

ANTICUERPOS HUMANOS A PD-L1

CAMPO DE LA INVENCION

[001] La presente invención se relaciona con anticuerpo humanos y fragmentos de unión de antígeno de los anticuerpos humanos que específicamente se unen al ligando receptor inmunomodulador de ligando 1 de muerte programada (PD-L1), y métodos terapéuticos y de diagnóstico del uso de esos anticuerpos.

DECLARACIÓN DEL ESTADO DEL ARTE RELACIONADO

[002] El ligando de muerte programada 1 (PD-L1) (también llamado B7-H1 o CD274) es un ligando de receptor de proteína de amino ácido 290 expresado ampliamente tanto en tejidos linfoides y no linfoides tales como células T CD4 y CD8, células de linaje macrófagas, tejidos periféricos, así como en células tumorales y células infectadas por virus (Dong y otros 1999, Nature Med.). PD-L1 se une a receptores PD-1 y B7-1 que pertenecen a la familia CD28/CTLA-4 (antígeno de linfocitos citotóxicos T)/ICOS (co-estimulador inducible) de los receptores de co-inhibidores de células T (Chen y otros 2013., Nature Rev. Immunol 13: 227-242) y atenúa la respuesta inmune mediante la inhibición de la activación de células T. La unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1 resulta en una disminución de la proliferación de células T y la secreción de citoquinas, comprometiendo respuestas inmunes humores y celulares en enfermedades como el cáncer y la infección viral.

[003] La expresión de PD-L1 en células tumorales y células infectadas por virus es explotada por tumores e infecciones virales crónicas para evadir la respuesta inmune. PD-L1 expresado en una amplia variedad de tumores y estudios en modelos animales ha demostrado que PD-L1 en tumores inhibe la activación de células T y la lisis de las células tumorales y puede conducir a aumento de la muerte de las células T específicas del tumor. En las infecciones virales crónicas,

PD-L1 se expresa en las células infectadas por virus uniéndose a PD-1 en las células T específicas del virus y estas células T se vuelven "agotadas" con pérdida de las funciones efectoras y la capacidad proliferativa (Freeman 2008, PNAS 105: 10275 a 10276). El sistema PD-1:PD-L1 también juega un papel importante en el desarrollo de células T regulatorias inducidas (Treg) y en el mantenimiento de la función Treg (Francisco y otros 2010, Immunol Rev. 236: 219-242).

[004] Puesto que PD-L1 juega un papel importante en la inmunidad de tumor y la inmunidad infecciosa, es un objetivo ideal para la inmunoterapia. El bloqueo de PD-L1 con antagonistas, incluyendo anticuerpos monoclonales, ha sido estudiado en tratamientos de cáncer y las infecciones virales crónicas (Ribas 2012, NEJM 366: 2517-2519; Freeman 2008, PNAS 105: 10275-10276; Sheridan 2012, Nature Biotechnology 30: 729-730).

[005] Los anticuerpos monoclonales para PD-L1 son conocidos en la técnica y han sido descritos, por ejemplo, en la patente/publicación de EE.UU. Nos. 7943742, 8383796, 8217149, 20090055944, 20120003056, 20130034559, 20130045200, 20130045201, 20130045202, y en WO2007005874, WO2011066.389, WO2010077634, EP1907424, y EP1899379.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[006] La presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos de los mismos que unen PD-L1. Los anticuerpos de la presente invención son útiles, entre otras cosas, para dirigirse a las células que expresan PD-L1 como las células cancerosas o células infectadas por virus, y para modular la actividad de PD-L1. En ciertas modalidades, los anticuerpos de la invención son útiles para inhibir o neutralizar la actividad de PD-L1 y para estimular la activación de células T, por ejemplo, bajo circunstancias en las que la destrucción mediada por células T es beneficioso o deseable. Los anticuerpos de la invención anti-PD-L1, o porciones de unión a antígeno del mismo, puede ser incluido como parte de

una molécula multi-específica de unión al antígeno, por ejemplo, para modular la respuesta inmune y/o para apuntar a los anticuerpos a un tipo de célula específico, tal como una célula tumoral, o una célula viralmente infectada. Los anticuerpos son útiles en el tratamiento de una enfermedad o trastorno tal como el cáncer y la infección viral.

[007] Los anticuerpos de la invención pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o anticuerpo IgG4) o pueden comprender sólo una porción de unión al antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')₂ o un fragmento scFv), y pueden ser modificados para afectar a la funcionalidad, por ejemplo, para eliminar las funciones efectoras residuales (Reddy y otros, 2000, J. Immunol 164:.. 1925-1933). En ciertas modalidades, los anticuerpos pueden ser bi-específicos.

[008] En un primer aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales aislados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a PD-L1. Los anticuerpos anti-PD-L1 ejemplares de la presente invención se enumeran en las Tablas 1 y 2 en el presente documento. La Tabla 1 presenta los identificadores de secuencia de aminoácidos de las regiones de la cadena pesada variable (HCVRs), las regiones determinantes de la cadena ligera de las regiones variables (LCVRs), las regiones determinantes de la cadena de complementariedad pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3), y la cadena ligera de complementariedad (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) de los anticuerpos anti-PD-L1 ejemplares. La Tabla 2 expone los identificadores de secuencia de ácido nucleico de los HCVRs, LCVRs, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de los anticuerpos anti-PD-L1 ejemplares.

[009] La presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, que comprende una HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de amino ácido HCVR enumerados en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente

similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la misma.

[010] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, que comprende una LCVR que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCVR enumerados en la Tabla 1, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la misma.

[011] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, que comprende una HCVR y un par de secuencias de aminoácido LCVR (HCVR / LCVR) que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCVR enumerados en la Tabla 1 junto con cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCVR listadas en la Tabla 1. De acuerdo con ciertas modalidades, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que comprende un par de secuencia de aminoácidos HCVR/LCVR contenida dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 ejemplares enumerados en la Tabla 1. En ciertas modalidades, el par de secuencia de aminoácidos HCVR/LCVR se selecciona del grupo que consiste en SEC ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106 , 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/170, 186/194, 202/210, 218/226, 234/242, 250/258, 266/274, 282/274, 290/274, 298/274, 306/274, 314/274, 322/274, 330/274, y 338/274. En ciertas modalidades, el par de secuencia de aminoácidos HCVR/LCVR se selecciona de una de SEC ID NOs: 82/90 (por ejemplo, H2M8314N), 162/170 (por ejemplo, H2M8718N), 306/274 (por ejemplo, H1H9364P2), y 314/274 (por ejemplo, H1 H9373P2). En ciertas otras modalidades, el par de secuencia de aminoácidos HCVR/LCVR se selecciona de una de SEC ID NOs: 98/106 (por ejemplo, H2M8316N), 146/154 (por ejemplo,

H2M8323N), 290/274 (por ejemplo, H1 H9351 P2) y 330/274 (por ejemplo, H1H9387P2).

[012] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, que comprende una cadena pesada CDR1 (HCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR1 listadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

[013] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, que comprende una cadena pesada CDR2 (HCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR2 listadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

[014] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, que comprende una cadena pesada CDR3 (HCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR3 listadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

[015] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, que comprende una cadena ligera CDR1 (LCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR1 listadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

[016] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, que comprende una cadena ligera CDR2

(LCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR2 listadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

[017] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, que comprende una cadena ligera CDR3 (LCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR3 listadas en la Tabla 1 o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia.

[018] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, que comprende un par de secuencias de aminoácidos HCDR3 y LCDR3 (HCDR3/LCDR3) que comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR3 listadas en la Tabla 1 junto con cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR3 listadas en la Tabla 1. De acuerdo con ciertas modalidades, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que comprenden un par de secuencias de aminoácidos HCDR3 / LCDR3 contenidas dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 ejemplares listados en la Tabla 1. En ciertas modalidades, el par de secuencia de aminoácidos HCDR3/LCDR3 se seleccionan del grupo que consiste en SEC ID NOs: 88/96 (por ejemplo, H2M8314N), 168/176 (por ejemplo, H2M8718N), 312/280 (por ejemplo, H1H9364P2) y 320/280 (por ejemplo, H1 H9373P2). En ciertas otras modalidades, el par de secuencia de aminoácidos HCDR3/LCDR3 se selecciona del grupo que consiste en SEC ID NOs: 104/112 (por ejemplo, H2M8316N), 152/160 (por ejemplo, H2M8323N), 296/280 (por ejemplo, H1H9351 P2), y 336/280 (por ejemplo, H1 H9387P2).

[019] La presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, que comprende un conjunto de seis CDRs (es

decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenidos dentro de cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 ejemplares listados en la Tabla 1. En ciertas modalidades, la secuencia de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1 -LCDR2-LCDR3 fijados se selecciona del grupo que consiste en SEC ID NOs: 84-86-88-92-94-96 (por ejemplo, H2M8314N); 164-166-168-172-174- 76 (por ejemplo, H2M8718N); 308-310-312-276-278-280 (por ejemplo, H1 H9364P2); y 316-318-320-276- 278-280 (por ejemplo, H1 H9373P2). En otras ciertas modalidades, la secuencia de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 fijada se selecciona del grupo que consiste en SEC ID NOs: 100-102-104-108-110-112 (por ejemplo, H2M8316N) ; 148-150-152-156-158-160 (por ejemplo, H2M8323N); 292-294-296-276-278-280 (por ejemplo, H1H9351P2); y 332-334-336-276-278-280 (por ejemplo, H1H9387P2).

[020] En una modalidad relacionada, la presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que comprenden un conjunto de seis CDRs (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contenidos dentro de un par de secuencia de aminoácido HCVR/LCVR como se define por cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 ejemplares listados en la Tabla 1. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno del mismo, que comprende la secuencia de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 fijada contenida dentro de un par de secuencia de aminoácidos HCVR/LCVR seleccionado de entre el grupo que consiste en SEC ID NOs: 82/90 (por ejemplo, H2M8314N), 98/106 (por ejemplo, H2M8316N), 146/154 (por ejemplo, H2M8323N), 162/170 (por ejemplo, H2M8718N), 290/274 (por ejemplo, H1H9351P2), 306/274 (por ejemplo, H1H9364P2), 314/274 (por ejemplo, H1H9373P2) y 330/274 (por ejemplo, H1H9387P2). Los métodos y técnicas para la identificación de las CDR dentro de las secuencias de aminoácidos HCVR y LCVR son bien conocidas en la técnica y pueden ser utilizadas para identificar CDRs dentro de las secuencias de

aminoácidos HCVR y/o LCVR específicas descritas en este documento. Las convenciones ejemplares que se pueden utilizar para identificar los límites de CDRs incluyen, por ejemplo, la definición de Kabat, la definición Chothia, y la definición AbM. En términos generales, la definición Kabat se basa en la variabilidad de secuencia, la definición de Chothia se basa en la localización de las regiones del bucle estructural, y la definición AbM es un compromiso entre los enfoques de Kabat y Chothia. Véase, por ejemplo, Kabat, "Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico," Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD (1991); Al-Lazikani y otros, J. Mol. Biol. 273: 927-948 (1997); y Martin y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 86: 9.268-9.272 (1989). Las bases de datos públicas también están disponibles para la identificación de secuencias de CDR dentro de un anticuerpo.

[021] La presente invención incluye anticuerpos anti-PD-L1 que tienen un patrón de glicosilación modificado. En algunas modalidades, la modificación para eliminar los sitios de glicosilación deseados pueden ser útiles, o un anticuerpo que carece de un resto de fucosa presente en la cadena de oligosacárido, por ejemplo, para aumentar la función de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) (ver Escudo y otros (2002) JBC 277: 26733). En otras aplicaciones, la modificación de galactosilación se puede hacer con el fin de modificar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

[022] La presente invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que compiten por la unión específica a PD-L1 con un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende las CDR de una HCVR y las CDR de una LCVR, donde la HCVR y la LCVR cada una tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias HCVR y LCVR listadas en la Tabla 1.

[023] La presente invención también proporciona anticuerpos aislados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que bloquean la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1. En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión a

antígeno del mismo que bloquea la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1 puede unirse al mismo epítipo en PD-L1 como PD-1/B7-1 o puede unirse a un epítipo diferente en PD-L1 como PD-1/B7-1. En ciertas modalidades, los anticuerpos de la invención que bloquean la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1 comprenden las CDR de una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las secuencias HCVR listadas en la Tabla 1; y las CDR de una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las secuencias de LCVR listadas en la Tabla 1.

[024] En modalidades alternativas, la presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que no bloquean la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1. En ciertas modalidades, la presente invención proporciona anticuerpos aislados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a PD-L1, donde los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos mejoran la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1. En algunas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno aislados de los mismos mejoran la unión de PD-L1 a PD-1/B7-1 comprenden las CDR de una HCVR, donde la HCVR tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 18, 66, 114, 130, 202, 218, 266, 282, 298, 322 y 338; y las CDR de una LCVR, donde la LCVR tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 26, 74, 122, 138, 210, 226, y 274. En algunas modalidades, los anticuerpos aislados o antígeno fragmentos de unión de los mismos comprenden un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR seleccionadas de entre el grupo que consiste en SEC ID NOs: 18/26 (por ejemplo, H2M8307N), 66/74 (por ejemplo, H2M8312N), 114/122 (por ejemplo, H2M8317N), 130/138 (por ejemplo, H2M8321N), 202/210 (por ejemplo, H1H9323P), 218/226 (por ejemplo, H1H9327P), 266/274 (por ejemplo, H1H9344P2), 282/274 (por ejemplo, H1H9345P2), 298/274 (por ejemplo, H1H9354P2), 322/274 (por ejemplo, H1H9382P2) y 338/274 (por ejemplo, H1H9396P2).

[025] La presente invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a PD-L1 de especie humana o de otro tipo. En ciertas modalidades, los anticuerpos pueden unirse a PD-L1 humano y/o al PD-L1 de Cynomolgus.

[026] La presente invención también proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que compiten por la unión a PD-L1 con un anticuerpo de referencia o de unión a antígeno del fragmento de la misma que comprende las CDR de una HCVR y las CDR de una LCVR, donde el HCVR y LCVR cada uno tiene una secuencia de aminoácidos seleccionadas de las secuencias HCVR y LCVR listadas en la Tabla 1.

[027] En una modalidad, la invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno que tiene una o más de las siguientes características: (a) bloquea la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1; (b) se une específicamente a PD-L1 humano y/o PD-L1 Cynomolgus; (c) inhibe la proliferación de células T en un ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR); y (d) aumenta la secreción de IL-2 y/o interferón-gamma en un ensayo MLR.

[028] En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede unirse específicamente al PD-L1 de una manera agonista, es decir, puede aumentar o estimular la unión y/o actividad de PD-L1; en otras modalidades, el anticuerpo puede unirse específicamente a PD-L1 de manera antagonista, es decir, puede bloquear la unión de PD-L1 a su receptor.

[029] En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la presente invención son bi-específicos y comprenden una primera especificidad de unión a PD-L1 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítipo objetivo. El segundo epítipo objetivo puede ser otro epítipo en PD-L1 o en una proteína diferente, tal como un co-inhibidor de células T. En ciertas modalidades, el epítipo objetivo puede estar en una célula diferente, incluyendo por ejemplo,

una célula T diferente, una célula B, una célula tumoral, una célula de tejido autoinmune o una célula viralmente infectada.

[030] En un segundo aspecto, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos o porciones de anticuerpos PD-L1 de la misma. Por ejemplo, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCVR listados en la Tabla 1; en ciertas modalidades la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótido elegida entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico HCVR listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.

[031] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCVR listados en la Tabla 1; en ciertas modalidades la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótido elegida entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCVR listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.

[032] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR1 listadas en la Tabla 1; en ciertas modalidades la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótido elegida entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico HCDR1 listados en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.

[033] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR2 listadas en la Tabla 1; en ciertas modalidades la molécula de ácido nucleico comprende una

secuencia de polinucleótido elegida entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico HCDR2 listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.

[034] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCDR3 listadas en la Tabla 1; en ciertas modalidades la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótido elegida entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico HCDR3 listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.

[035] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR1 listadas en la Tabla 1; en ciertas modalidades la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótido elegida entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCDR1 listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.

[036] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR2 listadas en la Tabla 1; en ciertas modalidades la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótido elegida entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCDR2 listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.

[037] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCDR3 listadas en la Tabla 1; en ciertas modalidades la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia

de polinucleótido elegida entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCDR3 listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99 % de identidad de secuencia con la misma.

[038] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican un HCVR, donde el HCVR comprende un conjunto de tres CDRs (es decir, HCDR1-HCDR2-HCDR3), donde la secuencia de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3 establecido es como se define por cualquier de los anticuerpos anti-PD-L1 ejemplares listados en la Tabla 1.

[039] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifica un LCVR, donde el LCVR comprende un conjunto de tres CDRs (es decir, LCDR1-LCDR2-LCDR3), donde la secuencia de aminoácidos LCDR1-LCDR2-LCDR3 establecida es como se define por cualquier de los anticuerpos anti-PD-L1 ejemplares listados en la Tabla 1.

[040] La presente invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican tanto un HCVR como un LCVR, donde el HCVR comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCVR listadas en la Tabla 1, y donde el LCVR comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos LCVR listadas en la Tabla 1. En ciertas modalidades, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de polinucleótido elegida entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico HCVR listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la misma, y una secuencia de polinucleótido elegida entre cualquiera de las secuencias de ácido nucleico LCVR listadas en la Tabla 2, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la misma. En ciertas modalidades de acuerdo con este aspecto de la invención, la

molécula de ácido nucleico codifica un HCVR y un LCVR, donde el HCVR y LCVR ambos derivan del mismo anticuerpo anti-PD-L1 listado en la Tabla 1.

[041] En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona vectores de expresión recombinantes capaces de expresar un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada o ligera de un anticuerpo anti-PD-L1. Por ejemplo, la presente invención incluye vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente, es decir, las moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las HCVR, LCVR, y/o secuencias de CDR como se expone en la Tabla 1. También se incluyen dentro del alcance de la presente invención células huésped en las que se han introducido tales vectores, así como métodos de producción de los anticuerpos o porciones de los mismos mediante el cultivo de las células huésped en condiciones que permiten la producción de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, y la recuperación de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos producidos.

[042] En un tercer aspecto, la presente invención proporciona moléculas de unión de antígeno multi-específicas y fragmentos de unión al antígeno que comprenden una primera especificidad de unión al antígeno que se une específicamente a PD-L1 y una segunda especificidad de unión al antígeno que se une específicamente a un antígeno seleccionado del grupo que consiste de PD-L1, un antígeno específico de célula tumoral, un antígeno específico de las células infectadas, y un co-inhibidor de células T. En ciertas modalidades, la primera especificidad de unión al antígeno puede comprender tres CDR derivadas de una HCVR con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias HCVR de la Tabla 1 y tres CDR derivadas de un LCVR con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las secuencias de LCVR de la Tabla 1. En una modalidad, la primera especificidad de unión al antígeno puede comprender un dominio extracelular de PD-1 o de B7-1, o un fragmento del mismo. La segunda

especificidad de unión al antígeno se puede orientar a un antígeno en la misma célula que PD-L1 o en una célula diferente del mismo tipo de tejido o de un tipo de tejido diferente. Por ejemplo, la molécula de unión al antígeno multi-específica se puede unir a una célula T donde la primera especificidad de unión al antígeno puede unirse específicamente a PD-L1 y la segunda especificidad de unión al antígeno puede unirse a un co-inhibidor de las células T en la célula T. Alternativamente, en otra modalidad, la primera especificidad de unión al antígeno se une específicamente a PD-L1 en una célula T y la segunda especificidad de unión al antígeno está dirigido a un antígeno/receptor en una célula B o una célula macrófago o presentadora de antígeno. En ciertas modalidades, la segunda especificidad de unión al antígeno se dirige a un antígeno sobre una célula tumoral, o en una célula infectada con un virus. En una modalidad, la primera especificidad de unión al antígeno comprende un dominio extracelular de PD-1 y la segunda especificidad de unión al antígeno se une a un epítipo diferente en PD-L1. En ciertas modalidades, la primera especificidad de unión al antígeno se une a PD-L1 con una menor afinidad, por ejemplo, con una KD de más de 10^{-8} M, más de 10^{-7} M, más de 10^{-6} M, o más de 10^{-5} M.

[043] En un cuarto aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humano recombinante o fragmento de unión al antígeno del mismo que une específicamente a PD-L1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un aspecto relacionado, la invención presenta una composición que es una combinación de un anticuerpo anti-PD-L1 y un segundo agente terapéutico. En una modalidad, el segundo agente terapéutico es cualquier agente que se combina ventajosamente con un anticuerpo anti-PD-L1. Los agentes ejemplares que se pueden combinar ventajosamente con un anticuerpo anti-PD-L1 incluyen, sin limitación, a otros agentes que se unen y/o modulan la señalización de PD-L1 (incluyendo otros anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, etc.) y/o agentes que no se unen directamente a

PD-L1 pero no obstante modulan la activación de células inmunes. Las terapias de combinación adicionales y las co-formulaciones que implican los anticuerpos anti-PD-L1 y moléculas de unión al antígeno multi-específicas de la presente invención se describen en este documento.

[044] En un quinto aspecto, la invención proporciona métodos para modular la respuesta inmune en un sujeto, el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-PD-L1 o de sus fragmentos de unión al antígeno de la invención al sujeto en necesidad. En ciertas modalidades, la invención proporciona métodos para mejorar la respuesta inmune en un sujeto, los métodos comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención que se une a PD-L1 y bloquea la unión de PD-L1 a PD-1 o a B7-1. En una modalidad, la invención proporciona un método para estimular o potenciar la activación de células T en un sujeto, el método comprende la administración de un anticuerpo bloqueante o fragmento de unión de antígeno del mismo de la invención al sujeto en necesidad. En una modalidad, la invención proporciona métodos para inhibir una célula T reguladora (Treg) en un sujeto, los métodos comprenden la administración de un anticuerpo de bloqueo o de sus fragmentos de unión al antígeno de la invención al sujeto en necesidad. En ciertas modalidades, el sujeto en necesidad puede sufrir de una enfermedad o trastorno tal como el cáncer o la infección viral. En modalidades alternativas, la presente invención proporciona métodos para inhibir la activación de células T, los métodos comprenden la administración de un anticuerpo de activación o de sus fragmentos de unión al antígeno de la invención a un sujeto en necesidad. En ciertas modalidades adicionales, el sujeto en necesidad puede sufrir de una enfermedad autoinmune.

[045] En un sexto aspecto, la invención proporciona métodos terapéuticos para tratar una enfermedad o trastorno, por ejemplo, cáncer o infección viral, en un sujeto usando un anticuerpo anti-PD-L1 o una porción de unión al antígeno de un

anticuerpo de la invención, donde los métodos terapéuticos comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de un anticuerpo de la invención al sujeto en necesidad. El trastorno tratado es cualquier enfermedad o condición que es mejorada, inhibida o impedida por la estimulación o inhibición de la unión o actividad de PD-L1. En ciertas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención se administra en combinación con un segundo agente terapéutico al sujeto en necesidad. El segundo agente terapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste de un anticuerpo a un co-inhibidor de células T, un anticuerpo para un antígeno de célula tumoral, un anticuerpo para un receptor de células T, un anticuerpo para un receptor Fc, un anticuerpo para un epítipo en una célula viralmente infectada, un anticuerpo a PD-1, un agente citotóxico, un fármaco anti-cáncer, un fármaco anti-viral, un fármaco anti-inflamatorio (por ejemplo, corticosteroides), un antagonista VEGF, y cualquier otra droga o terapia conocida en la técnica. En ciertas modalidades, el segundo agente terapéutico puede ser un agente que ayuda a contrarrestar o reducir cualquier efecto secundario posible (s) asociado con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención, si tal el efecto (s) secundario ocurre.

[046] En ciertas modalidades, la presente invención proporciona métodos para suprimir el crecimiento tumoral. En ciertas modalidades, la presente invención proporciona métodos para mejorar la supervivencia de pacientes con cáncer. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer primario y/o cáncer recurrente, incluyendo el cáncer de cerebro (por ejemplo, glioblastoma multiforme), cáncer de pulmón (por ejemplo, células cancerígenas de pulmón no pequeñas), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinoma de células de riñón, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de próstata, y cáncer de colon. Los métodos comprenden la administración de una composición

farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-PD-L1 de la presente invención en combinación con un segundo agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste de un factor de crecimiento endotelial vascular antagonista (VEGF) (por ejemplo, aflibercept , bevacizumab), un inhibidor AN-2 angiopoyetina (Ang2) (por ejemplo, un anticuerpo anti-Ang2 como nesvacumab), un inhibidor de la activación de genes de linfocitos 3 (LAG-3), un inhibidor antígeno de linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4) (por ejemplo, ipilimumab), un inhibidor de CCR4 (por ejemplo, mogamulizumab), un agente quimioterapéutico, y terapia de radiación. Otros ejemplos adicionales de terapias /agentes terapéuticos adicionales que se pueden utilizar en combinación con un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención para uso en el tratamiento del cáncer se describen en este documento.

[047] El anticuerpo o fragmento del mismo se puede administrar por vía subcutánea, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, por vía oral, por vía intramuscular, o por vía intracraneal. El anticuerpo o fragmento del mismo se pueden administrar en una dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg /kg de peso corporal del sujeto.

[048] La presente invención también incluye el uso de un anticuerpo anti-PD-L1 o fragmento de unión al antígeno de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer e infección viral crónica) que se beneficiarían del bloqueo o la mejora de la unión y/o señalización de PD-L1.

[049] Otras modalidades serán evidentes a partir de una revisión de la descripción detallada que aparece a continuación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[050] La Figura 1 es un esquema del bioensayo PD-L1 a base de luciferasa descrito en el Ejemplo 8 en el presente documento. Panel A: células Jurkat

inactivas; Panel B: células Jurkat se activan por medio del receptor de células T (TCR) a través de la agrupación del anticuerpo biespecífico CD3xCD20; Panel C: activación de PD-1 atenúa la respuesta en las células Jurkat activadas; Grupo D: el bloqueo de PD-L1 rescata la respuesta en las células Jurkat activadas.

[051] La Figura 2 ilustra el crecimiento del tumor y los resultados de supervivencia de los ratones implantados con células de tumor de colon-26 en el día 0 y tratados con las combinaciones indicadas de moléculas por inyección en los días 3, 6, 10, 13 y 19 ("modelo de tratamiento temprano de tumor"). El gráfico muestra el volumen del tumor (en mm³) para los diferentes grupos experimentales en diversos puntos de tiempo después de la implantación. Las flechas ascendentes a lo largo del eje X indican la temporización de las inyecciones del tratamiento. "mIgG2a" es el control del isotipo IgG2; "Fc" es el control Fc humana; "VEGF Trap" es aflibercept; "Anti-PD-1" es anti-PD-1 de ratón clon RPMI-14; "Anti-PD-L1" es un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 como se describe en este documento.

[052] La Figura 3 ilustra el crecimiento del tumor y los resultados de supervivencia de los ratones implantados con células de tumor de colon-26 en el día 0 y tratados con las combinaciones indicadas de moléculas por inyección en los días 3, 6, 10, 13 y 19 ("modelo de tratamiento temprano de tumor"). El gráfico muestra el volumen del tumor (en mm³) de ratones individuales en cada grupo experimental en el día 28 después de la implantación. "mIgG2a" es el control del isotipo IgG2; "Fc" es el control Fc humana; "VEGF Trap" es aflibercept; "Anti-PD-1" es anti-PD-1 de ratón clon RPMI-14; "Anti-PD-L1" es un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 como se describe en este documento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[053] Antes de describir los presentes métodos, se debe entender que esta invención no está limitada a los métodos particulares, y las condiciones experimentales descritas, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar.

También se debe entender que la terminología utilizada acá es para el propósito de describir únicamente las modalidades particulares, y no pretende ser limitante, dado que el alcance de la presente invención se limitará únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

[054] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen ahora los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas aquí se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

[055] El término "PD-L1" se refiere al ligando de muerte programada 1, también conocido como CD274 y B7H1. La secuencia de aminoácidos de longitud completa PD-L1 se proporciona en GenBank con el número de acceso NP_054862.1 y también se denomina en este documento como SEC ID NO: 351. El término "PD-L1" también incluye variantes de la proteína PD-L1 que tienen la secuencia de aminoácidos de SEC ID NOs: 345, 346, 347 o 348. El término "PD-L1" incluye PD-L1 recombinante o un fragmento del mismo. El término también abarca PD-L1 o un fragmento del mismo acoplado a, por ejemplo, etiqueta de histidina, Fc de ratón o humano, o una secuencia de señal tal como ROR1. Por ejemplo, el término incluye secuencias ejemplificadas por SEC ID NO: 347 o 348, que comprende un Fc de ratón (mIgG2a) o Fc humano (hIgG1) en el extremo C-terminal, acoplado a los residuos de aminoácidos 19-239 de longitud completa PD-L1 (SEC ID NO: 351; NP_054862.1). Las variantes de proteínas como se ejemplifica por la SEC ID NO: 345 comprenden una etiqueta de histidina en el extremo C-terminal, acoplado a los residuos de aminoácidos 19-239 de

NP_054862.1. A menos que se especifique como procedente de una especie no humana, el término "PD-L1" significa PD-L1 humano.

[056] PD-L1 es una proteína de aminoácido 290 con dominios de tipo IgV y IgC extracelulares (aminoácidos 19-239 de longitud completa PD-L1), un dominio transmembranal y un dominio intracelular de aproximadamente 30 aminoácidos. PD-L1 se expresa constitutivamente en muchas células tales como las células presentadoras de antígenos (por ejemplo, células dendríticas, macrófagos y células B) y en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas (por ejemplo, células vasculares endoteliales, islotes pancreáticos, y sitios de privilegio inmune). PD-L1 se expresa también en una amplia variedad de tumores y células infectadas por virus y es un componente del medio inmunosupresor (Ribas 2012, NEJM 366: 2517-2519). PD-L1 se une a uno de los dos co-inhibidores de las células T, PD-1 y B7-1.

[057] El término "PD-1" se refiere a la proteína de la muerte programada-1, un co-inhibidor de las células T, también conocido como CD279. La secuencia de aminoácidos de longitud completa PD-1 se proporciona en GenBank con el número de acceso NP_005009.2 y también se denomina en este documento como SEC ID NO: 352. El término también abarca PD-1 o un fragmento de la misma acoplado a, por ejemplo, etiqueta de histidina, Fc de ratón o humano, o una secuencia señal tal como ROR1. Por ejemplo, el término incluye secuencias ejemplificadas por SEC ID NO: 349 o 350, que comprenden un Fc de ratón (mIgG2a) o Fc humano (hIgG1) en el extremo C-terminal, acoplado a los residuos de aminoácidos 25-170 de NP_005009.2 con una cambio C93S.

[058] PD-1 es un miembro de la familia CD28/CTLA-4/ICOS de co-inhibidores de células T. PD-1 es una proteína de aminoácido 288 con un dominio N-terminal extracelular que es similar a IgV, un dominio transmembranal y un dominio intracelular que contiene un diseño inhibidor basado en tirosina inmunoreceptora (ITIM) y un diseño interruptor basado en tirosina inmunoreceptora (ITSM)

(Chattopadhyay y otros, 2009, Immunol. Rev.). El receptor PD-1 tiene dos ligandos, PD-L1 y PD-L2.

[059] El término "B7-1" se refiere al antígeno de activación de los linfocitos T, también conocido como factor coestimulador CD80. B7-1 es un receptor de membrana de aminoácido 288 con un dominio extracelular N-terminal que comprende regiones similares a IgV (aa 37-138) y IgC (aa 154-232), un dominio transmembranal (aa 243 - 263) y una región intracelular C-terminal (aa 263-288). La secuencia de aminoácidos de longitud completa B7-1 se proporciona en GenBank con el número de acceso NP 005182,1.

[060] Como se usa aquí, el término "co-inhibidor de célula T" se refiere a un ligando y/o receptor que modula la respuesta inmune a través de la activación o supresión de células T. El término "co-inhibidor de célula T", también conocido como co-molécula de señalización de células T, incluye, pero no se limita a, PD-1, proteína de activación de linfocitos del gen 3 (LAG-3, también conocida como CD223), antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), atenuador de linfocitos T y B (BTLA), CD-28, 2B4, LY108, inmunoglobulina de células T y mucina-3 (TIM3), inmunoreceptor de células T con inmunoglobulina e ITIM (TIGIT; también conocido como VSIG9), receptor de leucocitos asociado similar a inmunoglobulina 1 (LAIR1; también conocida como CD305), coestimulador inducible de células T (ICOS; también conocida como CD278), B7-1 (CD80), y CD160.

[061] El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, pretende referirse a moléculas de inmunoglobulina compuestas de cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro (es decir, "moléculas de anticuerpo completas"), así como multímeros de los mismos (por ejemplo, IgM) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de cadena pesada ("HCVR" o "V_H") y una región constante de cadena pesada (compuesto de los dominios CH1, CH2 y CH3). Cada cadena

ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera ("LCVR o"V_L") y una región constante de cadena ligera (CL). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones flanqueantes (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino-terminal a carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En ciertas modalidades de la invención, las FR del anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo) puede ser idéntica a las secuencias de la línea germinal humana, o puede ser modificada de forma natural o artificialmente. Una secuencia de consenso de aminoácidos puede definirse sobre la base de un análisis de lado a lado de dos o más CDRs.

[062] La sustitución de uno o más residuos de CDR u omisión de una o más CDR también es posible. Los anticuerpos se han descrito en la literatura científica donde uno o dos CDRs se pueden prescindir de la unión. Padlan y otros (1995 FASEB J. 9: 133-139) analiza las zonas de contacto entre los anticuerpos y sus antígenos, basadas en estructuras cristalinas publicadas, y llegó a la conclusión que sólo aproximadamente un quinto a un tercio de residuos de CDR hacen contactos en realidad con el antígeno. Padlan también encontró muchos anticuerpos donde uno o dos CDRs no tenían aminoácidos en contacto con un antígeno (véase también, Vajdos y otros 2002 J Mol Biol 320: 415-428).

[063] Los residuos de CDR que no hacen contactos con el antígeno pueden ser identificados en base a estudios anteriores (por ejemplo, residuos H60-H65 en CDRH2 no son requeridos frecuentemente), de las regiones de CDR de Kabat se encuentran fuera de CDRs de Chothia, por modelado molecular y/o empíricamente. Si se omite un CDR o residuo (s), por lo general es sustituido con un aminoácido que ocupa la posición correspondiente en otra secuencia de anticuerpo humano o un consenso de tales secuencias. Las posiciones de

sustitución dentro de CDRs y aminoácidos para sustituir también se pueden seleccionar empíricamente. Las sustituciones empíricas pueden ser sustituciones conservativas o no conservativas. [064] Los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 completamente humanos descritos en este documento pueden comprender uno o más sustituciones de aminoácidos, inserciones y/o deleciones en el marco y/o regiones CDR de los dominios variables de cadena pesada y ligera en comparación con las secuencias de línea germinal correspondientes. Tales mutaciones se pueden determinar fácilmente mediante la comparación de las secuencias de aminoácidos descritas en este documento a secuencias de la línea germinal disponibles en, por ejemplo, bases de datos de secuencias de anticuerpos públicas. La presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno, que se derivan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento, donde uno o más aminoácidos dentro de uno o más marcos y/o regiones CDR se mutan al residuo correspondiente de la secuencia de la línea germinal de la que se derivó el anticuerpo, o al residuo correspondiente de otra secuencia de la línea germinal humana, o para una sustitución conservadora de aminoácidos del residuo de la línea germinal correspondiente (tales cambios de secuencia se denominan aquí colectivamente como "mutaciones de línea germinal"). Una persona de habilidad ordinaria en la técnica, a partir de las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera descritas en este documento, puede producir fácilmente numerosos anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno que comprenden una o más mutaciones de la línea germinal individuales o combinaciones de los mismos. En ciertas modalidades, todos los residuos de marco y/o de CDR dentro de los dominios V_H y/o V_L están mutados de nuevo a los residuos encontrados en la secuencia de la línea germinal original de la que se derivó el anticuerpo. En otras modalidades, solamente ciertos residuos están mutados de nuevo a la secuencia de la línea germinal original, por ejemplo, solamente los residuos mutados se

encuentran dentro de los primeros 8 aminoácidos de FR1 o dentro de los últimos 8 aminoácidos de FR4, o sólo los residuos mutados se encuentran dentro de CDR1, CDR2 o CDR3. En otras modalidades, uno o más de residuos de marco y/o CDR se mutan al residuo correspondiente de una secuencia diferente de la línea germinal (es decir, una secuencia de la línea germinal que es diferente de la secuencia de línea germinal de la que se derivó originalmente el anticuerpo). Además, los anticuerpos de la presente invención pueden contener cualquier combinación de dos o más mutaciones de la línea germinal en las regiones de marco y/o CDR, por ejemplo, en el que ciertos residuos individuales están mutados al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal particular, mientras que algunos otros residuos que difieren de la secuencia de la línea germinal original se mantienen o se mutan al residuo correspondiente de una secuencia de línea germinal diferente. Una vez obtenidos, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos que contienen una o más mutaciones de la línea germinal se pueden ensayar fácilmente para una o más propiedades deseadas, tal como, la mejora de la especificidad de unión, mayor afinidad, propiedades biológicas antagonistas o agonistas mejoradas o mejoras de unión (según el caso), una inmunogenicidad reducida, etc. Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno obtenidos de esta manera están en general abarcados dentro de la presente invención.

[065] La presente invención también incluye anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 completamente humanos que comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos HCVR, LCVR, y/o CDR descritos en este documento que tienen una o más sustituciones conservadoras. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-PD-L1 que tienen secuencias de aminoácidos HCVR, LCVR, y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc. sustitutos de aminoácidos conservadores en relación a cualquiera de

las secuencias de aminoácidos HCVR, LCVR, y/o de CDR descritas en este documento.

[066] El término "anticuerpo humano", como se usa en este documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los mAbs humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humanos (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio in vitro o por mutación somática in vivo), por ejemplo en las CDRs y en particular, CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir mAbs donde las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero (por ejemplo, de ratón), se han injertado en las secuencias de FR humanas. El término incluye anticuerpos producidos de forma recombinante en un mamífero no humano, o en células de un mamífero no humano. El término no pretende incluir anticuerpos aislados o generados en un sujeto humano.

[067] El término "moléculas de unión a antígeno multi-específicas", tal como se utiliza aquí se refiere a fragmentos de unión de antígeno bi-específicos, tri-específicos o multi-específicos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Moléculas de unión a antígeno multi-específicas pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido objetivo o pueden contener dominios de unión a antígeno específicos para epítopos de más de un polipéptido objetivo. Una molécula de unión al antígeno multi-específica puede ser un solo polipéptido multifuncional, o puede ser un complejo multimérico de dos o más polipéptidos que están de forma covalente o están asociados entre sí de forma no covalente. El término "moléculas de unión a antígeno multi-específicas" incluye anticuerpos de la presente invención que puede estar vinculado a o co-expresado con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína. Por ejemplo, un

anticuerpo o fragmento de la misma pueden ser vinculados funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares, tales como una proteína o fragmento de la misma para producir una molécula bi-específica o una molécula multi-específica de unión al antígeno con una segunda especificidad de unión. Según la presente invención, el término "moléculas de unión a antígeno multi-específicas" también incluye anticuerpos bi-específicos, tri-específicos o multi-específicos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En ciertas modalidades, un anticuerpo de la presente invención está funcionalmente ligado a otro anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para producir un anticuerpo bi-específico con una segunda especificidad de unión. Los anticuerpos bi-específicos y multi-específicos de la presente invención se describen en este documento.

[068] El término "se une específicamente" o "se une específicamente a", o similares, significa que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable bajo condiciones fisiológicas. La unión específica puede caracterizarse por una constante de equilibrio de disociación de al menos aproximadamente 1×10^{-8} M o menos (por ejemplo, una KD menor indica una unión más fuerte). Los métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmón superficial, y similares. Como se describe en el presente documento, los anticuerpos han sido identificados por resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo, BIACORE™, que se unen específicamente a PD-L1. Además, los anticuerpos multi-específicos que se unen a un dominio en PD-L1 y uno o más antígenos adicionales o un bi-específico que se une a dos diferentes regiones de PD-L1 se consideran, sin embargo, los anticuerpos que "se unen específicamente", como se usa en el presente documento.

[069] El término "alta afinidad" anticuerpo se refiere a aquellos mAbs que tienen una afinidad de unión a PD-L1, expresado como KD, de al menos 10^{-8} M, preferiblemente 10^{-9} M; más preferiblemente 10^{-10} M, incluso más preferiblemente 10^{-11} M, incluso más preferiblemente 10^{-12} M, según se mide por resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo, BIACORE™ o solución afinidad ELISA.

[070] Por el término "tasa de retraso", "Koff" o "KD" se entiende un anticuerpo que se disocia de PD-L1, con una constante de velocidad de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menos, preferiblemente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos, como se determina por resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo, BIACORE™.

[071] Los términos "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, y similares, como se usa en el presente documento, incluye cualquier origen natural, enzimáticamente obtenible, sintético, o un polipéptido mediante ingeniería genética o glicoproteína que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los términos "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, o "fragmento de anticuerpo", como se usa en este documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse a PD-L1.

[072] En modalidades específicas, los fragmentos de anticuerpos o anticuerpos de la invención pueden conjugarse a una fracción tal como un ligando o una fracción terapéutica ("inmunoconjugado"), tal como un antibiótico, un segundo anticuerpo anti-PD-L1, o un anticuerpo a otro antígeno tal como un antígeno específico para tumores, un antígeno de células infectadas de forma viral, o un compañero de inhibidor de células T, o una inmunotoxina, o cualquier otra fracción terapéutica útil para tratar una enfermedad o condición, incluyendo por ejemplo, cáncer, infección viral, crónica o enfermedad autoinmune.

[073] Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos (Abs) que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo

aislado que une específicamente PD-L1 o un fragmento del mismo, está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de PD-L1.

[074] Un "anticuerpo bloqueante" o un "anticuerpo neutralizante", como se usa en el presente documento (o un "anticuerpo que neutraliza la actividad de PD-L1" o un "anticuerpo antagonista"), pretende referirse a un anticuerpo cuya unión a PD-L1 resulta en la inhibición de al menos una actividad biológica de PD-L1. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede prevenir o bloquear la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1.

[075] Un "anticuerpo activador" o un "anticuerpo mejorador", como se usa en el presente documento (o un "anticuerpo agonista"), pretende referirse a un anticuerpo cuya unión a los resultados de PD-L1 en el aumento o la estimulación de al menos una actividad biológica de PD-L1. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede aumentar o mejorar la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1.

[076] El término "resonancia de plasmón superficial", como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones biomoleculares en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensor, por ejemplo usando el sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ).

[077] El término " K_D ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de equilibrio de disociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno.

[078] El término "epítopo" se refiere a un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión específica de antígeno en la región variable de una molécula de anticuerpo conocida como un paratopo. Un antígeno único puede tener más de un epítopo. Por lo tanto, diferentes anticuerpos pueden unirse a diferentes áreas de un antígeno y pueden tener diferentes efectos biológicos. El término "epítopo"

se refiere también a un sitio en un antígeno al que responden células B y/o T. También se refiere a una región de un antígeno que está unida por un anticuerpo. Los epítomos pueden definirse como estructural o funcional. Los epítomos funcionales son generalmente un subconjunto de los epítomos estructurales y tienen aquellos residuos que contribuyen directamente a la afinidad de la interacción. Los epítomos también pueden ser conformacionales, es decir, compuesto de los aminoácidos no lineales. En ciertas modalidades, los epítomos pueden incluir determinantes que son agrupaciones de superficie activas químicamente de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, grupos fosforilo, o grupos sulfonilo, y, en ciertas modalidades, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas.

[079] El término "identidad sustancial" o "sustancialmente idénticos", cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento del mismo, indica que, cuando se alinean óptimamente con las inserciones de nucleótidos apropiados o supresiones con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), hay identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente 90%, y más preferiblemente al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las bases nucleotídicas, medida por cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencia, tales como FASTA, BLAST o GAP, como veremos a continuación. Una molécula de ácido nucleico que tiene una identidad sustancial con una molécula de ácido nucleico de referencia puede, en ciertos casos, codificar un polipéptido que tiene la misma o sustancialmente similar secuencia de aminoácidos que el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de referencia.

[080] Como se aplica a los polipéptidos, la expresión "similitud sustancial" o "sustancialmente similar" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean óptimamente, tal como mediante el programas GAP o BESTFIT usando pesos de separación por defecto, comparten al menos 90% de identidad de

secuencia, incluso más preferiblemente al menos 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia. Preferiblemente, las posiciones de residuos, que no son idénticos, difieren por sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es una en la que un residuo de aminoácido está sustituido por otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución conservadora de aminoácidos no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservadoras, el porcentaje o grado de similitud pueden ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, que se incorpora aquí por referencia. Ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales de hidroxilo alifático: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos aminoácidos de sustitución conservativa preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y glutamina-asparagina. Como alternativa, un reemplazo conservador es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 descrita en Gonnet y otros (1992) *Science* 256: 1443-45, incorporada aquí por referencia. Un reemplazo "moderadamente conservador" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz PAM250 diario de probabilidad.

[081] La similitud de secuencia para polipéptidos se mide típicamente usando software de análisis de secuencia. El software de análisis de proteínas compara secuencias similares usando medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservativas. Por ejemplo, el software GCG contiene programas tales como GAP y BESTFIT que se pueden usar con parámetros por defecto para determinar homología de secuencia o identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo salvaje y una muteína de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias polipeptídicas también se pueden comparar usando FASTA con parámetros por defecto o recomendados; un programa en GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona alineaciones e identidad de secuencia porcentual de las regiones de la mejor superposición entre las secuencias de consulta y de búsqueda (Pearson (2000) supra). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la invención a una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, especialmente BLASTP o TBLASTN, utilizando parámetros por defecto. Véase, por ejemplo, Altschul y otros (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 y (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3.389 a 3402, cada uno de los cuales se incorpora aquí por referencia.

[082] Por la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad que produce el efecto deseado para el que se administra. La cantidad exacta dependerá de la finalidad del tratamiento, y será determinable por un experto en la técnica usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lloyd (1999) El Arte, Ciencia y Tecnología de la formulación magistral).

[083] Como se usa en este documento, el término "sujeto" se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, en necesidad de mejora, prevención y/o tratamiento

de una enfermedad o trastorno como la infección viral crónica, cáncer o enfermedad autoinmune.

[084] Como se usa en este documento, "fármaco contra el cáncer" significa cualquier agente útil para el tratamiento de cáncer, incluyendo, pero no limitado a, citotoxinas y agentes tales como antimetabolitos, agentes alquilantes, antraciclinas, antibióticos, agentes antimicóticos, procarbazona, hidroxiurea, asparaginasa, corticosteroides, mitotano (O,P'-(DDD)), interferones y agentes radiactivos. Tal como se usa en este documento, "un agente citotóxico o citotoxina" significa cualquier agente que es perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen Taxol® (Paclitaxel), citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, coichicin, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

[085] Tal como se usa en el presente documento, el término "fármaco antiviral" se refiere a cualquier medicamento o terapia que se usa para tratar, prevenir o mejorar una infección viral en un sujeto huésped. El término "fármaco anti-viral" incluye, pero no se limita a la zidovudina, la lamivudina, el abacavir, la ribavirina, lopinavir, efavirenz, cobicistat, tenofovir, rilpivirina, analgésicos y corticosteroides. En el contexto de la presente invención, las infecciones virales incluyen a largo plazo o infecciones crónicas causadas por virus, incluyendo, pero no limitado a, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (HBV), virus de la hepatitis C (HCV), virus del papiloma humano (HPV), virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), y el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV).

[086] Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la presente invención se unen específicamente a PD-L1 y modular la interacción de PD-L1 con PD-1 o con B7-1. Los anticuerpos anti-PD-L1 pueden unirse a PD-L1 con alta afinidad o

con baja afinidad. En ciertas modalidades, los anticuerpos de la presente invención están bloqueando los anticuerpos en los que los anticuerpos se unen a PD-L1 y bloquean la interacción de PD-L1 con PD-1 o con B7-1. En algunas modalidades, los anticuerpos de bloqueo de la invención bloquean la unión de PD-L1 a PD-1 o a B7-1 y/o estimulan o potencian la activación de células T. En algunas modalidades, los anticuerpos de bloqueo son útiles para estimular o potenciar la respuesta inmune y/o para el tratamiento de un sujeto que padece cáncer, o una infección viral crónica. Los anticuerpos cuando se administran a un sujeto en necesidad de los mismos puede reducir la infección crónica por un virus como el VIH, LCMV o HBV en el sujeto. Se pueden usar para inhibir el crecimiento de células tumorales en un sujeto. Se pueden usar solos o como complemento de la terapia con otros restos terapéuticos o modalidades conocidas en la técnica para el tratamiento del cáncer, o infección viral. En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-PD-L1 que se unen a PD-L1 con una baja afinidad se utilizan como moléculas multi-específicas de unión al antígeno donde la primera especificidad de unión se une a PD-L1 con una baja afinidad y la segunda especificidad de unión se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un epítipo diferente de PD-L1, un co-inhibidor de célula T tal como PD-1, un antígeno específico de tumor y un antígeno específico para células infectadas.

[087] En ciertas modalidades, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos agonistas, donde los anticuerpos se unen al PD-L1 y mejoran la interacción de PD-L1 y PD-1/B7-1. En algunas modalidades, los anticuerpos activadores potencian la unión de PD-L1 a PD-1 o a B7-1 y/o inhiben o suprimen la activación de células T. Los anticuerpos de activación de la presente invención pueden ser útiles para inhibir la respuesta inmune en un sujeto y/o para el tratamiento de enfermedad autoinmune.

[088] En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-PD-L1 son moléculas de unión al antígeno multi-específicas, que comprenden una primera especificidad de unión

a PD-L1 y una segunda especificidad de unión a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un diferente epítipo de PD-L1, un co-inhibidor de célula T tales como PD-1, un antígeno específico de tumor y un antígeno específico de células infectadas. En ciertas modalidades, la primera especificidad de unión se une a PD-L1 con baja afinidad, por ejemplo, con una K_D de 10^{-8} M, 10^{-7} M o más.

[089] Ciertos anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención son capaces de unirse a y neutralizar la actividad de PD-L1, como se determina por ensayos in vitro o ensayos in vivo. La capacidad de los anticuerpos de la invención para unirse y neutralizar la actividad de PD-L1 se puede medir usando cualquier método estándar conocido por los expertos en la técnica, incluyendo ensayos de unión, o ensayos de actividad, como se describe en el presente documento.

[090] Los ensayos in vitro ejemplares no limitantes para medir la actividad de unión se ilustran en el Ejemplo 3, en el presente documento. En el Ejemplo 3, las afinidades de unión y las constantes cinéticas de los anticuerpos humanos anti-PD-L1 para PD-L1 humanos y PD-L1 Cynomolgus se determinó por resonancia de plasmón superficial y las mediciones se realizaron en un instrumento Biacore T200. En los Ejemplos 4 y 5, se utilizaron ensayos de bloqueo para determinar la capacidad de los anticuerpos anti-PD-L1 para bloquear la capacidad de unión de PD-L1 de PD-1 o B7-1 in vitro. En el Ejemplo 6, se utilizaron ensayos de bloqueo para determinar la competencia cruzada entre diferentes anticuerpos anti-PD-L1. El Ejemplo 7 describe la unión de los anticuerpos a las células que sobreexpresan PD-L1. En el Ejemplo 8, se utilizó un ensayo de luciferasa para determinar la capacidad de los anticuerpos anti-PD-L1 para antagonizar la señalización de PD-1/PD-L1 en células T.

[091] En ciertas modalidades, los anticuerpos de la presente invención son capaces de mejorar o estimular la activación de células T in vitro y en un sujeto con cáncer o en un sujeto infectado con un virus tal como LCMV. En ciertas modalidades, los anticuerpos de la presente invención se usan en combinación

con un segundo agente terapéutico, tal como un anticuerpo a un antígeno específico de tumor o un co-inhibidor de células T, para potenciar la respuesta inmune e inhibir el crecimiento del tumor en un sujeto. En ciertas modalidades, los anticuerpos agonistas de la invención son capaces de mejorar la unión PD-L1 a PD-1 o B7-1 y pueden inhibir la activación de células T in vitro y/o en un sujeto con enfermedad autoinmune.

[092] Los anticuerpos específicos para PD-L1 pueden no contener etiquetas o restos adicionales, o pueden contener una etiqueta o resto N-terminal o C-terminal. En una modalidad, la etiqueta o la fracción es biotina. En un ensayo de unión, la ubicación de una etiqueta (si existe) puede determinar la orientación del péptido con respecto a la superficie sobre la que se une el péptido. Por ejemplo, si una superficie está recubierta con avidina, un péptido que contiene una biotina N-terminal se orientará de tal manera que la porción C-terminal del péptido será distal a la superficie. En una modalidad, la etiqueta puede ser un radionúclido, un colorante fluorescente o una etiqueta detectable por MRI. En ciertas modalidades, tales anticuerpos marcados pueden usarse en ensayos de diagnóstico, incluyendo ensayos de formación de imágenes.

Fragmentos de Unión de Antígeno o Anticuerpos

[093] A menos que se indique específicamente lo contrario, el término "anticuerpo", como se usa en este documento, deberá entenderse que abarca moléculas de anticuerpos que comprenden dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina (es decir, "moléculas de anticuerpos completas"), así como los fragmentos de unión al antígeno de los mismos. Los términos "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo, y similares, como se usa en el presente documento, incluye cualquier origen natural, enzimáticamente obtenible, sintético, o un polipéptido obtenido mediante ingeniería genética o glicoproteína que une

específicamente un antígeno para formar un complejo. Los términos "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo, o "fragmento de anticuerpo", como se usa en este documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a PD-L1. Un fragmento de anticuerpo puede incluir un fragmento Fab, un $F(ab')_2$, un fragmento Fv, un fragmento dAb, un fragmento que contiene un CDR, o un CDR aislado. En ciertas modalidades, el término "fragmento de unión al antígeno" se refiere a un polipéptido o fragmento del mismo de una molécula de unión al antígeno multi-específica. De tales modalidades, el término "fragmento de unión al antígeno" incluye, por ejemplo, un dominio extracelular de PD-1 que se une específicamente a PD-L1. Los fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo se puede derivar, por ejemplo, de moléculas de anticuerpos completas utilizando cualquiera de las técnicas estándar adecuadas, tales como técnicas de ingeniería genética recombinante o de digestión proteolítica que implican la manipulación y la expresión de codificación variable del ADN del anticuerpo y (opcionalmente) dominios constantes. Tal ADN se conoce y/o está fácilmente disponible a partir de, por ejemplo, fuentes comerciales, bancos de ADN (incluyendo, por ejemplo, bibliotecas de fagos de anticuerpos), o se pueden sintetizar. El ADN puede ser secuenciado y manipulado químicamente o mediante el uso de técnicas de biología molecular, por ejemplo, para disponer uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, añadir o eliminar aminoácidos, etc.

[094] Ejemplos no limitativos de fragmentos de unión al antígeno incluyen: (i) fragmentos Fab; (ii) $F(ab')_2$; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas Fv (scFv) de cadena sencilla; (vi) fragmentos dAb; y (vii) unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan la región hipervariable de un anticuerpo (por ejemplo, una región determinante de complementariedad aislada (CDR) tal como un péptido CDR3), o un péptido FR3-

CDR3-FR4 restringido. Otras moléculas de ingeniería, tales como anticuerpos de dominio específico, anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio suprimido, anticuerpos quiméricos, anticuerpos injertados con CDR, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, nanocuerpos (por ejemplo, nanocuerpos monovalentes, nanocuerpos bivalentes, etc.), inmuno-farmacéuticos modulares pequeños (SMIPs), y dominios IgNAR variables tiburón, también se incluyen dentro de la expresión "fragmento de unión al antígeno", como se usa en el presente documento.

[095] Un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo comprenderá típicamente al menos un dominio variable. El dominio variable puede ser de cualquier tamaño o composición de aminoácidos y comprenderá generalmente al menos un CDR, que se encuentra junto a o en el marco de una o más secuencias de marco. En los fragmentos de unión al antígeno que tiene un dominio V_H asociada con un dominio V_L , los dominios V_H y V_L pueden estar situados uno con relación al otro en cualquier disposición adecuada. Por ejemplo, la región variable puede ser dimérica y contener dímeros V_H - V_H , V_H - V_L o V_L - V_L . Alternativamente, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener un dominio V_H o V_L monomérico.

[096] En ciertas modalidades, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo puede contener al menos un dominio variable unido covalentemente a al menos un dominio constante. Las configuraciones ejemplares no limitativas de dominios variables y constantes que se pueden encontrar dentro de un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la presente invención incluyen: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; y (xiv) V_L - C_L . En cualquier configuración de los dominios variables y constantes, incluyendo cualquiera de las configuraciones ejemplares mencionados anteriormente, los dominios variables y constantes pueden estar o

bien directamente unidos entre sí o pueden estar unidos por una región de bisagra o un enlazador completo o parcial. Una región de bisagra puede constar de al menos 2 (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 o más) aminoácidos, que resultan en una unión flexible o semi-flexible entre la variable adyacente y/o los dominios constantes en una sola molécula de polipéptido. Por otra parte, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la presente invención puede comprender un homo-dímero o hetero-dímero (u otro multímero) de cualquiera de las configuraciones de dominio variables y constante mencionadas anteriormente en asociación no covalente entre sí y/o con uno o más dominios V_H o V_L monoméricos (por ejemplo, mediante un puente (s) disulfuro).

[097] Al igual que con las moléculas de anticuerpos completas, los fragmentos de unión al antígeno pueden ser monoespecíficos o multi-específicos (por ejemplo, bi-específico). Un fragmento de unión al antígeno multi-específico de un anticuerpo comprenderá típicamente al menos dos dominios variables diferentes, en donde cada dominio variable es capaz de unirse específicamente a un antígeno separado o a un epítipo diferente en el mismo antígeno. Cualquier formato de anticuerpos multi-específicos, incluyendo los formatos ejemplares bi-específicos de anticuerpos descritos en este documento, pueden ser adaptados para su uso en el contexto de un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo de la presente invención utilizando técnicas rutinarias disponibles en la técnica.

Preparación de Anticuerpos Humanos

[098] Los métodos para la generación de anticuerpos humanos en ratones transgénicos se conocen en la técnica. Cualquiera de estos métodos conocidos se puede utilizar en el contexto de la presente invención para hacer anticuerpos humanos que se unen específicamente a PD-L1.

[099] Un inmunógeno que comprende cualquiera de los siguientes puede usarse para generar anticuerpos contra PD-L1. En ciertas modalidades, los anticuerpos

de la invención se obtienen a partir de ratones inmunizados con un inmunógeno primario, tal como PD-L1 de longitud completa [Ver el número de acceso GenBank NP_054862.1 (SEC ID NO: 351)] o con una forma recombinante de PD-L1 o fragmentos de PD-L1 humano modificado (SEC ID NO: 345, 347 o 348) o con fragmentos de PD-L1 Cynomolgus modificado (SEC ID N°: 346), seguido de inmunización con un inmunógeno secundario, o con un fragmento inmunogénicamente activo de PD-L1.

[0100] En ciertas modalidades, el inmunógeno puede ser un péptido desde el terminal N o el extremo terminal C de PD-L1. En una modalidad, el inmunógeno es el dominio similar a IgV y/o IgC extracelular de PD-L1. En ciertas modalidades de la invención, el inmunógeno es un fragmento de PD-L1 que va desde aproximadamente los residuos de aminoácidos 19-239 de SEC ID NO: 351 (NP_054862.1).

[0101] En algunas modalidades, el inmunógeno puede ser un péptido PD-L1 recombinante expresado en E. coli o en otras células eucariotas o de mamíferos tales como células de ovario de hámster chino (CHO).

[0102] En ciertas modalidades, los anticuerpos que se unen específicamente a PD-L1 se pueden preparar usando fragmentos de las regiones mencionadas anteriormente, o péptidos que se extienden más allá de las regiones designadas por aproximadamente 5 a aproximadamente 20 residuos de aminoácidos de cualquiera, o ambos, del terminal N o C extremos de las regiones descritas en el presente documento. En ciertas modalidades, cualquier combinación de las regiones anteriormente descritas o fragmentos de los mismos pueden ser utilizados en la preparación de anticuerpos específicos de PD-L1.

[0103] Utilizando la tecnología de VELOCIMMUNE® (véase, por ejemplo, EE.UU 6.596.541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) o cualquier otro método conocido para la generación de anticuerpos monoclonales, los anticuerpos quiméricos de alta afinidad de PD-L1 están aislados inicialmente teniendo una

región variable humana y una región constante de ratón. La tecnología VELOCIMMUNE® implica la generación de un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden genomas humanos unidos operativamente a la región endógena constante del ratón de tal forma que el ratón produce un anticuerpo que comprende una región variable humana y una región constante de ratón en respuesta al estímulo del antigénico. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se aísla y se unen operativamente al ADN que codifica las regiones humanas constantes de cadena pesada y ligera. El ADN se expresa entonces en una célula capaz de expresar el anticuerpo completamente humano.

Bioequivalentes

[0104] Los anticuerpos anti-PD-L1 y fragmentos de anticuerpo de la presente invención abarcan proteínas que tienen secuencias de aminoácidos que varían de las de los anticuerpos descritos, pero que retienen la capacidad de unirse a PD-L1. Tales variantes de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos comprenden una o más adiciones, deleciones, o sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia madre, pero exhiben actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de los anticuerpos descritos. Del mismo modo, las secuencias de ADN que codifican el anticuerpo de la presente invención abarcan secuencias que comprenden una o más adiciones, deleciones, o sustituciones de nucleótidos en comparación con la secuencia descrita, pero que codifican un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es esencialmente bioequivalente a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención.

[0105] Dos proteínas de unión a antígenos o anticuerpos, se consideran bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya tasa y grado de absorción no muestran una diferencia

significativa cuando se administra en la misma dosis molar en condiciones experimentales similares, ya sea en dosis únicas o dosis múltiples. Algunos anticuerpos se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en la medida de su absorción, pero no en su velocidad de absorción y, sin embargo pueden considerarse bioequivalentes porque tales diferencias en la tasa de absorción son intencionales y se reflejan en el etiquetado y no son esenciales para la consecución de las concentraciones eficaces del medicamento en el cuerpo, por ejemplo, el uso crónico, y se considera médicamente insignificante para el producto farmacéutico particular.

[0106] En una modalidad, dos proteínas de unión al antígeno son bioequivalentes si no existen diferencias significativas clínicas en su seguridad, pureza, o potencia.

[0107] En una modalidad, dos proteínas de unión al antígeno son bioequivalentes si un paciente se puede cambiar una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin un aumento esperado en el riesgo de efectos adversos, incluyendo un cambio clínicamente significativo en la inmunogenicidad, o disminución de la eficacia, en comparación con el tratamiento continuado sin tal conmutación.

[0108] En una modalidad, dos proteínas de unión al antígeno son bioequivalentes si ambos actúan por un mecanismo común o mecanismos de acción para la condición o condiciones de uso, en la medida en que se conozcan tales mecanismos.

[0109] La bioequivalencia se puede demostrar por in vivo y/o in vitro. Las medidas de bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) un ensayo in vivo en humanos u otros mamíferos, donde la concentración del anticuerpo o de sus metabolitos se mide en la sangre, plasma, suero, u otro fluido biológico como una función del tiempo; (b) una prueba in vitro que se ha correlacionado con y es razonablemente predictiva de los datos de biodisponibilidad in vivo de humanos; (c) un ensayo in vivo en humanos u otros mamíferos en los que el efecto farmacológico agudo

apropiado del anticuerpo (o su objetivo) se mide como una función del tiempo; y (d) en un ensayo clínico bien controlado que establece la seguridad, eficacia, o la biodisponibilidad o bioequivalencia de un anticuerpo.

[0110] Las variantes bioequivalentes de los anticuerpos de la invención pueden construirse, por ejemplo, haciendo diversas sustituciones de residuos o secuencias o eliminando residuos o secuencias terminales o internas no necesarias para la actividad biológica. Por ejemplo, los residuos de cisteína que no son esenciales para la actividad biológica pueden ser eliminados o reemplazados con otros aminoácidos para evitar la formación de puentes disulfuro intramoleculares innecesarios o incorrectos tras la renaturalización. En otros contextos, los anticuerpos bioequivalentes pueden incluir variantes de anticuerpos que comprenden cambios de aminoácidos, que modifican las características de glicosilación de los anticuerpos, por ejemplo, mutaciones que eliminan o remueven el glicosilación.

Anticuerpos Anti-PD-L1 que Comprenden Variantes Fc

[0111] De acuerdo con ciertas modalidades de la presente invención, se proporcionan anticuerpos anti-PD-L1 que comprende un dominio Fc que comprende una o más mutaciones que mejoran o disminuyen la unión del anticuerpo al receptor FcRn, por ejemplo, a pH ácido, en comparación con el pH neutro. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-PD-L1 que comprenden una mutación en región CH2 o CH3 del dominio Fc, donde la mutación o mutaciones aumentan la afinidad del dominio Fc para FcRn en un ambiente ácido (por ejemplo, en un endosoma donde el pH varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0). Tales mutaciones pueden dar lugar a un aumento de la vida media del suero del anticuerpo cuando se administra a un animal. Los ejemplos no limitantes de tales modificaciones Fc incluyen, por ejemplo, una modificación en la posición 250 (por ejemplo, E o Q);

250 y 428 (por ejemplo, L o F); 252 (por ejemplo, L / Y / F / W o T), 254 (por ejemplo, S o T), y 256 (por ejemplo, S / R / Q / E / D o T); o una modificación en la posición 428 y/o 433 (por ejemplo, H / L / R / S / P / Q o K) y/o 434 (por ejemplo, A, W, H, F o Y [N434A, N434W, N434H, N434F o N434Y]); o una modificación en la posición 250 y/o 428; o una modificación en la posición 307 o 308 (por ejemplo, 308F, V308F), y 434. En una modalidad, la modificación comprende una modificación 428L (por ejemplo, M428L) y 434S (por ejemplo, N434S); una modificación 428L, 259I (por ejemplo, V259I), y 308F (por ejemplo, V308F); una modificación 433K (por ejemplo, H433K) y una modificación 434 (por ejemplo, 434Y); una modificación 252, 254, y 256 ({por ejemplo, 252Y, 254T y 256E); una modificación 250Q y modificación 428L (por ejemplo, T250Q y M428L); y una modificación 307 y/o 308 (por ejemplo, 308F o 308P). En aún otra modalidad, la modificación comprende una modificación 265A (por ejemplo, D265A) y/o una modificación 297A (por ejemplo, N297A).

[0112] Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-PD-L1 que comprenden un dominio Fc que comprende uno o más pares o grupos de mutaciones seleccionadas del grupo constituido por: 250Q y 248L (por ejemplo, T250Q y M248L); 252Y, 254T y 256E (por ejemplo, M252Y, S254T y T256E); 428L y 434S (por ejemplo, M428L y N434S); 257I y 311I (por ejemplo, P257I y Q311I); 257I y 434H (por ejemplo, P257I y N434H); 376V y 434H (por ejemplo, D376V y N434H); 307A, 380A y 434A (por ejemplo, T307A, E380A, y N434A); y 433K y 434F (por ejemplo, H433K y N434F). En una modalidad, la presente invención incluye anticuerpos anti-PD-L1 que comprenden un dominio Fc que comprende una mutación S108P en la región bisagra de IgG4 para promover la estabilización del dímero. Todas las posibles combinaciones de las anteriores mutaciones en el dominio Fc, y otras mutaciones dentro de los dominios variables de anticuerpos descritos en este documento, se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

[0113] La presente invención también incluye anticuerpos anti-PD-L1 que comprenden una región quimérica constante de cadena pesada (CH), donde la región CH quimérica comprende segmentos derivados de las regiones CH de más de un isotipo de inmunoglobulina. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden comprender una parte que comprende la región CH quimérica o la totalidad de un dominio CH2 derivado de una IgG1 humana, IgG2 humana o molécula de IgG4 humana, combinada en parte o en su totalidad con un dominio CH3 derivado de una IgG1 humana, IgG2 humana o molécula de IgG4 humana. De acuerdo con ciertas modalidades, los anticuerpos de la invención comprenden una región CH quimérica que tiene una región de bisagra quimérica. Por ejemplo, una bisagra quimérica puede comprender una secuencia de aminoácidos de "bisagra superior" (residuos de aminoácidos desde las posiciones 216 a 227 de acuerdo con la numeración UE) derivada de una IgG1 humana, una IgG2 humana o una región de bisagra IgG4 humana, combinada con una secuencia de "bisagra inferior" (residuos de aminoácidos desde las posiciones 228 a 236 de acuerdo con la numeración UE) derivada de una IgG1 humana, una IgG2 humana o una región de bisagra IgG4 humana. De acuerdo con ciertas modalidades, la región de bisagra quimérica comprende los residuos de aminoácidos derivados de una IgG1 humana o una bisagra superior IgG4 humana y residuos de aminoácidos derivados de una bisagra inferior IgG2 humana. Un anticuerpo que comprende una región CH quimérica como se describe en este documento puede, en ciertas modalidades, presentar funciones efectoras Fc modificadas sin afectar negativamente a las propiedades terapéuticas o farmacocinéticas del anticuerpo. (Véase, por ejemplo, USSN. 14/170.166, presentada el 31 de enero de 2014, cuya descripción se incorpora como referencia en su totalidad).

Características Biológicas de los Anticuerpos

[0114] En general, los anticuerpos de la presente invención funcionan mediante la unión a PD-L1. La presente invención incluye anticuerpos anti-PD-L1 y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que unen moléculas monoméricas o diméricas solubles PD-L1 con alta afinidad. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos que unen PD-L1 monomérico (por ejemplo, a 25° C o a 37° C) con una K_D de menos de aproximadamente 318 pM según se mide por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando el formato de ensayo tal como se define en el ejemplo 3 en el presente documento. En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos unen PD-L1 monomérico con una K_D de menos de aproximadamente 300 pM, inferior a aproximadamente 250 pM, inferior a aproximadamente 150 pM, inferior a aproximadamente 100 pM, o menor que aproximadamente 50 pM, como se mide por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando el formato de ensayo tal como se define en el ejemplo 3 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[0115] La presente invención también incluye anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que unen PD-L1 dimérico (por ejemplo, a 25° C o a 37° C) con una K_D de menos de aproximadamente 15 pM según se mide por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando el formato de ensayo tal como se define en el ejemplo 3 en el presente documento. En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos unen PD-L1 dimérico con una K_D de menos de aproximadamente 12 pM, menos de aproximadamente 10 pM, inferior a aproximadamente 8 pM, o menos de aproximadamente 5 pM, según se mide por la superficie resonancia de plasmón, por ejemplo, usando el formato de ensayo tal como se define en el ejemplo 3 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[0116] La presente invención también incluye anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que unen PD-L1 Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) (por

ejemplo, a 25° C o a 37° C) con una K_D de menos de aproximadamente 28 nM, medida por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando el formato de ensayo tal como se define en el ejemplo 3 en el presente documento. En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, unen PD-L1 Cynomolgus con una K_D de menos de aproximadamente 25 nM, menos de aproximadamente 20 nM, menos de aproximadamente 15 nM, menos de aproximadamente 10 nM, o menos de aproximadamente 5 nM, según se mide por resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando el formato de ensayo tal como se define en el ejemplo 3 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar.

[0117] La presente invención también incluye anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que unen PD-L1 con una vida media de disociación ($t_{1/2}$) de más de aproximadamente 1 minuto como se mide por resonancia de plasmón de superficie a 25° C o 37° C, por ejemplo, usando un formato de ensayo tal como se define en el ejemplo 3 en el presente documento, o un ensayo sustancialmente similar. En ciertas modalidades, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de la presente invención unen PD-L1 con un $t_{1/2}$ de más de aproximadamente 5 minutos, más de aproximadamente 10 minutos, más de aproximadamente 30 minutos, más de aproximadamente 50 minutos, más de aproximadamente 60 minutos, más de aproximadamente 70 minutos, más de aproximadamente 80 minutos, más de aproximadamente 90 minutos, más de aproximadamente 100 minutos, más de aproximadamente 200 minutos, más de aproximadamente 300 minutos, más de aproximadamente 400 minutos, más de aproximadamente 500 minutos, más de aproximadamente 600 minutos, más de aproximadamente 700 minutos, o más de aproximadamente 800 minutos, como se mide por resonancia de plasmón de superficie a 25° C o 37° C, por ejemplo, usando un formato de ensayo tal como se define en el ejemplo 3 en el presente documento (por ejemplo,

captura mAb o formato de captura de antígeno), o un ensayo sustancialmente similar.

[0118] La presente invención también incluye anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que bloquea la unión de PD-L1 a PD-1 con una IC_{50} de menos de aproximadamente 770 pM según se determina usando un ensayo de inmunoensayo basado en ELISA, por ejemplo, como se muestra en el Ejemplo 4, o un ensayo sustancialmente similar. La presente invención también incluye anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que bloquea la unión de PD-L1 a B7-1 con una IC_{50} de menos de aproximadamente 10 nM como se determina usando un ensayo de inmunoensayo basado en ELISA, por ejemplo, como se muestra en el Ejemplo 4, o un ensayo sustancialmente similar. La presente invención también incluye anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que unen a PD-L1 y mejorar la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1.

[0119] En algunas modalidades, los anticuerpos de la presente invención pueden unirse al dominio extracelular de PD-L1 o a un fragmento del dominio. En algunas modalidades, los anticuerpos de la presente invención pueden unirse a más de un dominio (anticuerpos de reacción cruzada). En ciertas modalidades, los anticuerpos de la presente invención pueden unirse a un epítipo localizado en el dominio extracelular que comprende residuos de aminoácidos 19-239 de NP_054862.1 (SEC ID NO: 351). En algunas modalidades, los anticuerpos pueden unirse a un epítipo que comprende uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste de residuos de aminoácidos 1-221 de SEC ID NOs: 345-348, o 353.

[0120] En ciertas modalidades, los anticuerpos de la presente invención pueden funcionar mediante el bloqueo o la inhibición de la actividad de unión de PD-1 o B7-1 asociada con PD-L1 mediante la unión a cualquier otra región o fragmento de la proteína de longitud completa, la secuencia de aminoácidos que se muestra en

SEC ID NO: 351. En ciertas modalidades, los anticuerpos pueden atenuar o modular la interacción entre PD-L1 y PD-1/B7-1.

[0121] En ciertas modalidades, los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos de la invención pueden unirse a un epítipo en un dominio y también se pueden unir a un segundo epítipo en un dominio diferente de PD-L1. En ciertas modalidades, los anticuerpos biespecíficos de la invención pueden unirse a dos epítopos diferentes en el mismo dominio. En una modalidad, la molécula de unión al antígeno multi-específica comprende una primera especificidad de unión al antígeno donde la primera especificidad de unión comprende el dominio extracelular o fragmento del mismo de PD-1; y una segunda especificidad de unión al antígeno a otro epítipo de PD-L1. En otra modalidad, la molécula de unión al antígeno multi-específica comprende una primera especificidad de unión al antígeno donde la primera especificidad de unión comprende el dominio extracelular o fragmento del mismo de B7-1; y una segunda especificidad de unión al antígeno a otro epítipo de PD-L1.

[0122] En una modalidad, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal completamente humano o fragmento de unión al antígeno del mismo que une a PD-L1, donde el anticuerpo o fragmento del mismo exhibe una o más de las siguientes características: (i) comprende una HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 186, 202, 218, 234, 250, 258, 266, 274, 282, 290, 298, 306, 314, 322, 330 y 338, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (ii) comprende una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 194, 210, 226, 242, 258, y 274, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al

menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iii) comprende un dominio de HCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 192, 208, 224, 240, 256, 272, 280, 288, 296, 304, 312, 320, 328, 336 y 344, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y un dominio LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 200, 216, 232, 248, 264, y 280, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iv) comprende un dominio HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 188, 204, 220, 236, 252, 268, 284, 292, 300, 308, 316, 324, 332, y 340, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; un dominio HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 190, 206, 222, 238, 254, 270, 286, 294, 302, 310, 318, 326, 334, y 342, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia ; un dominio LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 196, 212, 228, 244, 260, y 276, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y un dominio LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 198, 214, 230, 246, 262, y 278, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%,

al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (v) es una molécula de unión al antígeno multi-específica que comprende una primera especificidad de unión a PD-L1 y una segunda especificidad de unión a un antígeno seleccionado del grupo que consiste de PD-L1, un antígeno específico de tumor, un antígeno de células infectadas por virus, y un co-inhibidor de células T; (vi) se une a PD-L1 humano con una K_D de aproximadamente 4 pM a aproximadamente 645 nM; (vii) se une a PD-L1 Cynomolgus con una K_D de aproximadamente 70 pM a aproximadamente 400 nM; (viii) bloquea o mejora la unión de PD-L1 a PD-1 con una IC_{50} <770 pM; (ix) bloquea o mejora la unión de PD-L1 a B7-1 con una IC_{50} <10 nM; (x) bloquea la baja regulación de células T de PD-1 inducida y/o rescata la señalización de las células T en un ensayo de indicador de luciferasa de células T/APC; (xi) estimula la proliferación de células T y la actividad en un ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR); (xii) induce la producción de IL-2 y/o IFN en un ensayo de MLR; y (xiii) suprime el crecimiento tumoral y aumenta la supervivencia en pacientes con cáncer.

[0123] En una modalidad, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal totalmente humano o fragmento de unión al antígeno del mismo que bloquea la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1, donde el anticuerpo o fragmento del mismo presenta una o más de las siguientes características: (i) comprende un HCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 82, 98, 146, 162, 290, 306, 314, y 330, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90 %, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (ii) comprende una LCVR que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 90, 106, 154, 170, y 274, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iii) comprende un dominio de HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 88, 104, 152,

168, 296, 312, 320, y 336, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90% , al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y un dominio LCDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NO: 96, 112, 160, 176, y 280, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (iv) comprende un dominio HCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 84, 100, 148, 164, 292, 308, 316, y 332, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; un dominio HCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 86, 102, 150, 166, 294, 310, 318, y 334, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; un dominio LCDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO: 92, 108, 156, 172, y 276, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; y un dominio LCDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de SEC ID NO: 94, 110, 158, 174, y 278, o una secuencia sustancialmente similar del mismo que tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia; (v) es una molécula de unión al antígeno multi-específica que comprende una primera especificidad de unión a PD-L1 y una segunda especificidad de unión a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en un epítipo diferente de PD-L1, un antígeno específico de tumor, un antígeno de las células infectadas viralmente, y un co-inhibidor de las células T; (vi) se une a PD-L1 humano con una $K_D < 10^{-10}$ M; (vii) se une a PD-L1 Cynomolgus con una $K_D < 10^{-7}$ M; (viii) bloquea la unión de PD-L1 a PD-1 o B7-1; (ix) bloquea la baja

regulación de células T de PD-1 inducida y/o rescata la señalización de las células T en un ensayo de indicador de luciferasa de células T/APC; (xi) estimula la proliferación de células T y la actividad en un ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR); (xii) induce la producción de IL-2 y/o IFN en un ensayo de MLR; y (xiii) suprime el crecimiento tumoral y aumenta la supervivencia en pacientes con cáncer.

[0124] Los anticuerpos de la presente invención pueden poseer una o más de las características biológicas antes mencionadas, o cualquier combinación de las mismas. Otras características biológicas de los anticuerpos de la presente invención serán evidentes para una persona de experiencia ordinaria en la técnica a partir de una revisión de la presente descripción, incluyendo los ejemplos de trabajo de este documento.

Selectividad de Especies y Reactividad Cruzada de Especies

[0125] De acuerdo con ciertas modalidades de la invención, los anticuerpos anti-PD-L1 humanos se unen a PD-L1 pero no a PD-L1 de otras especies. Alternativamente, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención, en ciertas modalidades, se unen a humano PD-L1 y PD-L1 a partir de una o más especies no humanas. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden unirse a PD-L1 humano y pueden unirse o no unirse, como sea el caso, a una o más de PD-L1 de ratón, rata, cobaya, hámster, jerbo, cerdo, gato, perro, conejo, cabra, oveja, vaca, caballo, camello, Cynomolgus, mono tití, monos rhesus o chimpancé. En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden unirse a PD-L1 humano y Cynomolgus con las mismas afinidades o con diferentes afinidades.

Mapeo de Epítopos y Tecnologías Relacionadas

[0126] La presente invención incluye anticuerpos anti-PD-L1 que interactúan con uno o más aminoácidos que se encuentran dentro de uno o más dominios de la molécula de PD-L1, incluyendo, por ejemplo, el dominio extracelular (similar a IgV), el dominio extracelular similar a IgC, un dominio transmembrana, y un dominio intracelular. El epítipo al que los anticuerpos se unen puede consistir en una única secuencia contigua de 3 o más (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más) aminoácidos localizados dentro de cualquiera de los dominios mencionados anteriormente de la molécula de PD-L1 (por ejemplo, un epítipo lineal en un dominio). Alternativamente, el epítipo puede consistir en una pluralidad de aminoácidos no contiguos (o secuencias de aminoácidos) situados dentro de uno o ambos de los dominios mencionados anteriormente de la molécula de PD-L1 (por ejemplo, un epítipo conformacional).

[0127] Varias técnicas conocidas por las personas de experiencia en la técnica se pueden usar para determinar si un anticuerpo "interactúa con uno o más aminoácidos" dentro de un polipéptido o proteína. Las técnicas ejemplares incluyen, por ejemplo, ensayos de bloqueo cruzado de rutina, tal como el descrito en Antibodies, Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY). Otros métodos incluyen el análisis mutacional de exploración de alanina, el análisis de transferencia por absorción de péptidos (Reineke (2004) Methods Mol Biol 248: 443-63), estudios cristalográficos de análisis de escisión del péptido y análisis de RMN. Además, se pueden emplear métodos, tales como la escisión epítipo, la extracción de epítipo y modificación química de los antígenos (Tomer (2000) Prot Sci 9: 487-496). Otro método que se puede utilizar para identificar los aminoácidos dentro de un polipéptido con el que interactúa un anticuerpo es el intercambio de hidrógeno/deuterio detectado por espectrometría de masas. En términos generales, el método de intercambio de hidrógeno/deuterio implica deuterio-etiquetado de la proteína de interés, seguido por la unión del anticuerpo a la proteína de deuterio etiquetado. A continuación, el complejo de

proteína/anticuerpo se transfiere al agua y los protones intercambiables dentro de los aminoácidos que están protegidos por el complejo de anticuerpo se someten de nuevo al intercambio de deuterio a hidrógeno a una velocidad más lenta que los protones intercambiables dentro de los aminoácidos que no son parte de la interfaz. Como resultado, los aminoácidos que forman parte de la interfaz de proteína/anticuerpo pueden retener deuterio y por lo tanto exhiben relativamente mayor masa en comparación con los aminoácidos no incluidos en la interfaz. Después de la disociación del anticuerpo, la proteína objetivo se somete a la escisión por proteasas y análisis de espectrometría de masas, revelando de esta forma los residuos de deuterio marcado que corresponden a los aminoácidos específicos con los que interactúa el anticuerpo. Véase, por ejemplo, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen y Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

[0128] El término "epítopo" se refiere a un sitio en un antígeno al cual responden células B y/o células T. Los epítopos de células B pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente se conservan con la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario típicamente se pierden tras el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítopo incluye normalmente al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 o 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única.

[0129] Creación de perfiles de Modificación Asistida (MAP), también conocido como anticuerpo de perfiles basados en la estructura del antígeno (ASAP) es un método que clasifica un gran número de anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos contra el mismo antígeno de acuerdo con las similitudes del perfil de unión de cada anticuerpo para modificar químicamente o enzimáticamente superficies de antígeno (véase el documento US 2004/0101920, en el presente documento se

incorpora específicamente por referencia en su totalidad). Cada categoría puede reflejar un único epítipo claramente diferente de lo que se superpone parcialmente con el epítipo representado por otra categoría. Esta tecnología permite la filtración rápida de anticuerpos genéticamente idénticos, de tal manera que dicha caracterización se pueda centrar en anticuerpos genéticamente distintos. Cuando se aplica a la detección de hibridoma, el MAP puede facilitar la identificación de clones de hibridoma que producen mAbs que tienen las características deseadas. El MAP puede ser usado para ordenar los anticuerpos de la invención en grupos de anticuerpos que unen diferentes epítopos.

[0130] En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-PD-L1 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se unen a un epítipo dentro de uno o más de cualquiera de las regiones ejemplificadas en PD-L1, ya sea en forma natural, como se ejemplifica en la SEC ID NO: 351 o recombinantemente producido, como se ejemplifica en la SEC ID NOS: 345-348, o a un fragmento de la misma. En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención se unen a una región extracelular que comprende uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste de residuos de aminoácidos 19-239 de PD-L1. En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención se unen a una región que comprende uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste de residuos de aminoácidos 1-221 de PD-L1 Cynomolgus, como se ejemplifica por la SEC ID NO: 346.

[0131] En ciertas modalidades, los anticuerpos de la invención, como se muestra en la Tabla 1, interactúan con al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en residuos de aminoácidos que van desde aproximadamente la posición 19 a aproximadamente la posición 130 de la SEC ID NO: 351; o residuos de aminoácidos que van desde aproximadamente la posición 130 hasta aproximadamente la posición 153 de la SEC ID NO: 351; o residuos de aminoácidos que van desde aproximadamente la posición 153 hasta aproximadamente la posición 210 de la SEC ID NO: 351; o a residuos de

aminoácidos que van desde aproximadamente la posición 210 hasta aproximadamente la posición 239 de la SEC ID NO: 351. Estas regiones se ilustran parcialmente en SEC ID NOs: 345-348.

[0132] La presente invención incluye anticuerpos anti-PD-L1 que se unen al mismo epítipo, o una porción del epítipo, como cualquiera de los anticuerpos ejemplares específicos descritos en este documento en la Tabla 1, o un anticuerpo que tiene las secuencias de CDR de cualquiera de los anticuerpos ejemplares descritos en la Tabla 1. Asimismo, la presente invención también incluye anticuerpos anti-PD-L1 que compiten por la unión a PD-L1 o un fragmento de PD-L1 con cualquiera de los anticuerpos ejemplares específicos descritos en este documento en la Tabla 1, o un anticuerpo que tiene las secuencias de CDR de cualquiera de los anticuerpos ejemplares descritos en la Tabla 1. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos anti-PD-L1 que compiten de forma cruzada por la unión a PD-L1 con uno o más anticuerpos como se define en el ejemplo 6 en el presente documento (por ejemplo, H2aM8309N, H1H9329P, H1H9336P, H2aM8314N, H2aM8316N, H2aM8718N, H1H9387P2, H1H9351P2, H1H9364P2, H1H9373P2, y H2aM8306N). La presente invención también incluye anticuerpos anti-PD-L1 que compiten de forma cruzada por la unión a PD-L1 con uno o más anticuerpos como se define en el Ejemplo 6 en el presente documento (por ejemplo, H1H9396P2, H2aM8317N, H2aM8321N, H1H9323P, H1H9382P2, H1H9344P2, H1H9345P2 y H1H9354P2).

[0133] Se puede determinar fácilmente si un anticuerpo se une al mismo epítipo que, o compite por la unión con, un anticuerpo anti-PD-L1 de referencia mediante el uso de métodos de rutina conocidos en la técnica. Por ejemplo, para determinar si un anticuerpo de prueba se une al mismo epítipo como un anticuerpo anti-PD-L1 de referencia de la invención, permite que el anticuerpo de referencia que se unen a una proteína PD-L1 o péptido en condiciones de saturación. A continuación, se evalúa la capacidad de un anticuerpo de prueba para unirse a la

molécula de PD-L1. Si el anticuerpo de ensayo es capaz de unirse a PD-L1 después de la unión saturada con el anticuerpo anti-PD-L1 de referencia, se puede concluir que el anticuerpo de ensayo se une a un epítipo diferente que el anticuerpo de referencia anti-PD-L1. Por otro lado, si el anticuerpo de ensayo no es capaz de unirse a la proteína PD-L1 siguiendo una unión de saturación con el anticuerpo de referencia anti-PD-L1, entonces el anticuerpo de prueba puede unirse al mismo epítipo que el epítipo unido por el anticuerpo de referencia anti-PD-L1 de la invención.

[0134] Para determinar si un anticuerpo compite por la unión con un anticuerpo de referencia anti-PD-L1, la metodología de unión anteriormente descrita se lleva a cabo en dos orientaciones: En una primera orientación, se permite que el anticuerpo de referencia se una a una proteína PD-L1 bajo condiciones de saturación, seguido por la evaluación de la unión del anticuerpo de prueba a la molécula de PD-L1. En una segunda orientación, se permite que el anticuerpo de prueba se una a una molécula de PD-L1 en condiciones de saturación, seguido por la evaluación de la unión del anticuerpo de referencia a la molécula de PD-L1. Si, en ambas orientaciones, sólo el primer anticuerpo (saturado) es capaz de unirse a la molécula de PD-L1, entonces se concluye que el anticuerpo de prueba y el anticuerpo de referencia compiten para la unión a PD-L1. Como se apreciará por una persona de habilidad ordinaria en la técnica, un anticuerpo que compite por la unión con un anticuerpo de referencia no necesariamente se une al epítipo idéntico como el anticuerpo de referencia, pero estéricamente pueden bloquear la unión del anticuerpo de referencia por la unión a un epítipo de solapamiento o adyacente.

[0135] Dos anticuerpos se unen al mismo epítipo o epítipo superpuesto si cada uno inhibe competitivamente (bloquea) la unión del otro al antígeno. Es decir, 1-, 5-, 10-, 20- o 100- veces en exceso de un anticuerpo inhibe la unión del otro en al menos un 50%, pero preferiblemente 75%, 90% o incluso 99% como se mide en

un ensayo de unión competitiva (véase, por ejemplo, Junghans y otros, Cancer Res. 1990 50: 1495-1502). Alternativamente, dos anticuerpos tienen el mismo epítipo si esencialmente todas las mutaciones de aminoácidos en el antígeno que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo, reducen o eliminan la unión del otro. Dos anticuerpos tienen epítipos superpuestos si algunas mutaciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo, reducen o eliminan la unión del otro.

[0136] Experimentación de rutina adicional (por ejemplo, mutación de péptidos y análisis de unión) puede entonces llevarse a cabo para confirmar si la falta de unión observada del anticuerpo de prueba es, de hecho, debido a la unión al mismo epítipo como el anticuerpo de referencia o si el bloqueo estérico (u otro fenómeno) es responsable de la falta de unión observada. Los experimentos de este tipo se puede realizar utilizando ELISA, RIA, resonancia de plasmón superficial, citometría de flujo o cualquier otro ensayo de unión d anticuerpo cuantitativa o cualitativa disponibles en la técnica.

Inmunoconjugados

[0137] La invención abarca un anticuerpo humano anti-PD-L1 monoclonal conjugado con una fracción terapéutica ("inmunoconjugado"), tal como una citotoxina o un agente quimioterapéutico para tratar el cáncer. Tal como se utiliza en este documento, el término "inmunoconjugado" se refiere a un anticuerpo que esta química o biológicamente vinculado a una citotoxina, un agente radioactivo, una citocina, un interferón, una fracción objetiva o reportera, una enzima, una toxina, un péptido o proteína o un agente terapéutico. El anticuerpo puede estar vinculado a la citotoxina, agente radiactivo, citocina, interferón, fracción objetiva o indicadora, enzima, toxina, un péptido o agente terapéutico en cualquier localización a lo largo de la molécula con tal de que sea capaz de unirse a su objetivo. Los ejemplos de inmunoconjugados incluyen conjugados de fármacos de

anticuerpos y proteínas de fusión de anticuerpo-toxina. En una modalidad, el agente puede ser un segundo anticuerpo diferente a PD-L1. En ciertas modalidades, el anticuerpo se puede conjugar a un agente específico para una célula tumoral o una célula viralmente infectada. El tipo de fracción terapéutica que se puede conjugar con el anticuerpo anti-PD-L1 tendrá en cuenta la condición a ser tratada y el efecto terapéutico deseado a alcanzar. Ejemplos de agentes adecuados para la formación de inmunoconjugados son conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, el documento WO 05/103081.

Anticuerpos Multi-específicos

[0138] Los anticuerpos de la presente invención pueden ser mono-específicos, bi-específicos, o multi-específicos. Los anticuerpos multi-específicos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido objetivo o puede contener dominios de unión a antígeno específicos para más de un polipéptido objetivo. Véase, por ejemplo, Tutt y otros, 1991, J. Immunol. 147: 60-69; Kufer y otros, 2004, Trends Biotechnol. 22: 238-244.

[0139] En un aspecto, la presente invención incluye moléculas de unión al antígeno multi-específicas o fragmentos de unión al antígeno de los mismos en los que una especificidad de unión al antígeno de una inmunoglobulina es específica para un epítipo dentro del dominio extracelular de PD-L1 (por ejemplo, en la región similar a IgV), o un fragmento del mismo, y la otra especificidad de unión al antígeno de la inmunoglobulina es específica para la unión a un epítipo diferente en el dominio extracelular de PD-L1 (por ejemplo, en la región similar a IgC), o un segundo objetivo terapéutico, o se conjuga con una fracción terapéutica. En ciertas modalidades, la primera especificidad de unión al antígeno puede comprender PD-1 o B7-1 o un fragmento del mismo. En una modalidad, la primera especificidad de unión al antígeno que se une a PD-L1 comprende el dominio extracelular de PD-1. En ciertas modalidades de la invención, una especificidad de

unión al antígeno de una inmunoglobulina es específico para un epítipo dentro de los restos de aminoácidos 19 a 239 de PD-L1 (SEC ID NO: 351) o un fragmento del mismo, y la otra especificidad de la inmunoglobulina es específica para un segundo antígeno objetivo. El segundo antígeno objetivo puede estar en la misma célula que PD-L1 o en una célula diferente. En una modalidad, la segunda célula objetivo está en una célula inmune que no sea una célula T, tal como una célula B, célula presentadora de antígenos, monocitos, macrófagos o células dendríticas. En algunas modalidades, el segundo antígeno objetivo puede estar presente en una célula tumoral o en una célula viralmente infectada.

[0140] En otro aspecto, la invención proporciona moléculas de unión a antígeno o fragmentos de unión al antígeno que comprenden una primera especificidad de unión al antígeno que se une a PD- L1 y una segunda especificidad de unión al antígeno que se une específicamente a un antígeno objetivo multi-específico en una célula tumoral. En diversas modalidades, el antígeno específico de tumor es uno de los antígeno CA9, CA125, antígeno con melanoma asociado (MAGE), antígeno carcinoembrionario (CEA), vimentina, tumor-M2-PK, antígeno prostático específico (PSA), MART-1, o CA 19-9. Los ejemplos no limitantes de otros antígenos asociados a tumores específicos incluyen, por ejemplo, AFP, ALK, proteínas BAGE, β -catenina, BRC-abl, BRCA1, BORIS, anhidrasa carbónica IX, caspasa-8, CCR5, CD19, CD20, CD30, CD40, CDK4, CTLA4, ciclina B1, CYP1 B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2 / HER2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EpCAM, EphA2, Fra-1, FOLR1, proteínas GAGE (por ejemplo, GAGE-1,-2), GD2, GD3, GloboH, glipicano-3, GM3, gp100, Her2, HLA / B-Raf, HLA / K-ras, H LA / MAG E-A3, hTERT, LMP2, proteínas MAGE (por ejemplo, MAGE-1 , -2, -3, -4, -6 y -12), HLA-A2, MART-1, mesotelina, ML-IAP, Lodo, Muc2, MUC3, Muc4, MUC5, MUC16 (CA-125), MUM1 , NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ES01, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA (FOLH1), proteínas RAGE, Ras , RGS5, Rho, SART-1, SART-3, Steap-1, Steap-2, survivina, TAG-72,

TGF- β , TMPRSS2, Tn, TRP-1, TRP-2, tirosinasa, y uroplakin-3. En otras modalidades, la segunda especificidad de unión al antígeno se une a un antígeno de tumor que está presente en las células tumorales específicas para, pero no limitado a, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, melanoma, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de ovario, y cáncer de páncreas. Los anticuerpos de la invención, en este aspecto, pueden inhibir la actividad de PD-L1.

[0141] En otro aspecto, la invención proporciona moléculas de unión al antígeno multi-específicas o fragmentos de unión al antígeno de los mismos donde la segunda especificidad de unión al antígeno se une a un antígeno específico a una célula infectada viralmente. En ciertas modalidades, la segunda especificidad de unión al antígeno se une a un antígeno específico a una célula infectada con un virus seleccionado del grupo que consiste de HIV, HBV, HCV, HPV, LCMV y SIV.

[0142] En otro aspecto, la invención proporciona moléculas de unión al antígeno multi-específicas o fragmentos de unión al antígeno que comprenden una primera especificidad de unión al antígeno que se une a PD- L1 y una segunda especificidad de unión al antígeno que se une a un co-inhibidor de célula T tales como PD-1, LAG-3, TIM3, B7-1, CTLA-4, BTLA, CD-28, 2B4, LY108, TIGIT, LAIR1, ICOS y CD160.

[0143] Cualquiera de las moléculas de unión al antígeno multi-específicas, o variantes de las mismas, pueden construirse usando técnicas de biología molecular convencionales (por ejemplo, tecnología de ADN y expresión de proteínas recombinantes), como es bien conocido por una persona de experiencia ordinaria en la técnica.

[0144] En algunas modalidades, los anticuerpos específicos de PD-L1 se generan en un formato biespecífico (un "biespecífico") donde las regiones variables que se unen a dominios distintos de PD-L1 están unidas entre sí para conferir especificidad de doble dominio dentro de una sola molécula de unión. El diseño

adecuado de bi-específicos puede mejorar la eficacia global inhibitoria de PD-L1 al aumentar tanto la especificidad y avidéz de la unión. Las regiones variables con especificidad para los dominios individuales, (por ejemplo, los segmentos del dominio N-terminal), o que pueden unirse a diferentes regiones dentro de un dominio, se combinan en un andamio estructural que permite que cada región se una simultáneamente a los epítomos separados, o a diferentes regiones dentro de un dominio. En un ejemplo para regiones biespecíficas de cadena pesada variable (V_H) de un aglutinante con especificidad para un dominio, se recombinan con las regiones variables de cadena ligera (V_L) de una serie de aglutinantes con especificidad para que un segundo dominio identifique socios V_L no afines que se pueden combinar con un V_H original sin alterar la especificidad original para ese V_H . De esta manera, un solo segmento V_L (por ejemplo, V_{L1}) se puede combinar con dos dominios V_H diferentes (por ejemplo, V_{H1} y V_{H2}) para generar un biespecífico que comprende dos "brazos" de unión (V_{H1} - V_{L1} y V_{H2} - V_{L1}). El uso de un segmento V_L solo reduce la complejidad del sistema y por lo tanto simplifica y aumenta la eficiencia en la clonación, expresión, y procesos de purificación utilizados para generar el biespecífico (Véase, por ejemplo, USSN 13/022759 y US2010/0331527).

[0145] Alternativamente, los anticuerpos que unen más de un dominio y un segundo objetivo, tales como, pero no limitados a, por ejemplo, un segundo anticuerpo anti-PD-L1 diferente, se puede preparar en un formato biespecífico utilizando las técnicas descritas en este documento, u otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Las regiones variables de anticuerpo que se unen a regiones distintas pueden ser unidas entre sí con las regiones variables que se unen a sitios relevantes en, por ejemplo, el dominio extracelular de PD-L1, para conferir especificidad de doble antígeno en una única molécula de unión. El diseño adecuado de los biespecíficos de esta naturaleza tiene doble función. Las regiones variables con especificidad para el dominio extracelular se combinan con

una región variable con especificidad por fuera del dominio extracelular y se emparejan en un andamio estructural que permite que cada región variable se una a los antígenos separados.

[0146] Un formato de anticuerpo biespecífico ejemplar que se puede utilizar en el contexto de la presente invención implica el uso de un primer dominio de inmunoglobulina (Ig) C_H3 y un segundo dominio Ig C_H3, donde el primer y segundo dominios Ig C_H3 difieren uno del otro por al menos un aminoácido, y donde al menos una diferencia de aminoácidos reduce la unión del anticuerpo biespecífico a la proteína A en comparación con un anticuerpo biespecífico que carece de la diferencia de un aminoácido. En una modalidad, el primer dominio Ig C_H3 une a la proteína A y el segundo dominio Ig C_H3 contiene una mutación que reduce o suprime la unión de la proteína A tal como una modificación H95R (por numeración IMGT exón; H435R por numeración de la UE). El segundo C_H3 puede comprender además una modificación Y96F (por IMGT; Y436F por la UE). Otras modificaciones que se pueden encontrar dentro de la segunda C_H3 incluyen: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, y V82I (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M y V422I por la UE) en el caso de los anticuerpos IgG1; N44S, K52N, y V82I (IMGT; N384S, K392N, y V422I por la UE) en el caso de los anticuerpos IgG2; y Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, y V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, y V422I por la UE) en el caso de los anticuerpos IgG4. Las variaciones en el formato de anticuerpo biespecífico descrito anteriormente se contemplan dentro del alcance de la presente invención.

[0147] Otros formatos biespecíficos ejemplares que se pueden utilizar en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitación, por ejemplo, formatos biespecíficos basados en scFv o diacuerpo, fusiones de IgG-scFv, dominio variable dual (DVD)-Ig, cuadroma, perillas-en-agujeros, cadena ligera común (por ejemplo, la cadena ligera común con perillas-en-agujeros, etc.), CrossMab, CrossFab, cuerpo (SEED), cremallera de leucina, Duobody, IgG1 / IgG2, Fab de

doble efecto (DAF)-IgG, y Mab² de formatos biespecíficos (véase, por ejemplo, Klein y otros 2012, mAbs. 4: 6, 1 -1 1, y las referencias citadas en el mismo, para una revisión de los formatos anteriores). Los anticuerpos biespecíficos también se pueden construir usando una conjugación de ácido péptido/nucleico, por ejemplo, donde los aminoácidos no naturales con reactividad química ortogonal se utilizan para generar conjugados de anticuerpo-oligonucleótido específicos del sitio que luego se autoensamblan en complejos multiméricos con composición, valencia y geometría definida. (Véase, por ejemplo, Kazane y otros, J. Am Chem. Soc. [Epub: 04 de diciembre 2012]).

Administración Terapéutica y Formulaciones

[0148] La invención proporciona composiciones terapéuticas que comprenden los anticuerpos anti-PD-L1 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la presente invención. Las composiciones terapéuticas de acuerdo con la invención se administrarán con vehículos adecuados, excipientes, y otros agentes que se incorporan en formulaciones para proporcionar una mejor transferencia, suministro, tolerancia, y similares. Una multitud de formulaciones apropiadas se pueden encontrar en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, jaleas, ceras, aceites, lípidos, lípidos (aniónico o catiónico) que contienen vesículas (tales como de LIPOFECTIN[™]), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, aceite-en-agua y agua en emulsiones de aceite, emulsiones carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos, y mezclas semisólidas que contienen Carbowax. Ver también Powell y otros "Compendio de excipientes para formulaciones parenterales" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52: 238-311.

[0149] La dosis de anticuerpo puede variar dependiendo de la edad y el tamaño del sujeto a ser administrado, la enfermedad objetivo, las condiciones, la vía de administración, y similares. Cuando se utiliza un anticuerpo de la presente invención para tratar una enfermedad o trastorno en un paciente adulto, o para la prevención de una enfermedad tal, es ventajoso administrar el anticuerpo de la presente invención normalmente a una dosis única de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 80, aproximadamente 10 a aproximadamente 60, o aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Dependiendo de la severidad de la condición, la frecuencia y la duración del tratamiento se pueden ajustar. En ciertas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención se puede administrar como una dosis inicial de al menos aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 800 mg, aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mg, aproximadamente 5 a aproximadamente 300 mg, o aproximadamente 10 a aproximadamente 200 mg, a aproximadamente 100 mg, o hasta alrededor de 50 mg. En ciertas modalidades, la dosis inicial puede ir acompañada de la administración de una segunda o una pluralidad de dosis posteriores del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo en una cantidad que puede ser aproximadamente la misma o menor que la de la dosis inicial, donde las dosis posteriores están separadas por al menos de 1 día a 3 días; al menos una semana, por lo menos 2 semanas; al menos 3 semanas; al menos 4 semanas; al menos 5 semanas; al menos 6 semanas; al menos 7 semanas; al menos 8 semanas; al menos 9 semanas; al menos 10 semanas; al menos 12 semanas; o al menos 14 semanas.

[0150] Varios sistemas de entrega se conocen y se pueden usar para administrar la composición farmacéutica de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar los virus mutantes, endocitosis mediada por receptor (véase, por

ejemplo, Wu y otros (1987) J. Biol Chem 262: 4429-4432). Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, intradérmica, transdérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. La composición se puede administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y puede administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. La composición farmacéutica puede también administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase, por ejemplo, Langer (1990) Science 249: 1527-1533).

[0151] El uso de nanopartículas para entregar los anticuerpos de la presente invención también se contempla en el presente documento. Las nanopartículas conjugadas con anticuerpo se pueden usar tanto para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Las nanopartículas conjugadas con anticuerpo y los métodos de preparación y uso se describen en detalle por Arruebo, M., y otros 2009 ("nanopartículas conjugadas con anticuerpo para aplicaciones biomédicas" en J. Nanomat Volumen 2009, Número de artículo 439389, 24 páginas, doi: 10.1155/2009/439389), incorporada aquí por referencia. Las nanopartículas pueden ser desarrolladas y conjugadas con anticuerpos contenidos en composiciones farmacéuticas para dirigir las células tumorales o células de tejido autoinmunes o células infectadas por virus. Las nanopartículas para la administración de fármacos también se han descrito en, por ejemplo, US 8.257.740, o US 8.246.995, cada uno incorporado en este documento en su totalidad.

[0152] En ciertas situaciones, la composición farmacéutica se puede entregar en un sistema de liberación controlada. En una modalidad, una bomba puede ser utilizada. En otra modalidad, materiales poliméricos pueden ser utilizados. En aún otra modalidad, un sistema de liberación controlada puede ser colocado en la

proximidad de la composición objetivo, por lo que requiere sólo una fracción de la dosis sistémica.

[0153] Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosificación para administración intravenosa, subcutánea, intracutánea, intracraneal, intraperitoneal e inyecciones intramusculares, infusiones de goteo, etc. Estas preparaciones inyectables se pueden preparar por métodos conocidos públicamente. Por ejemplo, las preparaciones inyectables se pueden preparar disolviendo, suspendiendo o emulsionando el anticuerpo o su sal, descrita anteriormente, en un medio acuoso estéril o un medio oleoso convencionalmente utilizado para inyecciones. Con respecto al medio acuoso para inyección, hay, por ejemplo, solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes auxiliares, etc., que pueden ser utilizados en combinación con un agente solubilizante adecuado tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un agente tensioactivo no iónico [por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (polioxietileno (50 mol) de aducto de aceite de ricino hidrogenado)], etc. Como medio oleoso, se emplean, por ejemplo, aceite de sésamo, aceite de soja, etc., que puede ser utilizado en combinación con un agente solubilizante tal como benzoato de bencilo, alcohol bencílico, etc. La inyección preparada de esta manera se llena preferiblemente en una ampolla adecuada. [0154] Una composición farmacéutica de la presente invención se pueden administrar por vía subcutánea o por vía intravenosa con una aguja y una jeringa estándar. Además, con respecto a la administración subcutánea, un dispositivo de administración de pluma tiene aplicaciones en la entrega de una composición farmacéutica de la presente invención. Tal dispositivo de suministro tipo pluma puede ser reutilizable o desechable. Un dispositivo de administración de pluma reutilizable generalmente utiliza un cartucho reemplazable que contiene una composición farmacéutica. Una vez que toda la composición farmacéutica dentro del cartucho ha sido administrada y el cartucho está vacío, el cartucho

vacío puede ser fácilmente desechado y sustituido por un nuevo cartucho que contiene la composición farmacéutica. El dispositivo de administración de pluma se puede volver a utilizar. En un dispositivo de suministro tipo pluma desechable, no hay cartucho reemplazable. Más bien, el dispositivo de administración de pluma desechable viene lleno previamente con la composición farmacéutica en un depósito dentro del dispositivo. Una vez que el depósito se vacía de la composición farmacéutica, todo el dispositivo se desecha.

[0155] Numerosos dispositivos de entrega de tipo pluma y autoinyectores reutilizables tienen aplicaciones en la administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención. Los ejemplos incluyen, pero sin duda no se limitan a Autopen™ (Owen Mumford, Inc., de Woodstock, Reino Unido), pluma DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Suiza), pluma HUMALOG MIX 75/25™, pluma HUMALOG™, pluma HUMALIN 70 / 30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), pluma BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, y OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Alemania), por nombrar sólo unos pocos. Ejemplos de dispositivos de administración de tipo pluma desechables que tienen aplicaciones en la administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero ciertamente no se limitan a pluma SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), y KWIKPEN™ (Eli Lilly), SURECLICK™ autoinyector (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), EPIPEN (Dey, LP) y la pluma HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), por nombrar sólo unos pocos.

[0156] Ventajosamente, las composiciones farmacéuticas para uso oral o parenteral descritas anteriormente se preparan en formas de dosificación en una dosis unitaria adecuada para adaptarse a una dosis de los ingredientes activos.

Tales formas de dosificación en una dosis unitaria incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampollas), supositorios, etc. La cantidad de anticuerpo contenida es generalmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 mg por dosificación en una dosis unitaria; especialmente en forma de inyección, se prefiere que el anticuerpo esté presente en aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mg y en aproximadamente 10 a aproximadamente 250 mg para las otras formas de dosificación.

Usos Terapéuticos de los Anticuerpos

[0157] Los anticuerpos de la presente invención son útiles para el tratamiento, la prevención, y/o mejora de la enfermedad o trastorno o afección como el cáncer, enfermedad autoinmune o una infección viral y/o para mejorar al menos un síntoma asociado con dicha enfermedad, trastorno o afección. En algunas modalidades de la invención, los anticuerpos descritos en el presente documento son útiles para tratar sujetos que sufren de cáncer primario o recurrente, incluyendo, por ejemplo, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de riñón, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de mama, de cabeza y cuello, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de cerebro, mieloma múltiple y melanoma. Los anticuerpos se pueden usar para tratar síntomas de las etapas tempranas o tardías del cáncer. En una modalidad, un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención puede ser utilizado para tratar el cáncer metastásico. Los anticuerpos son útiles en la reducción o la inhibición o encogimiento del crecimiento tumoral de los tumores sólidos y cánceres de la sangre. En ciertas modalidades, los anticuerpos se pueden usar para prevenir la recaída de un tumor. En ciertas modalidades, el tratamiento con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención puede conducir a más de 50% de regresión, más de 60% de regresión, más de 70% de regresión, más de 80% de regresión o más de 90% de regresión de un tumor en un sujeto. En

ciertas modalidades, los anticuerpos se pueden usar para aumentar la supervivencia de un sujeto que sufre de cáncer.

[0158] En ciertas modalidades, los anticuerpos de la invención son útiles para tratar sujetos que sufren de una infección viral crónica. En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención son útiles en la disminución de los títulos virales en el huésped y/o el rescate de las células T agotadas. En una modalidad, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención pueden ser administrado en una dosis terapéutica a un paciente con una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o virus del papiloma humano (VPH) o virus de hepatitis B/C (HBV / HCV). En una modalidad relacionada, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención se pueden usar para tratar una infección por el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) en un sujeto simio tal como Cynomolgus. En otra modalidad, un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención puede ser utilizado para tratar la infección viral crónica por el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV).

[0159] En ciertas modalidades, un anticuerpo de bloqueo de la presente invención puede ser administrado en una cantidad terapéuticamente eficaz a un sujeto que sufre de cáncer o una infección viral.

[0160] En ciertas modalidades, los anticuerpos de la invención son útiles para el tratamiento de una enfermedad autoinmune, incluyendo pero no limitado a, la alopecia areata, hepatitis autoinmune, enfermedad celíaca, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, enfermedad inflamatoria del intestino, miopatías inflamatorias, esclerosis múltiple, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis reumatoide, esclerodermia, síndrome de Sjogren, lupus sistémico eritematoso, vitiligo, pancreatitis autoinmune, urticaria autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, enfermedad de Crohn, diabetes tipo I, fascitis eosinofílica, enterogastritis eosinofílica, síndrome de Goodpasture, miastenia grave, artritis

psoriásica, fiebre reumática, colitis ulcerosa, vasculitis y granulomatosis de Wegener. En ciertas modalidades, un anticuerpo activador de la invención puede ser utilizado para tratar un sujeto que sufre de enfermedad autoinmune.

[0161] Uno o más anticuerpos de la presente invención se pueden administrar para aliviar o prevenir o disminuir la gravedad de uno o más de los síntomas o condiciones de la enfermedad o trastorno.

[0162] También se contempla en el presente documento usar uno o más anticuerpos de la presente invención profilácticamente a los pacientes en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno tal como el cáncer y la infección viral crónica.

[0163] En una modalidad adicional de la invención, los presentes anticuerpos se utilizan para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de pacientes que sufren de cáncer, enfermedad autoinmune o infección viral. En otra modalidad de la invención, los presentes anticuerpos se utilizan como complemento de la terapia con cualquier otro agente o cualquier otro tratamiento conocido para los expertos en la técnica útil para tratar el cáncer, enfermedad autoinmune o infección viral.

Terapias de Combinación

[0164] Las terapias de combinación pueden incluir un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención y cualquier agente terapéutico adicional que se pueda combinar ventajosamente con un anticuerpo de la invención, o con un fragmento biológicamente activo de un anticuerpo de la invención.

[0165] Los anticuerpos de la presente invención se pueden combinar de forma sinérgica con uno o más fármacos contra el cáncer o terapia para tratar el cáncer, incluyendo, por ejemplo, carcinoma de células renales, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, y melanoma. Se contempla en este documento para usar anticuerpos anti-PD-L1 de

la invención en combinación con inmunoestimulantes y/o terapias inmunosupresoras para inhibir el crecimiento del tumor, y/o aumentar la supervivencia de pacientes con cáncer. Las terapias inmunoestimulantes incluyen terapias inmunoestimulantes directas para aumentar la actividad de células inmunes, ya sea al "soltar el freno" en las células inmunes suprimidas o "pisar el acelerador" para activar una respuesta inmune. Los ejemplos incluyen apuntar a otro puesto de control de los receptores, la vacunación y adyuvantes. Las modalidades inmunosupresoras pueden aumentar la antigenicidad del tumor mediante la promoción de la muerte celular inmunogénica, inflamación o tener otros efectos indirectos que promueven una respuesta inmune anti-tumor. Los ejemplos incluyen la radiación, la quimioterapia, los agentes anti-angiogénicos, y la cirugía.

[0166] En diversas modalidades, uno o más anticuerpos de la presente invención se pueden usar en combinación con un segundo anticuerpo para PD-L1, un anticuerpo para PD-1 (por ejemplo, nivolumab), un inhibidor LAG-3, un inhibidor CTLA- 4 (por ejemplo, ipilimumab), un inhibidor TIM3, un inhibidor BTLA, un inhibidor TIGIT, un inhibidor CD47, un antagonista de otro co-inhibidor de células T o ligando (por ejemplo, un anticuerpo para CD-28, 2B4, LY108, LAIR1, ICOS, CD160 o VISTA), un inhibidor indoleamine-2,3-dioxigenasa (IDO), un antagonista de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [por ejemplo, un "VEGF-Trap" tal como aflibercept u otra proteína de fusión inhibidora de VEGF como se expone en el documento US 7,087,41 1, o un anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, bevacizumab, o ranibizumab) o una molécula pequeña inhibidora de quinasa del receptor VEGF (por ejemplo, sunitinib, sorafenib, o pazopanib)], un inhibidor Ang2 (por ejemplo, nesvacumab), un inhibidor de factor beta de crecimiento transformante (TGF β), un inhibidor receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, erlotinib, cetuximab), un agonista a un receptor co-estimulador (por ejemplo, un agonista de proteína

inducida por glucocorticoides relacionada con TNFR), un anticuerpo para un antígeno específico de tumor (por ejemplo, CA9, CA125, antígeno 3 asociado al melanoma (MAGE3), antígeno carcinoembrionario (CEA), vimentina, tumor-M2-PK, antígeno específico de la próstata (PSA), mucina-1, MART-1, y CA19-9), una vacuna (por ejemplo, Bacillus de Calmette-Guerin, una vacuna contra el cáncer), un adyuvante para aumentar la presentación de antígenos (por ejemplo, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos), un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, anticuerpo biespecífico CD3xCD20, anticuerpo biespecífico PSMAxCD3), una citotoxina, un agente quimioterapéutico (por ejemplo, dacarbazina, temozolomida, ciclofosfamida, docetaxel, doxorubicina, daunorubicina, cisplatino, carboplatino, gemcitabina, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel y vincristina), ciclofosfamida, radioterapia, un inhibidor IL-6R (por ejemplo, sarilumab), un inhibidor IL-4R (por ejemplo, dupilumab), un inhibidor IL-10, una citoquina tal como IL-2, IL-7, IL-21 e IL-15, un conjugado de fármaco anticuerpo (ADC) (por ejemplo, anti-CD19-DM4 ADC, y anti-DS6-DM4 ADC), un fármaco anti-inflamatorio (por ejemplo, corticosteroides, y fármacos anti inflamatorios sin esteroides), un suplemento dietético, tales como antioxidantes o cualquier cuidado paliativo para tratar el cáncer. En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención se pueden usar en combinación con vacunas contra el cáncer, incluidas las vacunas dendríticas de células, virus oncolíticos, vacunas de células tumorales, etc., para aumentar la respuesta anti-tumor. Ejemplos de vacunas contra el cáncer que se pueden utilizar en combinación con anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención incluyen la vacuna MAGE3 para melanoma y cáncer de vejiga, vacuna MUC1 de cáncer de mama, EGFRv3 (por ejemplo, rindopepimut) para el cáncer de cerebro (incluyendo glioblastoma multiforme) o ALVAC-CEA (para CEA + cánceres). En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención se pueden usar

en combinación con un suplemento dietético, tal como antioxidantes o cualquier cuidado paliativo para tratar el cáncer.

[0167] En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención se pueden administrar en combinación con terapia de radiación en métodos para generar respuestas antitumorales duraderas a largo plazo y/o aumentar la supervivencia de los pacientes con cáncer. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención se pueden administrar antes de, concomitantemente o después de la administración de la terapia de radiación a un paciente con cáncer. Por ejemplo, la terapia de radiación se puede administrar en una o más dosis a lesiones tumorales seguidas de la administración de una o más dosis de anticuerpos anti-L1 PD- de la invención. En algunas modalidades, la terapia de radiación se puede administrar localmente a una lesión tumoral para mejorar la inmunogenicidad local del tumor de un paciente (radiación auxiliar) y/o para matar las células tumorales (radiación ablativa) seguido de la administración sistémica de un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención. Por ejemplo, la radiación intracraneal se puede administrar a un paciente con cáncer de cerebro (por ejemplo, glioblastoma multiforme), junto con la administración sistémica de un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención. En ciertas modalidades, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención se pueden administrar en combinación con terapia de radiación y un agente quimioterapéutico (por ejemplo, temozolomida) o un antagonista de VEGF (por ejemplo, aflibercept).

[0168] Los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención se pueden administrar en combinación con uno o más fármacos anti-virales conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitados a, zidovudina, lamivudina, abacavir, ribavirina, lopinavir, efavirenz, cobicistat, tenofovir, rilpivirina y corticosteroides. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención pueden ser administrados en combinación con un inhibidor LAG3, un inhibidor CTLA-4, un

inhibidor PD-1 o cualquier antagonista de otro co-inhibidor de células T para tratar la infección viral crónica.

[0169] Los anticuerpos de fragmentos de los mismos de la invención se pueden usar en combinación con cualquier fármaco o terapia conocida en la técnica (por ejemplo, corticosteroides y otros inmunosupresores) para tratar una enfermedad autoinmune o trastorno que incluye, pero no se limita a, la alopecia areata, hepatitis autoinmune, enfermedad celíaca, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, enfermedad inflamatoria intestinal, miopatías inflamatorias, esclerosis múltiple, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis reumatoide, esclerodermia, síndrome de Sjogren, lupus sistemático eritematoso, vitiligo, pancreatitis autoinmune, urticaria autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, enfermedad de Crohn, diabetes tipo I, fascitis eosinofílica, enterogastritis eosinofílica, síndrome de Goodpasture, miastenia grave, artritis psoriásica, fiebre reumática, colitis ulcerosa, vasculitis y granulomatosis de Wegener.

[0170] El componente o componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar antes de, simultáneamente con, o después de la administración del anticuerpo anti-PD-L1 de la presente invención. Para los propósitos de la presente descripción, dichos regímenes de administración se consideran la administración de un anticuerpo anti-PD-L1 "en combinación con" un segundo componente terapéuticamente activo.

[0171] El componente o componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar a un sujeto antes de la administración de un anticuerpo anti-PD-L1 de la presente invención. Por ejemplo, un primer componente puede ser considerado para ser administrado "antes de" un segundo componente si el primer componente se administra 1 semana antes, 72 horas antes, 60 horas antes, 48 horas antes, 36 horas antes, 24 horas antes, 12 horas antes, 6 horas antes, 5 horas antes, 4 horas antes de, 3 horas antes, de 2 horas antes, 1 hora antes, 30

minutos antes, 15 minutos antes, 10 minutos antes, 5 minutos antes de, o menos de 1 minuto antes de la administración del segundo componente. En otras modalidades, el componente o componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar a un sujeto después de la administración de un anticuerpo anti-PD-L1 de la presente invención. Por ejemplo, un primer componente puede ser considerado para ser administrado "después de" un segundo componente si el primer componente se administra 1 minuto después, 5 minutos después, 10 minutos después, 15 minutos después, 30 minutos después, a 1 hora después, 2 horas después, 3 horas después, 4 horas después, 5 horas después, 6 horas después de, 12 horas después de, 24 horas después de, 36 horas después de, 48 horas después de, 60 horas después de, 72 horas después de la administración del segundo componente. En aún otras modalidades, el componente o componentes terapéuticamente activos adicionales se pueden administrar a un sujeto concurrente con la administración de un anticuerpo anti-PD-L1 de la presente invención. La administración "concurrente", para los propósitos de la presente invención, incluye, por ejemplo, la administración de un anticuerpo anti-PD-L1 y un componente terapéuticamente activo adicional a un sujeto en una sola forma de dosificación (por ejemplo, co-formulado), o en formas separadas de dosificación administradas al sujeto con intervalos de aproximadamente 30 minutos o menos la una de la otra. Si se administra en formas de dosificación separadas, cada forma de dosificación puede administrarse por la misma vía (por ejemplo, tanto el anticuerpo anti-PD-L1 y el componente terapéuticamente activo adicional pueden ser administrados por vía intravenosa, subcutánea, etc.); alternativamente, cada forma de dosificación se puede administrar a través de una ruta diferente (por ejemplo, el anticuerpo anti-PD-L1 se puede administrar por vía intravenosa, y el componente terapéuticamente activo adicional puede ser administrado por vía subcutánea). En cualquier caso, la administración de las componentes en una única dosis, en formas de dosificación separadas por la

misma vía, o en formas de dosificación separadas por diferentes rutas son todas consideradas "administraciones simultáneas", para los propósitos de la presente descripción. Para los propósitos de la presente descripción, la administración de un anticuerpo anti-PD-L1 "antes de", "concurrente con," o "después" (tal como estos términos se definen aquí anteriormente) de la administración de un componente terapéuticamente activo adicional, se considera la administración de un anticuerpo anti-PD-L1 "en combinación con" un componente terapéuticamente activo adicional).

[0172] La presente invención incluye composiciones farmacéuticas donde un anticuerpo anti-PD-L1 de la presente invención se co-formula con uno o más de los componentes activos terapéuticamente adicionales como se describe en otra parte en este documento usando una variedad de combinaciones de dosificación.

[0173] En modalidades ejemplares donde se administra un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención en combinación con un antagonista VEGF (por ejemplo, una trampa VEGF tal como aflibercept), incluyendo la administración de co-formulaciones que comprenden un anticuerpo anti-PD-L1 y un antagonista VEGF, los componentes individuales se pueden administrar a un sujeto y/o co-formular usando una variedad de combinaciones de dosificación. Por ejemplo, el anticuerpo anti-PD-L1 se puede administrar a un sujeto y/o contener en una co-formulación en una cantidad seleccionada del grupo que consiste en 0,01 mg, 0,02 mg, 0,03 mg, 0,04 mg, 0,05 mg, 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg, 0,5 mg, 0,6 mg, 0,7 mg, 0,8 mg, 0,9 mg, 1,0 mg, 1,5 mg, 2,0 mg, 2,5 mg, 3,0 mg, 3,5 mg, 4,0 mg, 4,5 mg, 5,0 mg, 6,0 mg, 7,0 mg, 8,0 mg, 9,0 mg, y 10,0 mg; y el antagonista VEGF (por ejemplo, una trampa VEGF tal como aflibercept) se pueden administrar al sujeto y/o contener en una co-formulación en una cantidad seleccionada del grupo que consiste de 0,1 mg, 0,2 mg, 0,3 mg, 0,4 mg, 0,5 mg, 0,6 mg, 0,7 mg, 0,8 mg, 0,9 mg, 1 0,0 mg, 1,1 mg, 1 0,2 mg, 1,3 mg, 1 0,4 mg, 1 mg 0,5, 1 0,6 mg, 1,7 mg, 1,8 mg, 1 0,9 mg, 2,0 mg, 2,1 mg, 2,2 mg, 2,3 mg, 2,4 mg, 2,5 mg, 2,6 mg, 2,7 mg, 2,8

mg, 2,9 mg y 3,0 mg. Las combinaciones/co-formulaciones se pueden administrar a un sujeto de acuerdo con cualquiera de los regímenes de administración descritos en otra parte en este documento, incluyendo, por ejemplo, dos veces a la semana, una vez cada semana, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, una vez cada mes, una vez cada 2 meses, una vez cada 3 meses, una vez cada 4 meses, una vez cada 5 meses, una vez cada 6 meses, etc.

Regímenes Administrativos

[0174] De acuerdo con ciertas modalidades de la presente invención, múltiples dosis de un anticuerpo anti-L1 PD- (o una composición farmacéutica que comprende una combinación de un anticuerpo anti-PD-L1 y cualquiera de los agentes terapéuticamente activos adicionales que se mencionan en el presente documento) puede administrarse a un sujeto durante un curso de tiempo definido. Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención comprenden la administración secuencial a un sujeto de múltiples dosis de un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención. Como se usa en este documento, "administración secuencial" significa que cada dosis de anticuerpo anti PD-L1 se administra al sujeto en un punto diferente en el tiempo, por ejemplo, en diferentes días separados por un intervalo predeterminado (por ejemplo, horas, días, semanas o meses). La presente invención incluye métodos que comprenden administrar secuencialmente al paciente una dosis inicial única de un anticuerpo anti-PD-L1, seguido de una o más dosis secundarias del anticuerpo anti-PD-L1, y, opcionalmente, seguido de una o más dosis terciarias del anticuerpo anti-PD-L1. El anticuerpo anti-PD-L1 se puede administrar a una dosis de entre 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg.

[0175] Los términos "dosis inicial", "dosis secundarias," y "dosis terciarias," se refieren a la secuencia temporal de la administración del anticuerpo anti-PD-L1 de la invención. Por lo tanto, la "dosis inicial" es la dosis que se administra al comienzo del régimen del tratamiento (también conocida como la "dosis de

referencia"); las dosis "secundarias" son las dosis que se administran después de la dosis inicial; y las "dosis" terciarias son las dosis que se administran después de las dosis secundarias. Todas las dosis iniciales, secundarias y terciarias pueden contener la misma cantidad de anticuerpos anti-PD-L1, pero en general pueden diferir uno del otro en términos de la frecuencia de administración. En ciertas modalidades, sin embargo, la cantidad de anticuerpo anti-PD-L1 contenido en las dosis iniciales, secundarias y/o terciarias varía de unos a otros (por ejemplo, ajustar hacia arriba o hacia abajo según el caso) durante el curso del tratamiento. En ciertas modalidades, dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, o 5) dosis se administran en el comienzo del régimen del tratamiento como "dosis de carga", seguido de dosis posteriores que se administran sobre una base menos frecuente (por ejemplo, "dosis de mantenimiento").

[0176] En ciertas modalidades ejemplares de la presente invención, cada dosis secundaria y/o terciaria se administra 1 a 26 (por ejemplo, 1, 1 ½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4 ½, 5, 5 ½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8 ½, 9, 9 ½, 10, 10 ½, 11, 11 ½, 12, 12 ½, 13, 13½, 14, 14 ½, 15, 15 ½, 16, 16 ½, 17, 17 ½, 18, 18 ½, 19, 19 ½, 20, 20½, 21, 21 ½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, o más) semanas después de la dosis inmediatamente anterior. La frase "la dosis inmediatamente anterior," como se usa en este documento, significa, en una secuencia de múltiples administraciones, la dosis de anticuerpo anti-PD-L1 que se administra a un paciente antes de la administración de la siguiente dosis en la secuencia sin intervención de otras dosis.

[0177] Los métodos de acuerdo con este aspecto de la invención puede comprender administrar a un paciente cualquier número de dosis secundaria y/o terciaria de un anticuerpo anti-PD-L1. Por ejemplo, en ciertas modalidades, sólo una única dosis secundaria se administra al paciente. En otras modalidades, dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más) dosis secundarias se administran al paciente. Del mismo modo, en ciertas modalidades, sólo una única dosis terciaria

se administra al paciente. En otras modalidades, dos o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más) dosis terciarias se administran al paciente.

[0178] En modalidades que implican múltiples dosis secundarias, cada dosis secundaria puede administrarse a la misma frecuencia que las otras dosis secundarias. Por ejemplo, cada dosis secundaria se puede administrar al paciente 1 a 2 semanas o 1 a 2 meses después de la dosis inmediatamente anterior. Del mismo modo, en las modalidades que implican múltiples dosis terciarias, cada dosis terciaria se puede administrar en la misma frecuencia que las otras dosis terciarias. Por ejemplo, cada dosis terciaria se puede administrar al paciente 2 a 12 semanas después de la dosis inmediatamente anterior. En ciertas modalidades de la invención, la frecuencia a la que las dosis secundarias y/o terciarias se administran a un paciente puede variar en el curso del régimen del tratamiento. La frecuencia de administración también se puede ajustar durante el curso del tratamiento por un médico dependiendo de las necesidades individuales del paciente después del examen clínico.

[0179] La presente invención incluye pautas de administración donde 2 a 6 dosis de carga se administran a un paciente en una primera frecuencia (por ejemplo, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, etc.), seguido de la administración de dos o más dosis de mantenimiento para el paciente sobre una base menos frecuente. Por ejemplo, de acuerdo con este aspecto de la invención, si las dosis de carga se administran a una frecuencia de, por ejemplo, una vez al mes (por ejemplo, dos, tres, cuatro, o más dosis de carga administrada una vez al mes), entonces la dosis de mantenimiento se puede administrar al paciente una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada siete semanas, una vez cada ocho semanas, una vez cada diez semanas, una vez cada doce semanas, etc.).

Usos de Diagnóstico de los Anticuerpos

[0180] Los anticuerpos anti-PD-L1 de la presente invención se pueden usar para detectar y/o medir el PD-L1 en una muestra, por ejemplo, para fines de diagnóstico. Algunas modalidades contemplan el uso de uno o más anticuerpos de la presente invención en ensayos para detectar una enfermedad o trastorno como el cáncer, enfermedad autoinmune o infección viral crónica. Los ensayos de diagnóstico ejemplares para PD-L1 pueden comprender, por ejemplo, poner en contacto una muestra, obtenida de un paciente, con un anticuerpo anti-PD-L1 de la invención, donde el anticuerpo anti-PD-L1 está marcado con un marcador detectable o molécula informadora o se utiliza como un ligando de captura para aislar selectivamente a PD-L1 a partir de muestras de pacientes. Alternativamente, un anticuerpo anti-PD-L1 no marcado se puede utilizar en aplicaciones de diagnóstico en combinación con un anticuerpo secundario que es en sí marcado de manera detectable. La etiquetada detectable o molécula reportera puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , o ^{125}I ; una fracción fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o; o una enzima tal como fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, peroxidasa de rábano picante, o luciferasa. Los ensayos ejemplares específicos que se pueden utilizar para detectar o medir PD-L1 en una muestra incluyen enzoinmunoensayo (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

[0181] Las muestras que se pueden utilizar en ensayos de diagnóstico PD-L1 de acuerdo con la presente invención incluyen cualquier muestra de tejido o fluido obtenible a partir de un paciente, que contiene cantidades detectables de cualquiera de las proteínas PD-L1, o fragmentos de los mismos, en condiciones normales o patológicas. En general, los niveles de PD-L1 en una muestra particular obtenida de un paciente sano (por ejemplo, un paciente no aquejado de cáncer o una enfermedad autoinmune) se medirán para establecer inicialmente

una línea de base, o estándar, del nivel de PD-L1. Este nivel básico de PD-L1 a continuación, se puede comparar con los niveles de PD-L1 medidos en muestras obtenidas de individuos sospechosos de tener una condición relacionada con el cáncer, o síntomas asociados con tal condición.

[0182] Los anticuerpos específicos para PD-L1 pueden no contener etiquetas adicionales o fracciones adicionales, o pueden contener una etiqueta o fracción N-terminal o C-terminal. En una modalidad, la etiqueta o fracción es biotina. En un ensayo de unión, la ubicación de una etiqueta (si existe) puede determinar la orientación del péptido con respecto a la superficie sobre la que se une el péptido. Por ejemplo, si una superficie está recubierta con avidina, un péptido que contiene una biotina N-terminal se orientará de tal manera que la porción C-terminal del péptido será distal a la superficie.

[0183] Aspectos de la invención se refieren al uso de los anticuerpos dados a conocer como marcadores para predecir el pronóstico de cáncer o de un trastorno autoinmune en los pacientes. Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar en ensayos de diagnóstico para evaluar el pronóstico de cáncer en un paciente y para predecir la supervivencia.

EJEMPLOS

[0184] Los siguientes ejemplos se exponen a fin de proporcionar a los expertos ordinarios en la técnica una exposición y descripción completas de cómo hacer y usar los métodos y composiciones de la invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero algunos errores y desviaciones experimentales deberían ser explicados. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, peso molecular es peso molecular promedio, la

temperatura es en grados centígrados, la temperatura ambiente es de aproximadamente 25° C, y la presión es la atmosférica o una aproximación.

Ejemplo 1: Generación de Anticuerpos Humanos a PD-L1

[0185] Los anticuerpos humanos a PD-L1 se generaron usando un fragmento de PD-L1 que se extiende desde aproximadamente los aminoácidos 19-239 de SEC ID NO: 351 (Acceso a Genbank NP_054862.1). El inmunógeno se administra directamente, con un adyuvante para estimular la respuesta inmune, a un ratón de VELOCIMMUNE® que comprende ADN que codifica las regiones variables de cadena pesada y ligera kappa de inmunoglobulina humana. La respuesta inmune de anticuerpos se monitorizó mediante un inmunoensayo específico de PD-L1. Cuando se logró una respuesta inmune deseada se recogieron los esplenocitos y se fusionan con células de mieloma de ratón para preservar sus líneas celulares de hibridoma de viabilidad y forma. Las líneas celulares de hibridoma se rastrearon y seleccionaron para identificar las líneas celulares que producen anticuerpos específicos de PD-L1. Usando esta técnica, y el inmunógeno descrito anteriormente, varios anticuerpos quiméricos anti-PD-L1 (es decir, anticuerpos que tienen dominios variables humanos y dominios constantes de ratón) se obtuvieron; anticuerpos ejemplares generados de esta manera se designaron como H2M8306N, H2M8307N, H2M8309N, H2M8310N, H2M8312N, H2M8314N, H2M8316N, H2M8317N, H2M8321 N, H2M8323N, H2M8718N, H2M8718N2, y H2M8719N.

[0186] Los anticuerpos anti-PD-L1 también se aislaron directamente de las células B positivas para antígeno sin fusión de células de mieloma, como se describe en U.S. 2007/0280945A1, incorporado en el presente documento específicamente como referencia en su totalidad. Usando este método, varios anticuerpos anti-PD-L1 completamente humanos (es decir, anticuerpos que tienen dominios variables humanos y dominios constantes humanos) se obtuvieron; anticuerpos ejemplares

generados de esta manera se designaron como sigue: H1 H9323P, H1 H9327P, H1 H9329P, H1 H9336P, H1 H9344P2, H1 H9345P2, H1 H9351 P2, H1 H9354P2, H1 H9364P2, H1 H9373P2, H1 H9382P2, H1 H9387P2, y H1 H9396P2.

[0187] Las propiedades biológicas de los anticuerpos ejemplares generados de acuerdo con los métodos de este ejemplo se describen en detalle en los ejemplos expuestos a continuación.

Ejemplo 2: Secuencias de Aminoácido y Nucleótido de Región Variable de Cadena Pesada y Ligera

[0188] La Tabla 1 define los identificadores de secuencia de aminoácido de las regiones variables de cadena pesada y ligera y CDR de los anticuerpos anti-PD-L1 seleccionados de la invención. Los correspondientes identificadores de secuencia de ácido nucleico se definen en la Tabla 2.

Tabla 1: Identificadores de Secuencia de Aminoácido

	SEQ ID NO							
Designación de Anticuerpo	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H2M8306N	2	4	6	8	10	12	14	16
H2M8307N	18	20	22	24	26	28	30	32
H2M8309N	34	36	38	40	42	44	46	48
H2M8310N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M8312N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2M8314N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M8316N	98	100	102	104	106	108	110	112
H2M8317N	114	116	118	120	122	124	126	128
H2M8321N	130	132	134	136	138	140	142	144

H2M8323N	146	148	150	152	154	156	158	160
H2M8718N	162	164	166	168	170	172	174	176
H2M8718N2	178	180	182	184	170	172	174	176
H2M8719N	186	188	190	192	194	196	198	200
H1H9323P	202	204	206	208	210	212	214	216
H1H9327P	218	220	222	224	226	228	230	232
H1H9329P	234	236	238	240	242	244	246	248
H1H9336P	250	252	254	256	258	260	262	264
H1H9344P2	266	268	270	272	274	276	278	280
H1H9345P2	282	284	286	288	274	276	278	280
H1H9351P2	290	292	294	296	274	276	278	280
H1H9354P2	298	300	302	304	274	276	278	280
H1H9364P2	306	308	310	312	274	276	278	280
H1H9373P2	314	316	318	320	274	276	278	280
H1H9382P2	322	324	326	328	274	276	278	280
H1H9387P2	330	332	334	336	274	276	278	280
H1H9396P2	338	340	342	344	274	276	278	280

Tabla 2: Identificadores de Secuencia de Ácido Nucleico

	SEQ ID NO							
Designación de Anticuerpo	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H2M8306N	1	3	5	7	9	11	13	15
H2M8307N	17	19	21	23	25	27	29	31
H2M8309N	33	35	37	39	41	43	45	47
H2M8310N	49	51	53	55	57	59	61	63
H2M8312N	65	67	69	71	73	75	77	79

H2M8314N	81	83	85	87	89	91	93	95
H2M8316N	97	99	101	103	105	107	109	111
H2M8317N	113	115	117	119	121	123	125	127
H2M8321N	129	131	133	135	137	139	141	143
H2M8323N	145	147	149	151	153	155	157	159
H2M8718N	161	163	165	167	169	174	173	175
H2M8718N2	177	179	181	183	169	174	173	175
H2M8719N	185	187	189	191	193	195	197	199
H1H9323P	201	203	205	207	209	211	213	215
H1H9327P	217	219	221	223	225	227	229	231
H1H9329P	233	235	237	239	241	243	245	247
H1H9336P	249	251	253	255	257	259	261	263
H1H9344P2	265	267	269	271	273	275	277	279
H1H9345P2	281	283	285	287	273	275	277	279
H1H9351P2	289	291	293	295	273	275	277	279
H1H9354P2	297	299	301	303	273	275	277	279
H1H9364P2	305	307	309	311	273	275	277	279
H1H9373P2	313	315	317	319	273	275	277	279
H1H9382P2	321	323	325	327	273	275	277	279
H1H9387P2	329	331	333	335	273	275	277	279
H1H9396P2	337	339	341	343	273	275	277	279

[0189] Los anticuerpos se denominan típicamente en este documento de acuerdo con la siguiente nomenclatura: prefijo Fc (por ejemplo, "H1H", "H2M", "H2aM", etc.), seguido de un identificador numérico (por ejemplo, "8306", "9323 ", etc., como se muestra en la Tabla 1), seguido de un sufijo "P","N"," P2", o "N2". Por lo tanto, de acuerdo con esta nomenclatura, un anticuerpo puede ser referido en el

presente documento como, por ejemplo, "H2M8306N", "H1H9344P2", etc. Los prefijos H1H, H2M y H2aM en las designaciones de anticuerpos utilizadas en el presente documento indican el isotipo de la región Fc en particular del anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo "H1H" tiene un Fc IgG1 humano, un anticuerpo "H1M" tiene un Fc IgG1 ratón, y un anticuerpo "H2M" o "H2aM" tiene un Fc IgG2 ratón, (todas las regiones variables son totalmente humanas como se indica mediante la primera 'H' en la designación de anticuerpos). Como se apreciará por una persona de experiencia ordinaria en la técnica, un anticuerpo que tiene un isotipo Fc particular, se puede convertir en un anticuerpo con un isotipo Fc diferente (por ejemplo, un anticuerpo con una Fc IgG1 de ratón se puede convertir a un anticuerpo con un Fc IgG4 humano, etc.), pero en cualquier caso, los dominios variables (incluyendo las CDR) que están indicados por los identificadores numéricos que se muestran en la Tabla 1, seguirán siendo los mismos, y se espera que las propiedades de unión al antígeno sean idénticas o sustancialmente similares independientemente de la naturaleza del dominio Fc.

Ejemplo 3: Unión de anticuerpo a PD-L1 como se determina por Resonancia de Plasmones de Superficie

[0190] Las constantes de la tasa de asociación y disociación de unión (k_a y k_d , respectivamente), las constantes de equilibrio de disociación y la vida media de disociación (K_D y $t_{1/2}$, respectivamente) de la unión del antígeno a los anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 purificados se determinaron utilizando un ensayo de biosensor de resonancia de plasmones superficiales en tiempo real en un instrumento Biacore 4000. La superficie del sensor Biacore se derivatizó con anticuerpo anti-ratón policlonal de conejo (GE, # BR-1008-38) o con anticuerpo Fc anti-humano monoclonal de ratón (GE, # BR-1008-39) para capturar aproximadamente 200- 300 EF de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1, expresados ya sea con Fc de ratón o con Fc humana, respectivamente. Los

reactivos PD-L1 ensayados para la unión a los anticuerpos anti-PD-L1 incluyen PD-L1 (aminoácidos 19-239 de número de acceso NP_054862.1) humanos recombinantes expresados con una etiqueta myc-myc-hexahistidina C-terminal (hPD-L1 -MMH; SEC ID: 345), PD-L1 de simio *Cynomolgus* recombinante expresado con una etiqueta myc-myc-hexahistidina C-terminal (MfPD-L1 -MMH; SEC ID: 346), PD-L1 humano recombinante (aminoácidos humanos recombinantes 19 - 239 de número de acceso NP_054862.1) expresado ya sea con una etiqueta Fc IgG1 humana C-terminal (hPD-L1 -hFc; SEC ID: 347) o con una etiqueta Fc IgG2a de ratón C-terminal (HPD-L1 -mFc; SEC ID: 348), y PD-L1 de simio *Cynomolgus* recombinante expresado con una etiqueta Fc IgG2a de ratón C-terminal (MfPD-L1 -mFc; SEC ID: 353). Las diferentes concentraciones de reactivos PD-L1 se inyectaron sobre la superficie capturada del anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 a una velocidad de flujo de 30µL/min. La unión de los reactivos de PD-L1 a los anticuerpos monoclonales capturados se controló durante 3 a 4 minutos mientras que la disociación de los reactivos PD-L1 de unión de anticuerpo se monitorizó durante 10 minutos en un tampón HBST en ejecución (0,01 M de HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, EDTA 3 mM, 0,05% v/v surfactante Tween-20). Los experimentos se realizaron a 25° C o 37° C de temperatura. Las constantes de la tasa de asociación (k_a) y disociación (k_d) cinética de velocidad se determinaron mediante el procesamiento y ajuste de los datos a un modelo de unión 1:1 usando software de ajuste de curva Scrubber 2.0c. Las constantes del equilibrio de disociación de unión (K_D) y la vida media de disociación ($t_{1/2}$) se calcula entonces a partir de las constantes de velocidad cinética como: K_D (M) = k_d / k_a y $t_{1/2}$ (min) = $[\ln 2 / (60 * k_d)]$. Los parámetros cinéticos de unión para diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 que se unen a diferentes reactivos PD-L1 a 25° C y 37 °C se tabulan en las Tablas 3-8.

Tabla 3: Parámetros Cinéticos de Unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 que se unen a hPD-L1-MMH a 25°C

Unión de Monómero hPD-L1-MMH a 25°C				
Anticuerpo	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	K _D (M)	t ¹ / ₂ (min)
H2aM8306N	1.44 E+05	1.00 E-02	6.96 E-08	1.2
H2aM8307N	3.27 E+04	1.47 E-04	4.50 E-09	79
H2aM8309N	6.42 E+05	1.04 E-02	1.63 E-08	1.1
H2aM8310N	8.86 E+04	3.10 E-04	3.50 E-09	37
H2aM8312N	7.59 E+04	7.22 E-04	9.51 E-09	16
H2aM8314N	9.25 E+05	5.17 E-05	5.58 E-11	224
H2aM8316N	9.57 E+05	1.12 E-05	1.17 E-09	10
H2aM8317N	9.40 E+04	3.95 E-02	4.21 E-07	0.3
H2aM8321N	1.03 E+05	3.59 E-03	3.49 E-08	3.2
H2aM8323N	9.37 E+05	2.23 E-04	2.38 E-10	52
H2aM8718N	9.27 E+05	8.01 E-05	8.36 E-11	144
H2aM8719N	8.64 E+04	2.26 E-03	2.62 E-08	5.1
H1H9323P	5.51 E+04	1.88 E-02	3.41 E-07	0.6
H1H9327P	4.19 E+05	2.59 E-04	6.19 E-10	45
H1H9329P	1.77 E+06	1.34 E-01	7.58 E-08	0.1
H1H9336P	7.92 E+05	3.90 E-04	4.92 E-10	30
H1H9345P2	9.02 E+04	1.49 E-02	1.65 E-07	0.8
H1H9351P2	4.56 E+05	8.96 E-04	1.96 E-09	13
H1H9354P2	4.76 E+04	3.83 E-04	8.04 E-09	30
H1H9364P2	9.32 E+05	2.99 E-04	3.21 E-10	39
H1H9373P2	2.65 E+06	2.91 E-04	1.10 E-10	40
H1H9382P2	7.90 E+04	4.79 E-03	6.06 E-08	2.4
H1H9387P2	2.64 E+06	5.82 E-02	2.21 E-08	0.2

H1H9396P2	1.72 E+05	2.18 E-03	1.27 E-08	5.3
-----------	-----------	-----------	-----------	-----

Tabla 4: Parámetros Cinéticos de Unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 que se unen a hPD-L1-MMH a 37°C

Unión de Monómero hPD-L1-MMH a 37°C				
Anticuerpo	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	K _D (M)	t ¹ / ₂ (min)
H2aM8306N	1.80 E+05	3.10 E-02	1.72 E-07	0.4
H2aM8307N	5.35 E+04	8.79 E-04	1.64 E-08	13
H2aM8309N	1.06 E+06	3.14 E-02	2.97 E-08	0.4
H2aM8310N	1.32 E+05	1.28 E-03	9.70 E-09	9.0
H2aM8312N	8.89 E+04	4.03 E-03	4.53 E-08	2.9
H2aM8314N	1.07 E+06	1.50 E-04	1.40 E-10	77
H2aM8316N	1.01 E+06	5.30 E-03	5.24 E-09	2.2
H2aM8317N	9.03 E+04	5.85 E-02	6.47 E-07	0.2
H2aM8321N	1.01 E+05	9.29 E-03	9.16 E-08	1.2
H2aM8323N	1.3 E+06	6.84 E-04	4.97 E-10	17
H2aM8718N	1.08 E+06	1.55 E-04	1.44 E-10	74
H2aM8719N	1.50 E+05	5.76 E-03	3.84 E-08	2.0
H1H9323P	1.21 E+05	4.25 E-02	3.52 E-07	0.3
H1H9327P	5.21 E+05	4.29 E-04	8.24 E-10	27
H1H9329P	2.82 E+06	3.29 E-01	1.17 E-07	0.04
H1H9336P	1.07 E+06	7.88 E-04	7.33 E-10	15
H1H9345P2	1.72 E+05	3.40 E-02	1.97 E-07	0.3
H1H9351P2	6.82 E+05	1.68 E-03	2.47 E-09	6.9
H1H9354P2	7.39 E+04	1.14 E-03	1.54 E-08	10
H1H9364P2	1.35 E+06	5.63 E-04	4.17 E-10	21
H1H9373P2	3.09 E+06	5.58 E-04	1.80 E-10	21

H1H9382P2	9.97 E+04	1.07 E-02	1.07 E-07	1.1
H1H9387P2	3.49 E+06	1.37 E-01	3.91 E-08	0.08
H1H9396P2	3.44 E+05	1.13 E-02	3.30 E-08	1.0

Tabla 5: Parámetros Cinéticos de Unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 que se unen a Dímero PD-L1 humano a 25°C

Unión de Dímero PD-L1 Humano a 25°C				
Anticuerpo	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	K _D (M)	t½ (min)
H2aM8306N	7.39 E+05	3.09 E-04	4.18 E-10	37
H2aM8307N	1.89 E+04	2.89 E-05	1.54 E-09	399
H2aM8309N	3.3 E+06	1.44 E-04	4.29 E-11	80
H2aM8310N	3.13 E+05	5.71 E-05	1.83 E-10	202
H2aM8312N	2.47 E+05	1.02 E-04	4.13 E-10	113
H2aM8314N	3.16 E+06	1.35 E-05	4.26 E-12	859
H2aM8316N	3.08 E+06	1.44 E-04	4.68 E-11	80
H2aM8317N	3.59 E+05	4.50 E-04	1.25 E-09	26
H2aM8321N	8.13 E+05	2.87 E-04	3.53 E-10	40
H2aM8323N	2.91 E+06	2.05 E-05	7.04 E-12	565
H2aM8718N	3.20 E+06	1.62 E-05	5.06 E-12	713
H2aM8719N	3.42 E+05	2.62 E-04	7.67 E-10	44
H1H9323P	2.24 E+05	1.69 E-04	7.54 E-10	68
H1H9327P	4.66 E+05	7.87 E-05	1.69 E-10	147
H1H9329P	2.97 E+06	7.68 E-04	2.59 E-10	15
H1H9336P	1.38 E+06	1.09 E-04	7.86 E-11	106
H1H9345P2	5.00 E+05	2.37 E-04	4.74 E-10	49
H1H9351P2	9.16 E+05	1.53 E-04	1.67 E-10	76
H1H9354P2	1.68 E+05	1.16 E-04	6.89 E-10	100

H1H9364P2	2.42 E+06	1.06 E-04	4.37 E-11	109
H1H9373P2	4.08 E+06	1.06 E-04	2.60 E-11	109
H1H9382P2	2.23 E+05	1.48 E-04	6.63 E-10	78
H1H9387P2	5.07 E+06	2.18 E-04	4.27 E-11	53
H1H9396P2	7.76 E+05	1.90 E-04	2.45 E-10	61

Tabla 6: Parámetros Cinéticos de Unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 que se unen a Dímero PD-L1 humano a 37°C

Unión de Dímero PD-L1 Humano a 37°C				
Anticuerpo	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	K _D (M)	t ¹ / ₂ (min)
H2aM8306N	9.97 E+05	4.16 E-04	4.17 E-10	28
H2aM8307N	4.41 E+04	2.21 E-04	5.00 E-09	52
H2aM8309N	4.41 E+06	1.66 E-04	3.76 E-11	70
H2aM8310N	4.84 E+05	1.24 E-04	2.58 E-10	93
H2aM8312N	3.57 E+05	2.61 E-04	7.32 E-10	44
H2aM8314N	3.89 E+06	2.30 E-05	5.91 E-12	503
H2aM8316N	4.06 E+06	2.37 E-04	5.85 E-11	49
H2aM8317N	4.81 E+05	6.57 E-04	1.36 E-09	18
H2aM8321N	9.46 E+05	2.69 E-04	2.85 E-10	43
H2aM8323N	4.32 E+06	1.21 E-04	2.80 E-11	96
H2aM8718N	3.72 E+06	1.98 E-05	5.32 E-12	584
H2aM8719N	4.37 E+05	2.91 E-04	6.66 E-10	40
H1H9323P	5.19 E+05	2.03 E-04	3.91 E-10	57
H1H9327P	6.83 E+05	1.36 E-04	2.00 E-10	85
H1H9329P	3.87 E+06	2.67 E-03	6.89 E-10	4.3
H1H9336P	2.75 E+06	8.3 E-05	3.02 E-11	139
H1H9345P2	6.82 E+05	2.03 E-04	2.97 E-10	57

H1H9351P2	1.25 E+06	1.46 E-04	1.17 E-10	79
H1H9354P2	4.56 E+05	1.45 E-04	3.17 E-10	80
H1H9364P2	3.34 E+06	6.96 E-05	2.08 E-11	166
H1H9373P2	5.12 E+06	8.97 E-05	1.75 E-11	129
H1H9382P2	4.92 E+05	1.37 E-04	2.87 E-10	84
H1H9387P2	6.12 E+06	3.92 E-04	6.39 E-11	29
H1H9396P2	1.09 E+06	2.58 E-04	2.37 E-10	45

Tabla 7: Parámetros Cinéticos de Unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 que se unen a MfPD-L1-MMH a 25°C

Unión de Monómero MfPD-L1-MMH a 25°C				
Anticuerpo	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	K _D (M)	t½ (min)
H2aM8306N	1.65 E+05	7.88 E-03	4.77 E-08	1.5
H2aM8307N	2.61 E+04	1.07 E-03	4.09 E-08	11
H2aM8309N	8.70 E+05	1.30 E-02	1.49 E-08	0.9
H2aM8310N	1.03 E+05	3.06 E-04	2.97 E-09	38
H2aM8312N	7.09 E+04	5.97 E-04	8.42 E-09	19
H2aM8314N	9.66 E+05	7.00 E-05	7.24 E-11	165
H2aM8316N	9.71E+05	1.64 E-03	1.69 E-09	7.0
H2aM8317N	1.06 E+05	2.38 E-02	2.26 E-07	0.5
H2aM8321N	1.34 E+05	4.02 E-03	2.99 E-08	2.9
H2aM8323N	5.47 E+05	8.68 E-03	1.59 E-08	1.3
H2aM8718N	9.04 E+05	6.64 E-05	7.35 E-11	174
H2aM8719N	8.17 E+04	2.68 E-03	3.28 E-08	4.3
H1H9323P	8.22 E+04	2.40 E-02	2.92 E-07	0.5
H1H9327P	3.59 E+05	3.33 E-04	9.28 E-10	35
H1H9329P	1.76 E+06	1.35 E-01	7.69 E-08	0.09

H1H9336P	6.79 E+05	5.94 E-04	8.76 E-10	19
H1H9345P2	1.10 E+05	8.50 E-03	7.73 E-08	1.4
H1H9351P2	3.49 E+05	1.11 E-03	3.19 E-09	10
H1H9354P2	4.60 E+04	3.02 E-04	6.64 E-09	38
H1H9364P2	7.57 E+05	3.12 E-04	4.12 E-10	37
H1H9373P2	2.21 E+06	2.82 E-04	1.27 E-10	41
H1H9382P2	8.22 E+04	1.29 E-02	1.57 E-07	0.9
H1H9387P2	2.37 E+06	6.04 E-02	2.55 E-08	0.2
H1H9396P2	2.06 E+05	2.52 E-03	1.22 E-08	4.6

Tabla 8: Parámetros Cinéticos de Unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 que se unen a MfPD-L1-MMH a 37°C

Unión de Monómero MfPD-L1-MMH a 37°C				
Anticuerpo	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	K _D (M)	t½ (min)
H2aM8306N	2.74E+05	3.68E-02	1.34 E-07	0.3
H2aM8307N	1.87E+05	1.43 E-03	7.63 E-09	8.1
H2aM8309N	1.07E+06	2.81 E-02	2.63 E-08	0.4
H2aM8310N	4.71E+05	1.07 E-03	2.27 E-09	11
H2aM8312N	1.01E+05	3.32	3.27 E-08	3.5
H2aM8314N	1.07E+06	1.52 E-04	1.42 E-10	76
H2aM8316N	1.02E+06	5.3 E-03	5.27 E-09	2.1
H2aM8317N	2.66E+05	4.76 E-02	1.79 E-07	0.2
H2aM8321N	1.59E+05	8.16 E-03	5.11 E-08	1.4
H2aM8323N	9.56E+05	2.82 E-02	2.95 E-08	0.4
H2aM8718N	1.10E+06	1.46 E-04	1.33 E-10	79
H2aM8719N	1.35E+05	6.99 E-03	5.19 E-08	1.7
H1H9323P	1.25E+05	4.99 E-02	3.98 E-07	0.2

H1H9327P	4.77E+05	5.34 E-04	1.12 E-09	22
H1H9329P	2.66E+06	3.64 E-01	1.37 E-07	0.03
H1H9336P	9.09E+05	1.25 E-03	1.38 E-09	9.2
H1H9345P2	1.64E+05	1.97 E-02	1.21 E-07	0.6
H1H9351P2	5.60E+05	2.01 E-03	3.59 E-09	2.8
H1H9354P2	8.59E+04	8.44E-04	9.82 E-09	14
H1H9364P2	1.12E+06	6.33E-04	5.66 E-10	18
H1H9373P2	2.81E+06	5.69E-04	2.03 E-10	20
H1H9382P2	1.30E+05	2.45E-02	1.89 E-07	0.5
H1H9387P2	3.20E+06	1.57E-01	4.89 E-08	0.07
H1H9396P2	3.94E+05	1.20 E-02	3.05E-08	1.0

Tabla 9: Parámetros Cinéticos de Unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 que se unen a PD-L1-mFc de mono a 25°C

Unión de MfPD-L1-mFc a 25°C				
Anticuerpo	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	K _D (M)	t ¹ / ₂ (min)
H1H8314N	2.58E+06	6.77E-05	2.63E-11	171
HAH8316N	2.71E+06	5.23E-05	1.93E-11	221
H1H8323N	2.67E+06	6.16E-05	2.31E-11	188
H1H9351P2	7.81E+05	7.19E-05	9.22E-11	161
H1H9364P2	1.32E+06	7.75E-05	5.87E-11	149
H1H9373P2	2.85E+06	4.96E-05	1.74E-11	233
H1H9387P2	3.55E+06	1.61E-04	4.52E-11	72
H1H9351P2	8.64E+05	7.80E-05	9.03E-11	148
H1H9364P2	1.25E+06	5.80E-05	4.62E-11	199
H1H9373P2	3.27E+06	6.55E-05	2.00E-11	176
H1H9387P2	2.90E+06	2.12E-04	7.30E-11	55

H1H9323P	2.80E+05	1.45E-04	5.19E-10	79
H1H9327P	3.84E+05	1.02E-04	2.94E-10	113
H1H9329P	1.74E+06	6.72E-04	3.86E-10	17
H1H9336P	9.90E+05	6.16E-05	6.22E-11	188
H1H9344P2	3.50E+05	1.38E-04	3.93E-10	84
H1H9345P2	2.96E+05	1.51E-04	5.12E-10	76
H1H9354P2	2.05E+05	9.14E-05	4.47E-10	126
H1H9382P2	2.13E+05	1.33E-04	6.26E-10	87
H1H9396P2	8.37E+05	1.88E-04	2.25E-10	61

Tabla 10: Parámetros Cinéticos de Unión de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 que se unen a PD-L1-mFc de mono a 37°C

Unión de MfPD-L1-mFc a 37°C				
Anticuerpo	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	K _D (M)	t½ (min)
H1H8314N	2.89E+06	9.60E-05	3.33E-11	120
HAH8316N	2.96E+06	6.16E-05	2.08E-11	187
H1H8323N	2.99E+06	1.35E-04	4.51E-11	86
H1H9351P2	1.06E+06	9.46E-05	8.91E-11	122
H1H9364P2	2.36E+06	1.11E-04	4.71E-11	104
H1H9373P2	3.15E+06	8.59E-05	2.73E-11	134
H1H9387P2	3.41E+06	4.74E-04	1.39E-10	24
H1H9351P2	1.61E+06	1.04E-04	6.47E-11	111
H1H9364P2	2.41E+06	6.76E-05	2.80E-11	171
H1H9373P2	3.86E+06	1.23E-04	3.19E-11	94
H1H9387P2	2.90E+06	5.65E-04	1.61E-10	25
H1H9323P	3.84E+05	2.44E-04	6.36E-10	47
H1H9327P	7.64E+05	2.94E-04	3.85E-10	39

H1H9329P	2.18E+06	1.54E-03	7.08E-10	8
H1H9336P	1.86E+06	4.60E-05	2.47E-11	251
H1H9344P2	9.05E+05	2.17E-04	2.40E-10	53
H1H9345P2	8.61E+05	2.92E-04	3.39E-10	40
H1H9354P2	2.72E+05	2.03E-04	7.46E-10	57
H1H9382P2	2.84E+05	2.35E-04	8.25E-10	49
H1H9396P2	1.57E+06	5.05E-04	3.19E-10	23

[0191] Como se muestra en la Tabla 3, a 25° C, todos los 25 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención unidos a HPD-L1-MMH tienen valores de K_D que van desde 55.8pM a 421 nM. Como se muestra en la Tabla 4, a 37° C, todos los 25 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención unidos a HPD-L1-MMH tienen valores de K_D que van de 140pM a 647nm. Como se muestra en la Tabla 5, a 25° C, todos los 25 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención unidos a HPD-L1 dímero tienen valores de K_D que van desde 4.26 pM a 1.54nM. Como se muestra en la Tabla 6, a 37 ° C, todos los 25 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención unidos a HPD-L1 dímero tienen valores de K_D que van desde 5.32 pM a 5.0nM. Como se muestra en la Tabla 7, a 25° C, todos los 25 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención unidos a MfPD-L1-MMH tienen valores de K_D que van desde 72.4pM a 292nM. Como se muestra en la Tabla 8, a 37° C, todos los 25 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención unidos a MfPD-L1-MMH tienen valores de K_D que van de 133pM a 398nM. Como se muestra en la Tabla 9, a 25°C, todos los 20 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención ensayados unidos a MfPD-L1-mFc tiene valores de K_D que van desde 17.4pM a 626pM. Como se muestra en la Tabla 10, a 37°C, todos los 20 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención ensayados unidos a MfPD-L1-mFc tienen valores de K_D que van desde 20.8pM a 825pM.

Ejemplo 4: Bloqueo de unión de PD-L1 a PD-1 como se determina por ELISA

[0192] La capacidad de los anticuerpos anti-PD-L1 monoclonales para bloquear el PD-L1 humano de la unión a sus parejas de unión, el PD-1 humano y los receptores B7-1 humanos, se midió utilizando dos formatos ELISA sándwich de competencia.

[0193] Una proteína PD-1 humana dimérica compuesta de una porción del dominio extracelular (aminoácidos 25-170 de número de acceso NP_005009.2 con un cambio C93S) que se expresa con una etiqueta hFc C-terminal (HPD-1-hFc; SEC ID: 350) y una proteína B7-1 humana dimérica compuesta de una porción del dominio extracelular expresada con la etiqueta hFc C-terminal y las etiquetas de hexahistidina (hB7-1 -hFc-6His; R & D Systems, #140-B1) se recubrieron por separado a 2 µg/ml en una placa de microtitulación de 96 pozos en un tampón de PBS durante la noche a 4°C. Los sitios de unión no específicos se bloquearon posteriormente utilizando un 0,5% de solución de BSA en PBS (v/w). Una cantidad constante de 0,5 nM o 8,0 nM de una proteína hPD-L1 dimérica compuesta de una porción del dominio extracelular PD-L1 humano que se expresa con una etiqueta mFc C-terminal (HPD-L1 -mFc; SEC ID: 348) se valoró separadamente con concentraciones de anticuerpos anti-PD-1 y anticuerpos de control de isotipo que oscilan entre 0 a 210 nM en dilución en serie. Estos complejos de proteína anticuerpos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (RT). Complejos con 0,5 nM constante HPD-L1-mFc se transfirieron posteriormente a placas de microtitulación recubiertas con HPD-1-hFc, y complejos con 8 nM constantes HPD-L1 -mFc fueron transferidos a placas recubiertas con hB7-1-HFC-6His. Se les permitió a los complejos unirse a las placas recubiertas durante 1 hora a RT. Después de 1 hora de incubación, los pozos se lavaron y se detectó unido a la placa HPD-L1-mFc con un anticuerpo policlonal anti-mFc conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch, # 115-035-164). Las muestras se desarrollaron con una solución de TMB (BD Biosciences, # 51-2606KC y # 51-2607KC) para producir una reacción colorimétrica y se neutralizó

con ácido sulfúrico 1M antes de medir la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Victor X5. El análisis de datos utiliza un modelo de respuesta de dosis sigmoideal dentro del software Prism™. El valor de IC₅₀ calculado, definido como la concentración de anticuerpo necesaria para bloquear 50% de la unión de HPD-L1-mFc a HPD-1-hFc o hB7-1- HFC-6His, se utilizó como indicador de la potencia de bloqueo. Los valores máximos de bloqueo representan la capacidad de los anticuerpos para bloquear la unión de hPD-L1-mFc con respecto a la base. La absorbancia medida en la cantidad constante de hPD-L1 en la curva de dosis se define como 0% de bloqueo y la absorbancia sin hPD-L1 añadido se define como 100% de bloqueo. Los valores de absorbancia de los pozos que contienen la concentración más alta para cada anticuerpo se utilizaron para determinar el porcentaje de bloqueo a la máxima concentración ensayada del anticuerpo. Los anticuerpos con un máximo porcentaje de bloqueo por debajo de 25% se caracterizaron como no-bloqueantes, y sus valores IC₅₀ no se reportaron en la Tabla 11. Los anticuerpos con un porcentaje máximo de bloqueo por debajo de - 25% se caracterizaron como no-bloqueantes/potenciadores.

Tabla 11: bloqueo ELISA de la unión de hPD-L1-mFc a hPD-1-HFC y hB7-1-HFC-6His por anticuerpos anti-PD-L1

Anticuerpo	Concentración de anticuerpo máxima (nM) probada en recubrimiento hPD-1-hFc	Bloqueo 0.5 NM de unión de hPD-L1-mFc a hPD-1-hFc, IC ₅₀ (M)	Bloqueo 0.5 NM de unión de hPD-L1-mFc a hPD-1-hFc, %máximo bloqueo	Concentración de anticuerpo máxima (nM) probada en recubrimiento hB7-1-hFc-6His	Bloqueo 8 NM de unión de hPD-L1-mFc a hPD-1-hFc-6His, IC ₅₀ (M)	Bloqueo 8 NM de unión de hPD-L1-mFc a hB7-1-hFc-6His, %máximo bloqueo
------------	--	---	--	---	--	---

H2aM8306N	50	<2.5E-10(*)	99	150	<4.0E-09(*)	93
H2aM8307N	50	IC	29	150	NBI/ Mejora- dor	-44
H2aM8309N	50	<2.5E-10(*)	98	150	<4.0E-09(*)	98
H2aM8310N	50	3.9E-10	76	150	<4.0E-09(*)	98
H2aM8312N	50	NBI	23	150	<4.0E-09(*)	98
H2aM8314N	50	<2.5E-10(*)	93	150	<4.0E-09(*)	97
H2aM8316N	50	<2.5E-10(*)	96	150	<4.0E-09(*)	98
H2aM8317N	50	NBI	-11	150	NBI/ Mejora- dor	-166
H2aM8321N	50	NBI	10	150	NBI/ Mejora- dor	-124
H2aM8323N	50	<2.5E-10(*)	100	150	<4.0E-09(*)	99
H2aM8718N	50	<2.5E-10(*)	97	150	1.0E-08	57
H2aM8719N	50	7.7E-10	95	150	NBI/ Mejora-	-50

					dor	
H1H9323P	50	<2.5E-10(*)	43	210	NBI/ Mejora- dor	-25
H1H9327P	50	NBI/ mejorador	-28	210	IC	41
H1H9329P	50	<2.5E-10(*)	100	210	4.9E-09	100
H1H9336P	50	<2.5E-10(*)	100	210	4.4E-09	99
H1H9344P2	50	NBI	15	210	NBI/ Mejora- dor	-51
H1H9345P2	50	<2.5E-10(*)	26	210	NBI/ Mejora- dor	-34
H1H9351P2	50	<2.5E-10(*)	100	210	4.4E-09	100
H1H9354P2	50	5.3E-10	34	210	NBI	-13
H1H9364P2	50	<2.5E-10(*)	100	210	4.1E-09	101
H1H9373P2	50	<2.5E-10(*)	100	210	4.6E-09	101
H1H9382P2	50	<2.5E-10(*)	39	210	NBI/ Mejora- dor	-30
H1H9387P2	50	<2.5E-	100	210	<4.0E-	100

		10(*)			09(*)	
H1H9396P2	50	<2.5E-10(*)	59	210	NBI	8
Control de isotipo-IgG1 humano	50	NBI	-11	210	NBI	-3
Control de isotipo-IgG2a de ratón	50	NBI	5	210	NBI	-3

(*) - debajo de la base teórica del ensayo; La base teórico del ensayo es 2.5E-10M para la capa hPD-1-hFc y 4.0E-09 M para la capa hB7-1-hFc-6His; NBI - no bloqueador; IC - concluyente

[0194] Como se muestra en la Tabla 11, 19 de los 25 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención bloquearon la unión de 0,5 nM de hPD-L1-mFc a HPD-1-hFc con valores de IC₅₀ que oscilan desde menos de 250pM a 770pM con el máximo porcentaje de bloqueo que va desde 26% a 100%. Cuatro de los 25 anticuerpos anti-PD-L1 probados fueron caracterizados como no bloqueadores de la unión de hPD-L1-mFc a HPD-1-hFc, mientras que un anticuerpo probado (H1H9327P) se caracterizó como un no-bloqueador/potenciador de la unión de hPD-L1-mFc a hPD-1-hFf. Un anticuerpo (H2aM8307N) demostró un bloqueo débil de la unión de hPD-L1-mFc a hPD-1-hFc con un máximo porcentaje de bloqueo de 29%; sin embargo, el valor de IC₅₀ no se pudo determinar para esta muestra.

[0195] Por otra parte, 14 de los 25 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención bloquearon la unión de 8 nM de hPD-L1-MFC a hB7-1-hFc-6His con valores de IC₅₀ de <4 nM a 10 nm con un porcentaje de bloqueo máximo que oscila entre 57% al 101%. Dos de los 25 anticuerpos anti-PD-L1 ensayados fueron caracterizados como no-bloqueadores de la unión de hPD-L1-mFc a hB7-1-hFc-

6His, mientras que 8 anticuerpos ensayados fueron caracterizados como no-bloqueantes/potenciadores de la unión de hPD-L1-mFc a hB7-1-hFc-6His. Un anticuerpo (H1H9327P) demostró un bloqueo débil de la unión de hPD-L1-mFc a hB7-1-hFc-6His con un máximo porcentaje de bloqueo del 41%; sin embargo, el valor de IC₅₀ no se pudo determinar para esta muestra.

Ejemplo 5: Bloqueo de la unión de PD-L1 a PD-1 como se determina por el ensayo de biosensor y por resonancia de plasmón superficial

[0196] La inhibición de la unión de PD-L1 humano a PD-1 humano por diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 fue estudiada ya sea usando el ensayo de interferometría de bio-capa en tiempo real sobre un instrumento de biosensor Octet Red96 (Fortebio Inc.) o el uso de un ensayo de biosensor de resonancia de plasmón superficial en tiempo real sobre un instrumento Biacore 3000.

[0197] Se realizaron estudios de inhibición de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 expresadas con Fc ratón en un instrumento Octeto Red96. En primer lugar, 100 nM de un PD-L1 humano recombinante expresado con una etiqueta de Fc IgG2a de ratón C-terminal (HPD-L1-mFc; SEC ID: 348) se incubó con 500 nM de cada anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 durante al menos 1 hora antes de ejecutar el ensayo de inhibición. Aproximadamente de 0,8 nm a 1.2 nm de PD-1 humano recombinante expresado con una etiqueta de Fc IgG1 humano C-terminal (hPD-1-hFc; SEC ID: 350) fue capturado utilizando biosensores de captura de Fc IgG anti-humano. Los biosensores Octet capturados con hPD-1-hFc se sumergieron posteriormente en los pozos que contienen la mezcla de hPD-L1-mFc y anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 diferentes. Todo el experimento se realizó a 25° C en el tampón Octet HBST (0.01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, EDTA 3 mM, 0,05% v/v surfactante P20, 0,1 mg/mL BSA) con una placa de agitación a una velocidad de 1000 rpm. Los biosensores se lavaron en tampón Octet HBST entre cada paso del experimento. La respuesta de unión en tiempo real fue

monitoreada durante el curso del experimento y la respuesta de unión en el extremo de cada paso. La unión de hPD-L1-mFc al hPD-1-hFc capturado se comparó en presencia y ausencia de diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 y se utilizó para determinar el comportamiento de bloqueo de los anticuerpos ensayados como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12: Inhibición de la unión de PD-1 humano a PD-L1 humano por diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 expresados con Fc de ratón llevado a cabo en el instrumento Octet Red96.

Anticuerpo monoclonal anti-PD-L1	Cantidad de hPD-1-hFc capturado (nm)	Unión de la mezcla del anticuerpo monoclonal 100nM de hDP-L1-mFc y 500nM de anti-PD-L1 (nm)	% Bloqueo
Sin anticuerpo	1.05	0.31	0
H2aM8306N	0.98	0.02	94
H2aM8307N	1.01	0.46	-48
H2aM8309N	0.89	0.02	94
H2aM8310N	0.95	0.13	58
H2aM8312N	1.06	0.52	-68
H2aM8314N	0.99	0.02	94
H2aM8316N	1.06	0.01	97
H2aM8317N	0.92	0.58	-87
H2aM8321N	1.04	0.60	-94

H2aM8323N	1.00	0.02	94
H2aM8718N	1.08	0.01	97
H2aM8719N	0.93	0.11	65
Anticuerpo de control de isotipo	1.10	0.35	-13

[0198] Como se muestra en la Tabla 12, 8 de los 12 anticuerpos anti-PD-L1 ensayados en el instrumento Octet Red96 demostraron el bloqueo de la unión de hPD-L1-mFc a hPD-1-hFc que van desde 58% a 97%. Cuatro anticuerpos anti-PD-L1 probados demostraron la capacidad de mejorar la unión de hPD-L1-mFc a hPD-1-hFc.

[0199] A continuación, estudios de inhibición de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 expresados con Fc humana se realizaron en el instrumento Biacore 3000. En primer lugar, 100 nM de PD-L1 recombinante humano expresado con una etiqueta de Fc IgG1 humano C-terminal (hPD-L1-hFc; SEC ID: 350) se incubó con 500 nM de cada anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 durante al menos 1 hora antes de ejecutar el ensayo de inhibición. Una superficie de sensor CM5 Biacore se derivatizó primero con anticuerpo policlonal específico IgG2a anti-ratón (Southern Biotech, # 1080-1001) utilizando la química estándar EDC-NHS. Aproximadamente 230 RU de PD-1 humano recombinante expresado con una etiqueta Fc IgG2a de ratón C-terminal (hPD-1-mFc; SEC ID: 348) luego fue capturado y fue seguido por una inyección de 100 nM de hPD-L1-hFc en presencia y ausencia de diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 a una velocidad de flujo de 25µl/min durante 2 minutos. Todo el experimento se realizó a 25° C en tampón de HBST en ejecución (0.01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl , EDTA 3 mM, 0,05% v / v surfactante P20). Las respuestas de unión en tiempo real se controlaron durante todo el curso del experimento y la respuesta de unión en el

extremo de cada paso. La unión de hPD-L1-hFc al hPD-1-mFc capturado se comparó en presencia y ausencia de diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 y se utilizó para determinar el comportamiento de bloqueo de los anticuerpos ensayados como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13: Inhibición de la unión de PD-1 humano a PD-L1 humano por medio de diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 expresados con Fc humano realizado en un instrumento Biacore 3000.

Anticuerpo monoclonal anti-PD-L1	Cantidad de hPD-1-mFc capturado (RU)	Unión de la mezcla del anticuerpo monoclonal 100nM de hDP-L1-hFc y 500nM de anti-PD-L1 (nm)	% Bloqueo
No mAb	222	56	0
H1H9323P	224	262	-368
H1H9327P	226	172	-207
H1H9329P	227	2	97
H1H9336P	227	9	84
H1H9345P2	229	292	-422
H1H9351P2	227	6	90
H1H9354P2	229	293	-428
H1H9364P2	228	8	86
H1H9373P2	227	6	89
H1H9382P2	228	307	-448
H1H9387P2	228	5	91
H1H9396P2	228	164	-193
Anticuerpo de	228	56	0

control de isotipo			
-----------------------	--	--	--

[0200] Como se muestra en la Tabla 13, 6 de los 12 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención ensayados en el instrumento Biacore 3000, demostraron el bloqueo de la unión de hPD-L1-hFc a hPD-1-mFc que va desde 84% a 97%. Seis anticuerpos anti-PD-L1 probados demostraron la capacidad para mejorar la unión del hPD-L1-hFc a hPD-1-hFc.

Ejemplo 6: competencia cruzada Octet entre los anticuerpos anti-PD-L1

[0201] La competencia de unión entre anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 se determinó utilizando un ensayo en tiempo real, de interferometría bio-capa libre de etiqueta en un biosensor Octet Red384 (Pall ForteBio Corp.). Todo el experimento se realizó a 25°C en el tampón de Octet HBST (0.01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, EDTA 3 mM, 0,05% v/v de tensioactivo P20, 0,1 mg/mL BSA) con la placa de agitación a una velocidad de 1000 rpm. Para evaluar si 2 anticuerpos fueron capaces de competir entre sí para la unión a sus respectivos epítopos en el PD-L1 humano recombinante expresado con una etiqueta myc-myc-hexahistidina C-terminal (hPD-L1-MMH; SEC ID: 345), alrededor de ~0,3 nM de hPD-L1-MMH fue capturado por primera vez en las puntas del biosensor Octet del anticuerpo recubierto anti-Penta-His (ForteBio Inc, # 18-5079) sumergiendo las puntas durante 5 minutos en el pozo que contenía solución de 20 µg/ml de hPD-L1-MMH. Las puntas del biosensor de antígeno capturado después se saturaron con el primer anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 (subsecuentemente referido como mAb-1) por inmersión en pozos que contienen 50 µg/mL solución de mAb-1 durante 5 minutos. Las puntas del biosensor se sumergieron posteriormente en los pozos que contienen 50 µg/mL de solución de un segundo anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 (subsecuentemente referido como mAb-2). Las puntas del biosensor se

lavarón en tampón Octeto HBST entre cada paso del experimento. Se monitoreó la respuesta de unión en tiempo real durante el curso del experimento y la respuesta de unión en el extremo de cada paso, como se muestra en la Figura 1. La respuesta de la unión de mAb-2 a hPD-L1-MMH pre-acomplejado con mAb -1 se comparó y se determinó el comportamiento competitivo/no competitivo de diferentes anticuerpos monoclonales anti-PD-L1.

[0202] En las condiciones experimentales usadas en este ejemplo, (a) H2aM8309N, H1H9329P, H1H9336P, H2aM8314N, H2aM8316N, H2aM8718N, H1H9387P2, H1H9351P2, H1H9364P2, H1H9373P2, y H2aM8306N compitieron de forma cruzada entre sí; bB) H2aM8310N, H2aM8321N y H2aM8312N compitieron de forma cruzada entre sí; (c) H1 H9396P2, H2aM8317N, H2aM8321N, H1H9323P, H1H9382P2, H1H9344P2, H1H9345P2, y H1H9354P2 compitieron de forma cruzada entre sí; y (d) H1H9327P y H2aM8307N compitieron de forma cruzada entre sí. En un caso, se observó la competencia en una orientación, pero no en la orientación opuesta: es decir, cuando se aplicó por primera vez H2aM8307N en competencia con H2aM8309N, H1H9329P, H1H9336P, H2aM8314N, H2aM8316N, H2aM8718N, H1H9387P2, H1H9351P2, H1H9364P2, H1H9373P2, y H2aM8306N; sin embargo, en la orientación opuesta, H2aM8309N, H1H9329P, H1H9336P, H2aM8314N, H2aM8316N, H2aM8718N, H1H9387P2, H1H9351P2, H1H9364P2, H1H9373P2, y H2aM8306N cuando se aplican primero no compiten con H2aM8307N.

Ejemplo 7: Unión del anticuerpo a las células que sobreexpresan PD-L1

[0203] La unión de los anticuerpos anti-PD-L1 a una línea celular de riñón embrionario humano (HEK293; ATCC, # CRL-1573) transfectadas de forma estable con PD-L1 de longitud completa (aminoácidos de 1 a 290 de número de acceso NP_054862.1) (HEK293 / HPD-L1) se determinó mediante FACS.

[0204] Para el ensayo, las células adherentes se separaron usando tampón de disociación libre de enzima y se bloquearon con un medio completo. Las células se centrifugaron y se resuspendieron a una concentración de 2.8×10^6 células/ml en PBS frío que contenía 2% de FBS. Las células HEK293 parentales y HEK293/HPD-L1 se incubaron durante 15 a 30 minutos en hielo con 100 nM de cada anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo de control de isotipo. Los anticuerpos no unidos se eliminaron por lavado con D-PBS que contenía 2% de FBS, y las células se incubaron posteriormente con un fragmento de Fc secundario conjugado con ficoeritrina que reconoce específicamente cualquier Fc humana (Jackson ImmunoResearch, # 109-1 16-170) o Fc de ratón (Jackson ImmunoResearch, # 1 15-1 15-164) durante 15 a 30 minutos en hielo. Se lavaron las células con D-PBS que contenía 2% de FBS para eliminar los reactivos de detección secundarios sin unir y las medidas de fluorescencia fueron adquiridas usando un citómetro de flujo HyperCyte (IntelliCyt, Inc.). Los datos fueron analizados utilizando el software HyperCyte.

Tabla 14: FACS de unión de anticuerpos anti-PD-L1 a células HEK293/HPD-L1 y células HEK293 parentales

Anticuerpo	FACS sobre las células parentales HEK293 [MFI]	FACS sobre las células HEK293/hPD-L1 [MFI]	Radio de HEK293/hPD-L1 a las células parentales HEK293
H1H9323P	1909	154992	81
H1H9327P	2120	317592	450
H1H9329P	1504	282088	188
H1H9336P	2263	379009	168
H1H9344P2	1691	200976	119

H1H9345P2	1885	228406	121
H1H9351P2	1685	289523	172
H1H9354P2	2204	275839	125
H1H9364P2	2066	323663	157
H1H9373P2	2151	333236	155
H1H9382P2	1473	205563	140
H1H9387P2	1232	323793	263
H1H9396P2	2340	227961	97
H2aM8306N	1286	316485	246
H2aM8307N	1382	73946	54
H2aM8309N	1160	192678	166
H2aM8310N	1357	14918	11
H2aM8312N	1380	158331	115
H2aM8314N	2053	194832	95
H2aM8316N	1601	172104	108
H2aM8317N	1270	67600	53
H2aM8321N	1322	112495	85
H2aM8323N	2250	163497	73
H2aM8718N	2225	194341	87
H2aM8719N	1272	133399	105
Control de isotipo IgG de ratón	1273	1115	0.9
Control de isotipo IgG1 humano	1179	1099	0.9
Control de	1991	1839	0.9

isotipo IgG4			
humano			

[0205] Como se muestra en la Tabla 14, los 25 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención mostraron una fuerte unión a las células HEK293/HPD-L1 a comparación con la unión en la línea de HEK293 parentales.

Ejemplo 8: El bloqueo de la regulación baja de células T inducidas por PD-L1 en un ensayo marcador de luciferasa de células T/APC

[0206] La activación de células T se consigue mediante la estimulación de receptores de células T (TCR) que reconocen péptidos específicos presentados por proteínas de clase I o II de complejo de histocompatibilidad principal en células presentadoras de antígeno (APC). Las TcR activadas a su vez inician una cascada de eventos de señalización que pueden ser monitoreados por los genes indicadores impulsados por factores de transcripción tales como el activador de proteína 1 (AP-1), factor nuclear de células T activadas (NFAT) o potenciador de cadena ligera kappa de factor nuclear de células B activadas (N FKJD). La respuesta de células T se modula a través de la participación de los co-receptores expresados ya sea de forma constitutiva o inducible en las células-T. Uno de estos receptores está programado como proteína de muerte celular 1 (PD-1), un regulador negativo de la actividad de células T. El PD-1 interactúa con su ligando, PD- L1, que se expresa en las células objetivo, incluyendo APCs o células cancerosas, y esta interacción da como resultado la entrega de señales inhibitoras por el reclutamiento de fosfatasas para la señal de TcR, lo que resulta en la supresión de la señalización positiva.

[0207] Un bioensayo fue desarrollado para medir la señalización de células T inducida por la interacción entre las células APC y T mediante la utilización de un cultivo mixto derivado de dos líneas de células de mamíferos: las células Jurkat

(una línea de células T inmortalizadas) y células Raji (una línea de célula B) (Figura 1). Para el primer componente del bioensayo, las células E6-1 clon Jurkat (ATCC, # TIB-152) fueron transducidas con el Signal Lenti AP-1 Luc Reporter (Qiagen - Sabiosciences, # CLS-01 1 L) como se indica en las instrucciones del fabricante. El lentivirus codifica el gen de luciferasa de luciérnaga bajo el control de un promotor mínimo CMV, repeticiones en tándem del elemento de TPA-inducible de la transcripción de respuesta (TRE) y un gen de resistencia a puromicina. La línea celular Jurkat de ingeniería se transdujo posteriormente con una quimera PD-1 que comprende el dominio extracelular de PD-1 humano (aminoácidos de 1 a 170 de PD1 humano; número de acceso NP_005009.2) y la trans-membrana y dominios citoplasmáticos de CD300a humano (aminoácidos de 181 a 299 de CD300a humano; número de acceso NP_009192.2). Se seleccionó y se mantuvo la línea de célula estable resultante (Jurkat / AP1-Luc / hPD1 - hCD300a) en RPMI/10% FBS/ penicilina/estreptomicina/glutamina suplementada con 500 µg/ml de G418 + 1 µg/mL de puromicina.

[0208] Para el segundo componente del bioensayo, las células Raji (ATCC, # CCL-86) fueron transducidas con el gen PD-L1 humano (aminoácidos 1 -290 de número de acceso NP_054862.1), que había sido clonado en un sistema de vector lentiviral (pLEX) (Applied Scientific Thermo, # OHS4735). Las células Raji positivas para el PD-L1 (Raji/HPD-L1) se aislaron por FACS utilizando un anticuerpo PD-L1 y se mantuvieron en Iscove / 10% SFB / penicilina/estreptomicina / glutamina suplementado con 1 µg/ml de puromicina.

[0209] Para simular la interacción de células APC/T, se utilizó un anticuerpo biespecífico compuesto de un brazo Fab de unión que se une a CD3 en las células T y otro brazo Fab de unión que se une a CD20 en las células Raji (anticuerpo biespecífico CD3xCD20; por ejemplo, como se describe en US20140088295). La presencia de la molécula biespecífica en los resultados del ensayo en la activación de la célula T y APC al cerrar las subunidades CD3 en las células T a CD20

expresado de forma endógena en las células Raji. La ligación de CD3 con anticuerpos anti-CD3 se ha demostrado que conduce a la activación de las células T. En este bioensayo, los anticuerpos que bloquean la interacción de PD1/PD-L1 rescatan la actividad de las células T mediante la desactivación de la señalización inhibidora lo que aumenta la activación de AP1-Luc.

[0210] En el bioensayo basado en la luciferasa, RPMI 1640 suplementado con 10% FBS y penicilina / estreptomicina / glutamina fue utilizado como medio de ensayo para preparar suspensiones de células y las diluciones de anticuerpo para llevar a cabo el cribado de anticuerpos monoclonales anti-PD-L1 (mAbs). En el día de la proyección, se determinaron los valores de EC_{50} de anti-PD-L1 mAbs, en presencia de una concentración fija de anticuerpo biespecífico CD3xCD20 (30 pM), así como el EC_{50} del anticuerpo biespecífico solo. En el siguiente orden, se añadieron las células y reactivos a 96 pozos de placas blancas de fondo plano. Para las determinaciones de anti-PD-L1 mAb EC_{50} , primero se preparó una concentración fija de anticuerpo biespecífico CD3xCD20 (final 30 pM) y se añadió a los pozos de placas de microtitulación. Diluciones en serie de doce puntos de anti-PD-L1 anticuerpos monoclonales y controles se añadieron a continuación (concentraciones finales que van desde 1 0,7 pM a 100 nM; más pozos con medio de ensayo por sí solo). Para la determinación del anticuerpo biespecífico (solo) EC_{50} , el anticuerpo biespecífico, a concentraciones finales que van desde 0.17 pM a 10 nM (más pozos con medio de ensayo solo), se añadió a los pozos de la placa de microtitulación. Posteriormente, una suspensión de células de 2.5×10^6 /mL Raji/ HPD-L1 se preparó y se añadieron 20 uL por pozo (número final de células / células de pozo 5×10^4). Las placas se dejaron a temperatura ambiente (15-20 minutos), mientras se preparó una suspensión de 2.5×10^6 / mL de Jurkat / AP1-Luc / hPD1 (ecto) -hCD300a (TM-cyto). Se añadió 20 uL de la suspensión Jurkat (número final de células/células de pozo 5×10^4) por pozo. Las placas que contienen el co-cultivo se incubaron durante 5 a 6 horas a 37°C en 5% de CO₂. A

continuación, se detectó la actividad de luciferasa después de la adición de reactivo ONE-Glo™ (Promega, # E6051) y las unidades de luz relativas (RLUs) se midieron en un luminómetro Victor. Todas las muestras se ensayaron en duplicados.

[0211] Los valores de RLU para cada anticuerpo seleccionado se normalizaron mediante el establecimiento de la condición de ensayo con concentración fija (30 pM) del anticuerpo biespecífico CD3/CD20, pero sin anticuerpo anti-PD-L1 al 100%. Esta condición corresponde a la máxima respuesta AP1-Luc provocada por la molécula biespecífica en presencia de la señal inhibidora de PD-1/PD-L1. Después de la adición del anticuerpo anti-PD-L1, la señal inhibitoria es suprimida, y se muestra el aumento de la estimulación aquí como E_{max} , el porcentaje de aumento en la señal en presencia de la dosis del anticuerpo más alta probada (100 nM). Para comparar la potencia de los anticuerpos anti-PD-L1 ensayados, la concentración del anticuerpo en el que el valor de RLU normalizado alcanzó 125% de activación se determinó a partir de una ecuación logística de cuatro parámetros a través de una curva de respuesta de 12 puntos usando GraphPad Prism. Los resultados se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15: Anticuerpo anti-PD-L1 que bloquea la inhibición dependiente de PD-1/PD-L1 de la señalización de AP1-Luc

Anticuerpo	Ensayo antagonista Concentración [M] del anticuerpo al 125% de activación	Ensayo antagonista Medio Emax [%] @ 100nM
H2aM8306N	3.78E-09	166.8
H2aM8307N	N/A	87.7
H2aM8309N	3.09E-10	180.9

H2aM8310N	N/A	112.8
H2aM8312N	N/A	75.6
H2aM8314N	1.44E-11	234.9
H2aM8316N	1.47E-10	177.4
H2aM8317N	N/A	109.2
H2aM8321N	N/A	116.8
H2aM8323N	2.20E-10	173.3
H2aM8718N	1.51E-10	182.0
H1H9323P	N/A	101.1
H1H9327P	N/A	77.1
H1H9329P	N/A	124.5
H1H9336P	9.81E-11	162.6
H1H9344P2	N/A	98.3
H1H9345P2	N/A	89.2
H1H93451P2	3.44E-10	154.4
H1H9354P2	N/A	89.9
H1H9364P2	7.93E-11	164.5
H1H9373P2	1.34E-10	150.2
H1H9382P2	N/A	86.5
H1H9387P2	1.86E-11	141.2
H1H9396P2	N/A	102.6
H1H8314N	6.57E-11	147.9
H1H9364P2	1.62E-10	158.1
H1H9373P2	7.07E-11	152.5
Control de isotipo mlgG2a	N/A	80.2
Control de	N/A	96.8

isotipo hlgG1		
Control de isotipo hlgG4	N/A	97.6

N/A= no es aplicable porque en las concentraciones probadas estos anticuerpos no activaron el 125%

[0212] Como se muestra en la Tabla 15, 14 de los 27 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención ensayados bloquearon la inhibición de PD-1 / PD-L1 con valores de E_{max} que van desde 234,9 hasta 138,1. Trece de los 27 anticuerpos anti-PD-L1 de la invención no demostraron bloqueo sustancial de la interacción PD1/PD-L1 cuando se probó en este ensayo. Los controles del isotipo no interfieren con la interacción PD1/PD-L1.

Ejemplo 9: la eficacia in vivo de los anticuerpos anti-PD-L1

[0213] Para determinar el efecto de un número selecto de anticuerpos anti-PD-L1 de la invención en un modelo in vivo relevante, un estudio MC38.ova de crecimiento de tumor, que implica la inyección subcutánea de células tumorales e inicializadas en diferentes días, se llevó a cabo en ratones que eran homocigotos para la expresión del dominio extracelular de PD-L1 humano en lugar del dominio extracelular de PD-L1 de ratón (ratones Humln PD-L1) en un 75% de C57 /Bl6/25% 129 de antecedente de cepa. Las células MC38.Ova (adenocarcinoma de colon de ratón) fueron diseñadas para expresar ovoalbúmina de pollo con el fin de aumentar la inmunogenicidad del tumor, y para permitir el control de las respuestas inmunes de células T a los péptidos de ovoalbúmina antigénicos definidos. En un segundo paso, las células MC38.Ova se transdujeron con un vector lentiviral que expresa HPD-L1 bajo el promotor SFFV. Las células MC38.Ova positivas para HPD-L1 (MC38.Ova / HPD-L1) se aislaron por FACS

utilizando el anticuerpo específico de hPD-L1. Se encontró que las células expresaron bajo nivel de PD-L1 de ratón endógeno.

[0214] Para un primer estudio (estudio #1), los ratones se dividieron de forma uniforme de acuerdo con el peso corporal en 5 grupos de tratamiento o control (n = 5-8 ratones por grupo). El día 0, los ratones fueron anestesiados por inhalación de isoflurano y luego inyectados por vía subcutánea en el flanco derecho con 1×10^6 células MC38.ova/hPD-L1 en suspensión de 100 uL de DMEM. Los grupos de tratamiento fueron intraperitonealmente inyectados con 500 ug de cualquiera de uno de los tres anticuerpos anti-PD-L1 de la invención, o uno de los dos anticuerpos de control de isotipo con especificidad irrelevante en los días 3, 7, 10, 14 y 17 del experimento, mientras que un grupo de ratones se dejó sin tratamiento.

[0215] En un segundo estudio (estudio nº2), los ratones humanizados PD-L1 fueron asignados al azar en 7 grupos de tratamiento (n = 5 a 6 ratones). En el día 0, los ratones se implantaron por vía subcutánea con 1×10^6 células de MC38.Ova/hPD-L1. Los ratones fueron administrados por vía intraperitoneal con REGN-PD-L1 ab (H1 H8314N o H1 H9364P2 o H1 H9373P2), o control de isotipo abs hlgG4 mut o hlgG1 en dosis de 10 mg/kg o 5 mg/kg. Grupos de ratones fueron administrados con anticuerpo en los días 3, 7, 10, 14 y 17. Los volúmenes de los tumores se monitorizaron mediante medición de calibre dos veces por semana durante la duración del experimento (21 días). La dosificación experimental y protocolo de tratamiento para los grupos de ratones se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16: Protocolo de dosificación y tratamiento experimental para grupos de ratones

Estudio #	Muestras probadas	Cantidad de dosis en cada punto de tiempo	Intervalos de dosificación
-----------	-------------------	---	----------------------------

		de dosificación	
1	Control de isotipo 1	500 µg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H1H8314N	500 µg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H1H9364P2	500 µg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H1H9373P2	500 µg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	Control de isotipo 2	500 µg	Días 3, 7, 10, 14, 17
2	Control de isotipo 1	10 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H1H8314N	10 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H1H8314N	5 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H1H9364P2	10 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H1H9364P2	5 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H1H9364P2	10 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17
	H1H9364P2	5 mg/kg	Días 3, 7, 10, 14, 17

[0216] Para los estudios, los volúmenes promedios de tumor se controlaron mediante la medición de calibre dos veces por semana durante la duración del experimento (17 días) y el porcentaje de supervivencia se registró al final del experimento. Además, también se evaluó el número de ratones libres de tumor al final del estudio. Los resultados, expresados como el volumen medio del tumor (mm³) (± SD), el porcentaje de supervivencia y el número de ratones libres de tumor se muestran en las Tablas 17 y 18.

Tabla 17: Media del volumen del tumor, porcentaje de supervivencia y número de ratones libres de tumor en cada grupo de tratamiento del estudio # 1

Anticuerpo	Volumen del tumor, mm3 medio (±SD)		% Supervivencia		Ratones libres de tumor	
	Día 10	Día 17	Día 10	Día 17	Día 17	Día 17
Control de isotipo 1	65(±27)	148(±109)	100%	100%	100%	0/5 (0%)
Control de isotipo 2	54(±44)	80(±63)	100%	100%	100%	0/5 (0%)
H1H8314N	6(±10)	2(±5)	100%	100%	100%	4/5 (80%)
H1H9364P2	16(±17)	0(±0)	100%	100%	100%	5/5(100%)
H1H9373P2	13(±14)	0(±0)	100%	100%	100%	5/5(100%)

[0217] Como se muestra en la Tabla 17 para el estudio # 1, los tres anticuerpos anti-PD-L1 de la invención fueron eficaces en la mejora de la regresión del tumor en la dosis de 500 ug/ratón con todos los ratones de los grupos de tratamiento que recibieron dos de los anticuerpos, H1H9364P2 y H1H9373P2, estando libres de tumores en el día 17. En el grupo de tratamiento que recibió uno de los anticuerpos anti-PD-L1 de la invención, H1H8314N, 4 de cada 5 ratones estaban libres de tumor a los 17 días, mientras que 0 de 5 animales estaban libres de tumores en los grupos de control de isotipo. El test posterior ANOVA de una vía con comparación múltiple de Dunnett reveló una diferencia significativa en los volúmenes tumorales entre los tratamientos con anticuerpos anti-PD-L1 de la invención y el anticuerpo de control de isotipo con un valor de p<0,05.

Tabla 18: Media del volumen del tumor, porcentaje de supervivencia y número de ratones libres de tumor de cada grupo de tratamiento del estudio # 2

Anticuerpo	Volumen del tumor, mm3 medio (±SD)				% Supervivencia				Ratones libres de tumor	Ratones libres de tumor
	Día	Día 10	Día 21	Día 21	Día 10	Día	Día	Día	Día 21	Día 21

	10					10	21	21		
	10 MPK	5 MPK	10 MPK	5 MPK	10 MPK	5 MPK	10 MPK	5 MPK	10 MPK	5 MPK
Control de isotipo 1	55(37)	N/A	534(356)	N/A	100%	N/A	100%	N/A	0/6(0%)	N/A
H1H8314N	14(15)	17(4)	19(22)	108(101)	100%	100%	100%	100%	3/6(50%)	2/5(40%)
H1H9364P2	18(10)	23(10)	34(81)	231(238)	100%	100%	100%	100%	5/6(83%)	1/5(20%)
H1H9373P2	10(8)	25(29)	37(59)	37(59)	100%	100%	100%	100%	5/6(83%)	3/5(60%)

[0218] Como se muestra en la Tabla 18, en el estudio # 2, la administración de los anticuerpos anti-PD-L1 seleccionados dio como resultado la inhibición del crecimiento tumoral promoviendo la regresión del tumor. Los tres anticuerpos anti-PD-L1 fueron eficaces en la dosis de 10 mg/kg y 5 mg/kg y promovieron la regresión del tumor en los ratones tratados de una manera dependiente de la dosis a lo largo del curso del experimento, mientras que 0 de 5 animales estaban libres de tumor en el grupo de control El test posterior ANOVA con comparación múltiple de Tukey reveló una diferencia significativa en los volúmenes tumorales entre los tratamientos con los anticuerpos anti-PD-L1 y anticuerpos de control de isotipo con valor p <0,05 o inferior.

Ejemplo 10: Efectos antitumorales de una combinación de un anticuerpo anti-PD-L1 y un antagonista VEGF en un modelo de tratamiento de tumor temprano de ratón

[0219] Un modelo de tratamiento de tumor temprano fue desarrollado para probar la eficacia de una combinación de un anticuerpo anti-PD-L1 y un antagonista VEGF. En este modelo, la terapia de combinación se administra poco después de la implantación del tumor. El experimento también utiliza un anticuerpo anti-PD-L1 solo y en combinación con el antagonista VEGF. El anticuerpo anti-PD-L1 utilizado en este experimento fue un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 con secuencias de anticuerpo V_H/V_L "YW243.55S70", según US20100203056A1 (Genentech, Inc.),

con el IgG2a de ratón y que era de reacción cruzada con el ratón PD-L1. El antagonista VEGF utilizado en este experimento fue aflibercept (una molécula quimérica a base de receptor VEGF, también conocido como "VEGF-trap" o "VEGFR1 R2-FcΔC1(a)," una descripción completa de la que se proporciona en este documento). El anticuerpo anti-PD-1 utilizado en este experimento era PD-1 clon "RPMI-14" anti-ratón con IgG2b de ratón (Bio X Cell, West Lebanon, NH).

[0220] Para este modelo experimental, 1.0x10⁶ de células tumorales Colon-26 se implantaron por vía subcutánea en ratones BALB/c en el día 0. Comenzando en el día 3, antes del establecimiento de los tumores medibles, los ratones fueron tratados con una de las mono-terapias o combinación de terapias, o una combinación de control, como se expone en la Tabla 19.

Tabla 19: Dosificación experimental y grupos de tratamiento

Grupo de tratamiento	Primer agente	Segundo agente
Combinación de control	Control de isotipo IgG2a (250 µg, IP)	Control hFc (250 µg, SC)
Solo VEGF Trap	Control de isotipo IgG2a (250 µg, IP)	Aflibercept (10 mg/kg, SC)
Solo anti-Pd-1	Anti-PD-1 mAb RPMI-14 (250 µg, IP)	Control hFc (250 µg, SC)
Solo anti-PD-L1	Anti-PD-1 mAb (250 µg, IP)	Control hFc (250 µg, SC)
VEGF Trap + anti-P-1	Anti-PD-1 mAb RPMI-14 (250 µg, IP)	Aflibercept (10 mg/kg, SC)
VEGF Trap + anti-PD-L1	Anti-PD-1 mAb (250 µg, IP)	Aflibercept (10 mg/kg, SC)

[0221] Los diversos tratamientos se administraron en cinco puntos de tiempo diferentes durante un período de dos semanas (es decir, inyecciones en el día 3, día 6, día 10, día 13 y día 19).

[0222] Los animales en cada grupo de tratamiento se evaluaron en términos de la incidencia de tumores, volumen del tumor, tiempo medio de supervivencia y número de animales libres de tumor en el día 50. La extensión del crecimiento del tumor se resume en la Figura 2 (curvas de crecimiento del tumor) y la Figura 3 (volumen del tumor en el día 28). Los resultados también se resumen en la Tabla 20.

Tabla 20: Ratones libres de tumores por el tratamiento

Grupo de tratamiento	Número de animales libres de tumor en el día 50
Combinación de control	0/10
Solo VEGF Trap	3/10
Solo anti-Pd-1	4/10
Solo anti-PD-L1	5/10
VEGF Trap + anti-P-1	7/10
VEGF Trap + anti-PD-L1	9/10

[0223] El crecimiento del tumor se redujo sustancialmente en los animales tratados con la combinación de VEGF Trap + anticuerpo anti-PD-L1 en comparación con los regímenes de tratamiento que implican cualquiera de los agentes terapéuticos por sí solos (ver las figuras 2 y 3). Además, la supervivencia se incrementó sustancialmente en el grupo de VEGF Trap + anticuerpos anti-PD-L1, con una supervivencia del 90% de los animales por lo menos 50 días después de la implantación del tumor. Por el contrario, para los grupos de monoterapia de anti-PD-L1 y VEGF Trap, la supervivencia en el día 50 fue sólo del 50% y 30% respectivamente (véase la Figura 3 y la Tabla 20).

[0224] La presente invención no se debe limitar en alcance por las modalidades específicas descritas acá. De hecho, varias modificaciones de la invención adicionales a las descritas acá se volverán evidentes a los expertos en la materia a partir de la anterior descripción y las figuras adjuntas. Dichas modificaciones pretenden caer dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.