

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 708**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

C12Q 1/6886 (2008.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.09.2014 PCT/US2014/053870**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2015 WO15050663**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2014 E 14850189 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 3052131**

54 Título: **Procedimientos para el tratamiento de cáncer en pacientes con niveles elevados de Bim**

30 Prioridad:
01.10.2013 US 201361885218 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.05.2019

73 Titular/es:
**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (100.0%)
200 First Street S.W.
Rochester, MN 55905, US**

72 Inventor/es:
**DONG, HAIDONG;
HARRINGTON, SUSAN M.;
KWON, EUGENE D.;
KRCO, CHRISTOPHER J. y
LIU, XIN**

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 714 708 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

Procedimientos para el tratamiento de cáncer en pacientes con niveles elevados de Bim

5 Campo técnico

El presente documento se refiere a materiales y procedimientos para el tratamiento de cáncer, y más particularmente a materiales y procedimientos para el tratamiento de cáncer en pacientes que se ha determinado que presentan niveles elevados de Bim.

10

Antecedentes

La diseminación metastásica de células tumorales es la causa principal de mortalidad relacionada con cáncer, lo que indica la necesidad de enfoques terapéuticos capaces de controlar o prevenir la metástasis (Gibbons et al. (2012) *Oncolimmunology* 1 (7): 1061-1073; y Grivennikov et al. (2010) *Cell* 140: 883-899). La presencia de células T efectoras y de memoria infiltrantes de tumores se correlaciona con una reducción de la diseminación metastásica, consecuente con el papel de las células T en la prevención de la metástasis de tumores primarios.

15

20

El B7-H1 (también denominado PD-L1) es un polipéptido expresado por una diversidad de células tumorales. También se expresa de forma constitutiva por macrófagos y células dendríticas, y su expresión está regulada al alza tras la activación celular. El PD-1 se expresa en la superficie de células T activadas, células B activadas y macrófagos activados, y es un receptor para B7-H1. El CD80 se encuentra en células B activadas y monocitos activados, y proporciona una señal coestimuladora necesaria para la activación y la supervivencia de las células T; el CD80 también se une al B7-H1.

25

30

Topalian SL et al. describen en *The New England Journal of Medicine*, vol. 366, Nº 26, 28 de junio de 2012, en las páginas 2443-2454, la seguridad, la actividad y las correlaciones inmunológicas de un anticuerpo anti-PD-1 en cáncer. El documento WO 2013/090552 A1 describe composiciones y procedimientos para la intervención terapéutica de la señalización a través de EP2 y EP4, en combinación con la intervención terapéutica de la señalización a través de PD-1, mediante la inhibición de al menos uno de EP2, EP4, PGE2, o combinaciones de los mismos, en combinación con la inhibición de al menos uno de PD-1, PD-L1, PD-L2 y combinaciones de los mismos.

35

Berrien-Elliot MM et al. describen en *Cancer Research*, vol. 73, Nº 2, 15 de enero de 2013, páginas 605-616, una inmunoterapia adoptiva de larga duración para leucemia producida mediante la manipulación de múltiples rutas reguladoras de tolerancia de células T CD8+.

40

Gibbons RM et al. describen en *Oncolimmunology* vol. 1, Nº 7, 1 de octubre de 2012, en las páginas 1061-1073, que el B7-H1 limita la entrada de células T CD8+ efectoras a la agrupación de memoria mediante la regulación al alza de Bim.

40 Sumario

La presente invención se define por medio de la reivindicación independiente 1. Las reivindicaciones dependientes representan otras formas de realización de la invención.

45

50

55

El presente documento proporciona, entre otras cosas, un procedimiento para determinar si el PD-1 de las células T se ha acoplado a su ligando, B7-H1. El procedimiento se basa en parte en el descubrimiento de que el acoplamiento de PD-1 con B7-H1 tiene como consecuencia una regulación al alza de Bim, una molécula proapoptótica, y se correlaciona con la muerte de células T mediada por B7-H1. Este descubrimiento sugiere que los niveles intracelulares de Bim entre células positivas a PD-1 es un barómetro del grado en el que el PD-1 ha sido activado por B7-H1, puesto que niveles reducidos de Bim identifican células T positivas a PD-1 activadas cuyas moléculas PD-1 aún no se han acoplado ampliamente, y niveles elevados de Bim reflejan un acoplamiento crónico de PD-1 con B7-H1. La estratificación de niveles de Bim entre las células T CD8 positivas a PD-1 puede ser un biomarcador para evaluar (1) si las moléculas de PD-1 de células T CD8 se han acoplado con ligandos asociados al tumor B7-H1; y (2) la eficacia de un régimen de bloqueo anti-PD-1 o anti-B7-H1 para reducir el acoplamiento de PD-1. Por lo tanto, utilizando Bim como un biomarcador de señalización para la función PD-1, puede ser posible seleccionar pacientes que tengan más probabilidades de beneficiarse del tratamiento de bloqueo del punto de control y determinar la programación terapéutica óptima y las agendas de dosificación.

60

65

En un aspecto, el presente documento presenta una composición para su uso en un procedimiento para tratar un mamífero que padece cáncer, en la que dicho procedimiento comprende: (a) determinar que dicho mamífero contiene un nivel elevado de Bim, y (b) administrar a dicho mamífero un anticuerpo anti-B7-H1, un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-CD80, una proteína de fusión que comprende una porción de PD-1 unida a una secuencia Fc de inmunoglobulina, o una proteína de fusión que comprende una porción de CD80 unida a una secuencia Fc de Ig, en condiciones en las que la interacción de B7-H1 de origen natural con PD-1 o CD80 en dicho mamífero se reduce después de dicha administración. El mamífero puede ser un ser humano. El cáncer puede ser un cáncer de

melanoma, un cáncer de mama, un cáncer de pulmón, un carcinoma de células renales, un cáncer de páncreas, un cáncer de próstata, un cáncer de colon, un cáncer de cerebro, un cáncer de hígado o un cáncer de ovarios.

A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que se refiere la presente invención. Aunque se pueden utilizar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para poner en práctica la invención, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. En caso de conflicto, regirá la presente especificación, incluidas las definiciones. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Los detalles de una o más formas de realización de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la descripción siguiente. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

15 Descripción de los dibujos

La figura 1 contiene un par de gráficos que representan la cinética de respuestas de células T CD8+ a la estimulación con antígeno. Se inmunizaron (i.p.) ratones de tipo silvestre (WT) y deficientes (KO) en B7-H1 con OVA más poli I:C y se utilizó tetramero K^b/OVA para identificar células T CD8+ específicas de antígeno en el bazo (panel superior) y el hígado (panel inferior) en los puntos temporales indicados después de la inmunización. Los datos muestran el porcentaje de células T CD8+ tetramero+ (media \pm SD de tres ratones por punto temporal). Se muestra uno de los dos experimentos independientes. * $p < 0,05$ en comparación con ratones WT.

Las figuras 2A-2D contiene una serie de exploraciones por FACS y gráficos que muestran una población de células T CD8+ de memoria potenciada en ausencia de B7-H1. Los ratones se inmunizaron con OVA más poli I:C y se reestimularon con OVA el día 40 después de la inmunización. El día 4 después de la reestimulación, se aislaron células del bazo de ratones WT y deficientes en B7-H1 sin tratamiento previo o inmunizados para su análisis. Figura 2A: exploraciones por FACS que muestran el porcentaje de células T CD8+ tetramero+ específicas de OVA; * $p < 0,05$ en comparación con ratones WT. Figura 2B: gráfico que representa la cantidad absoluta de células T CD8+ tetramero+ específicas de OVA (media \pm SD, $n = 3$). Figura 2C: análisis por FACS de la producción intracelular de citocinas en células T CD8+ de ratones inmunizados (media \pm SD, $n = 3$). Figura 2D: gráficos que representan la actividad citolítica *in vivo* en ratones inmunizados. Se marcaron células diana (esplenocitos singénicos) pulsadas con péptido OVA o péptido de control con una dosis alta o baja de CFSE (5 μ M para células pulsadas con péptido OVA; 0,5 μ M para células pulsadas con péptido de control) y se mezclaron (1:1, 2,5 x 10⁶ de cada uno) y se inyectaron i.v. en ratones WT o deficientes en B7-H1. Las gráficas de histograma (izquierda) muestran el porcentaje de células diana remanentes en el bazo 4 horas después de la transferencia de células diana. El gráfico de barras (derecha) muestra el porcentaje de lisis específica en el bazo (media \pm SD, $n = 3$).

Las figuras 3A y 3B contienen exploraciones por FACS y gráficos que muestran respuestas de recuerdo de células T CD8+ de memoria mejoradas y una inmunidad antitumoral mejorada en el pulmón en ausencia de B7-H1. El día 35 después de la inmunización, se inyectaron (i.v.) a ratones WT y deficientes en B7-H1 inmunizados o sin tratamiento previo 5 x 10⁵ células tumorales B16-OVA. Figura 3A: porcentaje y cantidades absolutas de células T IFN γ + CD8+ en el pulmón de ratones inmunizados (media \pm SD, $n = 3$) el día 4 después de la inyección tumoral. * $p < 0,01$ en comparación con ratones WT. Figura 3B: se identificaron focos de tumores metastásicos en el tejido pulmonar y se realizó un recuento de los mismos el día 20 después de la inyección tumoral (media \pm SD, $n = 5$). N.S.: no significativo.

Las figuras 4A-4D contiene una serie de exploraciones por FACS y un gráfico que muestra que las células T CD8+ CD11a^{alto} representan células T efectoras estimuladas con antígeno. Se analizaron células del bazo de ratones WT y deficientes en B7-H1 sin tratamiento previo o inmunizados mediante tinción conjunta con anti-CD11a y tetramero K^b/OVA o marcadores funcionales. Figura 4A: exploraciones por FACS que muestran el porcentaje de células T CD8+ CD11a^{alto} de ratones inmunizados WT y deficientes en B7-H1. Figura 4B: gráfico que representa el porcentaje promedio de células T CD8+ CD11a^{alto} de ratones inmunizados WT y deficientes en B7-H1 (media \pm SD, $n = 4$). Figura 4C, exploraciones por FACS que muestran el porcentaje de células (K^b/OVA-tet) tetramero+ específicas de antígeno en una población de células T CD8+ CD11a^{alto} y CD11a^{bajo}. Figura 4D: exploraciones por FACS que muestran el ensayo funcional CTL de células T CD8+ CD11a^{alto} y CD11a^{bajo} después de una breve reestimulación *in vitro*. La desgranulación de los CTL se analizó mediante movilización de CD107a, seguida de tinción intracelular para IPN γ . Los números indican porcentajes de áreas seleccionadas.

Las figuras 5A-5D contienen una serie de exploraciones por FACS y un gráfico que muestra menos células T CD8+ estimuladas con antígeno apoptóticas en ratones deficientes en B7-H1. El día 7 después de la inmunización, se analizaron células del bazo para determinar la proliferación y la apoptosis. Figuras 5A y 5B: exploraciones por FACS que muestran la expresión de Ki67 y la incorporación de BrdU, respectivamente, analizadas en células T CD8+ CD11a^{alto} o CD11a^{bajo}. Los números son porcentajes de área seleccionada en el total de células T CD8+. Figura 5C: exploraciones por FACS de células apoptóticas TMRE^{bajo} anexina V+ medidas en células T CD8+ CD11a^{alto} y CD11a^{bajo}. Figura 5D, gráfico que representa el porcentaje de células apoptóticas (TMRE^{bajo} anexina V+) en células

T CD8+ CD11a^{alto} (media \pm SD, n = 4).

Las figuras 6A-6D contienen una serie de histogramas y una gráfica que muestra niveles más bajos de Bim en células T CD8+ estimuladas con antígeno en ratones deficientes en B7-H1. Figura 6A: ensayo por citometría de flujo de la expresión intracelular de Bim, Bcl-2 y Bcl-xL en células T CD8+ CD11a^{alto} seleccionadas en el bazo de ratones WT (rojo) y deficientes en B7-H1 (azul) el día 7 después de la inmunización. Los números son la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la expresión de Bim. Figura 6B: gráfico que muestra la MFI promedio de Bim expresado por células T CD8+ CD11a^{alto} (media \pm SD, n = 9). Figura 6C: expresión intracelular de Bim en células T CD8+ CD11a^{alto} en el hígado de ratones inmunizados. Los números son MFI. Figura 6D: expresión de Bim en células T CD8+ totales en el bazo de ratones WT (rojo) y deficientes en B7-H1 (azul) sin tratamiento previo.

La figura 7 contiene una serie de histogramas que muestran el papel extrínseco de B7-H1 en la regulación de Bim. Se transfirieron células T CD8+ OT-1 WT (Thy1.1+) a ratones huésped WT (rojo) o deficientes en B7-H1 (azul) un día antes de la inmunización con OVA más poli I:C. El día 7 después de la inmunización, se identificaron las células T CD8+ OT-1 en el bazo y el hígado mediante el marcador Thy1.1 y se analizaron para determinar la expresión intracelular de Bim. Los números son MFI.

Las figuras 8A-8F muestran que la coestimulación con B7-H1 induce la regulación al alza de los niveles de proteína Bim en células T activadas. Se incubaron células T CD8+ preactivadas con B7-H1 unido a placa o proteína de fusión (Fc) de control durante 48 horas en presencia de anti-CD3. Figura 8A: inmunotransferencia Western que muestra la expresión de la isoforma de Bim en células T CD8+. Figura 8B: histograma que muestra la expresión de Bim total en células T CD8+ coestimuladas con B7-H1 (azul) o proteína de control (rojo). Los números son MFI. Figura 8C: gráfico que representa la MFI promedio de Bim expresado por células T CD8+ activadas (media \pm SD, n = 5). Figura 8D: gráfico que representa el porcentaje de células T CD8+ vivas (exclusivas al azul de tripano) en cultivo (media \pm SD, n = 5). Figura 8E: exploraciones por FACS que indican apoptosis de células T CD8+ aisladas de ratones WT, deficientes en Bim y transgénicos Bcl-2 (Tg). Los números muestran el porcentaje de células T apoptóticas TMRE^{bajo} anexina V+ en células T CD8+ totales. Figura 8F: gráfico que representa la MFI promedio de Bim expresado por células T CD8+ en cultivo con Ab (anticuerpo) anti-B7-H1 (10B5, que bloquea la unión de B7-H1 a PD-1 y CD80; 43H12, que bloquea la unión de B7-H1 a CD80 solamente), Ab anti-PD-1 (G4), o Ab de control (10 μ g/ml de cada uno) (media \pm SD, n = 3).

Las figuras 9A-9C contienen una serie de gráficos que muestran que la coestimulación con B7-H1 inhibe la activación de Akt. Se estimularon células T CD8+ preactivadas con B7-H1 unido a placa o con proteína de fusión (Fc) de control. Después de 24 horas de estimulación, las células T CD8+ se recogieron y se utilizaron para el análisis. Figura 9A: gráfico que representa el análisis de niveles de transcrito *Bcl211* por qPCR en tiempo real utilizando el procedimiento de CT comparativo. GAPDH sirvió como el gen de control interno. La gráfica muestra el cambio en el número de veces (media \pm SD, n = 4). Figura 9B: histogramas que representan la fosforilación de Akt (izquierda) y mTOR (derecha), analizada mediante tinción intracelular de células T CD8+ con Ab anti-fosfo-Akt y anti-fosfo-mTOR. Los números muestran el porcentaje de células teñidas positivas. Figura 9C: gráfico de barras que representa la MFI promedio de la expresión de fosfo-Akt y fosfo-mTOR (media \pm SD, n = 3). N.S.: no significativo.

La figura 10 contiene secuencias representativas de ácidos nucleicos (parte superior) y aminoácidos (parte inferior) para B7-H1 humano (SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente).

La figura 11 contiene secuencias representativas de ácidos nucleicos (parte superior) y aminoácidos (parte inferior) para PD-1 humano (SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente).

Las figuras 12A y 12B contienen secuencias representativas de ácidos nucleicos (12A) y aminoácidos (12B) para CD80 humano (SEQ ID NO: 5 y 6, respectivamente).

La figura 13 contiene una gráfica (izquierda) que muestra la identificación de células T CD8+ en función de su expresión de CD11a^{alto} y PD-1+ (panel izquierdo). Se tiñeron linfocitos con CD8, CD11a y PD-1, operación seguida de tinción intracelular para Bim. La figura 13 también contiene un histograma que representa la expresión de Bim por subconjuntos de células T CD8+ (Tn: células T indiferenciadas; PD-1-, células estimuladas negativas a PD-1; PD-1+, células estimuladas positivas a PD-1). Solo las células CD8+ estimuladas con PD-1+ expresaron altos niveles de Bim.

La figura 14 es un par de gráficos que representan el nivel de expresión de Bim en células T CD8+ PD-1+ CD11a^{alto} reactivas a tumores en la sangre periférica de 26 pacientes con melanoma en comparación con 11 controles normales, sanos (panel izquierdo, P = 0,007 mediante la prueba T de Student modificada) y en células T CD8+ PD-1+ CD11a^{alto} reactivas a tumores en la sangre periférica de 11 pacientes con cáncer de próstata en comparación con 11 controles normales, sanos (panel derecho, P = 0,001 mediante la prueba T de Student modificada).

La figura 15 es un par de gráficos que representan la expresión de Bim en células T CD8+ PD-1 negativas (PD-1-) y PD-1 positivas (PD-1+) CD11a^{alto} de pacientes con melanoma (izquierda) y controles sanos (derecha). Bim aumentó significativamente en las poblaciones PD-1+ (p = 0,0081) en pacientes con melanoma.

La figura 16 es un par de gráficos que representan el nivel de expresión de Bim en células T CD8+ PD-1+ CD11a^{alto} reactivas a tumores en la sangre periférica de 26 pacientes con melanoma en comparación con 11 controles normales, sanos (panel izquierdo, que indica las muestras "Bim bajo" y "Bim alto"), y representan la tasa de supervivencia para pacientes de "Bim bajo" frente a pacientes de "Bim alto" (panel derecho).

La figura 17A es un par de gráficos que muestran que la proteína B7-H1 indujo la expresión de Bim en células T CD8+ preactivadas humanas. La figura 17B es una imagen de una inmunotransferencia Western que muestra niveles de Bim en las células.

La figura 18 es un par de gráficos que muestran que un anticuerpo anti-PD-1 bloqueó significativamente la regulación al alza de Bim inducida por B7-H1 de una forma dependiente de la dosis (panel izquierdo), y que los efectos de bloqueo del anticuerpo anti-PD-1 se correlacionaron inversamente con los niveles más altos de Bim inducidos por B7-H1 (panel derecho).

La figura 19 es un par de gráficos que muestran que la frecuencia de células T CD8+ Bim+ PD-1+ fue significativamente mayor en la sangre periférica de pacientes con melanoma antes del tratamiento que en un grupo de control sano (panel izquierdo), y que después del tratamiento anti-PD-1 con anticuerpos, aproximadamente el 67% de los pacientes con melanoma mostraron una reducción significativa en la frecuencia de células T CD8+ Bim+ PD-1+ (panel derecho).

La figura 20 es un par de gráficos que muestran que B7-H1 expresado por células tumorales indujo la regulación al alza de células T CD8 Bim preactivadas humanas.

La figura 21 es un par de fotografías (izquierda) y un gráfico (derecha) que muestra que la expresión de Bim se asoció con la expresión de B7-H1 en el carcinoma de células renales (RCC) humanas. En particular, el gráfico del panel derecho muestra que los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) Bim+ aumentaron en tejidos tumorales positivos a B7-H1. Puntuaciones de reactividad Bim: 0, ausencia; 1, focal; 2, moderada; 3, marcada. Análisis de contingencia utilizando la prueba exacta de Fisher ($p < 0,01$).

La figura 22 es un par de gráficos que muestran que la expresión de Bim se correlacionó con Granzyme B y T-bet (un factor de transcripción de células T efectoras) expresados por células T CD8+ PD-1+ CD11a^{alto} relacionadas con cáncer, lo que sugiere que la expresión de Bim está asociada con la diferenciación de células T CD8+ efectoras.

La figura 23 es un par de gráficos que muestran que la expresión de Bim se redujo en células T CD8+ PD-1+ CD11a^{alto} después de radioterapia en algunos pacientes con cáncer de melanoma (panel izquierdo) y próstata (panel derecho).

Descripción detallada

El presente documento proporciona materiales y procedimientos para identificar pacientes que tengan más probabilidades de beneficiarse del tratamiento de bloqueo del punto de control, materiales y procedimientos para determinar la programación terapéutica óptima y las agendas de dosificación, y procedimientos y materiales para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, el presente documento proporciona procedimientos y materiales para determinar que un mamífero (por ejemplo, un ser humano) tiene un nivel elevado de Bim, y tratar al mamífero con una molécula que puede interferir con la interacción entre B7-H1 y PD-1, y/o la interacción entre B7-H1 y CD80 (por ejemplo, un anticuerpo contra B7-H1, PD-1 o CD80, o con una proteína de fusión que contiene una porción de PD-1 o una porción de CD80 fusionada con un dominio Fc de inmunoglobulina (Ig)). Tal como se describe en el presente documento, niveles elevados de Bim pueden relacionarse con un aumento de la apoptosis de células T CD8+ estimuladas con antígeno, pero la inhibición de la interacción de B7-H1 con PD-1 o CD80 puede conducir a niveles reducidos de Bim y a una reducción de la apoptosis de células T.

La expresión "nivel elevado", tal como se usa en el presente documento con respecto a un nivel de Bim, se refiere a un nivel que es superior (por ejemplo, el 50% superior, 2 veces superior, 3 veces superior o más de 3 veces superior) que un nivel de referencia de Bim. La expresión "nivel de referencia", tal como se usa en el presente documento con respecto al Bim, se refiere al nivel de Bim que se observa normalmente en mamíferos sanos sin cáncer. Por ejemplo, un nivel de referencia de Bim puede ser el nivel promedio de Bim presente en muestras obtenidas de un muestreo aleatorio de 50 humanos que no padecen cáncer.

La presencia de un nivel elevado de Bim puede determinarse midiendo, por ejemplo, niveles de proteína o niveles de ácido nucleico. Por ejemplo, el nivel de proteína Bim puede medirse en una muestra de sangre (por ejemplo, una muestra de sangre periférica) u otro fluido corporal de un mamífero con cáncer o de un mamífero de control, utilizando tinción de células, inmunotransferencia Western u otras técnicas inmunológicas. El nivel de expresión de Bim también puede medirse a nivel de ácidos nucleicos, utilizando inmunotransferencia Northern o cualquier otro procedimiento adecuado para determinar los niveles de ARNm de *Bcl211*, que codifica la proteína Bim. En algunos casos, los niveles de proteína Bim o de ácido nucleico se pueden medir en muestras de tejido tumoral, muestras de

ascitis o muestras de órganos linfoides. Se apreciará que se utilizan niveles de muestras comparables cuando se determina si un nivel particular es un nivel elevado o no.

5 Un ejemplo representativo de un ácido nucleico B7-H1 humano tiene la secuencia expuesta en GENBANK® con el N° de acceso AF177937 (GI N° 6708118) (SEQ ID NO: 1; figura 10), y un polipéptido B7-H1 humano representativo tiene la secuencia expuesta en GENBANK® con el N° de acceso AAF25807 (GI N° 6708119) (SEQ ID NO: 2; figura 10).

10 Un ejemplo representativo de un ácido nucleico PD-1 humano puede tener la secuencia expuesta en GENBANK® con el N° de acceso BC074740.2 (GI N° 50960296) (SEQ ID NO: 3; figura 11), y un ejemplo representativo de un polipéptido PD-1 humano tiene la secuencia expuesta en GENBANK® con el N° de acceso AAH74740.1 (GI N° 49902307) (SEQ ID NO: 4; figura 11).

15 Un ejemplo representativo de un ácido nucleico CD80 humano tiene la secuencia expuesta en NCBI con el N° de referencia NM_005191.3 (GI N° 113722122) (SEQ ID NO: 5; figura 12A), y un ejemplo representativo de un polipéptido CD80 humano tiene la secuencia expuesta en NCBI con el N° de referencia NP_005182.1 (GI N° 4885123) (SEQ ID NO: 6; figura 12B).

20 Una vez que se determina el nivel de Bim dentro de una muestra de un mamífero, el nivel puede compararse con un nivel de referencia y utilizarse para clasificar al mamífero como que tiene o como que carece de un nivel elevado de Bim.

25 Una vez que se ha determinado que un mamífero tiene un nivel elevado de Bim tal como se describe en el presente documento, se puede administrar al mamífero una molécula que inhibe la interacción entre B7-H1 y PD-1 y/o la interacción entre B7-H1 y CD80. Los ejemplos de dichas moléculas incluyen, sin limitación, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti-B7-H1, anticuerpos anti-PD-1 o anticuerpos anti-CD80) y proteínas de fusión (por ejemplo, proteínas de fusión PD-1 o proteínas de fusión CD80). Dichas proteínas de fusión pueden contener, por ejemplo, el dominio extracelular de PD-1 fusionado con un dominio Fc de IgG, o el dominio extracelular de CD80 fusionado con un dominio Fc de IgG. Después de la administración, el/los anticuerpo(s) o la(s) proteína(s) de fusión pueden unirse a B7-H1, reduciendo o bloqueando así la acción de B7-H1 en la inducción de la regulación al alza de Bim.

30 El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanizados (Jones et al. (1986) *Nature* 321: 522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332: 323-329; y Presta (1992) *Curr. Op. Struct Biol.* 2: 593-596), anticuerpos quiméricos (Morrison et al. (1984) *Proc. Natl Acad Sci. USA* 81: 6851-6855), anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos, y fragmentos de anticuerpos. La expresión "fragmento de anticuerpo" comprende cualquier porción de los anticuerpos mencionados anteriormente, tales como sus regiones de unión a antígeno o variables. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fv, diacuerpos (Hollinger et al. (1993) *Proc. Natl Acad Sci. USA* 90: 6444-6448), moléculas de anticuerpo monocatenarias (Plückthun en: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies* 113, Rosenberg y Moore, eds., Springer Verlag, N.Y. (1994), 269-315) y otros fragmentos siempre que muestren la capacidad de unión a B7-H1, PD-1 o CD80 deseada.

45 Los ejemplos de anticuerpos anti-B7-H1 humanos incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-B7-H1 humano disponibles comercialmente de Biologend (por ejemplo, N° de catálogo 329701 o 329702; San Diego, CA) o eBioscience (por ejemplo, N° de catálogo 14-5983-80 o 14-5983-82).

50 Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-1 humanos incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-PD-1 humano disponibles en el mercado de Biologend (por ejemplo, N° de catálogo 329904 o 329905) o eBioscience (N° de catálogo 12-2799-42; San Diego, CA).

55 Los ejemplos de anticuerpos anti-CD80 humanos incluyen, sin limitación, anticuerpos anti-CD8 humano disponibles comercialmente de Biologend (por ejemplo, N° de catálogo 305201 o 305202) o eBioscience (por ejemplo, N° de catálogo 14-0809-80 o 14-0809-82).

60 El término "anticuerpo", tal como se usa en el presente documento, también incluye moléculas similares a anticuerpos que contienen subdominios manipulados genéticamente de anticuerpos o variantes de anticuerpos de origen natural. Estas moléculas similares a anticuerpos pueden ser anticuerpos de un único dominio, tales como dominios de únicamente V_H o de únicamente V_L derivados o bien de fuentes naturales tales como camélidos (Muyldermans et al. (2001) *Rev. Mol. Biotechnol.* 74: 277-302) o bien a través de una representación *in vitro* de bibliotecas de seres humanos, camélidos u otras especies (Holt et al. (2003) *Trends Biotechnol.* 21: 484-90). En determinadas formas de realización, la estructura polipeptídica de las proteínas de unión a antígeno puede estar basada en anticuerpos, que incluyen, pero sin limitación, minicuerpos, anticuerpos sintéticos (a veces denominados "miméticos de anticuerpos"), anticuerpos humanos, fusiones de anticuerpos (a veces denominadas "conjugados de anticuerpos"), y fragmentos de los mismos, respectivamente.

- Un "fragmento Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y de unión a antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera en asociación estrecha y no covalente. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. En conjunto, las seis CDR confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. No obstante, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque habitualmente con una afinidad menor que la totalidad del sitio de unión. El "fragmento Fab" también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (C_{H1}) de la cadena pesada. El "fragmento Fab" se diferencia del "fragmento Fab" en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio C_{H1} de la cadena pesada, que incluye una o más cisteínas a partir de la región bisagra del anticuerpo. El "fragmento F(ab')₂" se produce originariamente como un par de "fragmentos Fab" que tienen cisteínas de bisagra entre los mismos. Los procedimientos para preparar dichos fragmentos de anticuerpos, tales como digestión con papaína o pepsina, son conocidos por los expertos en la técnica.
- Un anticuerpo puede ser del tipo IgA, IgD, IgE, IgG o IgM, incluidos los tipos IgG o IgM, tales como, sin limitación, los tipos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM1 e IgM2. Por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo es del tipo IgG1, IgG2 o IgG4.
- En algunas formas de realización, los anticuerpos, tal como se usan en los procedimientos descritos en el presente documento, pueden ser anticuerpos completamente humanos o humanizados. Los anticuerpos humanos pueden evitar determinados problemas asociados con anticuerpos xenogénicos, tales como anticuerpos que poseen regiones constantes y/o variables murinas o de rata. En primer lugar, debido a que la porción efectora es humana, puede interactuar mejor con otras partes del sistema inmunitario humano, por ejemplo, para destruir células diana de forma más eficaz mediante citotoxicidad dependiente del complemento o citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo. En segundo lugar, el sistema inmunitario humano no debería reconocer el anticuerpo como extraño. En tercer lugar, la semivida en la circulación humana será similar a los anticuerpos humanos de origen natural, permitiendo que se administren dosis más pequeñas y menos frecuentes. Los procedimientos para preparar anticuerpos humanos son conocidos en la técnica.
- Además de los anticuerpos humanos, los anticuerpos "humanizados" pueden tener muchas ventajas. Los anticuerpos humanizados generalmente son anticuerpos monoclonales quiméricos o mutantes de ratón, rata, hámster, conejo u otras especies, que poseen dominios de región constante y/o variable humanos o cambios específicos. Las técnicas para generar anticuerpos humanizados son bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar la reorganización controlada de dominios de anticuerpos unidos a través de enlaces disulfuro de proteínas para formar nuevas moléculas de proteínas artificiales o anticuerpos "quiméricos" (Konieczny et al. (1981) *Haematologia (Budap.)* 14:95). Se puede utilizar la tecnología de ADN recombinante para construir fusiones genéticas entre secuencias de ADN que codifican dominios variables de cadena ligera y pesada de anticuerpos de ratón y dominios constantes de cadena ligera y pesada de anticuerpos humanos (Morrison et al. (1984) *Proc. Natl Acad Sci. USA* 81:6851).
- Las secuencias de ADN que codifican porciones de unión al antígeno o regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de anticuerpos monoclonales murinos pueden injertarse por medios moleculares en secuencias de ADN que codifican marcos estructurales de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos humanos (Jones et al. (1986) *Nature* 321:522; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323). Los productos recombinantes expresados se denominan anticuerpos "remodelados" o humanizados, y comprenden el marco estructural de una cadena ligera o pesada de anticuerpo humano y porciones de reconocimiento de antígeno, CDR, de un anticuerpo monoclonal murino.
- Otros procedimientos para diseñar cadenas pesadas y ligeras y para producir anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N^o 5.530.101, 5.565.332, 5.585.089, 5.639.641, 5.693.761, 5.693.762 y 5.733.743. No obstante, se describen procedimientos adicionales para humanizar anticuerpos en las patentes de Estados Unidos N^o 4.816.567, 4.935.496, 5.502.167, 5.558.864, 5.693.493, 5.698.417, 5.705.154, 5.750.078 y 5.770.403, por ejemplo.
- Pueden incorporarse moléculas que interfieren con la interacción entre B7-H1 y PD-1, y/o la interacción entre B7-H1 y CD80, tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos contra B7-H1, PD-1 y CD80, así como proteínas de fusión que contienen porciones de PD-1 o CD80 unidas a un dominio Fc de Ig) en composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, el presente documento también proporciona el uso de dichas moléculas en la fabricación de medicamentos para el tratamiento del cáncer. Las composiciones pueden incluir además uno o más vehículos, diluyentes y/o coadyuvantes farmacéuticamente aceptables. La potencia de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento se basa normalmente en la unión del anticuerpo o proteína de fusión a B7-H1.
- Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" (también denominado "excipiente" o "vehículo") es un disolvente, agente de suspensión, agente estabilizante o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para la administración de uno o más compuestos terapéuticos a un sujeto que no es tóxico para la célula o el mamífero que se expone al

mismo a las dosis y las concentraciones empleadas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos o sólidos, y pueden seleccionarse considerando la forma de administración planificada para proporcionar el volumen másico deseado, la consistencia y otras propiedades químicas y de transporte pertinentes, cuando se combinan con uno o más de los compuestos terapéuticos y cualesquiera otros componentes de una composición farmacéutica dada. Los vehículos farmacéuticamente aceptables típicos que no reaccionan de forma perjudicial con aminoácidos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación: agua, solución salina, agentes aglutinantes (por ejemplo, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa), materiales de carga (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, gelatina o sulfato de calcio), lubricantes (por ejemplo, almidón, polietilenglicol o acetato de sodio), disgregantes (por ejemplo, almidón o almidón-glicolato de sodio) y agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los vehículos farmacéuticamente aceptables también incluyen soluciones acuosas con pH tamponado o liposomas (vesículas pequeñas compuestas por varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que son útiles para la administración de un fármaco a un mamífero). Otros ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes tales como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos), proteínas tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas, polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina, monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol, contraiones salinos tales como sodio y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse mezclando uno o más agentes activos con uno o más vehículos, diluyentes y/o coadyuvantes fisiológicamente aceptables, y opcionalmente otros agentes que normalmente se incorporan en formulaciones para proporcionar unas mejores transferencia, administración, tolerancia y similares. Se puede formular una composición farmacéutica, por ejemplo, en formulaciones liofilizadas, soluciones acuosas, dispersiones o preparaciones sólidas, tales como comprimidos, grageas o cápsulas. Se puede encontrar una pluralidad de formulaciones apropiadas en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences (18ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1990)), particularmente en el capítulo 87 por Block, Lawrence, en el mismo. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, jaleas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como LIPOFECTIN™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite, emulsiones de carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada en tratamientos y terapias tal como se describen en el presente documento, siempre que el agente activo de la formulación no se inactive por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Véase también, Baldrick (2000) *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32: 210-218; Wang (2000) *Int. J. Pharm.* 203: 1-60; Charman (2000) *J. Pharm. Sci.* 89: 967-978; y Powell et al. (1998) *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 52: 238-311), y citas de los mismos para obtener información adicional relacionada con formulaciones, excipientes y vehículos bien conocidos por los químicos farmacéuticos.

Las composiciones farmacéuticas incluyen, sin limitación, soluciones, emulsiones, suspensiones acuosas y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una diversidad de componentes que incluyen, por ejemplo, líquidos preformados, sólidos autoemulsionables y semisólidos autoemulsionables. Las emulsiones son, a menudo, sistemas bifásicos que comprenden dos fases líquidas no miscibles íntimamente mezcladas y dispersadas entre sí; en general, las emulsiones son de la variedad de agua en aceite (w/o) o de aceite en agua (o/w). Las formulaciones en emulsión se han utilizado ampliamente para la administración oral de productos terapéuticos debido a su facilidad de formulación y su eficacia de solubilización, absorción y biodisponibilidad.

Las composiciones y formulaciones pueden incluir soluciones acuosas estériles, que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados (por ejemplo, potenciadores de la penetración, compuestos vehículo y otros vehículos farmacéuticamente aceptables). Las composiciones pueden contener adicionalmente otros componentes adjuntos que se encuentran convencionalmente en composiciones farmacéuticas. Por lo tanto, las composiciones pueden incluir también materiales farmacéuticamente activos compatibles, tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o materiales adicionales útiles para formular físicamente diversas formas de dosificación de las composiciones proporcionadas en el presente documento, tales como tintes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes. Además, la composición se puede mezclar con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, saborizantes y sustancias aromáticas. No obstante, cuando se añaden, dichos materiales no deben interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes polipeptídicos dentro de las composiciones proporcionadas en el presente documento. Si se desea, las formulaciones pueden esterilizarse.

En algunas formas de realización, una composición que contiene un anticuerpo o proteína de fusión tal como se proporciona en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo anti-B7-H7, anti-PD-1 o anti-CD80, o una proteína de fusión PD-1 Fc o CD80 Fc) puede encontrarse en forma de una solución o polvo con o sin un diluyente para producir una suspensión inyectable. La composición puede contener ingredientes adicionales que incluyen, sin

limitación, vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina, agua, ácido láctico, manitol o combinaciones de los mismos, por ejemplo.

Se puede utilizar cualquier procedimiento apropiado para administrar una molécula tal como se describe en el presente documento a un mamífero. La administración puede realizarse, por ejemplo, por vía parenteral (por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intratecal, intraventricular, intramuscular o intraperitoneal, o por goteo intravenoso). La administración puede ser rápida (por ejemplo, mediante inyección) o puede producirse durante un período de tiempo (por ejemplo, mediante infusión lenta o la administración de formulaciones de liberación lenta). En algunas formas de realización, la administración puede ser tópica (por ejemplo, transdérmica, sublingual, oftálmica o intranasal), pulmonar (por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles) u oral. Además, una composición que contiene un anticuerpo o proteína de fusión tal como se describe en el presente documento puede administrarse antes, después o en lugar de la resección quirúrgica de un tumor.

Una composición que contiene un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-B7-H1, un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-CD80) o una proteína de fusión (por ejemplo, una fusión PD-1 Fc o una fusión CD80 Fc) puede administrarse a un mamífero en cualquier cantidad apropiada, a cualquier frecuencia apropiada, y durante cualquier periodo de tiempo apropiado eficaz para lograr un resultado deseado (por ejemplo, para aumentar la supervivencia libre de progresión). En algunos casos, una composición que contiene un anticuerpo o una proteína de fusión tal como se describe en el presente documento puede administrarse a un mamífero que tiene cáncer para reducir la velocidad de progresión del cáncer en el 5, 10, 25, 50, 75, 100 o más por ciento. Por ejemplo, la velocidad de progresión puede reducirse de forma que no se detecte una progresión adicional del cáncer. Se puede utilizar cualquier procedimiento apropiado para determinar si se reduce o no la velocidad de progresión del cáncer. Para el cáncer de piel (por ejemplo, el melanoma), por ejemplo, la velocidad de progresión puede evaluarse tomando imágenes de tejido en diferentes puntos temporales y determinando la cantidad de células cancerosas presentes. Las cantidades de células cancerosas determinadas dentro del tejido en diferentes momentos se pueden comparar para determinar la velocidad de progresión. Después del tratamiento tal como se describe en el presente documento, la velocidad de progresión puede determinarse nuevamente en otro intervalo de tiempo. En algunos casos, se puede determinar el estadio del cáncer después del tratamiento y compararlo con el de la etapa antes del tratamiento para determinar si la velocidad de progresión se ha reducido o no.

En algunos casos, una composición que contiene un anticuerpo o una proteína de fusión tal como se describe en el presente documento se puede administrar a un mamífero que tiene cáncer en condiciones en las que la supervivencia libre de progresión aumenta (por ejemplo, en el 5, 10, 25, 50, 75, 100 o más por ciento) en comparación con la mediana de la supervivencia libre de progresión de los mamíferos correspondientes que tienen cáncer sin tratar o la mediana de la supervivencia libre de progresión de los mamíferos correspondientes que tienen cáncer y se han tratado por medio de otros tratamientos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos). La supervivencia libre de progresión se puede medir en cualquier período de tiempo (por ejemplo, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses o un periodo más prolongado).

La administración a un mamífero de una molécula como se establece en el presente documento puede producir un aumento en el número de células T CD8+ reactivas al tumor de origen natural, que pueden ejercer efectos anticancerosos contra las células cancerosas presentes en el mamífero.

Una cantidad eficaz de una composición que contiene una molécula tal como se proporciona en el presente documento puede ser cualquier cantidad que reduzca la velocidad de progresión del cáncer, aumente la tasa de supervivencia libre de progresión o aumente la mediana del tiempo de progresión sin producir una toxicidad significativa para el mamífero. Las dosis óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los polipéptidos individuales (por ejemplo, anticuerpos y proteínas de fusión), y generalmente pueden estimarse basándose en la CE_{50} que se ha descubierto que es eficaz en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. Generalmente, la dosis es de 0,01 μ g a 100 g por kg de peso corporal. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un anticuerpo o proteína de fusión puede ser de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg (por ejemplo, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, o aproximadamente 75 mg/kg). Si un mamífero particular no responde a una cantidad particular, entonces la cantidad del anticuerpo o la proteína de fusión se puede aumentar, por ejemplo, dos veces. Después de recibir esta concentración más alta, se puede realizar un seguimiento al mamífero para determinar su capacidad de respuesta al tratamiento y los síntomas de toxicidad, y se pueden realizar los ajustes correspondientes. La cantidad eficaz puede permanecer constante o puede ajustarse como una escala móvil o una dosis variable dependiendo de la respuesta del mamífero al tratamiento. Pueden influir diversos factores en la cantidad eficaz real utilizada para una aplicación particular. Por ejemplo, la frecuencia de administración, la duración del tratamiento, el uso de múltiples agentes de tratamiento, la vía de administración y la gravedad del cáncer pueden requerir un aumento o una reducción de la cantidad eficaz real administrada.

La frecuencia de administración puede ser cualquier frecuencia que reduzca la velocidad de progresión del cáncer, aumente la tasa de supervivencia libre de progresión o aumente la mediana del tiempo de progresión sin producir una toxicidad significativa para el mamífero. Por ejemplo, la frecuencia de administración puede ser de una vez o más de forma diaria, quincenal, semanal, mensual, o incluso menor. La frecuencia de administración puede

permanecer constante o puede variar durante la duración del tratamiento. Un curso de tratamiento puede incluir períodos de descanso. Por ejemplo, una composición que contiene un anticuerpo o una proteína de fusión tal como se proporciona en el presente documento puede administrarse durante un período de dos semanas, seguido de un período de descanso de dos semanas, y dicho régimen se puede repetir varias veces. Al igual que con la cantidad eficaz, pueden influir diversos factores en la frecuencia real de administración utilizada para una aplicación particular. Por ejemplo, la cantidad eficaz, la duración del tratamiento, el uso de múltiples agentes de tratamiento, la vía de administración y la gravedad del cáncer pueden requerir un aumento o una reducción de la frecuencia de administración.

Una duración eficaz para administrar una composición proporcionada en el presente documento puede ser cualquier duración que reduzca la velocidad de progresión del cáncer, aumente la tasa de supervivencia libre de progresión o aumente la mediana del tiempo de progresión sin producir una toxicidad significativa para el mamífero. Por lo tanto, la duración eficaz puede variar de varios días a varias semanas, meses o años. En general, la duración eficaz del tratamiento del cáncer puede variar entre varias semanas y varios meses. En algunos casos, una duración eficaz puede durar mientras un mamífero individual esté vivo. Pueden influir diversos factores en la duración eficaz real utilizada para un tratamiento en particular. Por ejemplo, una duración eficaz puede variar con la frecuencia de administración, la cantidad eficaz, el uso de múltiples agentes de tratamiento, la vía de administración y la gravedad del cáncer.

Después de administrar una composición proporcionada en el presente documento a un mamífero, se puede realizar un seguimiento del mamífero para determinar si se ha tratado o no el cáncer. Por ejemplo, un mamífero puede evaluarse después del tratamiento para determinar si la velocidad de progresión del cáncer se ha reducido o no (por ejemplo, se ha detenido). Puede usarse cualquier procedimiento, incluidos los que son estándar en la técnica, para evaluar la progresión y las tasas de supervivencia.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Materiales y procedimientos

Ratones, líneas celulares y reactivos: Se adquirieron ratones CD45.2+ C57BL/6 hembra de Taconic Farms y se adquirieron ratones C57BL/6-Ly5.1 congénicos CD45.1+ de National Cancer Institute. Se suministraron ratones transgénicos OT-1 TCR (Thy 1.1+) por T. Tian (Harvard University, Boston, MA). Se suministraron ratones C57BL/6 deficientes en B7-H1 por L. Chen (Universidad de Yale, New Haven, CT; Dong et al., *Immunity* 20: 327-336, 2004). Se adquirieron ratones *Bcl211*^{-/-} y ratones *Cd80*^{-/-} de Jackson Laboratory. Se cruzaron ratones *Cd80*^{-/-} con ratones OT-1 WT y produjeron ratones *Cd80*^{-/-} OT-1. Se suministraron ratones transgénicos *Bcl-2* por V. Shapiro (Mayo Clinic, Rochester). Los ratones se mantuvieron en condiciones exentas de patógenos y se utilizaron a las 8-12 semanas de edad. Se suministraron células de melanoma murino B16-OVA por R. Vile (Mayo Clinic, Rochester, MN) y se cultivaron en medio RPMI 1640 (Cellgro) con FBS al 10% (Life Technologies), 1 U/ml de penicilina, 1 µg/ml de estreptomina y 20 mM de tampón HEPES (todos de Mediatech). Se obtuvo mAb (anticuerpo monoclonal) de hámster anti-B7-H1 de ratón (10B5) y PD-1 (G4) a partir de células de hibridoma suministradas por L. Chen. Se suministró mAb anti-B7-H1 de ratón (43H12) de hámster por K. Tamada (John Hopkins University).

Análisis por citometría de flujo: Se adquirieron tetrámero MHC de clase I (péptido K^bOVA SIINFEKL; SEQ ID NO: 1) y tetrámero de control negativo de Beckman Coulter. Se adquirieron Ab conjugados a fluorocromo contra CD8, CD11a, Fas (CD95), ligando Fas, CD90.1 (Thy 1.1), CD90.2 (Thy 1.2), CD107a, IPN γ , IL-2 y TNF α de BD Biosciences, BioLegend, o eBiosciences. Para detectar los niveles de citocinas intracelulares, las células se incubaron con GolgiPlug (BD Biosciences) durante 4 horas antes del análisis. Las células se tiñeron para detectar antígenos de superficie y después se incubaron en tampón de fijación (BioLegend) durante 20 minutos a temperatura ambiente, operación seguida de permeabilización en tampón de lavado de permeabilización (BioLegend). Después se tiñeron células fijas y permeabilizadas con Ab durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se adquirieron Ab para Akt, Bcl-xL, Bcl-2, Bim y mTOR y Ab secundarios conjugados a fluorocromo de Cell Signaling (Danvers, MA). Para detectar los niveles intracelulares de Akt, Bcl-xL, Bcl-2, Bim y mTOR, se tiñeron en primer lugar células T para detectar antígenos de superficie, después se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 10 minutos a 37 °C, operación seguida de permeabilización con metanol enfriado con hielo durante 30 minutos. Después de bloquear con suero de rata al 15% durante 15 minutos, las células se tiñeron con Ab durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la tinción, las células se lavaron tres veces con tampón de incubación antes del análisis. Al menos 100.000 células viables se clasificaron en vivo en instrumentos FACScan o FACSCalibur (BD Biosciences). El análisis por citometría de flujo se realizó utilizando el programa informático FlowJo (Tree Star).

Inmunización, activación, ensayo de apoptosis y ensayo de proliferación de células T: Se inmunizaron ratones mediante inyección i.p. 0,5 mg de ovoalbúmina (OVA, de Sigma-Aldrich) y 50 µg de poli (I:C) (Sigma Aldrich). Para la activación y el ensayo de apoptosis *in vitro* de células T, se marcaron células T CD8+ purificadas con CFSE (Invitrogen-Molecular Probes) y se incubaron con péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ (Instalaciones Principales de la Mayo Clinic) a

0,2 µg/ml durante 72 horas. La apoptosis de células T CD8+ se analizó mediante tinción utilizando anexina V (BD Biosciences) y TMRE (éster etílico de tetrametilrodamina, Invitrogen/Molecular Probes T-669). También se midió la proliferación mediante detección de la incorporación de BrdU y tinción con Ki67. A los ratones inmunizados se les inyectó i.p. 0,8 mg/ml de BrdU (BD Biosciences) los días 4 a 6 después de la inmunización. El día 7 después de la inmunización, la incorporación de BrdU se determinó mediante tinción intranuclear con anti-BrdU (B9285, Sigma-Aldrich) y anti-Ki67 (556027, BD Biosciences).

Ensayo de CTL in vivo. Para el ensayo de CTL *in vivo*, se marcaron células de bazo pulsadas con péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ o pulsadas con péptido de control (como células diana) de ratones singénicos con una dosis alta de CFSE (5 µM) o una dosis baja de CFSE (0,5 µM), se mezclaron a 1:1 ($2,5 \times 10^6$ de cada uno) antes de la inyección. Las células diana se inyectaron i.v. a ratones inmunizados el día 4 después de la reprovocación con proteína antígeno cognado. La actividad de CTL se determinó 4 horas después de la transferencia de células diana. La lisis específica se calcula utilizando las fórmulas siguientes:

proporción = (% de CFSE alta/% de CFSE baja), % de lisis específica = $[1 - (\text{proporción estimulada}/\text{proporción sin estimular})] \times 100\%$

Estudios de tumores: A los ratones se les inoculó i.v. 5×10^5 células tumorales B16-OVA el día 25 después de la inmunización. El día 21 después de la inyección del tumor, los ratones se sacrificaron y el tejido pulmonar se perfundió con PBS. Se realizó un recuento del número de focos tumorales en el tejido pulmonar.

Experimentos de transferencia de células T: Se inyectaron i.v. células T CD8+ purificadas (1×10^6) de ratones transgénicos Thy1.1 + OT-1 en ratones Thy 1.2+ WT o deficientes en B7-H1, operación seguida de inmunización con OVA más poli I:C. El día 7 después de la inmunización, las células T CD8+ transferidas se identificaron por su expresión de Thy1.1 y se usaron para la detección de la expresión intracelular de Bim, Bcl-2 y Bcl-xL. Se inyectaron cantidades iguales de células T CD8+ OT-1 Cd80^{-/-} (CD45.2+) y WT (Thy1.1+, CD45.2+) (10^6 de cada uno) en ratones CD45.1+, operación seguida de la inmunización de OVA y poli I:C. Las células T CD8+ OT-1 transferidas en el bazo se identificaron mediante citometría de flujo.

Activación de células T in vitro y cultivo con proteínas de fusión: Se recogieron células de bazo de ratones sin tratamiento previo y se preactivaron con ConA (5 µg/ml, L7647, Sigma-Aldrich) durante 48 horas. Después de la activación, las células T CD8+ se purificaron (kit de selección negativa de células T CD8+ EasySep, Stem Cell Technologies) y se incubaron con anti-CD3 unida a placa (BD Biosciences) y proteína de fusión B7-H1 Fc o proteína Fc de control (R&D Systems). Los cultivos se mantuvieron durante los períodos de tiempo indicados y después las células se recogieron para el análisis.

Inmunotransferencia Western: Se lisaron células con tampón NETN (NP40 al 0,5%, NaCl 150 mM, Tris 50 mM y EDTA 1 mM). Los lisados celulares se llevaron a ebullición y se procesaron en geles de SDS-PAGE (BioRad), se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Millipore) y se inmunotransfirieron utilizando procedimientos estándar.

RT-PCR cuantitativa: Se aisló ARN total a partir de células T CD8+ purificadas (RNeasy Kit, Qiagen), y se transcribió de forma inversa (kit de síntesis de iScriptcDNA, BioRad). Las muestras se analizaron para determinar los niveles de transcrito Bim utilizando cebadores Bcl211 (Qiagen) y QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) en un iCycler (BioRad). Los niveles de GAPDH se utilizaron para normalizar los datos mediante el procedimiento de TC comparativa.

Análisis estadístico: Se utilizó una prueba t de Student bilateral, desapareada o apareada para evaluar diferencias estadísticas en grupos experimentales. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Ejemplo 2: Se generan más células T de memoria en ausencia de B7-H1

La cinética de las respuestas de las células T CD8+ en el bazo y el hígado de ratones C57BL/6 WT y deficientes en B7-H1 se comparó después de la inmunización con proteína ovoalbúmina (OVA) y ácido poliinosínico:policitidílico (poli (I:C)) como coadyuvante. Se observó un mayor número de células T CD8+ en el máximo de la respuesta inmunitaria (día 7 después de la inmunización) en el bazo y el hígado de ratones deficientes en B7-H1 en comparación con ratones WT. Durante la fase de contracción (días 7 a 14 después de la inmunización) hubo un retardo significativo en la reducción de las células T CD8+ específicas de antígeno en el bazo y el hígado de ratones deficientes en B7-H1 en comparación con ratones WT. El día 40 después de la inmunización, se detectaron más células T CD8+ de memoria específicas de antígeno en ratones deficientes en B7-H1 en comparación con ratones WT (figura 1). Estos datos sugirieron que el B7-H1 huésped puede regular el grado de expansión y contracción de células T CD8+ efectoras, influyendo así en el tamaño del conjunto de células T CD8+ de memoria tanto en los tejidos linfoides como en los no linfoides.

Se realizaron estudios para examinar hasta qué grado regula B7-H1 la generación de células T CD8+ de memoria en ratones inmunizados, utilizando tetrámero K^bOVA₂₅₇₋₂₆₄ (K^bOVA-tet) para detectar células T CD8+ de memoria

estimuladas con antígeno en el bazo el día 4 después de reestimulación *in vivo* (proteína OVA, administrada el día 40 después de la inmunización primaria). El día 4 se seleccionó para el análisis porque en ese punto temporal es posible distinguir una respuesta de recuperación de la respuesta primaria (que tarda 7 días en establecerse). Por lo tanto, los ratones sin tratamiento previo no mostraron un aumento significativo de células T CD8+ específicas de antígeno el día 4 después de la inmunización (figura 2A). La frecuencia de células T CD8+ K^bOVA-tet+ aumentó más de 2 veces en ratones inmunizados deficientes en B7-H1 (0,38%) en comparación con ratones WT (0,16%; $p < 0,05$; figura 2A). Este aumento se reflejó en los números de células absolutos ($p = 0,001$; figura 2B). Además de tener un mayor número de células T CD8+ de memoria, se detectó un porcentaje aumentado de células T CD8+ de memoria capaces de producir múltiples citocinas en el bazo de ratones deficientes en B7-H1 (0,73% de IFN γ +/TNF α +, 0,17% de IFN γ +/IL-2+) en comparación con ratones WT (0,24% de IFN γ +/TNF α +, 0,07% de IFN γ +/IL-2+; $p < 0,05$; figura 2C). También se realizó un ensayo CTL *in vivo* para medir la actividad citolítica de las células T CD8+ de memoria. El día 4 después de la reestimulación *in vivo* se inyectaron células diana (esplenocitos singénicos marcados con CFSE alto o bajo) pulsadas con péptidos OVA o péptido de control en ratones inmunizados WT y deficientes en B7-H1. Cuatro horas después de la inyección de células, se analizaron las células positivas a CFSE remanentes en el bazo. Las células T CD8+ de memoria en los ratones deficientes en B7-H1 lisaron más células diana pulsadas con péptido OVA (33,5%) que las de ratones WT (9,3%, $p < 0,01$; figura 2D). En conjunto, estos datos sugieren que B7-H1 regula negativamente la generación de células T CD8+ de memoria en ratones inmunizados.

Una característica distintiva de las células T CD8+ de memoria es su rápida respuesta de recuerdo a antígenos cognados, por lo que se realizaron estudios para determinar si el aumento del conjunto de memoria en ratones deficientes en B7-H1 conduciría a una respuesta de recuerdo más protectora. Se inyectaron células tumorales de melanoma B16-OVA (manipuladas genética para que expresen OVA) en ratones inmunizados WT y deficientes en B7-H1. Las células tumorales B16-OVA inyectadas por vía intravenosa forman metástasis en el pulmón y se puede realizar un seguimiento de la inmunidad antitumoral realizando un recuento del número de focos tumorales. El día 4 después de la inyección intravenosa de 5×10^5 células tumorales B16-OVA, la frecuencia de las células T CD8+ de memoria funcionales en los pulmones de ratones WT y deficientes en B7-H1 se determinó mediante tinción intracelular para IFN γ . Se detectaron aproximadamente 4 a 5 veces más células T CD8+ IFN γ + en los pulmones de ratones deficientes en B7-H1 en comparación con ratones WT ($p < 0,01$; figura 3A). El día 21 posterior a la inyección tumoral, el número de metástasis tumorales en los pulmones de ratones deficientes en B7-H1 sin tratamiento previo fue comparable al de los ratones WT sin tratamiento previo ($p = 0,43$; figura 3B). Se formaron menos metástasis tumorales en los pulmones de ratones WT inmunizados en comparación con ratones WT sin tratamiento previo ($p = 0,001$). Significativamente, las metástasis tumorales se descartaron completamente en los pulmones de ratones deficientes en B7-H1 inmunizados (figura 3B), lo que sugiere que se establece una población de memoria de células T CD8+ más eficaz en ausencia de B7-H1.

Ejemplo 3: La expresión de Bim se reduce en células T CD8+ estimuladas con antígeno en ausencia de B7-H1

Se realizaron estudios para determinar qué mecanismos podrían ser responsables del aumento de la población de células T CD8+ de memoria en ratones deficientes en B7-H1 mediante el examen de la proliferación y apoptosis de células T CD8+ estimuladas con antígeno después de la inmunización. Se utilizó CD11a como marcador de activación sustituto. Una ventaja de este procedimiento es que las células T CD8+ CD11a^{alto} representan células T CD8+ estimuladas con antígeno que responden a epítopes de antígenos no definidos no reconocidos por tetrámeros. Se detectaron células T CD8+ CD11a^{alto} a niveles bajos en los bazos de ratones sin tratamiento previo WT y deficientes en B7-H1 (figura 4A). El día 7 después de la inmunización, el porcentaje de células T CD8+ CD11a^{alto} aumentó más de 2 veces en el bazo de ratones deficientes en B7-H1 (41,5%) en comparación con ratones WT inmunizados (17,2%; $p < 0,01$; figuras 4A y 4B), lo que era consecuente con los resultados obtenidos mediante la tinción del tetrámero (figura 1). Del siete a 15% de células T CD8+ CD11a^{alto} de ratones WT y deficientes en B7-H1 fueron específicas para el epítipo de OVA₂₅₇₋₂₆₄ restringido por H-2K^b conocido basándose en la tinción del tetrámero y las células T CD8+ CD11a^{bajo} no contenían células tetrámero+ (figura 4C), lo que sugiere que todas las células T CD8+ específicas de antígeno se encuentran en la población de células T CD8+ CD11a^{alto}. Además, la población de CD8+ CD11a^{alto} tanto de ratones WT y como de ratones deficientes en B7-H1, pero no la población de células T CD8+ CD11a^{bajo}, produjo IFN γ y experimentó desgranulación (indicada por la expresión en superficie de CD107a) después de reestimulación *ex vivo* (figura 4D). Como las respuestas de las células T frente a diversos epítopes se regulan de forma coordinada, estos datos apoyan aún más el concepto de que la población de células T CD8+ CD11a^{alto} representa células T CD8+ específicas de OVA verdaderas. Casi el 80-90% de células T CD8+ CD11a^{alto} inducidas por OVA eran reactivas contra epítopes de antígenos no definidos de la proteína OVA (figura 4C). Por lo tanto, la población de células T CD8+ CD11a^{alto} podría utilizarse para representar a la mayor parte de las células T CD8+ estimuladas con antígeno durante las respuestas de células T primarias. En los estudios siguientes, se utilizó CD11a^{alto} como marcador para rastrear células T CD8+ específicas de antígeno.

La proliferación de células T CD8+ efectoras después de la inmunización se examinó mediante tinción de células para Ki67, una proteína nuclear asociada con la proliferación celular (Gerdes et al. (1984) *J. Immunol.* 133: 1710-1715). El porcentaje de células Ki67+ aumentó en células T CD8+ CD11a^{alto} de ratones deficientes en B7-H1 (9,32%) en comparación con ratones WT (7,5%), pero este aumento no fue estadísticamente significativo (figura 5A). También se realizó un seguimiento de la proliferación realizando un ensayo de incorporación de BrdU para medir la

proliferación en curso de células T CD8+ después de la inmunización. En este ensayo, el porcentaje de células T CD8+ CD11a^{alto} BrdU+ también fue similar entre WT (6,05%) y ratones deficientes en B7-H1 (5,59%; figura 5B). Las células Ki67+ o BrdU+ se detectaron principalmente en las células T CD8+ CD11a^{alto} pero no en células T CD8+ CD11a^{bajo}, lo que sugiere que las células T CD8+ CD11a^{alto} se encuentran en proliferación después de la estimulación con antígeno (figuras 5A y 5B). Estos resultados sugirieron que el aumento en la población de células T CD8+ estimuladas con antígeno en ratones deficientes en B7-H1 no es debido a una mayor proliferación de este compartimiento celular, comparado con los ratones WT.

Después se realizaron estudios para evaluar si la reducción de la apoptosis de las células T CD8+ estimuladas con antígeno podría contribuir al aumento observado de la población de células T CD8+ estimuladas con antígeno en ratones deficientes en B7-H1 inmunizados. Tal como se ha discutido anteriormente, la ruta del receptor de muerte del ligando Fas/Fas está implicada en la regulación de la contracción de las células T, por lo que se midieron los niveles de expresión superficial del ligando Fas y Fas en las células T CD8+ efectoras el día 7 después de la inmunización. La expresión del ligando Fas y Fas se detectó a niveles similares en ratones WT y deficientes en B7-H1. Estos resultados sugieren que el aumento observado en la población de células T CD8+ efectoras no es debido a un cambio en la apoptosis inducida por Fas en ratones deficientes en B7-H1. La ruta mitocondrial para la apoptosis se investigó mediante el análisis de niveles de anexina V y tinción con éster etílico de tetrametilrodamina (TMRE). El TMRE es un marcador fluorescente que se incorpora a las mitocondrias intactas, y las células que experimentan apoptosis muestran una tinción de TMRE reducida en comparación con las células vivas (Jayaraman, J. Immunol. Methods 306: 68-79, 2005). Estos estudios revelaron que menos células T CD8+ CD11a^{alto} estimuladas con antígeno estaban experimentando apoptosis (TMRE^{bajo} anexina V+) en ratones deficientes en B7-H1 (3,4%) en comparación con ratones WT (6,7%, $p < 0,05$; figuras 5C y 5D). Estos resultados sugirieron que los niveles reducidos de apoptosis mitocondrial pueden contribuir al aumento observado de células T CD8+ estimuladas con antígeno en ratones deficientes en B7-H1.

Se realizaron experimentos para buscar alteraciones en la expresión de moléculas reguladoras de la apoptosis en células T CD8+ efectoras. Se midieron los niveles intracelulares de la molécula proapoptótica Bim y las moléculas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x_L en células T CD8+ CD11a^{alto} recién aisladas del bazo el día 7 después de la inmunización de ratones sin tratamiento previo. Se observaron niveles de expresión intracelular más bajos de Bim en células T CD8+ CD11a^{alto} de ratones deficientes en B7-H1 que en las mismas células obtenidas de ratones WT ($p < 0,001$; figuras 6A y 6B), mientras que los niveles de expresión de Bcl-2 y Bcl-x_L fueron comparables en ratones WT y deficientes en B7-H1 (figura 6A). La expresión de Bim, Bcl-2 y Bcl-x_L fue comparable en células T CD8+ CD11a^{alto} de ratones deficientes en B7-H1 y WT (figura 6A). También se analizaron niveles de expresión intracelular de Bim en células T CD8+ CD11a^{alto} aisladas del hígado el día 7 después de la inmunización de ratones sin tratamiento previo. Nuevamente, se observaron niveles de expresión intracelular más bajos de Bim en células T CD8+ CD11a^{alto} de ratones deficientes en B7-H1 en comparación con ratones WT (figura 6C). Finalmente, se examinaron niveles de expresión intracelular de estas proteínas en células T CD8+ CD11a^{alto} aisladas del bazo de ratones sin tratamiento previo, y no se observaron diferencias significativas en ratones deficientes en B7-H1 frente a ratones WT en los niveles de expresión de Bim (figura 6D), Bcl-2 o Bcl-x_L. Estos datos sugirieron que la regulación a la baja de la molécula proapoptótica Bim puede contribuir al aumento observado de células T CD8+ efectoras estimuladas con antígeno en ratones deficientes en B7-H1.

Para excluir la posibilidad de que la regulación a la baja de Bim en ratones deficientes en B7-H1 fuera debido a un cambio intrínseco en las células T deficientes en B7-H1, se realizaron experimentos de transferencia en los que se inyectaron células T CD8+ OT-1 indiferenciadas (Thy1.1+) en ratones WT o deficientes en B7-H1 (Thy1.2+). Tras la transferencia de las células T CD8+ OT-1, los ratones huésped se inmunizaron con OVA más poli I:C. El día 7 después de la inmunización se midieron los niveles intracelulares de Bim, Bcl-2 y Bcl-x_L en células T CD8+ OT-1 transferidas recién aisladas del bazo y el hígado. Las células T CD8+ OT-1 transferidas a huéspedes deficientes en B7-H1 expresaron niveles más reducidos de Bim tanto en el bazo como en el hígado en comparación con las células T CD8+ OT-1 transferidas a huéspedes WT (figura 7). La expresión de Bcl-2 y Bcl-x_L en células T CD8+ OT-1 transferidas a ratones WT o deficientes en B7-H1 fueron comparables (figura 7). Estos datos sugirieron que la regulación a la baja de Bim en ratones deficientes en B7-H1 no se debe a un cambio intrínseco en las células T deficientes en B7-H1, sino más bien al huésped B7-H1 que interactúa con uno de sus asociados de unión en células T CD8+.

A continuación, se utilizaron anticuerpos que bloquean la interacción entre B7-H1 y PD-1 o entre B7-H1 y CD80 para examinar si el bloqueo de cualquiera de estas rutas tendría un efecto sobre los niveles de expresión de Bim. Los días 1 y 3 después de la inmunización de ratones WT con OVA más poli I:C, se inyectó un anticuerpo anti-PD-1 (G4) que solo bloquea la unión de PD-1 a B7-H1 (Hirano et al. (2005) Cancer Res. 65: 1089-1096) o un anticuerpo anti-B7-H1 (43H12) que solo bloquea la unión de B7-H1 a CD80 (Park et al. (2010) Blood 116: 1291-1298). El día 7 después de la inmunización, los niveles de expresión de Bim en células T CD8+ CD11a^{alto} se compararon entre grupos con o sin bloqueo por anticuerpos. Los anticuerpos que bloquean la interacción entre B7-H1 y PD-1 o entre B7-H1 y CD80 redujeron la expresión de Bim en células T CD8+ estimuladas en comparación con los anticuerpos de control, mientras que la expresión de Bcl-2 y Bcl-x_L no se vio afectada. Estos resultados sugirieron que la regulación a la baja de Bim en ratones deficientes en B7-H1 podría deberse a una falta de interacción entre B7-H1 y sus asociados de unión, PD-1 y CD80.

Después de una infección vírica aguda, se acumulan más células T de memoria centrales en los órganos linfoides de ratones deficientes en PD-1 en comparación con ratones WT, lo que indica que la señalización de PD-1 regula de forma negativa la generación de células T de memoria (Allie et al. (2011) J. Immunol. 186: 6280-6286). La relevancia de la señalización de CD80 en la regulación de la generación de memoria se abordó mediante la transferencia de cantidades iguales de células T CD8+ indiferenciadas OT-1 deficientes en CD80 y OT-1 WT a ratones CD45.1+. Un día después de la transferencia de células T, los ratones huésped se inmunizaron con OVA más poli I:C. El día 21 después de la inmunización se analizaron la frecuencia y el fenotipo de las células T CD8+ OT-1 deficientes en CD80 y WT transferidas. El día 21 después de la inmunización, se detectó en el bazo un porcentaje 2 veces superior de células T CD8+ OT-1 deficientes en CD80 en comparación con células T CD8+ OT-1 WT, lo que indica que las células T CD80+ OT-1 deficientes en CD80 transferidas generaron más células T de memoria en comparación con células T CD8+ OT-1 WT. La tinción de superficie confirmó que estas células tenían un fenotipo de memoria central (CD44^{alto} CD62L^{alto}). La respuesta de recuerdo de la población de memoria generada a partir de células transferidas se investigó inyectando a los huéspedes OVA más poli I:C el día 30 después de la inmunización inicial, y 3 días después se analizó la frecuencia y el fenotipo de las células transferidas. Se detectó un porcentaje aumentado de células T CD8+ OT-1 deficientes en CD80 en comparación con células T CD8+ OT-1 WT en el bazo ($p = 0,013$). La tinción de superficie confirmó que estas células tenían un fenotipo de memoria efectora (CD44^{alto} CD62L^{bajo}). En conjunto, estos datos demostraron que las células T CD8+ OT-1 *Cd80*^{-/-} generaron más células T de memoria en comparación con sus homólogos WT, lo que indica que el CD80 expresado por células T CD8+ puede regular negativamente la generación de células T de memoria.

Ejemplo 4: El B7-H1 mejora la expresión de Bim en células T CD8+ activadas

Se realizaron estudios para investigar cómo podría regular B7-H1 los niveles de Bim en células T CD8+ activadas. Se incubaron células T CD8+ WT preactivadas con proteína de fusión B7-H1 unida a la placa durante 48 horas en presencia de estimulación con TCR (anticuerpo anti-CD3). La expresión de Bim se analizó mediante inmunotransferencia Western, y se observaron niveles de expresión aumentados en células T CD8+ cultivadas en presencia de proteína de fusión B7-H1, en comparación con una proteína de fusión de control (figura 8A). La expresión de Bim también se analizó por citometría de flujo intracelular, revelando que la proteína de fusión B7-H1 aumentó drásticamente los niveles de proteína Bim en células T CD8+ en comparación con una proteína de fusión de control ($p < 0,02$; figuras 8B y 8C). En ausencia de anticuerpos anti-CD3, los niveles de Bim no aumentaron tras la incubación con proteína de fusión B7-H1, lo que sugiere que B7-H1 proporciona una señal coestimuladora para la regulación al alza de Bim. Por consiguiente, el número absoluto de células vivas también se redujo en células T CD8+ cultivadas en presencia de proteína de fusión B7-H1 en comparación con una proteína de fusión de control ($p < 0,01$; figura 8D). Se observó un aumento de los niveles de células que experimentan apoptosis (TMRE^{bajo} anexina V+) en cultivos de células T CD8+ activadas expuestas a la proteína de fusión B7-H1 y anti-CD3 (12,4%) en comparación con las células cultivadas con proteína de fusión de control y anti-CD3 (4,1%, figura 8E). La inducción de apoptosis por la proteína de fusión B7-H1 desapareció en células T CD8+ aisladas de ratones deficientes en Bim y ratones transgénicos Bcl-2 (figura 8E), lo que sugiere que la apoptosis de células T inducida por B7-H1 puede depender de la ruta mitocondrial mediada por Bim de la apoptosis.

Para examinar qué receptor de B7-H1 está implicado en la mediación de la regulación al alza de Bim, se incubaron células T CD8+ WT preactivadas con proteína de fusión B7-H1 unida a placa previamente bloqueada con anticuerpos anti-B7-H1 (10B5 o 43H12) o anti-PDI (G4). El anticuerpo 10B5 bloquea la interacción de B7-H1 con PD-1 y CD80. Tanto el anticuerpo 10B5 como el anticuerpo G4 bloquearon completamente la regulación al alza de Bim inducida por la proteína de fusión B7-H1, mientras que el 43H12 solo hizo lo mismo parcialmente, pero de forma significativa (figura 8F). Ninguno de los anticuerpos utilizados en este experimento tuvo efectos sobre los niveles de expresión de Bim en células cultivadas con proteína de fusión de control, lo que indica que su efecto sobre los niveles de expresión de Bim es debido a que bloquea la interacción entre B7-H1/PD-1 o B7-H1/CD80 y no debido a un efecto no específico. Estos resultados sugieren que B7-H1 puede utilizar PD-1 o CD80 en células T CD8+ para administrar señales coestimuladoras para la regulación al alza de Bim.

Posteriormente se examinó el mecanismo por el que B7-H1 regula los niveles de expresión de Bim. Se examinaron niveles de ARNm de *Bcl211*, que codifica la proteína Bim, mediante análisis por PCR cuantitativa en tiempo real utilizando ARNm aislado de células T CD8+ preactivadas que se expusieron a la proteína de fusión B7-H1 o a una proteína de fusión de control y anti-CD3 durante 24 horas. La incubación de células T CD8+ preactivadas con proteína de fusión B7-H1 no aumentó los niveles de *Bcl211* (figura 9A), lo que indica que la regulación al alza de Bim mediada por B7-H1 no es resultado de una regulación transcripcional. La degradación de Bim está estrechamente regulada, al menos en parte, por la activación de Akt seguida de la fosforilación y la degradación de Bim mediada por Akt (Qi et al. (2006) J. Biol. Chem. 281: 813-823). El nivel de activación de Akt en células T CD8+ después del acoplamiento de B7-H1 se midió mediante citometría de flujo intracelular para Akt fosforilado (Ser473). Las células T CD8+ cultivadas con proteína de fusión B7-H1 mostraron niveles reducidos de Akt fosforilado en comparación con células T CD8+ cultivadas con una proteína de fusión de control ($p < 0,01$; figuras 9B y 9C). Como la fosforilación de Akt en Ser473 está regulada por la activación de mTOR (Sarbasov et al. (2005) Science 307: 1098-1101; y Jacinto et al. (2006) Cell 127: 125-137), se realizaron estudios para examinar si B7-H1 regula la fosforilación de mTOR *in vitro*. Inesperadamente, no hubo diferencia en niveles de fosfo-mTOR en células T CD8+ cultivadas con proteína de

fusión B7-H1 y células cultivadas con proteína de fusión de control (figuras 9B y 9C). Estos resultados sugieren que el acoplamiento de células T CD8+ con B7-H1 inhibe la activación de Akt, lo que da como resultado una reducción de la degradación de Bim.

5 **Ejemplo 5: Bim aumenta en células T CD8+ reactivas a tumores en sangre periférica de pacientes con melanoma y cáncer de próstata**

Se aislaron linfocitos de sangre periférica de 26 pacientes con melanoma en estadio IV (avanzado) y de 11 donantes de sangre sanos. Los linfocitos se tiñeron con CD8, CD11a y PD-1, operación seguida de tinción intracelular para Bim. La alta expresión de CD11a por células T CD8 se utilizó para identificar células T estimuladas con antígeno. Se definieron células T CD8+ reactivas al tumor por su expresión de CD11a^{alto} y PD-1+ (figura 13, panel izquierdo). Los histogramas mostrados en el panel derecho de la figura 13 indican la expresión de Bim por subconjuntos de células T CD8+ (Tn: células T indiferenciadas; PD-1-: células estimuladas negativas a PD-1, PD-1+: células estimuladas positivas a PD-1). Cabe señalar que solo las células T CD8+ estimuladas con PD-1+ (reactivas al tumor) expresaron altos niveles de Bim. La expresión de Bim aumentó en las células T CD8+ reactivas al tumor en la sangre periférica de los pacientes con melanoma en comparación con los controles sanos, y también aumentó en las células T CD8+ reactivas al tumor en la sangre periférica de los pacientes con cáncer de próstata en comparación con los controles sanos (figura 14). La regulación al alza de Bim en pacientes con melanoma dependía de PD-1, tal como se muestra en la figura 15. Cuando se compararon los niveles de Bim entre células T CD8+ CD11a^{alto} negativas a PD-1 (PD-1-) y positivas a PD-1 (PD-1+) se encontró que el Bim aumentó significativamente en las poblaciones de PD-1+ ($p = 0,0081$) en pacientes con melanoma. Por el contrario, la expresión de Bim no aumentó en las células T PD-1+ en donantes sanos, lo que sugiere que la regulación al alza de Bim depende de la expresión de PD-1 y está relacionada con el cáncer.

Además, cuando los pacientes con melanoma se dividieron en las categorías "Bim bajo" frente a "Bim alto" según el nivel de expresión de Bim en células T CD8+ CD11a^{alto} PD-1+ reactivas al tumor en la sangre periférica (figura 16, panel izquierdo), la tasa de supervivencia de los pacientes con células T CD8+ PD-1+ Bim^{alto} se redujo en comparación con la tasa de supervivencia de los pacientes con células T CD8+ PD-1+ Bim^{bajo} (figura 16, panel derecho).

30 **Ejemplo 6: La proteína B7-H1 induce una alta expresión de Bim en células T CD8+ preactivadas humanas**

Dado que la regulación al alza de Bim es una consecuencia de la interacción entre B7-H1 y PD-1, se realizaron experimentos para evaluar si un anticuerpo de bloqueo anti-PD-1 puede reducir la regulación al alza de Bim inducida por B7-H1 en células T. Se estableció un sistema *in vitro* en el que se incubaron células T CD8+ primarias humanas preactivadas con una proteína de fusión B7-H1/PD-L1 para inducir la regulación al alza de Bim. Tal como se muestra en la figura 17A (panel derecho), se indujo una regulación al alza significativa de Bim (presentado como MFI) por la fusión B7-H1/PD-L1 ($P < 0,05$, $n = 6$). El aumento de la expresión de Bim se demuestra adicionalmente mediante un histograma de citometría de flujo (figura 17A, panel izquierdo) y un ensayo de inmunotransferencia Western (figura 17B).

Utilizando este sistema, se cribaron varios anticuerpos anti-PD-1 humanos disponibles comercialmente por sus efectos de bloqueo, y se identificó un anticuerpo anti-PD-1 (clon MIH4) que bloqueó significativamente la regulación al alza de Bim inducida por B7-H1 en una forma dependiente de la dosis (figura 18, panel izquierdo). Dado que B7-H1 indujo diferentes grados de regulación al alza de Bim en donantes sanos individuales, se realizaron experimentos para examinar si los diferentes grados de regulación al alza de Bim afectarían los efectos de bloqueo del anticuerpo anti-PD-1. Curiosamente, se observó que los niveles más altos de Bim inducidos por B7-H1 tenían una correlación negativa con la reducción de Bim por el anticuerpo de bloqueo anti-PD-1 (figura 18, panel derecho; Pearson $R = -0,71$, $n = 12$, $P < 0,05$). Estos resultados sugieren que los niveles de Bim preexistentes en las células T CD8+ podrían afectar a la eficacia del bloqueo anti-PD-1. Por lo tanto, medir los niveles de Bim antes del tratamiento podría ayudar a determinar el grado al que un anticuerpo anti-PD-1 podría bloquear el efecto de las señales de PD-1 sobre las respuestas de las células T antitumorales.

55 **Ejemplo 7: El tratamiento anti-PD-1 reduce la frecuencia de células T CD8 Bim+ PD-1+ reactivas a tumores**

A continuación, se realizaron estudios para evaluar el efecto del anticuerpo anti-PD-1 en la expresión de Bim por células T CD8 reactivas al tumor en pacientes con cáncer. Se recogieron linfocitos de sangre periférica de pacientes con melanoma avanzado (estadio IV) antes y 12 semanas después del tratamiento con anti-PD-1. Se identificaron células T CD8 reactivas al tumor por su alta expresión de CD11a y expresión de PD-1. La expresión de Bim se analizó mediante tinción intracelular. El porcentaje de Bim+PD-1+ en células T CD8+ CD11a^{alto} se comparó entre personas sanas y pacientes con melanoma, y entre pacientes con melanoma antes y después del tratamiento con anticuerpo anti-PD-1. Tal como se muestra en la figura 19, la frecuencia de células T CD8 Bim+ PD-1+ en la sangre periférica de pacientes con melanoma (antes del tratamiento, $n = 29$) fue significativamente superior que en el grupo de control sano ($p = 0,0012$, $n = 14$), lo que sugiere que más células T CD8 PD-1+ se encuentran bajo la influencia de la interacción PD-1/B7-H1 que conduce a la regulación al alza de Bim. Es importante indicar que doce semanas después del tratamiento con anticuerpos anti-PD-1 (2 mg/kg, un ciclo), aproximadamente el 67% (6/9) de los

pacientes con melanoma mostraron una reducción significativa en la frecuencia de células T CD8 Bim+PD-1+ ($p = 0,023$, $n = 6$). Estos resultados indicaron que la medición de Bim expresada por células T CD8 PD-1+ podría usarse para supervisar las respuestas de los pacientes con cáncer al tratamiento anti-PD-1, que puede bloquear la regulación al alza de Bim inducida por B7-H1. Se puede utilizar una frecuencia o nivel reducido de Bim expresado por células T CD8 PD-1+ en pacientes con cáncer después del tratamiento con anti-PD-1 para evaluar qué pacientes responden al tratamiento.

Ejemplo 8: B7-H1 expresado por células tumorales induce la regulación al alza de Bim en células T CD8 preactivadas humanas

Dado que la mayor parte de las células tumorales sólidas humanas expresan niveles elevados de B7-H1, se examinó la función de B7-H1 expresada en células tumorales en la expresión de Bim de células T. Se incubaron células T CD8 primarias humanas previamente activadas con células de una línea de melanoma humano (624mel) que se transfectaron con ADNc de B7-H1 o con ADNc simulado de control, durante 24 horas. Tal como se muestra en la figura 20, la expresión intracelular de Bim aumentó drásticamente en las células T CD8 cultivadas con células B7-H1/624mel, en comparación con células simuladas/624mel ($p < 0,01$). Este resultado sugiere que B7-H1 expresado por células tumorales humanas tiene el potencial de regular al alza el Bim en células T CD8 preactivadas.

Ejemplo 9: La expresión BIM está asociada con la expresión de B7-H1 en RCC humano

La capacidad de B7-H1 para regular al alza Bim en células T CD8+ preactivadas, pero no nuevamente activadas, implicaba que la reactivación de células T CD8+ reactivas al tumor en sitios tumorales podría reducirse utilizando este mecanismo mediante células tumorales positivas a B7-H1. Para analizar esta posibilidad, se evaluaron tejidos de cáncer humano teñidos para B7-H1 y Bim. La hipótesis era que los tejidos de cáncer humanos positivos a B7-H1 se asociarían con más linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) positivos a Bim. Tal como se muestra en la figura 21 (panel izquierdo), se tiñeron tejidos de carcinoma de células renales humanas con anticuerpos anti-B7-H1 y anti-Bim en ensayos de inmunohistoquímica. La reactividad de B7-H1 se identificó en la superficie de las células cancerosas, mientras que la tinción positiva a Bim se identificó en células cancerosas y también en TIL (figura 21, panel izquierdo). La reactividad de Bim se determinó mediante un sistema de puntuación arbitrario: 0 (ausencia), 1 (focal), 2 (moderada) y 3 (marcada). La asociación entre tumores positivos o negativos a B7-H1 y la frecuencia de reactividad de Bim a diferentes niveles se muestran en el panel derecho de la figura 21, y se analizaron utilizando la prueba exacta de Fisher. En general, se encontró que los tumores positivos a B7-H1 tienen un mayor grado (puntuaciones de 2-3) de TIL positivos a Bim que los tumores negativos a B7-H1 (prueba exacta de Fisher, $p < 0,01$). Estos resultados sugieren que los tumores positivos a B7-H1 pueden inducir más muerte en células T reactivas al tumor en sitios tumorales a través de la regulación al alza de Bim cuando estas células T se reactivan con la estimulación de antígeno tumoral.

Ejemplo 10: La expresión de Bim se correlaciona con granzima B y T-bet expresadas por células T CD8+ CD11a^{alto} PD-1+ relacionadas con cáncer

Para examinar si la regulación al alza de Bim está asociada con células T efectoras, se midieron los niveles de granzima B (una molécula ejecutiva de linfocitos T citotóxicos, CTL) y T-bet (un factor de transcripción de CTL) en células T CD8 CD11a^{alto} PD-1+ de sangre de pacientes con melanoma y se analizó su correlación con niveles de Bim. Tal como se muestra en la figura 22, se observaron correlaciones positivas entre los niveles de Bim y granzima B (panel izquierdo; $r = 0,51$, $p < 0,05$) y entre los niveles de Bim y T-bet (panel derecho; $r = 0,62$, $p < 0,01$). Estos resultados sugirieron que los niveles más altos de expresión de Bim están asociados con la función o diferenciación de células T efectoras. Estos datos también implican que la regulación al alza de Bim puede utilizarse por células tumorales positivas a B7-H1 para inducir la apoptosis de células T CD8 reactivas a tumores, especialmente de células T CD8 con función efectora.

Ejemplo 11: La expresión de Bim disminuye en células T CD8 PD-1+ CD11a^{alto} después de la radioterapia en algunos pacientes con cáncer

Para observar cómo los niveles de Bim en las células T CD8 reactivas al tumor responden al tratamiento, los niveles de Bim se midieron en células T CD8 CD11a^{alto} PD-1+ de la sangre periférica de pacientes con melanoma y cáncer de próstata antes y después de la radioterapia. Como se muestra en la figura 23 (panel izquierdo), se observaron niveles reducidos de Bim en pacientes con melanoma después de la radioterapia. Por el contrario, se observaron mayores niveles de Bim en pacientes con cáncer de próstata después de la radioterapia (panel derecho). Debido a la cantidad limitada de pacientes en este estudio, estos cambios no alcanzaron significancia estadística. No obstante, estos cambios en los niveles de Bim después del tratamiento citotóxico del tumor sugirieron que la destrucción de los tejidos tumorales podría alterar la estimulación del antígeno y la expresión de B7-H1, lo que tendría como consecuencia alteraciones en la expresión de Bim, que depende tanto de la estimulación del antígeno como del acoplamiento de B7-H1 con células T CD8 PD-1. Tomados en conjunto, estos estudios indican que la medición de niveles de Bim en células T CD8 PD-1+ reactivas al tumor podría usarse como biomarcador para supervisar respuestas de células T a antígenos y ligandos PD-1 (por ejemplo, B7-H1) expresados por células tumorales humanas.

Otras formas de realización

5 Se entenderá que aunque la invención se ha descrito conjuntamente con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

Listado de secuencias

10 < 110> Mayo Foundation for Medical Education and Research

15 < 120> PROCEDIMIENTOS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER EN PACIENTES CON NIVELES ELEVADOS DE BIM

< 130> 07039-1283WO1

< 150> US 61/885.218

20 < 151> 01/10/2013

< 160> 6

< 170> FastSEQ para Windows versión 4.0

< 210> 1

25 < 211> 873

< 212> ADN

< 213> Homo sapiens

< 400> 1

```

atgaggatat ttgctgtcctt tatattcatg acctactggc atttgctgaa cgcatttact 60
gtcacgggttc ccaaggacct atatgtggta gagtatggta gcaatatgac aattgaatgc 120
aaattcccag tagaaaaaca attagacctg gctgcactaa ttgtctattg ggaaatggag 180
gataagaaca ttattcaatt tgtgcatgga gaggaagacc tgaaggttca gcatagtagc 240
tacagacaga gggcccgct gttgaaggac cagctctccc tgggaaatgc tgcacttcag 300
atcacagatg tgaattgca ggatgcaggg gtgtaccgct gcatgatcag ctatggtggt 360
gccgactaca agcgaattac tgtgaaagtc aatgccccat acaacaaaat caaccaaga 420
atthtgggtt tggatccagt cacctctgaa catgaaactga catgtcaggc tgagggctac 480
cccaaggccg aagtcactcg gacaagcagt gaccatcaag tcctgagtgg taagaccacc 540
accaccaatt ccaagagaga ggagaagcct ttcaatgtga ccagcacact gagaatcaac 600
acaacaacta atgagatttt ctactgcact tttaggagat tagatcctga ggaaaacct 660
acagctgaat tggtcatccc agaactacct ctggcacatc ctccaaatga aaggactcac 720
ttggtaatte tgggagccat cttattatgc cttgggtgtag cactgacatt catcttccgt 780
ttaagaaaag ggagaatgat ggatgtgaaa aatgtggca tccaagatac aaactcaaag 840
30 aagcaaagtg atacacattt ggaggagacg taa 873

```

< 210> 2

< 211> 290

< 212> PRT

35 < 213> Homo sapiens

< 400> 2

```

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
Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val

```

ES 2 714 708 T3

```

      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> 3
 < 211> 948
 5 < 212> ADN
 < 213> Homo sapiens

```

< 400> 3
gcctgagcag tggagaaggc ggcactctgg tggggctgct ccaggcatgc agatcccaca 60
ggcgcctctg ccagtcgtct gggcggtgct acaactgggc tggcggccag gatggttctt 120
agactcccca gacaggcctt ggaaccccc cacttctcc ccagccctgc tcgtggtgac 180
cgaaggggac aacgccacct tcacctgcag cttctccaac acatcggaga gcttcgtgct 240
aaactggtac cgcattgagc ccagcaacca gacggacaag ctggccgctt tccccgagga 300
ccgcagccag cccggccagg actgcccgtt ccgtgtcaca caactgcca acgggcgtga 360
cttccacatg agcgtggtca gggcccggcg caatgacagc ggcacctacc tctgtggggc 420
catctccctg gcccccagg cgcatatcaa agagagcctg cgggcagagc tcagggtgac 480
agagagaagg gcagaagtgc ccacagcccc ccccagcccc tcaccagagc cagccggcca 540
gttccaaacc ctggtggttg gtgtcgtggg cggcctgctg gccagcctgg tgctgctagt 600
ctgggtcctg gccgtcatct gctcccgggc cgcacgaggg acaataggag ccaggcgcac 660
cggccagccc ctgaaggagg acccctcagc cgtgcctgtg ttctctgtgg actatgggga 720
gctggatttc cagtggcgag agaagacccc ggagccccc gtgccctgtg tccttgagca 780
gacggagtat gccaccattg tcttctctag cggaatgggc acctcatccc ccgcccgcag 840
gggctcagcc gacggccctc ggagtgccca gccactgagg cctgaggatg gacactgctc 900
ttggcccctc tgaccggcct ccttggccac cagtgttctg cagaccct 948

```

10 < 210> 4
 < 211> 288
 < 212> PRT
 15 < 213> Homo sapiens

```

< 400> 4
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 Ser 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

```

ES 2 714 708 T3

				85						90					95			
Val	Thr	Gln	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							
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> 5
 < 211> 2757
 < 212> ADN
 < 213> Homo sapiens

5

< 400> 5
 gacaagact gagtgaactc aaacctctctg taaagtaaca gaagttagaa ggggaaatgt 60
 cgctctctctg aagattacc c aaagaaaaag tgatttgtca ttgctttata gactgtaaga 120
 agagaacatc tcagaagtgg agtcttacc tgaaatcaa ggatttaaag aaaaagtgga 180
 attttctctc agcaagctgt gaaactaaat ccacaacctt tggagacc caaacaccct 240
 ccaatctctg tgtgttttgt aaacatcact ggagggtctt ctacgtgagc aattggattg 300
 tcatcagccc tgcctgtttt gcacctggga agtgccctgg tcttacttgg gtccaaattg 360
 ttggctttca cttttgacc taagcatctg aagccatggg ccacacacgg aggcagggaa 420
 catcaccatc caagtgtcca tacctcaatt tctttcagct cttggtgctg gctggtcttt 480
 ctcaattctg ttcaggtgtt atccacgtga ccaaggaagt gaaagaagt gcaacgctgt 540
 cctgtggtca caatgtttct gttgaagagc tggcacaac tcgcatctac tggcaaaagg 600
 agaagaaaaat ggtgctgact atgatgtctg gggacatgaa tatatggccc gactacaaga 660
 accggaccat ctttgataac actaataacc tctccattgt gatcctggct ctgcccctat 720
 ctgacgaggg cacatacgag tgtgttgttc tgaagtatga aaaagacgct ttcaagcggg 780
 aacacctggc tgaagtgacg ttatcagtc aagctgact ccctacacct agtatatctg 840
 actttgaaat tccaacttct aatattagaa ggataatttg ctcaacctct ggaggttttc 900
 cagagcctca cctctcctgg ttggaaaatg gagaagaatt aaatgccatc aacacaacag 960
 tttccaaga tcttgaaact gagctctatg ctggttagcag caaactggat ttcaatatga 1020
 caaccaacca cagcttcatg tgtctcatca agtatggaca ttaagagtg aatcagacct 1080
 tcaactggaa tacaaccaag caagagcatt ttcctgataa cctgctccca tcctgggcca 1140
 ttaccttaat ctcaagtaaat ggaatttttg tgatatgctg cctgacctac tgctttgccc 1200
 caagatgcag agagagaagg agaatgaga gattgagaag ggaagtgta cgccctgtat 1260
 aacagtgtcc gcagaagcaa gggctgaaa agatctgaag gtcccacctc catttgcaat 1320
 tgacctcttc tgggaacttc ctcatagtg caagattacc ccaccttgcc ctttacgtat 1380
 ctgctcttag gtgcttcttc acttcagttg ctttgcagga agtgtctaga ggaatatggg 1440
 gggcacagaa gtagctctgg tgaccttgat caaggtgttt tgaatgcag aattcttgag 1500
 ttctggaagg gacttttagag aataccagtg ttattaatga caaaggcact gaggcccagg 1560
 gaggtgacct gaattataaa ggccagcgcc agaaccaga tttcctaact ctggtgctct 1620
 ttccctttat cagtttgact gtggcctggt aactggtata tacatatata tgtcaggcaa 1680
 agtgctgctg gaagtagaat ttgtccaata ttcagagact atctgatttc 1740
 ctaatgtcag agtagaagat tttatgctgc tgtttacaaa agcccaatgt aatgcatagg 1800

10

ES 2 714 708 T3

```

aagtatggca tgaacatctt taggagacta atggaaatat tattggtggt taccagat 1860
tccatttttt tcattgtggt ctctattgct gctctctcac tccccatga ggtacagcag 1920
aaaggagaac tatccaaaac taatttcctc tgacatgtaa gacgaatgat ttaggtacgt 1980
caaagcagta gtcaaggagg aaagggatag tccaaagact taactgggtc atattggact 2040
gataatctct ttaaatggct ttatgctagt ttgacctcat ttgtaaaata tttatgagaa 2100
agttctcatt taaaatgaga tcgttggtta cagtgtatgt actaagcagt aagctatctt 2160
caaatgtcta aggtagtaac tttccatagg gcctccttag atccctaaga tggctttttc 2220
tccttggtat ttctgggtct ttctgacatc agcagagaac tggaaagaca tagccaactg 2280
ctgttcatgt tactcatgac tcctttctct aaaactgcct tccacaattc actagaccag 2340
aagtggacgc aacttaagct gggataatca cattatcatc tgaaaatctg gagttgaaca 2400
gcaaaaagaag acaacatttc tcaaatgcac atctcatggc agctaagcca catggctggg 2460
atttaaagcc tttagagcca gcccatggct ttagctacct cactatgctg cttcacaac 2520
cttgctcctg tgtaaaacta tattctcagt gtagggcaga gaggtctaac accaacataa 2580
ggtactagca gtgtttcccg tattgacagg aataactaac tcaataattc ttttcttttc 2640
catttagtaa cagttgtgat gactatgttt ctattctaag taattcctgt attctacagc 2700
agatactttg tcagcaatac taagggaaga aacaaagttg aaccgtttct ttaataa 2757

```

< 210> 6

< 211> 288

5 < 212> PRT

< 213> Homo sapiens

< 400> 6

```

Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr
 1          5          10          15
Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys
 20          25          30
Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu
 35          40          45
Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile
 50          55          60
Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp
 65          70          75          80
Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr
 85          90          95
Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly
 100         105         110
Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg
 115         120         125
Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr
 130         135         140
Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile
 145         150         155         160
Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu
 165         170         175
Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp
 180         185         190
Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met
 195         200         205
Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg
 210         215         220
Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro
 225         230         235         240
Asp Asn Leu Leu Pro Ser Trp Ala Ile Thr Leu Ile Ser Val Asn Gly
 245         250         255
Ile Phe Val Ile Cys Cys Leu Thr Tyr Cys Phe Ala Pro Arg Cys Arg
 260         265         270
Glu Arg Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val
 275         280         285

```

10

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende

5 un anticuerpo anti-B7-H1, un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-CD80, una proteína de fusión que comprende una porción de PD-1 unida a una secuencia Fc de inmunoglobulina, o una proteína de fusión que comprende una porción de CD80 unida a una secuencia Fc de inmunoglobulina

10 para su uso en un procedimiento para tratar a un mamífero que padece cáncer,

en la que dicho procedimiento comprende

15 (i) determinar el nivel de Bim en una muestra de sangre periférica de dicho mamífero y certificar que dicho mamífero contiene un nivel elevado de Bim, en el que dicho nivel elevado de Bim se basa en niveles de proteína Bim,

20 en el que dicho nivel elevado de Bim se refiere a un nivel que es al menos un 50% mayor que un nivel de referencia de Bim, en el que dicho nivel de referencia se refiere al nivel de Bim que se observa normalmente en mamíferos correspondientes sanos sin cáncer, y

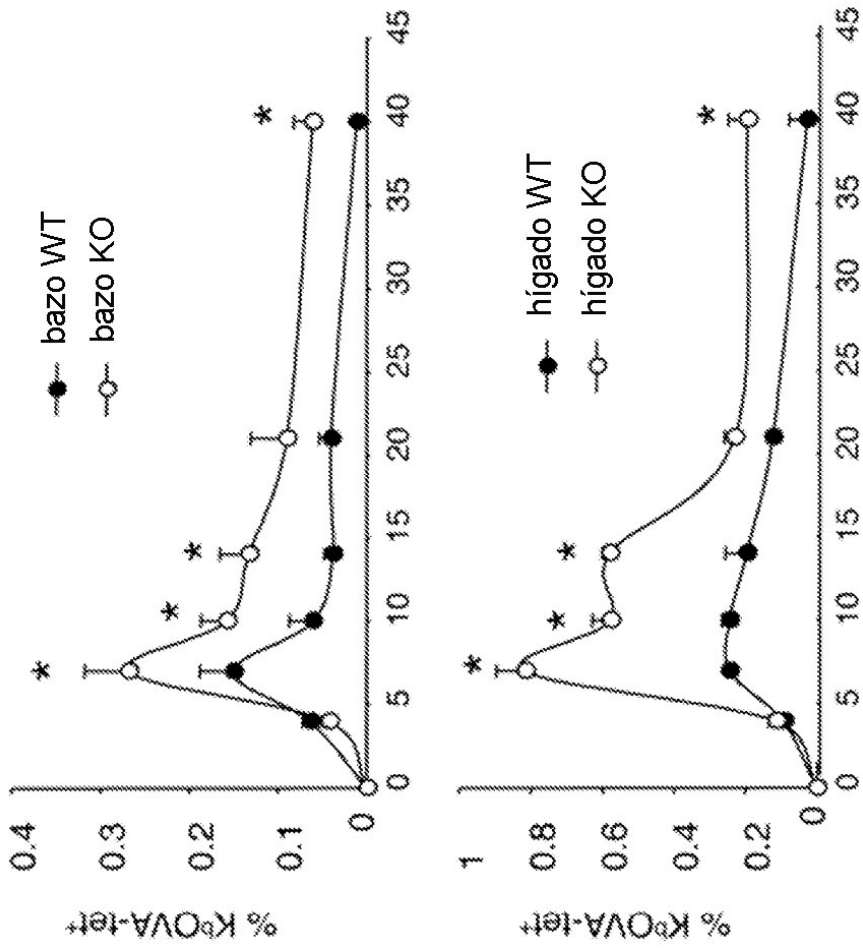
25 (ii) administrar dicha composición a dicho mamífero en condiciones en las que la interacción de B7-H1 de origen natural con PD-1 o CD80 en dicho mamífero se reduce después de administrar dicha composición a dicho mamífero.

2. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho mamífero es un ser humano.

3. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho cáncer es un cáncer de melanoma, un cáncer de mama, un cáncer de pulmón, un carcinoma de células renales, un cáncer de páncreas, un cáncer de próstata, un cáncer de colon, un cáncer de cerebro, un cáncer de hígado o un cáncer de ovario.

30

FIGURA 1



Días después de la inmunización

FIGURA 2

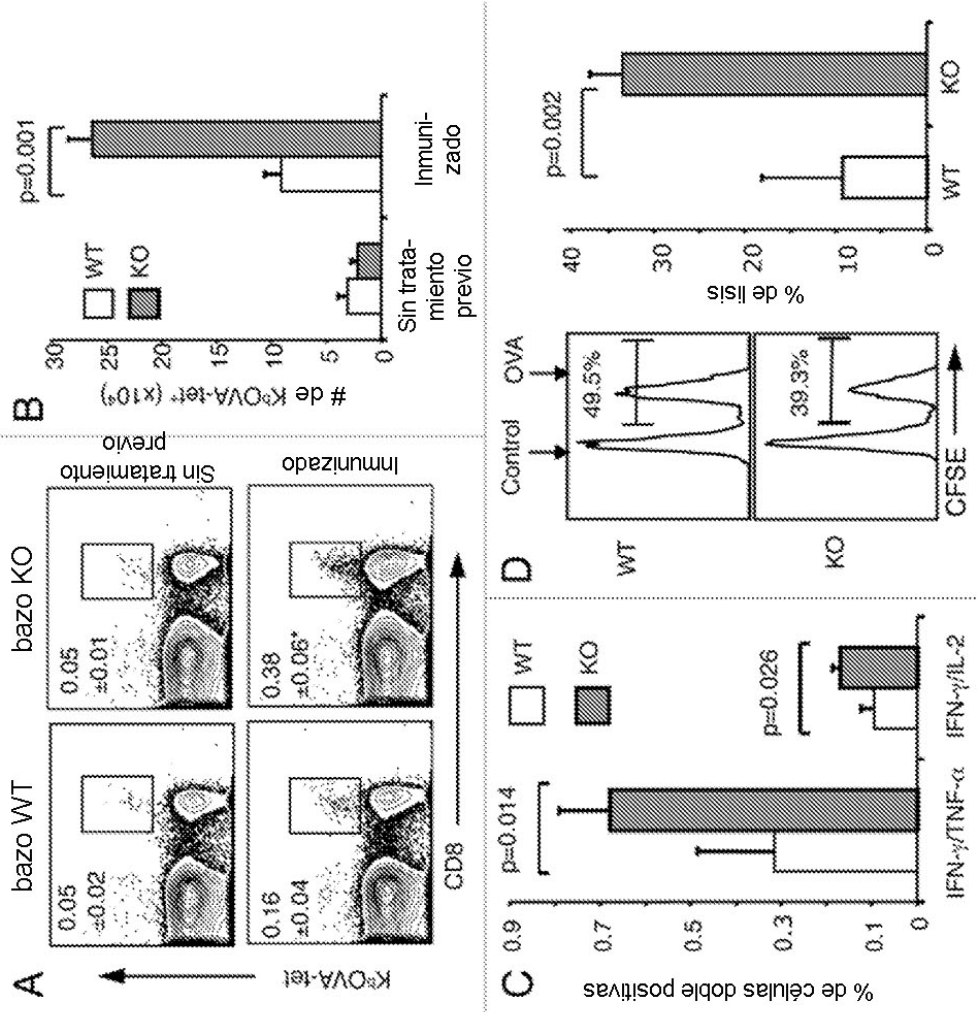


FIGURA 3

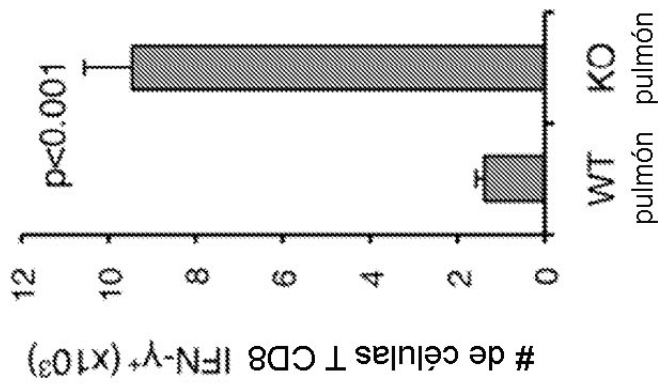
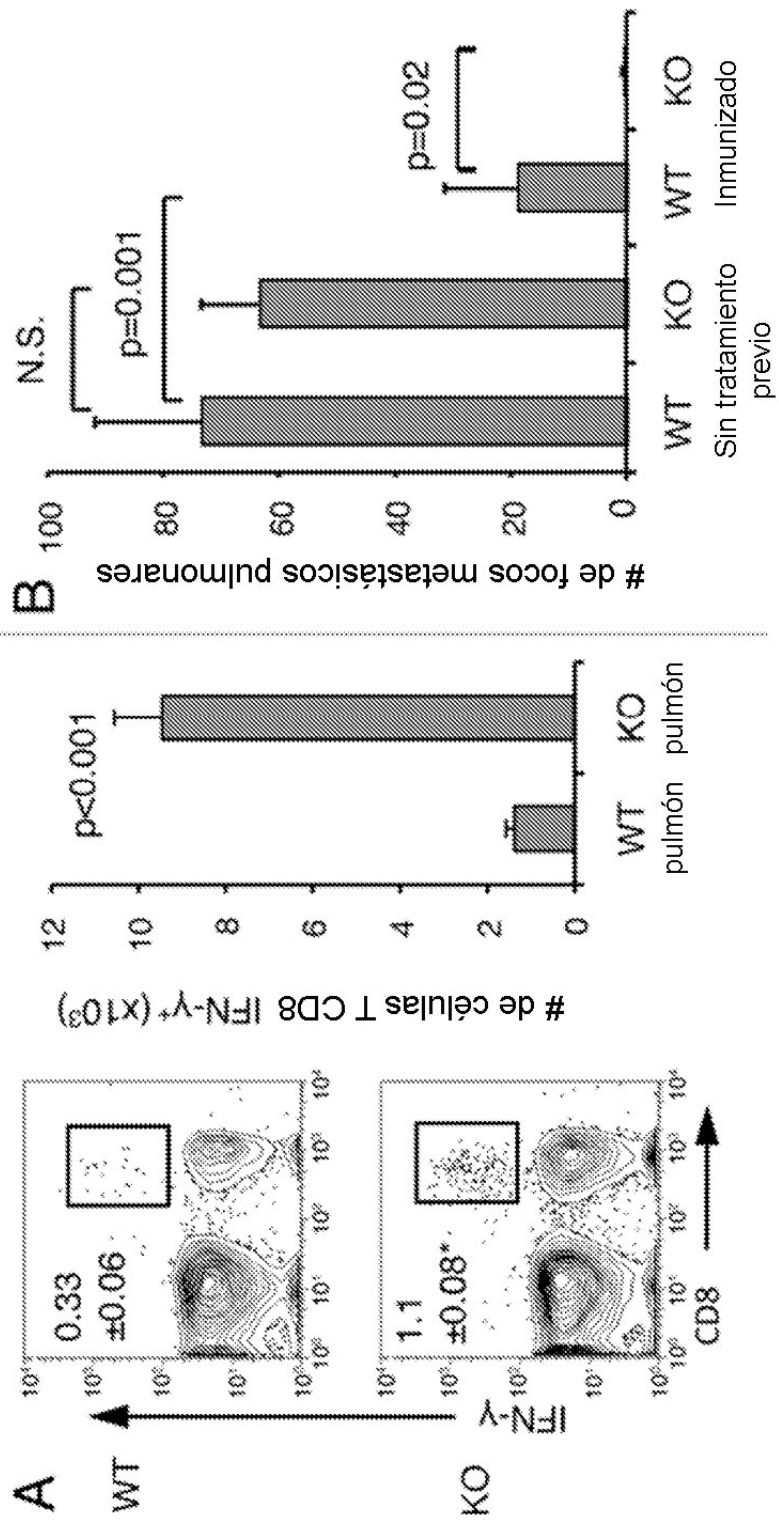
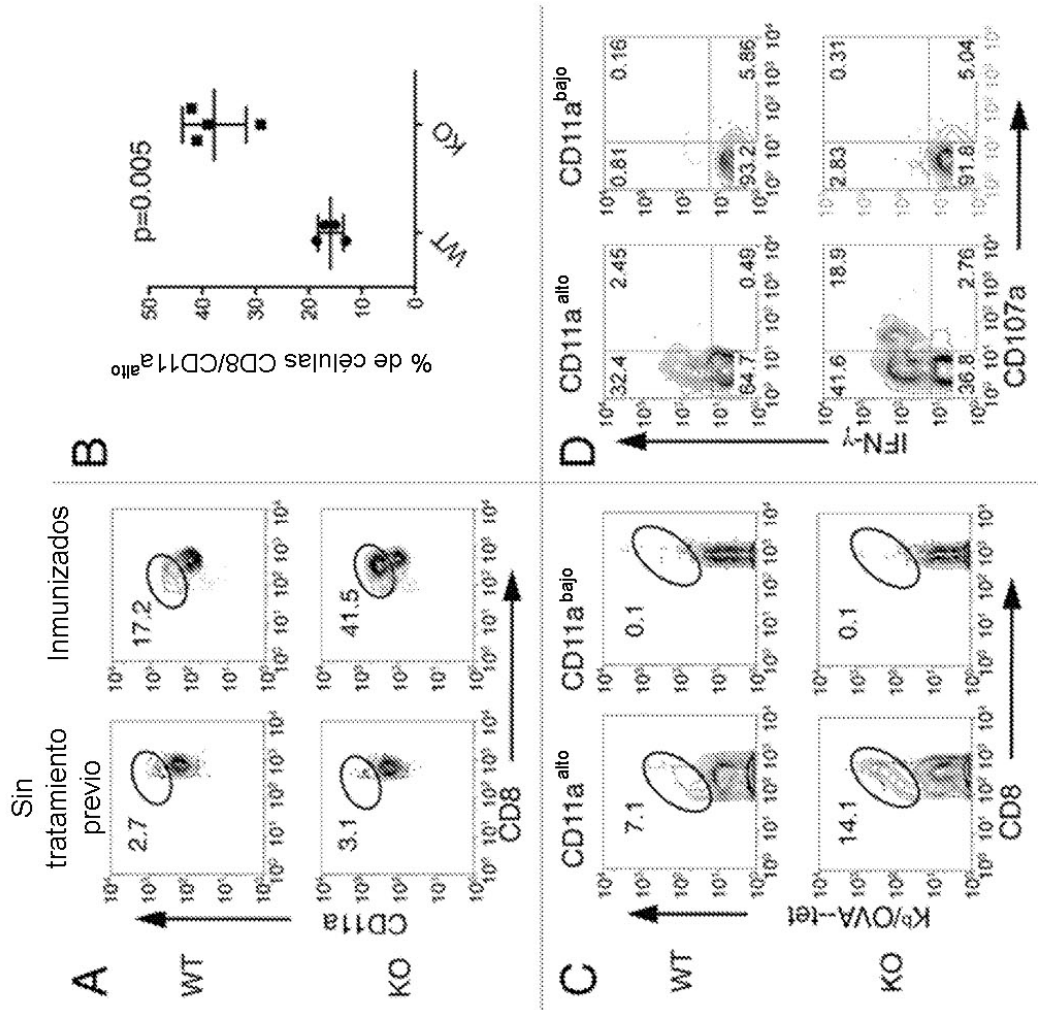


FIGURA 4



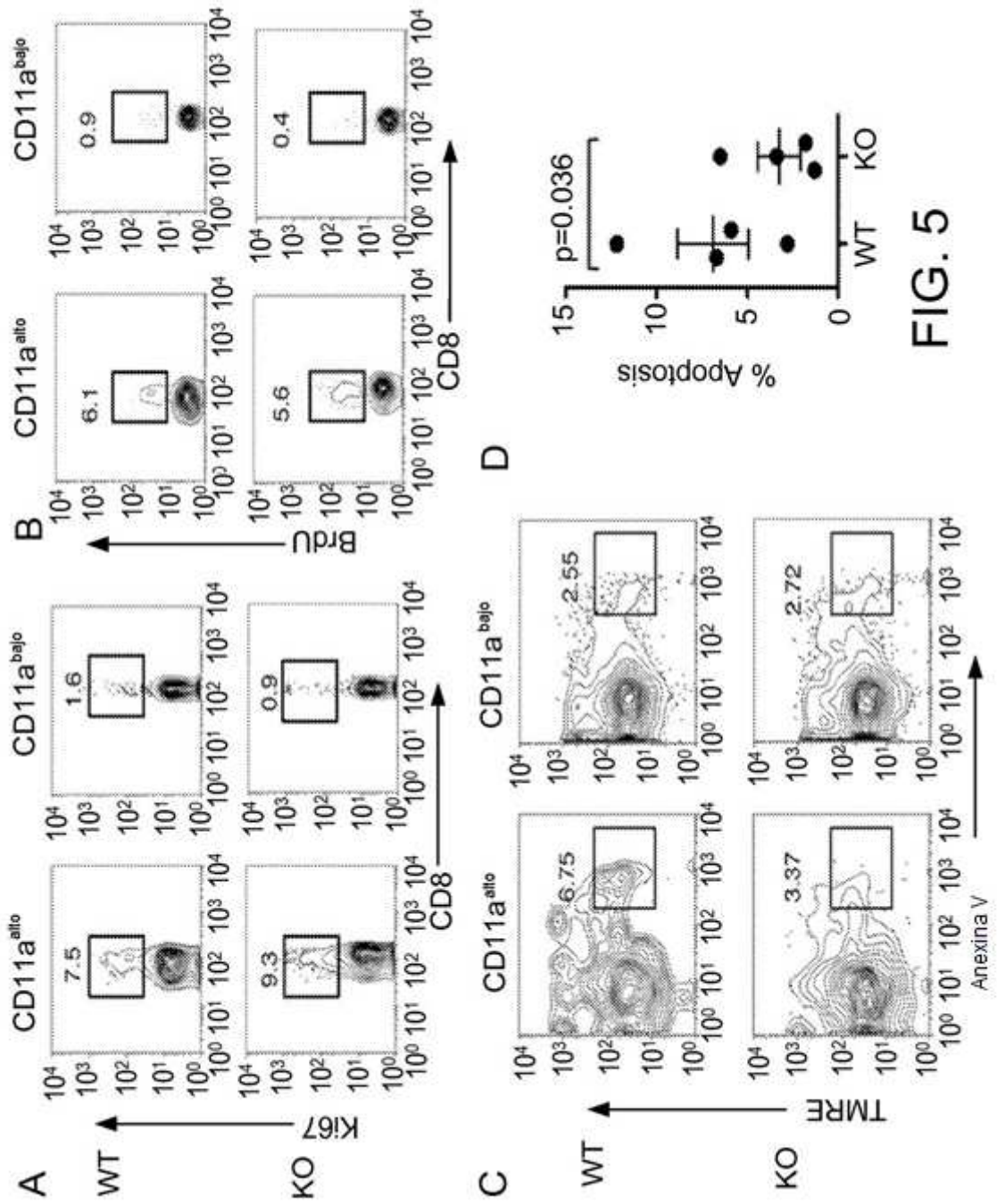


FIG. 5

FIGURA 6

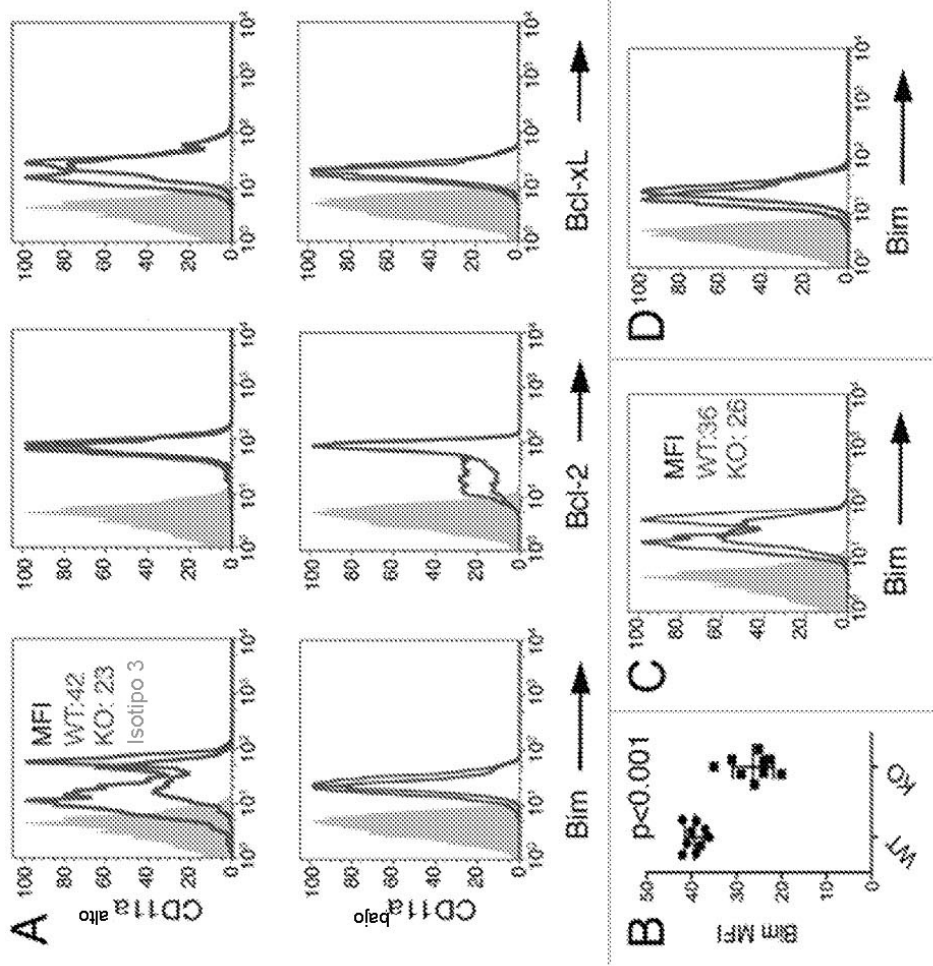


FIGURA 7

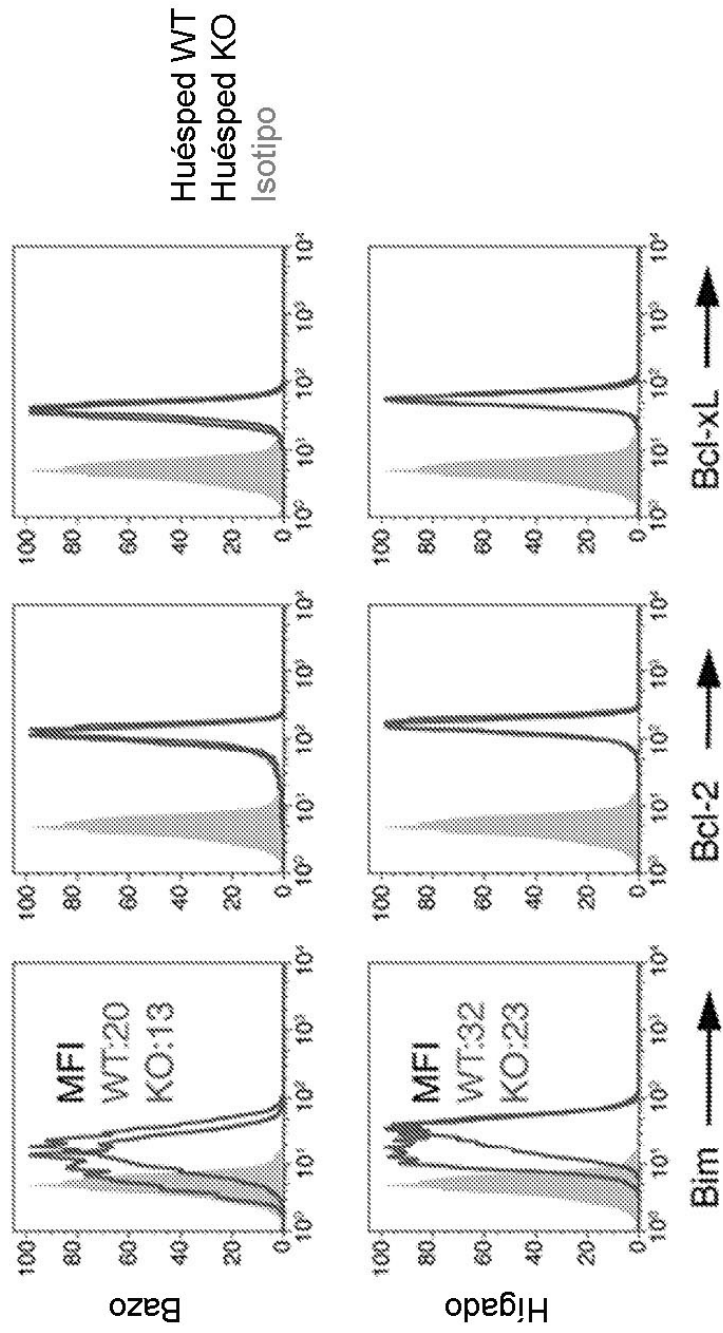


FIGURA 8

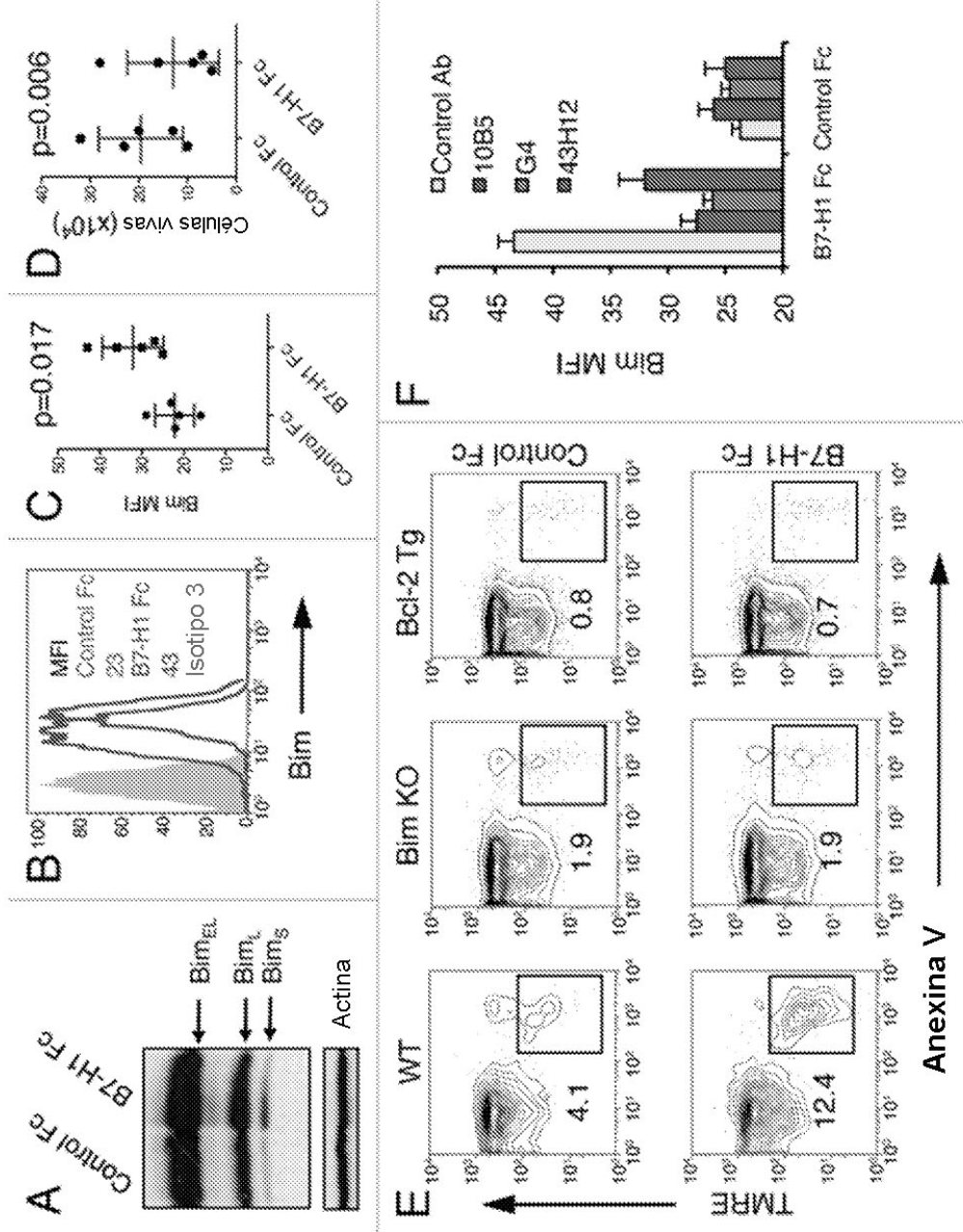


FIGURA 9

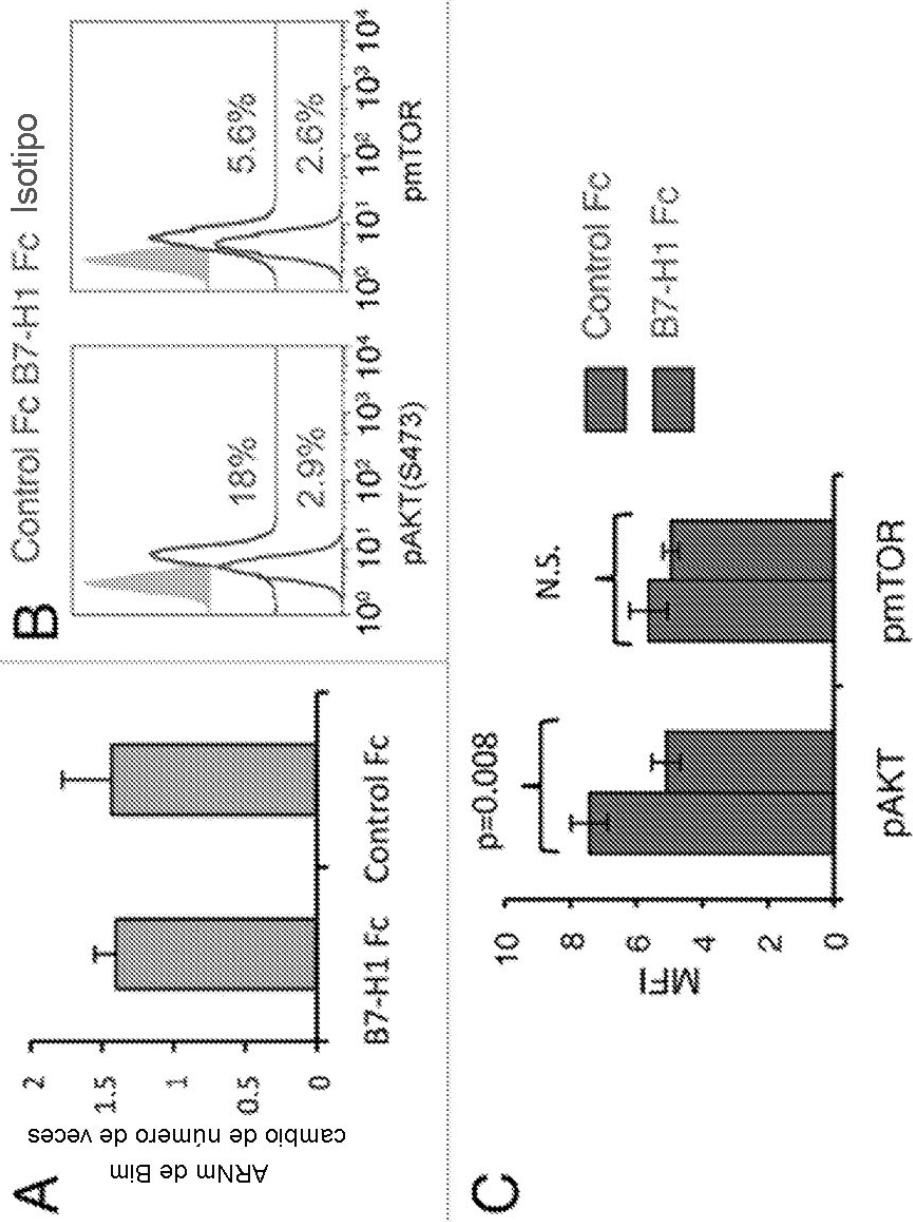


FIGURA 10

```

1 atgaggatat ttgctgtcct tatattcatg acctactggc atttgctgaa cgcatttact
61 gtcacggttc ccaaggacct atatgtgga gagtatggta gcaatatgac aattgaatgc
121 aaattcccag tagaaaaaca ttattcaatt tgtgcatgga gaggaagacc tgaaggttca gcatagtagc
181 gataagaaca ttattcaatt gggcccggct gttgaaggac cagctctccc tgggaaatgc tgcacttcag
241 tacagacaga gggcccggct gttgaaggac cagctctccc tgggaaatgc tgcacttcag
301 atcacagatg tgaattgca ggatgcaggg gtgtaccgct gcatgatcag ctatggtggt
361 gccgactaca agcgaattac tgtgaaagtc aatgccccat acaacaaaat caaccaaaga
421 attttggttg tggatccagt cacctctgaa catgaaactga catgtcaggc tgagggctac
481 cccaaggccg aagtcacatcg gacaagcagt gaccatcaag tcctgagtagg taagaccacc
541 accaccaatt ccaagagaga ggagaagcct ttcaatgtga ccagcacact gagaatcaac
601 acaacaacta atgagatctt ctactgcaat tttaggagat tagatcctga ggaataccat
661 acagctgaat tggatcatccc agaactacct ctggcacatc ctccaaatga aggactcac
721 ttggtaatc tgggagccat cttattatgc cttggtgtag cactgacatt catcttccgt
781 ttaagaaaaag ggagaatgat ggatgtgaaa aaatgtggca tccaagatata aactcaaaag
841 aagcaaaagt atacacattt ggaggagacg taa (SEQ ID NO:1)

1 MRIFAVFIFM TYWHLNNAFT VTVPKDLVYV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME
61 DKNI IQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG
121 ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT
181 TTNSKREEKL FNVSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEIVPEL P LAHPNERH
241 LVILGAILLC LGVALTFIFR LRKGRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET (SEQ ID NO:2)

```

FIGURA 11

```

1  gcctgagcag  tggagaaagg  ggcactctgg  tggggctgct  ccaggcatgc  agatcccaca
61  ggcgccctgg  ccagtcgtct  gggcggtgct  acaactgggc  tggcggccag  gatggttctt
121  agactcccca  gacaggccct  ggaaccccc  caccttctcc  ccagccctgc  tcgtggtgac
181  cgaaggggac  aacgccacct  tcacctgcag  ctctccaac  acatcggaga  gcttcgtgct
241  aaactggtac  cgcattgagc  ccagcaacca  gacggacaag  ctggccgctt  tccccgagga
301  ccgagccag  cccggccagg  actgcccgtt  ccgtgtcaca  caactgcccc  acgggctgga
361  cttccacatg  agcgtggtca  gggcccggcg  caatgacagc  ggcacctacc  tctgtggggc
421  catctccctg  gcccccaagg  cgcagatcaa  agagagcctg  cgggcagagc  tcaggggtgac
481  agagagaagg  gcagaaagtc  ccacagcccc  cccagcccc  tcacccagcc  cagccggcca
541  gttccaaaac  ctggtggttg  gtgtcgtggg  cggcctgctg  ggcagcctgg  tgctgctagt
601  ctgggtcctg  gccgtcatct  gctcccgggc  cgcacgaggg  acaataggag  ccaggcgcac
661  cggccagccc  ctgaaggagg  acccctcagc  cgtgcctgtg  ttctctgtgg  actatgggga
721  gctggatttc  cagtggcgag  agaagacccc  ggagcccccc  gtgcccctgtg  tccttgagca
781  gacggagtat  gccaccattg  tctttcctag  cggaatgggc  acctcatccc  ccgccccgag
841  gggctcagcc  gacggccctc  ggagtgcccc  gccactgagg  cctgaggatg  gacactgctc
901  ttggccccctc  tgaccggcctt  ccttggccac  cagtgttctg  cagaccct (SEQ ID NO:3)

1  MQIPQAPWPV  VMAVLQLGWR  PGWFLDSPDR  PWNPTFSPA  LLVTEGDNA  TFTCSFSNTS
61  ESFVLNWMYR  SPSNQTDKLA  AFPEDRSQPG  QDCRFRVTQL  PNGRDFHMSV  VRARRNDSGT
121  YLCGAIISLAP  KAQIKESLRA  ELRVERRAE  VPTAHPSPSP  RPAGQFQTLV  VGVVGGLLGS
181  LVLLVWVLAV  ICSRAARGTI  GARRTGQPLK  EDPSAVPVFS  VDYGELDFQW  REKTPEPPVP
241  CVPEQTEYAT  IVFPSGMGTS  SPARRGSADG  PRSAQPLRPE  DGHCSWPL (SEQ ID NO:4)

```


FIGURA 12A

1 gacaagtact gagtgaact aaaccctctg taaagtaaca gaagttagaa ggggaaatgt cgcctctctg aagattacc
 81 aaagaaaaag tgatttgta gactgtata gactgtaaga agagaacatc tcagaagtgg agtcttacc tgaatcaaa
 161 ggatttaaaag aaaaagtga attttcttc agcaagctgt gaaactaaat ccacaacctt tggagaccca ggaacacct
 241 ccaatctctg tgtgtttgt aaacatcact ggaggttctt ctacgtgagc aattggattg tcatcagccc tgcctgtttt
 321 gcacctggga agtgcctgg tcttacttgg gtccaaattg ttggctttca cttttgaccc taagcatctg aagccatggg
 401 ccacacagg aggcaggga catcaccatc caagtgtcca tacctcaatt tctttcagct ctgtgtctg gctgtcttt
 481 ctcaattctg ttcaggtgtt atccactga ccaaggagt gaaagaagt gcaacgctgt cctgtgtca caatgtttct
 561 gttgaaagc tggcacaac tgcctctac tggcaaaagg agaagaaat ggtgctgact atgatgtctg gggacatgaa
 641 tataaggccc gagtacaaga accggacct ctttgatata actaataacc tctccattgt gatctggct ctgcccacat
 721 ctgacaggg cacatacag tgtgtgttct tgaagtatga aaaagcgt tccaagcggg aacacctggc tgaagtgacg
 801 ttatcagtca aagctgactt ccctacacct agtatactg actttgaaat tccaacttct aatattagaa ggataattg
 881 ctcaacctct ggaggtttc cagagcctca cctctcctgg ttggaaaatg gagaagaatt aaatggccat acacaaacg
 961 tttcccaaga tctgaaact gagctctatg ctgttagcag caaactggat ttcaatatga caaccaacca cagcttcatg
 1041 tgtctcatca agtatggaca ttaagagtg aatcagacct tcaactggaa tacaaccaag caagagcatt ttcctgataa
 1121 cctgctccca tctgggcca ttaccttaat ctcagtaaat ggaattttg tgatatgctg cctgacctac tgccttgccc
 1201 caagatcag agagagaag agaatgaga gattggaag gaaagtgtg cgcctgtat aacagtgtcc gcagaagcaa
 1281 ggggtgaaa agatctgaag gtcccacctc catttgaat tgacctctc tgggaacttc ctccatgga caagattacc
 1361 ccacctggc cttacgtat ctgctcttag gtgcttcttc acttcagttg ctttgcagga agtgtctaga ggaatatggt
 1441 gggcacagaa gtgctctgg tgaccttgat caaggtgttt tgaatgcag aattcttgag tcttggaaagg gacttttag
 1521 aataccagtg ttattaaatg caaaggcact gggcccagg gagggtgccc gaattataaa gcccagcggc agaaccaca
 1601 tttcctaact ctggtgctct tccccttat cagtttgact gtggcctgtt aactggtata tacatatata tgtcaggcaa
 1681 agtgcctgctg gaagtagaat ttgtccaata acaggccaac ttcagagact atctgatttc ctaatgtcag agtagaagat
 1761 tttatgctgc tgtttacaaa agcccaatgt aatgcatagg aagtatggca tgaacatctt tagggagacta atggaaat
 1841 tattggtgtt taccagtat tccattttt tccattgtt ctctattgct gctctctcac tcccctatga ggtacagcag
 1921 aaaggagaac tatccaaaac taatttctc tgacatgtaa gacgaatgat ttaggtactg caaagcagta gtcaaggagg
 2001 aaaggatag tccaaagact taactggttc atattggact gataatctct ttaaatgctt ttaagtgtt ttgacctcat
 2081 ttgtaaaata ttatgagaa agttctcatt taaaatgaga tctgttttta cagtgtatgt actaagcagt aagctatctt
 2161 caaatgtcta agtagtaac ttccatagg gctccttag atccctaaga tggcttttct tctctggat tctctgggtc
 2241 tctgacatc agcagagaac tggaaagaca tagccaactg ttgttcactg tactcatgac tcttctctt aacctgctt
 2321 tccacaattc actagaccag aagtggacgc aacttaagct ggataatca cattatcatc tgaaaatctg gacttgaaca
 2401 gcaaaagaag acaacatttc tcaaatgac atctcatggc agctaaagcca catggctggg atttaaagcc ttttagacca
 2481 gccatggtt ttactacct cactatgctg ctccacaac ctgctcctg tgtaaaacta tattctcagt gtagggcaga
 2561 gaggtctaac accaataaa ggtactagca gtgttctccg tattgacagg aataactaac tcaataatc tttcttttc
 2641 catttagtaa cagttgtgat gactatgttt ctattctaa taattcctgt attctacagc agatactttg tcagcaatac
 2721 taagggaaga acaaaagtgt aacctttct ttaataa (SEQ ID NO:5)

FIGURA 12B

1 MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELA
 61 QTRIWQKEKQVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYESCVVLK
 121 YEKDAFKREHLAETLSVKA DFPTPSISDFEIPTSNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE
 181 ELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDNFNMTT NHSFMCLIKYGHLRVNQTFN WNTTKQEHFP
 241 DNLPSWAITLISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO: 6)

FIGURA 13

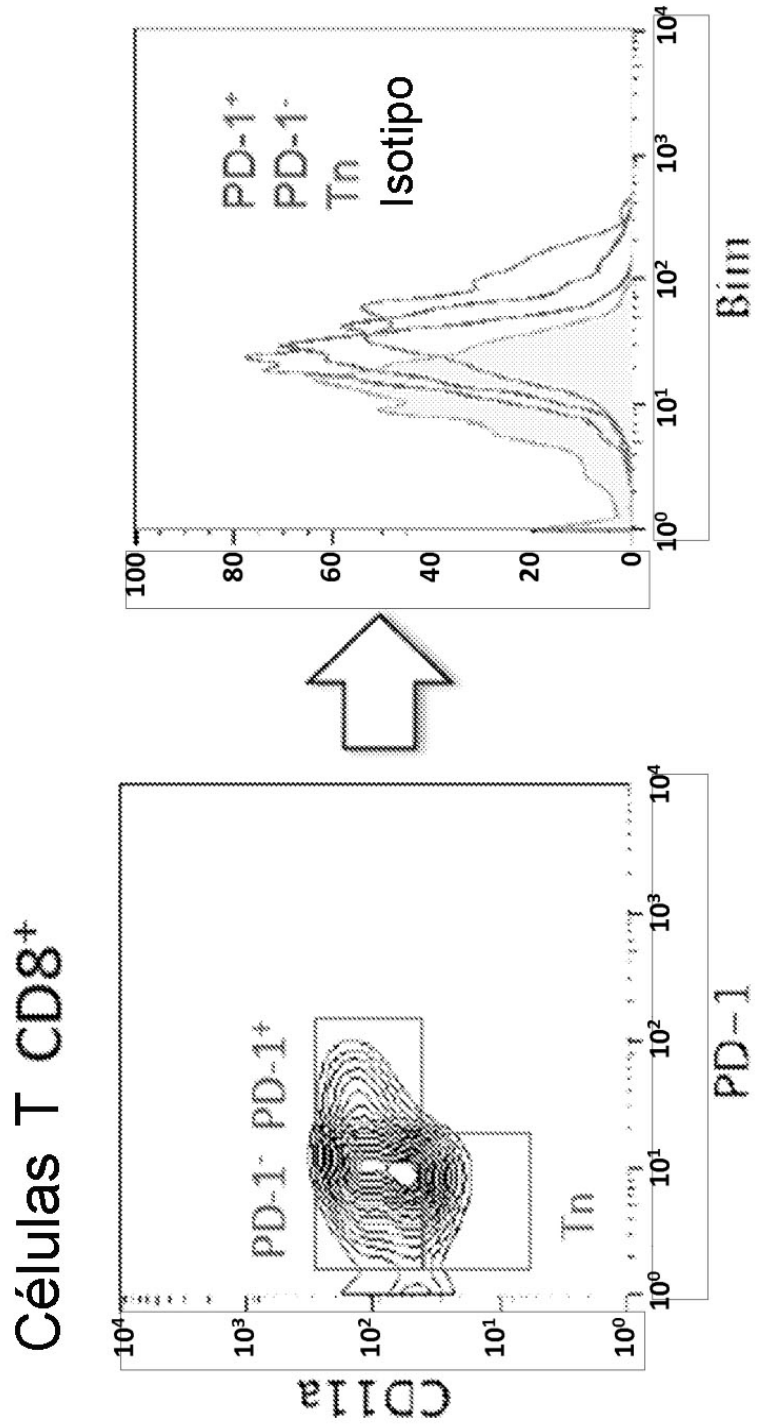


FIGURA 14

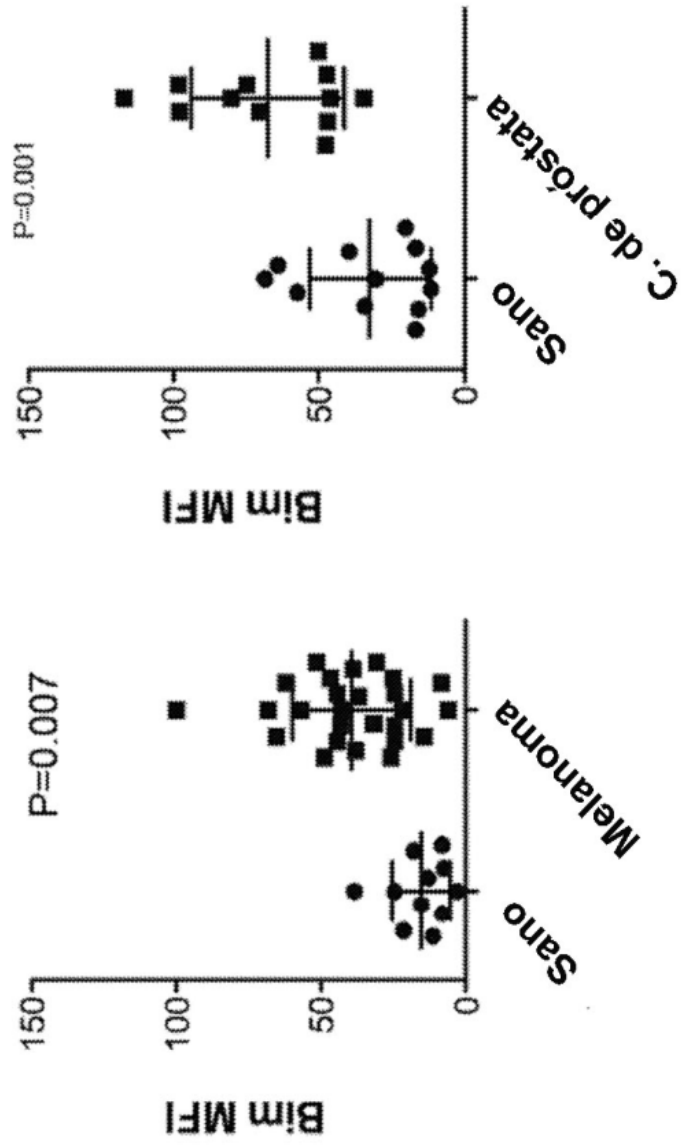


FIGURA 15

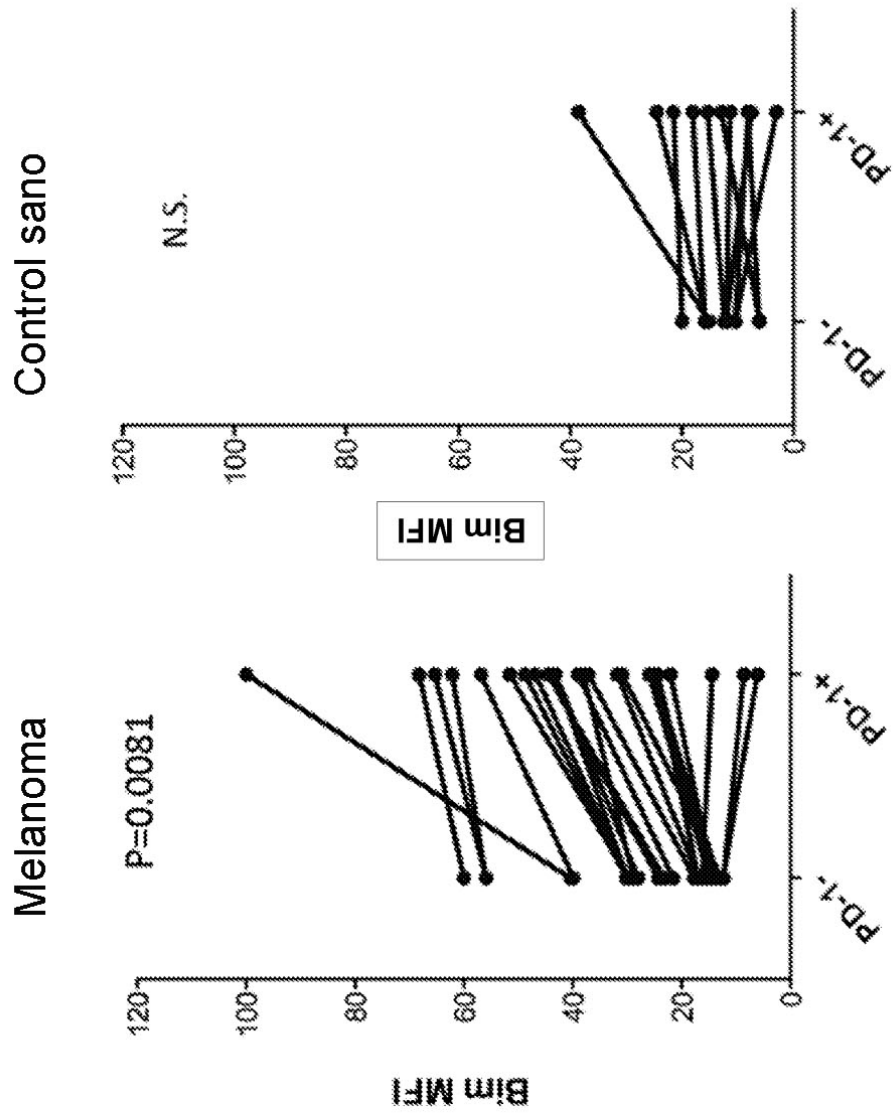


FIGURA 16

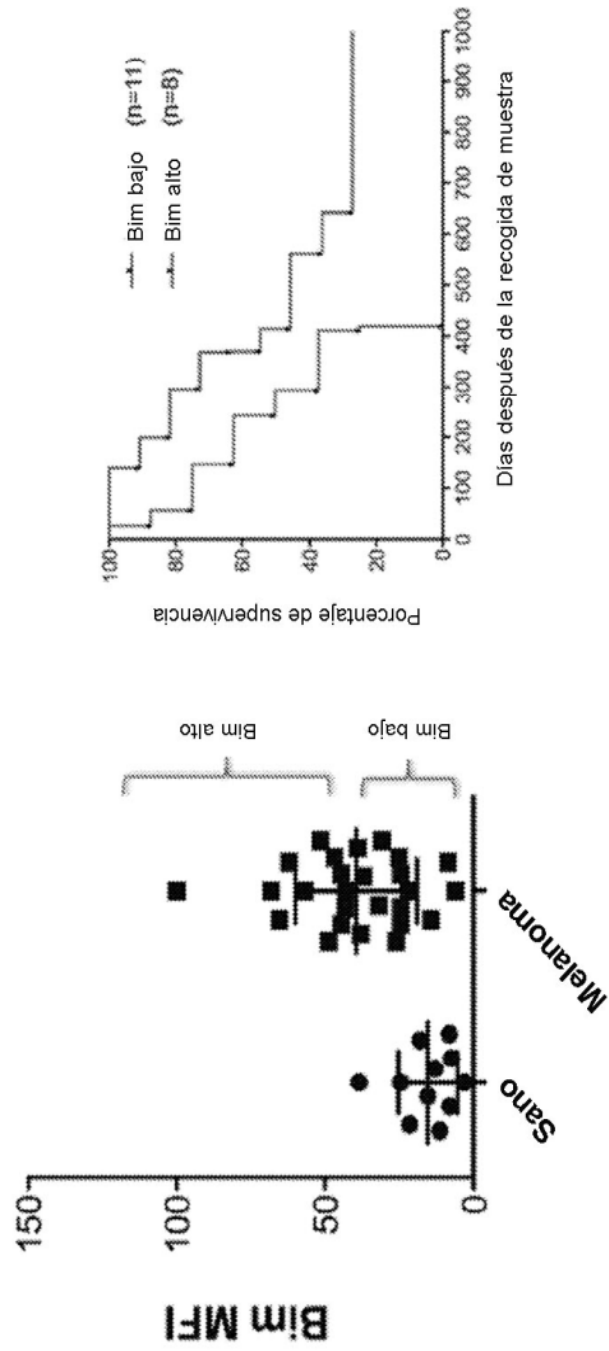


FIGURA 17A

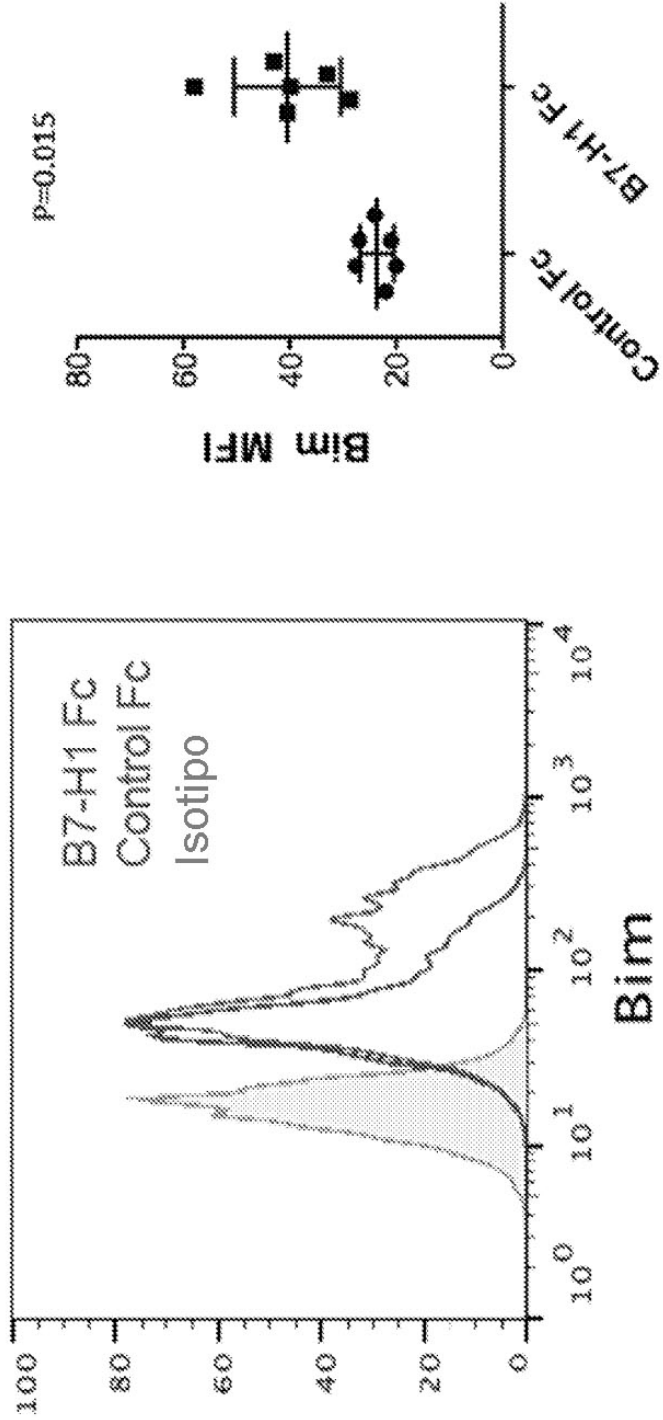


FIGURA 17B

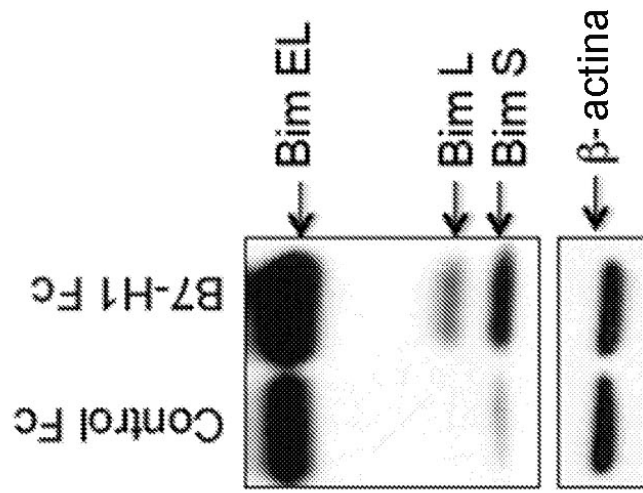


FIGURA 18

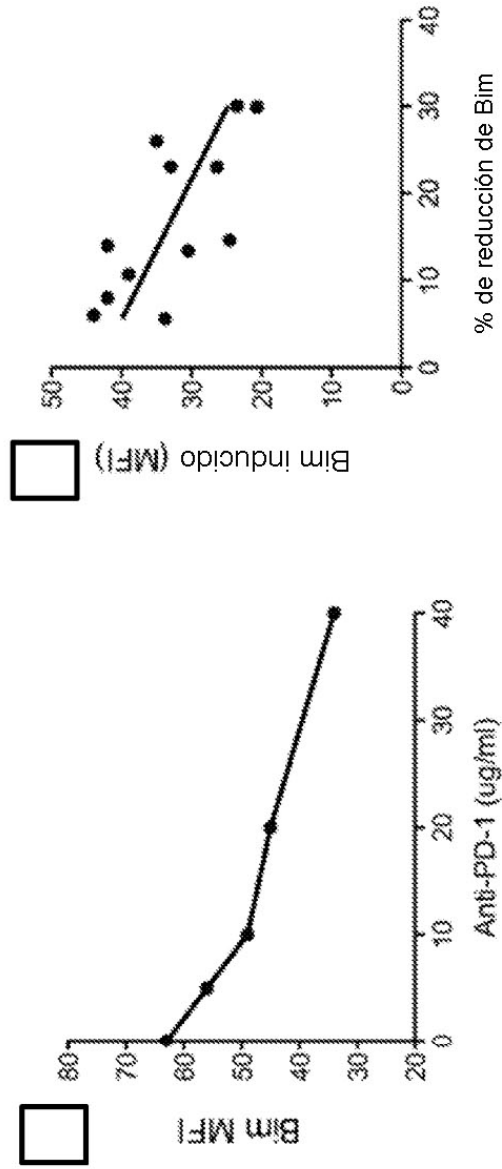


FIGURA 19

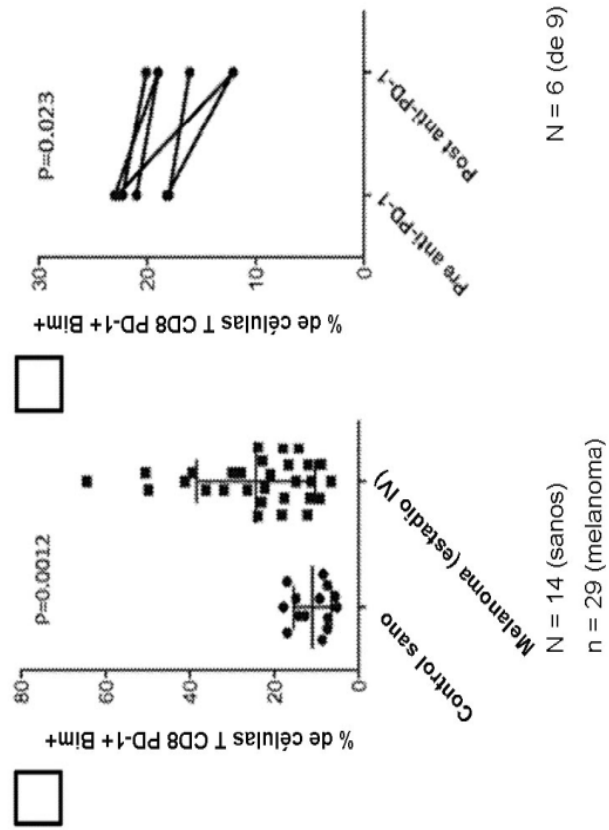


FIGURA 20

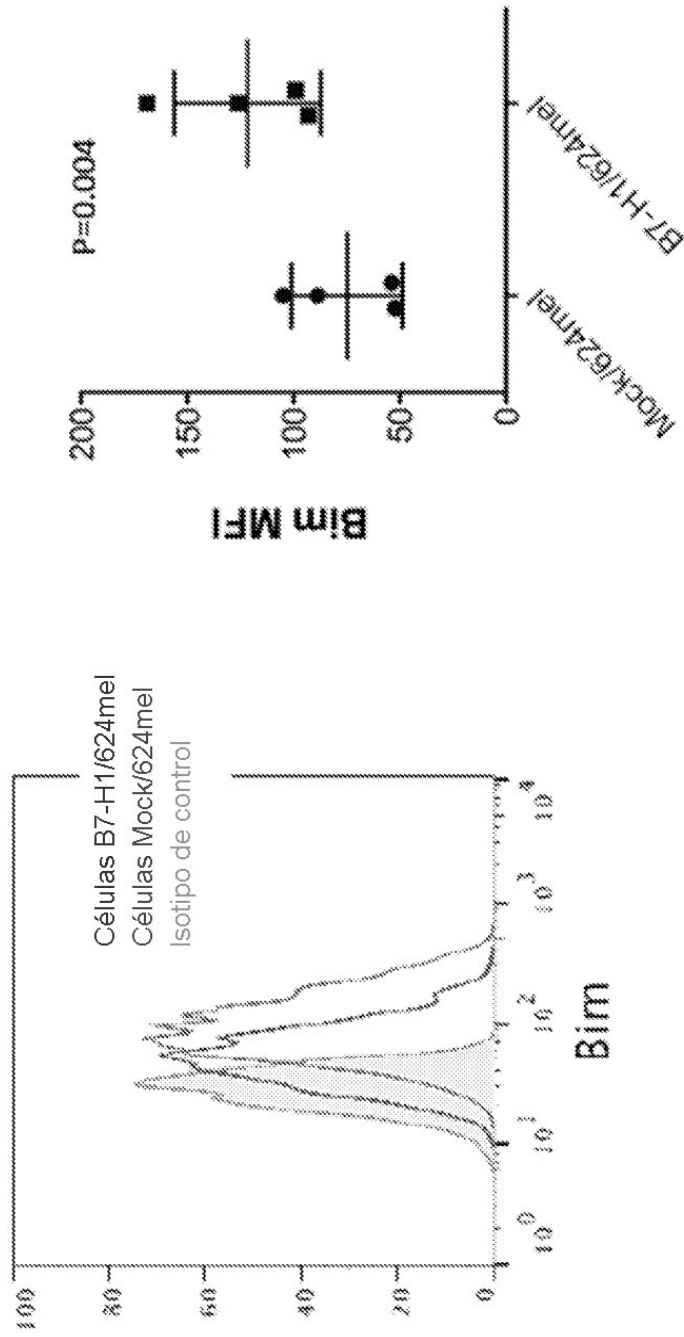


FIGURA 21

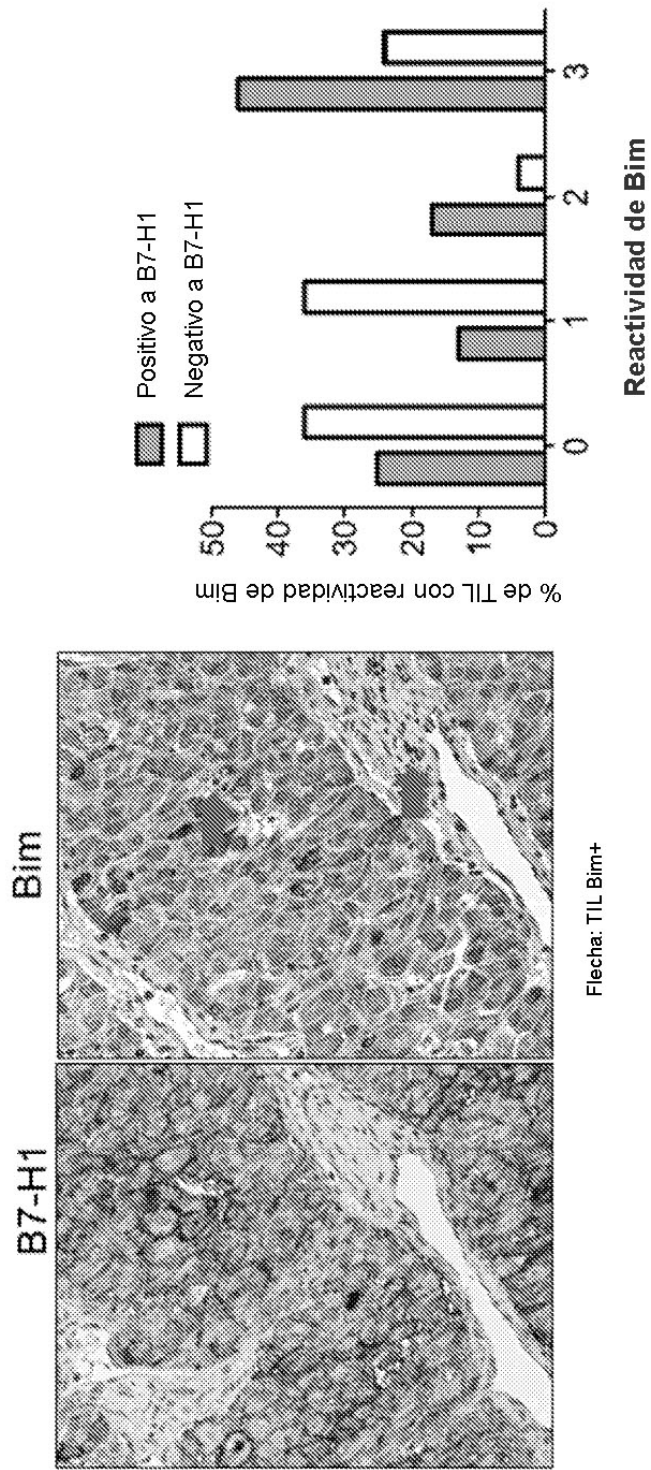


FIGURA 22

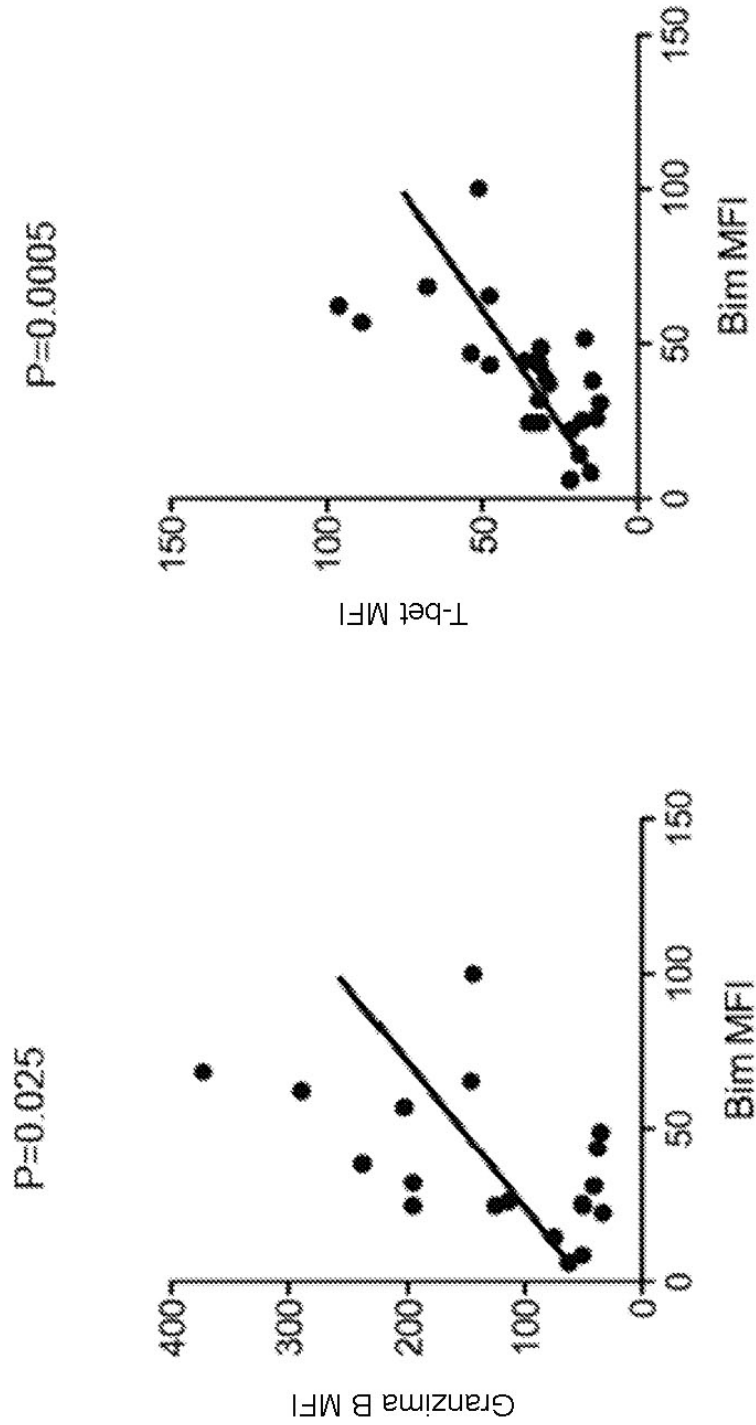


FIGURA 23

