

P-15289

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **NC2018/0004132**

Solicitud de patente a nombre de **FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC.**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, obrando como apoderada de la sociedad **FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC.**, domiciliada en San Francisco, California, Estados Unidos de América, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al Oficio No. **1844** notificado mediante notificación electrónica el 11 de febrero de 2020, relacionado con el primer concepto técnico de fondo, atentamente me permito presentar la siguiente información:

1. Modificación al capítulo reivindicatorio

Con fundamento en la facultad que confiere el Artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial un nuevo capítulo reivindicatorio, el cual consta de doce (12) reivindicaciones y reemplaza completamente el capítulo presentado anteriormente.

En el nuevo capítulo reivindicatorio se realizaron las siguientes modificaciones:

- 1.1** Como primera medida, se modificó la antigua reivindicación 1 con el propósito de especificar que la molécula de fusión reclamada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20.
- 1.2** Las antiguas reivindicaciones 5-8, 15-17 y 19-22 han sido eliminadas del pliego reivindicatorio en esta oportunidad.

- 1.3** Se modificó la antigua reivindicación 9, que corresponde a la nueva reivindicación 5, con el propósito de especificar que las moléculas de fusión de la composición reclamada comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20.
- 1.4** Finalmente, las demás reivindicaciones fueron modificadas con el propósito de reenumerarlas y ajustar su correspondiente dependencia.

En cuanto a estas modificaciones, me permito decir que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la solicitud original y que fueron realizadas siguiendo las recomendaciones realizadas por el examinador, con el fin de superar las objeciones planteadas en su concepto técnico. Asimismo, las modificaciones se encuentran debidamente soportadas en la descripción de la solicitud y no implican una ampliación de la protección que correspondería a la divulgación contenida en la solicitud inicial, por lo que es posible afirmar que el nuevo pliego reivindicatorio se ajusta a las disposiciones del Artículo 34 de la Decisión 486/00.

2. Modificación al título

Con el propósito de adecuar el título de la solicitud de patente al nuevo pliego reivindicatorio, se modifica el título de la solicitud como se lee a continuación:

“PROTEÍNA DE FUSIÓN QUE COMPRENDE UN DOMINIO EXTRACELULAR CD80 Y UN DOMINIO FC DE IGG1”

3. Pago de tasas

En relación con el número de reivindicaciones, atentamente nos permitimos decir que no se adjunta pago de tasa por reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo reivindicatorio tiene un menor número de cláusulas que el anteriormente presentado y es, en esencia, una limitación al anterior pliego reivindicatorio.

Asimismo, considerando que el presente memorial se presenta junto con modificaciones a las reivindicaciones, se adjunta recibo de pago por concepto de un examen de patentabilidad, según lo establecido en la Resolución 3719 del 2016.

4. Concisión de las nuevas reivindicaciones

El solicitante manifiesta que mediante la presentación del nuevo capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones, de modo tal que las nuevas reivindicaciones proporcionan claridad y concisión a la invención descrita, a la vez que cuentan con el debido sustento en la descripción de la solicitud.

No obstante lo anterior, a continuación se presentan algunas aclaraciones:

4.1 Concisión de las antiguas reivindicaciones 7 y 8

El examinador sostiene que las antiguas reivindicaciones 7 y 8 no son concisas porque considera que se reclama la misma molécula de fusión que comprende la SEQ ID N°: 20, por lo que sugiere no repetir materia y reclamar la molécula en la misma reivindicación.

Si bien el solicitante respetuosamente disiente de la objeción del examinador, solo con el propósito de darle continuidad al trámite de la solicitud y sin que por ello deba interpretarse que concuerda con el examinador, se han eliminado las antiguas reivindicaciones 7 y 8, con lo cual el nuevo pliego reivindicatorio no da lugar a la objeción.

4.2 Concisión de las antiguas reivindicaciones 17 y 21

El examinador sostiene que las antiguas reivindicaciones 17 y 21 no son concisas debido a que ambas reclaman una composición que comprende una molécula de fusión de SEQ ID NO: 20 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, por lo que sugiere reclamar una composición en una sola reivindicación.

Si bien el solicitante respetuosamente disiente de la objeción del examinador, solo con el propósito de darle continuidad al trámite de la solicitud y sin que por ello deba interpretarse que concuerda con el examinador, se han eliminado las antiguas reivindicaciones 17 y 21, con lo cual el nuevo pliego reivindicatorio no da lugar a la objeción.

4.3 Concisión de las antiguas reivindicaciones 1, 8 y 19

El examinador sostiene que las antiguas reivindicaciones 1, 8 y 19 no son concisas porque reclaman en más de una reivindicación independiente una molécula de fusión que comprende un dominio extracelular de CD80 y una región Fc.

Si bien el solicitante respetuosamente disiente de la objeción del examinador, solo con el propósito de darle continuidad al trámite de la solicitud y sin que por ello deba interpretarse que concuerda con el examinador, se han eliminado las antiguas reivindicaciones 8 y 19, de forma que el nuevo pliego reivindicatorio reclama la molécula de fusión que comprende un dominio extracelular de CD80 y una región Fc únicamente en la reivindicación 1, con lo cual no da lugar a la objeción.

4.4 Concisión de las antiguas reivindicaciones 9 y 21

El examinador sostiene que las reivindicaciones 9 y 21 no son concisas porque reclaman en más de una reivindicación independiente una composición que comprende una molécula de fusión.

Si bien el solicitante respetuosamente disiente de la objeción del examinador, solo con el propósito de darle continuidad al trámite de la solicitud y sin que por ello deba interpretarse que concuerda con el examinador, se ha eliminado la antigua reivindicación 21, dejando solo la antigua reclamación 9, que corresponde a la nueva reivindicación 5, para reclamar una composición que comprende una molécula de fusión ECD CD80 con una región Fc únicamente. Por lo tanto, es posible manifestar que el nuevo pliego reivindicatorio no da lugar a la objeción.

5. Claridad de la descripción

El examinador sostiene que la descripción no está clara ya que considera que en su ejemplo 6 se muestra una tabla en la página 129, donde se muestran los resultados de las pruebas realizadas, sin embargo, considera que esta tabla se encuentra cortada y que por lo tanto no es posible visualizar todos los resultados.

En respuesta a la amable observación del examinador, se presenta en esta oportunidad una nueva descripción para la solicitud, la cual corresponde a la solicitud originalmente presentada, pero que presenta la tabla en su totalidad.

En vista de las modificaciones realizadas a la descripción, se solicita respetuosamente reconsiderar y retirar la objeción.

6. Unidad de invención

El examinador sostiene que la solicitud carece de unidad de invención debido a que reclama más de un grupo inventivo, sin la presencia de características o elementos técnicos nuevos e inventivos que sean comunes a todas las invenciones. En particular, el examinador considera que la invención presenta dos grupos inventivos: el Grupo Inventivo 1, conformado por las reivindicaciones 1-18, 21, 22 y 23 (parcialmente); y el Grupo Inventivo 2, conformado por las reivindicaciones 19, 20 completamente y 23 parcialmente.

Si bien el solicitante respetuosamente disiente de la objeción del examinador, solo con el propósito de darle continuidad al trámite de la solicitud y sin que por ello deba interpretarse que concuerda con el examinador, se hace notar que en esta oportunidad se eliminaron las antiguas reivindicaciones 19 y 20, y se modificó la reivindicación 23 para que la misma dependa del Grupo inventivo 1. El Solicitante considera que las reivindicaciones modificadas corresponden en su totalidad al Grupo Inventivo 1, por lo que solicita respetuosamente reconsiderar y retirar la objeción.

Por otra parte, el solicitante se reserva el derecho de presentar solicitudes divisionales dirigidas a la materia de las antiguas reivindicaciones 19, 20 y 23 (parcialmente), según lo señalado por el examinador en su concepto técnico.

7. Nivel inventivo

El examinador establece en su concepto técnico que la altura inventiva de la molécula de fusión de la antigua reivindicación 1 afectada por los documentos D1 (Haile S., et al. The journal of immunology) y D2 (Solá R., et al. Bio Drugs), considerando al documento D1 como el arte previo más cercano a la invención reclamada porque considera que dicho documento divulga *"una proteína de fusión soluble del dominio extracelular de CD80 humano y/o murino unida a una región Fc de IgG1 humano que mantiene la activación de los linfocitos T en presencia de PDL1+ de células tumorales y simultáneamente previene la interacción PDL1-PD1 (Pág. 2829, párrafo 3, línea 33)"*.

El examinador considera que la diferencia entre la invención definida en la reivindicación 1 y la proteína de fusión divulgada en el documento D1 consiste en que la molécula

reclamada en la solicitud comprende 15-60 moléculas de ácido siálico, lo cual resulta en una mejor la acción de la molécula de fusión sobre el crecimiento tumoral. El examinador utiliza al documento D2 para compensar la deficiencia de enseñanzas del documento D1, argumentando que *"el aumento de la cantidad de moléculas de ácido siálico para mejorar la acción de una proteína ya se ha revelado en el documento D2, que se refiere a la glicosilación de proteínas para optimizar la vida media circulatoria y actividad in vivo de dicha proteína para uso terapéutico "*. Por lo tanto, considera que la reivindicación 1 carece de un nivel inventivo porque la persona normalmente versada en la materia, estaría motivada a aumentar la cantidad de moléculas de ácido siálico como lo sugiere el documento D2 en la molécula de fusión divulgada en D1, para así llegar al objeto de la reivindicación 1. El examinador sostiene además que las reivindicaciones 2-18 y 21-23 carecen de un nivel inventivo por las mismas razones.

En este sentido, hacemos notar que el artículo 18 de la Decisión 486/00 determina que *"una invención tiene nivel inventivo, si para una **persona del oficio normalmente versada en la materia técnica** correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica"*. (El subrayado es nuestro).

Lo anterior significa que el análisis de nivel inventivo **NO** es una comparación de los objetos de las anterioridades y la solicitud en estudio. El análisis de nivel inventivo **debe demostrar** la obviedad de la invención y establecer cómo ésta no contiene un salto cualitativo, que demuestre su altura inventiva, teniendo en cuenta que se hace **necesario demostrar** que la invención analizada carece de nivel inventivo y hubiese sido obvia para una persona versada en la materia.

Considerando la definición anterior, a continuación, se procede a destacar las diferencias entre la molécula de fusión de la presente solicitud y las moléculas del arte previo divulgadas en D1 y D2, mostrando cómo dichas diferencias le proporcionan un efecto técnico inesperado que no podría haber sido derivado de manera obvia a partir de las enseñanzas del arte previo citado por el examinador, para así evidenciar la no obviedad de la invención reclamada por el solicitante.

Como primera medida se hace notar que, si bien el solicitante no concuerda con la opinión del examinador, en el nuevo pliego reivindicatorio se han eliminado las reivindicaciones 5-8, 15-17, 21 y 22, con lo cual las objeciones con respecto a estas reivindicaciones no son aplicables al nuevo pliego reivindicatorio.

Como segunda medida, se hace notar que la reivindicación independiente 1 y la antigua reivindicación 9 (que ahora corresponde a la nueva reivindicación 5) reclaman la SEQ ID NO: 20 como la secuencia específica para la molécula de fusión al ECD de la CD80. Esta secuencia no se encuentra descrita en ninguno de los documentos D1 ni D2, y dichos documentos tampoco proporcionan una razón o motivación para que una persona del oficio normalmente versada en la materia pueda llegar a esta secuencia particular.

Por otra parte, es importante destacar que el documento D2 no enseña ni sugiere el rango específico de moléculas de ácido siálico en una molécula de fusión al ECD de la CD80-como el reclamado en las reivindicaciones 1 y 5. El documento D2 proporciona una discusión general de la glucosilación de proteínas. En particular, el documento D2 afirma que la glucosilación es la más *"estructuralmente compleja de las modificaciones químicas que ocurren naturalmente en las proteínas"*, y que *"la glucosilación puede mostrar heterogeneidad con respecto al sitio de unión del glucano (macro-heterogeneidad) y con respecto a la estructura del glucano (micro-heterogeneidad)"*. (véase la página 3, último párrafo). El documento D2 continúa explicando que existen múltiples tipos diferentes de sitios de glicosilación, incluyendo N-glicosilaciones y O-glicosilaciones. (véase en la página 4, el primer párrafo completo). Además, el documento D2 explica que existen múltiples estructuras diferentes de núcleo de glucano formadas por la remodelación de varios monosacáridos: fucosa, galactosa, manosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido siálico. Aún más, el documento D2 explica que los extremos terminales de estas estructuras centrales de glucano a menudo se funcionalizan aún más. El documento D2 también destaca el número de parámetros de glucosilación que pueden alterarse al indicar *"parece que los diferentes parámetros de glucosilación (p. Ej., Número de glucanos unidos, tamaño molecular, secuencia y carga del glucano) pueden modular las propiedades farmacológicas de los fármacos proteicos en diferentes grados "* (véase la página 7). Por lo tanto, en resumen, el documento D2 demuestra que la glucosilación es compleja y altamente variable. Sin embargo, el documento D2 no explica qué parámetros de glicosilación deberían manipularse y de qué manera para lograr cualquier resultado deseado particular con un nuevo agente terapéutico, tal como las proteínas de fusión al EDC de la CD80 de las presentes reivindicaciones.

Por ejemplo, el documento D2 proporciona una tabla (véase la Tabla I) de medicamentos basados en glucoproteínas. Pero la Tabla I solo sirve para enfatizar la diversidad de glicosilación en los medicamentos actuales. En particular, la Tabla I deja en claro que diferentes terapias usan diferentes tipos de glicosilación (N u O glicosilados) y diferentes números de glicanos (que van de 1 a 7 en la Tabla I). Por lo

tanto, la persona del oficio normalmente versada en la materia a partir de las enseñanzas contenidas en el documento D2 habría sido consciente de que tanto el tipo como la cantidad de glicosilación podrían variar, y no habrían encontrado en el documento D2 ninguna guía con respecto a qué tipo o qué cantidad de glicosilación sería útil para un proteína de fusión al ECD de la CD80. De hecho, ni la Tabla I ni ninguna otra porción del documento D2 menciona las moléculas de fusión al ECD de la CD80. Por lo tanto, a partir de las enseñanzas contenidas en el documento D2 solamente, o en combinación con las enseñanzas del documento D1, una persona del oficio normalmente versada en la materia no habría tenido ningún motivo para seleccionar específicamente la modificación del ácido siálico o el número particular de ácidos siálicos reclamados por las reivindicaciones de la presente solicitud para una molécula de fusión al ECD de la CD80, por lo que no habría sido de ninguna manera obvio llegar a la proteína de fusión de la presente invención

Por lo tanto, en vista de los argumentos aquí proporcionados y de las modificaciones realizadas al pliego reivindicatorio en esta oportunidad, es posible afirmar que la molécula de fusión al dominio extracelular (ECD) de la CD80 de la presente solicitud, implican un nivel inventivo, cumpliendo así con el requerimiento del Artículo 18 de la Decisión 486/00. Igualmente, dado que todas las reivindicaciones restantes dependen de la reivindicación 1 o de la nueva reivindicación 5, es posible manifestar que las reivindicaciones 1 a 12 del nuevo pliego reivindicatorio tienen un nivel inventivo.

8. Conclusiones

Con las modificaciones introducidas y los argumentos presentados puede concluirse que:

- i) Las modificaciones presentadas en esta oportunidad se ajustan a las disposiciones del Artículo 34 de la Decisión 486;
- ii) EL título de la actual solicitud refleja el objeto y el campo industrial con el cual se relaciona la invención y es concordante con la materia descrita en las nuevas reivindicaciones, ajustándose así a las disposiciones del artículo 34 de la Decisión 486;
- iii) La materia objeto de las actuales reivindicaciones es clara, concisa y cuenta con el debido sustento en el capítulo descriptivo, el cual también es claro para

una persona normalmente versada en la materia, cumpliendo así con los requerimientos de los Artículos 28 y 30 de la Decisión 486;

- iv) El objeto de la presente solicitud hace referencia a un solo grupo inventivo, cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 25;
- v) El objeto de las nuevas reivindicaciones no se encuentra anticipado por el estado de la técnica y representa un avance para el campo técnico de la invención, cumpliendo con el requerimiento del Artículos 16 y 18 de la Decisión 486;

Así, respetuosamente se solicita al examinador reconocer la novedad, el nivel inventivo y la aplicación industrial para la invención titulada *"PROTEÍNA DE FUSIÓN QUE COMPRENDE UN DOMINIO EXTRACELULAR CD80 Y UN DOMINIO FC DE IGG1"* a nombre de FIVE PRIME THERAPEUTICS, INC. y, por lo tanto, conceder el privilegio de patente, si los cumpliese; o si el señor examinador considera que subsisten razones para objetar la presente invención, rogamos comunicarnos los debidos motivos y razones que sustenten su objeción con el fin de que nuestro mandante tenga la posibilidad de exponer sus argumentos con base en la interpretación del Artículo 42 del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo que señala que: *"Habiéndose dado oportunidad a los interesados para expresar sus opiniones, y con base en las pruebas e informes disponibles, se tomará la decisión, que será motivada. La decisión resolverá todas las peticiones que hayan sido oportunamente planteadas dentro de la actuación por el peticionario y por los terceros reconocidos"*, (el subrayado es nuestro).

9. Anexos

9.1 Nuevo capítulo reivindicatorio que incluye doce **(12)** reivindicaciones.

9.2 Nueva descripción de la solicitud

9.3 Comprobante de pago de tasa nuevo examen de patentabilidad.

Señora Directora,


CAROLINA DAZA MONTALVO
C.C. 66.783.790 de Palmira Valle
TP-141563 CSJ
notificaciones@clarkemodet.com.co

**POLIPÉPTIDOS DEL DOMINIO EXTRACELULAR DE CD80 Y SU USO EN
EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER**

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5

La presente solicitud reivindica la prioridad de las solicitudes de patentes provisionales estadounidenses n.º 62/373,654, presentada el 11 de agosto de 2016, y 62/249,836, presentada el 2 de noviembre de 2015, las
10 cuales se incorporan en su totalidad a la presente mediante referencia.

CAMPO

15 La presente solicitud hace referencia a polipéptidos del dominio extracelular (ECD, por sus siglas en inglés) de la CD80 (B7-1) y moléculas de fusión al ECD de la CD80 y su uso en el tratamiento del cáncer, tanto solos como en combinación con otros agentes terapéuticos, tales como
20 agentes que estimulan el sistema inmunitario tales como inhibidores de PD-1/PD-L1.

ANTECEDENTES

25 La CD80, también conocida como B7-1, pertenece a la familia

B7 de proteínas unidas a la membrana y participa de la regulación del sistema inmunitario mediante el suministro de respuestas coestimuladoras o coinhibidoras a través de su actividad de unión a ligandos. Otros miembros de la familia B7 de proteínas incluyen CD86 (B7-2), el ligando coestimulador inducible (ICOS-L), el ligando de muerte programada 1 (PD-L1; B7-H1), el ligando de muerte programada 2 (PD-L2; B7-H2), B7-H3 y B7-H4. La CD80 es una proteína transmembrana que se expresa en la superficie de los linfocitos T, los linfocitos B, las células dendríticas y los monocitos, y se une a los receptores CD28, CTLA4 (CD152) y PD-L1. La CD80 y CD86 y sus receptores CTLA4 y CD28 funcionan como un sistema coestimulador-coinhibidor, por ejemplo, para controlar la activación, expansión, diferenciación y supervivencia de los linfocitos T. La interacción de la CD80 y CD86 con CD28 provoca señales coestimuladoras que conducen, por ejemplo, a la activación de respuestas de los linfocitos T. La CD80, a su vez, estimula la regulación positiva de CTLA4, que, al unirse a la CD80, suprime las respuestas de los linfocitos T desencadenadas anteriormente por las interacciones CD80/CD28. Esta retroalimentación cíclica permite un buen control de las respuestas inmunitarias.

También se ha demostrado que la CD80 interactúa con otro

miembro de la familia B7, el PD-L1, con una afinidad similar a la que tiene con la CD28, mientras que la CD86 no interactúa con el PD-L1. El PD-L1 es uno de dos ligandos para la proteína de muerte programada-1 (PD-1), que también
5 participa de la regulación de los linfocitos T. Específicamente, la expresión de la PD-1 en los linfocitos T puede inducirse después de que se hayan activado los linfocitos T, y la unión de la PD-1 al PD-L1 ejerce una regulación negativa de la actividad de los linfocitos T
10 mediante la promoción de la inactivación de los linfocitos T. Muchas células tumorales expresan el PD-L1 en su superficie, lo cual puede conducir a interacciones PD-1/PD-L1 y la inhibición de las respuestas de los linfocitos T contra el tumor. Esta observación ha conducido al
15 desarrollo de inhibidores de la interacción PD-1/PD-L1 como productos terapéuticos contra el cáncer diseñados para estimular respuestas inmunitarias naturales contra tumores de pacientes.

20 La unión de la CD80 al PD-L1 puede funcionar como un mecanismo alternativo para bloquear la interacción PD-1/PD-L1 e impedir la inhibición de las respuestas de los linfocitos T en el sitio de un tumor. Al mismo tiempo, sin embargo, otra alternativa disponible podría ser un aumento
25 de los niveles de la CD80 para la unión a la CD28 y la

inducción de CTLA4, mediante lo cual se inducirían o inhibirían las respuestas de los linfocitos T. Algunas formas solubles de la CD80 también pueden funcionar para bloquear la activación de CTLA4 mediante el bloqueo de la actividad de la CD80 endógena. Además, las diferentes formas de la proteína CD80 solubles pueden tener diferentes efectos sobre el crecimiento de los tumores a través de otras interacciones entre las formas de la proteína y las células tumorales, cuyo impacto no puede predecirse antes de las evaluaciones. Hasta ahora tampoco se ha evaluado directamente de qué manera afectan el crecimiento tumoral *in vivo* las diversas formas solubles de la CD80. Los inventores de la presente han desarrollado un conjunto de moléculas de fusión al dominio extracelular (ECD) de la CD80 con efectos particularmente potentes sobre el crecimiento del tumor en un modelo de ratón, tanto cuando se administran solas, como cuando se administran junto con un inhibidor de PD-1/PD-L1. En función de los datos que se mostrarán en los ejemplos de funcionamiento más adelante, las modalidades de la presente pueden proporcionar excelentes efectos terapéuticos en el tratamiento del cáncer.

COMPENDIO

En algunas modalidades, se proporciona un polipéptido del dominio extracelular (ECD) de la CD80 o una molécula de fusión al ECD de la CD80. En algunas modalidades, la molécula de fusión comprende un ECD de la CD80 y al menos un compañero de fusión, que comprende un dominio Fc de una inmunoglobulina, tal como una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana, albúmina, o un polímero tal como PEG. En algunas modalidades, el ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 comprenden una CD80 humana, tal como la de la SEQ ID NO:5, o un ECD de CD80 de la isoforma 2 o la isoforma 3 de la CD80 (SEQ ID NOs: 3 y 4). En algunas modalidades, la molécula de fusión comprende un dominio Fc, tal como un dominio Fc que comprende una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NOs: 9-16. En algunas modalidades, la molécula de fusión comprende un dominio Fc de IgG1 humana, tal como uno con una secuencia de tipo salvaje tal como el de la SEQ ID NO:14, o de manera alternativa, una secuencia mutante con sustituciones de aminoácidos L234F, L235E y P331S tal como la de la SEQ ID NO:12. En algunas modalidades, la molécula de fusión al ECD de la CD80 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO:14, la SEQ ID NO: 20 y la SEQ ID NO: 21. En algunas modalidades, el compañero de fusión de la molécula de fusión al ECD de la CD80 se une directamente al

aminoácido de extremo C de la secuencia de aminoácidos del ECD de la CD80 o al aminoácido del extremo N de la secuencia de aminoácidos del ECD de la CD80 madura. En algunas modalidades, la molécula de fusión del ECD de la CD80 puede unirse al ECD de la CD80 a través de un péptido enlazador, tal como un enlazador GS.

En algunas modalidades, la molécula de fusión al ECD de la CD80 tiene un contenido de ácido siálico de 10-60 mol de ácido siálico (SA, por sus siglas en inglés)/mol proteína, tal como 15-60 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido es de 10-40 mol de SA/mol de proteína, tal como 15-40 mol de SA/mol de proteína, tal como 20-40 mol de SA/mol de proteína, 20-30 mol de SA/mol de proteína, 15-25 mol de SA/mol de proteína, 15-30 mol de SA por mol de proteína o 30-40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido de SA es de al menos 15, tal como al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35 o al menos 40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido de SA es de 15, 20, 25, 30, 35 o 40 mol de SA/mol de proteína. En algunas de esas modalidades, la molécula de fusión al ECD de la CD80 es una fusión ECD de CD80-Fc, por ejemplo, con un dominio Fc de tipo salvaje tal como un dominio Fc de IgG1, IgG2 o IgG4 humana o, de manera alternativa, un dominio Fc de IgG1 con

sustituciones en L234F, L235E y P331S. En algunas modalidades, la molécula de fusión al ECD de la CD80 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO:14, la SEQ ID NO: 20 y la SEQ ID NO: 21. En algunas de las modalidades anteriores, la molécula de fusión tiene un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento del tumor en un modelo singénico o de xenoinjerto de ratón, tal como en un modelo de ratón CT26, que una molécula de fusión con una secuencia de aminoácidos idéntica pero un menor contenido de SA. En algunas de las modalidades anteriores, donde la molécula de fusión comprende al menos 10 mol de SA/mol de proteína, tal como al menos 15 mol de SA/mol de proteína, tal como al menos 20 mol de SA/mol de proteína, la molécula de fusión tiene un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento del tumor en un modelo singénico o de xenoinjerto de ratón, tal como en un modelo de ratón CT26 que una molécula de fusión con una secuencia de aminoácidos idéntica pero con menos de 10 mol de SA/mol de proteína o menos de 15 mol de SA/mol de proteína o menos de 20 mol de SA/mol de proteína, respectivamente.

Algunas modalidades de la presente comprenden una molécula de fusión al ECD de la CD80 donde la molécula es capaz de lograr al menos un 50 %, tal como al menos un 60 %, tal

como al menos un 70 %, tal como al menos un 80 %, tal como al menos un 90 %, tal como al menos un 95 %, tal como al menos un 98 % de inhibición del desarrollo de células tumorales en al menos un modelo de cáncer singénico o de xenoinjerto de ratón, tal como un modelo CT26, durante un período de al menos diez días, tal como al menos dos semanas, tal como durante un período de diez días a dos semanas o de dos a tres semanas, o al menos tres semanas.

En algunas modalidades, los ratones reciben de una a tres dosis de 0.3 a 3 mg/kg, tal como de 0.3 a 0.6 mg/kg, de la molécula de fusión ECD de CD80-Fc. En algunas de esas modalidades, la molécula de fusión al ECD de la CD80 también tiene un contenido de ácido siálico de 10-60 mol de ácido siálico (SA)/mol proteína, tal como 15-60 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido es de 10-40 mol de SA/mol de proteína, tal como 15-40 mol de SA/mol de proteína, tal como 20-40 mol de SA/mol de proteína, 20-30 mol de SA/mol de proteína, 15-25 mol de SA/mol de proteína, 15-30 mol de SA por mol de proteína o 30-40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido de SA es de al menos 15, tal como al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35 o al menos 40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido de SA es de 15, 20, 25, 30, 35 o 40 mol de SA/mol de proteína.

En algunas modalidades, la molécula de fusión al ECD de la CD80 tiene un Fc como compañero de fusión, tal como un dominio Fc de IgG1, IgG2 o IgG4 humana. En algunas modalidades, la molécula de fusión al ECD de la CD80
5 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO:14, la SEQ ID NO: 20 y la SEQ ID NO: 21. En algunas de las modalidades anteriores, donde la molécula de fusión comprende al menos 10 mol de SA/mol de proteína, tal como
10 al menos 15 mol de SA/mol de proteína, tal como al menos 20 mol de SA/mol de proteína, la molécula tiene un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento del tumor en un modelo singénico o de xenoinjerto de ratón, tal como en un modelo de ratón CT26 que una molécula de fusión con una
15 secuencia de aminoácidos idéntica pero con menos de 10 mol de SA/mol de proteína o menos de 15 mol de SA/mol de proteína o menos de 20 mol de SA/mol de proteína, respectivamente. En algunas de las modalidades anteriores, donde la molécula de fusión comprende al menos 10 mol de
20 SA/mol de proteína, tal como al menos 15 mol de SA/mol de proteína, tal como al menos 20 mol de SA/mol de proteína, la molécula tiene un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento del tumor en un modelo singénico o de xenoinjerto de ratón, tal como en un modelo de ratón CT26
25 después de al menos diez días o al menos dos semanas o al

menos tres semanas, tal como de diez días a dos semanas o de dos a tres semanas, que un anticuerpo anti-CTLA4, tal como el clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4.

5 En algunas de las modalidades anteriores, la molécula de fusión ECD de CD80-Fc también es capaz de inducir una regresión tumoral completa en los ratones del modelo tumoral singénico o de xenoinjerto, tal como un modelo CT26.

10

En la presente, también se proporcionan composiciones que comprenden un ECD de la CD80 o una molécula de fusión al ECD de la CD80 de cualquiera de las modalidades descritas anteriormente, y que comprenden además al menos un portador
15 farmacéuticamente aceptable. Algunas de esas composiciones comprenden además al menos un agente terapéutico adicional.

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional comprende al menos un agente que estimula el sistema
20 inmunitario. En algunas modalidades, el agente que estimula el sistema inmunitario comprende un inhibidor de la muerte celular programada 1 (PD-1) / el ligando de la muerte celular programada 1 (PD-L1). El inhibidor de PD-1/PD-L1 puede ser un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-PD-1 o
25 anticuerpo anti-PD-L1, un péptido o una molécula de fusión,

o una molécula pequeña.

En algunas modalidades, el inhibidor de PD-1/PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-1, tal como un anticuerpo que comprenda
5 las CDR de cadena pesada y cadena ligera, o que comprenda las regiones variables de cadena pesada y ligera, o que comprenda la secuencia de aminoácidos completa, de un anticuerpo seleccionado de entre nivolumab, pidilizumab y pembrolizumab. En algunas modalidades, el inhibidor de PD-
10 1/PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1, tal como un anticuerpo que comprenda las CDR de cadena pesada y cadena ligera, las regiones variables de cadena pesada y ligera, o la secuencia de aminoácidos completa, de un anticuerpo seleccionado de entre BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736 y
15 MSB0010718C.

En algunas modalidades, el inhibidor de PD-1/PD-L1 es una molécula de fusión a PD-1, tal como AMP-224 o un polipéptido tal como AUR-012.

20

En la presente, también se incluyen métodos de tratamiento del cáncer en un sujeto que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de un ECD de la CD80 o una proteína de fusión al ECD de la CD80 o una composición de
25 entre las modalidades que se describieron anteriormente. En

algunas modalidades, el cáncer es un tumor sólido. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona de entre cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer pulmonar no microcítico, melanoma, carcinoma de células
5 escamosas de la cabeza y el cuello, cáncer de ovario, cáncer pancreático, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, cáncer de vejiga y cáncer de endometrio. En algunas modalidades, el cáncer presenta recurrencia o progresión después de una terapia seleccionada de entre
10 cirugía, quimioterapia, radioterapia, o una combinación de estas.

En algunos de los métodos de la presente, el ECD de la CD80, la molécula de fusión al ECD de la CD80 o la
15 composición se administran en combinación con al menos un agente terapéutico adicional. En algunas de esas modalidades, el agente terapéutico adicional puede envasarse con el ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 como parte de la misma composición, p. ej.,
20 mezclados juntos en una composición o suministrados en recipientes, viales u otros envases separados. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional comprende al menos un agente que estimula el sistema inmunitario. En algunas modalidades, el agente que estimula el sistema
25 inmunitario comprende un inhibidor de la muerte celular

programada 1 (PD-1) / el ligando de la muerte celular
programada 1 (PD-L1). El inhibidor de PD-1/PD-L1 puede ser
un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-PD-1 o
anticuerpo anti-PD-L1, un péptido o una molécula de fusión,
5 o una molécula pequeña.

En algunas modalidades, el inhibidor de PD-1/PD-L1 es un
anticuerpo anti-PD-1, tal como un anticuerpo que comprenda
las CDR de cadena pesada y cadena ligera, o que comprenda
10 las regiones variables de cadena pesada y ligera, o que
comprenda la secuencia de aminoácidos completa, de un
anticuerpo seleccionado de entre nivolumab, pidilizumab y
pembrolizumab. En algunas modalidades, el inhibidor de PD-
1/PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1, tal como un anticuerpo
15 que comprenda las CDR de cadena pesada y cadena ligera, las
regiones variables de cadena pesada y ligera, o la
secuencia de aminoácidos completa, de un anticuerpo
seleccionado de entre BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736 y
MSB0010718C.

20

En algunas modalidades, el inhibidor de PD-1/PD-L1 es una
molécula de fusión a PD-1, tal como AMP-224 o un
polipéptido tal como AUR-012.

25 En algunas modalidades de los métodos de la presente, el

ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 y el agente terapéutico adicional, tal como un agente que estimula el sistema inmunitario, tal como un inhibidor de PD-1/PD-L1, pueden administrarse de manera simultánea o en
5 secuencia. En algunos casos, una o más dosis del inhibidor de PD-1/PD-L1 se administran antes de la administración del ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80. En algunos casos, el sujeto ha recibido un suministro completo del agente que estimula el sistema inmunitario,
10 p. ej., la terapia con el inhibidor de PD-1/PD-L1 antes de la administración del ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80. En algunos casos, el ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 se administra durante un segundo suministro del agente de
15 estimulación del sistema inmunitario, p. ej., terapia con el inhibidor de PD-1/PD-L1. En algunos casos, el sujeto ha recibido al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro dosis del agente que estimula el sistema inmunitario, tal como el inhibidor de PD-1/PD-L1, antes de
20 la administración del ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80. En algunos casos, se administra al menos una dosis del agente que estimula el sistema inmunitario, p. ej., el inhibidor de PD-1/PD-L1, al mismo tiempo que el ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD
25 de la CD80.

En algunas modalidades, una o más dosis del ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 se administran antes de la administración de un agente terapéutico adicional, tal como un agente que estimula el sistema inmunitario, tal como un inhibidor de PD-1/PD-L1. En algunos de esos casos, el sujeto ha recibido al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro dosis del ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 antes de la administración de un agente que estimula el sistema inmunitario, p. ej., un inhibidor de PD-1/PD-L1. En algunos casos, se administra al menos una dosis del ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 al mismo tiempo que el agente que estimula el sistema inmunitario, p. ej., el inhibidor de PD-1/PD-L1.

En cualquiera de los métodos de la presente, el sujeto puede ser resistente al tratamiento con un inhibidor de PD-1/PD-L1. En algunos de esos casos, el sujeto ha recibido anteriormente una terapia con el inhibidor de PD-1/PD-L1, mientras que en otros de esos casos, el sujeto no ha recibido anteriormente una terapia con el inhibidor de PD-1/PD-L1 pero se identifica como resistente a través de otros medios tales como determinados rasgos fenotípicos.

En cualquiera de los métodos anteriores, el sujeto puede recibir la administración de un agente terapéutico adicional que comprenda al menos un agente de quimioterapia, un agente inhibidor del crecimiento, un agente antiangiogénico y/o una composición antineoplásica, además del ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80.

En algunas modalidades, se ha demostrado que la combinación del ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 y un agente que estimula el sistema inmunitario, tal como un inhibidor de PD-1/PD-L1, que se administra al sujeto reduce o inhibe el crecimiento del tumor en al menos un modelo de cáncer singénico o de xenoinjerto de ratón de manera sinérgica en comparación con el tratamiento con el ECD de la CD80 o la molécula de fusión, o el agente que estimula el sistema inmunitario, tal como el inhibidor de PD-1/PD-L1 suministrados de manera individual. En algunas modalidades, el modelo de ratón es un modelo de cáncer colorrectal con células CT26 de carcinoma colorrectal murinas. En otras modalidades, el modelo puede ser un modelo MC38 o un modelo B16.

En cualquiera de las modalidades de métodos anteriores, el ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80

que se administra al sujeto puede inhibir el crecimiento del tumor en al menos un modelo de cáncer singénico o de injerto de ratón durante un período de 1 semanas, 10 días, 2 semanas o 3 semanas, por ejemplo, en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 %, o puede inhibir el crecimiento de tumores en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 % en un paciente durante un período de un mes, dos meses, tres meses, seis meses o un año. En cualquiera de las modalidades de métodos anteriores, la administración del ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 puede reducir el volumen de al menos un tumor en un animal o sujeto humano en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 %, por ejemplo, durante un período de un mes, dos meses, tres meses, seis meses o un año. En algunas de esas modalidades, el tumor es un tumor sólido.

En cualquiera de las modalidades de métodos de terapia de

combinación anteriores, la combinación del ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 con un agente terapéutico adicional, tal como un estimulador del sistema inmunitario, tal como un inhibidor de PD-1/PD-L1, que se administra al sujeto puede inhibir el crecimiento del tumor en al menos un modelo de cáncer singénico o de injerto de ratón durante un período de 1 semanas, 10 días, 2 semanas o 3 semanas, por ejemplo, en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 %, o puede inhibir el crecimiento de tumores en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 % en un paciente durante un período de un mes, dos meses, tres meses, seis meses o un año. En cualquiera de las modalidades de métodos de terapia de combinación anteriores, la combinación del ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 con un agente terapéutico adicional, tal como un estimulador del sistema inmunitario, tal como un inhibidor de PD-1/PD-L1, que se administra al sujeto puede reducir el volumen de al menos un tumor en un animal o sujeto humano en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 %

al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 %, por ejemplo, durante un período de un mes, dos meses, tres meses, seis meses o un año. En algunas de esas modalidades, el tumor es un tumor sólido.

En algunas de las modalidades de terapia de combinación anteriores, el ECD de la CD80 o la molécula de fusión del ECD de la CD80 es una molécula de fusión del ECD de la CD80 que comprende 10-60 mol de ácido siálico (SA) por mol de proteína ECD de CD80, tal como 15-60 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido es de 10-40 mol de SA/mol de proteína, tal como 15-40 mol de SA/mol de proteína, tal como 20-40 mol de SA/mol de proteína, 20-30 mol de SA/mol de proteína, 15-25 mol de SA/mol de proteína, 15-30 mol de SA por mol de proteína o 30-40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido de SA es de al menos 15, tal como al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35 o al menos 40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido de SA es de 15, 20, 25, 30, 35 o 40 mol de SA/mol de proteína. En algunas de esas modalidades, la molécula de fusión al ECD de la CD80 comprende un dominio Fc como compañero de fusión, tal como un dominio Fc de tipo salvaje, tal como un dominio Fc de IgG1, IgG2 o IgG4 humana de tipo salvaje. En algunas

modalidades, la molécula de fusión al ECD de la CD80 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO:14, la SEQ ID NO: 20 y la SEQ ID NO: 21. En algunas de esas
5 modalidades, el ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 es capaz de lograr al menos un 90 % de reducción del desarrollo de células tumorales CT26 en los ratones, tal como al menos un 95 %, o al menos un 98 %, durante un período de al menos diez días, tal como al menos
10 dos semanas, tal como al menos tres semanas, tal como durante un período de diez días a dos semanas o de dos a tres semanas. En algunas modalidades, estos resultados se obtienen después de que los ratones reciben de una a tres dosis de 0.3 a 3 mg/kg, tal como de 0.3 a 0.6 mg/kg, de la
15 molécula de fusión ECD de CD80-Fc.

En la presente, también está comprendida una molécula de fusión al ECD de CD80 que comprende un polipéptido del ECD de la CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, tal como
20 un Fc de IgG1 humana de tipo salvaje, donde ECD de CD80-Fc comprende 10-60 mol de SA por mol de proteína ECD de CD80-Fc, tal como 15-60 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido es de 10-40 mol de SA/mol de proteína, tal como 15-40 mol de SA/mol de proteína, tal
25 como 20-40 mol de SA/mol de proteína, 20-30 mol de SA/mol

de proteína, 15-25 mol de SA/mol de proteína, 15-30 mol de SA por mol de proteína o 30-40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido de SA es de al menos 15, tal como al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35 o al menos 40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido de SA es de 15, 20, 25, 30, 35 o 40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el dominio Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:14. En algunas modalidades, la molécula de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:20. En algunas modalidades, la molécula es capaz de lograr una reducción de al menos un 90 %, tal como al menos un 95 %, o al menos un 98 %, del desarrollo de células tumorales CT26 en los ratones durante un período de al menos diez días, tal como al menos dos semanas, tal como al menos tres semanas, tal como durante un período de diez días a dos semanas o de dos a tres semanas. En algunas modalidades, estos resultados se obtienen después de que los ratones reciben de una a tres dosis de 0.3 a 3 mg/kg, tal como de 0.3 a 0.6 mg/kg, de la molécula de fusión ECD de CD80-Fc.

También están comprendidas las composiciones que comprenden ECD de CD80-Fc de IgG1 y que comprenden además al menos un portador farmacéuticamente aceptable. Esas composiciones

también pueden contener un agente terapéutico adicional. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es al menos un agente que estimula el sistema inmunitario, tal como un inhibidor de la muerte celular programada 1 (PD-1) / el ligando de la muerte celular programada 1 (PD-L1). En algunos casos, el inhibidor de PD-1/PD-L1 es un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-PD-1, tal como nivolumab, pidilizumab y pembrolizumab. Por ejemplo, el anticuerpo puede tener las CDR de cadena pesada y cadena ligera o las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo seleccionado de entre nivolumab, pidilizumab y pembrolizumab. En otras modalidades, el inhibidor de PD-1/PD-L1 es un anticuerpo anti-PD-L1. Un anticuerpo anti-PD-L1 puede tener las CDR de cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo seleccionado de entre BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736 y MSB0010718C, por ejemplo, o puede comprender las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736 o MSB0010718C. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona de entre BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736 y MSB0010718C. De manera alternativa, el inhibidor de PD-1/PD-L1 puede ser una molécula de fusión a PD-1, tal como AMP-224 o un polipéptido tal como AUR-012.

La presente descripción también abarca métodos de

tratamiento del cáncer en un sujeto que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula de fusión ECD de CD80-Fc de IgG1 tal como se describió anteriormente. En algunas modalidades, el cáncer es un
5 tumor sólido, tal como un cáncer seleccionado de entre cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer pulmonar no microcítico, melanoma, carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello, cáncer de ovario, cáncer pancreático, carcinoma de células renales, carcinoma
10 hepatocelular, cáncer de vejiga y cáncer de endometrio. En algunas modalidades, el cáncer presenta recurrencia o progresión después de una terapia seleccionada de entre cirugía, quimioterapia, radioterapia, o una combinación de estas.

15

En algunas de estas modalidades de métodos, ECD de CD80-Fc comprende 10-60 mol de SA por mol de proteína ECD de CD80-Fc, tal como 15-60 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido es de 10-40 mol de SA/mol de
20 proteína, tal como 15-40 mol de SA/mol de proteína, tal como 20-40 mol de SA/mol de proteína, 20-30 mol de SA/mol de proteína, 15-25 mol de SA/mol de proteína, 15-30 mol de SA por mol de proteína o 30-40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido de SA es de al menos
25 15, tal como al menos 20, al menos 25, al menos 30, al

menos 35 o al menos 40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido de SA es de 15, 20, 25, 30, 35 o 40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1, IgG2 o IgG4 humana. En algunas modalidades, el dominio Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:14. En algunas modalidades, la molécula de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:20 o 21. En algunas modalidades, la molécula es capaz de lograr al menos un 90 % de reducción del desarrollo de células tumorales CT26 en los ratones durante un período de dos o tres semanas luego de la inoculación de los ratones con células tumorales. En algunas modalidades, la molécula es capaz de lograr al menos un 95 % de reducción del desarrollo de células tumorales CT26, tal como al menos un 98 % de reducción, en los ratones durante un período de dos o tres semanas luego de la inoculación de los ratones con células tumorales. Por ejemplo, esos resultados pueden obtenerse cuando los ratones reciben de una a tres dosis de 0.3 a 3.0 mg/kg, tal como de 0.3 a 0.6 mg/kg, de la molécula de fusión ECD-Fc. En algunas de las modalidades de métodos, ECD de CD80-Fc comprende 10-40 mol de SA por mol de proteína ECD de CD80-Fc, y ECD de CD80-Fc reduce el desarrollo de células tumorales CT26 en los ratones durante un período de dos a tres semanas en un mayor grado que una

proteína ECD de CD80-Fc con la misma secuencia de aminoácidos que comprende menos de 10 mol de SA por mol de proteína ECD de CD80-Fc. La descripción de la presente también comprende métodos de mejora de la eficacia de una

5 proteína de fusión al ECD de la CD80 en el tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende aumentar el nivel de ácido siálico (SA) en la proteína de fusión al ECD de la CD80 o suministrar una proteína de fusión al ECD de la CD80 con un aumento del nivel de SA y administrar la proteína de

10 fusión al ECD de la CD80 que comprende un mayor nivel de SA al sujeto. En algunas de esas modalidades, el nivel de SA aumenta en 5, 10, 20, 30, 40 o 50 mol por mol de proteína del ECD de la CD80. En algunas de estas modalidades de métodos, ECD de CD80-Fc comprende 10-60 mol de SA por mol

15 de proteína ECD de CD80-Fc, tal como 15-60 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido es de 10-40 mol de SA/mol de proteína, tal como 15-40 mol de SA/mol de proteína, tal como 20-40 mol de SA/mol de proteína, 20-30 mol de SA/mol de proteína, 15-25 mol de SA/mol de proteína,

20 15-30 mol de SA por mol de proteína o 30-40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido de SA es de 15, 20, 25, 30, 35 o 40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1, IgG2 o IgG4 humana. En algunas modalidades, el

25 dominio Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ

ID NO:14. En algunas modalidades, la molécula de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:20 o 21. En algunas modalidades, la molécula es capaz de lograr al menos un 90 % de reducción del desarrollo de células tumorales CT26 en los ratones durante un período de dos o tres semanas. En algunas modalidades, la molécula es capaz de lograr al menos un 95 %, tal como al menos un 98 %, de reducción del desarrollo de células tumorales CT26 en los ratones durante un período de al menos diez días, tal como al menos dos semanas, tal como al menos tres semanas, tal como durante un período de diez días a dos semanas o de dos a tres semanas. En algunas modalidades, estos resultados se obtienen después de que los ratones reciben de una a tres dosis de 0.3 a 3 mg/kg, tal como de 0.3 a 0.6 mg/kg, de la molécula de fusión ECD de CD80-Fc.

En algunas de estas modalidades de métodos, la mejora de la eficacia se mide como un aumento de la supervivencia a nivel general, un aumento de la supervivencia sin la enfermedad o una mayor reducción del crecimiento de al menos un tumor en un animal o sujeto humano. En otras palabras, se mejora uno o más de estos parámetros a partir de la administración de la molécula de fusión al ECD de la CD80 con un mayor contenido de SA en comparación con una molécula de fusión al ECD de la CD80 con un menor contenido

de SA. En otras modalidades, la mejora de la eficacia se mide como una mayor reducción del crecimiento del tumor en un modelo singénico o de xenoinjerto de ratón tal como un modelo de ratón CT26 o como una reducción de la velocidad de depuración en un animal o sujeto humano. En algunas modalidades, la eficacia se mide como una mayor reducción del crecimiento tumoral de al menos un tumor en el sujeto o una mayor reducción del crecimiento del tumor en al menos un modelo singénico o de xenoinjerto de ratón, y donde el crecimiento del tumor se reduce de manera adicional en al menos un 10 %, tal como al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o al menos un 90 % a partir de la administración de la molécula de fusión al ECD de la CD80 con un aumento del nivel de SA en comparación con la administración de la molécula de fusión al ECD de la CD80 sin el aumento del nivel de SA.

Se ha de comprender que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada que sigue son solamente ilustrativas y explicativas y no restringen las reivindicaciones. Los títulos de las secciones que se usan en la presente cumplen solamente fines de organización y no se ha de interpretar que limiten la materia descrita. Todas las referencias mencionadas en la presente, incluidas las

publicaciones y solicitudes de patentes, se incorporan en su totalidad a la presente mediante referencia a todos los efectos.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las **Figuras 1a-1b** muestran efectos de la administración de una molécula de fusión ECD de CD80-Fc en comparación con una molécula de fusión ECD de CTLA4-Fc y un control de solución salina a ratones que recibieron un implante de células CT26 de una línea de células de carcinoma colorrectal murinas. La **Figura 1a** muestra el volumen tumoral hasta 21 días después de la inoculación de los ratones con las células CT26. Tal como se muestra en la figura, ECD de CTLA4-Fc potenció el crecimiento de los tumores mientras que ECD de CD80-Fc inhibió el crecimiento de los tumores de manera estadísticamente significativa en comparación con el control de la solución salina. Los valores *P* se calcularon mediante análisis de prueba *t* de dos colas desapareada de los volúmenes tumorales calculados en cada día del estudio (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). La **Figura 1b** muestra los volúmenes tumorales individuales del día 19 después de la inoculación para los tres grupos.

25

Las **Figuras 2a-2b** muestran efectos de la administración de una molécula de fusión ECD de CD80-Fc o un anticuerpo anti-PD-1 o una combinación de los dos en comparación con un control de solución salina a ratones que recibieron un implante de células CT26 de una línea de células de carcinoma colorrectal murinas. La **Figura 2a** muestra el volumen tumoral hasta 14 días después de la inoculación. Los ratones que recibieron la administración de la combinación de ECD de CD80-Fc y anti-PD-1 mostraron una reducción estadísticamente significativa del crecimiento de los tumores en comparación con las terapias individuales con ECD de CD80-Fc ($p < 0.01$ después del día 9) o anti-PD-1 ($p < 0.01$ el día 14). La importancia estadística se determinó a través de una Prueba T desapareada de dos colas que comparó el grupo de combinación con el grupo con ECD de CD80-Fc. La **Figura 2b** muestra los volúmenes tumorales individuales del día 14.

Las **Figuras 3a-b** muestran el efecto de la secuencia de polipéptidos de fusión Fc sobre los efectos de una molécula de fusión ECD de CD80-Fc en el crecimiento tumoral de los tumores CT26 en los ratones. Específicamente, los ratones recibieron la administración de un control de solución salina, o ECD de CD80-Fc con un compañero de fusión del dominio Fc de tipo salvaje de IgG1 humana (CD80-IgG1 WT), o

ECD de CD80-Fc con un compañero de fusión del dominio Fc de IgG1 humana mutante (L234F/L235E/P331S) (CD80-IgG1 MT). La **Figura 3a** muestra cambios en el volumen tumoral hasta el día 21 después de la inoculación. El dominio Fc mutado provocó una mejora de la actividad antitumoral, que fue estadísticamente significativa a partir del día 14 después de la inoculación ($p < 0.01$). Se determinó la importancia estadística a través de una Prueba T desapareada de dos colas. La **Figura 3b** muestra los volúmenes tumorales individuales del día 21 después de la inoculación.

Las **Figuras 4a-b** muestran la tinción de células tumorales murinas para determinar la presencia de linfocitos T CD3+ y CD4+ después de la exposición al control de solución salina o a las moléculas de fusión ECD de CD80-Fc con compañeros de fusión Fc de tipo salvaje y mutantes. La **Figura 4a** proporciona imágenes representativas que muestran linfocitos CD3+ (imágenes superiores) y la tinción con DAPI correspondiente (núcleos, imágenes inferiores) en tumores CT26 recolectados 7 días después de la inyección de solución salina, CD80-IgG1 WT o CD80-IgG1 MT. Tanto CD80-IgG1 WT como CD80-IgG1 MT aumentaron la cantidad de linfocitos CD3+ dentro de los tumores en comparación con el vehículo, pero la magnitud del aumento fue mayor con CD80-IgG1 MT. Las imágenes se recolectaron mediante el uso del

objetivo 10X. La **Figura 4b** proporciona imágenes representativas que muestran linfocitos CD3⁺ (fila superior) y linfocitos CD4⁺ (fila inferior) en tumores CT26 recolectados 7 días después de la inyección de solución salina, CD80-IgG1 WT o CD80-IgG1 MT. Las imágenes se obtuvieron en el mismo campo de visión pero con canales diferentes. Tanto CD80-IgG1 WT como CD80-IgG1 MT aumentaron la cantidad de linfocitos CD4⁺ de infiltración en comparación con el vehículo. La relación de linfocitos CD3⁺ con respecto a CD4⁺ aumentó con CD80-IgG1 MT en comparación con CD80-IgG1 WT. Las imágenes se recolectaron mediante el uso del objetivo 10X.

Las **Figuras 5a-d** muestran la liberación de citocinas IFN- γ y TNF- α desde los linfocitos T en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos expuestas a microesferas de proteínas A recubiertas con 0.01, 0.1 o 1 μ g/pocillo de una molécula de fusión ECD de CD80-Fc de IgG1 (CD80-Fc). Las **Figuras 5a y 5c** muestran que la CD80-Fc inmovilizada en microesferas de manera individual no provocó una activación significativa de linfocitos T, según se midió mediante la producción de citocinas solubles. Las **Figuras 5b y 5d** muestran que, cuando se inmovilizó una pequeña cantidad de OKT3-scFv (demasiado baja para provocar la estimulación de linfocitos T por sí sola) junto con CD80-Fc, se observó la

liberación de citocinas.

La **Figura 6** muestra el crecimiento tumoral de tumores CT26 murinos luego del tratamiento con un control de solución salina o dosis de 0.3 o 0.6 mg/kg de tres lotes diferentes de una molécula de fusión ECD de CD80-Fc con tres contenidos de ácido siálico (SA) diferentes. El lote A tiene 5 mol de SA/mol de proteína, el lote D tiene 15 mol de SA/mol de proteína y el lote E tiene 20 mol de SA/mol de proteína. El tratamiento con el lote E de ECD de CD80-Fc con dosis de 0.3 o 0.6 mg/kg provocó una inhibición del crecimiento tumoral del 93 % y 98 % en comparación con el control ($P < 0.001$). El tratamiento con el lote D de ECD de CD80-Fc con dosis de 0.3 o 0.6 mg/kg provocó una inhibición del crecimiento tumoral del 93 % y 95 % en comparación con el control ($P < 0.001$). En comparación, el tratamiento con el lote A de ECD de CD80-Fc a 0.3 mg/kg no inhibió el crecimiento tumoral en comparación con el control y en dosis de 0.6 mg/kg solamente indujo una inhibición del crecimiento tumoral del 70 % ($P < 0.001$).

La **Figura 7** muestra el crecimiento tumoral de tumores CT26 tratados con IgG2b de ratón a 10 mg/kg; ECD de CD80-Fc murina con SA 20 mol/mol a 0.3 mg/kg; un clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4 a 10 mg/kg; y el clon 9D9 del

anticuerpo anti-CTLA4 a 1.5 mg/kg. Las flechas indican los momentos en los que los ratones recibieron las dosis. El símbolo de asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre ECD de CD80-Fc murina con SA 20 mol/mol a 0.3 mg/kg y los otros tratamientos.

La **Figura 8** muestra el crecimiento tumoral de tumores MC38 tratados con IgG2b de ratón a 10 mg/kg; ECD de CD80-Fc murina con SA 20 mol/mol a 3 mg/kg; un clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4 a 10 mg/kg; y el clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4 a 1.5 mg/kg. Las flechas indican los momentos en los que los ratones recibieron las dosis. El símbolo de asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre ECD de CD80-Fc murina con SA 20 mol/mol a 3mg/kg y los otros tratamientos.

La **Figura 9** muestra el crecimiento tumoral de tumores B16 tratados con IgG2b de ratón a 10 mg/kg; ECD de CD80-Fc murina con SA 20 mol/mol a 3 mg/kg; un clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4 a 10 mg/kg; y el clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4 a 1.5 mg/kg. Las flechas indican los momentos en los que los ratones recibieron las dosis. El símbolo de asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre ECD de CD80-Fc murina con SA 20 mol/mol a 3 mg/kg y los otros tratamientos.

DESCRIPCIÓN DE MODALIDADES PARTICULARES

Definiciones

5

A menos que se definan de otro modo, los términos científicos y técnicos usados en conexión con la presente invención tendrán los significados comúnmente aceptados por los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluyen el plural y los términos en plural incluyen el singular.

En la presente solicitud, el uso de «o» significa «y/o» a menos que se indique lo contrario. En el contexto de una reivindicación con dependencia múltiple, el uso de «o» hace referencia a más de una reivindicación dependiente o independiente anterior solamente como disyunción. Asimismo, términos tales como «elemento» o «componente» abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

Los ejemplos de técnicas usadas en conexión con técnicas de ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos,

25

transformación y cultivo de tejidos (p. ej., electroporación, lipofección), reacciones enzimáticas y purificación se describen, p. ej., en Sambrook et ál. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)), entre otros.

Tal como se utilizan de acuerdo con la presente descripción, se comprenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tendrán los siguientes significados:

Las expresiones **«molécula de ácido nucleico»** y **«polinucleótido»** pueden usarse de manera intercambiable y hacen referencia a un polímero de nucleótidos. Esos polímeros de nucleótidos pueden contener nucleótidos naturales y/o no naturales e incluyen, de modo no taxativo, ADN, ARN y APN. Una **«secuencia de ácido nucleico»** hace referencia a la secuencia lineal de nucleótidos que comprenden la molécula de ácido nucleico o el polinucleótido.

Las expresiones **«polipéptido»** y **«proteína»** se usan de manera intercambiable para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácidos y no se limitan a una longitud

mínima. Esos polímeros de residuos de aminoácidos pueden contener residuos de aminoácidos naturales o no naturales e incluyen, de modo no taxativo, péptidos, oligopéptidos, dímeros, trímeros y multímeros de residuos de aminoácidos.

5 Tanto las proteínas de longitud completa como sus fragmentos se encuentran abarcados por la definición. Las expresiones también incluyen modificaciones del polipéptido posteriores a la expresión, por ejemplo, glicosilación, sialilación, acetilación, fosforilación, y similares.

10 Además, a efectos de la presente invención, un «polipéptido» hace referencia a una proteína que incluye modificaciones, tales como eliminaciones, adiciones y sustituciones (por lo general de naturaleza conservadora) de la secuencia natural, siempre y cuando la proteína

15 mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo, a través de una mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, por ejemplo, a través de mutaciones de hospedadores que producen las proteínas o errores ocasionados por la amplificación de

20 PCR.

Un «**dominio extracelular de la CD80**» o «**ECD de la CD80**» hace referencia a un polipéptido del dominio extracelular de la CD80, lo cual incluye sus variantes naturales y

25 modificadas. Los ejemplos no taxativos de ECD de CD80

incluyen las SEQ ID NOs:--. Una «**molécula de fusión al ECD de la CD80**» hace referencia a una molécula que comprende un ECD de la CD80 y un compañero de fusión tal como un dominio Fc, albúmina o PEG. El compañero de fusión puede unirse de
5 manera covalente, por ejemplo, al extremo N o C del ECD de la CD80 o en una ubicación interna. Los ejemplos no taxativos de moléculas de fusión al ECD de la CD80 incluyen las SEQ ID NOs:--.

10 Las expresiones «**proteína de muerte celular programada 1**» y «**PD-1**» hacen referencia a un receptor inmunoinhibidor que pertenece a la familia CD28. La PD-1 se expresa de manera predominante en linfocitos T activados anteriormente *in vivo* y se une a dos ligandos, PD-L1 y PD-L2. El término
15 «PD-1», tal como se usa en la presente, incluye PD-1 humana (hPD-1), variantes, isoformas y homólogos de especies de hPD-1, y análogos con al menos un epítipo común con hPD-1. La secuencia hPD-1 completa puede encontrarse en GenBank con el n.º de registro U64863. En algunas modalidades, la
20 PD-1 es una PD-1 humana con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: -- (precursora, con secuencia de señal) o la SEQ ID NO: -- (madura, sin secuencia de señal).

Las expresiones «**ligando 1 de muerte celular programada 1**»
25 y «**PD-L1**» hacen referencia a uno de dos ligandos de

glicoproteínas de la superficie celular para la PD-1 (el otro es PD-L2) que ejercen una regulación negativa de la activación de linfocitos T y la secreción de citocinas a partir de la unión a PD-1. El término «PD-L1», tal como se
5 usa en la presente, incluye PD-L1 humano (hPD-L1), variantes, isoformas y homólogos de especies de hPD-L1, y análogos con al menos un epítipo común con hPD-L1. La secuencia de hPD-L1 completa puede encontrarse en GenBank® con el n.º de registro Q9NZQ7. En algunas modalidades, la
10 PD-L1 es una PD-L1 humana con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: -- (precursora, con secuencia de señal) o la SEQ ID NO: -- (madura, sin secuencia de señal).

La expresión **«agente que estimula el sistema inmunitario»**,
15 tal como se usa en la presente, hace referencia a una molécula que estimula el sistema inmunitario al actuar como un agonista de una molécula estimuladora del sistema inmunitario, lo cual incluye una molécula coestimuladora, o al actuar como un antagonista de una molécula inhibidora
20 del sistema inmunitario, lo cual incluye una molécula coinhibidora. Un agente que estimule el sistema inmunitario puede ser un producto biológico, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, otra proteína o vacuna, o puede ser un fármaco de moléculas pequeñas. Una **«molécula
25 estimuladora del sistema inmunitario»** incluye un receptor o

ligando que actúa para mejorar, estimular, inducir o «activar» de otro modo una respuesta inmunitaria. Las moléculas estimuladoras del sistema inmunitario, tal como se definen en la presente, incluyen moléculas coestimuladoras. Una «**molécula inhibidora del sistema inmunitario**» incluye un receptor o ligando que actúa para reducir, inducir, suprimir o «desactivar» de otro modo una respuesta inmunitaria. Las moléculas inhibidoras del sistema inmunitario, tal como se definen en la presente, incluyen moléculas coinhibidoras. Esas moléculas estimuladoras del sistema inmunitario e inhibidoras del sistema inmunitario pueden ser, por ejemplo, receptores o ligandos encontrados en células inmunitarias tales como linfocitos T o encontrados en células involucradas en la inmunidad innata tales como linfocitos NK.

La expresión «**inhibidor de PD-1/PD-L1**» hace referencia a un resto que altera la vía de señalización de PD-1/PD-L1. En algunas modalidades, el inhibidor inhibe la vía de señalización de PD-1/PD-L1 mediante la unión a PD-1 y/o PD-L1. En algunas modalidades, el inhibidor también se une a PD-L2. En algunas modalidades, un inhibidor de PD-1/PD-L1 bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 y/o PD-L2. Los ejemplos de inhibidores de PD-1/PD-L1 no taxativos incluyen anticuerpos que se unen a PD-1; anticuerpos que se unen a PD-L1;

proteínas de fusión, tales como AMP-224; y péptidos, tales como AUR-012.

La expresión **«anticuerpo que inhibe la PD-1»** hace
5 referencia a un anticuerpo que se une a la PD-1 o se une al PD-L1 e inhibe de ese modo la señalización de la PD-1 y/o el PD-L1. En algunas modalidades, un anticuerpo que inhibe la PD-1 se une a la PD-1 y bloquea la unión del PD-L1 y/o PD-L2 a la PD-1. En algunas modalidades, un anticuerpo que
10 inhibe la PD-1 se une al PD-L1 y bloquea la unión de la PD-1 al PD-L1. Se puede hacer referencia a un anticuerpo que inhibe la PD-1 que se une al PD-L1 como un «anticuerpo anti-PD-L1». Se puede hacer referencia a un anticuerpo que inhibe la PD-1 que se une a la PD-1 como un «anticuerpo
15 anti-PD-1».

Con respecto a ECD de la CD80 y moléculas de fusión al ECD de la CD80, la expresión **«bloquea la unión de»** un ligando, y sus variantes gramaticales, hace referencia a la
20 capacidad de inhibir una interacción entre la CD80 y un ligando de la CD80, tal como CD28, CTLA4 o PD-L1. Esa inhibición puede producirse a través de cualquier mecanismo, incluso mediante la competencia de ECD de la CD80 o moléculas de fusión al ECD de la CD80 por la unión
25 con ligandos de la CD80.

Con respecto a anticuerpos anti-PD-1 y péptidos o moléculas de fusión a la PD-1, la expresión «**bloquea la unión de**» un ligando, tal como PD-L1, y sus variantes gramaticales, se usa para hacer referencia a la capacidad de inhibir la interacción entre la PD-1 y un ligando de la PD-1, tal como PD-L1. Esa inhibición puede producirse a través de cualquier mecanismo, lo cual incluye la interferencia directa con la unión al ligando, p. ej., debido a sitios de unión en superposición en la PD-1 y/o cambios de conformación en la PD-1 inducidos por el anticuerpo que alteran la afinidad con respecto al ligando, etc., o, en el caso de un péptido o una molécula de fusión a la PD-1, mediante la competencia por la unión con un ligando de la PD-1.

15

La «**afinidad**» o «**afinidad de unión**» hacen referencia a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un solo sitio de unión de una molécula (p. ej., un polipéptido) y su compañero de unión (p. ej., un ligando). En algunas modalidades, una «afinidad de unión» hace referencia a la afinidad de unión intrínseca, que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (p. ej., polipéptido y ligando). Por lo general, la afinidad de una molécula X con respecto a su compañero Y puede estar representada por la constante de disociación (K_d).

El término «**anticuerpo**», tal como se usa en la presente, hace referencia a una molécula que comprende al menos la región de determinación de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) 1, CDR2 y CDR3 de una cadena pesada y al menos la CDR1, CDR2 y CDR3 de una cadena ligera, donde la molécula es capaz de unirse a un antígeno. El término «anticuerpo» incluye, de modo no taxativo, fragmentos capaces de unirse a un antígeno, tales como Fv, Fv monocatenarios (scFv), Fab, Fab' y (Fab')₂. El término «anticuerpo» también incluye, de modo no taxativo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos de diversas especies tales como ratones, seres humanos, macacos cangrejeros, etc.

En algunas modalidades, un anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera. En algunas modalidades, un anticuerpo comprende al menos una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada y al menos una parte de una región constante de cadena pesada, y al menos una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera y al menos una parte de una región constante de cadena ligera. En algunas modalidades, un anticuerpo comprende dos cadenas pesadas, donde cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada y al menos una parte de una

región constante de cadena pesada, y dos cadenas ligeras, donde cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera y al menos una parte de una región constante de cadena ligera. Tal como se usa en la presente, se
5 considera que un Fv monocatenario (scFv), o cualquier otro anticuerpo que comprende, por ejemplo, una sola cadena de polipéptidos que comprende las seis CDR (tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena ligera) tienen una cadena pesada y una cadena ligera. En algunas de esas modalidades,
10 la cadena pesada es la región del anticuerpo que comprende las tres CDR de cadena pesada y la cadena ligera en la región del anticuerpo que comprende las tres CDR de cadena ligera.

15 La expresión «**región variable de cadena pesada**» hace referencia a una región que comprende HVR1 de cadena pesada, marco (FR) 2, HVR2, FR3 y HVR3. En algunas modalidades, una región variable de cadena pesada también comprende al menos una parte de un FR1 y/o al menos una
20 parte de un FR4.

La expresión «**región constante de cadena pesada**» hace referencia a una región que comprende al menos tres dominios constantes de cadena pesada, C_H1, C_H2 y C_H3. Los
25 ejemplos no taxativos de regiones constantes de cadena

pesada incluyen γ , δ y α . Los ejemplos no taxativos de regiones constantes de cadena pesada también incluyen ϵ y μ . Cada región constante pesada corresponde a un isotipo de anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo que comprende una
5 región constante γ es un anticuerpo de IgG, un anticuerpo que comprende una región constante δ es un anticuerpo de IgD y un anticuerpo que comprende una región constante α es un anticuerpo de IgA. Además, un anticuerpo que comprende una región constante μ es un anticuerpo de IgM y un
10 anticuerpo que comprende una región constante ϵ es un anticuerpo de IgE. Determinados isotipos pueden subdividirse de manera adicional en subclases. Por ejemplo, los anticuerpos de IgG incluyen, de modo no taxativo, anticuerpos de IgG1 (que comprenden una región constante
15 γ_1), IgG2 (que comprenden una región constante γ_2), IgG3 (que comprenden una región constante γ_3) e IgG4 (que comprenden una región constante γ_4); los anticuerpos de IgA incluyen, de modo no taxativo, anticuerpos de IgA1 (que comprenden una región constante α_1) e IgA2 (que comprenden
20 una región constante α_2); y los anticuerpos de IgM incluyen, de modo no taxativo, IgM1 e IgM2.

La expresión «**cadena pesada**» hace referencia a un polipéptido que comprende al menos una región variable de
25 cadena pesada, con o sin una secuencia líder. En algunas

modalidades, una cadena pesada comprende al menos una parte de una región constante de cadena pesada. La expresión «cadena pesada de longitud completa» hace referencia a un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada y una región constante de cadena pesada, con o sin una secuencia líder.

La expresión «**región variable de cadena ligera**» hace referencia a una región que comprende HVR1 de cadena ligera, marco (FR) 2, HVR2, FR3 y HVR3. En algunas modalidades, una región variable de cadena ligera también comprende un FR1 y/o un FR4.

La expresión «**región constante de cadena ligera**» hace referencia a una región que comprende un dominio constante de cadena ligera, C_L . Los ejemplos no taxativos de regiones constantes de cadena ligera incluyen λ y κ .

La expresión «**cadena ligera**» hace referencia a un polipéptido que comprende al menos una región variable de cadena ligera, con o sin una secuencia líder. En algunas modalidades, una cadena ligera comprende al menos una parte de una región constante de cadena ligera. La expresión «cadena ligera de longitud completa» hace referencia a un polipéptido que comprende una región variable de cadena

ligera y una región constante de cadena ligera, con o sin una secuencia líder.

La expresión «**región hipervariable**» o «**HVR**» hace referencia a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en la secuencia y/o forman bucles definidos desde el punto de vista estructural («bucles hipervariables»). Por lo general, los anticuerpos de cuatro cadenas naturales comprenden seis HVR; tres en el V_H (H1, H2, H3) y tres en el V_L (L1, L2, L3). Por lo general, las HVR comprenden residuos de aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las «**regiones de determinación de la complementariedad**» («**CDR**»), donde estas últimas tienen la variabilidad de secuencia más alta y/o participan en el reconocimiento del antígeno. Los ejemplos de bucles hipervariables se producen en los residuos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3). (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987).) Los ejemplos de CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) se producen en los residuos de aminoácidos 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 y 95-102 de H3. (Kabat et ál., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Las expresiones «regiones hipervariables» (HVR, por sus siglas en inglés) y «regiones de determinación de

la complementariedad» (CDR) hacen referencia ambas a partes de la región variable que forman las regiones de unión al antígeno.

5 Un «**anticuerpo quimérico**», tal como se usa en la presente, hace referencia a un anticuerpo que comprende al menos una región variable de una primera especie (tal como ratones, ratas, macacos cangrejeros, etc.) y al menos una región constante de una segunda especie (tal como seres humanos,
10 macacos cangrejeros, etc.). En algunas modalidades, un anticuerpo quimérico comprende al menos una región variable de ratón y al menos una región constante humana. En algunas modalidades, un anticuerpo quimérico comprende al menos una región variable de macaco cangrejero y al menos una región
15 constante humana. En algunas modalidades, un anticuerpo quimérico comprende al menos una región variable de rata y al menos una región constante de ratón. En algunas modalidades, todas las regiones variables de un anticuerpo quimérico son de una primera especie y todas las regiones
20 constantes del anticuerpo quimérico son de una segunda especie.

Un «**anticuerpo humanizado**», tal como se usa en la presente, hace referencia a un anticuerpo donde al menos un
25 aminoácido en una región marco de una región variable no

humana se ha remplazado con el aminoácido correspondiente de una región variable humana. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado comprende al menos una región constante humana o fragmento de esta. En algunas
5 modalidades, un anticuerpo humanizado es un Fab, un scFv, un (Fab')₂, etc.

Un «**anticuerpo humano**», tal como se usa en la presente, hace referencia a anticuerpos producidos en seres humanos,
10 anticuerpos producidos en animales no humanos que comprenden genes de inmunoglobulina humana, tales como XenoMouse®, y anticuerpos seleccionados mediante el uso de métodos in vitro, tales como la expresión en fagos, donde el repertorio de anticuerpos se basa en secuencias de
15 inmunoglobulina humana.

La expresión «**secuencia líder**» hace referencia a una secuencia de residuos de aminoácidos ubicados en el extremo N de un polipéptido que facilita la secreción de un
20 polipéptido de una célula de un mamífero. Una secuencia líder puede escindirse a partir de la exportación del polipéptido de la célula del mamífero, formando una proteína madura. Las secuencias líder pueden ser naturales o sintéticas, y pueden ser heterólogas u homólogas con
25 respecto a la proteína a la que están unidas. Los ejemplos

no taxativos de secuencias líder también incluyen secuencias líder de proteínas heterólogas. En algunas modalidades, un anticuerpo carece de una secuencia líder. En algunas modalidades, un anticuerpo comprende al menos una secuencia líder, que puede seleccionarse de entre secuencias líder de anticuerpo natural y secuencias líder heterólogas.

El término «**aislada**», tal como se usa en la presente, hace referencia a una molécula que se ha separado de al menos algunos de los componentes con los que se encuentra normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, se hace referencia a un polipéptido como «aislado» cuando se separa de al menos algunos de los componentes de la célula en la que se produjo. En el caso de que una célula secrete un polipéptido después de la expresión, se considera que la separación física del sobrenadante que contiene el polipéptido de la célula que lo produjo implica «aislar» el polipéptido. De manera similar, se hace referencia a un polinucleótido como «aislado» cuando no es parte del polinucleótido más grande (tal como, por ejemplo, ADN genómico o ADN mitocondrial, en el caso de un polinucleótido de ADN) donde se encuentra normalmente en la naturaleza, o se separa de al menos algunos de los componentes de la célula en la que se produjo, p. ej., en

el caso de un polinucleótido de ARN. Por lo tanto, se puede hacer referencia a un polinucleótido de ADN contenido en un vector dentro de una célula hospedadora como «aislado», siempre y cuando ese polinucleótido no se encuentre en ese
5 vector en la naturaleza.

El término «**reducir**» o «**reduce**», cuando se aplica a un parámetro tal como el volumen tumoral, hace referencia a la disminución del nivel de ese parámetro de una manera
10 observable y medible. En algunas modalidades, la reducción puede ser de al menos un 10 %, tal como al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 % o al menos un 50 %. En algunas modalidades, la reducción puede ser estadísticamente significativa en comparación con un
15 tratamiento o control alternativo.

Los términos «**sujeto**» y «**paciente**» se usan de manera intercambiable en la presente para hacer referencia a un ser humano. En algunas modalidades, también se proporcionan
20 métodos de tratamiento de otros mamíferos que incluyen, de modo no taxativo, roedores, simios, felinos, caninos, equinos, bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, animales de laboratorio mamíferos, animales de granja mamíferos, animales mamíferos utilizados en deportes y mascotas
25 mamíferas.

Las expresiones «**resistente**» o «**sin respuesta**», cuando se usan en el contexto de un tratamiento con un agente terapéutico, hacen referencia a que el sujeto muestra una
5 respuesta disminuida o una falta de respuesta a una dosis estándar del agente terapéutico, con respecto a la respuesta del sujeto a la dosis estándar del agente terapéutico en el pasado, o con respecto a la respuesta esperada de un sujeto similar con un trastorno similar a la
10 dosis estándar del agente terapéutico. Por lo tanto, en algunas modalidades, un sujeto puede ser resistente al agente terapéutico aunque el sujeto no haya recibido previamente el agente terapéutico, o el sujeto puede desarrollar resistencia al agente terapéutico después de
15 haber respondido al agente en una o más ocasiones anteriores.

El término «**muestra**», tal como se usa en la presente, hace referencia a una composición que se obtiene o deriva de un
20 sujeto que contiene una entidad celular y/u otra entidad molecular que se haya de caracterizar, cuantificar y/o identificar, por ejemplo, en función de características físicas, bioquímicas, químicas y/o fisiológicas. Un ejemplo de muestra es una muestra de tejido.

La expresión «**muestra de tejido**» hace referencia a una recolección de células similares obtenidas de un tejido de un sujeto. La fuente de la muestra de tejido puede ser un tejido sólido, tal como un aspirado o una biopsia o una muestra de tejido u órgano recién obtenidos, congelados y/o conservados; sangre o cualquier constituyente de la sangre; fluidos corporales tales como líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, líquido peritoneal, líquido sinovial o líquido intersticial; células de cualquier momento de la gestación o el desarrollo del sujeto. En algunas modalidades, una muestra de tejido es una muestra de tejido de biopsia sinovial y/o una muestra de líquido sinovial. En algunas modalidades, una muestra de tejido es una muestra de líquido sinovial. La muestra de tejido también puede consistir en líneas celulares o células cultivadas o primarias. Opcionalmente, la muestra de tejido se obtiene de un tejido/órgano enfermo. La muestra de tejido puede contener compuestos que no se entremezclen de manera natural con el tejido tales como conservantes, anticoagulantes, soluciones amortiguadoras, fijadores, nutrientes, antibióticos, o similares. Una «muestra de control» o un «tejido de control», tal como se usa en la presente, hace referencia a una muestra, una célula o un tejido que se obtiene de una fuente que se sabe o se considera que no están afectados por la enfermedad por la

cual se está tratando el sujeto.

A los efectos de la presente, un «**corte**» de una muestra de tejido hace referencia a una parte o pieza de una muestra
5 de tejido, tal como un corte delgado de tejido o células extraído de una muestra de tejido sólido.

El término «**cáncer**» se usa en la presente para hacer referencia a un grupo de células que presentan niveles
10 anormalmente altos de proliferación y desarrollo. Un cáncer puede ser benigno (al que también se hace referencia como «tumor benigno»), premaligno o maligno. Las células cancerosas pueden ser células cancerosas sólidas (es decir, «**tumores sólidos**») o pueden ser células cancerosas
15 leucémicas. La expresión «**crecimiento del cáncer**» se usa en la presente para hacer referencia a la proliferación o el crecimiento de una célula o células que conforman un cáncer que conduce a un aumento correspondiente del tamaño o la extensión del cáncer.

20

Los ejemplos de cáncer incluyen, de modo taxativo, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos no taxativos más particulares de esos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer pulmonar
25 microcítico, cáncer pituitario, cáncer de esófago,

astrocitoma, sarcoma de tejido blando, cáncer pulmonar no microcítico (lo cual incluye cáncer pulmonar no microcítico de células escamosas), adenocarcinoma pulmonar, carcinoma escamoso pulmonar, cáncer peritoneal, cáncer hepatocelular, 5 cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o de útero, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de 10 riñón, carcinoma de células renales, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, cáncer cerebral, cáncer de endometrio, cáncer testicular, colangiocarcinoma, carcinoma de vesícula biliar, cáncer gástrico, melanoma y diversos tipos de 15 cáncer de cabeza y cuello (lo cual incluye el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello).

El «**tratamiento**», tal como se usa en la presente, hace referencia al tratamiento terapéutico y medidas 20 profilácticas o preventivas, donde el objeto consiste en impedir o enlentecer (reducir) la afección o el trastorno patológico objetivo. En determinadas modalidades, el término «**tratamiento**» abarca cualquier administración o aplicación de un producto terapéutico para una enfermedad 25 en un mamífero, incluido un ser humano, e incluye inhibir o

enlentecer la enfermedad o la progresión de la enfermedad;
aliviar de manera parcial o completa la enfermedad, por
ejemplo, al provocar la regresión, o restaurar o reparar
una función perdida, ausente o defectuosa; estimular un
5 proceso ineficiente; o provocar que la meseta de la
enfermedad tenga una gravedad reducida. El término
«**tratamiento**» también incluye reducir la gravedad de
cualquier característica fenotípica y/o reducir la
incidencia, el grado o la probabilidad de esa
10 característica. Las personas que necesitan tratamiento
incluyen aquellas que ya padecen el trastorno, así como
aquellas propensas a padecer el trastorno o aquellas en las
cuales se desee prevenirlo.

15 El término «**eficacia**», tal como se usa en la presente,
puede determinarse a partir de uno o más parámetros tales
como la supervivencia o la supervivencia sin la enfermedad
durante un período de tiempo tal como 1 año, 5 años o 10
años, así como parámetros tales como la reducción del
20 crecimiento de uno o más tumores en un sujeto. Parámetros
farmacocinéticos tales como la biodisponibilidad y
parámetros subyacentes tales como la velocidad de
depuración también pueden afectar la eficacia. Por lo
tanto, una «eficacia mejorada» (es decir, una mejora de la
25 eficacia) puede deberse a una mejora de los parámetros

farmacocinéticos así como una mejora de la potencia, y puede medirse mediante la comparación de las velocidades de depuración y el crecimiento tumoral en animales de prueba o en sujetos humanos, así como parámetros tales como la supervivencia, la tasa de recurrencia o la supervivencia sin la enfermedad.

La expresión «**cantidad eficaz**» o «**cantidad con eficacia terapéutica**» hace referencia a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto. En determinadas modalidades, una cantidad eficaz hace referencia a una cantidad eficaz, en las dosificaciones y durante los períodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una cantidad con eficacia terapéutica de un ECD de la CD80 o una molécula de fusión al ECD de la CD80 puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, así como la capacidad del fármaco de provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad con eficacia terapéutica abarca una cantidad en la cual todo efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo es superado por los efectos beneficiosos desde el punto de vista terapéutico. En algunas modalidades, la expresión «cantidad eficaz» hace referencia a una cantidad del fármaco que es eficaz para

tratar el cáncer.

La administración «**en combinación con**» uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como un agente que estimule
5 el sistema inmunitario, incluye la administración simultánea (concomitante) y consecutiva (en secuencia) en cualquier orden.

Un «**portador farmacéuticamente aceptable**» hace referencia a
10 un portador, auxiliar de formulación, material encapsulante, diluyente o relleno sólido, semisólido o líquido y no tóxico convencional en la técnica para usar con un agente terapéutico y que, en conjunto, conformen una «**composición farmacéutica**» para la administración a un
15 sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable no es tóxico para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas y es compatible con otros ingredientes de la formulación. El portador farmacéuticamente aceptable es adecuado para la formulación
20 empleada. Por ejemplo, si el agente terapéutico ha de administrarse por vía oral, el portador puede ser una cápsula de gel. Si el agente terapéutico ha de administrarse por vía subcutánea, el portador idealmente no irrita la piel y no provoca una reacción en el sitio de
25 inyección.

Ejemplos del dominio extracelular y moléculas de fusión al dominio extracelular de la CD80

En la presente se proporcionan ECD de la CD80 y moléculas
5 de fusión al ECD de la CD80. Los ECD de la CD80, por
ejemplo, pueden comprender los ECD de la isoforma 1, la
isoforma 2 y la isoforma 3 de la CD80 humana (véanse las
SEQ ID NOs: 1-3. En algunas modalidades, los ECD de la CD80
pueden comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID
10 NO:5.

Las moléculas de fusión al ECD de la CD80 pueden comprender
compañeros de fusión tales como polímeros, polipéptidos,
restos lipofílicos y grupos succinilo. Los ejemplos de
15 compañeros de fusión polipeptídicos incluyen, de modo no
taxativo, la albúmina sérica y un dominio Fc de IgG. Otros
ejemplos de compañeros de fusión poliméricos incluyen, de
modo no taxativo, polietilenglicol, lo cual incluye
polietilenglicoles con cadenas ramificadas y/o lineales.
20 Las secuencias de aminoácidos de determinados ejemplos de
dominios Fc se muestran en las SEQ ID NOs: 9-16 de la
presente.

En determinadas modalidades, el ECD de la CD80 o la
25 molécula de fusión al ECD de la CD80 carece de un péptido

señal. En determinadas modalidades, el ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 incluye al menos un péptido señal, que puede seleccionarse de entre un péptido señal de CD80 natural (SEQ ID NO: 7 o los aminoácidos 1-34 de la SEQ ID NO:1) y/o un péptido señal heterólogo.

En el caso de una molécula de fusión al ECD de la CD80, el compañero de fusión puede enlazarse al extremo amino o el extremo carboxi del polipéptido. En determinadas modalidades, el polipéptido y el compañero de fusión se encuentran enlazados de manera covalente. Si el compañero de fusión también es un polipéptido (el «polipéptido compañero de fusión»), el polipéptido y el polipéptido compañero de fusión pueden ser parte de una secuencia de aminoácidos continua. En esos casos, el polipéptido y el polipéptido compañero de fusión pueden traducirse como un solo polipéptido de una secuencia de codificación que codifique el polipéptido y el polipéptido compañero de fusión. En algunos de esos casos, los dos polipéptidos se enlazan directamente en secuencia de forma tal que el extremo N de un polipéptido siga inmediatamente al extremo C del otro sin ningún aminoácido intermedio. En otros casos, se inserta una secuencia peptídica enlazadora entre los dos polipéptidos, tales como una secuencia enlazadora GS. En determinadas modalidades, un ECD de la CD80 y el

compañero de fusión se encuentran enlazados de manera covalente a través de otros medios, tal como, por ejemplo, un enlace químico que no sea un enlace peptídico. En determinadas modalidades, el polipéptido y el compañero de fusión se encuentran enlazados de manera no covalente. En algunas de esas modalidades, pueden enlazarse, por ejemplo, mediante pares de unión. Los ejemplos de pares de unión incluyen, de modo no taxativo, biotina y avidina o estreptavidina, un anticuerpo y su antígeno, etc.

10

En algunas modalidades, la molécula de fusión al ECD de la CD80 comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 20 o 21.

Según cómo se produzcan, las moléculas de fusión al ECD de la CD80 pueden tener diferentes niveles de modificaciones de glicosilación particulares. Por ejemplo, una molécula de fusión al ECD de la CD80 puede tener diferentes concentraciones de residuos de ácido siálico en relación con la concentración de la proteína del ECD de la CD80. En algunas modalidades, un contenido de ácido siálico más alto puede tener un tiempo de depuración más prolongado en el organismo y, por lo tanto, una mayor biodisponibilidad general. En algunas modalidades, el contenido de ácido siálico de la molécula de fusión al ECD de la CD80 es de 10 a 60 mol de ácido siálico (SA) por mol de proteína. En

algunas modalidades, el contenido de ácido siálico de la molécula de fusión al ECD de la CD80 es de 15 a 60 mol de ácido siálico (SA) por mol de proteína. Por ejemplo, en algunas modalidades, el contenido de SA es de 10-40 mol de SA/mol de proteína, tal como 15-30 mol de SA/mol de proteína, tal como 15-25 mol de SA/mol de proteína, tal como 20-40 mol de SA/mol de proteína, tal como 20-30 mol de SA/mol de proteína, tal como 30-40 mol de SA/mol de proteína, tal como 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido de SA es de al menos 15 mol de SA/mol de proteína, tal como al menos 20 mol de SA/mol de proteína, al menos 25 mol de SA/mol de proteína, al menos 30 mol de SA/mol de proteína, al menos 35 mol de SA/mol de proteína o al menos 40 mol de SA/mol de proteína. En algunas de esas modalidades, el compañero de fusión es un dominio Fc, tal como un dominio Fc de IgG1, IgG2 o IgG4 humana.

En algunas modalidades, el contenido de SA de la molécula de fusión al ECD de la CD80 aumenta o se mantiene en un nivel relativamente alto en comparación con las moléculas de fusión al ECD de la CD80 existentes. En algunas modalidades, un aumento del contenido de SA, tal como de 5, 10, 15, 20, 30, 40 o 50 mol de SA por mol de la proteína del ECD de la CD80, puede conducir a una mejora de la

eficacia en al menos un modelo tumoral singénico o de xenoinjerto de ratón. Por ejemplo, en algunas modalidades, el crecimiento del tumor en un modelo tumoral de ratón puede reducirse de manera adicional en al menos un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % cuando hay un aumento del contenido de SA, tal como de 5, 10, 15, 20, 30, 40 o 50 mol de SA por mol de proteína del ECD de la CD80.

10 Por ejemplo, en algunas modalidades, una molécula de fusión ECD de CD80-Fc, tal como una molécula de fusión que comprende un dominio Fc de IgG1 humana que comprende entre 10 y 60 mol de SA/mol de proteína es capaz de lograr al menos un 80 %, tal como al menos un 90 %, tal como al menos 15 un 95 %, tal como al menos un 98 % de inhibición del desarrollo de células tumorales en al menos un modelo de cáncer singénico o de xenoinjerto de ratón durante un período de al menos diez días o al menos dos semanas o al menos tres semanas, tal como de diez días a dos semanas o 20 de dos a tres semanas luego de la inoculación con células tumorales. En algunas de esas modalidades, la molécula comprende al menos 15 mol de SA/mol de proteína, tal como al menos 20 mol de SA/mol de proteína, o un intervalo de 15-30, 15-25 o 20-30 mol de SA/mol de proteína. En algunas 25 modalidades, el modelo de ratón es un modelo tumoral de

ratón CT26, MC38 o B16. En algunas modalidades, los ratones reciben de una a tres dosis de la molécula a entre 0.3 y 3.0 mg/kg, tal como entre 0.3 y 0.6 mg/kg, por ejemplo, durante un período de una semana, una vez que los tumores han alcanzado un volumen mínimo. En algunas modalidades, el dominio Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:14. En algunas modalidades, la molécula de fusión al ECD de la CD80 comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 20 o 21.

10

En algunas modalidades, la molécula de fusión ECD de CD80-Fc reduce el desarrollo de células tumorales CT26 en los ratones durante un período de al menos diez días o al menos dos semanas o al menos tres semanas, tal como de diez días a dos semanas o de dos a tres semanas, después de la inoculación en un mayor grado que una proteína de fusión ECD de CD80-Fc con la secuencia de aminoácidos idéntica pero un menor nivel de SA por mol de proteína. En algunas modalidades, la molécula de fusión ECD de CD80-Fc reduce el crecimiento de tumores CT26 en los ratones durante un período de al menos diez días o al menos dos semanas, tal como durante diez días a dos semanas o de dos a tres semanas, después de la inoculación en un mayor grado que un anticuerpo anti-CTLA4, tal como el clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4. En algunas de esas modalidades, se administran

15

20

25

dosis de la molécula ECD de CD80-Fc de una a tres veces a 0.3 mg/kg, 0.6 mg/kg o 3.0 mg/kg mientras que se administran dosis del anticuerpo anti-CTLA4 la misma cantidad de veces a 1.5 o 10 mg/kg. En algunas de esas 5 modalidades, el modelo es un modelo tumoral murino CT26, MC38 o B16.

El Ejemplo 6 de la presente, por ejemplo, proporciona datos que muestran que el tratamiento de un modelo tumoral 10 singénico de ratón con una molécula de fusión al ECD de la CD80 con 15 o 20 mol de SA/mol de proteína provocó al menos un 93 % de inhibición del crecimiento tumoral después de una dosis de 0.3 mg/kg, mientras que el mismo tratamiento con una molécula con solamente 5 mol de SA/mol de proteína 15 no inhibió de manera significativa el crecimiento tumoral. De manera similar, una dosis de 0.6 mg/kg de la molécula de fusión al ECD de la CD80 con 15 o 20 mol de SA/mol de proteína provocó una inhibición del crecimiento tumoral del 95 % al 98 %, mientras que el mismo tratamiento con la 20 molécula con 5 mol de SA/mol de proteína inhibió el crecimiento tumoral solamente en un 70 %. (Véase la Figura 6.) Se evaluó el grado de inhibición alrededor de tres semanas luego de la inoculación con los tumores.

25 Además, el Ejemplo 7 de la presente muestra datos sobre una

molécula de fusión ECD de CD80-Fc (un sustituto del ratón) con 20 mol de SA/mol de proteína en tres modelos tumorales singénicos de ratón, los modelos CT26, MC38 y B16 en dosis de 0.3 mg/kg (CT26) o 3.0 mg/kg (MC38 y B16) en comparación con un anticuerpo anti-CTLA4 (clon 9D9) en dosis de 1.5 mg/kg y 10 mg/kg. Se administraron dosis de cada proteína tres veces durante un período de 7 días unos pocos días después de la inoculación con células tumorales, tal como se ilustra en las Figuras 7-9 (las flechas muestran los días de administración de dosis). En cada caso, ECD de CD80-Fc presentó una inhibición del crecimiento tumoral superior con respecto al anticuerpo anti-CTLA4 durante el transcurso del estudio de dos a tres semanas. (Figuras 7-9.) Por ejemplo, en el modelo CT26 el día 21 después de la inoculación con células tumorales, la molécula de fusión ECD de CD80-Fc mostró una reducción del 90 % del crecimiento tumoral en comparación con un 75 % o 53 % para los dos niveles de dosis de anti-CTLA4. En el modelo MC38 el día 19 después de la inoculación, la molécula ECD de CD80-Fc mostró una reducción de alrededor del 80 % en la inhibición del crecimiento tumoral en comparación con solamente un 21 % de crecimiento tumoral para la dosis más alta de anti-CTLA4 y la ausencia de inhibición del crecimiento tumoral para la dosis de anti-CTLA4 más baja. En el modelo B16, la molécula ECD de CD80-Fc mostró un 41 %

de inhibición del crecimiento tumoral el día 13 después de la inoculación mientras que el anticuerpo anti-CTLA4 no inhibió el crecimiento tumoral en ningún nivel de dosis. (Véanse las Figuras 7-9.)

5

En función de estos estudios, una molécula de fusión al ECD de la CD80 pueden ser capaces de lograr un determinado porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral durante un período de tiempo de al menos dos semanas, por ejemplo, alrededor de dos semanas después de que los ratones se han inoculado con las células tumorales, y también luego de la administración de dosis de la molécula de fusión se observa un promedio de inhibición del crecimiento tumoral en el entorno del porcentaje indicado en los ratones tratados.

15 Una molécula de fusión al ECD de la CD80 puede ser capaz de lograr un determinado porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral durante un período de tiempo de dos a tres semanas, por ejemplo, cuando entre dos y tres semanas después de que los ratones se han inoculado con las células tumorales, y también luego de la administración de dosis de la molécula de fusión, se observa un promedio de inhibición del crecimiento tumoral en el entorno del porcentaje indicado en los ratones tratados.

25 Los Ejemplos 6 y 7 también muestran que muchos ratones del

modelo CT26 tratados con la molécula de fusión al ECD de la CD80 tuvieron una regresión tumoral completa durante estos períodos de tiempo de dos a tres semanas. Además, un porcentaje más grande de ratones tuvo una regresión tumoral completa con la molécula de fusión al ECD de la CD80 con un contenido de SA más alto que con los tratamientos de comparación, y un porcentaje más grande de ratones tuvo una regresión tumoral completa con la molécula de fusión al ECD de la CD80 que con un anticuerpo anti-CTLA4. Por lo tanto, en algunas modalidades, el tratamiento con la molécula de fusión al ECD de la CD80, por ejemplo, con entre 0.3 mg/kg y 0.6 mg/kg de la molécula de fusión al ECD de la CD80 o con entre 0.3 mg/kg y 3.0 mg/kg de la molécula de fusión al ECD de la CD80, puede provocar una regresión tumoral completa en los ratones en un modelo singénico o de xenoinjerto tal como CT26, MC38 o B16.

Ejemplos de compañeros de fusión de dominio Fc

En algunas modalidades, la molécula de fusión al ECD de la CD80 tiene un dominio Fc como compañero de fusión. En algunas modalidades, el dominio Fc deriva de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana. En algunas modalidades, el dominio Fc tiene una secuencia de tipo salvaje, tal como una secuencia de IgG1 o IgG2 (p. ej., IgG2a) humana de tipo salvaje. En

otras modalidades, el dominio Fc es una variante natural o modificada. En algunas modalidades, se escoge un dominio Fc que tiene interacciones alteradas del Fc con uno o más receptores de Fc gamma. En algunas modalidades, se escoge un dominio Fc que tiene interacciones alteradas del Fc con uno o más factores de complemento. En algunas modalidades, se escoge un dominio Fc que tiene interacciones alteradas del Fc con uno o más receptores de Fc gamma y que tiene interacciones alteradas con uno o más factores de complemento.

En algunas modalidades, el dominio Fc comprende al menos una mutación puntual tal como se describe en WO 2014/144960. En algunas modalidades, el dominio Fc es un dominio Fc humano con una sustitución en una o más de las posiciones E233, L234, L235, P238, D265, N297, A327, P329 o P331 (donde la numeración de estas posiciones es de acuerdo con el índice EU tal como en Kabat). En algunas modalidades, el dominio Fc es un dominio Fc humano con una mutación en L234, L235 y/o P331. En algunas modalidades, el dominio Fc es un dominio Fc humano con las sustituciones L234F, L235E y P331S. (Véase, p. ej., la SEQ ID NO:12.) En algunas modalidades, el dominio Fc tiene una sustitución de aminoácidos en la posición N297. (Véase, p. ej., la SEQ ID NO: 13.) En algunas modalidades, el dominio Fc comprende

una mutación C237S. (Véase, p. ej., la SEQ ID NO: 9.)

En algunas modalidades, un compañero de fusión Fc mutado provoca que la molécula de fusión ECD de CD80-Fc tenga
5 interacciones alteradas con uno o más receptores de Fc gamma en comparación con las de una molécula de fusión al ECD de la CD80 con la misma secuencia de aminoácidos excepto por las mutaciones del dominio Fc. En algunas modalidades, el Fc tiene una afinidad reducida con respecto
10 a los receptores de Fc gamma tales como FcRN, RI, RIIA, RIIB y/o RIII en comparación con un dominio Fc de tipo salvaje. En algunas modalidades, el Fc tiene una afinidad reducida con respecto a FcRN, RI, RIIA, RIIB y RIII en comparación con un dominio Fc de tipo salvaje.

15

En algunas modalidades, un compañero de fusión Fc mutado provoca que la molécula de fusión ECD de CD80-Fc tenga interacciones alteradas con uno o más factores de complemento tales como C1, C2, C3, C4 y sus productos de
20 escisión, tales como C4a, C4b, C2a, C2b, C3a y C3b. En algunas modalidades, un compañero de fusión Fc mutado provoca que la molécula de fusión ECD de CD80-Fc tenga interacciones alteradas con uno o más factores de complemento en comparación con las de una molécula de
25 fusión al ECD de la CD80 con la misma secuencia de

aminoácidos excepto por las mutaciones del dominio Fc.

En algunas modalidades, el ECD de la CD80 y el compañero de fusión, tal como un compañero de fusión Fc, se encuentran
5 enlazados de manera directa de forma tal que el aminoácido de extremo N o C del Fc preceda o suceda inmediatamente al aminoácido de extremo N o C de la secuencia del ECD de la CD80. (Véanse, p. ej., las SEQ ID NOs: 20 y 21.) En otras modalidades, el ECD de la CD80 y el compañero de fusión se
10 unen mediante una molécula enlazadora, tal como mediante una secuencia peptídica enlazadora, tal como una secuencia enlazadora GS.

Composiciones y métodos terapéuticos

15

Métodos para tratar el cáncer

En algunas modalidades, se proporcionan métodos para tratar el cáncer, que comprenden administrar una cantidad eficaz
20 de un ECD de la CD80 o una molécula de fusión al ECD de la CD80.

En algunas modalidades, el cáncer puede ser benigno (al que también se hace referencia como «tumor benigno»),
25 premaligno o maligno. En algunas modalidades, el cáncer

puede comprender células cancerosas sólidas (es decir, «tumores sólidos») o, de manera alternativa, puede comprender células cancerosas leucémicas. En algunas modalidades, el ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 son eficaces para reducir el crecimiento del cáncer en un sujeto humano o animal, o en un modelo singénico o de xenoinjerto de ratón para el cáncer en tratamiento. En algunas modalidades, el ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 son eficaces para reducir el volumen tumoral, por ejemplo, en un modelo singénico o de xenoinjerto de ratón para el cáncer en tratamiento.

Los ejemplos de cánceres particulares que pueden tratarse incluyen, de modo taxativo, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos no taxativos más particulares de esos cánceres incluyen, de modo no taxativo, cáncer de células escamosas, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pituitario, cáncer de esófago, astrocitoma, sarcoma de tejido blando, cáncer pulmonar no microcítico (lo cual incluye cáncer pulmonar no microcítico de células escamosas), adenocarcinoma pulmonar, carcinoma escamoso pulmonar, cáncer peritoneal, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de

hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o de útero, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, cáncer de hígado, 5 cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, cáncer cerebral, cáncer de endometrio, cáncer testicular, colangiocarcinoma, carcinoma de vesícula biliar, cáncer gástrico, melanoma y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello (lo cual incluye el carcinoma de 10 células escamosas de cabeza y cuello).

En cualquiera de las modalidades de métodos anteriores, el ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 que se administra al sujeto puede inhibir el crecimiento 15 del tumor en un modelo de cáncer singénico de xenoinjerto de ratón durante un período de 1 semana, 10 días, 2 semanas o 3 semanas, por ejemplo, en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al 20 menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 %. En algunas modalidades, la molécula de fusión al ECD de la CD80 puede inhibir el crecimiento del tumor en un modelo tumoral de xenoinjerto de ratón CT26 en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al 25 menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos

un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 % dos semanas o tres semanas después de la inoculación. En algunos de esos casos, se pueden administrar dosis de la molécula de fusión de una a tres veces a entre 0.3 y 3 mg/kg, tal como entre 0.3 y 0.6 mg/kg. En cualquiera de las modalidades de métodos anteriores, la administración del ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 que se administra al sujeto puede reducir el volumen de al menos un tumor en un sujeto humano o animal en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 %, por ejemplo, durante un período de un mes, dos meses, tres meses, seis meses o un año. En algunos casos, la molécula de fusión ECD de CD80-Fc puede ser capaz de provocar la regresión tumoral completa en un modelo tumoral de ratón tal como un modelo CT26, por ejemplo, en una parte significativa de los ratones evaluados, tal como al menos un 40 % o al menos un 50 % de los ratones.

20

En cualquiera de estos métodos, el ECD de la CD80 o la molécula de fusión ECD de CD80-Fc puede ser una ECD de CD80-Fc que comprenda 10-60 mol de SA por mol de proteína ECD de CD80-Fc, tal como 15-60 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido es de 10-40 mol de

SA/mol de proteína, tal como 15-40 mol de SA/mol de proteína, tal como 20-40 mol de SA/mol de proteína, 20-30 mol de SA/mol de proteína, 15-25 mol de SA/mol de proteína, 15-30 mol de SA por mol de proteína o 30-40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido de SA es de al menos 15, tal como al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35 o al menos 40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido de SA es de 15, 20, 25, 30, 35 o 40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1, IgG2 o IgG4 humana. En algunas modalidades, el dominio Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:14. En algunas modalidades, la molécula de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:20 o 21.

15

Tratamientos de combinación con agentes que estimulan el sistema inmunitario que incluyen inhibidores de PD-1/PD-L1

En algunas modalidades, el ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 se administra para tratar uno de los cánceres anteriores en combinación con una cantidad eficaz de al menos un agente que estimula el sistema inmunitario. Los agentes que estimulan el sistema inmunitario pueden incluir, por ejemplo, un fármaco de moléculas pequeñas o un producto biológico. Los ejemplos de

agentes biológicos que estimulan el sistema inmunitario incluyen, de modo no taxativo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, fragmentos de polipéptidos de ligandos o receptores, por ejemplo, que bloquean la unión receptor-
5 ligando, vacunas y citocinas.

En algunas modalidades, el o los agentes que estimulan el sistema inmunitario comprenden un agonista de una molécula estimuladora del sistema inmunitario, lo cual incluye una
10 molécula coestimuladora, mientras que en algunas modalidades el o los agentes que estimulan el sistema inmunitario comprenden un antagonista de una molécula inhibidora del sistema inmunitario, lo cual incluya una molécula coinhibidora. En algunas modalidades, el o los
15 agentes que estimulan el sistema inmunitario comprenden un agonista de una molécula estimuladora del sistema inmunitario, lo cual incluye una molécula coestimuladora, que se encuentra en células inmunitarias, tales como los linfocitos T. En algunas modalidades, el o los agentes que
20 estimulan el sistema inmunitario comprenden un antagonista de una molécula inhibidora del sistema inmunitario, lo cual incluye una molécula coinhibidora, que se encuentra en células inmunitarias, tales como los linfocitos T. En algunas modalidades, el o los agentes que estimulan el
25 sistema inmunitario comprenden un agonista de una molécula

estimuladora del sistema inmunitario, lo cual incluye una molécula coestimuladora, que se encuentra en células involucradas en la inmunidad innata, tales como los linfocitos NK. En algunas modalidades, el o los agentes que
5 estimulan el sistema inmunitario comprenden un antagonista de una molécula inhibidora del sistema inmunitario, lo cual incluye una molécula coinhibidora, que se encuentra en células involucradas en la inmunidad innata, tales como los linfocitos NK. En algunas modalidades, la combinación
10 mejora la respuesta de linfocitos T específica del antígeno en el sujeto tratado y/o mejora la respuesta de inmunidad innata en el sujeto. En algunas modalidades, la combinación provoca una mejora de la respuesta antitumoral en un modelo de cáncer en un animal, tal como un modelo singénico o de
15 xenoinjerto, en comparación con la administración del ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80, o el agente que estimula el sistema inmunitario de manera individual. En algunas modalidades, la combinación provoca una respuesta sinérgica en un modelo de cáncer en un
20 animal, tal como un modelo singénico o de xenoinjerto, en comparación con la administración del ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80, o el agente que estimula el sistema inmunitario de manera individual.

25 En cualquiera de las modalidades de métodos de terapia de

combinación anteriores, la combinación del ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 con el agente que estimula el sistema inmunitario, tal como un inhibidor de PD-1/PD-L1, que se administra al sujeto puede inhibir el crecimiento del tumor en un modelo de cáncer singénico o de xenoinjerto de ratón durante un período de 1 semana, 10 días, 2 semanas o 3 semanas, por ejemplo, en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 %. En cualquiera de las modalidades de métodos de terapia de combinación anteriores, la combinación del ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 con el agente que estimula el sistema inmunitario, tal como un inhibidor de PD-1/PD-L1, que se administra al sujeto puede reducir el volumen de al menos un tumor en el sujeto o en un modelo animal en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70%, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 %, por ejemplo, durante un período de un mes, dos meses, tres meses, seis meses o un año.

En cualquiera de los métodos de terapia de combinación, el ECD de la CD80 o la molécula de fusión ECD de CD80-Fc puede

ser una ECD de CD80-Fc que comprenda 10-60 mol de SA por mol de proteína ECD de CD80-Fc, tal como 15-60 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido es de 10-40 mol de SA/mol de proteína, tal como 15-40 mol de SA/mol de proteína, tal como 20-40 mol de SA/mol de proteína, 20-30 mol de SA/mol de proteína, 15-25 mol de SA/mol de proteína, 15-30 mol de SA por mol de proteína o 30-40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido de SA es de al menos 15, tal como al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35 o al menos 40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido de SA es de 15, 20, 25, 30, 35 o 40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1, IgG2 o IgG4 humana. En algunas modalidades, el dominio Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:14. En algunas modalidades, la molécula de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:20 o 21.

En determinadas modalidades, un agente que estimula el sistema inmunitario se dirige a una molécula estimuladora o inhibidora que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulina (IgSF). Por ejemplo, un agente que estimula el sistema inmunitario puede ser un agente que se dirija (o se una específicamente) a otro miembro de la familia B7 de

polipéptidos. Un agente que estimula el sistema inmunitario puede ser un agente que se dirija a un miembro de la familia TNF de ligandos unidos a la membrana o un receptor coestimulador o coinhibidor que se una específicamente a un miembro de la familia TNF. Los ejemplos de miembros de la familia TNF y TNFR a los que se pueden dirigir los agentes que estimulan el sistema inmunitario incluyen CD40 y CD40L, OX-40, OX-40L, GITR, GITRL, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137 (4-1BB), TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT β R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, Linfotoxina α /TNF β , TNFR2, TNF α , LT β R, Linfotoxina α 1 β 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY y NGFR.

15

En algunas modalidades, un agente que estimula el sistema inmunitario puede comprender (i) un antagonista de una proteína que inhiba la activación de linfocitos T (p. ej., un inhibidor de puntos de control inmunitarios) tales como CTLA4, LAG-3, TIM3, Galectina 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, Galectina-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, B7-H3, B7-H4, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1, TIM-4 y ILT4 y/o puede comprender (ii) un agonista de una proteína que estimule la activación de linfocitos T tal como B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, GITR, GITRL,

25

CD70, CD27, CD40, CD40L, DR3 y CD28H.

En algunas modalidades, un agente que estimula el sistema inmunitario puede comprender un agente que inhiba o sea un antagonista de una citocina que inhiba la activación de linfocitos T (p. ej., IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF y otras citocinas inmunosupresoras) y, en algunas modalidades, un agente que estimula el sistema inmunitario puede comprender un agente que sea un agonista de una citocina, tal como IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 e IFN α (p. ej., la citocina en sí misma), que estimule la activación de linfocitos T. En algunas modalidades, los agentes que estimulan el sistema inmunitario pueden comprender un antagonista de una quimiocina, tal como CXCR2 (p. ej., MK-7123), CXCR4 (p. ej., AMD3100), CCR2 o CCR4 (mogamulizumab).

En algunas modalidades, los agentes que estimulan el sistema inmunitario pueden incluir antagonistas de receptores inhibidores en linfocitos NK o agonistas de receptores activadores en linfocitos NK. Por ejemplo, un ECD de la CD80 o una molécula de fusión al ECD de la CD80 puede combinarse con un antagonista de KIR.

Los agentes que estimulan el sistema inmunitario también pueden incluir agentes que inhiban la señalización de TGF-

β, agentes que mejoren la presentación de antígenos tumorales, p. ej., vacunas de células dendríticas, vacunas celulares con secreción de GM-CSF, oligonucleótidos CpG e imiquimod, o terapias que mejoren la inmunogenicidad de
5 células tumorales (p. ej., antraciclinas).

Los agentes que estimulan el sistema inmunitario también pueden incluir determinadas vacunas tales como vacunas dirigidas a la mesotelina o vacunas contra el cáncer de
10 listeria atenuada, tales como CRS-207.

Los agentes que estimulan el sistema inmunitario también pueden comprender agentes que eliminen o bloqueen linfocitos Treg, tales como agentes que se unan
15 específicamente a CD25.

Los agentes que estimulan el sistema inmunitario también pueden comprender agentes que inhiban una enzima metabólica tal como indoleamina dioxigenasa (IDO), dioxigenasa,
20 arginasa u óxido nítrico sintetasa.

Los agentes que estimulan el sistema inmunitario también pueden comprender agentes que inhiban la formación de adenosina o inhiban el receptor de adenosina A2A.

Los agentes que estimulan el sistema inmunitario también pueden comprender agentes que reviertan/impidan el agotamiento o la anergia de linfocitos T y agentes que desencadenen una activación de la inmunidad innata y/o
5 inflamación en un sitio tumoral.

En algunas modalidades, el agente que estimula el sistema inmunitario puede comprender un agonista de CD40 tal como un anticuerpo agonista de CD40. El ECD de la CD80 o la
10 molécula de fusión al ECD de la CD80 también pueden combinarse con una estrategia de combinación que se dirija a múltiples elementos de la vía inmunitaria, tales como uno o más de los siguientes: al menos un agente que mejore la presentación de antígenos tumorales (p. ej., vacunas de
15 células dendríticas, vacunas celulares con secreción de GM-CSF, oligonucleótidos CpG, imiquimod); al menos un agente que inhiba la regulación inmunitaria negativa, p. ej., mediante la inhibición de la vía de CTLA4 y/o la eliminación o el bloqueo de Treg u otras células
20 inmunosupresoras; una terapia que estimule la regulación inmunitaria positiva, p. ej., con agonistas que estimulen la vía de CD-137, OX-40 y/o GITR y/o estimulen la función efectora de los linfocitos T; al menos un agente que aumente de manera sistemática la frecuencia de linfocitos T
25 antitumorales; una terapia que elimine o inhiba los Tregs,

tales como los Tregs en el tumor, p. ej., mediante el uso de un antagonista de CD25 (p. ej., daclizumab) o mediante la eliminación de microesferas anti-CD25 ex vivo; al menos un agente que afecte la función de las células mieloides supresoras en el tumor; una terapia que mejore la inmunogenicidad de las células tumorales (p. ej., antraciclinas); la transferencia adoptiva de linfocitos T o linfocitos NK, lo cual incluye células con modificaciones genéticas, p. ej., células modificadas mediante receptores de antígenos quiméricos (terapia CAR-T); al menos un agente que inhiba una enzima metabólica tal como indoleamina dioxigenasa (IDO), dioxigenasa, arginasa u óxido nítrico sintetasa; al menos un agente que invierta/impida el agotamiento o la anergia celular; una terapia que desencadene una activación de la inmunidad innata y/o la inflamación en un sitio tumoral; la administración de citocinas estimuladoras del sistema inmunitario o el bloque de citocinas inmunosupresoras.

Por ejemplo, se puede usar un ECD de la CD80 o una molécula de fusión al ECD de la CD80 con uno o más agentes agonistas que se ligen a receptores coestimuladores positivos; uno o más antagonistas (agentes de bloqueo) que atenúen la señalización a través de receptores inhibidores, tales como antagonistas que superen distintas vías inmunosupresoras

dentro del microentorno del tumor; uno o más agentes que aumenten de manera sistemática la frecuencia de células inmunitarias antitumorales, tales como los linfocitos T, eliminen o inhiban los Tregs (p. ej., mediante la inhibición de CD25); uno o más agentes que inhiban enzimas metabólicas tales como IDO; uno o más agentes que inviertan/impidan el agotamiento o la anergia de los linfocitos T; y uno o más agentes que desencadenen la activación de la inmunidad innata y/o la inflamación en sitios tumorales.

En una modalidad, el o los agentes que estimulan el sistema inmunitario comprenden un antagonista de CTLA4, tal como un anticuerpo de CTLA4 antagonista. Los anticuerpos de CTLA4 adecuados incluyen, por ejemplo YERVOY (ipilimumab) o tremelimumab.

En algunas modalidades, el o los agentes que estimulan el sistema inmunitario comprenden un antagonista de LAG-3, tal como un anticuerpo de LAG-3 antagonista. Los anticuerpos de LAG-3 adecuados incluyen, por ejemplo, BMS-986016 (WO10/19570, WO14/08218), o IMP-731 o IMP-321 (WO08/132601, WO09/44273).

En algunas modalidades, el o los agentes que estimulan el

sistema inmunitario comprenden un agonista de CD137 (4-1BB), tal como un anticuerpo de CD137 agonista. Los anticuerpos de CD137 incluyen, por ejemplo, urelumab o PF-05082566 (WO12/32433).

5

En algunas modalidades, el o los agentes que estimulan el sistema inmunitario comprenden un agonista de GITR, tal como un anticuerpo de GITR agonista. Los anticuerpos de GITR adecuados incluyen, por ejemplo, TRX-518 (WO06/105021, 10 WO09/009116), MK-4166 (WO11/028683) o un anticuerpo de GITR que se describe en WO2015/031667.

En algunas modalidades, el o los agentes que estimulan el sistema inmunitario comprenden un agonista de OX40, tal 15 como un anticuerpo de OX40 agonista. Los anticuerpos de OX40 adecuados incluyen, por ejemplo, MEDI-6383, MEDI-6469 o MOXR0916 (RG7888; WO06/029879).

En algunas modalidades, el o los agentes que estimulan el 20 sistema inmunitario comprenden un agonista de CD27, tal como un anticuerpo de CD27 agonista. Los anticuerpos de CD27 adecuados incluyen, por ejemplo, varlilumab (CDX-1127).

25 En algunas modalidades, el o los agentes que estimulan el

sistema inmunitario comprenden MGA271, que se dirige a B7H3 (WO11/109400).

En algunas modalidades, el o los agentes que estimulan el
5 sistema inmunitario comprenden un antagonista de KIR, tal como lirilumab.

En algunas modalidades, el o los agentes que estimulan el sistema inmunitario comprenden un antagonista de IDO. Los
10 antagonistas de IDO incluyen, por ejemplo, INCB-024360 (WO2006/122150, WO07/75598, WO08/36653, WO08/36642), indoximod, NLG-919 (WO09/73620, WO09/1156652, WO11/56652, WO12/142237) o F001287.

15 En algunas modalidades, el o los agentes que estimulan el sistema inmunitario comprenden un agonista de receptores tipo Toll, p. ej., un agonista de TLR2/4 (p. ej., Bacillus Calmette-Guerin); un agonista de TLR7 (p. ej., Hiltonol o Imiquimod); un agonista de TLR7/8 (p. ej., Resiquimod); o
20 un agonista de TLR9 (p. ej., CpG7909).

En algunas modalidades, el o los agentes que estimulan el sistema inmunitario comprenden un inhibidor de TGF- β , p. ej., GC1008, LY2157299, TEW7197 o IMC-TR1.

En algunas modalidades, el ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 se administra para tratar uno de los cánceres anteriores en combinación con una cantidad eficaz de un inhibidor de PD-1/PD-L1.

5

Ejemplos de inhibidores de PD-1/PD-L1

Los inhibidores de PD-1/PD-L1 incluyen anticuerpos, proteínas de fusión y péptidos. Un ejemplo no taxativo de
10 proteína de fusión que es un inhibidor de PD-1/PD-L1 es AMP-224 (Amplimmune, GlaxoSmithKline). Un ejemplo no taxativo de péptido que es un inhibidor de PD-1/PD-L1 es AUR-012. Otros ejemplos de inhibidores de PD-1/PD-L1 incluyen anticuerpos que inhiben la PD-1, tales como
15 anticuerpos anti-PD-1 y anticuerpos anti-PD-L1. Esos anticuerpos pueden ser anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de ratón y anticuerpos humanos.

En algunas modalidades, la combinación provoca una mejora
20 de la respuesta antitumoral en un modelo de cáncer en un animal, tal como un modelo de xenoinjerto, en comparación con la administración del ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80, o un inhibidor de PD-1/PD-L1 de manera individual. En algunas modalidades, la combinación
25 provoca una respuesta sinérgica en un modelo de cáncer en

un animal, tal como un modelo de xenoinjerto, en comparación con la administración del ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80, o un inhibidor de PD-1/PD-L1 de manera individual.

5

La PD-1 es un receptor de puntos de control inmunitarios esencial expresado por linfocitos T y B activados y media la inmunosupresión. La PD-1 pertenece a la familia CD28 de receptores, que incluye CD28, CTLA4, ICOS, PD-1 y BTLA. Se han identificado dos ligandos de glicoproteínas de la superficie celular para la PD-1, el ligando de muerte programada 1 (PD-L1) y el ligando de muerte programada 2 (PD-L2). Estos ligandos se expresan en células que presentan antígenos así como muchos cánceres humanos y se ha demostrado que ejercen una regulación negativa de la activación de los linfocitos T y la secreción de citocinas al unirse a la PD-1. La inhibición de la interacción PD-1/PD-L1 media la actividad antitumoral potente en modelos preclínicos.

20

En la patente estadounidense n.º 8,008,449 se han descrito anticuerpos monoclonales humanos (HuMAbs) que se unen específicamente a la PD-1 con una afinidad alta. Otros mAbs anti-PD-1 se han descrito, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º 6,808,710, 7,488,802, 8,168,757 y

25

8,354,509, y la publicación PCT n.º WO 2012/145493. Cada uno de los HuMAbs anti-PD-1 que se describen en la patente estadounidense n.º 8,008,449: (a) se une a la PD-1 humana con una K_D de 1×10^{-7} M o menos, según se determina
5 mediante resonancia de plasmones superficiales mediante el uso de un sistema de biosensor Biacore; (b) no se une sustancialmente a ICOS, CTLA-4 o CD28 humana; (c) aumenta la proliferación de los linfocitos T en un ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR, por sus siglas en
10 inglés); (d) aumenta la producción de interferón- γ en un ensayo de MLR; (e) aumenta la secreción de IL-2 en un ensayo de MLR; (f) se une a la PD-1 humana y PD-1 del macaco cangrejero; (g) inhibe la unión del PD-L1 y/o PD-L2 a la PD-1; (h) estimula respuestas de memoria específicas
15 del antígeno; (i) estimula respuestas de los anticuerpos; y/o (j) inhibe el desarrollo de células tumorales *in vivo*. Los anticuerpos anti-PD-1 que se pueden usar en la presente invención incluyen anticuerpos que se unen específicamente a la PD-1 humana y presentan al menos una, al menos dos, al
20 menos tres, al menos cuatro o al menos cinco de las características anteriores (a) a (j).

En una modalidad, el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab. El nivolumab (también conocido como «Opdivo®»; designado
25 anteriormente 5C4, BMS-936558, MDX-1106 o ONO-4538) es un

anticuerpo inhibidor de los puntos de control inmunitarios de PD-1 de IgG4 completamente humano (S228P) que impide de manera selectiva la interacción con los ligandos de PD-1 (PD-L1 y PD-L2), mediante lo cual se bloquea la regulación negativa de funciones de los linfocitos T antitumorales (patente estadounidense n.º 8,008,449; Wang et ál., 2014 *Cancer Immunol Res.* 2(9):846-56).

En otra modalidad, el anticuerpo anti-PD-1 es pembrolizumab. El pembrolizumab (también conocido como «Keytruda®», lambrolizumab y MK-3475) es un anticuerpo de IgG4 monoclonal humanizado dirigido contra el receptor de la superficie celular humano PD-1 (muerte programada-1 o muerte celular programada-1). El pembrolizumab se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 8,900,587; véase también el sitio con la dirección: «www» punto «cáncer» punto «gov» barra «drugdictionary?cdrid=695789» (último acceso: 14 de diciembre de 2014). El pembrolizumab ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento del melanoma recidivante o refractario.

En otras modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 es MEDI0608 (anteriormente AMP-514), que es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de PD-1. El MEDI0608 se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 8,609,089,B2 o en

www «punto» cáncer «punto» gov «barra»
drugdictionary?cdrid=756047 (último acceso: 14 de diciembre
de 2014).

- 5 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 es
Pidilizumab (CT-011), que es un anticuerpo monoclonal
humanizado. El Pidilizumab se describe en la patente
estadounidense n.º 8,686,119 B2 o WO 2013/014668 A1.
- 10 Los anticuerpos anti-PD-1 que se pueden usar en los métodos
descritos también incluyen anticuerpos aislados que se unen
específicamente a la PD-1 humana y ejercen una competencia
cruzada por la unión a la PD-1 humana con nivolumab (véase,
p. ej., la patente estadounidense n.º 8,008,449; WO
15 2013/173223). La capacidad de los anticuerpos de ejercer
una competencia cruzada por la unión a un antígeno indica
que estos anticuerpos se unen a la misma región de epítipo
del antígeno y obstaculizan estéricamente la unión de otros
anticuerpos en competencia cruzada a esa región de epítipo
20 particular. Se espera que estos anticuerpos en competencia
cruzada tengan propiedades funcionales muy similares a las
del nivolumab en virtud de su unión a la misma región de
epítipo de la PD-1. Los anticuerpos en competencia cruzada
pueden identificarse fácilmente en función de su capacidad
25 de ejercer una competencia cruzada con el nivolumab en

ensayos de unión a PD-1 estándares tales como el análisis de Biacore, ensayos ELISA o la citometría de flujo (véase, p. ej., WO 2013/173223).

5 En determinadas modalidades, los anticuerpos que ejercen una competencia cruzada por la unión a la PD-1 humana con, o se unen a la misma región de epítipo de la PD-1 humana que, el nivolumab son anticuerpos monoclonales. Para la administración a sujetos humanos, estos anticuerpos en
10 competencia cruzada pueden ser anticuerpos quiméricos, o pueden ser anticuerpos humanizados o humanos.

Los anticuerpos anti-PD-1 que se pueden usar en los métodos de la invención descrita también incluyen partes de unión
15 al antígeno de los anticuerpos anteriores. Los ejemplos incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados mediante un puente disulfuro en la
20 región bisagra; (iii) un fragmento F_d que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; y (iv) un fragmento F_v que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo.

Administración de los ECD de la CD80 o proteínas de fusión
25 **a los ECD de la CD80 en combinación con agentes que**

estimulan el sistema inmunitario o inhibidores de PD-1/PD-L1

En algunas modalidades, se administra al mismo tiempo el
5 ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 y
el agente que estimula el sistema inmunitario o el
inhibidor de PD-1/PD-L1. En algunas modalidades, se
administra en secuencia el ECD de la CD80 o la molécula de
fusión al ECD de la CD80 y el agente que estimula el
10 sistema inmunitario o el inhibidor de PD-1/PD-L1. En
algunas modalidades, se administra al menos una, al menos
dos, al menos tres dosis, al menos cinco dosis o al menos
diez dosis de un ECD de la CD80 o una molécula de fusión a
la CD80 antes de la administración de un agente que
15 estimula el sistema inmunitario o el inhibidor de PD-1/PD-
L1. En algunas modalidades, se administra al menos una, al
menos dos, al menos tres dosis, al menos cinco dosis o al
menos diez dosis de un agente que estimula el sistema
inmunitario o inhibidor de PD-1/PD-L1 antes de la
20 administración de un ECD de la CD80 o molécula de fusión a
la CD80. En algunas modalidades, la última dosis del agente
que estimula el sistema inmunitario o inhibidor de PD-1/PD-
L1 se administra al menos un, dos, tres, cinco días o diez,
o una, dos, tres, cinco, doce o veinticuatro semanas antes
25 de la primera dosis del ECD de la CD80 o la molécula de

fusión a la CD80. En alguna otra modalidad, la última dosis del ECD de la CD80 o la molécula de fusión a la CD80 se administra al menos un, dos, tres, cinco días o diez, o una, dos, tres, cinco, doce o veinticuatro semanas antes de la primera dosis del agente que estimula el sistema inmunitario o inhibidor de PD-1/PD-L1. En algunas modalidades, un sujeto ha recibido, o recibe, una terapia con el inhibidor de PD-1/PD-L1 o un agente que estimula el sistema inmunitario, y se añade un ECD de la CD80 o una molécula de fusión a la CD80 al régimen terapéutico.

En algunas modalidades, el sujeto responde de manera inadecuada a un agente que estimula el sistema inmunitario o un inh de PD-1/PD-L1 (es decir, muestra resistencia a uno o más agentes que estimulan el sistema inmunitario o inhibidores de PD-1/PD-L1). Un sujeto que responde de manera inadecuada al inhibidor de PD-1/PD-L1, por ejemplo, puede haber respondido anteriormente a un inhibidor de PD-1/PD-L1, pero puede haber comenzado a presentar una menor respuesta al inhibidor de PD-1/PD-L1, o el sujeto puede no haber respondido nunca al inhibidor de PD-1/PD-L1. La respuesta inadecuada a un agente que estimula el sistema inmunitario o el inhibidor de PD-1/PD-L1 significa que aspectos de la afección que se esperaría que mejoraran luego de una dosis estándar del inhibidor de PD-1/PD-L1 no

mejoran y/o la mejora solamente se produce si se administra una dosis mayor que la estándar. En algunas modalidades, una persona que responde de manera inadecuada a un agente que estimula el sistema inmunitario o un inhibidor de PD-1/PD-L1 ha experimentado, o experimenta, una respuesta inadecuada al fármaco después de recibir una dosis estándar durante al menos dos semanas, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos seis semanas o al menos doce semanas. Una dosis «estándar» de un agente que estimula el sistema inmunitario o un inhibidor de PD-1/PD-L1 puede ser determinada por un profesional médico y puede depender de la edad, el peso y la historia clínica del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la frecuencia de la administración de dosis, etc. En algunas modalidades, una persona que responde de manera inadecuada a un agente que estimula el sistema inmunitario o un inhibidor de PD-1/PD-L1 ha experimentado, o experimenta, una respuesta inadecuada a un anticuerpo anti-PD-1 y/o un anticuerpo anti-PD-L1. En algunas modalidades, una persona que responde de manera inadecuada a un inhibidor de PD-1/PD-L1 ha experimentado, o experimenta, una respuesta inadecuada a AMP-224. En algunas modalidades, una persona que responde de manera inadecuada a un inhibidor de PD-1/PD-L1 ha experimentado, o experimenta, una respuesta inadecuada a un inhibidor de PD-1/PD-L1 seleccionado de entre nivolumab,

pidilizumab y pembrolizumab.

En cualquiera de las modalidades anteriores, la combinación del ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 con el inhibidor de PD-1/PD-L1 que se administra al sujeto puede inhibir el crecimiento del tumor en un modelo de cáncer singénico o de xenoinjerto de ratón durante un período de 1 semana, 10 días o 2 semanas, por ejemplo, en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 %. En cualquiera de las modalidades de métodos de terapia de combinación anteriores, la combinación del ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80 con el inhibidor de PD-1/PD-L1, que se administra al sujeto puede reducir el volumen de al menos un tumor en el sujeto o en un modelo animal en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 %, por ejemplo, durante un período de un mes, dos meses, tres meses, seis meses o un año.

En cualquiera de estos métodos de terapia de combinación, el ECD de la CD80 o la molécula de fusión ECD de CD80-Fc

puede ser una ECD de CD80-Fc que comprenda 10-60 mol de SA por mol de proteína ECD de CD80-Fc, tal como 15-60 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido es de 10-40 mol de SA/mol de proteína, tal como 15-40 mol de SA/mol de proteína, tal como 20-40 mol de SA/mol de proteína, 20-30 mol de SA/mol de proteína, 15-25 mol de SA/mol de proteína, 15-30 mol de SA por mol de proteína o 30-40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido de SA es de al menos 15, tal como al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35 o al menos 40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido de SA es de 15, 20, 25, 30, 35 o 40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1, IgG2 o IgG4 humana. En algunas modalidades, el dominio Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:14. En algunas modalidades, la molécula de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:20 o 21.

20 Vías de administración y portadores

En diversas modalidades, los polipéptidos y las moléculas de fusión pueden administrarse *in vivo* a través de diversas rutas, que incluyen, de modo no taxativo, oral, intraarterial, parenteral, intranasal, intravenosa,

intramuscular, intracardiaca, intraventricular, intratraqueal, bucal, rectal, intraperitoneal, intradérmica, tópica, transdérmica e intratecal, o de otro modo mediante implante o inhalación. Las composiciones en
5 cuestión pueden formularse en preparaciones de forma sólida, semisólida, líquida o gaseosa, lo cual incluye, de modo no taxativo, comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, soluciones, supositorios, enemas, inyecciones, inhaladores y aerosoles. Una molécula de ácido nucleico que
10 codifica un polipéptido puede usarse para recubrir micropartículas de oro y suministrarse por vía intradérmica mediante un dispositivo de bombardeo de partículas, o una «pistola de genes» tal como se describe en la bibliografía (véase, por ej., Tang et ál., *Nature* 356:152-154 (1992)).
15 La formulación y la vía de administración adecuadas pueden seleccionarse de acuerdo con la aplicación prevista.

En diversas modalidades, las composiciones que comprenden polipéptidos se proporcionan en formulaciones con una
20 amplia variedad de portadores farmacéuticamente aceptables (véase, p. ej., Gennaro, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus*, 20.^a ed. (2003); Ansel et ál., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7.^a ed., Lippencott
25 Williams y Wilkins (2004); Kibbe et ál., *Handbook of*

Pharmaceutical Excipients, 3.^a ed., Pharmaceutical Press (2000)). Se encuentran disponibles diversos portadores farmacéuticamente aceptables, que incluyen vehículos, adyuvantes y diluyentes. Además, también se encuentran
5 disponibles diversas sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste y amortiguación del pH, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizadores, agentes humectantes y similares. Los ejemplos no taxativos de portadores incluyen solución
10 salina, solución salina amortiguada, dextrosa, agua, glicerol, etanol, y combinaciones de estos.

En diversas modalidades, las composiciones que comprenden polipéptidos y moléculas de fusión pueden formularse para la inyección, lo cual incluye la administración subcutánea,
15 mediante su disolución, suspensión o emulsión en un solvente acuoso o no acuoso, tal como un aceite vegetal o de otro tipo, glicéridos de ácido alifático sintético, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol; y si se desea, con aditivos convencionales tales como
20 solubilizantes, agentes isotónicos, agentes suspensores, agentes emulsionantes, estabilizadores y conservantes. En diversas modalidades, las composiciones pueden formularse para la inhalación, por ejemplo, mediante el uso de propelentes aceptables presurizados tales como
25 diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares. Las

composiciones también pueden formularse, en diversas modalidades, en microcápsulas de liberación sostenida, por ejemplo, con polímeros biodegradables o no biodegradables. Un ejemplo no taxativo de formulación biodegradable incluye polímeros de ácido poliláctico-ácido glicólico. Un ejemplo no taxativo de formulación no biodegradable incluye un éster de ácido graso de poliglicerina. Por ejemplo, en EP 1 125 584 A1, se describen determinados métodos de elaboración de esas formulaciones.

10

También se proporcionan paquetes y kits farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes, cada uno de los cuales contiene una o más dosis de un polipéptido o una combinación de polipéptidos. En algunas modalidades, se proporciona una dosificación unitaria que contiene una cantidad predeterminada de una composición que comprende un polipéptido o una combinación de polipéptidos, con o sin uno o más agentes adicionales. En algunas modalidades, una dosificación unitaria de ese tipo se suministra en una jeringa para inyección llena previamente para un solo uso. En diversas modalidades, la composición contenida en la dosificación unitaria puede comprender solución salina, sacarosa, o similares; una solución amortiguadora, tal como fosfato, o similares; y/o puede formularse dentro de un intervalo de pH estable y eficaz. De manera alternativa, en

algunas modalidades, la composición puede proporcionarse como un polvo liofilizado que puede reconstituirse a partir de la incorporación de un líquido adecuado, por ejemplo, agua estéril. En algunas modalidades, la composición
5 comprende una o más sustancias que inhiben la acumulación de proteínas, lo cual incluye, de modo no taxativo, sacarosa y arginina. En algunas modalidades, una composición de la invención comprende heparina y/o proteoglicano.

10

Las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad eficaz para el tratamiento o la profilaxis de la indicación específica. La cantidad con eficacia terapéutica normalmente depende del peso del sujeto en tratamiento, su
15 condición física o de salud, la extensión de la afección que se ha de tratar o la edad del sujeto en tratamiento. En algunas modalidades, un inhibidor de PD-1/PD-L1, tal como un anticuerpo o una proteína de fusión, se administra con el ECD de la CD80 o la molécula de fusión al ECD de la CD80
20 en una dosis de 1 a 4 mg/kg. En algunas modalidades, un inhibidor de PD-1/PD-L1 se administra en una dosis de 1, 2, 3 o 4 mg/kg.

La determinación de la frecuencia de administración puede
25 ser realizada por expertos en la técnica, tales como un

médico tratante en función de las consideraciones de la afección en tratamiento, la edad del sujeto en tratamiento, la gravedad de la afección en tratamiento, el estado general de salud del sujeto en tratamiento y similares. En algunas modalidades, se administra una dosis eficaz de un ECD de la CD80 o una molécula de fusión al ECD de la CD80 a un sujeto una o más veces. En diversas modalidades, una dosis eficaz se administra al sujeto una vez al mes, menos de una vez al mes, tal como, por ejemplo, cada dos meses o cada tres meses. En otras modalidades, una dosis eficaz se administra más de una vez al mes, tal como, por ejemplo, cada tres semanas, cada dos semanas o una vez a la semana. En algunas modalidades, una dosis eficaz se administra una vez cada 1, 2, 3, 4 o 5 semanas. En algunas modalidades, una dosis eficaz se administra dos tres veces a la semana. Una dosis eficaz se administra al sujeto al menos una vez. En algunas modalidades, la dosis eficaz puede administrarse múltiples veces, incluso durante períodos de al menos un mes, al menos seis meses o al menos un año.

20

Terapias de combinación adicionales

Los ECD de la CD80 o las moléculas de fusión al ECD de la CD80 pueden administrarse de manera individual, con inhibidores de PD-1/PD-L1 y/o con otros modos de

25

tratamiento. Los ECD de la CD80 o las moléculas de fusión al ECD de la CD80 pueden proporcionarse antes, sustancialmente al mismo tiempo o después que otros modos de tratamiento, por ejemplo, cirugía, quimioterapia, radioterapia o la administración de otro producto biológico. En algunas modalidades, el cáncer presenta recurrencia o progresión luego de una terapia seleccionada de entre cirugía, quimioterapia, radioterapia, o una combinación de estas.

10

Para el tratamiento del cáncer, los ECD de la CD80 o las moléculas de fusión al ECD de la CD80 pueden administrarse junto con uno o más agentes adicionales contra el cáncer, tales como un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, un agente antiangiogénico y/o una composición antineoplásica. En las definiciones que siguen se proporcionarán ejemplos no taxativos de agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes antiangiogénicos, agentes contra el cáncer y composiciones antineoplásicas que pueden usarse en combinación con los anticuerpos de la presente invención.

En cualquiera de las modalidades de métodos de terapia de combinación anteriores, la terapia que se administra al sujeto puede inhibir el crecimiento del tumor en un modelo

de cáncer singénico o de xenoinjerto de ratón durante un período de 1 semana, 10 días o 2 semanas, por ejemplo, en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 %. En cualquiera de las modalidades de métodos de terapia de combinación anteriores, la terapia que se administra al sujeto puede reducir el volumen de al menos un tumor en el sujeto o en un modelo animal en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 98 %, por ejemplo, durante un período de un mes, dos meses, tres meses, seis meses o un año.

15

En cualquiera de estos métodos de terapia de combinación adicionales, el ECD de la CD80 o la molécula de fusión ECD de CD80-Fc puede ser una ECD de CD80-Fc que comprenda 10-60 mol de SA por mol de proteína ECD de CD80-Fc, tal como 15-60 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido es de 10-40 mol de SA/mol de proteína, tal como 15-40 mol de SA/mol de proteína, tal como 20-40 mol de SA/mol de proteína, 20-30 mol de SA/mol de proteína, 15-25 mol de SA/mol de proteína, 15-30 mol de SA por mol de proteína o 30-40 mol de SA/mol de proteína. En algunas

25

modalidades, el contenido de SA es de al menos 15, tal como al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35 o al menos 40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el contenido de SA es de 15, 20, 25, 30, 35 o 40 mol de SA/mol de proteína. En algunas modalidades, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1, IgG2 o IgG4 humana. En algunas modalidades, el dominio Fc comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:14. En algunas modalidades, la molécula de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:20 o 21.

Un «**agente quimioterapéutico**» es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, de modo no taxativo, agentes alquilantes tales como tiotepa y la ciclofosfámina Cytosan®; alquilsulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocina, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilolomelamina, acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluido el análogo sintético topotecano); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluidos sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina);

criptoficinas (particularmente, criptoficina 1 y
criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluidos los
análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina;
pancratistatina; una sarcodictiina; espongistatina;
5 mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo,
clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida,
meclore tamina, clorhidrato de óxido de meclore tamina,
melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina,
trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como
10 carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina,
nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los
antibióticos de enediina (p. ej., caliqueamicina,
especialmente caliqueamicina gammaI y caliqueamicina
omegaI1 (véase, p. ej., Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33:
15 183-186 (1994)); dInemicina, incluida la dinemicina A;
bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así
como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos
antibióticos de enediina de cromoproteínas relacionados),
aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina,
20 bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina,
carzinofilina, cromomicinis, dactinomicina, daunorrubicina,
detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, la doxorrubicina
Adriamycin® (lo cual incluye morfolino-doxorrubicina,
cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y
25 desoxidoxorrubicina), epirrubicina, esorrubicina,

idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como
mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina,
olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina,
quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina,
5 estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina,
zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-
fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como
denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato;
análogos de la purina tales como fludarabina, 6-
10 mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de la
pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-
azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina,
doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales
como calusterona, propionato de dromostanolona,
15 epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenales
tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano;
repositores de ácido fólico tales como ácido frolínico;
aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido
aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo;
20 bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina;
diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una
epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea;
lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina
y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol;
25 nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina;

losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; el complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-
5 triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente, la toxina T-2, la verracurina A, la roridina A y la anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido («Ara-C»); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides,
10 p. ej., el paclitaxel Taxol® (Bristol- Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), Abraxane® sin Cremofor, formulación de paclitaxel con nanopartículas modificadas con albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y el docetaxel Taxotere® (Rhône- Poulenc Rorer,
15 Antony, Francia); clorambucilo; la gemcitabina Gemzar®; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos del platino tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; la vinorelbina Navelbine®;
20 novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecán (Camptosar, CPT-11) (incluido el régimen de tratamiento de irinotecán con 5-FU y leucovorina); el inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales
25 como ácido retinoico; capecitabina; combretastatina;

leucovorina (LV); oxaliplatino, incluido el régimen de
tratamiento con oxaliplatino (FOLFOX); inhibidores de PKC-
alfa, Raf, H-Ras, EGFR (p. ej., erlotinib (Tarceva®)) y
VEGF-A que reducen la proliferación celular y sales
5 farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de
cualquiera de los anteriores.

Otros ejemplos no taxativos de agentes quimioterapéuticos
incluyen agentes antihormonales que actúan para regular o
10 inhibir la acción hormonal sobre cánceres tales como
antiestrógenos y moduladores de receptores de estrógenos
selectivos (SERM, por sus siglas en inglés), lo cual
incluye, por ejemplo, tamoxifeno (incluido el tamoxifeno
Nolvadex®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno,
15 trioxifeno, ceoxifeno, LY117018, onapristona y el
toremifeno Fareston®; inhibidores de la aromatasa que
inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de
estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por
ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, el acetato de
20 megestrol Megase®, el exemestano Aromasin®, formestano,
fadrozol, el vorozol Rivisor®, el letrozol Femara® y el
anastrozol Arimidex®; y antiandrógenos tales como
flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y
goserelina; así como troxacitabina (un análogo del
25 nucleósido citosina de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos

antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Ralf y H-Ras; ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (p. ej., la ribozima Angiozyme®) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas tales como vacunas para terapias génicas, por ejemplo, la vacuna Allovectin®, la vacuna Leuvectin® y la vacuna Vaxid®; rIL-2 Proleukin®; el inhibidor de la topoisomerasa 1 Lurtotecan®; 10 rmRH Abarelix®; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Un «**agente antiangiogénico**» o «**inhibidor de la angiogénesis**» hace referencia a una sustancia de peso molecular bajo, un polinucleótido (lo cual incluye, p. ej., 15 un ARN inhibidor (iARN o ARNip)), un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o proteínas de fusión de estos, que inhiben la angiogénesis, vasculogénesis o permeabilidad vascular no deseada, ya sea de manera directa o indirecta. Se debería 20 comprender que el agente antiangiogénico incluye los agentes que se unen al factor angiogénico y su receptor y bloquean su actividad angiogénica. Por ejemplo, un agente antiangiogénico es un anticuerpo u otro antagonista de un 25 agente angiogénico, p. ej., anticuerpos de VEGF-A (p. ej.,

bevacizumab (Avastin®)) o del receptor de VEGF-A (p. ej., el receptor de KDR o receptor de Flt-1), inhibidores anti-PDGFR tales como GLEEVEC® (mesilato de imatinib), moléculas pequeñas que bloquean la señalización del receptor de VEGF (p. ej., PTK787/ZK2284, SU6668, Sutent®/SU11248 (malato de sunitinib), AMG706, o aquellos que se describen en, p. ej., la solicitud de patente internacional WO 2004/113304). Los agentes antiangiogénicos también incluyen inhibidores naturales de la angiogénesis, p. ej., angiostatina, endostatina, etc. Véase, p. ej., Klagsbrun y D'Amore (1991) *Annu. Rev. Physiol.* 53:217-39; Streit y Detmar (2003) *Oncogene* 22:3172-3179 (p. ej., la Tabla 3 enumera una terapia antiangiogénica para el melanoma maligno); Ferrara & Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5(12):1359-1364; Tonini et ál. (2003) *Oncogene* 22:6549-6556 (p. ej., la Tabla 2 enumera factores antiangiogénicos conocidos); y Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-206 (p. ej., la Tabla 1 enumera agentes antiangiogénicos usados en ensayos clínicos).

20

Un «**agente inhibidor del crecimiento**», tal como se usa en la presente, hace referencia a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula (tal como una célula que exprese el VEGF) *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede

25

reducir de manera significativa el porcentaje de células (tal como una célula que exprese el VEGF) en la fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen, de modo no taxativo, agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar que no sea la fase S), tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueadores de la fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II, tales como doxorrubicina, epirrubicina, daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen la G1 también llegan a detener la fase S, por ejemplo, agentes de alquilación de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluoruracilo y ara-C. Se puede encontrar información adicional en Mendelsohn e Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, Capítulo 1, titulado «Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs» de Murakami et ál. (W.B. Saunders, Filadelfia, 1995), p. ej., p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos contra el cáncer derivados del árbol del tejo. El docetaxel (Taxotere®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético del paclitaxel (Taxol®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y

estabilizan microtúbulos al evitar la despolimerización, lo cual genera la inhibición de la mitosis en las células.

La expresión «**composición antineoplásica**» hace referencia a
5 una composición útil en el tratamiento del cáncer que comprende al menos un agente terapéutico activo. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen, de modo no taxativo, p. ej., agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes
10 usados en radioterapia, agentes antiangiogénicos, otros agentes inmunoterapéuticos contra el cáncer además de los inhibidores de PD-1/PD-L1, agentes apoptóticos, agentes antitubulina y otros agentes para tratar el cáncer, tales como anticuerpos anti-HER-2, anticuerpos anti-CD20, un
15 antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés) (p. ej., un inhibidor de la tirosina cinasa), un inhibidor de HER1/EGFR (p. ej., erlotinib (Tarceva®), inhibidores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (p. ej., Gleevec®
20 (mesilato de imatinib)), un inhibidor de COX-2 (p. ej., celecoxib), interferones, inhibidores de CTLA-4 (p. ej., un anticuerpo anti-CTLA ipilimumab (YERVOY®)), inhibidores de PD-L2 (p. ej., anticuerpos anti-PD-L2), inhibidores de TIM3 (p. ej., anticuerpos anti-TIM3), citocinas, antagonistas
25 (p. ej., anticuerpos neutralizadores) que se unen a uno o

más de las siguientes dianas: ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA, PD-L2, CTLA-4, TIM3, o receptor/es de VEGF, TRAIL/Apo2, y otros agentes químicos orgánicos y bioactivos, etc. En la invención también se encuentran
5 incluidas las combinaciones de los anteriores.

EJEMPLOS

Se pretende que los ejemplos descritos a continuación sean
10 únicamente ejemplos de la invención y no se debería considerar que limiten la invención de ningún modo. No se pretende que los ejemplos impliquen que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para asegurar la
15 exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben contemplar algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la
20 temperatura se encuentra en grados centígrados y la presión es atmosférica o similar.

**Ejemplo 1: Una molécula de fusión ECD de CD80-Fc reduce el crecimiento de los tumores en ratones con implantes de la
25 línea de células de carcinoma colorrectal murinas CT26**

Se adquirieron ratones BALB/c hembra de siete semanas de edad a través de Charles River Laboratories (Hollister, CA) y se aclimataron durante dos semanas antes del inicio del estudio. La línea de células de carcinoma colorrectales murinas CT26 se implantó por vía subcutánea a través del flanco derecho de los ratones a 1.0×10^6 células/200 μ L/ratón. Antes de la inoculación, las células se cultivaron durante no más de tres pasajes en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) inactivado por calor al 10 %, L-Glutamina 2 mM. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. Al alcanzar un 80-85 % de confluencia, las células se recolectaron y se volvieron a suspender en una mezcla 1:1 de RPMI 1640 sin suero y Matrigel® a 5×10^6 células por mililitro.

Los ratones se supervisaron dos veces a la semana luego del implante de células para determinar el crecimiento tumoral. Para medir los tumores, se midió la longitud y el ancho de cada tumor mediante el uso de calibres y se calculó el volumen de acuerdo con la fórmula: Volumen tumoral (mm³) = (ancho (mm) x longitud (mm))²/2. El día 7 se midieron todos los tumores y los ratones se distribuyeron de manera aleatoria en grupos de tratamiento. El volumen tumoral

medio para todos los animales ingresados en grupos de tratamiento fue de 175 mm³. Los ratones recibieron la administración de solución salina o ADN plasmídico a través de RIPPSSM. El ADN plasmídico que se administró a través de
5 RIPPSSM contenía la secuencia para el dominio extracelular (ECD) de CD80 o CTLA4 de origen murino así como el dominio Fc de IgG2a humana. Se siguieron midiendo los tumores al menos dos veces a la semana hasta que el volumen tumoral superó el 10 % del peso del animal, o aproximadamente
10 2000 mm³.

El cambio del tamaño de los tumores se muestra mediante una gráfica del volumen tumoral medio con respecto al día a partir del cual se inocularon los animales con células CT26. (**Figura 1a.**) Los RIPPS con el ECD de la CD80 de ratón
15 redujeron de manera significativa el crecimiento tumoral en comparación con el control de solución salina ($p < 0.05$) a partir del día 11. (**Figuras 1a-b.**) Los valores P se calcularon mediante análisis de prueba t de dos colas desapareada de los volúmenes tumorales calculados en cada
20 día del estudio (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Se determinó que la inhibición del crecimiento tumoral mediante el ECD de la CD80 fue del 78.8 % en comparación con el control de solución salina, que se calculó como
25 $100 \times (1 - (\text{cambio medio de volumen tumoral para CD80} / \text{cambio medio de volumen tumoral para solución salina}))$. Tal como

se muestra en la **Figura 1a**, el RIPPS con CTLA4-ECD Fc potenció en los hechos el crecimiento tumoral en comparación con el control de solución salina. Una explicación para este resultado es que la construcción
5 CTLA4-ECD Fc puede haber actuado como una trampa de ligandos para la CD80, impidiendo que la CD80 se una a CD28 y estimulando la actividad de los linfocitos T contra las células tumorales.

**Ejemplo 2: Una molécula de fusión ECD de CD80-Fc en
10 combinación con un anticuerpo anti-PD-1 reduce el crecimiento de los tumores en ratones con implantes de la línea de células de carcinoma colorrectal murinas CT26**

Se adquirieron ratones BALB/c hembra de siete semanas de edad a través de Charles River Laboratories (Hollister, CA)
15 y se aclimataron durante 12 días antes del inicio del estudio. La línea de células de carcinoma colorrectales murinas CT26 se implantó por vía subcutánea a través del flanco derecho de los ratones a 1.0×10^6 células/200
20 μL /ratón. Antes de la inoculación, las células se cultivaron durante no más de tres pasajes en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10 %, L-Glutamina 2 mM. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al
25 5 %. Al alcanzar un 80-85 % de confluencia, las células se

recolectaron y se volvieron a suspender en una mezcla 1:1 de RPMI 1640 sin suero y Matrigel® a 5×10^6 células por mililitro.

5 Los ratones se supervisaron dos veces a la semana luego del implante de células para determinar el crecimiento tumoral. Para medir los tumores, se midió la longitud y el ancho de cada tumor mediante el uso de calibres y se calculó el volumen de acuerdo con la fórmula: Volumen tumoral (mm^3) =
10 (ancho (mm) x longitud (mm))²/2. El día 7 se midieron todos los tumores y los ratones se distribuyeron de manera aleatoria en grupos de tratamiento. El volumen tumoral medio para todos los animales ingresados en grupos de
15 recibieron la administración de ADN plasmídico que codificaba el ECD de la CD80 de ratón más Fc de IgG2a humana o Fc solo (control negativo) a través de RIPPSSM. Se administró proteína para anti-PD1 (Clon RMP1-14) o IgG2a de rata (Clon 2A3, control negativo). Los grupos de
20 administración de dosis fueron los siguientes: 1) Fc RIPPSSM más IgG2a de rata, 2) CD80 RIPPSSM más IgG2a de rata, 3) Fc RIPPSSM más anti-PD1 o 4) CD80 RIPPSSM más anti-PD1. Se siguieron midiendo los tumores al menos dos veces a la semana hasta que el volumen tumoral superó el 10 % del
25 peso del animal, o aproximadamente 2000 mm^3 .

El cambio del tamaño de los tumores se muestra mediante una gráfica del peso tumoral medio para todos los grupos al final del estudio. (**Figura 2a.**) Los RIPPSSM con el ECD de la CD80 de ratón o la administración de anti-PD1 redujeron el crecimiento tumoral en comparación con el control. (**Figuras 2a-b.**) La combinación con RIPPSSM de CD80 y anti-PD1 provocó una reducción significativa del crecimiento tumoral en comparación con la CD80 ($p < 0.01$ después del día 9) o anti-PD-1 ($p < 0.01$ el día 14) de manera individual ($p < 0.05$) a partir de nueve días después del inicio del tratamiento. Los valores p se calcularon mediante análisis de prueba t de dos colas desapareada de los volúmenes tumorales calculados en cada día de medición.

15

Se determinó que la inhibición del crecimiento tumoral (TGI, por sus siglas en inglés) mediante el ECD de la CD80 y anti-PD1 fue del 28.7 % y 41.5 %, respectivamente, en comparación con el control. Se determinó que la TGI mediante la combinación del ECD de la CD80 y anti-PD1 fue del 83 %. (Véase la **Figura 2b.**) La TGI se calculó mediante el uso de la fórmula $100 \times (1 - (\text{media de } \Delta \text{volumen del grupo de tratamiento} / \text{media de } \Delta \text{volumen con solución salina}))$.

25 **Ejemplo 3: Comparación de la actividad de moléculas de**

fusión ECD de CD80-Fc con secuencias de polipéptidos de fusión de Fc de IgG1 humana de tipo salvaje y mutantes

Se adquirieron ratones BALB/c hembra de siete semanas de
5 edad a través de Charles River Laboratories (Hollister, CA)
y se aclimataron durante dos semanas antes del inicio del
estudio. La línea de células de carcinoma colorrectales
murinas CT26 se implantó por vía subcutánea a través del
flanco derecho de los ratones a 1.0×10^6 células/200
10 μL /ratón. Antes de la inoculación, las células se
cultivaron durante no más de tres pasajes en medio RPMI
1640 complementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado
por calor al 10 %, L-Glutamina 2 mM. Las células se
cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al
15 5 %. Al alcanzar un 80-85 % de confluencia, las células se
recolectaron y se volvieron a suspender en una mezcla 1:1
de RPMI 1640 sin suero y Matrigel® a 5×10^6 células por
mililitro.

20 Los ratones se supervisaron dos veces a la semana luego del
implante de células para determinar el crecimiento tumoral.
Para medir los tumores, se midió la longitud y el ancho de
cada tumor mediante el uso de calibres y se calculó el
volumen de acuerdo con la fórmula: Volumen tumoral (mm³) =
25 (ancho (mm) x longitud (mm))²/2. El día 5 se midieron todos

los tumores y los ratones se distribuyeron de manera aleatoria en grupos de tratamiento. El volumen tumoral medio para todos los animales ingresados en grupos de tratamiento fue de 175 mm³. Los ratones recibieron la administración de solución salina o ADN plasmídico a través de RIPPSSM. El ADN plasmídico que se administró a través de RIPPSSM contenía la secuencia para el dominio extracelular (ECD) de CD80 de origen murino con el dominio Fc de IgG1 humana. Se administraron dos clones a través de RIPPSSM, uno con el Fc de IgG1 humana de tipo salvaje (CD80-IgG1 WT) y el otro con este Fc con tres aminoácidos mutados (L234F/L235E/P331S) con el fin de alterar la interacción de Fc con receptores de Fc gamma (CD80-IgG1 MT). Se siguieron midiendo los tumores al menos dos veces a la semana hasta que el volumen tumoral superó el 10 % del peso del animal, o aproximadamente 2000 mm³.

El cambio del tamaño de los tumores se muestra mediante una gráfica del volumen tumoral medio con respecto al día a partir del cual se inocularon los animales con células CT26. (**Figuras 3a-b.**) Los RIPPSSM con CD80-IgG1 WT redujeron de manera significativa el crecimiento tumoral en comparación con el control de solución salina ($p < 0.05$) a partir del día 14. CD80-IgG MT redujo de manera significativa el crecimiento tumoral en comparación con

CD80-IgG1 WT ($p < 0.01$) a partir del día 14. Los valores P se calcularon mediante análisis de prueba t de dos colas desapareada de los volúmenes tumorales calculados en cada día del estudio (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Se determinó que la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) mediante CD80-IgG1 WT fue del 69.4 % en comparación con el control de solución salina, en comparación con la TGI para CD80-IgG1 MT, que se calculó en un 98 %. (Véase la **Figura 3b.**) La TGI se determinó mediante el uso de la fórmula $100 \times (1 - (\Delta \text{volumen del grupo de tratamiento} / \Delta \text{volumen con solución salina}))$.

Ejemplo 4: Efectos de las moléculas de fusión ECD de CD80-Fc con secuencias de polipéptidos de fusión de Fc de IgG1 humana de tipo salvaje y mutantes sobre linfocitos T de infiltración en tumores CT26

Se llevó a cabo un estudio *in vivo* separado para analizar los efectos de CD80-IgG1 WT y CD80-IgG1 MT sobre linfocitos T de infiltración en tumores CT26 en una etapa inicial del tratamiento.

Se adquirieron ratones BALB/c hembra de siete semanas de edad a través de Charles River Laboratories (Hollister, CA) y se aclimataron durante dos semanas antes del inicio del

estudio. La línea de células de carcinoma colorrectales murinas CT26 se implantó por vía subcutánea a través del flanco derecho de los ratones a 1.0×10^6 células/200 μ L/ratón. Antes de la inoculación, las células se
5 cultivaron durante no más de tres pasajes en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10 %, L-Glutamina 2 mM. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. Al alcanzar un 80-85 % de confluencia, las células se
10 recolectaron y se volvieron a suspender en una mezcla 1:1 de RPMI 1640 sin suero y Matrigel® a 5×10^6 células/mL.

Los ratones se supervisaron dos veces a la semana luego del implante de células para determinar el crecimiento tumoral.
15 Para medir los tumores, se midió la longitud y el ancho de cada tumor mediante el uso de calibres y se calculó el volumen de acuerdo con la fórmula: Volumen tumoral (mm³) = (ancho (mm) x longitud (mm))²/2. El día 5 se midieron todos los tumores y los ratones se distribuyeron de manera
20 aleatoria en grupos de tratamiento (n = 5 ratones por grupo). El volumen tumoral medio para todos los animales ingresados en grupos de tratamiento era de 72 mm³. Los ratones recibieron la administración de solución salina, un dominio extracelular (ECD) murino de la CD80 con un Fc de
25 IgG1 humana de tipo salvaje (CD80-IgG1 WT), o un ECD murino

de la CD80 con un Fc de IgG1 humana mutado (CD80-IgG1 MT, mutaciones L234F/L235E/P331S) con el fin de alterar la interacción con receptores de Fc gamma. Los tumores se midieron los días 5 y 11.

5 El día 12, los ratones se sometieron a eutanasia con CO₂ y se perfundieron con solución salina amortiguada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés), pH 7.4. En resumen, se abrió rápidamente el tórax del ratón, y se usó una jeringa con una aguja de calibre 20 para infundir 40 mL de PBS en
10 la aorta a través de una incisión en el ventrículo izquierdo. La sangre y la PBS salieron a través de una abertura en la aurícula derecha. Los tumores se removieron y sumergieron en formalina neutra amortiguada al 10 % en 4 °C. Después de 2 horas, los tejidos se enjuagaron 3 veces
15 en PBS y luego se transfirieron en sacarosa al 30 % en PBS durante la noche. Al día siguiente, los tumores se congelaron en compuesto OCT y se almacenaron a -80 C.

Se realizaron cortes de criostato con 20 µm de grosor. Los
20 cortes se secaron en portaobjetos Superfrost® Plus durante entre 1 y 2 horas. Las muestras se permeabilizaron con PBS que contenía Triton® X-100 al 0.3 % y se incubaron en suero normal de cabra al 5 % en PBS con Triton® X-100 al 0.3 % (solución de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente
25 para bloquear la unión de anticuerpos sin especificidad.

Para detectar linfocitos T, los cortes se incubaron con anti-CD4 de rata (GK1.5/ eBiosciences) y anticuerpo anti-CD3 de conejo (SP7/ Thermo Scientific), ambos diluidos 1:500 en solución de bloqueo durante la noche. Se incubaron 5 muestras de control en suero normal al 5 % en lugar de anticuerpo primario durante el mismo período de tiempo. Después de enjuagarse con PBS que contenía Triton® X-100 al 0.3 %, las muestras se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios antirrata 10 de cabra etiquetados con Alexa® 594 y anticonejo de cabra etiquetados con Alexa® 488 diluidos 1:400 en PBS (Jackson ImmunoResearch). Las muestras se enjuagaron con PBS que contenía Triton® X-100 al 0.3 %, se fijaron en paraformaldehído al 1 % (PFA), se enjuagaron nuevamente con 15 PBS y se montaron en medio de montaje de fluorescencia Vectashield con DAPI (laboratorios Vector).

Las muestras se examinaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot® 2 plus equipado con la cámara 20 AxioCam® HRc. Se recolectaron imágenes representativas para cada grupo experimental que muestran la cantidad y distribución de los linfocitos CD3⁺ y CD4⁺ dentro del tumor, que se muestran en las **Figuras 4a y 4b**.

25 El tratamiento con CD80-IgG1 WT o CD80-IgG1 MT aumentó la

cantidad de linfocitos CD3⁺ y CD4⁺ intratumorales en comparación con la solución salina (**Figuras 4a y 4b**). Si bien la cantidad de linfocitos CD4⁺ fue similar entre los tumores tratados con CD80-IgG1 WT o CD80-IgG1 MT, el tratamiento con CD80-IgG1 MT condujo a un mayor aumento de linfocitos T CD3⁺ de infiltración tumoral en comparación con CD80-IgG1 WT (**Figura 4b**). La relación de linfocitos CD3⁺ con respecto a CD4⁺ aumentó con CD80-IgG1 MT en comparación con CD80-IgG1 WT.

10

Ejemplo 5: Efectos de liberación de citocinas de una molécula de fusión ECD de CD80-Fc

Métodos

15

Tratamientos con proteínas

Una molécula de fusión ECD de CD80-Fc de IgG1 (CD80-Fc) humana se unió a microesferas de proteína A magnéticas (Life Technologies) en medios de proliferación de linfocitos T que contenían RPMI 1640, 100 IU de penicilina/100 ug/mL de estreptomycin, L-Glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 100 nM, 2-mercaptoetanol 55 uM y suero fetal bovino de contenido ultrabajo de IgG al 10 %.

25 Se llevaron a cabo reacciones de unión en placas de cultivo

de tejidos de fondo plano de 96 pocillos con un volumen de 100 uL por pocillo con una concentración de microesferas de 3 millones de microesferas por mL. CD80-Fc se unió a las microesferas con una serie de concentraciones: 10, 1, 5 0.1 ug/mL. También se realizó un conjunto adicional de reacciones de unión con la incorporación de 3 ng/mL de OKT3-scFv. Se dejó que las proteínas se unieran durante 1 hora a temperatura ambiente en una plataforma oscilante, luego de lo cual se añadieron 100 uL de Fc sin IgG1 (FPT) 10 20 ug/mL (concentración final: 10 ug/mL) a cada pocillo y se dejó que se unieran durante una hora adicional con el fin de bloquear cualquier sitio de unión de la Proteína A no ocupado en las microesferas. Luego se lavaron 3 veces las microesferas completamente cargadas y bloqueadas con 15 PBS mediante el uso de un soporte de placas de 96 pocillos magnéticas con el fin de remover las proteínas sin unión. Luego se añadieron 100 uL de linfocitos pan-T humanos en una concentración de 1×10^6 células/mL a cada pocillo de microesferas lavadas secas. Cada condición se analizó por 20 triplicado.

Células

Se aislaron PBMC humanas de sangre enriquecida con aféresis 25 (capas leucocitarias) recolectadas de donantes saludables

~ 18 h antes del aislamiento mediante centrifugación con gradiente de densidad Ficoll® (Biochrom). Luego se aislaron los linfocitos pan-T de las PBMC mediante el uso de un kit de aislamiento de linfocitos pan-T humanos (Miltenyi). Los
5 linfocitos T se cultivaron a una densidad de 1 millón de células/mL en matraces de cultivo de tejidos T225 en medios de proliferación (se describió anteriormente) complementados con 8 ng/mL de IL-2 y el activador de linfocitos T humanos Dynabeads® (Life Tech) a 1
10 microesfera/célula. Luego del cultivo, se suministró de nuevo IL-2 a las células, que se mantuvieron de manera constante a una concentración de 0.3 millones de células/mL mediante la incorporación de medios de proliferación nuevos cada 2 días. Las células se mantuvieron en una incubadora
15 con camisa de agua a 37 °C manteniendo el CO₂ al 5 %. Después de 6 días de expansión, las microesferas activadoras se removieron mediante el uso de un soporte de tubo magnético y se volvieron a suspender las células en una concentración de 1 millón de células/mL en medios de
20 proliferación recién elaborados sin IL-2. 24 horas después, las células se sometieron a ensayo con proteínas inmovilizadas en microesferas de Proteína A.

Mediciones de citocinas

Se midieron los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interferón gamma (IFN- γ) soluble en los sobrenadantes mediante el uso de kits HTRF-ELISA (Cisbio) 24 horas después de que las células se habían tratado con las proteínas inmovilizadas en microesferas de Proteína A de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados

La CD80-Fc inmovilizada en microesferas de manera individual no provocó una activación significativa de linfocitos T humanos, según se midió mediante la producción de citocinas solubles (**Figuras 5a y c**). Sin embargo, cuando se inmovilizó una pequeña cantidad de OKT3-scFv junto con CD80-Fc, se observó una liberación contundente de IFN- γ y TNF- α dependiente de la CD80 (**Figuras 5b y d**). La cantidad de OKT3-scFv usada aquí fue demasiado baja para provocar la estimulación de los linfocitos T por sí sola y, por lo tanto, requirió la presencia de la CD80 como proteína coestimuladora. Por lo tanto, estos resultados confirman que la CD80-Fc usada en este ensayo presentó en efecto actividad biológica.

Si bien la liberación de IFN- γ y TNF- α en este ensayo mostró que la CD80-Fc presentó actividad biológica, una

liberación en exceso de citocinas tales como IFN- γ y TNF- α puede ser perjudicial. Por lo tanto, para comprobar la seguridad del tratamiento con ECD de CD80-Fc, estos resultados se compararon con resultados publicados anteriormente con TGN1412, un anticuerpo anti-CD28 monoclonal que se demostró que era un «superagonista» de linfocitos T y liberaba niveles excesivos y perjudiciales de citocinas tales como IFN- γ y TNF- α en sujetos humanos.

El TGN1412 inmovilizado por sí solo parece tener una potencia significativamente mayor a la hora de inducir la liberación de citocinas de los linfocitos T humanos que la CD80 humana por sí sola. En Findlay et ál., *J. Immunological Methods* 352: 1-12 (2010), se indica que 1 ug/pocillo de TGN1412 provocó una liberación contundente de TNF α , ~ 2000 pg/mL, y en Vessillier et ál., *J. Immunological Methods* 424: 43-52 (2015), se indica que la misma cantidad de TGN1412 provocó IFN- γ contundente, ~ 10000 pg/mL. En nuestro ensayo, la misma cantidad de CD80-Fc inmovilizada no provocó una liberación significativa de ninguna citocina. Estos resultados sugieren que la CD80-Fc es al menos 1000 veces menos potente a la hora de inducir la liberación de citocinas que TGN1412 y, por lo tanto, presenta un riesgo significativamente menor de inducir una tormenta de

citocinas en seres humanos que TGN1412.

Ejemplo 6: Efectos de una molécula de fusión ECD de CD80-Fc en tumores CT26 *in vivo* con dominios Fc con contenido diferente de ácido siálico (SA)

Se llevó a cabo un estudio *in vivo* en tumores CT26 para analizar los efectos de tres lotes diferentes del ECD de la CD80 fusionados con Fc de IgG1 humana de tipo salvaje con diferentes contenidos de ácido siálico (SA). Específicamente, el lote E de ECD de CD80-Fc contiene 20 mol de SA/mol de proteína, el lote D contiene 15 mol de SA/mol de proteína y el lote A contiene 5 mol de SA/mol de proteína.

Se adquirieron ratones BALB/c hembra de siete semanas de edad a través de Charles River Laboratories (Hollister, CA) y se aclimataron durante una semana antes del inicio del estudio. La línea de células de carcinoma colorrectales murinas CT26 se implantó por vía subcutánea a través del flanco derecho de los ratones a 1.0×10^6 células/200 μ l/ratón. Antes de la inoculación, las células se cultivaron durante no más de tres pasajes en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10 %, L-Glutamina 2 mM. Las células se

cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. Al alcanzar un 80-85 % de confluencia, las células se recolectaron y se volvieron a suspender en una mezcla 1:1 de RPMI 1640 sin suero y Matrigel® a 5 x10⁶ células por 5 mililitro.

Se supervisaron los ratones para determinar el crecimiento tumoral dos veces a la semana luego del implante de células. Para medir los tumores, se midió la longitud y el 10 ancho de cada tumor mediante el uso de calibres y se calculó el volumen de acuerdo con la fórmula: volumen tumoral (mm³) = (ancho (mm) x longitud (mm))²/2. El día 7 se midieron todos los tumores y los ratones se distribuyeron de manera aleatoria en siete grupos de 15 tratamiento (n = 10 ratones por grupo experimental). El volumen tumoral medio para todos los animales ingresados fue de 94 mm³. El primer grupo recibió una inyección de 200 µl de PBS (control) por vía intravenosa (o.v.) en la vena de la cola. El segundo grupo recibió una inyección de 20 ECD de CD80-Fc a 20 mol de SA/mol de proteína (lote E) i.v. en dosis de 0.3 mg/kg. El tercer grupo recibió una inyección de ECD de CD80-Fc a 20 mol de SA/mol de proteína (lote E) i.v. en dosis de 0.6 mg/kg. El cuarto grupo recibió una inyección de ECD de CD80-Fc a 15 mol de SA/mol 25 de proteína (lote D) i.v. en dosis de 0.3 mg/kg. El quinto

grupo recibió una inyección de ECD de CD80-Fc a 15 mol de SA/mol de proteína (lote D) i.v. en dosis de 0.6 mg/kg. El sexto grupo recibió una inyección de ECD de CD80-Fc a 5 mol de SA/mol de proteína (lote A) i.v. en dosis de 0.3 mg/kg.

5 El séptimo grupo recibió una inyección de ECD de CD80-Fc a 5 mol de SA/mol de proteína (lote A) i.v. en dosis de 0.6 mg/kg. Los tumores se midieron los días 10, 14, 16, 18, 22 y 24.

10 El tratamiento con ECD de CD80-Fc a 20 mol de SA/mol de proteína (lote E) en dosis de 0.3 o 0.6 mg/kg provocó una inhibición del crecimiento tumoral del 93 % y 98 % en comparación con el control ($P < 0.001$). El tratamiento con ECD de CD80-Fc a 15 mol de SA/mol de proteína (lote D) en

15 dosis de 0.3 o 0.6 mg/kg provocó una inhibición del crecimiento tumoral del 93 % y 95 % en comparación con el control ($P < 0.001$). En comparación, el tratamiento con el lote A de ECD de CD80-Fc a 0.3 mg/kg (con 5 mol de SA/mol de proteína) no inhibió el crecimiento tumoral en

20 comparación con el control y en dosis de 0.6 mg/kg solamente indujo una inhibición del 70 % ($P < 0.001$)

(Figura 6).

El día 37 se analizó la incidencia de ratones sin tumores.

25 El tratamiento con ECD de CD80-Fc a 20 mol/mol de SA (lote

E) en dosis de 0.3 o 0.6 mg/kg condujo a una regresión tumoral completa en 8/10 (80 %) o 10/10 (100 %) de los ratones. El tratamiento con ECD de CD80-Fc a 15 mol/mol de SA (lote D) en dosis de 0.3 o 0.6 mg/kg condujo a una

5 regresión tumoral completa en 9/10 (90 %) de los ratones. En comparación, el lote A de tratamiento con ECD de CD80-Fc en dosis de 0.6 mg/kg indujo la regresión tumoral solamente en 1/10 (10 %) de los ratones, tal como se mostrará en la tabla a continuación.

10

Grupo de tratamiento	Ratones sin tumores el día 37
Solución salina	0 % (0/10 ratones)
ECD de CD80-Fc, SA 20 mol/mol (lote E) a 0.3 mg/kg, 1 dosis	80 % (8/10 ratones)
ECD de CD80-Fc, SA 20 mol/mol (lote E) a 0.6 mg/kg, 1 dosis	100 % (10/10 ratones)
ECD de CD80-Fc, SA 15 mol/mol (lote D) a 0.3 mg/kg, 1 dosis	90 % (9/10 ratones)
ECD de CD80-Fc, SA 15 mol/mol (lote D) a 0.6 mg/kg, 1 dosis	90 % (9/10 ratones)
ECD de CD80-Fc, SA 5 mol/mol (lote A) a 0.3 mg/kg, 1 dosis	0 % (0/10 ratones)
ECD de CD80-Fc, SA 5 mol/mol	10 % (1/10 ratones)

(lote A) a 0.6 mg/kg, 1 dosis	
-------------------------------	--

Ejemplo 7: Efectos de una molécula de fusión ECD de CD80 murina - Fc murino en el crecimiento tumoral en tres modelos tumorales singénicos diferentes

Se llevaron a cabo estudios *in vivo* con un sustituto de ratón que comprendía el dominio extracelular (ECD) de la CD80 murina enlazado al dominio Fc de IgG2a de ratón de tipo salvaje (ECD de CD80-Fc murina). Los efectos de ECD de CD80-Fc murina se compararon con los del clon 9D9 del anticuerpo anti-CTLA4 (IgG2b) en tres modelos tumorales singénicos diferentes: los modelos de carcinoma de colon CT26, carcinoma de colon MC38 y melanoma B16.

Modelo tumoral CT26

Se adquirieron ratones BALB/c hembra de siete semanas de edad a través de Charles River Laboratories (Hollister, CA) y se aclimataron durante una semana antes del inicio del estudio. La línea de células de carcinoma colorrectales murinas CT26 se implantó por vía subcutánea a través del flanco derecho de los ratones a 1.0×10^6 células/200 μ L/ratón. Antes de la inoculación, las células se cultivaron durante no más de tres pasajes en medio RPMI

1640 complementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10 %, L-Glutamina 2 mM. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. Al alcanzar un 80-85 % de confluencia, las células se recolectaron y se volvieron a suspender en una mezcla 1:1 de RPMI 1640 sin suero y matrigel.

Los ratones se supervisaron dos veces a la semana luego del implante de células para determinar el crecimiento tumoral.

10 Para medir los tumores, se midió la longitud y el ancho de cada tumor mediante el uso de calibres y se calculó el volumen de acuerdo con la fórmula: volumen tumoral (mm³) = (ancho (mm) x longitud (mm))²/2. El día 7 se midieron todos los tumores y los ratones se distribuyeron de manera

15 aleatoria en siete grupos de tratamiento (n = 15 ratones por grupo experimental). El volumen tumoral medio para todos los animales ingresados fue de 96 mm³. Los ratones recibieron dosis 3 veces, los días 4, 7 y 11. El primer grupo recibió una inyección de IgG2b de ratón (mIgG2b) i.p.

20 en dosis de 10 mg/kg (control). El segundo grupo recibió una inyección de ECD de CD80-Fc murina, 20 mol/mol de SA i.v. en dosis de 0.3 mg/kg. El tercer grupo recibió una inyección de clon 9D9 de anticuerpo anti-CTLA4 (IgG2b) i.p.

25 en dosis de 1.5 mg/kg. El cuatro grupo recibió una inyección de clon 9D9 de anticuerpo anti-CTLA4 (IgG2b) i.p.

en dosis de 10 mg/kg. Los tumores se midieron los días 10, 13, 17, 19, 21 y 24.

El día 21 (cuando todos los controles seguían en estudio),
5 el tratamiento con ECD de CD80-Fc murina a 20 mol/mol de SA en dosis de 0.3 mg/kg provocó una inhibición del crecimiento tumoral del 90 % en comparación con el control ($P < 0.001$). El tratamiento con anticuerpo anti-CTLA4 a 10 mg/kg provocó una inhibición del crecimiento tumoral del
10 75 % en comparación con el control ($P < 0.001$). En comparación, el tratamiento con anticuerpo anti-CTLA4 a 1.5 mg/kg indujo solamente una inhibición del crecimiento tumoral del 53 % ($P < 0.001$) (**Figura 7**). El día 21, el impacto del tratamiento con ECD de CD80-Fc murina a
15 20 mol/mol de SA en dosis de 0.3 mg/kg sobre el crecimiento tumoral fue significativamente mayor que el del anticuerpo anti-CTLA4 en dosis de 1.5 mg/kg ($P < 0.001$) o 10 mg/kg ($P = 0.009$).

20 El día 37 se analizó la incidencia de ratones sin tumores. El tratamiento con ECD de CD80-Fc murina a 20 mol/mol de SA en dosis de 0.3 mg/kg condujo a una regresión tumoral completa en 7/15 (47 %) de los ratones. El tratamiento con anticuerpo anti-CTLA4 a 10 mg/kg condujo a una regresión
25 tumoral completa en 3/15 (20 %) de los ratones. Ninguno de

los ratones tratados con el anticuerpo anti-CTLA4 a 1.5 mg/kg presentó una regresión tumoral completa.

Modelo tumoral MC38

5

Se adquirieron ratones C57Bl/6 hembra de siete semanas de edad a través de Charles River Laboratories (Hollister, CA) y se aclimataron durante una semana antes del inicio del estudio. La línea de células de carcinoma colorrectales murinas MC38 se implantó por vía subcutánea a través del flanco derecho de los ratones a 0.5×10^6 células/100 μ L/ratón. Antes de la inoculación, las células se cultivaron durante no más de tres pasajes en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10 %, L-Glutamina 2 mM. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. Al alcanzar un 80-85 % de confluencia, las células se recolectaron y se volvieron a suspender en una mezcla 1:1 de RPMI 1640 sin suero y matrigel.

20

Los ratones se supervisaron dos veces a la semana luego del implante de células para determinar el crecimiento tumoral. Para medir los tumores, se midió la longitud y el ancho de cada tumor mediante el uso de calibres y se calculó el volumen de acuerdo con la fórmula: volumen tumoral (mm³) =

25

(ancho (mm) x longitud (mm))²/2. El día 7 se midieron todos los tumores y los ratones se distribuyeron de manera aleatoria en siete grupos de tratamiento (n = 15 ratones por grupo experimental). El volumen tumoral medio para todos los animales ingresados fue de 78 mm³. Los ratones recibieron dosis 3 veces, los días 7, 10 y 14. El primer grupo recibió una inyección de IgG2b de ratón (mIgG2b) i.p. en dosis de 10 mg/kg (control). El segundo grupo recibió una inyección de ECD de CD80-Fc murina, 20 mol/mol de SA i.v. en dosis de 3 mg/kg. El tercer grupo recibió una inyección de clon 9D9 de anticuerpo anti-CTLA4 (IgG2b) i.p. en dosis de 1.5 mg/kg. El cuatro grupo recibió una inyección de clon 9D9 de anticuerpo anti-CTLA4 (IgG2b) i.p. en dosis de 10 mg/kg. Los tumores se midieron los días 11, 14, 17 y 19.

El día 19 (cuando todos los controles seguían en estudio), el tratamiento con ECD de CD80-Fc murina a 20 mol/mol de SA en dosis de 3 mg/kg provocó una inhibición del crecimiento tumoral del 79 % en comparación con el control (P < 0.001). Además, la ECD de CD80-Fc murina a 20 mol/mol de SA tuvo un mayor impacto sobre el crecimiento tumoral en comparación con el anticuerpo anti-CTLA4 (P < 0.001). El tratamiento con anticuerpo anti-CTLA4 a 10 mg/kg redujo el crecimiento tumoral en un 21 % en comparación con el control (P = 0.05)

mientras que a 1.5 mg/kg no afectó de manera significativa el tamaño del tumor (**Figura 8**). El día 21, el impacto del tratamiento con ECD de CD80-Fc murina a 20 mol/mol de SA en dosis de 3 mg/kg sobre el crecimiento tumoral fue significativamente mayor que el del anticuerpo anti-CTLA4 en dosis de 1.5 mg/kg ($P < 0.001$) o 10 mg/kg ($P = 0.009$).

Si bien se usó una dosis de 3 mg/kg de ECD de CD80-Fc para estos experimentos, una dosis de 0.3 mg/kg de ECD de CD80-Fc también redujo el desarrollo de células tumorales en el modelo tumoral MC38 (no se muestran datos).

Modelo tumoral B16

Se adquirieron ratones C57Bl/6 hembra de siete semanas de edad a través de Charles River Laboratories (Hollister, CA) y se aclimataron durante una semana antes del inicio del estudio. La línea de células de melanoma murinas B16-F10 se implantó por vía subcutánea a través del flanco derecho de los ratones a 0.5×10^6 células/100 μ L/ratón. Antes de la inoculación, las células se cultivaron durante no más de tres pasajes en medio DMEM complementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10 %, L-Glutamina 2 mM. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5 %. Al alcanzar un 80-85 % de

confluencia, las células se recolectaron y se volvieron a suspender en una mezcla 1:1 de DMEM sin suero y matrigel.

Los ratones se supervisaron dos veces a la semana luego del
5 implante de células para determinar el crecimiento tumoral.
Para medir los tumores, se midió la longitud y el ancho de cada tumor mediante el uso de calibres y se calculó el volumen de acuerdo con la fórmula: volumen tumoral (mm^3) = (ancho (mm) x longitud (mm))²/2. El día 7 se midieron todos
10 los tumores y los ratones se distribuyeron de manera aleatoria en siete grupos de tratamiento (n = 15 ratones por grupo experimental). El volumen tumoral medio para todos los animales ingresados fue de 70 mm^3 . Los ratones recibieron dosis 3 veces, los días 3, 6 y 10. El primer
15 grupo recibió una inyección de IgG2b de ratón (mIgG2b) i.p. en dosis de 10 mg/kg (control). El segundo grupo recibió una inyección de ECD de CD80-Fc murina, 20 mol/mol de SA i.v. en dosis de 3 mg/kg. El tercer grupo recibió una inyección de clon 9D9 de anticuerpo anti-CTLA4 (IgG2b) i.p.
20 en dosis de 1.5 mg/kg. El cuatro grupo recibió una inyección de clon 9D9 de anticuerpo anti-CTLA4 (IgG2b) i.p. en dosis de 10 mg/kg. Los tumores se midieron los días 10, 13, 15, 16, 17.

25 El día 13 (cuando todos los controles seguían en estudio),

el tratamiento con ECD de CD80-Fc murina a 20 mol/mol de SA en dosis de 3 mg/kg provocó una inhibición del crecimiento tumoral del 41 % en comparación con el control ($P < 0.001$). El tratamiento con anticuerpo anti-CTLA4 a 10 mg/kg o 5 1.5 mg/kg no afectó de manera significativa el crecimiento en comparación con el control (**Figura 9**).

TABLA DE SECUENCIAS

La tabla a continuación proporciona un listado de determinadas secuencias a las que se hace referencia en la presente.

10

15

20

SEQ. ID. NO.	Descripción	Secuencia
1	Secuencia de aminoácidos precursora de la CD80 humana (con secuencia de señal)	MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEV KEVATLSCGHNVSVVEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIW PEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYESVVLKYEKDAF KREHLAEVTLSVKADFPTPSISDFEIPSTNIRRIICSTSGGF PEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDFNMTT NHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTKQEHFPDNLPSWAITLI SVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV
2	Secuencia de aminoácidos precursora de la CD80 de ratón (con secuencia de señal)	MACNCQLMQDTPLLKFCPRLLILFVLLIRLSQVSSDVDEQL SKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKVVL SVIAGK LKVWPEYKNRTLYDNNTTYSLIILGLVLSDRGTYSCVVQKKER GTYESVHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFAS GGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISQLDNF TTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEKPPEDPPDSKNTLVLF AGFGAVITVVVIVVVIKCFCKHRSCFRNEASRETNNSLTFG PEEALAEQTVFL

5	3	Isoforma 2 de la CD80 humana (sin secuencia de señal)	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTM MSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYESCVV LKYEKDAFKREHLAEVTLVKADFTPSISDFEIPTSNIRRI ICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSS KLDFNMTTNHSMCLIKYGHLRVNQTFNWNTSFAPRCRERRR NERLRRESVRPV
	4	CD80 humana Isoforma 3 (sin secuencia de señal)	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTM MSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYESCVV LKYEKDAFKREHLAEVTLVKGFAPRCRERRRNERLRRESVR PV
10	5	Secuencia del ECD de la CD80 humana (sin secuencia de señal)	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTM MSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYESCVV LKYEKDAFKREHLAEVTLVKADFTPSISDFEIPTSNIRRI ICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSS KLDFNMTTNHSMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTKQEHFPDN
	6	Secuencia del ECD de la CD80 de ratón (sin secuencia de señal)	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHKVVLVS VIAGKLKVWPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRGTYSVV QKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRI TCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISS QLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEKPPEDPPDSKN
15	7	Secuencia de señal de la CD80 humana	MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSG
20			

5

10

15

20

8	Secuencia de señal de la CD80 de ratón	MACNCQLMQDTPLLKFPCLILLFVLLIRLSQVSSD
9	Fc C237S	EPKSSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10	Fc	ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
11	Fc	ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSQ EDPEVQFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPPVL DSDGSFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK
12	Mutante L234F, L235E, P331S de Fc de IgG1 humana	EPKSSDKTHTCPPCPAPE FE GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP AS IEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK

5

10

15

20

13	Mutante N297 de Fc de IgG1 humana	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPGK
14	Fc IgG1 humana	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPGK
15	Fc IgG3 humana	ELKTPLGDTTHTCPRCEPKSCDTPPPCPRCEPKSCDTPPPCP RCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTF RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPE NNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFFCFSVMHEAL HNRFTQKSLSLSPGK
16	Fc IgG4 humana	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNNHYTQ KSLSLSLGK

5	17	ECD de CD80 de ratón Fc IgG2a de ratón (parte de Fc subrayada)	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHKDVVLS VIAGKLKVVWPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRGTYSCVV QKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRI TCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISS QLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEKPPEDPPDSKNE <u>PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI</u> <u>SLSP</u> <u>IVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQ</u> <u>TQTHREDYNST</u> <u>LRVVSALPIQHQDWM</u> <u>SGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISK</u> <u>PKG</u> <u>SVRAPQVYVLPPEEEMTKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTN</u> <u>NGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSC</u> <u>SVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK</u>
10			
15	18	ECD de CD80 de ratón Fc IgG1 humana WT (parte de Fc subrayada)	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHKDVVLS VIAGKLKVVWPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRGTYSCVV QKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRI TCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISS QLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEKPPEDPPDSKNE <u>PKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE</u> <u>VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY</u> <u>RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ</u> <u>PREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN</u> <u>GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV</u> <u>FSCS</u> <u>VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
20			

5

10

15

20

19	ECD de CD80 de ratón Fc IgG1 MT (234, 235, 331) (parte de Fc subrayada; los mutantes se muestran en negrita)	VDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESEDRIYWQKHDKVVL SVIAGKCLKVWPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRGTYSC VVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADT KRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELY TISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEKPPEDPP DSKNEPKSSDKTHTCPPCPAPE FE GGPSVFLFPPKPKDTLM <u>ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE</u> <u>EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEK</u> <u>TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS</u> <u>DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR</u> <u>WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
20	ECD de CD80 humana Fc IgG1 humana WT (parte de Fc subrayada)	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVL MMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYES VVLKYEKDAFKREHLAEVTLVKADFPPTPSISDFEIPSTNI RRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELY AVSSKLDNFMTTNHSEFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTKQEHF PDNEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI <u>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE</u> <u>QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT</u> <u>ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD</u> <u>IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW</u> <u>QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>

10

15

20

21	ECD de CD80 humana Fc IgG1 humana L234F, L235E, P331S MT (parte de Fc subrayada; mutantes en negrita)	VIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRIYWQKEKKMVLTM SGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTIECVVLK YEKDAFKREHLAEVTLVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICS TSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLD NMTTNHSMCLIKYGHRLRVNQTFNWNNTTKQEHFPDNEPKSSDK <u>THTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD</u> <u>VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV</u> <u>LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTL</u> <u>PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT</u> <u>PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT</u> <u>QKSLSLSPGK</u>
22	Precursor de PD-1 humano (con secuencia de señal) UniProtKB/S wiss-Prot: Q15116.3, 01-OCT-2014	MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPTTFSPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL
23	PD-1 humana (madura, sin secuencia de señal)	PGWFLDSPDR PWNPTTFSPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS

10

15

20

24	Precursor de PD-L1 humano (con secuencia de señal) UniProtKB/Sw iss-Prot: Q9NZQ7.1, 01-OCT-2014	MRIFAVFIFM TYWHLLNAFT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVIPPEL LAHPPNERH LVILGAILLC LGVALTFIFR LRKGRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET
25	PD-L1 humana (madura, sin secuencia de señal)	FT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVIPPEL LAHPPNERH LVILGAILLC LGVALTFIFR LRKGRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de fusión al dominio extracelular (ECD) de la CD80 que comprende un polipéptido del ECD de la CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, donde la molécula de fusión al ECD de la CD80 comprende 15-60 moléculas de ácido siálico (SA), y donde la molécula de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20.
2. La molécula de fusión de la reivindicación 1, donde la molécula de fusión al ECD de la CD80 comprende 15-40 moléculas de SA.
3. La molécula de fusión de la reivindicación 1, donde la molécula de fusión al ECD de la CD80 comprende 15-30 moléculas de SA.
4. La molécula de fusión de la reivindicación 1, donde la molécula de fusión al ECD de la CD80 comprende 20-30 moléculas de SA.
5. Una composición que comprende (i) moléculas de fusión al ECD de la CD80 que comprenden un polipéptido del ECD de la CD80 humana y un dominio Fc de IgG1 humana, y (ii) un portador farmacéuticamente aceptable,
donde las moléculas de fusión al ECD de la CD80 comprenden 15-60 moles de SA por mol de proteína de fusión al ECD de la CD80, donde las moléculas de fusión al ECD de la CD80 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20.
6. La composición de la reivindicación 5, donde las moléculas de fusión al ECD de la CD80 comprenden 15-40 moles de SA por mol de proteína de fusión al ECD de la CD80.
7. La composición de la reivindicación 5, donde las moléculas de fusión al ECD de la CD80 comprenden 15-30 moles de SA por mol de proteína de fusión al ECD de la CD80.
8. La composición de la reivindicación 5, donde las moléculas de fusión al ECD de la CD80 comprenden 20-30 moles de SA por mol de proteína de fusión al ECD de la CD80.

9. La composición de la reivindicación 5, donde las moléculas de fusión al ECD de la CD80 comprenden 20-40 moles de SA por mol de proteína de fusión al ECD de la CD80.

10. La composición de la reivindicación 9, donde las moléculas de fusión al ECD de la CD80 comprenden 30-40 moles de SA por mol de proteína de fusión al ECD de la CD80.

11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 5-10, que comprende además un agente terapéutico adicional, donde el agente terapéutico adicional comprende un inhibidor de la muerte celular programada 1 (PD-1) / el ligando de la muerte celular programada 1 (PD-L1).

12. Una secuencia de codificación que codifica la molécula de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2018/0004132
Recibo: 20-36514
Fecha: 28/05/2020

CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO
CC: 66.783.790
Pago PSE No: 403830
CUS: 636787379

Patente PCT
POLIPEPTIDOS DEL DOMINIO EXTRACELULAR DE CD80 Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-01	Solicitud examen de patentabilidad Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 1,133,000	\$ 1,133,000
TOTAL					\$ 1,133,000