

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 609**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2009 E 09811805 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 2350129**

54 Título: **Composiciones de antagonistas de PD-1 y métodos de uso**

30 Prioridad:

25.08.2008 US 91709 P

25.08.2008 US 91694 P

02.04.2009 US 211697 P

25.08.2008 US 91705 P

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

14.09.2015

73 Titular/es:

**AMPLIMMUNE, INC. (100.0%)
45 W. Watkins Mill Road, Suite A
Gaithersburg, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**LANGERMANN, SOLOMON y
LIU, LINDA**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 545 609 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones de antagonistas de PD-1 y métodos de uso

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones terapéuticas que contienen un compuesto que impide la transducción de señales inhibitoras en células T en combinación con agentes de potenciación y al uso de dichos componentes juntos o por separado para la inducción de respuestas de células T valiosas en la terapia de enfermedades.

Antecedentes de la invención

La respuesta de linfocitos T frente a estados patológicos, tales como infección y enfermedades crónicas tales como cáncer, es complicada e implica interacciones intercelulares y la producción de mediadores solubles (denominados citocinas o linfocinas). La activación de células T depende normalmente de una señal específica de antígeno tras el contacto del receptor de células T (TCR) con un péptido antigénico presentado a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) mientras que el grado de esta reacción se controla mediante señales independientes de antígeno positivas y negativas que surgen de una variedad de moléculas coestimuladoras. Estas últimas son comúnmente miembros de la familia de CD28/B7. A la inversa, la muerte programada 1 (PD-1) es un miembro de la familia de CD28 de receptores que suministra una respuesta inmunitaria negativa cuando se induce en células T. El contacto entre PD-1 y uno de sus ligandos (B7-H1 o B7-DC) induce una respuesta inhibitora que disminuye la multiplicación de células T y/o la intensidad y/o duración de una respuesta de células T.

Por tanto, la respuesta de linfocitos T se regula mediante diversos factores, incluyendo moléculas de superficie celular que actúan como receptores, en las que estas últimas incluyen tanto el complejo de TCR así como otras moléculas de superficie.

En resumen, una respuesta de células T específica de antígeno está mediada por dos señales: 1) acoplamiento del TCR con péptido antigénico presentado en el contexto de HC (señal 1), y 2) una segunda señal independiente de antígeno suministrada por el contacto entre diferentes pares de receptor/ligando (señal 2). Esta "segunda señal" es crítica para determinar el tipo de respuesta de células T (activación frente a tolerancia) así como la intensidad y duración de esa respuesta, y se regula mediante señales tanto positivas como negativas de moléculas coestimuladoras, tales como la familia de B7 de proteínas.

La ruta coestimuladora de células T más extensamente caracterizada es B7-CD28, en la que B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) se acoplan cada uno al receptor CD28 estimulador y al receptor de CTLA-4 (CD152) inhibitor. Junto con la señalización a través del receptor de células T, la unión de CD28 aumenta la proliferación específica de antígeno de células T, potencia la producción de citocinas, estimula la diferenciación y la función efectora, y promueve la supervivencia de células T (Lenschow, *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 14:233-258 (1996); Chambers y Allison, *Curr. Opin. Immunol.*, 9:396-404 (1997); y Rathmell y Thompson, *Annu. Rev. Immunol.*, 17:781-828 (1999)). En cambio, se piensa que la señalización a través de CTLA-4 suministra una señal negativa que inhibe la proliferación de células T, la producción de IL-2 y la progresión del ciclo celular (Krummel y Allison, *J. Exp. Med.*, 183:2533-2540 (1996); y Walunas, *et al.*, *J. Exp. Med.*, 183:2541-2550 (1996)). Otros miembros de la familia de B7 de moléculas coestimuladoras incluyen B7-H1 (Dong, *et al.*, *Nature Med.*, 5:1365-1369 (1999); y Freeman, *et al.*, *J. Exp. Med.*, 192:1-9 (2000)), B7-DC (Tseng, *et al.*, *J. Exp. Med.*, 193:839-846 (2001); y Latchman, *et al.*, *Nature Immunol.*, 2:261-268 (2001)), B7-H2 (Wang, *et al.*, *Blood*, 96:2808-2813 (2000); Swallow, *et al.*, *Immunity*, 11:423-432 (1999); y Yoshinaga, *et al.*, *Nature*, 402:827-832 (1999)), B7-H3 (Chapoval, *et al.*, *Nature Immunol.*, 2:269-274 (2001)) y B7-H4 (Choi, *et al.*, *J. Immunol.*, 171:4650-4654 (2003); Sica, *et al.*, *Immunity*, 18:849-861 (2003); Prasad, *et al.*, *Immunity*, 18:863-873 (2003); y Zang, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100:10388-10392 (2003)). B7-H5 (descrito en el documento WO 2006/012232) es un miembro recién descubierto de la familia de B7.

Las moléculas de la familia de B7 tienen un dominio IgC (constante) proximal a la membrana y un dominio IgV (variable) distal a la membrana. La familia de tipo CD28 de receptores para estos ligandos comparten un dominio de tipo IgV extracelular común. Las interacciones de pares de receptor-ligando están mediadas predominantemente a través de residuos en los dominios IgV de los ligandos y receptores (Schwartz, *et al.*, *Nature Immunol.*, 3:427-434 (2002)). En general, se describe que los dominios IgV tienen dos láminas que contienen, cada una, una capa de cadenas β (Williams y Barclay, *Annu. Rev. Immunol.*, 6:381-405 (1988)). Las láminas delantera y trasera de CTLA-4 contienen cadenas A'GFC'C y ABEDC, respectivamente (Ostrov, *et al.*, *Science*, 290:816-819 (2000)), mientras que las láminas delantera y trasera de los dominios IgV de B7 están compuestas por cadenas AGFCC'C y BED, respectivamente (Schwartz, *et al.*, *Nature*, 410:604-608 (2001); Stamper, *et al.*, *Nature*, 410:608-611 (2001); e Ikemizu, *et al.*, *Immunity*, 12:51-60 (2000)). Análisis cristalográficos revelaron que la superficie de contacto de unión de CTLA-4/B7 está dominada por la interacción del bucle análogo a CDR3 de CTLA-4, compuesto por un motivo MYPPPY, con una superficie en B7 formada predominantemente por las cadenas G, F, C, C' y C" (Schwartz, *et al.*, *Nature*, 410:604-608 (2001); y Stamper, *et al.*, *Nature*, 410:608-611 (2001)). Datos de homología de aminoácidos, mutación y modelado informático apoyan el concepto de que este motivo también es un sitio de unión a B7 principal

para CD28 (Bajorath, *et al.*, J. Mol. Graph. Model., 15:135-139 (1997)). Aunque el motivo MYPPPY no está conservado en ICOS, el receptor para B7-H2, estudios han indicado que un motivo relacionado que tiene la secuencia FDPDPF y ubicado en la posición análoga es un determinante principal para la unión de ICOS a B7-H2 (Wand, *et al.*, J. Exp. Med., 195:1033-1041 (2002)).

5 B7-DC (también denominado PD-L2 o CD273) es un miembro relativamente nuevo de la familia de B7, y tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en aproximadamente el 34% a B7-H1 (también denominado PD-L1). Los ortólogos de B7-DC de ser humano y de ratón comparten una identidad de aminoácidos de aproximadamente el 70%. Aunque se encuentran transcritos de B7-H1 y B7-DC en diversos tejidos (Dong, *et al.*, Nature Med., 5:1365-1369 (1999); Latchman, *et al.*, Nature Immunol., 2:261-268 (2001); y Tamura, Blood, 97:1809-1816 (2001)), los perfiles de expresión de las proteínas son bastante distintos. B7-H1 se expresa ampliamente en una amplia variedad de tipos de tejidos y células, mientras que la expresión de B7-DC se limita predominantemente a macrófagos y células dendríticas (DC) activadas.

15 Se ha mostrado que tanto B7-H1 como B7-DC se unen a PD-1 (Freeman, *et al.*, J. Exp. Med., 192:1027-1034 (2000)), un miembro distante de la familia de CD28 con un motivo inhibidor de inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático (Ishida, *et al.*, EMBO J., 11:3887-3895 (1992)). PD-1, un miembro de la familia de CD28 de receptores, se expresa de manera inducible en células T activadas, células B, linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, DC y macrófagos (Keir, *et al.* Curr. Opin. Immunol. 19:309-314 (2007)).

20 El principal resultado de la unión a PD-1 por parte de sus ligandos es inhibir la señalización posterior al receptor de células T (TCR). Por tanto, la transducción de señales a través de PD-1 proporciona habitualmente una señal supresora o inhibidora a la célula T que da como resultado una disminución de la proliferación de células T u otra reducción en la activación de células T. B7-H1 es el ligando de PD-1 predominante que provoca la transducción de señales inhibitoras en células T. Las presentes divulgaciones solucionan el problema de inhibición de células T no deseada proporcionando agentes que se unen a PD-1 y por tanto impiden la transducción de señales inhibitoras, o bien se unen a ligandos de PD-1 tales como B7-H1, impidiendo así que el ligando se una a PD-1 para suministrar una señal inhibidora. En cualquier caso, se estimulan respuestas de células T, tales como proliferación o activación de células T.

30 B7-H1 es el ligando de PD-1 predominante, probablemente debido a su distribución más amplia y sus niveles de expresión superiores. La inhibición de PD-1 sólo se produce cuando PD-1 y TCR están ligados en estrecha proximidad uno a otro, en el contexto de la sinapsis inmunitaria. PD-1 y sus ligandos han sido el objeto de varios artículos de revisión.

35 B7-H1 también se sobreexpresa en muchos cánceres (incluyendo cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer gástrico, glioma, leucemia, cáncer de pulmón, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, carcinoma de células renales y cáncer urotelial), y se ha asociado con un mal pronóstico. B7-H1 se expresa por muchas líneas de células tumorales, especialmente tras la estimulación con interferón gamma (IFN- γ), y también se regula por incremento en células supresoras derivadas de la línea mieloide (MDSC) infiltrantes de tumores. Por ejemplo, PD-1 se regula por incremento en células T CD8 específicas de tumor y está asociado con una insuficiencia funcional, anergia, agotamiento y apoptosis. La regulación por incremento de PD-1 también se ha asociado con fenotipos disfuncionales y/o supresores en tipos de células adicionales, tales como células T reguladoras (Treg) y linfocitos citolíticos naturales T (NKT).

45 Las presentes divulgaciones usan tales funciones moleculares proporcionando regímenes de tratamiento para tratar enfermedades mediante aumento de la actividad de células T, especialmente cáncer y enfermedades infecciosas.

Breve resumen de la invención

50 La invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. En un aspecto, las presentes divulgaciones se refieren a un método de aumento de las respuestas de células T, por ejemplo, frente a un antígeno, en un mamífero que necesita tal aumento, que comprende administrar a dicho mamífero un compuesto que reduce la transducción de señales inhibitoras en células inmunitarias, especialmente células T, y un agente de potenciación, en el que dicho régimen de tratamiento es eficaz para aumentar la respuesta de células T de dicho mamífero.

60 Los compuestos útiles en el régimen de tratamiento de las divulgaciones incluyen aquellos que se unen a, y bloquean, receptores de PD-1 en células T sin desencadenar la transducción de señales inhibitoras, compuestos que se unen a ligandos de PD-1 para impedir su unión a PD-1, compuestos que hacen ambas cosas y compuestos que impiden la expresión de genes que codifican para o bien PD-1 o bien ligandos naturales de PD-1. Tales compuestos se denominan en el presente documento "antagonistas de PD-1". Los compuestos que se unen a ligandos naturales de PD-1 incluyen el propio PD-1, así como fragmentos activos de PD-1, y en el caso del ligando B7-H1, proteínas B7.1 y fragmentos. Tales antagonistas incluyen proteínas, anticuerpos, moléculas antisentido y pequeños compuestos orgánicos. En una realización preferida, dicha respuesta de células T es mayor que la producida por cualquiera de dicha proteína de fusión de antagonista de PD-1 o dicho agente de potenciación cuando se administran sin el otro.

5 En otra realización, compuestos útiles en los métodos de las divulgaciones son aquellos que se unen a moléculas de superficie de células T tales como CTLA4 para impedir las señales inhibitoras desencadenadas por la unión de ligandos naturales del mismo o que se unen a dichos ligandos naturales. Tales antagonistas incluyen proteínas, anticuerpos, moléculas antisentido y pequeños compuestos orgánicos.

10 En una realización general, los compuestos útiles en regímenes de tratamiento y composiciones de las presentes divulgaciones incluyen aquellos que se unen a PD-1 sin desencadenar, inducir, aumentar, facilitar y/o permitir la unión conjunta de PD-1 con TCR.

15 Los compuestos preferidos de las divulgaciones que impiden la transducción de señales inhibitoras a través de PD-1 y por tanto actúan como antagonistas de PD-1 incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de B7-DC, especialmente porciones solubles de los mismos, incluyendo fragmentos activos de los mismos, variantes y homólogos de los mismos, así como proteínas de fusión que incorporan cualquiera de los anteriores, que se unen a PD-1 sin desencadenar la transducción de señales inhibitoras. En realizaciones preferidas, B7-DC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 3 ó 4. Tales compuestos preferidos son aquellos que incorporan el dominio soluble de B7-DC (es decir, sin secuencia transmembrana). Los fragmentos adecuados de polipéptidos de B7-DC incluyen fragmentos que contienen los dominios IgV y/o IgC o fragmentos que contienen sólo el dominio IgV, siendo esto último una realización preferida, siendo los aminoácidos 20-121 de SEQ ID NO: 1 un ejemplo preferido de un dominio IgV.

25 Los antagonistas de PD-1 preferidos de las divulgaciones también incluyen, pero no se limitan a, fragmentos activos de ligandos naturales de PD-1, tales como polipéptidos de B7-H1 (dados a conocer en la patente estadounidense n.º 6.803.192, incorporada como referencia en el presente documento en su totalidad), especialmente porciones solubles de los mismos, incluyendo variantes y homólogos de los mismos, así como proteínas de fusión que incorporan cualquiera de los anteriores, que se unen a PD-1 sin desencadenar la transducción de señales inhibitoras.

30 Los compuestos preferidos de las divulgaciones también incluyen, pero no se limitan a, compuestos, incluyendo fragmentos activos, variantes y homólogos, que se unen a ligandos naturales de PD-1, tales como fragmentos de B7-1 que se unen a B7-H1, así como proteínas de fusión que incorporan cualquiera de los anteriores, que se unen a ligandos de PD-1 para impedir que estos últimos se unan a PD-1 para desencadenar la transducción de señales inhibitoras.

35 En otra realización de las divulgaciones, las composiciones y los métodos de uso de las mismas incluyen una combinación de un antagonista de receptor de PD-1 que se une a, y bloquea, el receptor de PD-1, y un antagonista de receptor de PD-1 separado que se une a, y bloquea, ligandos de receptor de PD-1. Otra realización de la presente invención proporciona antagonistas de receptor de PD-1 que se unen al receptor de PD-1 sin desencadenar la transducción de señales inhibitoras a través del receptor de PD-1 y también tienen la capacidad para unirse a, y antagonizar, ligandos de receptor de PD-1, tales como B7-H1, que de lo contrario desencadenarían la transducción de señales inhibitoras a través del receptor de PD-1. Otros antagonistas de receptor de PD-1 contemplados incluyen anticuerpos biespecíficos que pueden unirse tanto al receptor de PD-1 como a ligandos de receptor de PD-1.

45 Las realizaciones preferidas de compuestos útiles en las presentes divulgaciones también incluyen anticuerpos que se unen a PD-1 o CTLA4, reduciendo así, o eliminando, la transducción de señales inhibitoras mediada por esas fuentes.

50 Los compuestos preferidos para su uso en los métodos de las divulgaciones también incluyen, pero no se limitan a, fragmentos activos de ligandos de CTLA4 (tales como B7-1 y B7-2) que se unen a CTLA4 para reducir señales inhibitoras posteriores pero que no se unen a CD28 ni inhiben de otro modo la transducción de señales positivas por CD28.

55 Los compuestos preferidos de las divulgaciones que impiden la transducción de señales inhibitoras a través de PD-1 y por tanto actúan como antagonistas de PD-1 incluyen, pero no se limitan a, antagonistas de B7-DC, especialmente porciones solubles de los mismos, incluyendo fragmentos activos de los mismos, variantes y homólogos de los mismos, así como proteínas de fusión que incorporan cualquiera de los anteriores, que se unen a B7-DC.

60 En una realización de las divulgaciones, los polipéptidos de B7-DC, fragmentos o variantes de los mismos se acoplan a otros polipéptidos para formar proteínas de fusión que antagonizan el receptor de PD-1 uniéndose al receptor de PD-1 sin provocar la transducción de señales inhibitoras a través de PD-1, reduciendo así, o interfiriendo con, la unión del ligando a PD-1, particularmente la unión de B7-H1, e interfiriendo así con la transducción de señales inhibitoras a través del receptor de PD-1. Ejemplos de proteínas de fusión de la invención son polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, 12 ó 13, así como homólogos de los mismos. En una realización preferida, la totalidad o una porción del dominio extracelular (ECD) de B7-DC es

parte de una proteína de fusión en la que está unido a un segundo polipéptido que contiene una porción de Fc de una inmunoglobulina. Un ejemplo preferido de esto es B7-DC-Ig, especialmente cuando esta estructura forma parte de un homodímero en el que dos moléculas de B7-DC-Ig se unen entre sí, tal como mediante una unión disulfuro.

- 5 En realizaciones específicas de las divulgaciones, los fragmentos útiles en los compuestos de la invención consisten en al menos 10, 15, 25, 50, 75, 100, 150, 200 o más aminoácidos contiguos de un polipéptido que tiene la actividad antagonista deseada. Tales fragmentos también son comúnmente parte de proteínas de fusión para su uso en la invención.
- 10 En otro aspecto, las presentes divulgaciones se refieren a un método de aumento de las respuestas de células T en un mamífero que lo necesita, que comprende administrar a dicho mamífero un régimen de tratamiento eficaz que comprende un anticuerpo anti-PD-1 y un agente de potenciación, en el que dicho régimen de tratamiento es eficaz para aumentar la respuesta de células T de dicho mamífero.
- 15 En otro aspecto, las presentes divulgaciones se refieren a un método de aumento de las respuestas de células T en un mamífero que lo necesita, que comprende administrar a dicho mamífero un régimen de tratamiento eficaz que comprende un inmunomodulador, y un agente de potenciación, en el que dicho régimen de tratamiento es eficaz para aumentar la respuesta de células T de dicho mamífero. Tales inmunomoduladores incluyen moléculas que antagonizan otros receptores de la familia de CD28 (tales como CTLA4) que inhiben las respuestas de células T.
- 20 Una realización preferida usa un anticuerpo anti-CTLA4 y un agente de potenciación. Los inmunomoduladores adicionales incluyen: moléculas que agonizan receptores de la familia de CD28 (tales como CD28 e ICOS) que activan respuestas de células T; moléculas que antagonizan ligandos de la familia de B7 (tales como B7-H1, B7-DC, B7-H4) que inhiben respuestas de células T; y moléculas que agonizan ligandos de la familia de B7 (tales como B7.1 y B7.2) que activan respuestas de células T.
- 25 En realizaciones adicionales de cualquiera de los métodos de la invención, el régimen de tratamiento de una proteína de fusión antagonista de PD-1 y un agente de potenciación comprende además al menos un agente terapéutico adicional. Los agentes terapéuticos adicionales contemplados incluyen agentes inmunomoduladores. Los agentes inmunomoduladores a modo de ejemplo para tales métodos incluyen anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTLA4.
- 30 En una realización de la invención, el agente de potenciación se selecciona de ciclofosfamida y análogos de ciclofosfamida, sunitinib (Sutent), anticuerpo anti-TGFβ e imatinib (Gleevec), antraciclinas, oxaliplatino, doxorubicina. Otros agentes de potenciación dados a conocer, pero no reivindicados, incluyen: (un inhibidor de la mitosis, tal como paclitaxel, un inhibidor de aromataasa, tal como letrozol, un antagonista de receptor de adenosina A2a (A2AR), un inhibidor de la angiogénesis), antagonistas de TLR4 y antagonistas de IL-18. Algunos de estos agentes reducen el número de Treg (es decir, linfocitos T reguladores o T-reg) dentro del microentorno tumoral.
- 35 En otra realización, las composiciones de la invención contemplan específicamente el uso de cualquier adyuvante adecuado como parte de dicho método y/o dicha composición.
- Según la invención, pueden ponerse en contacto células T con proteína de fusión antagonista de receptor de PD-1 y/o composiciones de la misma que contienen un agente de potenciación *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. La puesta en contacto de células T usando proteínas de fusión antagonistas de receptor de PD-1 y/o composiciones de las mismas que contienen un agente de potenciación puede producirse antes, durante o después de la activación de la célula T.
- 45 En una realización específica, una proteína de fusión que impide o reduce la transducción de señales inhibitoras a través de PD-1 y el agente de potenciación se administran en momentos diferentes, tal como cuando el agente de potenciación se administra antes de administrar el antagonista de PD-1. Tal administración puede realizarse junto con un agente terapéutico adicional.
- 50 En realizaciones específicas de una composición para su uso en un método de la invención, el régimen de tratamiento incluye la administración del agente de potenciación al menos 1 hora, o al menos 2 horas, o al menos 3 horas, o al menos 5 horas, o al menos 10 horas, o al menos 15 horas, o al menos 20 horas, o al menos 24 horas, o al menos 30 horas antes de administrar la proteína de fusión. También se da a conocer la administración del agente de potenciación en uno de los momentos mencionados anteriormente o incluso más tiempo antes de administrar cualquiera o la totalidad del antagonista de PD-1, el anticuerpo anti-PD-1, el anticuerpo anti-CTLA4 y/o agentes terapéuticos adicionales. La administración del agente de potenciación también puede producirse después de administrar cualquiera o la totalidad del antagonista de PD-1, el anticuerpo anti-PD-1, el anticuerpo anti-CTLA4 y/o agentes terapéuticos adicionales, tal como no más de 1 hora, 2 horas, 3 horas, 5 horas, 10 horas, 15 horas, 20 horas, 24 horas o incluso hasta 30 horas después de administrar un antagonista de PD-1, o puede producirse junto con la administración del antagonista de PD-1.
- 60 El aumento de la respuesta de células T logrado como resultado de las composiciones de la invención es suficiente para tratar una enfermedad, incluyendo una o más de cáncer, infección viral, infección bacteriana e infección
- 65

parasitaria. Cuando la enfermedad es cáncer, tal cáncer es uno cualquiera o más de cáncer de vejiga, de cerebro, mama, de cuello uterino, colorrectal, de esófago, de riñón, de hígado, de pulmón, nasofaríngeo, de páncreas, de próstata, de piel, de estómago, uterino, de ovarios, de testículos o hematológico.

- 5 En otro aspecto, la presente divulgación incluye composiciones de los antagonistas usados en los métodos de la invención, en un portador farmacéuticamente aceptable y en las que dicha molécula de unión a PD-1 y dicho agente de potenciación están presentes cada uno en una cantidad eficaz para producir un aumento de la estimulación de células T.
- 10 En una realización preferida, la invención incluye kits médicos que comprenden recipientes que contienen uno o más de los agentes para su uso en la invención junto con portadores farmacéuticos para la dilución de los mismos e instrucciones de administración. Además, se da a conocer que tanto dicho antagonista de receptor de PD-1 como el agente de potenciación pueden estar presentes como componentes en un único recipiente, en un portador farmacéuticamente aceptable, cuando dichos componentes deben administrarse al mismo tiempo.

15

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra que B7-DC-Ig se une a PD-1. Se incubó B7-DC-Ig marcada a diversas concentraciones con una línea celular CHO que expresaba constitutivamente PD-1 o células CHO originales que no expresaban PD-1. Se analizó la unión mediante citometría de flujo. Se muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) de B7-DC-Ig (eje de las y) como función de la concentración de sonda (eje de las x). B7-DC-Ig se une a células CHO.PD-1 (círculo negro) pero no a células CHO sin transfectar (triángulo gris).

20

La figura 2 muestra que B7-DC-Ig compite con B7-H1 por la unión a PD-1. En primer lugar se incubó B7-DC-Ig sin marcar a diversas concentraciones con una línea celular CHO que expresaba constitutivamente PD-1 antes de añadir B7-H1-Ig marcada a la mezcla de células. Se muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) de B7-H1-Ig (eje de las y) como función de la concentración de agente de competencia B7-DC-Ig sin marcar (eje de las x) añadida. A medida que se aumenta la concentración de B7-DC-Ig sin marcar disminuye la cantidad de B7-H1-Ig marcada unido a células CHO, demostrando que B7-DC-Ig compite con B7-H1 por la unión a PD-1.

25

30

La figura 3 muestra los resultados de experimentos en los que la combinación de ciclofosfamida (CTX o Cytoxan®) y B7-DC-Ig murina dimérica dio como resultado la erradicación de tumores CT26 establecidos (carcinoma de colon) en ratones. El gráfico A muestra el volumen tumoral (mm^3) frente a los días tras la exposición a tumor en ratones tratados con 100 mg/kg de CTX en el día 10 mientras que el gráfico B muestra el volumen tumoral (mm^3) frente a los días tras la exposición a tumor en ratones tratados con CTX en el día 10 seguido un día después por la primera administración de B7-DC-Ig. Cada línea en cada gráfico representa un ratón. La flecha negra representa la administración de B7-DC-Ig. El gráfico C muestra el volumen tumoral promedio.

35

La figura 4 muestra los resultados de experimentos en los que la combinación de CTX y B7-DC-Ig murina dimérica erradicó tumores CT26 establecidos (carcinoma de colon) en ratones y protegió frente a la nueva exposición a CT26. Ratones que se trataron con CTX y B7-DC-Ig y se encontró que estaban libres de crecimiento tumoral en el día 44 tras la inoculación tumoral volvieron a exponerse a tumores. Posteriormente volvieron a exponerse de nuevo los ratones en el día 70. Ninguno de los ratones presentó crecimiento tumoral en el día 100.

40

La figura 5 muestra que el tratamiento con CTX y B7-DC-Ig dio como resultado la generación de CTL de memoria específicos de tumor. Los ratones que erradicaron tumores subcutáneos CT26 establecidos tras el tratamiento con CTX y B7-DC-Ig volvieron a exponerse a células CT26. Siete días después, se aislaron esplenocitos y se pulsaron o bien con ovoalbúmina, un péptido irrelevante, o bien con AH1, un péptido específico de CT26. Se tiñeron en primer lugar las células con anticuerpo anti-CD8 seguido por tinción intracelular con anticuerpo anti-IFN γ antes del análisis de FACS.

50

La figura 6 muestra los efectos de diferentes dosis de B7-DC-Ig en combinación con CTX sobre la erradicación de tumores CT26 establecidos en ratones. En ratones Balb/C de 9 a 11 semanas de edad se implantaron por vía subcutánea 1×10^5 células CT26. En el día 9, se inyectaron i.p. a los ratones 100 mg/kg de CTX. Veinticuatro horas después, en el día 10, se trataron los ratones con 30, 100 ó 300 μg de B7-DC-Ig seguido por 2 inyecciones cada semana hasta un total de 8 tratamientos. Se midió el crecimiento tumoral dos veces por semana.

55

La figura 7 muestra los resultados de experimentos en los que la combinación de CTX y anticuerpo anti-PD-1 dio como resultado la erradicación de tumores CT26 establecidos (carcinoma de colon) en ratones. El gráfico A muestra el volumen tumoral (mm^3) frente a los días tras la exposición a tumor en ratones sin tratar (es decir, ratones tratados con vehículo solo), el gráfico B muestra el volumen tumoral (mm^3) frente a los días tras la exposición a tumor en ratones tratados con anti-PD-1 solo comenzando en el día 11 a 300 μg por inyección, 3 veces por semana, hasta 12 inyecciones y el gráfico C muestra el volumen tumoral (mm^3) frente a los días tras la exposición a tumor en ratones tratados con CTX en el día 11 y la primera administración de anticuerpo anti-PD-1 en el día 12 a 300 μg por inyección, 3 veces por semana, hasta 12 inyecciones. Cada línea en cada gráfico representa un ratón. La flecha negra representa la administración de anticuerpo anti-PD-1.

60

65

La figura 8 muestra los resultados de experimentos en los que la combinación de CTX y anticuerpo anti-CTLA4 dio como resultado la erradicación de tumores CT26 establecidos (carcinoma de colon) en ratones. En este caso, el gráfico A muestra el volumen tumoral (mm^3) frente a los días tras la exposición a tumor en ratones tratados con 100 mg/kg de CTX en el día 11 mientras que el gráfico B muestra el volumen tumoral (mm^3) frente a los días tras la exposición a tumor en ratones tratados con CTX en el día 11 y anticuerpo anti-CTLA4 en el día 12 a 100 μg por inyección, 2 veces por semana, hasta 8 inyecciones. Cada línea en cada gráfico representa un ratón. La flecha negra representa la administración de anticuerpo anti-CTLA-4.

La figura 9 muestra los resultados de experimentos en los que en ratones Balb/C de 9 a 11 semanas de edad se implantaron 1×10^5 células CT26 por vía subcutánea. En el día 9, se inyectaron a los ratones 100 mg/kg de CTX, i.p. Veinticuatro horas después, en el día 10, se trataron los ratones con 100 μg de B7-DC-Ig. Hubo 5 grupos: ratones sin tratamiento previo que no recibieron ninguna célula tumoral, con inyección de vehículo, CTX solo, CTX + B7-DC-Ig o B7-DC-Ig sola. Se retiraron del estudio dos ratones sin tratamiento previo y 4 ratones de los otros grupos en el día 11 (2 días tras CTX) y el día 16 (7 días tras CTX) para el análisis de células T. El panel de la izquierda muestra que en el día 11, 2 días tras la inyección de CTX, Treg en el bazo de los ratones con tratamiento con CTX era significativamente menor que en los ratones con implantación tumoral y en los que se inyectó vehículo. El panel de la derecha muestra que en el día 16, 7 días tras CTX y 6 días tras el tratamiento con B7-DC-Ig, B7-DC-Ig redujo significativamente las células T CD4+ que con expresión alta de PD-1. Esto se observó tanto en los ratones tratados con B7-DC-Ig como en los tratados con CTX + B7-DC-Ig. Los ratones en los que se implantaron células tumorales tendían a tener más células T PD-1+/CD4+ en el LN de drenaje en comparación con ratones sin tratamiento previo.

La figura 10 muestra los resultados de experimentos en los que la combinación de CTX y B7-DC-Ig dio como resultado un aumento de la supervivencia en ratones con inyección en la vena de la cola de una línea celular de tumor de próstata de ratón. Se aislaron células SP-1 de pulmones de ratón que se metastatizaron a partir de inyección de células de tumor de próstata TRAMP. En primer lugar se inyectaron a ratones B10.D2 3×10^3 células SP-1 mediante inyección en la vena de la cola. En los días 5, 12 y 19, se inyectaron a los ratones 50 mg/kg de CTX cuando se indicó. En los días 6, 13 y 20, se administraron a los ratones 5 mg/kg de B7-DC-Ig cuando se indicó. En este caso, "NT" se refiere a "no tratado".

En la figura 11, a ratones Balb/C de 11-13 semanas de edad se les administraron metástasis hepáticas aisladas usando una técnica de inyección en medio bazo. Se dividieron los bazos de ratones anestesiados en dos mitades y se sujetaron con grapas las mitades. Se inyectaron células CT26 (1×10^5) en medio bazo, y tras 30 segundos, se reseco ese medio bazo y se sujetó con grapas la vena de drenaje esplénica. En el día 10, los ratones recibieron 1 inyección de CTX a 50 mg/kg, i.p. Veinticuatro horas después, en el día 11, se trataron los ratones con *Listeria* recombinante que portaba péptido AH1, un epitopo inmunodominante de CT26, a $0,1 \times 10^7$ UFC, y después en los días 14 y 17. También se trataron los ratones con B7-DC-Ig en el día 11 y después en el día 18. Se monitorizó la supervivencia global de ratones.

40 Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la invención divulgada. En particular, los siguientes términos y frases tienen el siguiente significado.

Se pretende que el término "transducción de señales inhibitoras" signifique cualquier transducción de señales que tiene el efecto de eliminar, o reducir de otro modo, las respuestas de células T frente a un antígeno, ya sea mediante reducción de la proliferación de células T o mediante cualquier otro mecanismo inhibitor, mediante lo cual se disminuye el grado o la duración de una respuesta de células T inmunogénicas. Tal transducción de señales inhibitoras puede deberse a la unión de PD-1 a un ligando natural, tal como unión de PD-1 a B7-H1 o algún otro miembro de esta clase de ligandos, B7-DC, o puede deberse a la unión de CTLA4 a ligandos, tales como B7-1 o B7-2. En general, los compuestos de las divulgaciones reducen tal transducción de señales inhibitoras e incluyen, pero no se limitan a, antagonistas de PD-1 y antagonistas de CTLA4.

El término "antagonista de PD-1" significa cualquier molécula que atenúa la transducción de señales inhibitoras mediada por PD-1, encontrada sobre la superficie de células T, células B, linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, DC y macrófagos. Un antagonista de este tipo incluye una molécula que altera cualquier señal inhibitora generada por una molécula de PD-1 en una célula T. En ejemplos específicos de las divulgaciones, un antagonista de PD-1 es una molécula que inhibe, reduce, elimina o reduce de otro modo la transducción de señales inhibitoras a través de la ruta de señalización de receptor de PD-1. Tal disminución puede dar como resultado que: (i) el antagonista de PD-1 de la invención se une a un receptor de PD-1 sin desencadenar transducción de señales, para reducir o bloquear la transducción de señales inhibitoras; (ii) el antagonista de PD-1 se une a un ligando (por ejemplo un agonista) del receptor de PD-1, impidiendo su unión al mismo (por ejemplo, en el que dicho agonista es B7-H1); (iii) el antagonista de PD-1 se une a, o inhibe de otro modo la actividad de, una molécula que es parte de una cadena reguladora que, cuando no se inhibe, tiene el resultado de estimular o facilitar de otro modo la transducción de señales inhibitoras de PD-1; o (iv) el antagonista de PD-1 inhibe la expresión de un receptor de PD-

1 o el ligando de expresión del mismo, especialmente reduciendo o eliminando la expresión de uno o más genes que codifican para PD-1 o uno o más de sus ligandos naturales. Por tanto, un antagonista de PD-1 de las divulgaciones es una molécula que realiza una disminución de la transducción de señales inhibitoras de PD-1, aumentando así la respuesta de células T frente a uno o más antígenos.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “antagonista de CTLA4” significa un compuesto que reduce la inhibición de reacciones de células T mediada por CTLA4. Por ejemplo, en una célula T, CTLA4 suministra un impulso inhibitor tras la unión de ligandos de B7, tales como B7-1 y B7-2. Un antagonista de CTLA4 es uno que altera la unión de dichos ligandos a CTLA4 en células T activadas. En una realización de las divulgaciones, el antagonista es un anticuerpo anti-CTLA4 que se une a CTLA4 para impedir la unión de ligandos.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “fragmento activo” se refiere a una porción de un polipéptido natural, o un polipéptido con alta homología de secuencia (por ejemplo, una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 98% o el 99%) con respecto a un polipéptido natural y que muestra actividad antagonista de PD-1, por ejemplo, uniéndose a PD-1 o uniéndose a un ligando de PD-1. En realizaciones preferidas, un fragmento de este tipo consistirá en el dominio extracelular (ECD) de una proteína B7-DC que se une a PD-1, tal como SEQ ID NO: 3, preferiblemente los aminoácidos 20 a 221 de la misma. En el caso de polipéptido de PD-1, un fragmento activo será una porción de dicho polipéptido que comprende un dominio de unión que se une a un ligando natural de PD-1 para impedir la estimulación de la transducción de señales inhibitoras mediada por PD-1 mediante dicho ligando. Los fragmentos activos pueden identificarse por su capacidad para competir con la molécula de la que se derivan por la unión a un sitio de unión natural. Por ejemplo, los fragmentos activos competirán con B7-DC de tipo natural por la unión a PD-1.

25 Con respecto a un anticuerpo, el término “fragmento activo” significa una porción de unión a antígeno de un anticuerpo que es menor que una inmunoglobulina entera. Tales fragmentos incluyen fragmentos Fab y F(ab₂)², que pueden reaccionar con, y unirse a, cualquiera de los polipéptidos dados a conocer en el presente documento por ser receptores o ligandos. Estos fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen de la porción Fc de un anticuerpo intacto, se aclaran más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión a tejido no específica que un anticuerpo intacto (Wahl *et al.*, J. Nuc. Med. 24:316-325 (1983)). También se incluyen fragmentos Fv (Hochman, J. *et al.* (1973) Biochemistry 12:1130-1135; Sharon, J. *et al.* (1976) Biochemistry 15:1591-1594). Estos diversos fragmentos se producen usando técnicas convencionales tales como escisión con proteasa o escisión química (véase, por ejemplo, Rousseaux *et al.*, Met. Enzymol., 121:663-69 (1986)).

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “porción soluble” de un antagonista de PD-1 significa la porción del polipéptido de longitud completa que no incluye ninguna parte del segmento o la porción transmembrana. Por ejemplo, con respecto a B7-DC, una porción soluble incluirá la porción extracelular (con o sin la secuencia señal N-terminal) pero no incluirá ninguna parte de la porción transmembrana (o, al menos, no lo suficiente como para reducir la solubilidad). Por tanto, el ECD de B7-DC humano se muestra como SEQ ID NO: 3 y consiste en dominios tanto de tipo IgV como de tipo IgC de la molécula de longitud completa (es decir, los aminoácidos 20-221 de la secuencia de longitud completa (SEQ ID NO: 1)).

45 Tal como se usa en el presente documento, un “polipéptido coestimulador” es un polipéptido que, tras la interacción con una molécula de superficie celular en células T, modula la actividad de la célula T. Por tanto, la respuesta de la célula T puede ser una respuesta efectora (por ejemplo, CTL o célula B productora de anticuerpos), una respuesta cooperadora que proporciona ayuda a una o más respuestas efectoras (por ejemplo, CTL o célula B productora de anticuerpos) o una respuesta supresora.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “régimen de tratamiento” se refiere a un tratamiento de una enfermedad o a un método para lograr un cambio fisiológico deseado, tal como aumento o disminución de la respuesta del sistema inmunitario frente a un antígeno o inmunógeno, tal como un aumento o disminución del número o la actividad de una o más células, o tipos de células, que participan en tal respuesta, en el que dicho tratamiento o método comprende administrar a un animal, tal como un mamífero, especialmente un ser humano, una cantidad suficiente de dos o más agentes químicos o componentes de dicho régimen para tratar eficazmente una enfermedad o para producir dicho cambio fisiológico, en el que dichos agentes químicos o componentes se administran juntos, tal como parte de la misma composición, o se administran por separado y de manera independiente al mismo tiempo o en momentos diferentes (es decir, la administración de cada agente o componente está separada por un periodo de tiempo finito de uno o más de los agentes o componentes) y en el que la administración de dicho uno o más agentes o componentes logra un resultado mayor que el de cualquiera de dichos agentes o componentes cuando se administran solos o de manera aislada.

60 Tal como se usa en el presente documento se pretende que el término “aislado” describa un compuesto de interés (por ejemplo, o bien un polinucleótido o bien un polipéptido) que está en un entorno diferente de aquél en el que el compuesto se produce de manera natural, por ejemplo separado de su medio natural tal como mediante concentración de un péptido hasta una concentración a la que no se encuentra en la naturaleza. Se pretende que “aislado” incluya compuestos que están dentro de muestras que están sustancialmente enriquecidas para el compuesto de interés y/o en las que el compuesto de interés está parcial o sustancialmente purificado.

Tal como se usa en el presente documento, el término “polipéptido” se refiere a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud, independientemente de la modificación (por ejemplo, fosforilación o glicosilación). Un polipéptido de la presente invención puede ser un polipéptido recombinante, un polipéptido natural o un polipéptido sintético, preferiblemente un polipéptido recombinante.

Tal como se usa en el presente documento, un polipéptido “variante” contiene al menos una alteración de la secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de tipo natural correspondiente.

Tal como se usa en el presente documento, una “alteración de la secuencia de aminoácidos” puede ser, por ejemplo, una sustitución, una delección o una inserción de uno o más aminoácidos.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “porción”, “segmento” y “fragmento”, cuando se usan en relación con polipéptidos, se refieren a una secuencia continua de residuos, tales como residuos de aminoácido, secuencia que forma un subconjunto de una secuencia mayor. Por ejemplo, si se sometió un polipéptido a tratamiento con cualquiera de las endopeptidasas comunes, tales como tripsina o quimotripsina, los oligopéptidos resultantes de tal tratamiento representarán porciones, segmentos o fragmentos del polipéptido de partida. Por tanto, un “fragmento” de un polipéptido se refiere a cualquier subconjunto del polipéptido que es un polipéptido más corto de la proteína de longitud completa. Generalmente, los fragmentos tendrán cinco o más aminoácidos de longitud.

Un derivado, análogo u homólogo, de un polipéptido (o fragmento del mismo) de la invención puede ser (i) uno en el que uno o más de los residuos de aminoácido se sustituyen por un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferiblemente un residuo de aminoácido conservado) y tal residuo de aminoácido sustituido puede ser uno codificado por el código genético o no, o (ii) uno en el que uno o más de los residuos de aminoácido incluyen un grupo sustituyente, o (iii) uno en el que el polipéptido maduro se fusiona con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol), o (iv) uno en el que los aminoácidos adicionales se fusionan con el polipéptido maduro, tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia que se emplea para la purificación del polipéptido maduro o una secuencia de proproteína. Se considera que tales derivados y análogos están dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, “valencia” se refiere al número de sitios de unión disponibles por molécula.

Según las presentes divulgaciones, el término “identidad en porcentaje” o “idéntico en porcentaje”, cuando se refiere a una secuencia, significa que se compara una secuencia con una secuencia reivindicada o descrita tras la alineación de la secuencia que va a compararse (la “secuencia comparada”) con la secuencia descrita o reivindicada (la “secuencia de referencia”). Entonces se determina la identidad en porcentaje según la siguiente fórmula:

$$\text{Identidad en porcentaje} = 100 [1 - (C/R)]$$

en la que C es el número de diferencias entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada a lo largo de la longitud de alineación entre la secuencia de referencia y la secuencia comparada en la que (i) cada base o aminoácido en la secuencia de referencia que no tiene una base o aminoácido alineado correspondiente en la secuencia comparada y (ii) cada hueco en la secuencia de referencia y (iii) cada base o aminoácido alineado en la secuencia de referencia que es diferente de una base o aminoácido alineado en la secuencia comparada, constituyen una diferencia; y R es el número de bases o aminoácidos en la secuencia de referencia a lo largo de la longitud de la alineación con la secuencia comparada contándose también cualquier hueco creado en la secuencia de referencia como base o aminoácido. Si existe una alineación entre la secuencia comparada y la secuencia de referencia para la que la identidad en porcentaje calculada anteriormente es aproximadamente igual o superior a una identidad en porcentaje mínima especificada, entonces la secuencia comparada tiene la identidad en porcentaje mínima especificada con respecto a la secuencia de referencia aunque puedan existir alineaciones en las que la identidad en porcentaje calculada anteriormente en el presente documento es inferior a la identidad en porcentaje especificada.

Tal como se usa en el presente documento, el término “sustitución de aminoácido conservativa” significa una sustitución en la que el aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares, y sustituciones de aminoácidos “no conservativas” son aquellas en las que, con el cambio, se altera significativamente la hidrofobicidad o el volumen ocupado del aminoácido sustituido. Las sustituciones no conservativas diferirán más significativamente en su efecto para mantener (a) la estructura del esqueleto del péptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en láminas o hélices, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen ocupado de la cadena lateral. Los ejemplos de sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen aquellas en las que la sustitución está dentro de uno de los cinco grupos siguientes: 1) pequeños residuos alifáticos, no polares o ligeramente polares (Ala, Ser, Thr, Pro, Gly); 2) residuos polares cargados negativamente y sus amidas (Asp, Asn, Glu, Gln); residuos polares cargados positivamente (His, Arg, Lys); grandes residuos

alifáticos, no polares (Met, Leu, Ile, Val, Cys); y grandes residuos aromáticos (Phe, Tyr, Trp). Ejemplos de sustituciones de aminoácidos no conservativas son aquellas en las que 1) un residuo hidrófilo, por ejemplo, serilo o treonilo, se sustituye por un residuo hidrófobo, por ejemplo, leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo (o viceversa); 2) una cisteína o prolina se sustituye por cualquier otro residuo (o viceversa); 3) un residuo que tiene una

5 cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo o histidilo, se sustituye por un residuo electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo (o viceversa); o 4) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, se sustituye por un residuo que no tiene una cadena lateral, por ejemplo, glicina (o viceversa).

Los términos “individuo”, “huésped”, “sujeto” y “paciente” se usan de manera intercambiable en el presente documento, y se refieren a un mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, primates, por ejemplo, seres humanos, así como roedores, tales como ratones y ratas, y otros animales de laboratorio.

10

Tal como se usa en el presente documento el término “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” significa una dosificación suficiente para tratar, inhibir o aliviar uno o más síntomas de un estado patológico que está tratándose o para proporcionar de otro modo un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado, especialmente potenciar la respuesta de células T frente a un antígeno seleccionado. La dosificación precisa variará según una variedad de factores tales como variables dependientes del sujeto (por ejemplo, edad, salud del sistema inmunitario, etc.), la enfermedad y el tratamiento que esté administrándose.

15

Tal como se usa en el presente documento “portador farmacéuticamente aceptable” incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

20

25

Se pretende que el término “anticuerpo” incluya tanto moléculas intactas así como fragmentos de los mismos que incluyen el sitio de unión a antígeno. La estructura de anticuerpo completo se facilita con frecuencia como H₂L₂ y se refiere al hecho de que los anticuerpos comprenden comúnmente 2 cadenas de aminoácidos ligeras (L) y 2 cadenas de aminoácidos pesadas (H). Ambas cadenas tienen regiones que pueden interactuar con una diana antigénica estructuralmente complementaria. Las regiones que interactúan con la diana se denominan regiones “variables” o “V” y se caracterizan por diferencias en la secuencia de aminoácidos de anticuerpos de diferente especificidad antigénica. Las regiones variable de cadenas o bien H o bien L contienen las secuencias de aminoácidos que pueden unirse específicamente a dianas antigénicas. Dentro de estas secuencias hay secuencias más pequeñas denominadas “hipervariables” debido a su extremada variabilidad entre anticuerpos de diferente especificidad. Tales regiones hipervariables también se denominan “regiones determinantes de la complementariedad” o regiones “CDR”. Estas regiones CDR representan la especificidad básica del anticuerpo para una estructura de determinante antigénico particular. Las CDR representan tramos no contiguos de aminoácidos dentro de las regiones variables pero, independientemente de la especie, se ha encontrado que las ubicaciones de posición de estas secuencias de aminoácidos críticas dentro de las regiones variables de cadenas pesada y ligera tienen ubicaciones similares dentro de las secuencias de aminoácidos de las cadenas variables. Las cadenas variables pesada y ligera de todos los anticuerpos tienen cada una 3 regiones CDR, cada una no contigua con las demás (denominadas L1, L2, L3, H1, H2, H3) para las cadenas ligera (L) y pesada (H) respectivas. Las regiones CDR aceptadas se han descrito por Kabat *et al*, J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977). Los anticuerpos dados a conocer según la invención también pueden ser completamente sintéticos, en los que las cadenas polipeptídicas de los anticuerpos se sintetizan y, posiblemente, se optimizan para la unión a los polipéptidos dados a conocer en el presente documento como que son receptores. Tales anticuerpos pueden ser anticuerpos quiméricos o humanizados y pueden tener una estructura completamente tetramérica, o pueden ser diméricos y comprender sólo una única cadena pesada y una única ligera.

30

35

40

45

50 Descripción detallada de la invención

Las presentes divulgaciones proporcionan un régimen de tratamiento, o terapia de combinación, para tratar una enfermedad en mamíferos que comprende un compuesto que reduce o elimina la transducción de señales inhibitoras en células T, preferiblemente células T humanas, administrado junto con un agente de potenciación para aumentar una respuesta inmunitaria.

55

Los métodos de las divulgaciones también se refieren al uso de inmunomoduladores de amplio espectro y composiciones de los mismos. En general, el aumento de la respuesta de células T resultante de estos métodos es mayor que cualquier aumento de la respuesta de células T resultante de administrar la misma dosis de cualquiera de dicho antagonista de PD-1 o dicho agente de potenciación solos.

60

Las composiciones y los regímenes dados a conocer son útiles para estimular o potenciar respuestas inmunitarias que implican células T. Por tanto, las composiciones de la invención son lo más útiles en el tratamiento de un estado patológico que se beneficiará de un aumento de la actividad de células T y en las que el aumento de la respuesta de células T es necesario o suficiente para tratar dicha enfermedad, aunque la enfermedad no está específicamente provocada o agravada por una reducción de la respuesta de células T. En una realización preferida, el tipo de

65

enfermedad que va a tratarse o prevenirse es un tumor maligno o una enfermedad infecciosa crónica provocada por una bacteria, virus, protozoo, helminto u otro patógeno microbiano intracelular al que atacan, es decir, linfocitos T citotóxicos. La activación de células T usando las composiciones dadas a conocer también es ventajosa para tratar o prevenir estados caracterizados por inmunosupresión.

5 Según las presentes divulgaciones, la respuesta de células T puede regularse mediante moléculas que se unen a receptores sobre la superficie de células T y moléculas que se unen a ligandos de tales receptores. En el caso de PD-1, moléculas que se unen a PD-1 para reducir su efecto inhibitor y/o moléculas que se unen a uno o más ligandos de PD-1 para reducir su capacidad para unirse a PD-1 tienen el efecto de reducir la capacidad de PD-1 para inhibir la respuesta de células T, aumentando así esta respuesta y los efectos inmunológicos de la misma.

A. ANTAGONISTAS DE RECEPTOR DE PD-1

15 Se proporcionan composiciones que contienen antagonistas de receptores de PD-1 e incluyen compuestos o agentes que o bien se unen a, y bloquean, un ligando de PD-1 para interferir con, o inhibir, la unión del ligando al receptor de PD-1, o bien se unen directamente a, y bloquean, el receptor de PD-1 sin inducir la transducción de señales inhibitoras a través del receptor de PD-1. En otra realización de las divulgaciones, el antagonista de receptor de PD-1 se une directamente al receptor de PD-1 sin desencadenar la transducción de señales inhibitoras y también se une a un ligando del receptor de PD-1 para reducir o inhibir que el ligando desencadene la transducción de señales a través del receptor de PD-1. Reduciendo el número y/o la cantidad de ligandos que se unen a receptor de PD-1 y desencadenan la transducción de una señal inhibitora, se atenúan menos células mediante la señal negativa suministrada por la transducción de señales de PD-1 y puede lograrse una respuesta inmunitaria más robusta.

25 Según las presentes divulgaciones, la señalización de PD-1 requiere la unión a un ligando de PD-1 (tal como B7-H1 o B7-DC) en estrecha proximidad a un antígeno peptídico presentado por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (véase, por ejemplo, Freeman Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 105:10275-10276 (2008)). Por tanto, proteínas, anticuerpos o moléculas pequeñas que impiden la unión conjunta de PD-1 y TCR en la membrana de células T son antagonistas de PD-1 útiles contemplados por las divulgaciones.

30 Los antagonistas de receptor de PD-1 a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de B7-DC, incluyendo homólogos y variantes de los mismos, así como fragmentos activos de cualquiera de los anteriores, y proteínas de fusión que incorporan cualquiera de los mismos. En una realización preferida, la proteína de fusión comprende la porción soluble de B7-DC acoplada a la porción de Fc de un anticuerpo, tal como IgG humana, y no incorpora la totalidad ni parte de la porción transmembrana de B7-DC humano. Los antagonistas de receptor de PD-1 también pueden ser antagonistas de moléculas pequeñas o anticuerpos que reducen o interfieren con la transducción de señales de receptor de PD-1 uniéndose a ligandos de PD-1 o al propio PD-1, especialmente en los que la unión conjunta de PD-1 con TCR no sigue a tal unión, no desencadenando así la transducción de señales inhibitoras a través del receptor de PD-1.

40 Los antagonistas de receptor de PD-1 proporcionados en el presente documento son generalmente útiles *in vivo* y *ex vivo* como agentes terapéuticos de estimulación de la respuesta inmunitaria. En general, las composiciones de antagonista dadas a conocer son útiles para tratar a un sujeto que tiene o que está predispuesto a tener cualquier enfermedad o trastorno frente al cual el sistema inmunitario del sujeto emprende una respuesta inmunitaria.

1. Polipéptidos de B7-DC

50 En determinadas divulgaciones, pueden usarse proteínas B7-DC como antagonistas de receptor de PD-1. B7-DC es un ligando natural de PD-1 y se une a PD-1 con mayor afinidad que B7-H1, y por tanto puede inhibir interacciones B7-H1:PD-1. Pueden obtenerse polipéptidos de B7-DC adecuados, incluyendo variantes, homólogos y fragmentos de los mismos, a partir de los siguientes polipéptidos de B7-DC humanos de longitud completa con (SEQ ID NO: 1) o sin (SEQ ID NO: 2) el péptido señal endógeno.

MIFLLMLSL ELQLHQIAAL FTVVTPKELY IIEHGSNVTLECNFDTGSHV NLGAITASLQ	60
KVENDTSPHR ERATLLEEQL PLGRASFHIP QVQVRDEGQY QCIIYGVAV DYKYLTLRVK	120
ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYPL AEVSWPNVSV PANTSHSRTP EGLYQVTSVL	180
RLKPPGRNF SCVFWNTHVR ELTLASIDLQ SQMEPRTHPT WLLHIFIFPC IIAFIFIATV	240
IALRKQLCQK LYSSKDTTKR FVTTTKREVN SAI	273

(SEQ ID NO: 1)

55

```

LFTVTVPKEL YIIHGSNVT LECNFDTGSH VNLGAIASL QKVENDTSPH RERATLLEEQ      60
LPLGKASFHI PQVQVRDEGQ YQCIIYGVA WDYKYLTQV KASYRKINTH ILKVPETDEV      120
ELTCQATGYP LAEVSWPVNS VPANTSHSRT PEGLYQVTSV LRLKPPGGRN FSCVFNTHV      180
RELTLASIDL OSQMEPRTHP TWLLHIFIFP CIIAFIFIAT VIALRKQLCQ KLYSSKDTTK      240
RPVTTTKREV NSAI                                                              254
(SEQ ID NO: 2)

```

5 La familia de B7 de moléculas, incluyendo B7-DC, se expresa en la superficie de la célula con un dominio IgC constante proximal a la membrana y un dominio IgV distal a la membrana. Los receptores para estos ligandos comparten un dominio de tipo IgV extracelular común. Las interacciones de pares de receptor-ligando están mediadas predominantemente a través de residuos en los dominios IgV de los ligandos y receptores. En general, se describe que los dominios IgV tienen dos láminas que contienen, cada una, una capa de cadenas β . Estas cadenas β se denominan A', B, C, C', C'', D, E, F y G. La estructura de tales polipéptidos se ha descrito en la bibliografía (véase Molnar *et al.*, Crystal structure of the complex between programmed death-1 (PD-1) and its ligand PD-L2, PNAS, vol. 105, págs. 10483-10488 (29 de julio de 2008)).

15 B7-DC, una proteína transmembrana, en su forma monomérica, comprende dominios IgV e IgC que constituyen la porción extracelular de la molécula (el dominio extracelular, o ECD), siendo el dominio de tipo IgV responsable, en su totalidad o en parte, de la unión a PD-1 así como de otras funciones citadas en las composiciones de las divulgaciones. Para la proteína humana, el dominio IgV se caracteriza porque presenta una unión disulfuro que une las cadenas B y F (mencionadas anteriormente), que parece ser característico de muchos dominios IgV y presenta una estructura tridimensional similar con los dominios IgV tanto de B7-1 como de B7-2 (véase Molnar *et al.*(2008), citado anteriormente).

20 En una realización de las divulgaciones, los polipéptidos variantes de B7-DC contienen alteraciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, deleciones o inserciones) dentro de una o más de esas cadenas β en cualquier combinación posible. En otra realización de las divulgaciones, variantes de B7-DC contienen una o más alteraciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, deleciones o inserciones) dentro de las cadenas β A', C, C', C'', D, E, F o G. En una realización preferida, las variantes de B7-DC contienen una o más alteraciones de aminoácidos en la cadena β G. En otra realización de las divulgaciones, los fragmentos de polipéptido de B7-DC variante incluyen los dominios IgC e IgV de B7-DC. En otra realización de las divulgaciones, los fragmentos de polipéptido de B7-DC variante incluyen el dominio IgV de B7-DC.

30 Las proteínas B7-DC humanas y de ratón contienen un dominio intracitoplasmático corto, un único dominio transmembrana y un dominio extracelular. El dominio extracelular contiene dos dominios Ig; un dominio IgC proximal a la membrana y un dominio IgV distal a la membrana. Los fragmentos útiles de polipéptidos de B7-DC variantes incluyen fragmentos solubles. Los fragmentos de B7-DC solubles son fragmentos de B7-DC que pueden expulsarse, secretarse o extraerse de otro modo de las células productoras. En una realización, los fragmentos de polipéptido de B7-DC variante de la proteína de fusión incluyen el dominio extracelular completo de B7-DC. El dominio extracelular de B7-DC incluye los aminoácidos desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente el aminoácido 221 de B7-DC murino o humano o fragmentos activos de los mismos. En otra realización, los fragmentos de polipéptido de B7-DC variante incluyen los dominios IgC e IgV de B7-DC. En otra realización, los fragmentos de polipéptido de B7-DC variante incluyen el dominio IgV de B7-DC.

40 Se piensa que la señalización de PD-1 requiere la unión a un ligando de PD-1 (normalmente B7-H1) en estrecha proximidad a un antígeno peptídico presentado por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Freeman Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 105:10275-10276 (2008)). Por tanto, proteínas, anticuerpos o moléculas pequeñas que impiden la unión conjunta de PD-1 y TCR en la membrana de células T son antagonistas de PD-1 útiles contemplados por esta invención.

45 El antagonista de PD-1 de las divulgaciones útil en los métodos y las composiciones de la invención incluye fragmentos de la proteína B7-DC que incorporan el ECD. Alternativamente, los fragmentos de B7-DC incluyen parte del dominio extracelular que comprende el dominio IgV o un dominio de tipo IgV, preferiblemente los aminoácidos 20-221, más preferiblemente 20-121, que son suficientes para unirse al receptor de PD-1 para interferir con, o impedir, o reducir de otro modo la transducción de señales inhibitorias a través del receptor de PD-1. En una realización preferida de la invención, el fragmento de B7-DC de la proteína de fusión compite con B7-H1 por la unión a receptores de PD-1.

55 En una realización, los fragmentos de polipéptido de B7-DC variante de la proteína de fusión pueden contener una región del polipéptido que es importante para la unión a PD-1. Estos fragmentos de polipéptido pueden ser útiles para competir por la unión a PD-1 y para impedir que B7-DC nativo se una a PD-1. Al competir por la unión a PD-1, estos fragmentos pueden ser útiles para potenciar una respuesta inmunitaria, ya que inhibir interacciones de B7-H1 y B7-DC con PD-1 inhibe la supresión de respuestas inmunitarias que se produciría de otro modo. Un fragmento de polipéptido de B7-DC de ratón o humano que puede unirse de manera competitiva a PD-1 puede contener, por

ejemplo, los aminoácidos 101-108 ó 110-114. La unión de B7-DC de tipo natural a PD-1 se inhibe normalmente en al menos el 50 por ciento, el 60 por ciento, el 70 por ciento, el 75 por ciento, el 80 por ciento, el 90 por ciento, el 95 por ciento o más del 95 por ciento en comparación con el nivel de unión de B7-DC de tipo natural a PD-1 en ausencia de un fragmento de dicho B7-DC de tipo natural. Los fragmentos de B7-DC a modo de ejemplo útiles en los métodos y/o las composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan de ninguna manera a, los siguientes dominios extracelulares de B7-DC:

Dominio extracelular (ECD) de B7-DC humano:

LFTVTVPKEL YIIEHGSNVT LECNFDTGSH VNLGAITASL QKVENDTSPH RERATLLEEQ	60
LPLGKASFHI PQVQVRDEGQ YQCIIYGVVA WDKYKLTILKV KASYRKINTH ILKVPETDEV	120
ELTCQATGYF LAEVSQPNVS VPANTSHSRT PEGLYQVTSV LRLKPPFGRN FSCVFNTHV	180
RELTASIDL QSQMEPRTHP TW	202

(SEQ ID NO:3)

y ECD de B7-DC murino:

LFTVTAPKEV YTVDVGSVSVS LECDFDRREC TELEGRASL QKVENDTSLQ SERATLLEEQ	60
LPLGKALFHI PSVQVRDSGQ YRCLVICGAA WDKYKLTIVKV KASYMRIDTR ILEVPGTGEV	120
QLTCQARGYP LAEVSQPNVS VPANTSHIRT PEGLYQVTSV LRLKQPSPRN FSCMFWNAHM	180
KELTSAIIDP LSRMEPKVPR TW	202

(SEQ ID NO:4)

EDC de B7-DC de mono cynomolgus:

LFTVTVPKEL YIIEHGSNVT LECNFDTGSH VNLGAITASL QKVENDTSPH RERATLLEEQ	60
LPLGKASFHI PQVQVRDEGQ YQCIIYGVVA WDKYKLTILKV KASYRKINTH ILKVPETDEV	120
ELTCQATGYF LAEVSQPNVS VPANTSHSRT PEGLYQVTSV LRLKPPFGRN FSCVFNTHV	180
RELTASIDL QSQMEPRTHP TW	202

(Seq ID NO: 15)

Se proporcionan muchas otras secuencias de primate útiles en los métodos y las composiciones de la invención en Onlamoon *et al.*, Immunology, vol. 124, págs. 277-293 (2008).

Un antagonista de PD-1 útil en las composiciones y los métodos de las divulgaciones también incluye una proteína de fusión (tal como se describe a continuación) que comprende porciones polipeptídicas primera y segunda, en el que dicha proteína de fusión, o al menos la primera porción polipeptídica de la misma, presenta actividad de antagonista de PD-1, especialmente en el que dicha proteína de fusión se une a, y bloquea, PD-1 o se une a, y bloquea, un ligando de PD-1. La primera porción polipeptídica de tal proteína de fusión puede comprender, o consistir en, cualquiera de los polipéptidos antagonistas de PD-1, o fragmentos de unión a PD-1 de los mismos, citados de otro modo en el presente documento para su uso como antagonistas de PD-1 en los métodos de las divulgaciones. En una realización preferida de una proteína de fusión de este tipo, la primera porción polipeptídica citada es N-terminal con respecto a la segunda porción polipeptídica citada. En una realización separada de las divulgaciones, la primera porción polipeptídica citada está unida a la segunda porción polipeptídica citada mediante un oligopéptido además de los aminoácidos que componen las porciones polipeptídicas primera y segunda citadas, en las que dichos aminoácidos de unión no disminuyen sustancialmente la actividad antagonista de PD-1 de dicha proteína de fusión.

En una proteína de fusión dimérica preferida, el dímero resulta de la unión covalente de residuos de Cys en las regiones CH de dos de las cadenas pesadas de Ig que son los mismos residuos de Cys que están unidos mediante unión disulfuro en cadenas pesadas de Ig normales dimerizadas.

En la técnica se conoce bien un gran número de secuencias de polipéptido que se usan de manera rutinaria como parejas de unión de proteínas de fusión. Los ejemplos de parejas de unión a polipéptidos útiles incluyen, pero no se limitan a, proteína verde fluorescente (GFP), glutatión S-transferasa (GST), polihistidina, myc, hemaglutinina, etiqueta Flag™ (Kodak, New Haven, CT), proteína de unión a maltosa E y proteína A.

Todavía otra realización proporciona un constructo tetramérico que tiene un sustrato BirA fusionado con el dominio extracelular de un polipéptido de B7-DC variante. En la técnica se conocen métodos para preparar constructos tetraméricos (véase Pertovas, *et al.*, J. Exp. Med., 203:2281 (2006)).

Proteínas de fusión de B7-DC murino a modo de ejemplo contienen los aminoácidos 20-221 de B7-DC murino

5 fusionados con los aminoácidos 237-469 de IgG2a murina (CAA49868). En un ejemplo no limitativo, proteínas de fusión de B7-DC humano contienen los aminoácidos 20-221 de B7-DC humano fusionados con los aminoácidos 245-476 de IgG1 humana (AAA02914). Los péptidos señal para proteínas de fusión de B7-DC incluyen los péptidos señal endógenos o cualquier otro péptido señal que facilita la secreción de la proteína de fusión a partir de un huésped. En otra realización de las divulgaciones, el primer polipéptido incluirá sólo el dominio IgV. Otras realizaciones pueden comprender el dominio Fc y bisagra de un anticuerpo IgG, tal como IgG1, con ninguna de las regiones variables presente. Otras realizaciones incluyen el uso de la bisagra y la región Fc de IgG2 o IgG4, especialmente que tiene una mutación N297Q u otra mutación que reduce la función efectora.

10 Según los métodos y las composiciones de las divulgaciones, el polipéptido útil como antagonista de PD-1, o la primera porción polipeptídica de una proteína de fusión útil como antagonista de PD-1, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 60%, o al menos el 65%, o al menos el 70%, o al menos el 75%, o al menos el 80%, o al menos el 85%, o al menos el 90%, o al menos el 95%, o al menos el 99% con respecto a los aminoácidos 1-221 de SEQ ID NO: 1, preferiblemente los aminoácidos 20-221 de SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 26-221 de SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 1-202 de SEQ ID NO: 3 ó 4, más preferiblemente los aminoácidos 20-121 de SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos 1-102 de SEQ ID NO: 3 ó 4.

20 En una realización de las divulgaciones, un polipéptido útil como antagonista de PD-1, o la primera porción polipeptídica de una proteína de fusión útil como antagonista de PD-1, consiste en los aminoácidos 1-221 de SEQ ID NO: 1, o consiste en los aminoácidos 20-221 de SEQ ID NO: 1, o consiste en los aminoácidos 26-221 de SEQ ID NO: 1, o consiste en los aminoácidos 1-202 de SEQ ID NO: 3 ó 4. En una realización (SEQ ID NO: 2), no comprende los aminoácidos 1-19 de SEQ ID NO: 1.

25 En otros ejemplos específicos, un polipéptido antagonista de PD-1, o la primera porción polipeptídica de una proteína de fusión antagonista de PD-1, comprende la secuencia de aminoácidos 20-121 de SEQ ID NO: 1, preferiblemente en la que comprende la secuencia de aminoácidos WDYKY en los residuos 110-114 de la misma, o en la que comprende los aminoácidos 1-102 de SEQ ID NO: 3, preferiblemente en la que comprende la secuencia de aminoácidos WDYKY en los residuos 91-95 de la misma.

30 En una realización preferida, tales identidades en porcentaje se alcanzan basándose en sustituciones de aminoácidos conservativas tal como se define en otra parte en el presente documento.

35 En una realización de este tipo, el polipéptido antagonista de PD-1, o la primera porción polipeptídica de una proteína de fusión antagonista de PD-1, no comprende los aminoácidos 1-19 de SEQ ID NO: 1, o no comprende ninguna porción de un dominio transmembrana, especialmente no la totalidad de tal dominio, o no comprende ninguna porción del dominio intracelular (o soluble), especialmente no la totalidad de tal dominio, de un ligando de PD-1 u otra proteína antagonista de PD-1. En una realización preferida, tal antagonista, o la primera porción polipeptídica, sólo comprende el dominio extracelular (ECD) de SEQ ID NO: 1 y por tanto sólo comprende una porción soluble del polipéptido de dicha secuencia, o un fragmento de dicha porción soluble.

40 En otras realizaciones de este tipo de las divulgaciones, el polipéptido antagonista de PD-1, o la primera porción polipeptídica de una proteína de fusión antagonista de PD-1, comprende el dominio IgV, o dominio de tipo IgV, o fragmento de unión a PD-1 del mismo, de un ligando de PD-1, o consiste en el dominio IgV, o dominio de tipo IgV, o fragmento de unión a PD-1 del mismo, de un ligando de PD-1. En ejemplos específicos, tal ligando de PD-1 es una molécula de B7-H1 o de B7-DC de tipo natural, preferiblemente molécula de B7-H1 o de B7-DC de tipo natural de ratón o de primate, preferiblemente humana.

50 En otras realizaciones de este tipo de las divulgaciones, el polipéptido antagonista de PD-1, o la primera porción polipeptídica de una proteína de fusión antagonista de PD-1, un fragmento de unión a PD-1 del dominio IgV, o dominio de tipo IgV, de un ligando de PD-1, especialmente en el que el dominio IgV, o dominio de tipo IgV, consiste en los aminoácidos 20 - 121 de SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos 1 - 102 de SEQ ID NO: 3.

55 Un antagonista de PD-1 de la invención también incluye un fragmento de unión a PD-1 de los aminoácidos 20-121 de SEQ ID NO: 1 (longitud completa humana), o tal como se da a conocer en el presente documento, pero no se reivindica, los aminoácidos 1-102 de SEQ ID NO: 3 (dominio extracelular o ECD).

60 En realizaciones específicas del mismo, el polipéptido o fragmento de unión a PD-1 también incorpora aminoácidos WDYKY en los residuos 110-114 de SEQ ID NO: 1 o WDYKY en los residuos 91-95 de SEQ ID NO: 3. A modo de ejemplos no limitativos dados a conocer en el presente documento, pero no reivindicados, un fragmento de unión a PD-1 de este tipo comprende al menos 10, o al menos 20, o al menos 30, o al menos 40, o al menos 50, o al menos 60, o al menos 70, o al menos 75, o al menos 80, o al menos 85, o al menos 90, o al menos 95, o al menos 100 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos 20-121 de SEQ ID NO: 1, en el que una realización preferida de cada fragmento de unión a PD-1 de este tipo comprenderá como subfragmento los aminoácidos WDYKY encontrados en los residuos 110-114 de SEQ ID NO: 1 o WDYKY en los residuos 91-95 de SEQ ID NO: 3.

65 Otros polipéptidos y fragmentos de unión a PD-1 preferidos específicamente contemplados por la invención incluyen

la secuencia de polipéptido de los aminoácidos 20-121 de SEQ ID NO: 1 (longitud completa humana) y fragmentos de unión a PD-1 del mismo, en los que, en tal polipéptido o fragmento de unión a PD-1, está presente una cisteína en los residuos 42 y/o 102, prefiriéndose una cisteína en ambas posiciones, y/o en los que está presente una fenilalanina en el residuo 21, y/o en los que está presente un ácido glutámico en el residuo 28, y/o en los que está presente una treonina, y/o en los que está presente una glutamina en el residuo 60, y/o en los que está presente un ácido glutámico en el residuo 101, y/o en los que está presente una isoleucina en el residuo 103, y/o en los que está presente una isoleucina en el residuo 105, y/o en los que está presente una glicina en el residuo 107, y/o en los que está presente una valina en el residuo 108, y/o en los que está presente un triptófano en el residuo 110, y/o en los que está presente un ácido aspártico en el residuo 111, y/o en los que está presente una tirosina en el residuo 112, y/o en los que está presente una lisina en el residuo 113, y/o en los que está presente una tirosina en el residuo 114, siempre que, en el caso de fragmentos de unión a PD-1, dicho fragmento sea lo bastante grande como para incluir tales posiciones de aminoácido.

Los polipéptidos y fragmentos de unión a PD-1 preferidos adicionales, específicamente contemplados por las divulgaciones, incluyen la secuencia de polipéptido de los aminoácidos 1-102 de SEQ ID NO: 3 (ECD humano) o SEQ ID NO: 4 (ECD murino) y fragmentos de unión a PD-1 de las mismas, en los que, en tal polipéptido o fragmento de unión a PD-1, está presente una cisteína en los residuos 23 y/o 83, prefiriéndose una cisteína en ambas posiciones, y/o en los que está presente una fenilalanina en el residuo 2, y/o en los que está presente un ácido glutámico en el residuo 9, y/o en los que está presente una treonina o arginina en el residuo 37, prefiriéndose treonina, y/o en los que está presente una glutamina en el residuo 41, y/o en los que está presente una arginina en el residuo 82, y/o en los que está presente una leucina en el residuo 84, y/o en los que está presente una isoleucina en el residuo 86, y/o en los que está presente una glicina en el residuo 88, y/o en los que está presente una alanina en el residuo 89, y/o en los que está presente un triptófano en el residuo 91, y/o en los que está presente un ácido aspártico en el residuo 92, y/o en los que está presente una tirosina en el residuo 93, y/o en los que está presente una lisina en el residuo 94, y/o en los que está presente una tirosina en el residuo 95, siempre que, en el caso de fragmentos de unión a PD-1, dicho fragmento sea lo bastante grande como para incluir tales posiciones de aminoácido.

En realizaciones adicionales, cualquiera de los polipéptidos anteriores también puede incorporar porciones o fragmentos, por ejemplo, de desde 1 hasta 10 aminoácidos contiguos, extraídos de los dominios señal, transmembrana o C-terminal del polipéptido de B7-DC o de B7-H1, tal como el de ratón o primate, preferiblemente de ser humano.

Tales polipéptidos y/o fragmentos de unión a PD-1 también pueden estar presentes en cualquiera de las proteínas de fusión de la invención, por ejemplo, en las que tal polipéptido o fragmento de unión a PD-1 representa el "primer polipéptido" de tal proteína de fusión.

En ejemplos específicos, la molécula, combinada con un agente de potenciación para su uso en un régimen de tratamiento de la invención, comprende un fragmento de unión a PD-1 de los aminoácidos 20-221 de SEQ ID NO: 1. En una realización de este tipo, el fragmento es de los aminoácidos 20 - 121 de SEQ ID NO: 1, preferiblemente en el que el fragmento contiene los aminoácidos 110-114 de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, está presente más de un fragmento de este tipo (tal como se describe en otra parte en el presente documento) y la molécula comprende al menos 2, 3, 4, 5 o más fragmentos de una proteína B7-DC, especialmente en la que el fragmento es parte de, o contiene parte de, los aminoácidos 20-221 de SEQ ID NO: 1. En una realización preferida de la misma, al menos uno de dichos fragmentos es de los aminoácidos 20 - 121 de SEQ ID NO: 1, más preferiblemente en la que al menos uno de dichos fragmentos incluye los aminoácidos 110-114 de SEQ ID NO: 1 (es decir, la secuencia WDYKY (SEQ ID NO: 14)). En realizaciones preferidas de las divulgaciones, el fragmento de unión a PD-1 comprende al menos 10, o al menos 25, o al menos 50, o al menos 75, o al menos 100 aminoácidos contiguos de longitud.

El péptido señal humano endógeno tiene la siguiente secuencia MIFLLMLSL ELQLHQIAA (SEQ ID NO: 5) y representa los 19 primeros aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En determinadas realizaciones de las divulgaciones, los fragmentos de polipéptido de B7-DC pueden incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 aminoácidos contiguos del péptido señal endógeno o heterólogo (que pueden usarse para producir un polipéptido de B7-DC recombinante mediante expresión en, y secreción desde, una célula transformada). También se apreciará que un polipéptido de B7-DC útil puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 aminoácidos contiguos del dominio transmembrana de B7-DC, y/o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 aminoácidos contiguos del dominio citoplasmático, o combinaciones de los mismos siempre que el fragmento de B7-DC conserve la capacidad para antagonizar el receptor de PD-1.

Los fenotipos de ratones PD-1^{-/-} proporcionan evidencias directas de que PD-1 es un regulador negativo de respuestas inmunitarias *in vivo*. En ausencia de PD-1, los ratones con el contexto C57BL/6 desarrollan lentamente una glomerulonefritis de tipo lupus y artritis progresiva (Nishimura, *et al.*, *Immunity*, 11:141-151 (1999)). Los ratones PD-1^{-/-} con el contexto BALB/c desarrollan rápidamente una cardiomiopatía dilatada autoinmunitaria mortal (Nishimura, *et al.*, *Science*. 291:319-322 (2001)). Sin embargo, evidencias sustanciales indican que B7-DC puede funcionar para coestimular la activación de respuestas de células T. En presencia de señales de TCR inferiores a las óptimas, B7-DC provoca un aumento de la proliferación y producción de citocinas *in vitro* (Tseng, *et al.*, *J. Exp. Med.*

193:839-846 (2001)). Por otro lado, estudios *in vitro* indican un papel regulador negativo para B7-DC en respuestas de células T. Estos datos aparentemente contradictorios se interpretan mejor mediante la expresión de receptores adicionales para B7-DC en células T distintos de PD-1.

- 5 Por tanto, las proteínas B7-DC, variantes, fragmentos y fusiones de las mismas, pueden tener la ventaja de potenciar directamente respuestas de células T uniéndose a un receptor desconocido que activa la célula T, además de potenciar las respuestas de células T impidiendo la transducción de señales inhibitoras mediada por PD-1.

2. Polipéptidos de B7-H1

10 En otra realización de las divulgaciones, el compuesto para su uso en combinación con un agente de potenciación en el régimen de tratamiento de la invención es, o comprende, un fragmento de un B7-H1 de mamífero, preferiblemente de ratón o primate, preferiblemente de ser humano, en el que dicho fragmento se une a, y bloquea, PD-1 pero no da como resultado la transducción de señales inhibitoras a través de PD-1 y dicho fragmento tiene al menos 10, o al menos 20, o al menos 30, o al menos 40, o al menos 50, o al menos 60, o al menos 70, o al menos 80, o al menos 90, o al menos 100 aminoácidos contiguos de longitud. En otras realizaciones de las divulgaciones, el fragmento puede ser de longitud variable siempre que tenga la función de unirse a PD-1 pero no produzca la transducción de señales inhibitoras que da como resultado la reducción de la proliferación de células T. Tales fragmentos de B7-H1 también encuentran uso como parte de la primera porción polipeptídica de proteínas de fusión de las divulgaciones.

Las secuencias de B7-H1 son las siguientes:

Polipéptido de B7-H1 humano (SEQ ID NO. 16):

25
 MRIFAVFIEM TYWHLNNAFT VTPKDLVYV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME 60
 DKNIIQFVHG EEDLKVQHS YRQRARLLKD QLSLGNAAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG 120
 ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT 180
 TTNSKREEKL FNVSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVIPPELP LAHPPNERTH 240
 LVILGAILLC LGVALTFIFR LRKGRMDVK KCGIQDTNSK QSDTHLEET 290

B7-H1 murino (SEQ ID NO: 17)

MRIFAGIIFT ACCHLLRAFT ITAPKDLVYV EYGSNVTMEC RFPVERELDL LALVYWEKE 60
 DEQVIQFVAG EEDLKPQHSN FRGRASLPKD QLLKGNAAALQ ITDVKLQDAG VYCCIISYGG 120
 ADYKRITLKV NAPYRKINQR ISVDPATSEH ELICQAEQYP EAEVIWTNSD HQPVSGKRSV 280
 TTSRTEGMLL NVTSSLRVNA TANDVFYCTF WRSQPGQNHT AELIPELPA THPPQNRTHW 240
 30 VLLGSILLFL IVVSTVLLFL RKQVRMLDVE KCGVEDTSSK NRNDTQFEET 290

PD-L1 de *Macaca mulatta* (SEQ ID NO: 18)

MRIFAVFIFT IYWHLNNAFT VTPKDLVYV EYGSNMTIEC RFPVEKQLGL 60
 TSLIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSN YRQRAQLLKD QLSLGNAAALR 120
 ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE 180
 HELTCQAEY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL LNVSTLRIN 240
 TTANEIFYCI FRRLGPEENH TAEVIPPELP LALPPNERTH LVILGAIFFL 300
 35 LGVALTFIFY LRKGRMDMK KSGIRVTNSK KQRDTQLEET 340

En el documento WO/2001/014557 (publicado el 1 de marzo de 2001) y en el documento WO/2002/079499 (publicado el 10 de octubre de 2002) se describen proteínas B7-H1-Ig.

3. PD-1 y otros polipéptidos

40 Otros polipéptidos útiles de las divulgaciones incluyen aquellos que se unen a los ligandos del receptor de PD-1. Estos incluyen la proteína de receptor de PD-1, o fragmentos solubles de la misma, que pueden unirse a los ligandos de PD-1, tales como B7-H1 o B7-DC, e impedir la unión al receptor de PD-1 endógeno, impidiendo así la transducción de señales inhibitoras. También se ha mostrado que B7-H1 se une a la proteína B7.1 (Butte *et al.*, Immunity, vol. 27, págs. 111-122, (2007)). Tales fragmentos también incluyen la porción de ECD soluble de la proteína PD-1 que incluye mutaciones, tales como la mutación A99L, que aumenta la unión a los ligandos naturales (Molnar *et al.*, Crystal structure of the complex between programmed death-1 (PD-1) and its ligand PD-L2, PNAS,

vol. 105, págs. 10483-10488 (29 de julio de 2008)). B7-1 o fragmentos solubles del mismo, que pueden unirse al ligando B7-H1 e impedir la unión al receptor de PD-1 endógeno, impidiendo así la transducción de señales inhibitoras, también son útiles.

5 Polipéptidos de PD-1 útiles en los métodos de las divulgaciones son los siguientes:

PD-1 humana (SEQ ID NO: 19)

MQIPQAPWPV VWAFLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPTFFPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS	60
ESFVLNWyRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFVRTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT	120
YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS	180
LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP	240
CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL	288

10

PD-1 de mono cynomolgus (SEQ ID NO: 20)

MQIPQAPWPV VWAFLQLGWR PGWFLESPDR PWNAPTFFSPA LLLVTEGDNA TFTCSFSNAS	60
ESFVLNWyRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFVRTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT	120
YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS	180
LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP	240
CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL	288

15 Según las divulgaciones, dado que B7-1 y fragmentos del mismo también pueden unirse a B7-H1 y enviar transducciones inhibitoras a células T a través de B7-H1, el bloqueo de esta interacción también puede reducir la transducción de señales inhibitoras que se produce a través de B7-H1. Los compuestos para su uso en las divulgaciones incluyen aquellas moléculas que bloquean este tipo de interacción. Tales moléculas se han dado a conocer en Butte *et al* (2007), citado anteriormente, e incluyen anticuerpos anti-B7-H1 con especificidad doble que
20 bloquean cualquiera de la interacción B7-H1:B7-1 y la B7-H1:PD-1 así como anticuerpos que muestran especificidad única que bloquean la interacción PD-L1:B7-1. Los compuestos que bloquean esta interacción mediante el bloqueo de B7-1 también son útiles, e incluyen anticuerpos anti-B7-1.

4. Polipéptidos variantes

25

Los polipéptidos útiles en las divulgaciones, tal como se describe, incluyen aquellos que están mutados para contener una o más sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos. En la técnica se conocen métodos para la mutagénesis. Los polipéptidos mutados o variantes inhiben o reducen la transducción de señales inhibitoras a través de receptores de PD-1 mediante la unión a ligandos de PD-1. Alternativamente, las variantes (por ejemplo polipéptidos de B7-DC) pueden unirse al receptor de PD-1 e inhibir, reducir o bloquear la transducción de señales inhibitoras a través del receptor de PD-1. Los polipéptidos variantes pueden ser de cualquier especie de origen. En una realización de las divulgaciones, el polipéptido variante es de una especie de mamífero. En una realización preferida, el polipéptido variante es de origen murino o de primate, preferiblemente humano.

30

35 En una realización, el polipéptido variante es un polipéptido de B7-DC que tiene la misma afinidad de unión a PD-1 que B7-DC de tipo natural o no variante pero que no tiene, o tiene menos del 10% de, la capacidad para desencadenar la transducción de señales inhibitoras a través del receptor de PD-1 con respecto a un polipéptido de B7-DC no mutado. En otras realizaciones, el polipéptido de B7-DC variante tiene el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50% o el 60% más de afinidad de unión a PD-1 que B7-DC de tipo natural sin desencadenar la transducción de
40 señales inhibitoras de PD-1.

Un polipéptido variante (por ejemplo un polipéptido de B7-DC variante) incluye aquellos que tienen cualquier combinación de sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos siempre que no se reduzca sustancialmente la actividad de antagonizar PD-1 con respecto al tipo natural. Sin embargo, cuando hay una reducción de este tipo,
45 no debe ser de más de la mitad de la del tipo natural de modo que dicha variante tiene al menos 50% de la actividad antagonista de PD-1 de la proteína de tipo natural, preferiblemente al menos el 60%, más preferiblemente al menos el 80%, lo más preferiblemente al menos el 90% o el 95%, prefiriéndose especialmente al menos el 100%. Se desean incluso más los aumentos de tal actividad resultantes de dicha variante. En una realización, los polipéptidos variantes de B7-DC aislados tienen alteraciones de aminoácidos de tal manera que su secuencia de aminoácidos
50 comparte una identidad de al menos el 60, el 70, el 80, el 85, el 90, el 95, el 97, el 98, el 99, el 99,5 o el 100% con respecto a una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de B7-DC de tipo natural, especialmente la de un polipéptido de B7-DC de mamífero, preferiblemente murino de tipo natural o de primate de tipo natural, preferiblemente humano.

50

55 La identidad entre secuencias de polipéptidos puede calcularse usando la definición de la identidad en % proporcionada anteriormente en el presente documento.

Las sustituciones de aminoácidos en polipéptidos pueden ser “conservativas” o “no conservativas”.

5 Moléculas de la familia de B7, incluyendo B7-DC, se expresan en la superficie celular con un dominio IgC constante proximal a la membrana y un dominio IgV distal a la membrana. Los receptores para estos ligandos comparten un dominio de tipo IgV extracelular común. Las interacciones de pares de receptor-ligando están mediadas predominantemente a través de residuos en los dominios IgV de los ligandos y receptores. En general, se describe que los dominios IgV tienen dos láminas que contienen, cada una, una capa de cadenas β . Estas cadenas β se denominan A', B, C, C', C", D, E, F y G. En una realización de las divulgaciones, los polipéptidos variantes de B7-DC
10 contienen alteraciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, deleciones o inserciones) dentro de una o más de estas cadenas β en cualquier combinación posible. En otra realización de las divulgaciones, las variantes de B7-DC contienen una o más alteraciones de aminoácidos (es decir, sustituciones, deleciones o inserciones) dentro de las cadenas β A', C, C', C", D, E, F o G. En una realización de las divulgaciones, las variantes de B7-DC contienen una o más alteraciones de aminoácidos en la cadena β G.

15 Con respecto a B7-DC murino o de primate, preferiblemente humano, un polipéptido de B7-DC variante puede contener, sin limitación, sustituciones, deleciones o inserciones en posiciones que no reducen sustancialmente la unión a PD-1 con respecto a B7-DC no mutado.

20 Sin embargo, se entiende que pueden realizarse sustituciones en las posiciones de aminoácido mencionadas usando cualquier aminoácido o análogo de aminoácido. Por ejemplo, las sustituciones en las posiciones mencionadas pueden realizarse con cualquiera de los aminoácidos que se producen de manera natural (por ejemplo, alanina, ácido aspártico, asparagina, arginina, cisteína, glicina, ácido glutámico, glutamina, histidina, leucina, valina, isoleucina, lisina, metionina, prolina, treonina, serina, fenilalanina, triptófano o tirosina).

25 Aunque las sustituciones descritas en el presente documento son con respecto a B7-DC de ratón y de primate, especialmente de ser humano, se indica que un experto habitual en la técnica puede realizar fácilmente alteraciones equivalentes en los polipéptidos correspondientes de otras especies (por ejemplo, rata, hámster, cobaya, jerbo, conejo, perro, gato, caballo, cerdo, oveja, vaca o primate no humano).

30 Los fragmentos preferidos incluyen la totalidad o parte del dominio extracelular de B7-DC eficaz para unirse a PD-1.

En una realización de las divulgaciones, fragmentos de polipéptido de B7-DC variante son aquellos que conservan la capacidad para unirse a PD-1 sin desencadenar la transducción de señales inhibitoras de PD-1. Una realización de las divulgaciones proporciona un polipéptido de B7-DC variante que es un fragmento de B7-DC de longitud completa y tiene normalmente al menos el 20 por ciento, el 30 por ciento, el 40 por ciento, el 50 por ciento, el 60 por ciento, el 70 por ciento, el 80 por ciento, el 90 por ciento, el 95 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, el 100 por ciento, o incluso más del 100 por ciento de la actividad antagonista de PD-1 del polipéptido de B7-DC variante de longitud completa.

40 Los fragmentos útiles de polipéptidos de B7-DC variantes incluyen fragmentos solubles. Los fragmentos de B7-DC solubles son fragmentos de B7-DC que pueden expulsarse, secretarse o extraerse de otro modo de las células productoras. En una realización, los fragmentos de polipéptido de B7-DC variante incluyen el dominio extracelular completo de B7-DC. El dominio extracelular de B7-DC incluye los aminoácidos de aproximadamente 20 a aproximadamente el aminoácido 221 de B7-DC murino o de primate, preferiblemente humano. En otra realización de las divulgaciones, los fragmentos de polipéptido de B7-DC variante incluyen los dominios IgC e IgV de B7-DC. En otra realización, los fragmentos de polipéptido de B7-DC variante incluyen el dominio IgV de B7-DC.

50 En una realización de las divulgaciones, los fragmentos de polipéptido de B7-DC variante contienen una región del polipéptido que es importante para la afinidad de unión a PD-1. Estos fragmentos de polipéptido son útiles para unirse a, y bloquear, el receptor de PD-1 para impedir que ligandos nativos se unan al receptor de PD-1, potenciando así una respuesta inmunitaria. La inhibición de interacciones de B7-H1 o B7-DC nativos con PD-1 inhibe la supresión de respuestas inmunitarias que de lo contrario se producirían. Un fragmento de polipéptido de B7-DC de ratón o primate, preferiblemente de ser humano, que se une a PD-1 contiene, a modo de ejemplo no limitativo, los aminoácidos 101-105 ó 111-113. La unión de B7-H1 al receptor de PD-1 normalmente se inhibe en al menos el 50 por ciento, o en al menos el 60 por ciento, o en al menos el 70 por ciento, o en al menos el 75 por ciento, o en al menos el 80 por ciento, o en al menos el 90 por ciento, o en al menos el 95 por ciento, o más, en comparación con el nivel de unión de B7-H1 a PD-1 en ausencia del fragmento.

60 El mutante A99L de PD-1 humano se une a B7-DC y B7-H1 con mayor afinidad que PD-1 humano sin mutar (Lazar Molnar *et al*/ PNAS 105, págs. 10483-10488 (2008)). En una realización de las divulgaciones, el compuesto que actúa para reducir la transducción de señales inhibitoras es una proteína soluble, tal como el ECD de PD-1 que incorpora esta mutación.

65 5. Polipéptidos modificados

Los polipéptidos útiles en las divulgaciones, tal como se describe, incluyendo variantes, homólogos y fragmentos de los mismos, pueden modificarse mediante restos químicos encontrados asociados con polipéptidos en el entorno celular normal, por ejemplo, mediante fosforilación, metilación, amidación, sulfatación, acilación, glicosilación, sumoilación y ubiquitinación del polipéptido.

5 Tales polipéptidos también pueden modificarse mediante restos químicos que no son normalmente parte de polipéptidos en un entorno celular. Tales modificaciones pueden introducirse en la molécula haciendo reaccionar residuos de aminoácido seleccionados como diana del polipéptido con un agente de derivatización orgánico que puede reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o residuos terminales. Otra modificación útil es la ciclización de la proteína. Tales modificaciones también incluyen la introducción de una etiqueta que puede proporcionar una señal detectable, ya sea directa o indirectamente, incluyendo, pero sin limitarse a, radioisótopos y compuestos fluorescentes.

15 Ejemplos de derivados químicos de los polipéptidos incluyen residuos lisinilo y amino-terminales derivatizados con anhídrido de ácido succínico u otros anhídridos de ácido carboxílico. La derivatización con un anhídrido carboxílico cíclico tiene el efecto de invertir la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar residuos que contienen amino incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; hidruro de boro y cloro; ácido trinitrobenzenosulfónico; O-metilourea; 2,4-pentanodiona; y reacción con glioxilato catalizada por transaminasa. Grupos laterales carboxilo, aspartilo o glutamilo, pueden modificarse selectivamente mediante reacción con carbodiimidas (R-N=C=N--R') tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-
20 etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, pueden convertirse residuos de aspartilo y glutamilo en residuos de asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con amoníaco. Los polipéptidos de la invención también pueden incluir uno o más D-aminoácidos que sustituyen a uno o más L-aminoácidos.

25 En otras realizaciones de las divulgaciones, el agente de potenciación, tal como CTX, puede ser en sí mismo parte del compuesto que reduce la transducción de señales inhibitoras, tal como cuando el agente de potenciación está químicamente unido a un antagonista de PD-1 de las divulgaciones.

6. Proteínas de fusión

30 También se proporcionan polipéptidos de fusión que tienen una primera pareja de fusión, o porción polipeptídica, que comprende la totalidad o una parte de una proteína antagonista de PD-1, por ejemplo un polipéptido de B7-DC (incluyendo variantes, homólogos y fragmentos del mismo) fusionada (i) directamente a un segundo polipéptido o, (ii) opcionalmente, fusionada a una secuencia de péptido ligador que está fusionada al segundo polipéptido. La presencia de la pareja de fusión puede alterar, por ejemplo, la solubilidad, afinidad y/o valencia del polipéptido antagonista de PD-1. Las proteínas de fusión dadas a conocer incluyen cualquier combinación de alteración de aminoácidos (es decir, sustitución, delección o inserción), fragmento y/o modificación de un polipéptido antagonista de PD-1 tal como se describió anteriormente. En una realización, las proteínas de fusión de B7-DC incluyen el dominio extracelular de una proteína B7-DC como primera pareja de unión. En otra realización de las divulgaciones, tales proteínas de fusión de B7-DC incluyen el dominio IgV e IgC de una proteína B7-DC como primera pareja de unión. En otra realización de las divulgaciones, las proteínas de fusión de B7-DC variantes incluyen el dominio IgV de una proteína B7-DC como primera pareja de unión.

45 Primeras parejas de fusión representativas incluyen polipéptido de B7-DC de primate, preferiblemente humano, o murino, fragmentos del mismo, y variantes del mismo, dados a conocer anteriormente en el presente documento. Los fragmentos preferidos incluyen el dominio extracelular de B7-DC. Tal como se menciona, el dominio extracelular puede incluir 1-10 aminoácidos contiguos de un péptido señal, dominio transmembrana de B7-DC, o ambos.

50 En una realización de las divulgaciones, las composiciones y/o los productos y/o los métodos de la invención usan antagonista de receptor de PD-1, especialmente polipéptidos, incluyendo variantes, homólogos y fragmentos de los mismos, que se acoplan a otros polipéptidos para formar proteínas de fusión que antagonizan el receptor de PD-1 mediante unión a un ligando de PD-1, tal como B7-H1, inhibiendo así que el ligando interactúe con PD-1. En otra realización de las divulgaciones, se acoplan polipéptidos antagonistas de receptor de PD-1, o variantes de los mismos, a otros polipéptidos para formar proteínas de fusión que antagonizan el receptor de PD-1 uniéndose a, y
55 bloqueando, el receptor de PD-1 e inhiben o reducen la transducción de señales inhibitoras a través de PD-1.

La segunda pareja de unión de polipéptido, o segunda porción polipeptídica, puede ser N-terminal o C-terminal con respecto al polipéptido antagonista de PD-1. En una realización preferida de las divulgaciones, el segundo polipéptido es C-terminal con respecto al polipéptido antagonista de PD-1.

60 En una realización preferida, la proteína de fusión contemplada para su uso en las composiciones y/o los productos de la invención comprende al menos una porción de un anticuerpo. Con la llegada de métodos de biología molecular y tecnología recombinante, ahora es posible producir moléculas de anticuerpo mediante medios recombinantes y así generar secuencias génicas que codifican para secuencias de aminoácidos específicas encontradas en la estructura polipeptídica de los anticuerpos. Tales anticuerpos pueden producirse o bien mediante clonación de las secuencias génicas que codifican para las cadenas polipeptídicas de dichos anticuerpos o bien mediante síntesis directa de
65

dichas cadenas polipeptídicas, con ensamblaje *in vitro* de las cadenas sintetizadas para formar estructuras tetraméricas activas (H₂L₂) con afinidad por epítomos y determinantes antigénicos específicos. Esto ha permitido la fácil producción de anticuerpos que tienen secuencias características de anticuerpos neutralizantes a partir de diferentes especies y fuentes.

5 Independientemente de la fuente de los anticuerpos, o cómo se construyen de manera recombinante, o cómo se sintetizan, *in vitro* o *in vivo*, usando animales transgénicos, tales como vacas, cabras y ovejas, usando cultivos de célula grandes de tamaño de laboratorio o comercial, en biorreactores o mediante síntesis química directa sin emplear ningún organismo vivo en ninguna fase del procedimiento, todos los anticuerpos tienen una estructura tridimensional global similar. Esta estructura viene dada con frecuencia como H₂L₂ y se refiere al hecho de que los anticuerpos comprenden comúnmente 2 cadenas de aminoácidos ligeras (L) y 2 cadenas de aminoácidos pesadas (H). Ambas cadenas tienen regiones que pueden interactuar con una diana antigénica estructuralmente complementaria. Las regiones que interactúan con la diana se denominan regiones "variables" o "V" y se caracterizan por diferencias en la secuencia de aminoácidos con respecto a anticuerpos de diferente especificidad antigénica.

En realizaciones preferidas de las divulgaciones, los polipéptidos antagonistas de receptor de PD-1, incluyendo fragmentos, mutantes y otras variantes, tienen una primera pareja de fusión que tiene la totalidad o una parte de una proteína B7-DC o variante de la misma fusionada (i) directamente a un segundo polipéptido o, (ii) opcionalmente, fusionada a una secuencia de péptido ligador que está fusionada al segundo polipéptido. La presencia de la pareja de fusión puede alterar la solubilidad, afinidad y/o valencia del polipéptido de B7-DC. En realizaciones más preferidas, se fusionan polipéptidos de B7-DC a uno o más dominios de una región constante de cadena pesada de Ig, más preferiblemente una secuencia de aminoácidos correspondiente a las regiones de bisagra, C_{H2} y C_{H3} de una cadena de inmunoglobulina C_{γ1} humana o a las regiones de bisagra, C_{H2} y C_{H3} de una cadena de inmunoglobulina C_{γ2a} murina. En una realización preferida, la región constante incluye preferiblemente una mutación (por ejemplo N297Q) para eliminar o reducir la unión a receptor de Fc.

Las regiones de bisagra, C_{H2} y C_{H3} de una cadena de inmunoglobulina C_{γ1} humana tienen la siguiente secuencia de aminoácidos:

30

EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF	60
NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT	120
ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP	180
PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK	232

(SEQ ID NO:6).

Las regiones de bisagra, C_{H2} y C_{H3} de una cadena de inmunoglobulina C_{γ2a} murina tienen la siguiente secuencia de aminoácidos:

35

EPRGPTIKPC PPCKCPAPNL LGGPSVFIFP PKIKDVLMS LSPIVTCVVV DVSEDDPDVQ	60
ISWFEVNNVEV HTAQTQTHRE DYNSTLRVVS ALPIQHQDWM SGKEFKCKVN NKDLPAPIER	120
TISKPKGQSVR APQVYVLPSP EEEMTKKQVT LTCMVTDFMP EDIYVEWTNN GKTELNYKNT	180
EPVLDSGDSY FMYSKLRVEK KNWVERNSYS CSVVHEGLHN HHTTKSFSRT PGK	233

(SEQ ID NO:7)

Las proteínas de fusión de B7-DC murino a modo de ejemplo contienen los aminoácidos 20-221 de B7-DC murino fusionados a los aminoácidos 237-469 de IgG2a murina (CAA49868). Las proteínas de fusión de B7-DC humano pueden contener los aminoácidos 20-221 de B7-DC humano fusionados a los aminoácidos 245-476 de IgG1 humana (AAA02914). Los péptidos señal para proteínas de fusión de B7-DC pueden ser los péptidos señal endógenos o cualquier otro péptido señal que facilita la secreción de la proteína de fusión a partir de un huésped.

Una proteína de fusión de B7-DC-Ig murina representativa se codifica por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 8.

Se apreciará que las secuencias de ácido nucleico dadas a conocer pueden someterse a optimización de codones para aumentar los niveles de expresión para sintetizar las proteínas de fusión útiles en los métodos y las composiciones de la presente invención. En la técnica se conocen métodos para la optimización de codones.

50 La proteína de fusión de B7-DC-Ig murina codificada por SEQ ID NO: 8 tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MLLLLPIIINL SIQLHPVAAL FTVTAPKEVY TVDVGSSVSL ECDFFDRRECT ELEGIRASLQ 60
 KVENDTSLQS ERATLLEEQL PLGKALFHIP SVQVRDSGQY RCLVICGAAW DYKYLTVKVK 120
 ASYMRIDTRI LEVPGTGEVQ LTCQARGYPL AEVSWQNVSV PANTSHIRTP EGLYQVTSVL 180
 RLKPQPSRNF SCMFWNAHMK ELTSAIIDPL SRMEPKVPRT WEPRGPTIKP CPPCKCPAPN 240
 LLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSPIVTCVV VDVSEDDPDV QISWFVNNVE VHQAQTQTHR 300
 EDYNSTLRVV SALPIQHODW MSGKEFKCKV NNKDLPAPIE RTISKPKGSV RAPQVYVLP 360
 PEEEMTKKQV TLTCMVTDFM PEDIYVEWTN NGKTELNYKN TEPVLDSGDS YFMYSKLRVE 420
 KKNWVERNSY SCSVVHEGLH NHHTTKSFSR TPGK 454

(SEQ ID NO:9)

SEQ ID NO: 10 proporciona la secuencia de aminoácidos para la proteína de fusión de B7-DC-Ig murina sin la secuencia señal.

5 LFTVTAPKEV YTVDVGSSVS LECDFDRREC TELEGIRASL QKVENDTSLQ SERATLLEEQ 60
 LPLGKALFHI PSVQVRDSGQ YRCLVICGAA WDYKYLTVKV KASYMRIDTR ILEVPGTGEV 120
 QLTQCARGYP LAEVSQNVSV VPANTSHIRT PEGLYQVTSV LRLKPQPSRN FSCMFWNAHM 180
 KELTSAIIDP LSRMEPKVPR TWEPRGPTIK PCPPCKCPAP NLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI 240
 ISLSPIVTCV VDVSEDDPDV QISWFVNNV EVHQAQTQTH REDYNSTLRV VSALPIQHOD 300
 WMSGKEFKCK VNNKDLPAPI ERTISKPKGS VRAPQVYVLP PEEEMTKKQ VTLTCMVTDF 360
 MPEDIYVEWT NNGKTELNYK NTEPVLDSG SYFMYSKLRV EKNWVERNS YSCSVVHEGL 420
 HNHHTTKSFS RTPGK 435

(SEQ ID NO:10)

En una realización, B7-DC-Ig humana se codifica por la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 11, que codifica para la secuencia de aminoácidos de B7-DC-Ig humana:

10 MIFLLMLSL ELQLHQIAAL FTVTVPKELY IIEHGSNVTL ECFNFTGSHV NLGAITASLQ 60
 KVENDTSPHR ERATLLEEQL PLGKASFHIP QVQVRDEGQY QCIIYGVAV DYKYLTLVKVK 120
 ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYPL AEVSWPNVSV PANTSHSRT EGLYQVTSVL 180
 RLKPPGRNF SCVFWNTHVR ELTLASIDLQ SQMEPRTHPT WEPKSCDKTH TCPPCPAPEL 240
 LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE 300
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS 360
 RDELTKNQVS LTCLVKGFPY SDIAVEWESN GQPENNYKT PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK 420
 SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKLSLS PGK 453

(SEQ ID NO:12)

La presente invención contempla específicamente realizaciones en las que la proteína de fusión madura útil en los métodos y las composiciones de la invención tiene la señal secuencia eliminada. En una realización preferida, la secuencia señal se elimina completamente.

SEQ ID NO: 13 proporciona la secuencia de aminoácidos para B7-DC-Ig humana sin la secuencia señal.

LFTVTVPKEL YIIEHGSNVT LECNFTGSH VNLGAITASL QKVENDTSPH RERATLLEEQ 60
 LPLGKASFI PQVQVRDEGQ YQCIIYGVA WDYKYLTLVK KASYRKINTH ILKVPETDEV 120
 ELTCQATGYP LAEVSQNVSV VPANTSHSRT PEGLYQVTSV LRLKPPGRN FSCVFWNTHV 180
 RELTLASIDL QSQMEPRTHPT TWEPKSCDKT HTPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI 240
 SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW 300
 LNKKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFPY 360
 PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH 420
 NHYTQKLSLS SPGK 434

(SEQ ID NO:13).

Las presentes divulgaciones contemplan específicamente realizaciones en las que las proteínas de fusión de B7-DC-Ig dadas a conocer usadas en los métodos y las composiciones dados a conocer en el presente documento tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 80%, el 85%, el 90%, el 99% o el 100% con respecto a SEQ ID NO: 9, 10, 12 ó 13.

En otra realización de las divulgaciones, el polipéptido de fusión puede tener función biespecífica mediante lo cual la primera pareja de fusión se une a un ligando de PD-1, tal como B7-H1, y la segunda pareja de fusión se une al receptor de PD-1 sin desencadenar la transducción de señales inhibitoras a través del receptor de PD-1.

5 Aunque un polipéptido útil en la invención puede ser monomérico o dimérico, las propias proteínas de fusión pueden presentarse en una forma monomérica u oligomérica, preferiblemente como dímero. En realizaciones específicas, las proteínas de fusión útiles como antagonistas de PD-1 en las composiciones de la invención pueden ensamblarse de manera espontánea para dar formas oligoméricas, especialmente diméricas, o pueden unirse químicamente para formar tales oligómeros mediante medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una proteína de fusión útil en la puesta en práctica de la invención puede comprender a su vez una porción de un polipéptido de B7-DC fusionada a una porción de un anticuerpo y éstas a su vez pueden ensamblarse para dar un dímero. En un ejemplo de este tipo, un polipéptido para su uso en la invención se fusiona como una única cadena de aminoácidos a la región Fc de un anticuerpo (tal como cuando este constructo se expresa a partir de un único polinucleótido recombinante), tras lo cual se unen dos productos de fusión de este tipo entre sí para formar un homodímero, tal como mediante unión disulfuro entre las regiones Fc respectivas.

20 Tales productos diméricos pueden ser homodímeros (cuando ambas proteínas de fusión monoméricas son idénticas) o pueden ser heterodímeros (cuando dos proteínas de fusión diferentes están unidas entre sí). Los monómeros individuales de tales dímeros pueden unirse mediante cualquier medio conocido en la técnica, tal como mediante enlace covalente (por ejemplo, una unión disulfuro) o mediante enlace no covalente (tal como una interacción iónica). Las B7-DC-Ig usadas en los ejemplos de la invención estaban presentes en forma de un homodímero que tenía 2 copias de SEQ ID NO: 10 unidas entre sí mediante una unión disulfuro. Además, los heterodímeros de la invención incluyen proteínas y proteínas de fusión biespecíficas en las que una porción monomérica se une a PD-1 y la otra se une a un ligando natural de PD-1. Tales heterodímeros se forman mediante acoplamiento de polipéptidos y proteínas de fusión descritos exhaustivamente en otra parte en el presente documento.

30 En otra realización útil de la invención, la proteína de fusión antagonista de PD-1 es un heterodímero, tal como cuando dos proteínas de fusión se unen entre sí pero no tienen secuencias de aminoácidos idénticas. En un ejemplo específico, cada monómero puede comprender una porción de Fc de un anticuerpo unida a un fragmento activo de un polipéptido de B7-DC cuando estos fragmentos activos son de diferentes porciones del polipéptido de B7-DC o cuando una proteína de fusión que comprende una porción de Fc de un anticuerpo fusionada a un polipéptido de B7-DC nativo de longitud completa se une (por ejemplo, se reticula) a una proteína de fusión que comprende una porción de Fc de un anticuerpo y un fragmento activo de un polipéptido de B7-DC nativo de longitud completa. En cada uno de tales casos, la porción del anticuerpo usada para formar cada proteína de fusión monomérica puede ser diferente entre las dos unidades monoméricas. Cualquier combinación dimérica de este tipo se contempla específicamente por los métodos y las composiciones de la invención.

40 En una proteína de fusión dimérica preferida, el dímero resulta de la unión mediante enlace covalente de residuo de Cys en las regiones CH de dos de las cadenas pesadas de Ig que son los mismos residuos de Cys que están unidos mediante unión disulfuro en cadenas pesadas de Ig normales dimerizadas.

45 Todavía otra realización proporciona un constructo tetramérico que tiene un sustrato BirA fusionado al dominio extracelular de un polipéptido de B7-DC variante. En la técnica se conocen métodos para preparar constructos tetraméricos (véase Pertovas, *et al.*, J. Exp. Med., 203:2281 (2006)).

7. Anticuerpos anti-PD-1 y otros anticuerpos

50 Otros antagonistas de PD-1 contemplados por los métodos de las divulgaciones incluyen anticuerpos que se unen a PD-1 o a ligandos de PD-1, y otros anticuerpos.

55 En un aspecto, las presentes divulgaciones se refieren a un método de aumento de una respuesta de células T en un mamífero que lo necesita, que comprende administrar a dicho mamífero un régimen de tratamiento eficaz que comprende un anticuerpo anti-PD-1 y un agente de potenciación, en el que dicho régimen de tratamiento es eficaz para aumentar la respuesta de células T de dicho mamífero frente a dicho antígeno.

Los anticuerpos anti-PD-1 útiles en el/los régimen/regímenes de tratamiento de las divulgaciones incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las siguientes publicaciones:

60 Documento PCT/IL03/00425 (Hardy *et al.*, documento WO/2003/099196)

Documento PCT/JP2006/309606 (Korman *et al.*, documento WO/2006/121168)

65 Documento PCT/US2008/008925 (Li *et al.*, documento WO/2009/014708)

Documento PCT/JP03/08420 (Honjo *et al.*, documento WO/2004/004771)

Documento PCT/JP04/00549 (Honjo *et al.*, documento WO/2004/072286)

5 Documento PCT/IB2003/006304 (Collins *et al.*, documento WO/2004/056875)

Documento PCT/US2007/088851 (Ahmed *et al.*, documento WO/2008/083174)

10 Documento PCT/US2006/026046 (Korman *et al.*, documento WO/2007/005874)

Documento PCT/US2008/084923 (Terrett *et al.*, documento WO/2009/073533)

Berger *et al.*, Clin. Cancer Res., vol. 14, págs. 30443051 (2008).

15 Un ejemplo específico de un anticuerpo anti-PD-1 útil en los métodos de las divulgaciones es MDX-1106 (véase Kosak, documento US 20070166281 (publicado el 19 de julio de 2007) en el párrafo 42), un anticuerpo anti-PD-1 humano, administrado preferiblemente a una dosis de 3 mg/kg.

20 En otro aspecto, las presentes divulgaciones se refieren a un método de aumento de una respuesta de células T en un mamífero que lo necesita, que comprende administrar a dicho mamífero un régimen de tratamiento eficaz que comprende un anticuerpo anti-ligando de PD-1, por ejemplo un anticuerpo anti-B7-H1, y un agente de potenciación, en el que dicho régimen de tratamiento es eficaz para aumentar la respuesta de células T de dicho mamífero frente a dicho antígeno.

25 Los anticuerpos anti-B7-H1 útiles en el/los régimen/regímenes de tratamiento de las divulgaciones incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las siguientes publicaciones:

Documento PCT/US06/022423 (documento WO/2006/133396, publicado el 14 de diciembre de 2006)

30 Documento PCT/US07/088851 (documento WO/2008/083174, publicado el 10 de julio de 2008)

Documento US 2006/0110383 (publicado el 25 de mayo 2006)

35 Un ejemplo específico de un anticuerpo anti-B7-H1 útil en los métodos de las divulgaciones es MDX-1105 (documento WO/2007/005874, publicado el 11 de enero de 2007), un anticuerpo anti-B7-H1 humano. Para los anticuerpos anti-B7-DC, véanse los documentos 7.411.051, 7.052.694, 7.390.888, 20060099203.

40 Otra realización de las divulgaciones incluye un anticuerpo biespecífico que comprende un anticuerpo que se une al receptor de PD-1 unido en puente a un anticuerpo que se une a un ligando de PD-1, tal como B7-H1. En una realización preferida de las divulgaciones, la porción de unión a PD-1 reduce o inhibe la transducción de señales a través del receptor de PD-1.

45 No es necesario que el anticuerpo para su uso en las divulgaciones sea un anticuerpo anti-PD-1 o anti-ligando de PD-1, sino que puede ser otro anticuerpo útil para mediar los efectos de células T en una respuesta inmunitaria. En este aspecto, las presentes divulgaciones se refieren a un método de aumento de una respuesta de células T frente a un antígeno en un mamífero que lo necesita, que comprende administrar a dicho mamífero un régimen de tratamiento eficaz que comprende un anticuerpo anti-CTLA4 y un agente de potenciación, en el que dicho régimen de tratamiento es eficaz para aumentar la respuesta de células T de dicho mamífero frente a dicho antígeno. Un ejemplo de un anticuerpo anti-CTLA4 contemplado para su uso en los métodos de las divulgaciones incluye un anticuerpo tal como se describe en el documento PCT/US2006/043690 (Fischkoff *et al.*, documento WO/2007/056539).

50 Ejemplos específicos de un anticuerpo anti-CTLA4 útil en los métodos de las divulgaciones son ipilimumab, también conocido como MDX-010 o MDX-101, un anticuerpo anti-CTLA4 humano, administrado preferiblemente a una dosis de 10 mg/kg, y tremelimumab un anticuerpo anti-CTLA4 humano, administrado preferiblemente a una dosis de 15 mg/kg.

8. Antagonistas de PD-1 de molécula pequeña

60 Los antagonistas de receptor de PD-1 también pueden ser antagonistas de molécula pequeña. El término "molécula pequeña" se refiere a compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular de más de 100 y de menos de aproximadamente 2.500 Dalton, preferiblemente entre 100 y 2000, más preferiblemente entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1250, más preferiblemente entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1000, más preferiblemente entre aproximadamente 100 y aproximadamente 750, más preferiblemente entre aproximadamente 200 y aproximadamente 500 Dalton. Las moléculas pequeñas a menudo incluyen estructuras carbonadas cíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más grupos funcionales. Los

antagonistas de molécula pequeña reducen o interfieren con la transducción de señales del receptor de PD-1 al unirse a ligandos de PD-1 tales como B7-H1 y B7-DC e impedir que el ligando interactúe con PD-1 o al unirse directamente a, y bloquear, el receptor de PD-1 sin desencadenar la transducción de señales a través del receptor de PD-1.

5 En una realización de las divulgaciones, una molécula pequeña de este tipo puede administrarse en combinación con otro antagonista de PD-1 o antagonista de CTLA4, tal como un anticuerpo específico para PD-1 o uno de sus ligandos o un anticuerpo específico para CTLA4 o uno de sus ligandos. Por tanto, tales moléculas pequeñas pueden administrarse como compuestos en uno o más de los métodos de las divulgaciones o pueden administrarse en combinación con otros compuestos útiles en los métodos de las divulgaciones. Por ejemplo, se ha mostrado que una serie de compuestos orgánicos pequeños se unen a ligando B7-1 para impedir la unión a CTLA4 (véase Erbe *et al.*, J. Biol. Chem., vol. 277, págs. 7363-7368 (2002)). Tales compuestos orgánicos pequeños podrían administrarse solos o junto con un anticuerpo anti-CTLA4, en combinación con la administración de CTX, para reducir la transducción de señales inhibitorias de células T.

15 En una realización de las divulgaciones, los antagonistas de PD-1 o antagonistas de CTLA4 contemplados para su uso en los métodos de la invención incluyen ácidos nucleico antisentido, tanto ADN como ARN, así como moléculas de ARNip. Tales moléculas antisentido impiden la expresión de PD-1 en células T así como la producción de ligandos de células T, tales como B7-H1, PD-L1 y PD-L2. Por ejemplo, ARNip (por ejemplo, de aproximadamente 21 nucleótidos de longitud, que es específico para el gen que codifica para PD-1, o que codifica para un ligando de PD-1, y cuyos oligonucleótidos pueden adquirirse fácilmente de manera comercial) complejo con portadores, tales como polietilimina (véase Cubillos-Ruiz *et al.*, J. Clin. Invest. 119(8): 2231-2244 (2009)), se capta fácilmente por células que expresan PD-1 así como ligandos de PD-1 y reduce la expresión de estos receptores y ligandos para lograr una disminución de la transducción de señales inhibitorias en células T, activando así las células T.

25 B. AGENTES DE POTENCIACIÓN

Según las divulgaciones, la actividad del antagonista de PD-1 aumenta, preferiblemente de manera sinérgica, por la presencia de un agente de potenciación. El agente de potenciación actúa para aumentar la eficacia del antagonista de receptor de PD-1, posiblemente mediante más de un mecanismo, aunque el mecanismo de acción preciso no es esencial para la práctica amplia de la presente invención.

35 En la realización preferida, el agente de potenciación es ciclofosfamida. Ciclofosfamida (CTX, Cytoxan[®], o Neosar[®]) es un fármaco de oxazafosforina y los análogos incluyen ifosfamida (IFO, Ifex), perfosfamida, trofosfamida (trofosfamida; Ixoten), y sales, solvatos, profármacos y metabolitos farmacéuticamente aceptables de los mismos (solicitud de patente estadounidense 20070202077). Ifosfamida (MITOXANA[®]) es un análogo estructural de ciclofosfamida y se considera que su mecanismo de acción es idéntico o sustancialmente similar al de ciclofosfamida. Perfosfamida (4-hidroperoxiciclofosfamida) y trofosfamida también son agentes alquilantes, que están relacionados estructuralmente con ciclofosfamida. Por ejemplo, la perfosfamida alquila el ADN, inhibiendo así la replicación del ADN y la síntesis de ARN y proteínas. Se han diseñado y evaluado nuevos derivados de oxazafosforinas en un intento por mejorar la selectividad y la respuesta con toxicidad del huésped reducida (Liang J, Huang M, Duan W, Yu XQ, Zhou S. Design of new oxazaphosphorine anticancer drugs. Curr Pharm Des. 2007; 13(9): 963-78. Revisión). Estos incluyen mafosfamida (NSC 345842), glufosfamida (D19575, mostaza de beta-D-glucosilifosforamida), S-(-)-bromofosfamida (CBM-11), NSC 612567 (aldofosfamida-perhidrotiazina) y NSC 613060 (aldofosfamida-tiazolidina). La mafosfamida es un análogo de oxazafosforina que es una sal del ácido 4-tioetanosulfónico de 4-hidroxi-CPA químicamente estable. La glufosfamida es un derivado de IFO en el que la mostaza de isofosforamida, el metabolito de alquilación de IFO, se une mediante enlace glicosídico a una molécula de beta-D-glucosa. Se describen análogos de ciclofosfamida adicionales en la patente estadounidense 5.190.929 titulada "Cyclophosphamide analogs useful as anti-tumor agents".

50 En otras realizaciones de las divulgaciones, el agente de potenciación es un agente que reduce la actividad y/o el número de linfocitos T reguladores (T-reg), preferiblemente, tal como se reivindica, sunitinib (SUTENT[®]), anticuerpo anti-TGFβ o imatinib (GLEEVAC[®]). El régimen de tratamiento citado también puede incluir administrar un adyuvante.

55 Los agentes de potenciación útiles también incluyen inhibidores de la mitosis, tales como paclitaxel, inhibidores de aromatasa (por ejemplo letrozol) e inhibidores de la angiogénesis (inhibidores de VEGF por ejemplo Avastin, VEGF-Trap) (véase, por ejemplo, Li *et al.*, Vascular endothelial growth factor blockade reduces intratumoral regulatory T cells and enhances the efficacy of a GM-CSF-secreting cancer immunotherapy. Clin Cancer Res. 15 de noviembre de 2006; 12(22) 6808-16), antagonistas de TLR4 y antagonistas de IL-18, o tal como se reivindica en el presente documento antraciclinas, oxaliplatino, doxorubicina.

60 C. COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

65 En un aspecto, las divulgaciones se refieren a una composición terapéutica, que comprende una molécula que impide la transducción de señales inhibitorias a través de PD-1, o un antagonista de CTLA4, y un agente de potenciación en un portador farmacéuticamente aceptable. Los componentes de dicha composición están presentes

en una cantidad eficaz para aumentar una respuesta de células T en un mamífero. En realizaciones específicas de las divulgaciones, el agente de potenciación es ciclofosfamida o un análogo de ciclofosfamida, habiéndose citado anteriormente ejemplos de tales análogos.

- 5 En otros ejemplos específicos, el agente de potenciación es un agente que reduce la actividad de los linfocitos T reguladores (T-reg), preferiblemente en el que la actividad se reduce debido a una disminución en el número de dichos T-reg. En realizaciones preferidas no limitativas, el agente es sunitinib (SUTENT[®]), anticuerpo anti-TGFβ o imatinib (GLEEVAC[®]).
- 10 El agente de potenciación útil en la formulación de composiciones de las divulgaciones también incluyen inhibidores de la mitosis, tales como paclitaxel, inhibidores de aromatasa (por ejemplo letrozol), inhibidores de la angiogénesis (inhibidores de VEGF por ejemplo Avastin, VEGF-Trap), antraciclinas, oxaliplatino, doxorubicina, antagonistas de TLR4 y antagonistas de IL-18.
- 15 Una composición terapéutica de la invención también comprende opcionalmente al menos un agente adicional que puede ser uno o más de un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-CTLA4, un inhibidor de la mitosis, un inhibidor de aromatasa, un antagonista de receptor de adenosina A2a (A2AR) o un inhibidor de la angiogénesis.

20 Cualquiera de las composiciones terapéuticas de la invención puede contener también uno o más adyuvantes tal como se describe en el presente documento.

Un antagonista de PD-1 útil como componente de una composición terapéutica de las divulgaciones incluye cualquiera de los antagonistas de PD-1 citados en el presente documento para su uso en cualquiera de los métodos de las divulgaciones. Por ejemplo, un antagonista de PD-1 de este tipo incluye cualquiera de las proteínas de fusión citadas en el presente documento. Un antagonista de este tipo también puede ser cualquiera de los polipéptidos o fragmentos de unión a PD-1 citados en el presente documento para su uso como la primera porción polipeptídica de cualquiera de las proteínas de fusión descritas para su uso en cualquiera de los métodos de las divulgaciones. Un antagonista de este tipo puede ser además un anticuerpo, tal como cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1, anti-B7-DC o anti-B7-H1 conocidos mencionados en el presente documento.

30 Una composición terapéutica de las divulgaciones también incluye, además o en lugar del antagonista de PD-1 mencionado anteriormente, un anticuerpo anti-CTLA4. Una composición de este tipo contendrá por tanto un anticuerpo anti-CTLA4 de este tipo y un agente de potenciación del tipo ya descrito en el presente documento.

35 Una composición terapéutica de las divulgaciones encuentra uso en cualquiera de los métodos de las divulgaciones en el presente documento. Una composición de este tipo, aunque está prevista para su uso como tratamiento activo de un estado patológico, también puede encontrar uso como composición profiláctica para prevenir cualquiera de las enfermedades citadas en el presente documento.

40 En un aspecto, las presentes divulgaciones contemplan una composición terapéutica que comprende un antagonista de PD-1 y un agente de potenciación en un portador farmacéuticamente aceptable, en la que el antagonista de PD-1 y el agente de potenciación están presentes juntos en una cantidad eficaz para aumentar una respuesta de células T en un mamífero.

45 Las composiciones terapéuticas dentro del alcance de las divulgaciones incluyen composiciones que comprenden todas y cada una de las combinaciones de los anticuerpos y/o antagonistas de PD-1 dados a conocer en el presente documento con cualquiera de los agentes de potenciación citados. A modo de ejemplos no limitativos, una composición terapéutica de las divulgaciones incluye una composición que comprende una cantidad eficaz de uno o más antagonistas de PD-1, tal como una combinación de cualquiera o la totalidad de los polipéptidos de longitud completa indicados en el presente documento como SEQ ID NO específicas u homólogos de los mismos, junto con uno o más fragmentos de cualquiera de dichos polipéptidos, incluyendo en la que cualquiera o todos se fusionan a otras proteínas, tal como fusión a una o más inmunoglobulinas citadas en el presente documento, o no se fusionan, y que comprende uno o más agentes de potenciación, tales como ciclofosfamida sola, o ciclofosfamida más uno o más análogos de la misma, sólo uno o más análogos de ciclofosfamida, o el agente de potenciación puede consistir en ciclofosfamida y un agente que reduce el número de T reg en un mamífero que recibe la composición, o puede consistir en un análogo de ciclofosfamida más un agente que reduce el número de T reg o el agente de potenciación puede consistir sólo en uno o más agentes que reducen el número de T reg u otra actividad de Treg. Todas estas combinaciones se contemplan por las divulgaciones siempre que la composición comprenda al menos un anticuerpo y/o antagonista de PD-1 que media en la actividad de células T y al menos un agente de potenciación.

60 Las composiciones de la invención también pueden incluir agentes activos adicionales. En realizaciones preferidas de cualquiera de las composiciones de la invención, la composición farmacéutica o terapéutica comprende además al menos un agente adicional seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-CTLA4, un inhibidor de la mitosis, tal como paclitaxel, un inhibidor de aromatasa, tal como letrozol, un antagonista de A2AR, un inhibidor de la angiogénesis, antraciclinas, oxaliplatino, doxorubicina, antagonistas de TLR4 y antagonistas de IL-18.

65

El antagonista de PD-1 y/o agente de potenciación puede administrarse mediante cualquier medio adecuado. En una realización preferida, el antagonista de PD-1 y/o agente de potenciación se administra en una disolución acuosa, mediante inyección parenteral. La formulación también puede estar en forma de una suspensión o emulsión.

5 En general, se proporcionan composiciones farmacéuticas que incluyen cantidades eficaces de un péptido o polipéptido, y opcionalmente incluyen diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones incluyen diluyentes, agua estéril, solución salina tamponada con diversos contenidos de tampón (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerzas iónicas; y
10 opcionalmente, aditivos tales como detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, TWEEN 20, TWEEN 80, polisorbato 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, matabisulfito de sodio) y conservantes (por ejemplo, Thimersol, alcohol bencílico) y sustancias de carga (por ejemplo, lactosa, manitol). Ejemplos de disolventes o vehículos no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y aceite de maíz, gelatina y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Las formulaciones pueden liofilizarse y redisolverse/resuspenderse inmediatamente antes de su uso. La formulación puede esterilizarse, por ejemplo,
15 mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, mediante la incorporación de agentes esterilizantes en las composiciones, mediante la irradiación de las composiciones, o mediante el calentamiento de las composiciones.

20 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse mediante las vías de administración parenteral (inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa (i.v.) o subcutánea), transdérmica (o bien pasivamente o bien usando iontoforesis o electroporación) o transmucosa (nasal, vaginal, rectal, o sublingual). Los métodos de administración de las composiciones de la invención no excluyen administrar el antagonista de PD-1 y el agente de potenciación por vías separadas y diferentes (por ejemplo, por vía tópica).

25 El antagonista de PD-1 y el agente de potenciación pueden administrarse al mismo tiempo, o en momentos diferentes, administrándose el agente de potenciación antes o después del antagonista de PD-1. En una realización de las divulgaciones, un agente de potenciación se administra tanto antes como después del antagonista de PD-1. En una realización de este tipo, el mismo agente de potenciación se administra antes y después del antagonista de PD-1. En otra realización, el agente de potenciación se administra antes del antagonista de PD-1.
30

Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” significa una dosificación suficiente para tratar, inhibir o aliviar uno o más síntomas del trastorno que está tratándose o para proporcionar de otro modo un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. La dosificación precisa variará según una variedad de factores tales como variables dependientes del sujeto (por ejemplo, edad, salud del sistema inmunitario, etc.), la enfermedad y el tratamiento que esté realizándose. Cantidades terapéuticamente eficaces de anticuerpos y/o antagonistas de receptor de PD-1 junto con un agente de potenciación provocan que se active o se mantenga una respuesta inmunitaria.
35

40 La dosificación seleccionada depende del efecto terapéutico deseado, de la vía de administración y de la duración del tratamiento deseado. Generalmente se administran niveles de dosificación de 0,001 a 50 mg/kg de peso corporal diarios a mamíferos. Preferiblemente, dicha dosis es de 1 a 50 mg/kg, más preferiblemente de 1 a 40 mg/kg, o incluso de 1 a 30 mg/kg, siendo una dosis de 2 a 20 mg/kg también una dosis preferida. Los ejemplos de otras dosificaciones incluyen de 2 a 15 mg/kg, o de 2 a 10 mg/kg o incluso de 3 a 5 mg/kg, siendo una dosis de aproximadamente 4 mg/kg un ejemplo específico.
45

Para regímenes de tratamiento que usan un agente de potenciación y un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-CTLA4, las dosificaciones están comúnmente en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg, prefiriéndose intervalos más cortos de 1 a 50 mg/kg y prefiriéndose más intervalos de 10 a 20 mg/kg. Una dosis apropiada para un sujeto humano es de entre 5 y 15 mg/kg, siendo lo más preferido 10 mg/kg de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-PD-1 humano, como MDX-1106) (más una dosis adecuada de ciclofosfamida u otro agente de potenciación administrado hasta aproximadamente 24 horas antes del anticuerpo).
50

En general, a modo de ejemplo únicamente, las formas de dosificación basadas en el peso corporal para cualquiera de los antagonistas de transducción de señales útiles en los métodos de la invención incluyen dosis en el intervalo de 5-300 mg/kg, o 5-290 mg/kg, o 5-280 mg/kg, o 5-270 mg/kg, o 5-260 mg/kg, o 5-250 mg/kg, o 5-240 mg/kg, o 5-230 mg/kg, o 5-220 mg/kg, o 5-210 mg/kg, o de 20 a 180 mg/kg, o de 30 a 170 mg/kg, o de 40 a 160 mg/kg, o de 50 a 150 mg/kg, o de 60 a 140 mg/kg, o de 70 a 130 mg/kg, o de 80 a 120 mg/kg, o de 90 a 110 mg/kg, o de 95 a 105 mg/kg, siendo las dosis de 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 50 mg/kg y 100 mg/kg ejemplos específicos de dosis preferidas. Naturalmente, tales dosis pueden repetirse.
60 Naturalmente, la dosis estará correlacionada con la identidad del mamífero que recibe dicha dosis. Las dosis en los intervalos de mg/kg citados anteriormente son convenientes para mamíferos, incluyendo roedores, tales como ratones y ratas, y primates, especialmente seres humanos, prefiriéndose especialmente dosis de aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg para tratar seres humanos.

65 Según el régimen de tratamiento de la invención, el agente de potenciación, por ejemplo ciclofosfamida, se administra en dosis no tóxicas que varían dependiendo del animal. En realizaciones específicas, el agente de

potenciación se administra mediante cualquier medio de administración adecuado, incluyendo parenteral u oral, incluyendo el primero administración sistémica, tal como intravenosa. Por ejemplo, un agente de potenciación como ciclofosfamida normalmente se administra por vía oral. Una administración de este tipo puede realizarse en cualquier dosificación conveniente, dependiendo del agente de potenciación. La dosificación en cada caso puede basarse en el peso corporal o puede administrarse como una dosificación unitaria.

Aunque la propia CTX no es tóxica, algunos de sus metabolitos son agentes alquilantes citotóxicos que inducen reticulación de ADN, y a dosis superiores, rompe cadenas. Muchas células son resistentes a CTX porque expresan altos niveles de la enzima detoxificante aldehído deshidrogenasa (ALDH). CTX selecciona como diana linfocitos en proliferación, ya que los linfocitos (pero no las células madre hematopoyéticas) sólo expresan bajos niveles de ALDH, y las células en división son las más sensibles a los agentes de alquilación del ADN.

Dosis bajas de CTX (<200 mg/kg) pueden tener efectos inmunoestimuladores, incluyendo estimulación de respuestas inmunitarias antitumorales en modelos de cáncer de ratón y seres humanos (Brode & Cooke Crit Rev. Immunol. 28:109-126 (2008)). Estas dosis bajas son subterapéuticas y no tienen una actividad antitumoral directa. En contraposición, altas dosis de CTX inhiben la respuesta antitumoral. Varios mecanismos pueden explicar el papel de CTX en la potenciación de la respuesta inmunitaria antitumoral: (a) depleción de Treg CD4+CD25+FoxP3+ (y específicamente Treg en proliferación, lo que puede ser especialmente supresor), (b) depleción de linfocitos B; (c) inducción de óxido nítrico (NO), dando como resultado la supresión del crecimiento de células tumorales; (d) movilización y expansión de MDSC CD11b+Gr-1+. Estos efectos primarios tienen numerosos efectos secundarios; por ejemplo tras la depleción de Treg los macrófagos producen más IFN- γ y menos IL-10. También se ha mostrado que CTX induce expresión de IFN de tipo I y promueve la proliferación homeostática de linfocitos.

La depleción de Treg se cita muy frecuentemente como el mecanismo por el que CTX potencia la respuesta inmunitaria antitumoral. Esta conclusión se basa en parte en los resultados de experimentos de transferencia adoptiva. En el modelo de tumor AB1-HA, el tratamiento con CTX en el día 9 produce una tasa de cura del 75%. La transferencia de Treg purificados en el día 12 inhibió casi completamente la respuesta de CTX (van der Most *et al.* Cancer Immunol. Immunother. 58:1219-1228 (2009)). Se observó un resultado similar en el modelo de tumor HHD2: la transferencia adoptiva de Treg CD4+CD25+ tras el pretratamiento con CTX eliminó la respuesta terapéutica frente a la vacuna (Taieb, J. J. Immunol. 176:2722-2729 (2006)).

Numerosos ensayos clínicos con seres humanos han demostrado que CTX a dosis baja es un agente seguro, bien tolerado y eficaz para promover respuestas inmunitarias antitumorales (Bas, & Mastrangelo Cancer Immunol. Immunother. 47:1-12 (1998)).

La dosis óptima para CTX para potenciar una respuesta inmunitaria antitumoral, es una que disminuya los recuentos globales de células T disminuyendo los niveles de Treg por debajo del intervalo normal pero que sea subterapéutica (véase Machiels *et al.* Cancer Res. 61:3689-3697 (2001)).

En ensayos clínicos con seres humanos en los que se ha usado CTX como un agente de inmunopotenciación, habitualmente se ha usado una dosis de 300 mg/m². Para un varón medio (6 pies, 170 libras (78 kg) con un área de superficie corporal de 1,98 m²), 300 mg/m² son 8 mg/kg, o 624 mg de proteína total. En modelos de cáncer de ratón, se ha observado eficacia a dosis que oscilan entre 15 - 150 mg/kg, que se refiere a 0,45 - 4,5 mg de proteína total en un ratón de 30 g (Machiels *et al.* Cancer Res. 61:3689-3697 (2001), Hengst *et al.* Cancer Res. 41:2163-2167 (1981), Hengst Cancer Res. 40:2135-2141 (1980)).

Para mamíferos mayores, tales como un primate, preferiblemente un paciente humano, pueden usarse tales dosis en mg/m² pero pueden preferirse dosis unitarias administradas a lo largo de un intervalo de tiempo finito. Tales dosis unitarias que pueden administrarse diariamente durante un periodo de tiempo finito, tal como de hasta 3 días, o hasta 5 días, o hasta 7 días, o hasta 10 días, o hasta 15 días o hasta 20 días o hasta 25 días, se contemplan todas ellas específicamente por la invención. Puede aplicarse el mismo régimen para los otros agentes de potenciación citados en el presente documento.

Todas las administraciones de este tipo dadas a conocer en el presente documento pero no reivindicadas pueden realizarse antes de o tras la administración de una molécula de unión a PD-1 de la invención. Alternativamente, la administración de una o más dosis de una molécula de unión a PD-1 de la invención puede escalonarse temporalmente con la administración del agente de potenciación para formar un ciclo uniforme o no uniforme de tratamiento por el que se administra una o más dosis de agente de potenciación, seguido por una o más dosis de un compuesto de unión a PD-1, seguido por una o más dosis de agente de potenciación, todo ello según cualquier programa que se seleccione o se desee por el investigador o el médico que administra dichos agentes.

En otras realizaciones específicas, el régimen de tratamiento incluye múltiples administraciones de uno o más antagonistas de PD-1. En algunas realizaciones, tales administraciones múltiples de antagonistas de PD-1 se realizan conjuntamente con múltiples administraciones del mismo o de diferentes agentes de potenciación.

Como en otras realizaciones de la invención, en este caso el agente de potenciación se administra al menos 1, 2, 3,

5, 10, 15, 20, 24 ó 30 horas antes de administrar el antagonista de PD-1.

Las composiciones farmacéuticas útiles en el presente documento también contienen un portador farmacéuticamente aceptable, incluyendo cualquier diluyente o excipiente adecuado, que incluye cualquier agente farmacéutico que no induce por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición, y que puede administrarse sin toxicidad excesiva. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol, y similares, incluyendo portadores útiles en la formación de aerosoles para la administración nasal y a otras vías respiratorias o para la administración al sistema oftálmico. Se presenta una discusión completa de portadores, diluyentes y otros excipientes farmacéuticamente aceptables en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. edición actual).

Las composiciones de vacuna (tal como se comenta más adelante) pueden incorporar además sustancias adicionales para estabilizar el pH, o para funcionar como adyuvantes, agentes humectantes, o agentes emulsionantes, que pueden servir para mejorar la eficacia de la vacuna.

Las vacunas se formulan generalmente para la administración parenteral y se inyectan o bien por vía subcutánea o bien por vía intramuscular. Tales vacunas también pueden formularse como supositorios o para administración oral, usando métodos conocidos en la técnica, o para administración a través de vías nasales o respiratorias.

D. MÉTODOS DE FABRICACIÓN

Polipéptidos antagonista de PD-1 aislados, incluyendo variantes, homólogos y fragmentos de los mismos, o bien de tipo natural o bien mutados, y proteínas de fusión que comprenden cualquiera de ellos, contemplados todos ellos para su uso en la invención, pueden obtenerse, por ejemplo, mediante síntesis química o mediante producción recombinante en una célula huésped. Para producir de manera recombinante un polipéptido coestimulador, puede usarse un ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido para transformar, transducir o transfectar una célula huésped bacteriana o eucariota (por ejemplo, una célula de insecto, levadura o mamífero). Se apreciará que las secuencias de nucleótidos pueden someterse a optimización de codones para aumentar los niveles de expresión de proteínas en un tipo particular de célula huésped. En la técnica se conocen bien métodos para la optimización de codones. En general, los constructos de ácido nucleico incluyen una secuencia reguladora unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido coestimulador. Las secuencias reguladoras (también denominadas en el presente documento secuencias de control de la expresión) normalmente no codifican para un producto génico, sino que en cambio afectan a la expresión de las secuencias de ácido nucleico a las que están operativamente unidas. Los péptidos señal usados para secretar proteínas a partir de una célula pueden ser los péptidos señal endógenos o cualquier otro péptido señal que facilite la secreción de la proteína de fusión a partir de un huésped.

Para procedimientos de biología molecular generales útiles en la puesta en práctica de las presentes divulgaciones, están disponibles varias referencias convencionales que contienen procedimientos bien conocidos en la técnica de biología molecular y la ingeniería genética y procedimientos que no es necesario describir adicionalmente en el presente documento. Las referencias útiles incluyen Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Wu *et al.*, *Methods in Gene Biotechnology* (CRC Press, Nueva York, NY, 1997), y *Recombinant Gene Expression Protocols, in Methods in Molecular Biology*, vol. 62, (Tuan, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 1997).

E. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD

Las enfermedades que van a tratarse o prevenirse mediante la administración de una combinación terapéutica proporcionada por las presentes divulgaciones incluyen un tumor maligno o una enfermedad infecciosa crónica producida por una bacteria, virus, protozoo, helminto u otro patógeno microbiano que entra de manera intracelular. Tales enfermedades se combaten a menudo a través del ataque mediante linfocitos T citotóxicos. Puesto que la presente invención proporciona terapias de combinación útiles para potenciar respuestas de células T, a través del aumento de la actividad de células T, el aumento de la proliferación de células T y la reducción de las señales inhibitoras de células T, las terapias de combinación de la invención tienen una ventaja única para tratar (o incluso prevenir) tales enfermedades.

En una realización, puesto que las infecciones virales se eliminan principalmente mediante células T, un aumento de la actividad de células T es terapéuticamente útil para potenciar la eliminación de un agente viral infeccioso de un ser humano. Por tanto, los compuestos dados a conocer de la invención, con actividad antagonista de receptor de PD-1, junto con un agente de potenciación funcionan en combinación para el tratamiento de infecciones virales locales o sistémicas. Las infecciones que van a tratarse mediante los compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a, infecciones virales de inmunodeficiencia (por ejemplo, VIH), papiloma (por ejemplo, VPH), herpes (por ejemplo, VHS), encefalitis, gripe (por ejemplo, virus influenza A humano), hepatitis (por ejemplo, VHB), y resfriado común (por ejemplo, rinovirus humano). También pueden administrarse formulaciones farmacéuticas de composiciones de antagonistas de receptor de PD-1 para tratar enfermedades virales sistémicas, incluyendo, pero

sin limitarse a, SIDA, gripe, resfriado común o encefalitis.

Las infecciones no virales que pueden tratarse mediante los compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a, infecciones producidas por microorganismos que incluyen, pero no se limitan a, *Actinomyces*, *Anabaena*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bdellovibrio*, *Bordetella*, *Borrelia*, *Campylobacter*, *Caulobacter*, *Chlamydia*, *Clorobium*, *Chromatium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Cytophaga*, *Deinococcus*, *Escherichia*, *Francisella*, *Halobacterium*, *Heliobacter*, *Haemophilus*, *Hemophilus influenza* tipo B (HIB), *Hyphomicrobium*, *Legionella*, *Leptspirosis*, *Listeria*, *Meningococcus* A, B y C, *Metanobacterium*, *Micrococcus*, *Myobacterium*, *Mycoplasma*, *Myxococcus*, *Neisseria*, *Nitrobacter*, *Oscillatoria*, *Procloron*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Phodospirillum*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Spirillum*, *Spirochaeta*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Sulfolobus*, *Thermoplasma*, *Thiobacillus*, *Treponema*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma sp.* (tal como *Histoplasma capsulatum*), *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Nocardia asteroides*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Leishmania*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydial psittaci*, *Chlamydial trachomatis*, *Plasmodium sp.* (tal como *Plasmodium falciparum*), *Trypanosoma brucei*, *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis* y *Schistosoma mansoni*.

En una realización, la presente invención proporciona composiciones para inducir o potenciar una respuesta inmunitaria en un huésped humano para tratar cáncer aumentando una respuesta de células T. Los tipos de cáncer que pueden tratarse con las composiciones y los métodos proporcionados incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: cáncer de vejiga, de cerebro, de mama, de cuello uterino, colorrectal, de esófago, de riñón, de hígado, de pulmón, nasofaríngeo, de páncreas, de próstata, de piel, de estómago, uterino, de ovarios, de testículos y hematológico.

Los tumores malignos que pueden tratarse se clasifican en el presente documento según el origen embrionario del tejido del que se deriva el tumor. Los carcinomas son tumores que surgen de tejidos endodérmicos o ectodérmicos tales como la piel o el revestimiento epitelial de glándulas y órganos internos. Los sarcomas, que surgen con menos frecuencia, se derivan de tejidos conjuntivos mesodérmicos tales como hueso, grasa y cartílago. Las leucemias y los linfomas son tumores malignos de células hematopoyéticas de la médula ósea. Las leucemias proliferan como células individuales, mientras que los linfomas tienden a crecer como masas tumorales. Los tumores malignos pueden aparecer en numerosos órganos o tejidos del organismo para establecer un cáncer.

Como demostración del valor de los regímenes de tratamiento de las divulgaciones, se sometió a prueba el análogo murino de B7-DC-Ig (en el que se fusiona el ECD de B7-DC de ratón, que comparte una identidad de secuencia del 72% con la proteína humana, con el dominio Fc de IgG_{2a} de ratón) en modelos de tumor de ratón singénico para cáncer de colon, mastocitoma y otros tipos de tumor incorporando un pretratamiento con ciclofosfamida (CTX) tal como se describe en el presente documento.

Los resultados mostraron que el tratamiento con una sola dosis subterapéutica de CTX, que actúa como agente de inmunopotenciación, seguido por B7-DC-Ig murina erradica tumores de carcinoma de colon CT26 establecidos en hasta el 80% de los animales. Además, en estudios de nueva exposición a tumor de carcinoma de colon CT26, no se detectó nuevo crecimiento tumoral en ratones que habían erradicado previamente el tumor tras el tratamiento con CTX + B7-DC-Ig murina. También se demostró que estos ratones tenían una población de CTL específicos de tumor aumentada en relación con los ratones sin tratamiento previo.

En una realización, las presentes divulgaciones contemplan el uso de un compuesto que reduce la transducción de señales inhibitoras en una célula T, tal como se describe en otra parte en el presente documento, en la fabricación de un medicamento para aumentar una respuesta de células T mediante terapia de combinación en el que dicho compuesto se administra conjuntamente con un agente de potenciación. Además, el compuesto que reduce la transducción de señales inhibitoras en una célula T y dicho agente de potenciación se proporcionan como medicamentos separados para su administración en diferentes momentos, preferiblemente en el que el agente de potenciación se administra antes del compuesto que reduce la transducción de señales inhibitoras, por ejemplo, hasta 24 horas antes del compuesto inhibidor (u otros intervalos de tiempo citados en el presente documento). Preferiblemente, el compuesto y el agente de potenciación son para su uso en el tratamiento de una enfermedad infecciosa o cáncer, incluyendo enfermedades producidas por cualquiera de los agentes infecciosos o cánceres citados en otra parte en el presente documento.

En una realización preferida, un compuesto útil en estas composiciones es una proteína recombinante compuesta por el ECD de B7-DC humano fusionado al dominio Fc de IgG₁ humana, denominado en el presente documento B7-DC-Ig.

En una realización, la presente invención se refiere a un kit médico para administrar un compuesto que reduce la transducción de señales inhibitoras en una célula T, tal como se da a conocer en el presente documento, en combinación con un agente de potenciación, comprendiendo dicho kit:

(a) un suministro de dosificación de un compuesto que reduce la transducción de señales inhibitoras en una célula T,

(b) un suministro de un agente de potenciación;

(c) un suministro de portador farmacéuticamente aceptable; y

5 (d) instrucciones impresas para administrar el compuesto en un uso tal como se describió anteriormente.

F. TERAPIAS DE COMBINACIÓN

10 Las vacunas requieren respuestas fuertes de células T para eliminar células cancerosas y células infectadas o agentes infecciosos. Los antagonistas de receptor de PD-1 descritos en el presente documento pueden administrarse como un componente de una vacuna, junto con un agente de potenciación, para proporcionar una señal coestimuladora para células T. Las vacunas dadas a conocer en el presente documento incluyen antígenos, un antagonista de receptor de PD-1 y opcionalmente adyuvantes y moléculas de direccionamiento.

15 Los antígenos frente a los que se potencia la respuesta de células T mediante la composición de la invención incluyen péptidos, proteínas, polisacáridos, sacáridos, lípidos, ácidos nucleicos o combinaciones de los mismos. Los antígenos, en el caso de enfermedad, están presentes debido al proceso de enfermedad.

20 Las composiciones de proteína de fusión de antagonistas de receptor de PD-1 dadas a conocer pueden administrarse conjuntamente con vacunas profilácticas, que confieren resistencia en un sujeto a la exposición posterior a agentes infecciosos, o conjuntamente con vacunas terapéuticas, que pueden usarse para iniciar o potenciar la respuesta inmunitaria de un sujeto a un antígeno preexistente, tal como un antígeno tumoral en un sujeto con cáncer, o un antígeno viral en un sujeto infectado con un virus.

25 El desenlace deseado de una respuesta inmunitaria profiláctica, terapéutica o desensibilizada puede variar según la enfermedad, basándose en principios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una respuesta inmunitaria frente a un agente infeccioso puede prevenir completamente la colonización y la replicación de un agente infeccioso, afectando a la "inmunidad estéril" y a la ausencia de cualquier síntoma de enfermedad. Sin embargo, una vacuna
30 contra agentes infecciosos puede considerarse eficaz si reduce el número, la intensidad o la duración de los síntomas; si reduce el número de individuos en una población con síntomas; o reduce la transmisión de un agente infeccioso. De manera similar, las respuestas inmunitarias frente a cáncer, alérgenos o agentes infecciosos pueden tratar completamente una enfermedad, pueden aliviar síntomas, o pueden constituir una faceta en una intervención terapéutica global contra una enfermedad. Por ejemplo, la estimulación de una respuesta inmunitaria frente a un
35 cáncer puede acoplarse con enfoques quirúrgicos, quimioterápicos, radiológicos, hormonales y otros enfoques inmunológicos con el fin de afectar al tratamiento.

Los productos de la invención no excluyen el uso de un adyuvante además del agente de potenciación. Tal adyuvante puede administrarse, por ejemplo, junto con el antagonista de PD-1. Los adyuvantes útiles en las
40 composiciones y métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: emulsiones de aceite (por ejemplo, adyuvante de Freund); formulaciones de saponina; virosomas y partículas de tipo viral; derivados bacterianos y microbianos; oligonucleótidos inmunoestimuladores; toxinas de ribosilación de ADP y derivados detoxificados; alumbre; BCG; composiciones que contienen minerales (por ejemplo, sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio, hidróxido, fosfatos, sulfatos, etc.); bioadhesivos y/o mucoadhesivos; micropartículas; liposomas; formulaciones de éter de polioxietileno y éster de polioxietileno; péptidos de muramilo;
45 polifosfazeno; compuestos de imidazoquinolona; y sustancias tensioactivas (por ejemplo lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol). Los adyuvantes útiles también incluyen inmunomoduladores tales como citocinas, interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo, interferón- γ), factor estimulador de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral.

50 Nada en el presente documento excluye que el antagonista de receptor de PD-1 dado a conocer, incluyendo cualquiera de los polipéptidos, fragmentos, variantes, homólogos y proteínas de fusión dados a conocer en el presente documento, se administre a un sujeto que lo necesita en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales (además del agente de potenciación). Los agentes terapéuticos adicionales se seleccionan basándose
55 en el estado, trastorno o enfermedad que va a tratarse. Por ejemplo, los antagonistas de receptor de PD-1 pueden coadministrarse con uno o más agentes adicionales que funcionan para potenciar o promover una respuesta inmunitaria, y que se consideran en el presente documento agentes activos.

Tales agentes incluyen, pero no se limitan a, amsacrina, bleomicina, busulfano, capecitabina, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, cladribina, clofarabina, crisantaspasa, citarabina, dacarbazina, dactinomina, daunorubicina, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, etopósido, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxycarbamida, idarubicina, ifosfamida, irinotecán, leucovorina, doxorubicina liposómica, daunorubicina liposómica, lomustina, melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, mitomicina, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, pemetrexed, pentostatina, procarbazona, raltitrexed, satraplatino, estreptozocina, tegafur-uracilo,
65 temozolomida, tenipósido, tiotepa, tioguanina, topotecán, treosulfano, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, o una combinación de los mismos. Los agentes proapoptóticos representativos incluyen, pero no se limitan a,

fludarabina, taurosporina, cicloheximida, actinomicina D, lactosilceramida, 15d-PGJ(2) y combinaciones de los mismos.

5 Las terapias proporcionadas por los métodos y las composiciones de la presente invención también pueden usarse conjuntamente con otros tipos de terapias, tales como tratamientos de radiación, cirugía y similares.

G. ENSAYOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA

10 Las presentes divulgaciones citan varias estructuras específicas útiles en la puesta en práctica de los métodos de las divulgaciones. Otros compuestos que poseen actividad antagonista y que son útiles en los métodos de las divulgaciones también pueden identificarse haciendo referencia a procedimientos de ensayo bien conocidos para identificar estructuras químicas que se unen a PD-1, CTLA4, y ligandos de cualquiera de ellos y que también poseen la capacidad de reducir la transducción de señales inhibitoras en células T. Algunos de tales ensayos son ensayos de unión útiles en determinar si una estructura química seleccionada se une a receptores; éstos se conocen bien en la técnica y no es necesario comentarlos en detalle en el presente documento (véase, por ejemplo, el documento U.S. 2008/0274490 (publicado el 6 de noviembre de 2008) y el documento U.S. 7.105.328 (expedido el 12 de septiembre de 2006), que muestran cada uno ensayos para moduladores de señalización de PD-1 usando células T). Se usan otros ensayos para determinar los efectos de los agentes de la invención, tales como fragmentos activos, para activar células T aumentando la proliferación y/o producción de citocinas. Tales ensayos también se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, el aumento de la proliferación de células puede demostrarse mediante el aumento de la incorporación de ³H-timidina (debido a un aumento de la síntesis de ADN necesario para la multiplicación celular) o ELISA y/o RIA para detectar el aumento de la producción de citocinas por las células T en cultivo.

25 En un experimento de este tipo, se evaluó la actividad de unión de PD-1 de B7-DC-Ig humana mediante ELISA. Se cubrieron placas de ELISA de 96 pocillos con 100 ul de PD-1/Fc humana recombinante 0,75 ug/ml (R&D Systems) diluida en tampón carbonato/bicarbonato BupH, pH 9,4 (Pierce) durante 2 horas y luego se bloqueó con disolución de BSA (Jackson ImmunoResearch) durante 90-120 minutos. Se permitió que B7-DC-Ig humana diluida en serie (tipo natural, así como mutantes D111S muteína y K113S que se seleccionaron por la reducción de la unión a PD-1) así como el control de isotipo IgG1 humano se unieran durante 90 minutos. Se detectó B7-DC-Ig unida usando 100 uL de clon MIH18 de anticuerpo anti-B7-DC humano conjugado con biotina 0,5 ug/ml (eBioscience) seguido por HRP-estreptavidina diluido 1:1000 (BD Bioscience) y sustrato TMB (BioFX). Se leyó la absorbancia a 450 nm usando un lector de placas (Molecular Devices) y se analizaron los datos en el software SoftMax usando un ajuste logístico de 4 parámetros. Los datos mostraron que B7-DC-Ig humana (de tipo natural) se unía a PD-1 pero que los mutantes K113S y D111S no se unían a PD-1.

40 Naturalmente, ha de entenderse que en la realización de los procedimientos de las presentes divulgaciones no se pretende que la referencia a tampones, medios, reactivos, células, condiciones de cultivo y similares particulares sean limitativos, sino que debe considerarse que incluyen todos los materiales relacionados que un experto habitual en la técnica reconocería que son interesantes o valiosos en el contexto particular en el que se presenta esta discusión. Por ejemplo, a menudo es posible sustituir un sistema de tampón o medio de cultivo por otro y todavía lograr resultados similares, si no idénticos. Los expertos en la técnica tendrán conocimiento suficiente de tales sistemas y metodologías para poder realizar, sin experimentación excesiva, tales sustituciones que servirán de manera óptima a sus fines en el uso de los métodos y procedimientos dados a conocer en el presente documento.

45 Las divulgaciones se describen en más detalle en los siguientes ejemplos no limitativos. Ha de entenderse que estos métodos y ejemplos no limitan en modo alguno las divulgaciones a las realizaciones descritas en el presente documento y que sin duda se les ocurrirán otras realizaciones y usos a los expertos en la técnica.

50 **Ejemplos**

Ejemplo 1

55 BT-DC-Ig se une a células CHO que expresan PD01

Se conjugó en primer lugar B7-DC-Ig con alofocianina (APC) y luego se incubó a diversas concentraciones con una línea celular CHO que expresaba constitutivamente PD-1 o células CHO originales que no expresaban PD-1. Se analizó la unión mediante citometría de flujo. La figura 1 muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) de B7-DC-Ig-APC como función de la concentración de sonda (eje de las x). B7-DC-Ig-APC se une a células CHO.PD-1 (círculo negro) pero no a células CHO sin transfectar (triángulo gris).

Ejemplo 2

65 BT-DC-Ig compite con B7-H1 por la unión a PD-1.

Se conjugó en primer lugar B7-H1-Ig con alofocianina (APC). En primer lugar se incubó B7-DC-Ig sin marcar a

diversas concentraciones con una línea celular CHO que expresaba constitutivamente PD-1 antes de añadir B7-H1-Ig-APC a la sonda y a la mezcla de células. La figura 2 muestra la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) de B7-H1-Fc-APC mostrada como función de la concentración de agente de competencia B7-DC-Ig sin marcar (eje de las x) añadida. A medida que se aumenta la concentración de B7-DC-Ig sin marcar disminuye la cantidad de B7-H1-Ig-APC unido a células CHO, demostrando que B7-DC-Ig compite con B7-H1 por la unión a PD-1.

Ejemplo 3

Modelo de tumor CT26

Se obtuvo la línea celular de tumor colorrectal de ratón, CT26, de ATCC. Se generó un banco de células maestro en el pase 4 siguiendo las directrices de la ATCC. Se sometieron a prueba las células y se confirmó que no había contaminación por micoplasmas ni otros patógenos. Se descongeló un vial de células tumorales de las reservas criopreservadas y se hicieron crecer durante dos pases antes de la inoculación.

Se dividieron las células CT26 a una dilución 1:5 con 30 ml de medio completo (RPMI + FBS al 10%, L-Glu 2 mM y 1x P/S) durante dos días de cultivo o a una dilución 1:10 con 30 ml de medio completo durante 3 días de cultivo.

Se recogieron las células CT26 aspirando el medio, enjugando el frasco con 5 ml de PBS, añadiendo 5 ml de tripsina, incubando a 37°C durante 2 min, y luego neutralizando con 10 ml de medio completo. Tras centrifugar a 600 x g (~1000 rpm) durante 5 min, se aspiraron los medios y se resuspendió el sedimento celular pipeteando con 10 ml de RPMI puro. Se repitió esta etapa de lavado tres veces.

Se analizaron el número y la viabilidad celular de las células inoculadas mediante tinción con colorante azul trípango con la dilución apropiada (por ejemplo dilución 1:5, 10 µl de células + 40 µl de azul trípango) y se confirmó mediante recuento celular con NOVA durante la última etapa de lavado. La viabilidad celular generalmente fue mayor del 95% para la inoculación.

Se diluyeron células CT26 hasta $6,7 \times 10^5$ células/ml para la inoculación inicial con RPMI puro y se almacenaron en hielo. Normalmente se inoculó cada ratón con 150 µl (1×10^5 células).

En el día 9, se agruparon en primer lugar todos los ratones que portaban tumores en una jaula para ratas y se dividieron aleatoriamente los ratones en grupos experimentales. Se reconstituyó la disolución de CTX mediante 1x PBS hasta 4 mg/ml. Se inyectaron en los ratones por vía intraperitoneal (i.p.) 0,5 ml de disolución de CTX dando como resultado 2 mg para un ratón de 20 gramos, es decir 100 mg/kg.

En el día 10, se inyectaron en los ratones por vía i.p. 0,5 ml de B7-DC-Ig (0,2 mg/ml) dando como resultado 0,1 mg para un ratón de 20 gramos, es decir 5 mg/kg. Se administró la misma dosis 2 veces por semana durante 4 semanas, un total de 8 dosis. Se monitorizó el crecimiento tumoral midiendo el tumor dos veces por semana, comenzando el día en que se administró B7-DC-Ig a través de un calibrador digital. Se calculó el volumen tumoral tal como sigue:

$$\text{Volumen tumoral} = (D_{\text{corta}})^2 \times (D_{\text{larga}})/6 = \sim 0,52 \times (D_{\text{corta}})^2 \times (D_{\text{larga}})$$

Se sacrificó a los ratones y sacaron del estudio si el volumen tumoral alcanzaba 2000 mm³ o si había úlceras cutáneas e infecciones en el sitio de inoculación tumoral.

Ejemplo 4

La combinación de ciclofosfamida y B7-DC-Ig puede erradicar tumores establecidos

Se implantaron en ratones Balb/C de 9 a 11 semanas de edad por vía subcutánea $1,0 \times 10^5$ células de tumor colorrectal CT26 tal como se describió anteriormente. En el día 10 tras la implantación tumoral, los ratones recibieron 100 mg/kg de ciclofosfamida. El tratamiento con B7-DC-Ig comenzó 1 día después, en el día 11. Se trató a los ratones con 100 µg de B7-DC-Ig, 2 dosis por semana, durante 4 semanas y un total de 8 dosis. El 75% de los ratones que recibieron el régimen de tratamiento con CTX + B7-DC-Ig erradicaron los tumores establecidos en el día 44, mientras que todos los ratones en el grupo control de CTX solo murieron como resultado del crecimiento tumoral o se sacrificaron porque los tumores sobrepasaban los tamaños aprobados por IACUC (resultados mostrados en la figura 3). Estos resultados demuestran la eficacia del régimen de tratamiento en tumores establecidos y no la mera profilaxis.

Ejemplo 5

La combinación de ciclofosfamida y BT-DC-Ig puede erradicar tumores establecidos y proteger frente a la nueva exposición a tumor

Los ratones que erradicaron tumores colorrectales CT26 establecidos del experimento descrito anteriormente volvieron a exponerse a 1×10^5 células CT26 en el día 44 y el día 70. No crecieron tumores a partir de la nueva exposición lo que sugiere que habían desarrollado inmunidad anti-tumoral a largo plazo a partir del tratamiento de combinación de ciclofosfamida y B7-DC-Ig. Todos los ratones en el grupo control con vehículo desarrollaron tumores (resultados mostrados en la figura 4). Estos resultados muestran la eficacia del régimen de tratamiento en tumores establecidos y que el tratamiento de combinación de ciclofosfamida y B7-DC-Ig daba como resultado respuestas de memoria frente a antígenos tumorales.

Ejemplo 6

La combinación de ciclofosfamida y BT-DC-Ig puede generar linfocitos T citotóxicos de memoria, específicos de tumor

Los ratones que erradicaron tumores colorrectales CT26 establecidos del experimento descrito anteriormente volvieron a exponerse a $2,5 \times 10^5$ células CT26 en el día 44. Siete días después, se aislaron los bazo de ratón. Se pulsaron los esplenocitos de ratón con 5 ó 50 ug/ml de ovoalbúmina (OVA) o péptidos AH1 durante 6 horas en presencia de un bloqueante de Golgi (BD BioScience). Se analizaron las células efectoras T de memoria evaluando las células T $CD8^+/IFN\gamma^+$. Los resultados en la figura 5 muestran que había una cantidad significativa de células efectoras T específicas de CT26 en los ratones que erradicaron los tumores CT26.

Ejemplo 7

Efecto dependiente de la dosis de BT-DC-Ig sobre la erradicación de tumores

Se implantaron en ratones Balb/C de 9 a 11 semanas de edad por vía subcutánea $1,0 \times 10^5$ células de tumor colorrectal CT26. En el día 9 tras la implantación tumoral, los ratones recibieron una sola dosis de ciclofosfamida (100 mg/kg) y comenzaron el tratamiento en el día 10 con 30, 100 ó 300 μ g de B7-DC-Ig, 2 dosis por semana durante 4 semanas, un total 8 de dosis. La figura 6 muestra que hubo un 70% de ratones que erradicaron los tumores a los 300 μ g, un 40% de erradicación de tumor con 100 μ g, y que la dosis de 30 μ g dio lugar a un 10% erradicación de tumores.

Ejemplo 8

La combinación de ciclofosfamida y anticuerpo anti-PD-1 puede erradicar tumores establecidos

Este es un ejemplo comparativo.

Se expusieron ratones Balb/C de 9 a 11 semanas de edad por vía subcutánea a $1,0 \times 10^5$ células de tumor colorrectal CT26. En el día 11 tras la exposición a tumor, los ratones recibieron una sola dosis de ciclofosfamida (100 mg/kg) y comenzaron el tratamiento con anticuerpo anti-PD-1 (250 ug, clon G4, Hirano F. *et al.*, 2005 Cancer Research) que se administró 3 veces por semana durante cuatro semanas. El 70% de los ratones que recibieron el régimen de CTX + anticuerpo anti-PD-1 erradicaron los tumores CT26 establecidos en el día 50 tras la exposición a tumor, mientras que todos los ratones en los grupos control y de anticuerpo anti-PD-1 solo murieron como resultado del crecimiento tumoral o se sacrificaron porque los tumores sobrepasaban los tamaños aprobados por IACUC. Estos resultados muestran la eficacia del régimen de tratamiento en tumores establecidos y no la mera profilaxis. Los resultados se muestran en la figura 7.

Ejemplo 9

La combinación de ciclofosfamida y anticuerpo anti-CTLA4 puede erradicar tumores establecidos

Este es un ejemplo comparativo.

Se expusieron ratones Balb/C de 9 a 11 semanas de edad por vía subcutánea a $1,0 \times 10^5$ células de tumor colorrectal CT26. En el día 11 tras la exposición a tumor, los ratones recibieron 100 mg/kg de ciclofosfamida. Se comenzó el tratamiento con anticuerpo anti-CTLA4 (un anticuerpo anti-CTLA4 de ratón de hibridoma de hámster, depósito de ATCC, UC10-4F10-11) 1 día después, en el día 12. Se trató a los ratones con 100 ug de anticuerpo anti-CTLA4, 2 dosis por semana, durante 4 semanas. El 56% de los ratones que recibieron el régimen de CTX + anticuerpo anti-CTLA4 estuvieron libres de tumores en el día 50 tras la exposición a tumor, mientras que todos los ratones en el grupo control murieron como resultado del crecimiento tumoral o se sacrificaron porque los tumores sobrepasaban los tamaños aprobados por IACUC. Los resultados se muestran en la figura 8. Estos resultados muestran la eficacia del régimen de tratamiento en tumores establecidos y no la mera profilaxis.

Ejemplo 10

La combinación de régimen de ciclofosfamida y BT-DC-Ig conduce a reducción de Treg en el microentorno tumoral

La figura 9 muestra los resultados de experimentos en los que en ratones Balb/C de 9 a 11 semanas de edad se implantaron 1×10^5 células CT26 por vía subcutánea. En el día 9, se inyectaron a los ratones 100 mg/kg de CTX, i.p. Veinticuatro horas después, en el día 10, se trataron los ratones con 100 ug de B7-DC-Ig. Hubo 5 grupos: ratones sin tratamiento previo que no recibieron ninguna célula tumoral, con inyección de vehículo, CTX solo, CTX + B7-DC-Ig o B7-DC-Ig sola. Se retiraron del estudio dos ratones sin tratamiento previo y 4 ratones de los otros grupos en el día 11 (2 días tras CTX) y el día 16 (7 días tras CTX) para el análisis de células T. El panel de la izquierda muestra que en el día 11, 2 días tras la inyección de CTX, Treg en el bazo de los ratones con tratamiento con CTX era significativamente menor que en los ratones con implantación tumoral y en los que se inyectó vehículo. El panel de la derecha muestra que en el día 16, 7 días tras CTX y 6 días tras el tratamiento con B7-DC-Ig, B7-DC-Ig redujo significativamente las células T CD4+ con expresión alta de PD-1. Esto se observó tanto en los ratones tratados con B7-DC-Ig como en los tratados con CTX + B7-DC-Ig. Los ratones en los que se implantaron células tumorales tendían a tener más células T PD-1+/CD4+ en el LN de drenaje en comparación con ratones sin tratamiento previo.

15 Ejemplo 11

La combinación de ciclofosfamida y BT-DC-Ig puede promover la supervivencia de ratones en un modelo de tumor de próstata metastásico

20 Se inyectaron a ratones B10.D2 de 9 a 11 semanas de edad por vía intravenosa $3,0 \times 10^5$ células SP-1, que se aislaron de metástasis de pulmón tras la inyección de células TRAMP originales. Los ratones con CTX recibieron 3 dosis de CTX, 50 mg/kg, en los días 5, 12 y 19. Los ratones tratados con B7-DC-Ig recibieron 3 dosis de B7-DC-Ig, 5 mg/kg, en los días 6, 13 y 20. En el día 100, el 17% de los ratones en los grupos control, no tratados, con CTX solo, con B7-DC-Ig solo sobrevivieron, mientras que el 43% de los ratones que recibieron combinación de CTX y B7-DC-Ig sobrevivieron. Los resultados se muestran en la figura 10.

25 Ejemplo 12

La combinación de la vacuna contra el cáncer de *Listeria* y B7-DC-Ig puede potenciar la supervivencia de ratones tras la implantación hepática de CT26

Este es un ejemplo comparativo.

35 En ratones Balb/C de 11-13 semanas de edad se implantaron células CT26 usando una técnica de inyección en medio bazo (Yoshimura K *et al.*, 2007, Cancer Research). En el día 10, los ratones recibieron 1 inyección de CTX a 50 mg/kg, i.p. Veinticuatro horas después, en el día 11, se trataron los ratones con *Listeria* recombinante que portaba el péptido AH1, un epítipo inmunodominante de CT26, a $0,1 \text{ DL}_{50}$ (1×10^7 UFC), luego en los días 14 y 17. También se trataron los ratones con B7-DC-Ig en el día 11 y después en el día 18. La figura 11 muestra ratones sin ningún tratamiento o tratados con CTX y vacuna contra el cáncer de *Listeria*, todos muertos antes el día 45. Hubo un 60% de los ratones que recibieron la triple combinación, CTX + vacuna contra el cáncer de *Listeria* y B7-DC-Ig que sobrevivieron.

1. Lista de referencias

45 1. Brode S, Cooke A. Immune-potentiating effects of the chemotherapeutic drug cyclophosphamide. Crit Rev.Immunol. 2008; 28(2):109-26

50 2. van der Most RG, Currie AJ, Mahendran S, Prosser A, Darabi A, Robinson BW, Nowak AK, Lake RA. Tumor eradication after cyclophosphamide depends on concurrent depletion of regulatory T cells: a role for cycling TNFR2-expressing effector-suppressor T cells in limiting effective chemotherapy. Cancer Immunol. Immunother. Agosto de 2009; 58(8):1219-28

55 3. Taieb J, Chaput N, Scharzt N, Roux S, Novault S, Menard C, Ghiringhelli F, Terme M, Carpentier AF, Darrasse-Jeze G, *et al.* Chemoimmunotherapy of tumors: cyclophosphamide synergizes with exosome based vaccines. J.Immunol. 1 de marzo de 2006; 176(5):2722-9

60 4. Machiels JP, Reilly RT, Emens LA, Ercolini AM, Lei RY, Weintraub D, Okoye FI, Jaffee EM. Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice. Cancer Res. 1 de mayo de 2001; 61(9):3689-97

65 5. Bass KK, Mastrangelo MJ. Immunopotential with low-dose cyclophosphamide in the active specific immunotherapy of cancer. Cancer Immunol.Immunother. Septiembre de 1998; 47(1):1-12

6. Hengst JC, Moky MB, Dray S. Cooperation between cyclophosphamide tumoricidal activity and host antitumor immunity in the cure of mice bearing large MOPC-315 tumors. Cancer Res. Junio de 1981; 41(6):2163-7

7. Hengst JC, Mokyry MB, Dray S. Importance of timing in cyclophosphamide therapy of MOPC-315 tumor-bearing mice. *Cancer Res.* Julio de 1980; 40(7):2135-41
8. Tsung K, Meko JB, Tsung YL, Peplinski GR, Norton JA. Immune response against large tumors eradicated by treatment with cyclophosphamide and IL-12. *J. Immunol.* 1 de febrero de 1998; 160(3):1369-77
9. Honeychurch J, Glennie MJ, Illidge TM. Cyclophosphamide inhibition of anti-CD40 monoclonal antibody-based therapy of B cell lymphoma is dependent on CD11b+ cells. *Cancer Res.* 15 de agosto de 2005; 65(16):7493-501
10. Wada S, Yoshimura K, Hipkiss EL, Harris TJ, Yen HR, Goldberg MV, Grosso JF, Getnet D, Demarzo AM, Netto GJ, Anders R, Pardoll DM, Drake CG. Cyclophosphamide augments antitumor immunity: studies in an autochthonous prostate cancer model. *Cancer Res.* 15 de mayo de 2009; 69(10):4309-18.
11. Freeman, G.J. Structures of PD-1 with its ligands: sideways and dancing cheek to cheek. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10275-10276 (2008).
12. Brode,S. & Cooke, A. Immune-potentiating effects of the chemotherapeutic drug cyclophosphamide. *Crit Rev. Immunol.* 28, 109-126 (2008).
13. van der Most,R.G. *et al.* Tumor eradication after cyclophosphamide depends on concurrent depletion of regulatory T cells: a role for cycling TNFR2-expressing effector-suppressor T cells in limiting effective chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 1219-1228 (2009).
14. Taieb,J. *et al.* Chemoimmunotherapy of tumors: cyclophosphamide synergizes with exosome based vaccines. *J. Immunol.* 176, 2722-2729 (2006).
15. Bass,K.K. & Mastrangelo, M.J. Immunopotiation with low-dose cyclophosphamide in the active specific immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 47, 1-12 (1998).
16. Machiels, J.P. *et al.* Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice. *Cancer Res.* 61, 3689-3697 (2001).
17. Hengst. J.C., Mokyry, M.B., & Dray, S. Cooperation between cyclophosphamide tumoricidal activity and host antitumor immunity in the cure of mice bearing large MOPC-315 tumors. *Cancer Res.* 41, 2163-2167 (1981).
18. Hengst, J.C., Mokyry, M.B., & Dray, S. Importance of timing in cyclophosphamide therapy of MOPC-315 tumor-bearing mice. *Cancer Res.* 40, 2135-2141 (1980).
19. Tsung,K., Meko,J.B., Tsung,Y.L., Peplinski,G.R., & Norton,J.A. Immune response against large tumors eradicated by treatment with cyclophosphamide and IL-12. *J. Immunol.* 160, 1369-1377 (1998).
20. Honeychurch,J., Glennie,M.J., & Illidge,T.M. Cyclophosphamide inhibition of anti-CD40 monoclonal antibody-based therapy of B cell lymphoma is dependent on CD11b+ cells. *Cancer Res.* 65, 7493-7501 (2005).
21. Wada S, Yoshimura K, Hipkiss EL, Harris TJ, Yen HR, Goldberg MV, Grosso JF, Getnet D, Demarzo AM, Netto GJ, Anders R, Pardoll DM, Drake CG. Cyclophosphamide augments antitumor immunity: studies in an autochthonous prostate cancer model. *Cancer Res.* 15 de mayo de 2009; 69(10):4309-18.

50 **Lista de secuencias**

- <110> Langermann, Solomon
- <120> Composiciones de antagonistas de PD-1 y métodos de uso
- <130> 21682-6
- <140>
- <141>
- <150> Documento 61/211.697 <151> 02-04-2009
- <150> Documento 61/091.692 <151> 25-08-2008
- <150> Documento 61/091.709 <151> 25-08-2008

<150> Documento 61/091.705 <151> 25-08-2008

<160> 20

5 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 273

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

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

```

15

Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr
 115 120 125

His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln
 130 135 140

Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val
 145 150 155 160

Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val
 165 170 175

Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys
 180 185 190

Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp
 195 200 205

Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Leu Leu His
 210 215 220

Ile Phe Ile Pro Phe Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val
 225 230 235 240

Ile Ala Leu Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp
 245 250 255

Thr Thr Lys Arg Pro Val Thr Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala
 260 265 270

Ile

- <210> 2
- <211> 254
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

<400> 2

Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly
 1 5 10 15

Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn
 20 25 30

10 Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser

ES 2 545 609 T3

Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly
1 5 10 15

Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn
20 25 30

Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
35 40 45

Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly
50 55 60

Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln
65 70 75 80

Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu
85 90 95

Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu
100 105 110

Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly
115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn
130 135 140

Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
145 150 155 160

Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp
165 170 175

Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser
180 185 190

Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp
195 200

<210> 4
<211> 202
5 <212> PRT
<213> murino

<400> 4

Leu Phe Thr Val Thr Ala Pro Lys Glu Val Tyr Thr Val Asp Val Gly

10

ES 2 545 609 T3

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

- 5 <210> 7
- <211> 233
- <212> PRT
- <213> murino
- 10 <400> 7

ES 2 545 609 T3

Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro
 1 5 10 15
 Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
 20 25 30
 Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val
 35 40 45
 Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe
 50 55 60
 Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu
 65 70 75 80
 Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His
 85 90 95
 Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys
 100 105 110
 Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser
 115 120 125
 Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met
 130 135 140
 Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro
 145 150 155 160
 Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn
 165 170 175
 Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met
 180 185 190
 Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser
 195 200 205
 Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr
 210 215 220
 Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 225 230

5 <210> 8
 <211> 1365
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> B7-DC-Ig murina

<400> 8

ES 2 545 609 T3

```

atgctgctcc tgctgcegat actgaacctg agcttacaac ttcacacctgt agcagcttta    60
ttcacctgga cagcccctaa agaagtgtac accgtagacg tcggcagcag tgtgagcctg    120
gagtgcgatt ttgaccgcag agaatgcact gaactggaag ggataagagc cagtttgagc    180
aaggtagaaa atgatacgtc tctgcaaagt gaaagagcca ccctgctgga ggagcagctg    240
cccctgggaa aggctttggt ccacatccct agtgtccaag tgagagattc cgggcagtac    300
cgttgccctgg tcatctgcgg ggccgcctgg gactacaagt acctgacggt gaaagtcaaa    360
gcttcttaca tgaggataga cactaggatc ctggagggtc caggtacagg ggagggtgag    420
cttacctgcc aggctagagg ttatccccta gcagaagtgt cctggcaaaa tgtcagtggt    480
cctgccaaca ccagccacat caggaccccc gaaggcctct accaggtcac cagtgttctg    540
cgcctcaagc ctcagcctag cagaaacttc agctgcatgt tctggaatgc tcacatgaag    600
gagctgactt cagccatcat tgaccctctg agtcggatgg aaccctaaagt cccagaacg    660
tgggagccaa gaggtcctac gatcaagccc tgcccgcctt gtaaagccc agctccaaat    720
ttgctgggtg gaccgtcagt ctttatcttc ccgccaaga taaaggacgt cttgatgatt    780
agtctgagcc ccatcgtgac atgctgtgtg gtggatggtt cagaggatga ccccgacgtg    840
caaatcagtt ggttcgttaa caacgtggag gtgcataccg ctcaaaccga gaccacaga    900
gaggattata acagcacctc gcgggtagtg tccgcccctg cgatccagca tcaggattgg    960
atgagcggga aagagtcaa gtgtaaggta aacaacaaag atctgccagc gccgattgaa   1020
cgaaccatta gcaagccgaa agggagcgtg cgcgcacctc aggtttacgt ccttccctca   1080

ccagaagagg agatgacgaa aaagcaggtg accctgacat gcatggtaac tgactttatg   1140
ccagaagata tttacgtgga atggactaat aacggaaaga cagagctcaa ttacaagaac   1200
actgagcctg ttctggattc tgatggcagc tactttatgt actccaaatt gagggtcgag   1260
aagaagaatt gggtcgagag aaacagttat agttgctcag tgggtgcatga ggcctccat   1320
aatcatcaca ccacaaagtc cttcagccga acgcccggga aatga                       1365

```

- 5 <210> 9
- <211> 454
- <212> PRT
- <213> artificial

- 10 <220>
- <223> B7-DC-Ig murina
- <400> 9

ES 2 545 609 T3

Met Leu Leu Leu Leu Pro Ile Leu Asn Leu Ser Leu Gln Leu His Pro
 1 5 10 15

Val Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Ala Pro Lys Glu Val Tyr Thr Val
 20 25 30

Asp Val Gly Ser Ser Val Ser Leu Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu
 35 40 45

Cys Thr Glu Leu Glu Gly Ile Arg Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn
 50 55 60

Asp Thr Ser Leu Gln Ser Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu
 65 70 75 80

Pro Leu Gly Lys Ala Leu Phe His Ile Pro Ser Val Gln Val Arg Asp
 85 90 95

Ser Gly Gln Tyr Arg Cys Leu Val Ile Cys Gly Ala Ala Trp Asp Tyr
 100 105 110

Lys Tyr Leu Thr Val Lys Val Lys Ala Ser Tyr Met Arg Ile Asp Thr
 115 120 125

Arg Ile Leu Glu Val Pro Gly Thr Gly Glu Val Gln Leu Thr Cys Gln
 130 135 140

Ala Arg Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Gln Asn Val Ser Val
 145 150 155 160

ES 2 545 609 T3

Pro Ala Asn Thr Ser His Ile Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val
 165 170 175

Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Gln Pro Ser Arg Asn Phe Ser Cys
 180 185 190

Met Phe Trp Asn Ala His Met Lys Glu Leu Thr Ser Ala Ile Ile Asp
 195 200 205

Pro Leu Ser Arg Met Glu Pro Lys Val Pro Arg Thr Trp Glu Pro Arg
 210 215 220

Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn
 225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp
 245 250 255

Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270

Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn
 275 280 285

Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn
 290 295 300

Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp
 305 310 315 320

Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro
 325 330 335

Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala
 340 345 350

Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys
 355 360 365

Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile
 370 375 380

Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn
 385 390 395 400

Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys
 405 410 415

Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys
 420 425 430

Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe
 435 440 445

Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 450

ES 2 545 609 T3

<210> 10
 <211> 435
 <212> PRT
 5 <213> artificial

<220>
 <223> Proteína de fusión B7-DC-Ig murina sin secuencia señal

10 <400> 10

Leu Phe Thr Val Thr Ala Pro Lys Glu Val Tyr Thr Val Asp Val Gly
 1 5 10 15

Ser Ser Val Ser Leu Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu Cys Thr Glu
 20 25 30

Leu Glu Gly Ile Arg Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
 35 40 45

Leu Gln Ser Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly
 50 55 60

Lys Ala Leu Phe His Ile Pro Ser Val Gln Val Arg Asp Ser Gly Gln
 65 70 75 80

Tyr Arg Cys Leu Val Ile Cys Gly Ala Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu
 85 90 95

Thr Val Lys Val Lys Ala Ser Tyr Met Arg Ile Asp Thr Arg Ile Leu
 100 105 110

Glu Val Pro Gly Thr Gly Glu Val Gln Leu Thr Cys Gln Ala Arg Gly
 115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Gln Asn Val Ser Val Pro Ala Asn
 130 135 140

ES 2 545 609 T3

Thr Ser His Ile Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Lys Pro Gln Pro Ser Arg Asn Phe Ser Cys Met Phe Trp
 165 170 175
 Asn Ala His Met Lys Glu Leu Thr Ser Ala Ile Ile Asp Pro Leu Ser
 180 185 190
 Arg Met Glu Pro Lys Val Pro Arg Thr Trp Glu Pro Arg Gly Pro Thr
 195 200 205
 Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly
 210 215 220
 Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met
 225 230 235 240
 Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu
 245 250 255
 Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val
 260 265 270
 His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu
 275 280 285
 Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly
 290 295 300
 Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile
 305 310 315 320
 Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val
 325 330 335
 Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr
 340 345 350
 Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu
 355 360 365
 Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro
 370 375 380
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val
 385 390 395 400
 Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val
 405 410 415
 His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr
 420 425 430
 Pro Gly Lys
 435

ES 2 545 609 T3

<210> 11
 <211> 1362
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> B7-DC-Ig humana

10 <400> 11

```

atgatcttcc ttctcttgat gctgtctttg gaattgcaac ttcaccaaat cgcggcctc      60
tttactgtga ccgtgccaaa agaactgtat atcattgagc acgggtccaa tgtgacctc      120
gaatgtaact ttgacaccgg cagccacggt aacctggggg ccatcactgc cagcttgcaa      180
aaagttgaaa acgacacttc acctcaccgg gagagggcaa cctctctgga ggagcaactg      240
ccattgggga aggccctcct tcatatccct caggtgcagg ttcgggatga gggacagtac      300
cagtgcatta ttatctacgg cgtggcttgg gattacaagt atctgacctc gaaggtgaaa      360
gcgtcctatc ggaaaattaa cactcacatt ctttaagggtc cagagacgga cgaggtggaa      420
ctgacatgcc aagccaccgg ctaccctgtg gcagagggtc gctggcccaa cgtgagcgta      480
cctgctaaca cttctcattc taggacacc cagggcctct accagggtac atccgtgctc      540
cgcctcaaac cgccccagg ccggaatctt agttgcgtgt tttggaatac ccacgtgcga      600
gagctgactc ttgcatctat tgatctgcag tcccagatgg agccacggac tcatccaact      660
tgggaacctc aatcttgcca taaaactcat acctgtcccc cttgcccagc ccccagactt      720
ctgggaggtc ccagtggtgt tctgtttccc ccaaaacctc aggacacact tatgatatcc      780
cgaacgccgg aagtgacatg cgtggttgtg gacgtctcac acgaagacc ggaggtgaaa      840
ttcaactggt acgttgacgg agttgaggtt cataacgcta agaccaagcc cagagaggag      900
caatacaatt ccacctatcg agtggtagt gtactgaccg ttttgacca agactggctg      960
aatggaaaag aatacaagtg caaagtatca aacaaggctt tgcctgcacc catcgagaag     1020
acaatttcta aagccaaagg gcagcccagg gaaccgcagg tgtacacact cccaccatcc     1080
cgcgacgagc tgacaaagaa tcaagtatcc ctgacctgcc tggtgaaagg cttttacca     1140
tctgacattg ccgtggaatg ggaatcaaat ggacaacctg agaacaacta caaaaccact     1200
ccacctgtgc ttgacagcga cgggtccttt ttctgtaca gtaagctcac tgtcgataag     1260
tctcgtggc agcagggcaa cgtcttttca tgtagtgtga tgcacgaagc tctgcacaac     1320
cattacacc agaagtctct gtcactgagc ccaggtaaat ga                          1362
    
```

15

<210> 12
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> B7-DC-Ig humana

<400> 12

25

ES 2 545 609 T3

Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln
 1 5 10 15

Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile
 20 25 30

Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser
 35 40 45

His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn
 50 55 60

Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu
 65 70 75 80

Pro Leu Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp
 85 90 95

Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr
 100 105 110

Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr
 115 120 125

His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln
 130 135 140

Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val
 145 150 155 160

ES 2 545 609 T3

Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val
 165 170 175

Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys
 180 185 190

Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp
 195 200 205

Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Glu Pro Lys
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu

ES 2 545 609 T3

405

410

415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 13

<211> 434

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> B7-DC-Ig humana sin secuencia señal

10

<400> 13

Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly
1 5 10 15

Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn
20 25 30

Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
35 40 45

Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly
50 55 60

Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln
65 70 75 80

Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu
85 90 95

Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu
100 105 110

Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly
115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn
130 135 140

ES 2 545 609 T3

Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
145 150 155 160

Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp
165 170 175

Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser
180 185 190

Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Glu Pro Lys Ser Cys Asp
195 200 205

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
210 215 220

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
225 230 235 240

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
245 250 255

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
260 265 270

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
275 280 285

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
290 295 300

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
305 310 315 320

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
325 330 335

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
340 345 350

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
355 360 365

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
370 375 380

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp

ES 2 545 609 T3

Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly
 115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn
 130 135 140

Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
 145 150 155 160

Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp
 165 170 175

Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser
 180 185 190

Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp
 195 200

<210> 16
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 16

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
 1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
 20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
 35 40 45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
 50 55 60

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

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
 85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
 100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
 115 120 125

10

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
 130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
 145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
 165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
 180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
 195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
 210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
 225 230 235 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
 245 250 255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
 260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
 275 280 285

Glu Thr
 290

<210> 17

<211> 290

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 17.

Met Arg Ile Phe Ala Gly Ile Ile Phe Thr Ala Cys Cys His Leu Leu
 1 5 10 15

Arg Ala Phe Thr Ile Thr Ala Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
 20 25 30

10

ES 2 545 609 T3

Gly Ser Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu
 35 40 45

Asp Leu Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val
 50 55 60

Ile Gln Phe Val Ala Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Asn
 65 70 75 80

Phe Arg Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn
 85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
 100 105 110

Cys Cys Ile Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu
 115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp
 130 135 140

Pro Ala Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro
 145 150 155 160

Glu Ala Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Pro Val Ser Gly
 165 170 175

Lys Arg Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val
 180 185 190

Thr Ser Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys
 195 200 205

Thr Phe Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile
 210 215 220

Ile Pro Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn Arg Thr His Trp
 225 230 235 240

Val Leu Leu Gly Ser Ile Leu Leu Phe Leu Ile Val Val Ser Thr Val
 245 250 255

Leu Leu Phe Leu Arg Lys Gln Val Arg Met Leu Asp Val Glu Lys Cys
 260 265 270

Gly Val Glu Asp Thr Ser Ser Lys Asn Arg Asn Asp Thr Gln Phe Glu
 275 280 285

Glu Thr
 290

- 5 <210> 18
- <211> 290
- <212> PRT
- <213> *Macaca mulatta*

ES 2 545 609 T3

<400> 18

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Thr Ile Tyr Trp His Leu Leu
 1 5 10 15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
 20 25 30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
 35 40 45

Gly Leu Thr Ser Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
 50 55 60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Asn
 65 70 75 80

Tyr Arg Gln Arg Ala Gln Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
 85 90 95

Ala Ala Leu Arg Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
 100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
 115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
 130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
 145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
 165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Leu Asn
 180 185 190

ES 2 545 609 T3

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Ala Asn Glu Ile Phe Tyr
 195 200 205

Cys Ile Phe Arg Arg Leu Gly Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
 210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala Leu Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
 225 230 235 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Phe Leu Leu Leu Gly Val Ala Leu Thr
 245 250 255

Phe Ile Phe Tyr Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Met Lys Lys Ser
 260 265 270

Gly Ile Arg Val Thr Asn Ser Lys Lys Gln Arg Asp Thr Gln Leu Glu
 275 280 285

Glu Thr
 290

- <210> 19
- <211> 288
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*

<400> 19

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
 20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Phe Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
 35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
 50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
 65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
 85 90 95

10 Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg

ES 2 545 609 T3

100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 20

<211> 288

5 <212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 20

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Glu Ser Pro Asp Arg Pro Trp
20 25 30

10

ES 2 545 609 T3

Asn Ala Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Leu Val Thr Glu Gly Asp
 35 40 45
 Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Ala Ser Glu Ser Phe Val
 50 55 60
 Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
 65 70 75 80
 Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
 85 90 95
 Val Thr Arg Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
 100 105 110
 Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
 115 120 125
 Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
 130 135 140
 Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
 145 150 155 160
 Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
 165 170 175
 Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
 180 185 190
 Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
 195 200 205
 Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
 210 215 220
 Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
 225 230 235 240
 Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
 245 250 255
 Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
 260 265 270
 Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
 275 280 285

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende:

5 una proteína de fusión que comprende porciones peptídicas primera y segunda en la que dicha primera porción peptídica consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de: B7-DC de tipo natural, una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 98% con respecto a los aminoácidos 20-221 ó 20-121 de SEQ ID NO: 1 y que compite *in vitro* con B7-DC de tipo natural por la unión a PD-1, un fragmento de B7-DC que compite *in vitro* con B7-DC de tipo natural por la unión a PD-1, y un dominio extracelular de B7-DC y dicha segunda porción

10 peptídica comprende una porción de un inmunoglobulina (Ig);

para su uso en un método de aumento de una respuesta de células T en un ser humano;

15 en la que el ser humano es uno a quien se le ha administrado previamente una composición que comprende un agente de potenciación seleccionado del grupo que consiste en: ciclofosfamida, un análogo de ciclofosfamida, sunitinib, anticuerpo anti-TGF β , imatinib, antraciclinas, oxaliplatino y doxorubicina, y en la que la dosificación del agente de potenciación no es eficaz para tener actividad antitumoral directa;

20 y en la que la respuesta de células T lograda tras la administración de la proteína de fusión es mayor que la respuesta de células T lograda mediante la administración o bien de la proteína de fusión sola o bien del agente de potenciación solo.

2. Composición que comprende:

25 un agente de potenciación seleccionado del grupo que consiste en: ciclofosfamida, un análogo de ciclofosfamida, sunitinib, anticuerpo anti-TGF β , imatinib, antraciclinas, oxaliplatino y doxorubicina,

para su uso en un método de aumento de una respuesta de células T en un ser humano;

30 en la que la dosificación del agente de potenciación no es eficaz para tener una actividad antitumoral directa;

en la que el ser humano es uno a quien se le va a administrar posteriormente una composición que comprende una proteína de fusión que comprende porciones peptídicas primera y segunda en la que dicha primera porción peptídica consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de: B7-DC de tipo natural, una secuencia de aminoácidos

35 que tiene una identidad de al menos el 98% con respecto a los aminoácidos 20-221 ó 20-121 de SEQ ID NO: 1 y que compite *in vitro* con B7-DC de tipo natural por la unión a PD-1, un fragmento de B7-DC que compite *in vitro* con B7-DC de tipo natural por la unión a PD-1, y un dominio extracelular de B7-DC y dicha segunda porción peptídica comprende una porción de una inmunoglobulina (Ig);

40 y en la que la respuesta de células T lograda tras la administración de la proteína de fusión es mayor que la respuesta de células T lograda mediante la administración o bien de la proteína de fusión sola o bien del agente de potenciación solo.

45 3. Composición para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha primera porción peptídica consiste en un polipéptido de B7-DC de tipo natural.

4. Composición para su uso según la reivindicación 3, en la que dicho B7-DC es un B7-DC humano.

50 5. Composición para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha primera porción peptídica consiste en un fragmento de B7-DC que no comprende ninguna porción de la porción transmembrana de dicho polipéptido de B7-DC.

6. Composición para su uso según la reivindicación 5, en la que dicha primera porción peptídica consiste en la porción soluble de dicho polipéptido de B7-DC y dicha segunda porción peptídica comprende la región Fc de un anticuerpo pero no comprende ninguna de las regiones variables de dicho anticuerpo.

55

7. Composición para su uso según la reivindicación 5 ó 6, en la que dicha primera porción peptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y dicha segunda porción polipeptídica comprende la región Fc de un anticuerpo pero no comprende ninguna de las regiones variables de dicho anticuerpo.

60

8. Composición para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha primera porción peptídica consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 98% con respecto a los aminoácidos 20-221 ó 20-121 de SEQ ID NO: 1.

65 9. Composición para su uso según la reivindicación 8, en la que dicha primera porción peptídica consiste en la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 20-221 ó 20-121 de SEQ ID NO: 1.

10. Composición para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 95% con respecto a la secuencia de SEQ ID NO: 9, 10, 12 ó 13.
- 5 11. Composición para su uso según la reivindicación 10, en la que dicha proteína de fusión comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, 12 ó 13.
- 10 12. Composición para su uso según cualquier reivindicación anterior, en la que dicha proteína de fusión es un monómero.
13. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que dicha proteína de fusión forma un dímero.
- 15 14. Composición para su uso según la reivindicación 13, en la que dicha proteína de fusión forma un homodímero.
15. Composición para su uso según la reivindicación 13, en la que dicha proteína de fusión forma un heterodímero.
- 20 16. Composición para su uso según cualquier reivindicación anterior, en la que dicho agente de potenciación es ciclofosfamida o un análogo de ciclofosfamida.
- 25 17. Composición para su uso según cualquier reivindicación anterior, para su uso en un método según cualquier reivindicación anterior, en la que dicho agente de potenciación se administra al menos X horas antes de administrar dicha proteína de fusión, en la que X se selecciona de 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 24 y 30.
- 30 18. Composición para su uso según cualquier reivindicación anterior, en la que dicha proteína de fusión comprende un fragmento de B7-DC de tipo natural que compite *in vitro* con B7-DC de tipo natural por la unión a PD-1.
19. Composición para su uso según la reivindicación 18, en la que dicho fragmento de B7-DC de tipo natural no comprende ninguna porción de la porción transmembrana de tal polipéptido.
- 35 20. Composición para su uso según la reivindicación 18, en la que dicho polipéptido de B7-DC es polipéptido B7-DC humano.
- 40 21. Composición para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha primera porción peptídica consiste en el dominio extracelular de B7-DC o un polipéptido que sólo se diferencia del mismo por sustituciones de aminoácidos conservativas.
- 45 22. Composición para su uso según cualquier reivindicación anterior, en la que dicha proteína de fusión se usa en una cantidad suficiente para tratar cáncer o infección mediante un aumento de la respuesta inmunitaria mediada por células T.
- 50 23. Composición para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho método comprende el tratamiento de cáncer.
- 55 24. Composición para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho método comprende el tratamiento de una enfermedad infecciosa.
- 60 25. Composición para su uso según la reivindicación 23, en la que dicho cáncer es cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer nasofaríngeo, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer uterino, cáncer de ovarios, cáncer de testículos o cáncer hematológico.
- 65 26. Composición para su uso según la reivindicación 23 para su uso en dicho método, en la que dicho método comprende además administrar al menos un agente adicional seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-CTLA4, un inhibidor de la mitosis, un inhibidor de aromatasa, un antagonista de A2AR y un inhibidor de la angiogénesis con dicha proteína de fusión.
27. Kit de partes que comprende:
- una proteína de fusión que comprende porciones peptídicas primera y segunda, en la que dicha primera porción peptídica consiste en los aminoácidos 20-221 de SEQ ID NO: 1, y dicha segunda porción peptídica comprende una porción de una inmunoglobulina (Ig);
- y ciclofosfamida;

para su uso en un método de tratamiento de cáncer;

en el que dicha ciclofosfamida se administra antes que dicha proteína de fusión y dicha proteína de fusión se administra sin ciclofosfamida tras la administración de ciclofosfamida;

5

en el que la dosificación de ciclofosfamida no es eficaz para tener actividad antitumoral directa.

28. Composición para su uso según la reivindicación 27, en la que dicha segunda porción peptídica comprende los aminoácidos 245-476 de IgG1 humana.

10

29. Composición para su uso según la reivindicación 27 para su uso en el método según la reivindicación 27, en la que dicha ciclofosfamida se administra a dicho paciente al menos 24 horas antes de la administración de la proteína de fusión.

15

30. Kit de partes que comprende:

una proteína de fusión que comprende porciones peptídicas primera y segunda, en la que dicha primera porción peptídica consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de: B7-DC de tipo natural, una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 98% con respecto a los aminoácidos 20-221 ó 20-121 de SEQ ID NO: 1 y que compite *in vitro* con B7-DC de tipo natural por la unión a PD-1, un fragmento de B7-DC que compite *in vitro* con B7-DC de tipo natural por la unión a PD-1, y un dominio extracelular de B7-DC y dicha segunda porción peptídica comprende una porción de una inmunoglobulina (Ig);

20

y un agente de potenciación seleccionado del grupo que consiste en: ciclofosfamida, un análogo de ciclofosfamida, sunitinib, anticuerpo anti-TGF β , imatinib, antraciclinas, oxaliplatino y doxorubicina;

25

para su uso en un método de aumento de una respuesta de células T en un ser humano;

en el que dicho agente de potenciación va a administrarse antes que dicha proteína de fusión y dicha proteína de fusión va a administrarse sin dicho agente de potenciación tras la administración de dicho agente de potenciación;

30

en el que la dosificación del agente de potenciación no es eficaz para tener actividad antitumoral directa;

y en el que la respuesta de células T lograda tras la administración de la proteína de fusión es mayor que la respuesta de células T lograda mediante la administración o bien de la proteína de fusión sola o bien del agente de potenciación solo.

35

Figura 1. Unión de B7-DC-Ig a células CHO que expresan PD-1

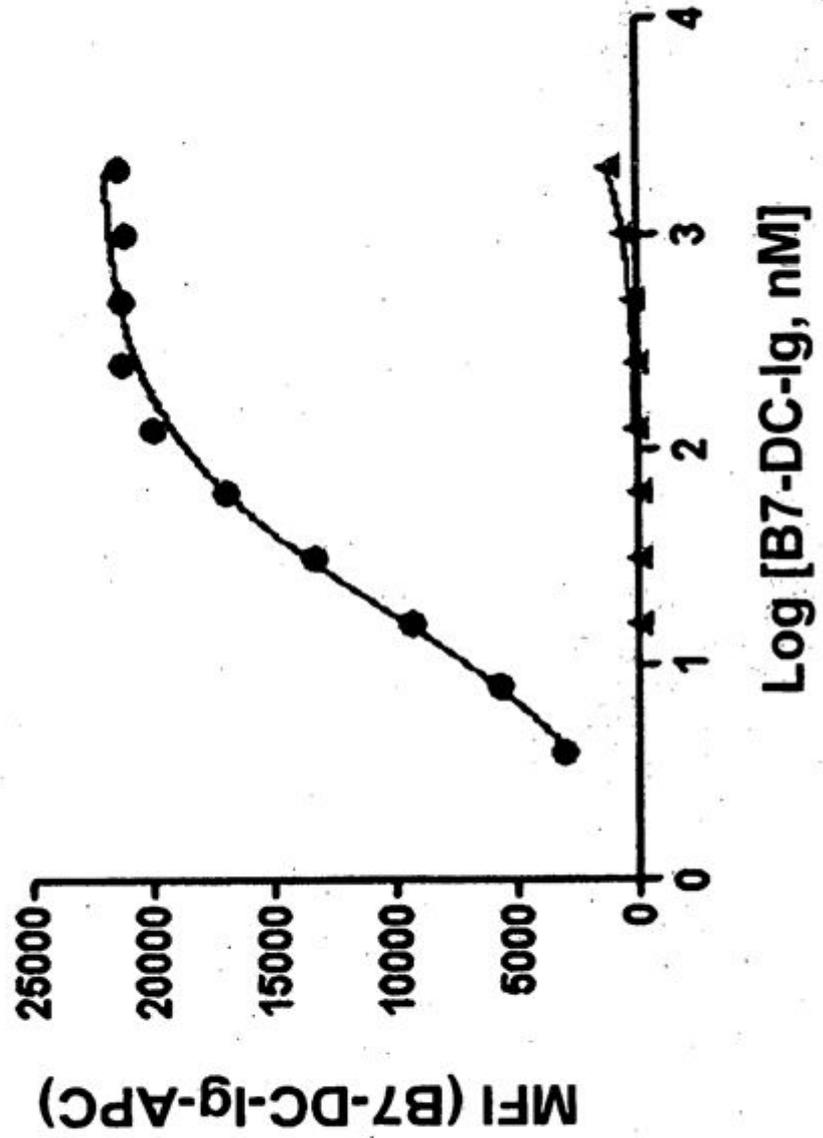


Figura 2. B7-DC-Ig compete con B7-H1 por la unión a PD-1

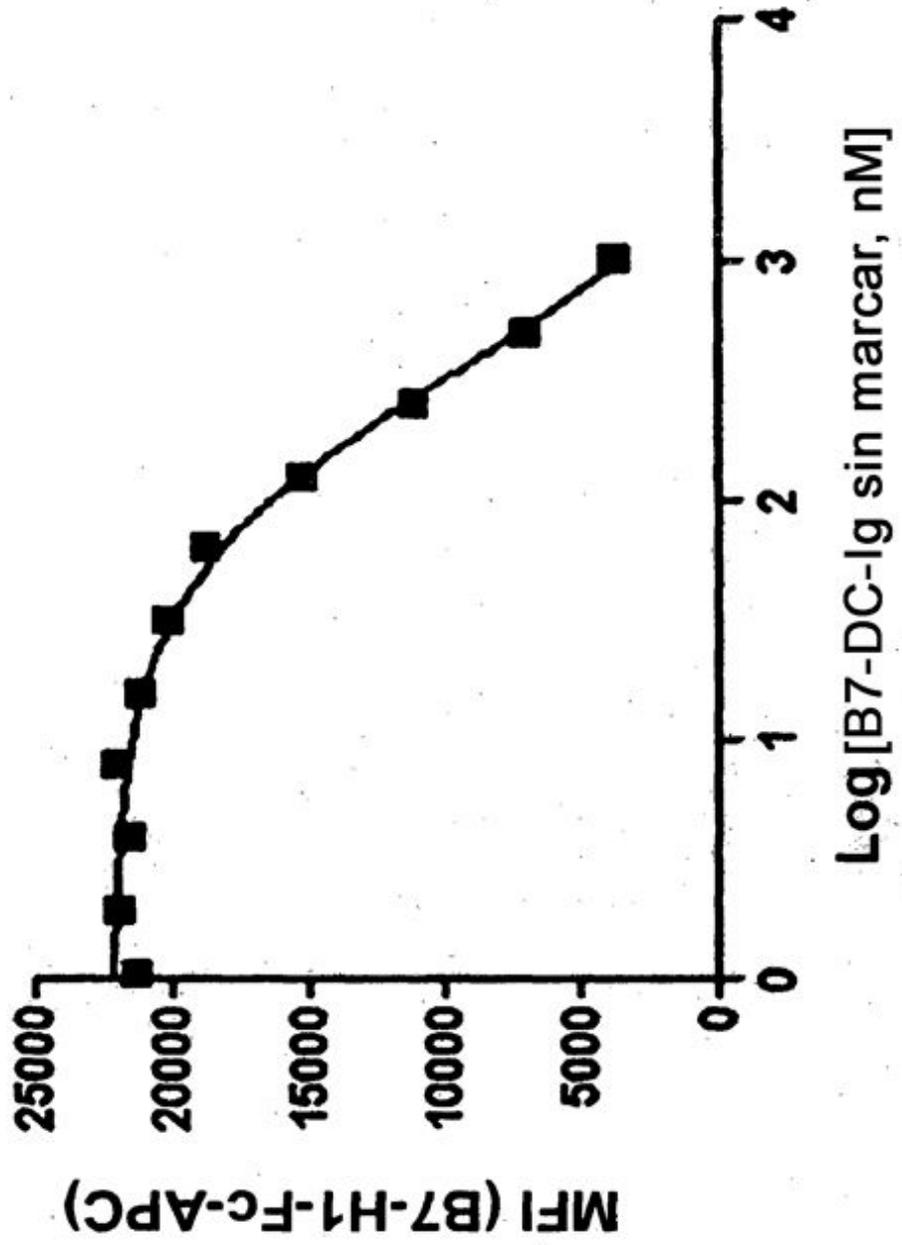
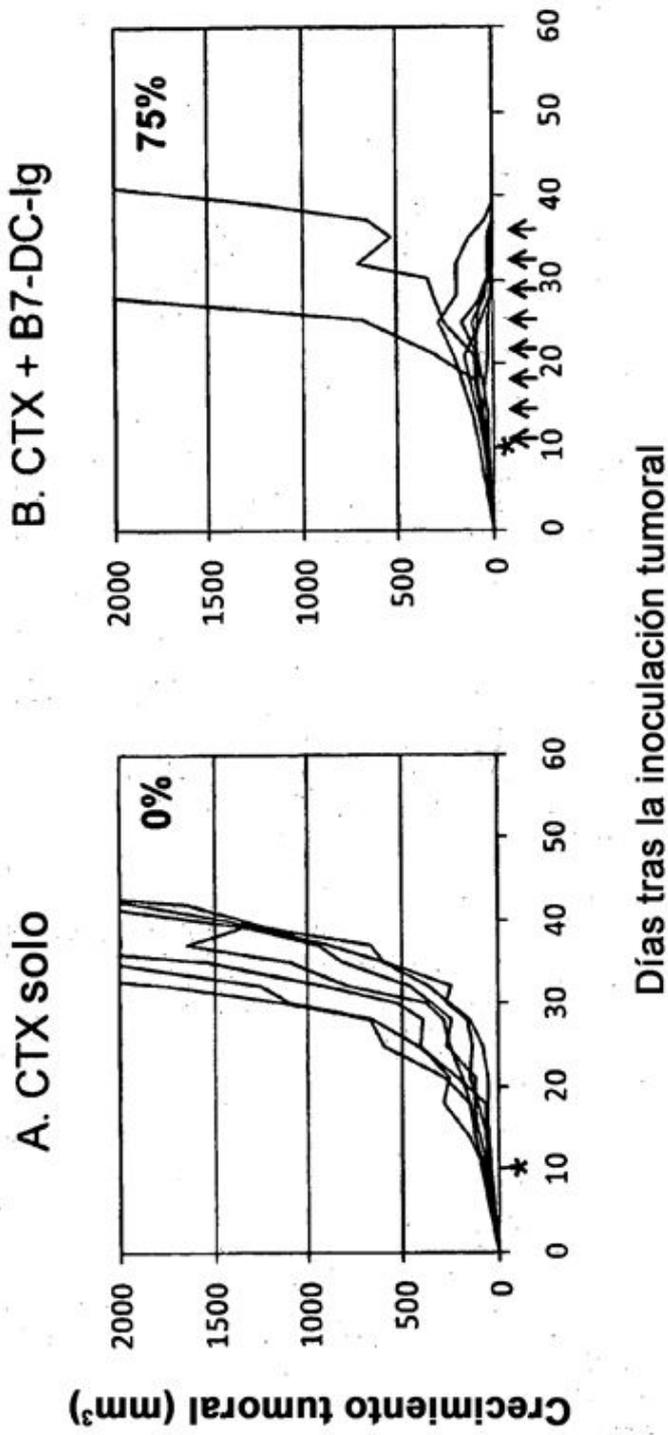


Figura 3-1. CTX combinado con B7-DC-Ig



* CTX, 100 mg/kg, en el día 10

↑ B7-DC-Ig, 5 mg/kg, día 11, 2 veces por semana

N=8

Figura 3-2. CTX combinado con B7-DC-Ig

C. Volumen tumoral promedio

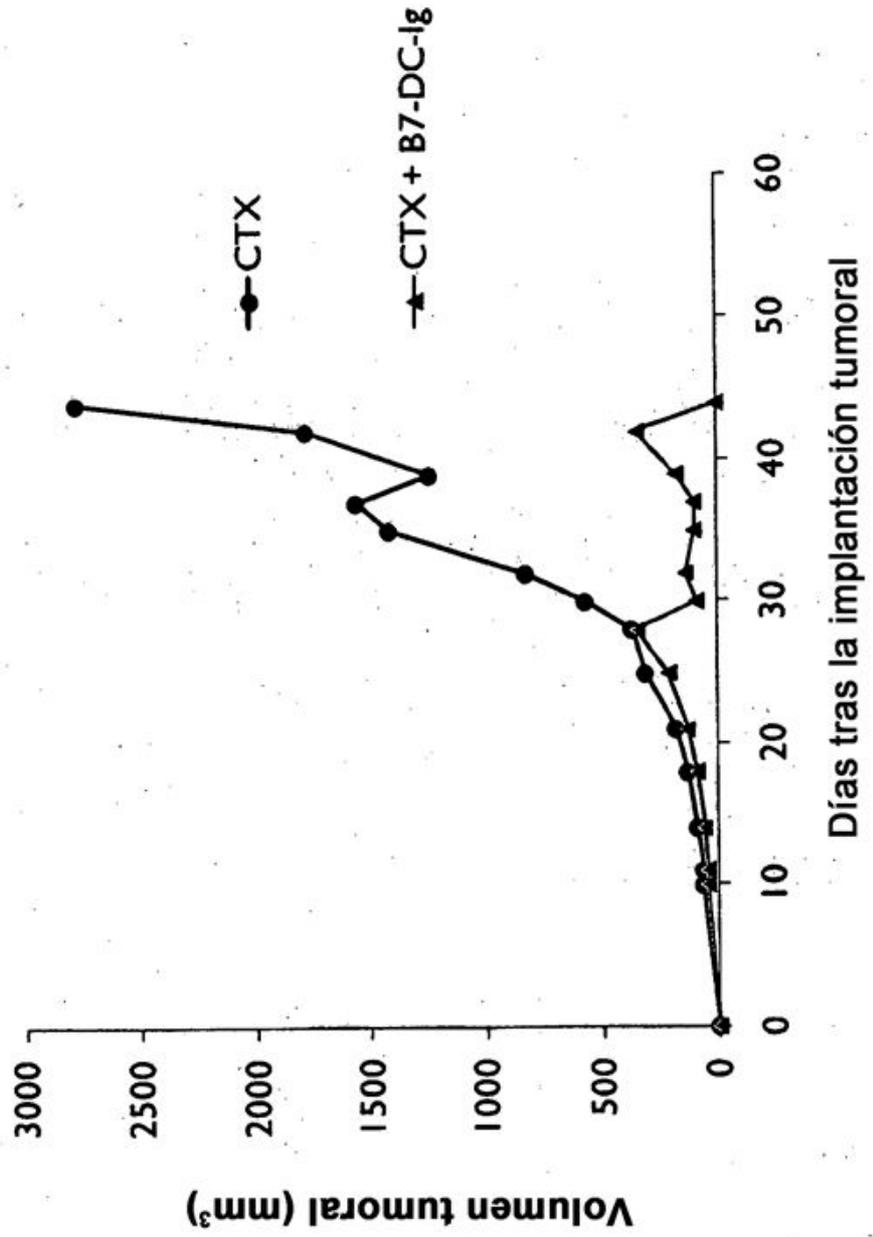


Figura 4. CTX + B7-DC-Ig erradica tumores y protege frente a la nueva exposición con CT26

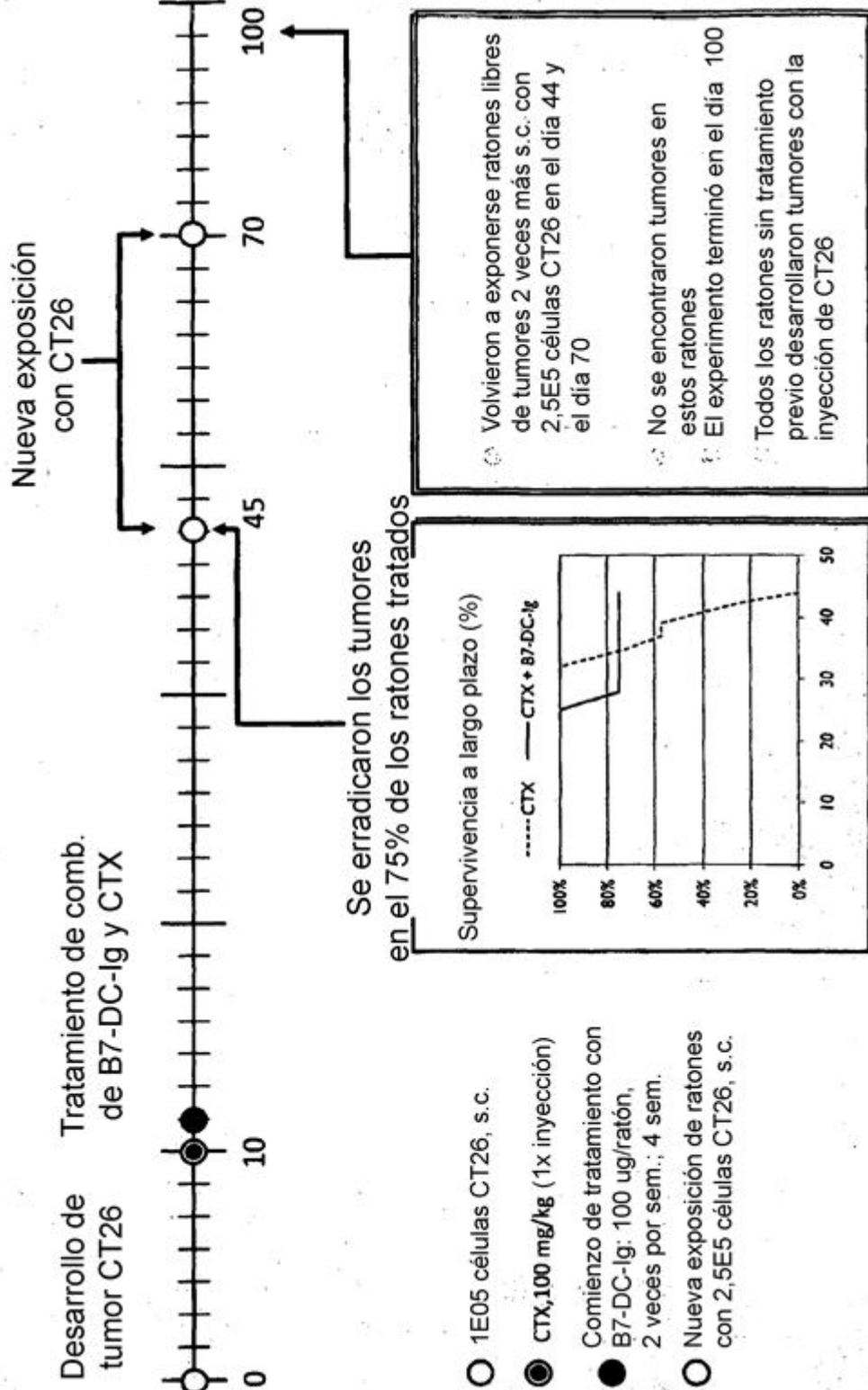


Figura 5. El tratamiento con CTX + B7-DC-Ig da como resultado linfocitos T citotóxicos de memoria, específicos de tumor

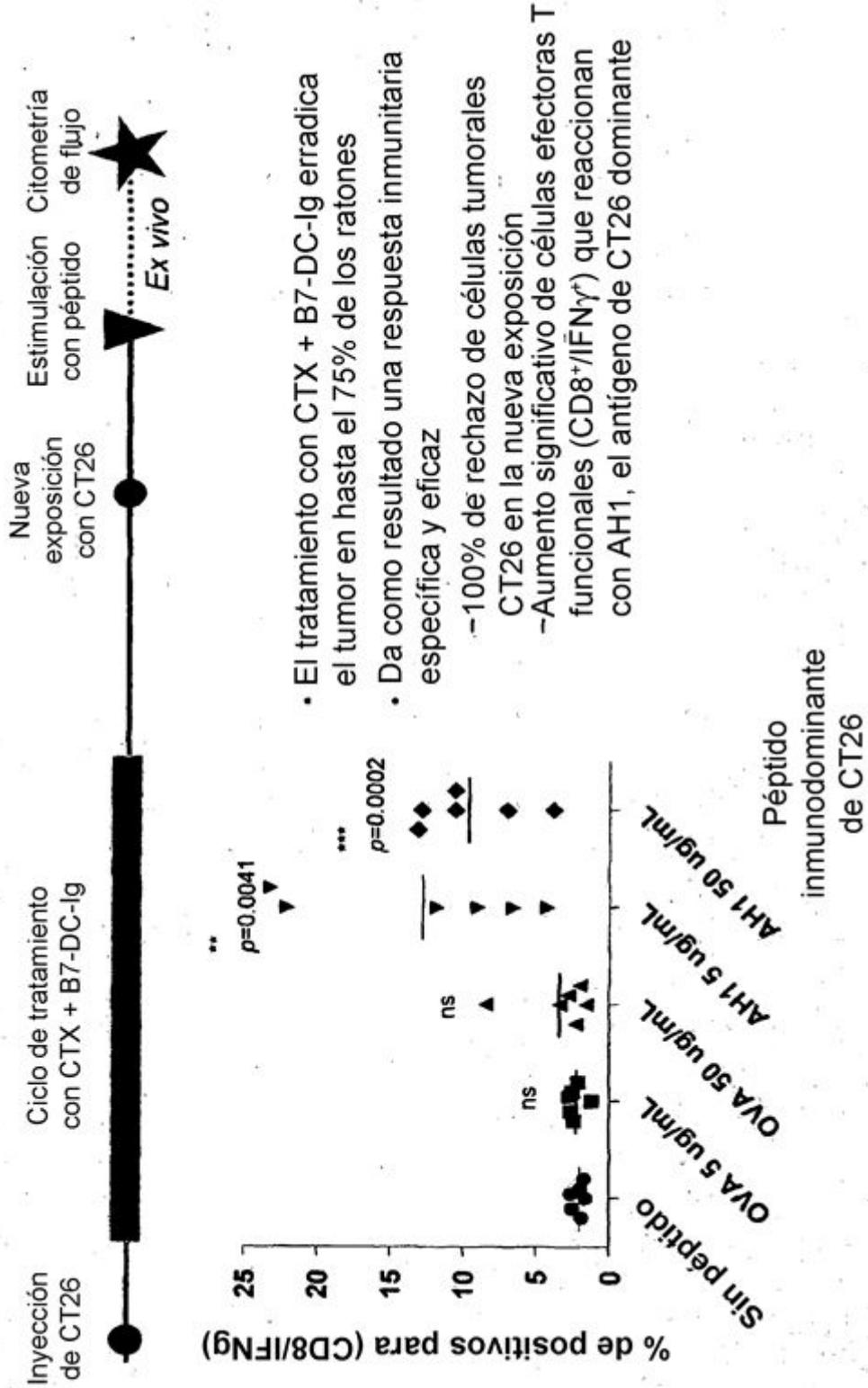


Figura 6. Correlación de la dosis de B7-DC-Ig con la erradicación de tumores: modelo de CT26

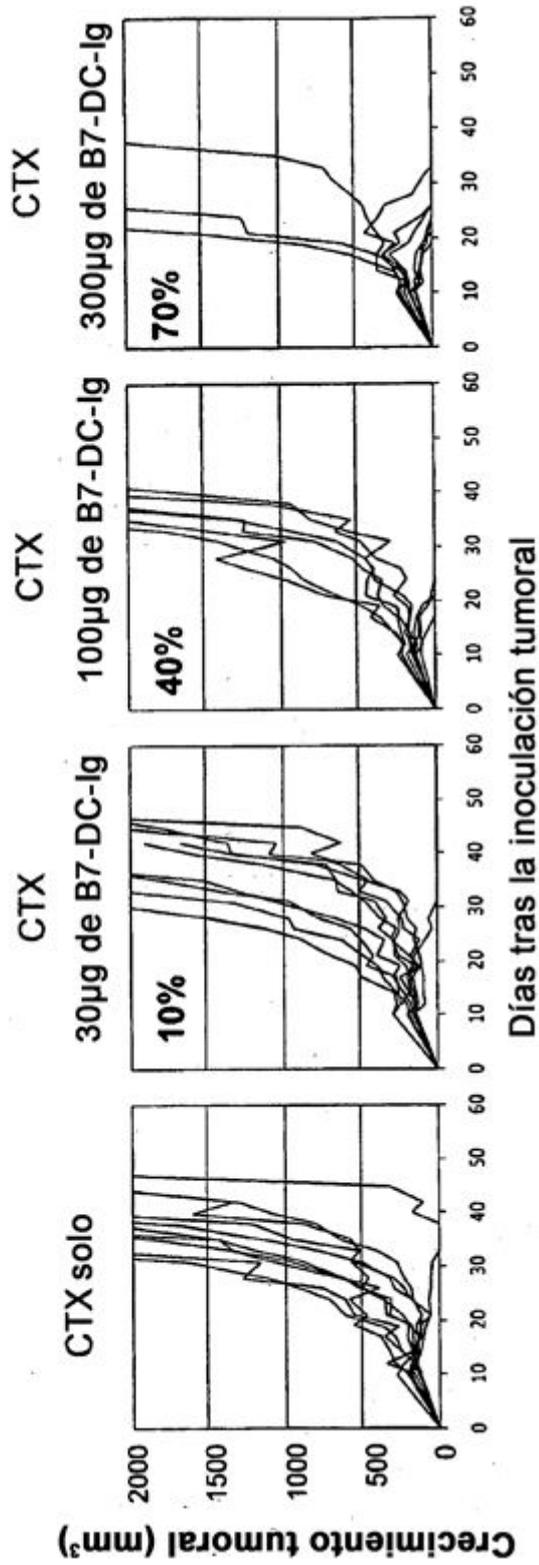
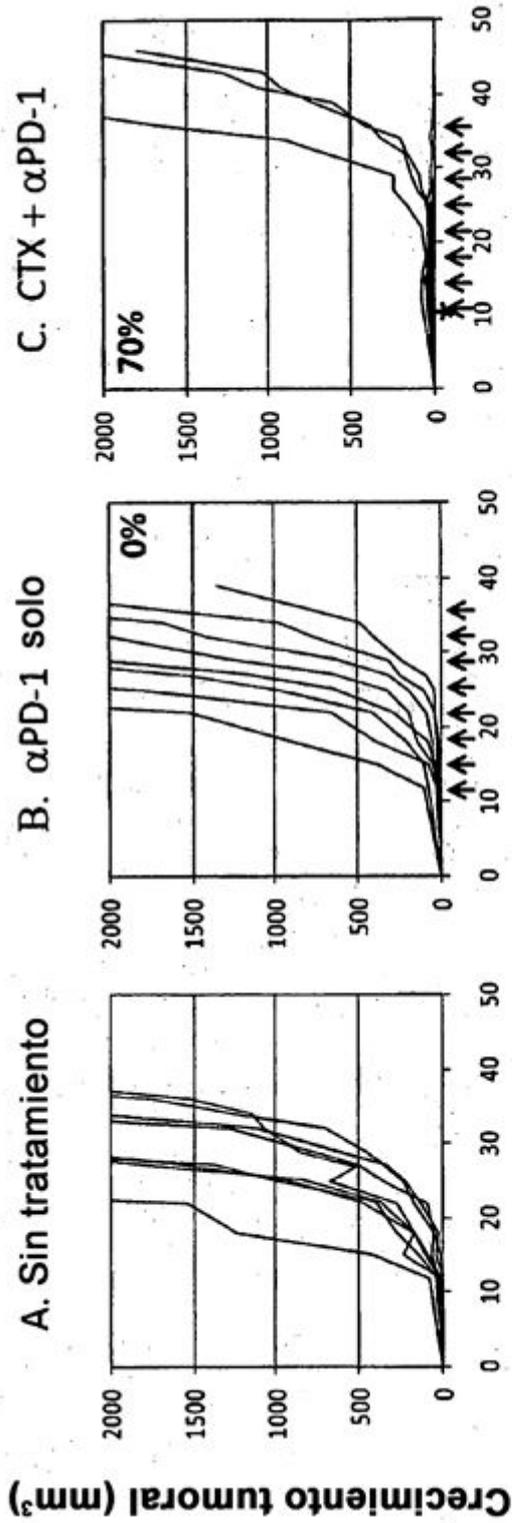


Figura 7. CTX combinado con anticuerpo anti-PD-1



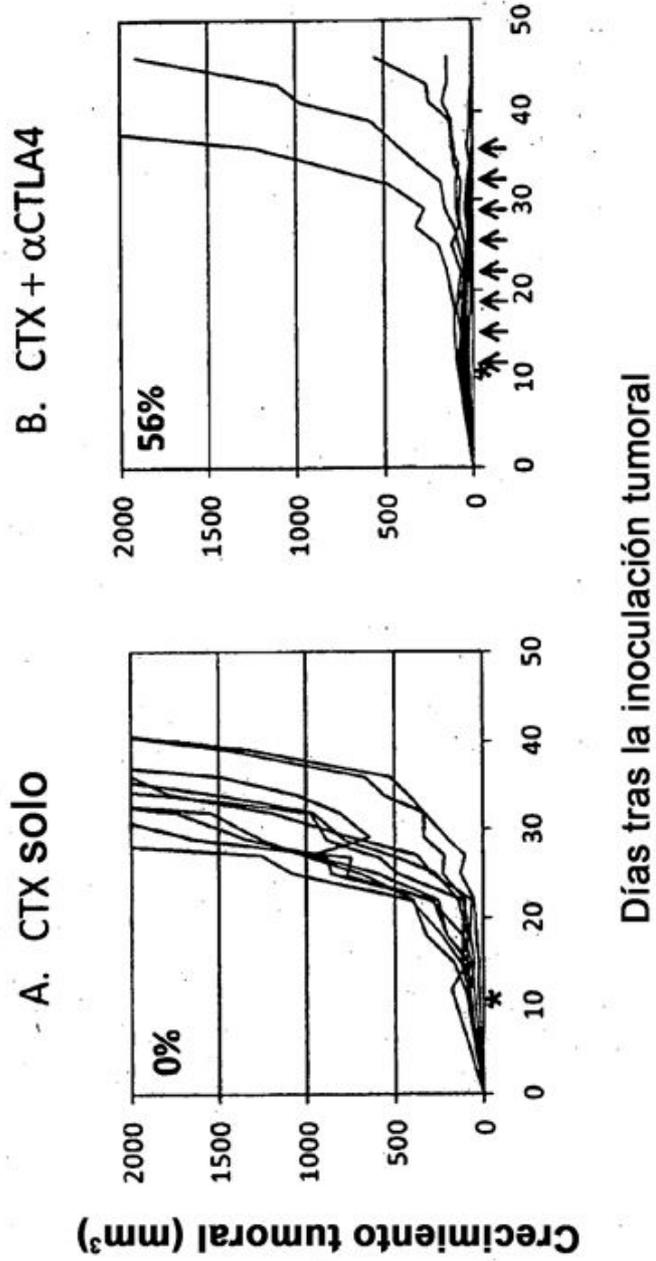
Días tras la inoculación tumoral

* CTX, 100 mg/kg, en el día 11

↑ αPD-1, 12,5 mg/kg, día 12, 2 veces por semana

N= 9 - 10

Figura 8. CTX combinado con anticuerpo anti-CTLA-4



Días tras la inoculación tumoral

* CTX, 100 mg/kg, en el día 11

↑ αCTLA-4, 5 mg/kg, día 12, 2 veces por semana

N= 9 - 10

Figura 9. La inclusión de CTX en el régimen de B7-DC-Ig conduce a la reducción de Treg en el bazo 2 días después. B7-DC-Ig reducido significativamente las células T PD-1^{alta} CD4⁺ en el ganglio linfático de drenaje

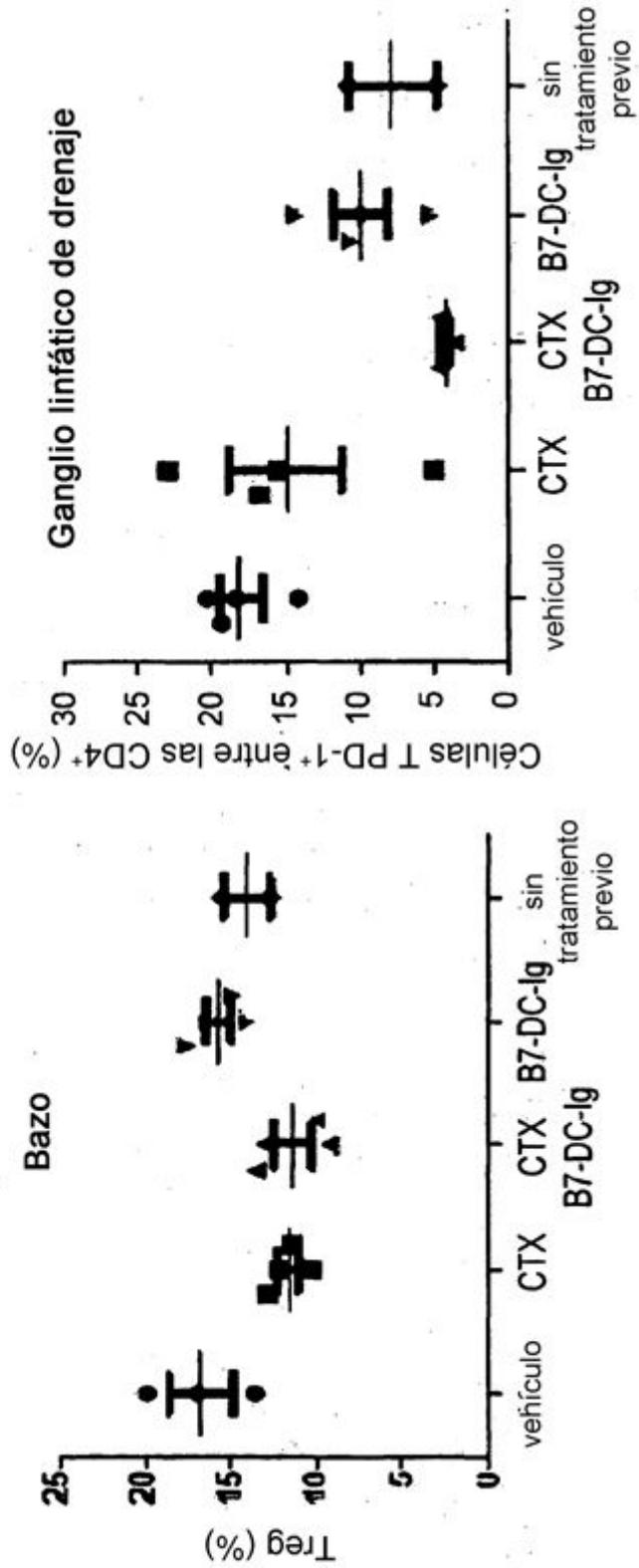


Figura 10. B7-DC-Ig presentó efecto sinérgico con CTX en un modelo de met. de pulmón

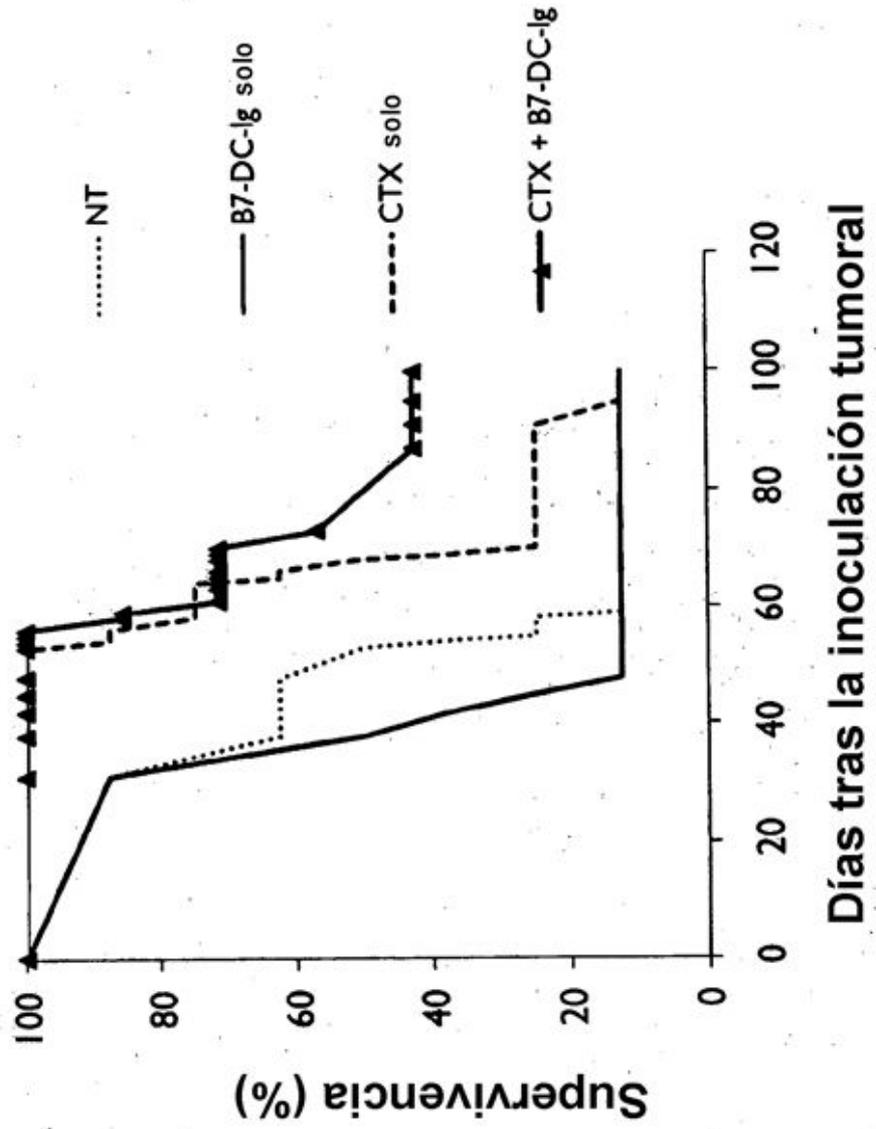


Figura 11. B7-DC-Ig presentó efecto sinérgico con CTX y vacuna de *Listeria* en un modelo de met. de hígado

