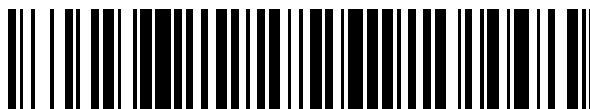


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 168**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61N 5/10** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.01.2013 PCT/CN2013/070342**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014 WO14107873**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2013 E 13870762 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2944323**

54 Título: **Agentes para tratar tumores, uso y método de los mismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.07.2019**

73 Titular/es:

**DINGFU BIOTARGET CO., LTD (100.0%)**  
**Building A6, Biobay, 218 Xinghu Street, Suzhou**  
**Industrial Park**  
**Suzhou, Jiangsu 215125, CN**

72 Inventor/es:

**FU, YANGXIN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

### Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 721 168 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

Agentes para tratar tumores, uso y método de los mismos

## 5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere al campo de la biomedicina, específicamente, se refiere a agentes para tratar y/o prevenir la resistencia de las células a la radioterapia (RT), el uso y el método relevante del mismo.

## 10 Antecedentes de la invención

El mecanismo de radioterapia se basa en producir daño letal al ADN de las células tumorales o al mesénquima asociado al tumor. Los pacientes con cáncer reciben generalmente una dosificación baja (1,5-3 Gy) de RT (en unas pocas veces) diariamente durante varias semanas, que se combina a menudo con quimioterapia. Tradicionalmente, la RT se considera como inmunosupresora<sup>20</sup>. Aunque algunos estudios investigaron los potenciales efectos inmunorreguladores de la RT local en tumores, hubo informes contradictorios en cuanto a si estas respuestas promueven o interfieren la remisión del tumor<sup>21-24</sup>.

Recientes estudios del inventor muestran que la RT ablativa local puede inducir respuestas inmunitarias que conducen a la remisión del tumor<sup>1,2</sup>. Sin embargo, la recidiva del tumor tras la RT es un problema clínico común tras la respuesta inicial, es decir, existen tumores y/o células tumorales resistentes a la RT. En la presente divulgación, el inventor demuestra que un anticuerpo bloqueante de B7-H1 puede actuar sinérgicamente con la RT, conduciendo el correspondiente uso a la remisión de tumores, particularmente de los tumores resistentes a la RT.

La radiación puede producir respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Las células tumorales expuestas a radiación son capaces de secretar señales de peligro (por ejemplo, HMGB-1), que interfieren con el TLR4 expresado en células dendríticas y posteriormente promueven la presentación cruzada de antígenos<sup>3</sup>. Además, resultados previos del inventor muestran que el interferón de tipo I estimulado por la radiación puede potenciar la señalización de peligro y aumentar la sensibilización cruzada de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> <sup>2</sup>. Posteriormente, las células dendríticas y los macrófagos pueden ingerir células tumorales apoptóticas y migrar a los ganglios linfáticos y activar los linfocitos T<sup>4</sup>. Durante estos procesos, las moléculas coestimuladoras aumentan las respuestas de los linfocitos T y dan como resultado una contracción del tumor. En contraste, las moléculas coinhibidoras suprimen las respuestas de los linfocitos T y contribuyen a la evasión del tumor<sup>5</sup>. Sin embargo, no está claro que las moléculas de señalización simultánea (por ejemplo, moléculas coinhibidoras) estén reguladas en exceso e inhiban la inmunidad de los linfocitos T tras la RT.

La ruta B7-H1/PD1 desempeña un papel en la inhibición inmunitaria del tumor.

B7-H1 es una molécula coinhibidora y un miembro de la familia B7, y se puede expresar de forma inducible en células tumorales, células dendríticas y macrófagos<sup>6</sup>. B7-H1 asociada a tumor está implicada en la inducción de la apoptosis de los linfocitos T reactivos a tumores y el deterioro de la citotoxicidad de los CTL<sup>7</sup>. Además, se considera que B7-H1 expresada en células dendríticas inhibe la proliferación de linfocitos T e impide que los linfocitos T produzcan citocinas<sup>8</sup>. PD-1 es un receptor inhibido, expresado de forma inducible en linfocitos T activados, y puede promover la anergia, la apoptosis y el agotamiento de los linfocitos T<sup>9</sup>. La señalización de PD-1 se considera un regulador del agotamiento de linfocitos T específicos de antígenos en infecciones crónicas (por ejemplo, LCMV en ratones y VIH y VHC en seres humanos)<sup>9-12</sup>. El sello distintivo de los linfocitos T agotados incluye un deterioro de su proliferación y de su función efectora<sup>13</sup>. Algunas referencias han implicado que la ruta B7-H1/PD1 contribuye al agotamiento de los linfocitos T en cánceres<sup>14-16</sup>. El bloqueo de la señalización de B7-H1/PD1 ha mostrado ser capaz de restablecer las respuestas de los linfocitos T funcionales y el retraso del crecimiento tumoral<sup>14, 16, 17</sup>. Como se ilustra en el documento WO 2012/177624 A2, que describe el uso combinado de un anticuerpo contra PD-1 con radioterapia, estas evidencias sugieren que el bloqueo de la señalización de B7-H1/PD-1 puede ser un importante valor para el diseño de la administración combinada de agentes y radioterapia.

## Sumario de la invención

Los estudios del inventor han mostrado que un régimen recientemente desarrollado, es decir, radioterapia local de alta dosificación, puede reducir la masa tumoral y aumentar la inmunidad antitumoral. Sin embargo, se produce a menudo la recidiva del tumor, es decir, existen células o tejidos tumorales resistentes a la RT tras la radioterapia. Estas células o tejidos tumorales pueden evolucionar además a tumores o tener el potencial para evolucionar a tumores. El presente inventor ha descubierto de forma sorprendente que la RT puede inducir la expresión de B7-H1 en tumores y la expresión de PD-1 en linfocitos T, y que la expresión de B7-H1 y PD-1 puede inhibir adicionalmente la inmunidad antitumoral y producir por tanto la recidiva del tumor. Sin embargo, se puede reducir la inmunosupresión inducida por RT (es decir, se puede reducir la resistencia de las células tumorales a la RT) y se puede potenciar la inmunidad antitumoral de los hospedadores utilizando una inmunoterapia y/o un producto que bloquee la señalización de B7-H1/PD1 tras la RT. Por tanto, la solución seleccionada en la presente divulgación presenta una novedosa estrategia/régimen, es decir, radioterapia seguida por la administración puntual de una inmunoterapia y/o un producto que bloquee la señalización de B7-H1/PD1 (es decir, un anticuerpo anti B7-H1) que puede potenciar las actividades

terapéuticas antitumorales y conseguir efectos terapéuticos beneficiosos para los pacientes con cáncer.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo bloqueante de B7-H1 para su uso en un método de tratamiento del cáncer en combinación con un tratamiento con radiación, en donde el anticuerpo bloqueante de B7-H1 se administra tras el tratamiento con radiación, y en donde dicho anticuerpo bloqueante de B7-H1 es un anticuerpo anti B7-H1.

En una realización específica, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal bloqueante de B7-H1, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal 10F.9G2 comercialmente disponible de Bio-X cell (West Lebanon, NH03784, EE.UU.).

En algunas realizaciones de la presente divulgación, la radioterapia es una irradiación de rayos X única o múltiple, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más irradiaciones de rayos X. Preferentemente, la dosificación de rayos X utilizada en cada irradiación puede ser de 5-20 Gy, tal como de 5-8, 5-12 o 5-15 Gy. En particular, cuando se administran múltiples irradiaciones de rayos X, el intervalo entre irradiaciones puede ser de una a varias horas (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o hasta 24 horas), uno a varios días (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 días, etc.).

En otras realizaciones, el tumor puede ser, aunque no de forma limitativa, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de colon o melanoma y/o las células de los mismos, por ejemplo, células de cáncer de mama (tales como células TUBO) o una línea de células tumorales Myc-Cap.

En determinadas realizaciones, la composición comprende además un compuesto adicional que se puede usar como agente quimioterapéutico. En particular, el compuesto adicional puede incluir, aunque no de forma limitativa, adriamicina, ciclofosfamida y Taxanos [paclitaxel (Taxol) y docetaxel (Taxotere)], capecitabina (Xeloda), gemcitabina (Gemzar), vinorelbina (Navelbine), tamoxifeno, inhibidores de la aromatasa (Arimidex, Femara y Aromasin), 5-FU con ácido folínico, irinotecan (Camptosar), oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, estramustina, mitoxantrona (Novantrone), prednisona, vincristina (Oncovin), etc.

En otras realizaciones, el anticuerpo puede proporcionarse en forma de una composición adecuada para su administración directa en los sitios del tumor o adecuada para la administración sistémica.

En algunas realizaciones, el anticuerpo bloqueante de B7-H1 para su uso en la presente divulgación se administra en un plazo de varias horas (por ejemplo, 10-48 horas), varios días (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 días) o varias semanas (por ejemplo, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 o 1-2 semanas) tras la radioterapia o el tratamiento con radiación. Cuando se desee, el anticuerpo puede administrarse múltiples veces, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6 o más veces, y el intervalo de tiempo entre dos administraciones puede ser de varias horas, un día, varios días (por ejemplo, 2-30, 2-25, 2-20, 2-15, 2-14, 2-13, 2-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4 o 2-3 días).

Aún en otras realizaciones, el anticuerpo puede administrarse por vía sistémica o simplemente en un sitio del tumor.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo bloqueante de B7-H1 que se va a administrar puede comprender además un compuesto adicional que se puede usar como un agente quimioterapéutico. En particular, el compuesto adicional puede incluir, aunque no de forma limitativa, adriamicina, ciclofosfamida y Taxanos [paclitaxel (Taxol) y docetaxel (Taxotere)], capecitabina (Xeloda), gemcitabina (Gemzar), vinorelbina (Navelbine), tamoxifeno, inhibidores de la aromatasa (Arimidex, Femara, Aromasin), 5-FU con ácido folínico, irinotecan (Camptosar), oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, estramustina, mitoxantrona (Novantrone), prednisona, vincristina (Oncovin), etc. Alternativamente, el método como se describe en la presente divulgación se puede usar en combinación con un método adicional para tratar y/o prevenir un tumor (por ejemplo, cirugía, quimioterapia o radioterapia).

## Breve descripción de los dibujos

**FIG. 1:** La expresión de B7-H1 y PD-1 en el microentorno tumoral tras la radiación.

5x10<sup>5</sup> células TUBO se inyectaron por vía subcutánea en los flancos de ratones Balb/c. En el día 14, los ratones se irradiaron localmente con 15 Grays (Gy). En el día 28, los tumores se extrajeron y se digirieron para obtener una suspensión de células individuales para tinción. (A) La expresión de B7-H1 en células tumorales se vio afectada por la radiación; (B) las expresiones de B7-H1 en CD y macrófagos cambiaron tras la radiación; (C) PD-1 se expresó de forma elevada en linfocitos T irradiados y sin irradiar.

**FIG. 2:** La RT produce regulación en exceso de B7-H1 en la línea celular Myc-Cap. A. La expresión de B7-H1 tras la RT. Las células tumorales (línea de células tumorales Myc-Cap) se trataron con 0, 4 y 8 Gy de irradiación. A continuación, las células tumorales irradiadas se cultivaron durante 24 o 48 horas. Después de 24 o 48 horas, se recogieron las células, y a continuación se tiñeron con un anticuerpo monoclonal anti B7-H1. Las células Myc-Cap no irradiadas se usaron como control.

**FIG. 3:** El bloqueo de B7-H1 mejora la radioterapia.

5x10<sup>5</sup> células TUBO se inyectaron por vía subcutánea en los flancos de ratones Balb/c. En el día 14, los ratones se trataron localmente con una dosificación de 12 Gy de irradiación. En los días 15, 18 y 21, los ratones recibieron una inyección por vía intraperitoneal con 50 µg de un anticuerpo monoclonal bloqueante de B7-H1 (clon 10F.9G2). Se controló el crecimiento del tumor.

**Descripción detallada de la invención**

Como se usa en el presente documento, el "agente capaz de inhibir la señalización de B7-H1/PD1" es un anticuerpo bloqueante de B7-H1. En una realización específica, el anticuerpo bloqueante puede ser un anticuerpo monoclonal específico, anticuerpo policlonal, anticuerpo humanizado, anticuerpo quimérico o un fragmento específico de antígeno (por ejemplo, fragmento de anticuerpo Fab, Fv, ScFv o similares) de los mismos. Una persona experta en la materia apreciará que cualquier anticuerpo capaz de unirse específicamente a la proteína B7-H1 y de influir en la función y/o la estructura de la misma puede actuar potencialmente como el "agente capaz de inhibir la señalización de B7-H1/PD1" de la presente divulgación.

Como se usa en el presente documento, el término "radioterapia" o la expresión "tratamiento con radiación", incluye, por ejemplo, radioterapia fraccionada, radioterapia no fraccionada y radioterapia superfraccionada, así como una combinación de radiación y quimioterapia. El tipo de radiación puede incluir además radiación ionizante (y), radiación de partículas, transferencia de baja energía (LET), transferencia de alta energía (HET), radiación de rayos X, radiación UV, radiación infrarroja, luz visible, radiación fotosensibilizante, etc.

En una realización de la presente divulgación, la radioterapia o tratamiento con radiación es una irradiación de rayos X única o múltiple, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más irradiaciones de rayos X. Preferentemente, la dosificación de rayos X utilizada en cada irradiación puede ser de 5-20 Gy, tal como de 5-8, 5-12 o 5-15 Gy. En particular, cuando se administran múltiples irradiaciones de rayos X, el intervalo entre irradiaciones puede ser de una a varias horas (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o hasta 24 horas), uno a varios días (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 días, etc.).

Como se usa en el presente documento, las expresiones "agente quimioterapéutico", "agente terapéutico químico" y "agente para quimioterapia" pueden usarse de manera indistinta. Esto incluye una composición que comprende un único principio activo o una combinación de múltiples agentes quimioterapéuticos. En un sujeto que necesita tratamiento, se puede usar quimioterapia junto con cirugía o radioterapia, o con otras formas de terapias antitumorales, por ejemplo, el "agente capaz de inhibir la señalización de B7-H1/PD1" de la presente divulgación. En particular, el agente quimioterapéutico incluye, aunque no de forma limitativa, adriamicina, ciclofosfamida y Taxanos [paclitaxel (Taxol) y docetaxel (Taxotere)], capecitabina (Xeloda), gemcitabina (Gemzar), vinorelbina (Navelbine), tamoxifeno, inhibidores de la aromatasa (Arimidex, Femara, Aromasin), 5-FU con ácido folínico, irinotecan (Camptosar), oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, estramustina, mitoxantrona (Novantrone), prednisona, vincristina (Oncovin), etc., o una combinación de los mismos.

En el contexto de la presente divulgación, la expresión "resistencia a la radioterapia" significa que las células (por ejemplo, células tumorales) no pierden su capacidad de seguir propagándose y/o de crecer tras haber sido sometidas a radioterapia o tratamiento con radiación. Generalmente, dicha resistencia puede conducir a una disminución o pérdida de la eficacia de la radioterapia en el tratamiento del tumor, lo que a su vez puede producir la recidiva del tumor.

En el contexto de la presente divulgación, el término "tumor", "cáncer" o la expresión "enfermedad hiperproliferativa" se refiere al crecimiento y la proliferación de cualesquiera células cancerosas malignas o benignas, incluyendo todas las células y tejidos transformados y todas las células y tejidos cancerosos.

Los ejemplos del cáncer incluyen, aunque no de forma limitativa, carcinoma, linfoma, blastocitoma, sarcoma, leucemia o tumores linfáticos malignos. Los ejemplos específicos del cáncer incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas de epitelio), cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma pulmonar y cáncer de pulmón de células escamosas, cáncer peritoneal, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello de útero, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer endometrial o cáncer de útero, cáncer de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer de hígado, cáncer de ano, cáncer de pene, y cáncer de cabeza y de cuello. Los ejemplos adicionales del cáncer se relacionan en otra parte de la presente divulgación. En particular, el tumor se selecciona entre: cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de colon y melanoma, y/o las células de los mismos, por ejemplo, células de cáncer de mama (tales como células TUBO) o una línea de células tumorales Myc-Cap.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, el agente capaz de inhibir la señalización de B7-H1/PD1 de la presente divulgación o la composición que comprende el agente se administra en un plazo de varias horas (por

ejemplo, 10-48 horas), varios días (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 días) o varias semanas (por ejemplo, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 o 1-2 semanas) tras la radioterapia o el tratamiento con radiación. Cuando se desee, el agente o la composición puede administrarse múltiples veces, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6 o más veces, y el intervalo entre administraciones puede ser de varias horas, un día, varios días (por ejemplo, 2-30, 2-25, 2-20, 2-15, 2-14, 2-13, 2-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4 o 2-3 días).

Para la prevención o el tratamiento de la resistencia a la radioterapia, los médicos pueden decidir la dosificación y la manera de administrar el agente o composición de la presente divulgación de acuerdo con los criterios conocidos en la técnica. La concentración y la dosificación administradas del agente que inhibe la señalización de B7-H1/PD1 pueden depender del tipo del cáncer que se va a tratar, la gravedad y el curso de la enfermedad, el tamaño del tumor, el grado de metástasis, de si el objetivo de la administración es preventivo o terapéutico, la terapia anterior, los antecedentes médicos del paciente y la respuesta a los anticuerpos, y del criterio del médico a cargo del tratamiento. Para la administración repetida durante varios días o más, dependiendo de la dolencia, el tratamiento puede mantenerse hasta que se consigue la supresión deseada de los síntomas, por ejemplo, una reducción del tamaño/volumen del tumor y la reducción de la metástasis. El ciclo de tratamiento puede controlarse mediante un método o análisis convencional basado en los criterios conocidos por los médicos o cualquier persona experta en la materia.

Específicamente, para un anticuerpo, la dosificación que se va a administrar puede variar de 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal del paciente, por ejemplo, 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal del paciente, o 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal del paciente. En general, los anticuerpos humanos tienen una semivida más larga en seres humanos que los anticuerpos procedentes de otras especies, debido a las respuestas inmunitarias frente a polipéptidos extraños. Por tanto, una dosificación más baja de un anticuerpo humano y una frecuencia más baja de administración son generalmente posibles. Además, la dosificación y la frecuencia de administración de un anticuerpo pueden reducirse potenciando la captación y la penetración del tejido (por ejemplo, en el cerebro) del anticuerpo a través de una modificación tal como la lipidación.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación puede comprender un excipiente, transportador, agente tamponante, estabilizante u otros materiales farmacéuticamente aceptables conocidos por las personas expertas en la materia. Dichos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. Dichos materiales pueden incluir cualquier disolvente, medio de dispersión, revestimiento, agente antibacteriano y antifúngico, agente isotónico y de retraso de la absorción, sustancia fisiológicamente compatible, etc. El transportador farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, glucosa, glicerol, etanol o similares, y una combinación de los mismos. En muchos casos, la composición farmacéutica puede comprender un agente isotónico, por ejemplo, azúcar, un poliol tal como manitol, sorbitol, o, preferentemente, cloruro de sodio. La sustancia farmacéuticamente aceptable puede ser también un agente humectante o una pequeña cantidad de sustancia auxiliar, tal como un agente hidratante o un agente emulsionante, un conservante o un agente tamponante, que puede aumentar la vida útil o la eficacia del anticuerpo. Las propiedades concretas del transportador u otros materiales dependerán de la vía de administración, que puede ser oral, tópica, mediante inhalación o mediante inyección, por ejemplo, por vía intravenosa. En una realización, la composición farmacéutica se administra mediante infusión o inyección intravenosa. En otra realización preferida, la composición farmacéutica se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea.

La composición farmacéutica para la administración oral puede estar en la forma de un comprimido, cápsula, polvo o líquido, por ejemplo, comprende un diluyente inerte o un transportador comestible asimilable. Un comprimido puede comprender un transportador sólido, por ejemplo, gelatina o un adyuvante. Una composición farmacéutica líquida comprende normalmente un transportador líquido, por ejemplo, agua, petróleo, aceite animal o vegetal, aceite mineral o aceite sintético. Es posible incluir solución salina fisiológica, glucosa u otras soluciones azucaradas, o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Un miembro específicamente de unión (y, cuando se desee, otros componentes) puede también encapsularse en cápsulas de gelatina de envoltura dura o blanda, comprimirse en comprimidos, o incorporarse directamente en la dieta de un sujeto. Para la administración terapéutica oral, el principio activo puede mezclarse con excipientes, y se puede usar en la forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, pastillas para masticar, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas o similares. A fin de administrar el producto de la presente divulgación por vías diferentes que la administración parenteral, puede ser necesario revestir un compuesto con un material que puede evitar su desactivación o la administración simultánea del mismo.

Como inyección intravenosa, o inyección en el sitio del dolor (por ejemplo, sitios del tumor), el principio activo estará en la forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, que está exenta de pirógenos y tiene un pK adecuado, isotonicidad y estabilidad. Una persona experta en la materia puede usar fácilmente, por ejemplo, un vehículo isotónico tal como una solución de cloruro de sodio, inyección de solución de Ringer, o inyección de solución de Ringer lactada para preparar una solución adecuada. Cuando se desee, pueden estar contenidos conservantes, estabilizantes, agentes tamponantes, antioxidantes y/u otros aditivos.

El agente o composición de la presente divulgación puede utilizarse solo o junto con una terapia adicional, de forma simultánea o secuencial, dependiendo de la dolencia que se va a tratar.

Los siguientes ejemplos están simplemente previstos para ilustrar la presente divulgación con más detalle y no debe interpretarse de forma alguna como limitante del alcance de la invención. Una persona experta en la materia apreciará que se pueden realizar modificaciones de las siguientes realizaciones sin apartarse del alcance, espíritu y principios de la presente divulgación de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

En los siguientes ejemplos se emplearon, salvo que se especifique otra cosa, métodos, aparatos, reactivos y protocolos comúnmente utilizados por los expertos en la materia.

#### **Ejemplo 1. B7-H1 y PD-1 se expresaron de forma elevada en un microentorno tumoral tras la radiación.**

La recidiva tras la RT es un problema común, que se debe al menos parcialmente a la presencia de células y/o tejidos tumorales resistentes a la RT en un sujeto. El presente inventor propone que el ciclo de recidiva, es decir, la progresión de estos tumores resistentes a la RT, puede implicar moléculas inhibitoras que inhiben las respuestas de los linfocitos T. A fin de investigar si la RT induce o no la expresión de B7-H1/PD1, el inventor tiñó B7-H1 en células tumorales, células dendríticas y macrófagos, y tiñó PD-1 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y linfocitos T CD8<sup>+</sup>. El procedimiento experimental se describió brevemente del siguiente modo. 5x10<sup>5</sup> células tumorales TUBO (obtenidas de células de cáncer de mama de ratones transgénicos Balb/c Her2/neu)<sup>18</sup> se inyectaron por vía subcutánea en los flancos de ratones Balb/c. En el día 14, los ratones se irradiaron localmente con 15 Grays (Gy) utilizando un generador de rayos X (PCM 1000, Pantak). En el día 28, los tumores se extrajeron y digirieron durante 30 min con 0,2 mg/ml de collagenasa para obtener una suspensión de células individuales para la tinción de B7-H1 con un protocolo convencional de tinción usando 0,5 µg/ml de anticuerpo monoclonal 10F.9G2 adquirido de Bio-X cell, West Lebanon, NH03784, EE.UU.

El inventor descubrió que B7-H1 se expresó no solo en las células tumorales sino también en células dendríticas y macrófagos tras la radiación (**FIG. 1A y 1B**). El inventor descubrió también que PD-1 se expresó de forma elevada en linfocitos T CD8<sup>+</sup> infiltrantes y en linfocitos T CD4<sup>+</sup> (**FIG. 1C**).

#### **Ejemplo 2. La RT produjo la regulación en exceso de B7-H1.**

A fin de investigar si la RT puede inducir o no la expresión de B7-H1 en células tumorales (línea celular Myc-Cap de cáncer de próstata<sup>19</sup>), las células tumorales (línea de células tumorales Myc-Cap) se trataron con una irradiación de 0, 4 y 8 Gy. A continuación, las células tumorales irradiadas se cultivaron durante 24 o 48 horas. Después de 24 o 48 horas, se recogieron las células, y las células recogidas (10<sup>6</sup> células) se sometieron a una tinción convencional con un anticuerpo monoclonal anti B7-H1 (0,5 µg/ml de anticuerpo 10F.9G2, adquirido de Bio-X cell, West Lebanon, NH03784, EE.UU.). Las células Myc-Cap no irradiadas se usaron como control. Los resultados mostraron que la RT reguló en exceso significativamente la expresión de B7-H1 en células Myc-Cap.

#### **Ejemplo 3. El bloqueo del anticuerpo anti B7-H1 promovió el efecto de la RT local y redujo la masa tumoral.**

Para estudiar si B7-H1 mediada por la RT altera la respuesta inmunitaria adquirida, o no lo hace, la ruta de señalización de B7-H1/PD1 se bloqueó durante la realización de la RT. 5x10<sup>5</sup> células TUBO se inyectaron por vía subcutánea en los flancos de ratones Balb/c. En el día 14, los ratones se trataron localmente con una dosificación de 12 Gy de irradiación (usando un generador de rayos X, PCM 1000, Pantak). En los días 15, 18 y 21 los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal con 50 µg de anticuerpo monoclonal bloqueante de B7-H1 (clon 10F.9G2, adquirido de Bio-X cell, West Lebanon, NH03784, EE.UU.), respectivamente, y se controló el crecimiento del tumor. Los resultados mostraron que aunque ni la RT ni el anticuerpo monoclonal bloqueante de B7-H1 solos tuvieron ningún efecto significativo sobre el crecimiento del tumor, la combinación de la RT y el anticuerpo generó un efecto sinérgico produciendo una remisión significativa del tumor de forma eficaz (**FIG. 3**).

#### **Bibliografía:**

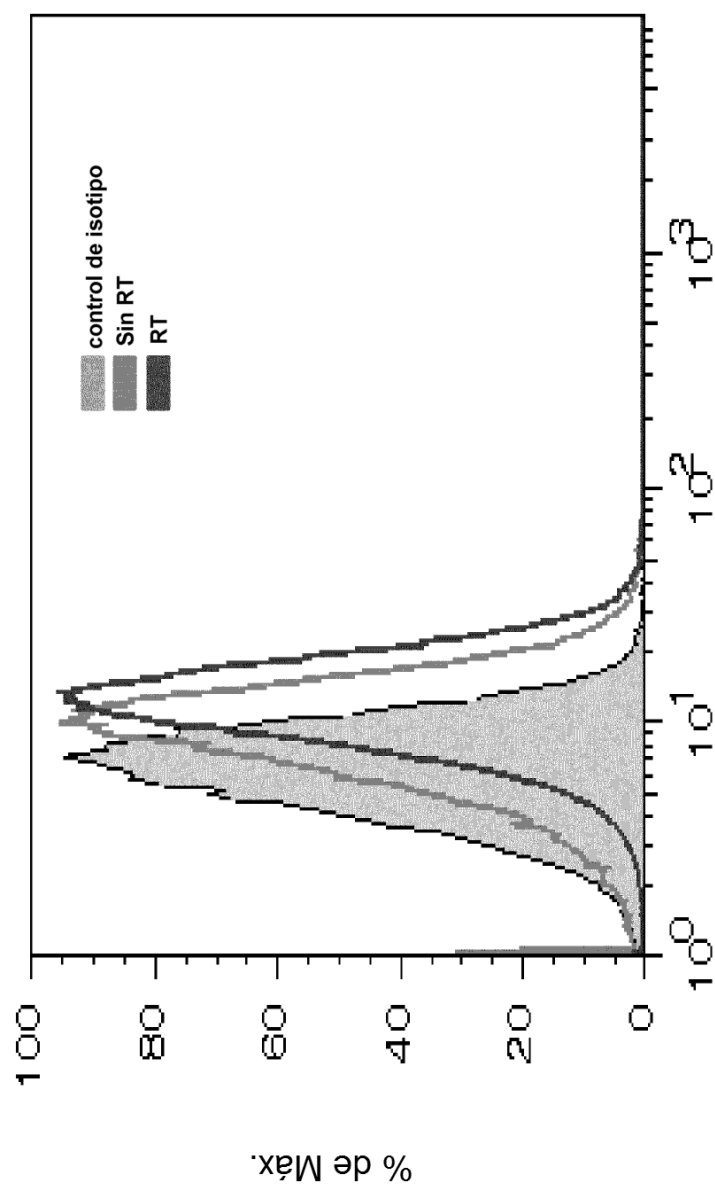
1. Lee, Y., *et al.*, Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8<sup>+</sup> T cells: changing strategies for cancer treatment. *Blood* 114, 589-595 (2009).
2. Burnette, B., *et al.*, The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity. *Cancer Res.*
3. Apetoh, L., *et al.*, Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13, 1050- 1059 (2007).
4. Asano, K., *et al.*, CD169-positive macrophages dominate antitumor immunity by crosspresenting dead cell-associated antigens. *Immunity* 34, 85-95.
5. Zou, W. y Chen, L., Inhibitory B7-family molecules in the tumor microenvironment. *Nat Rev Immunol* 8, 467-477 (2008).
6. Chen, L., Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T- cell immunity. *Nat Rev Immunol* 4, 336-347 (2004).
7. Dong, H., *et al.*, Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8, 793-800 (2002).
8. Curiel, T.J., *et al.*, Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell- mediated antitumor immunity. *Nat Med* 9, 562-567 (2003).

9. Barber, D.L., *et al.*, Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439, 682-687 (2006).
10. Day, C.L., *et al.*, PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443, 350-354 (2006).
- 5 11. Trautmann, L., *et al.*, Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 12, 1198-1202 (2006).
12. Nakamoto, N., *et al.*, Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoSPathog* 5, e1000313 (2009).
- 10 13. Freeman, G.J., Wherry, E.J., Ahmed, R. y Sharpe, A.H., Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J Exp Med* 203, 2223-2227 (2006).
14. Sakuishi, K., *et al.*, Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med* 207, 2187-2194.
- 15 15. Fourcade, J., *et al.*, Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *J Exp Med* 207, 2175-2186.
- 16 16. Mumprecht, S., Schurch, C., Schwaller, J., Solenthaler, M. y Ochsenbein, A.F., Programmed death 1 signaling on chronic myeloid leukemia-specific T cells results in T-cell exhaustion and disease progression. *Blood* 114, 1528-1536 (2009).
- 17 17. Hirano, F., *et al.*, Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res* 65, 1089-1096 (2005).
- 20 18. Rovero, S., Amici, A., Carlo, E.D., Bei, R., Nanni, P., Quaglino, E., Porcedda, P., Boggio, K., Smorlesi, A., Lollini, P.L., *et al.* (2000). DNA vaccination against rat her-2/Neu p185 more effectively inhibits carcinogenesis than transplantable carcinomas in transgenic BALB/c mice. *J. Immunol.* 165, 5133-5142.
- 19 19. Watson PA, Ellwood-Yen K, King JC, Wongvipat J, Lebeau MM, Sawyers CL., Context-dependent hormone-refractory progression revealed through characterization of a novel murine prostate cancer cell line. *Cancer Res.* 2005 Dec 15; 65 (24): 11565-71.
- 25 20. Wasserman J., *et al.*, Immunosuppression in irradiated breast cancer patients: *in vitro* effect of cyclooxygenase inhibitors. *Bull N Y Acad Med.* 1989; 65: 36-44.
21. Ohuchida K., *et al.*, Radiation to mesenchymal fibroblasts increases invasiveness of pancreatic cancer cells through tumor-mesenchymal interactions. *Cancer Res.* 2004; 64:3215-3222.
- 30 22. Merrick A., *et al.*, Immunosuppressive effects of radiation on human dendritic cells: reduced IL-12 production on activation and impairment of native T-cell priming. *BrJ Cancer.* 2005; 92: 1450-1458.
23. Chen, *et al.*, TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* 2001; 14: 715-725.
- 35 24. Reits EA, *et al.*, Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J. Exp Med.* 2006; 203: 1259-1271.

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo bloqueante de B7-H1 para su uso en un método de tratamiento del cáncer en combinación con un tratamiento con radiación, en donde el anticuerpo bloqueante de B7-H1 se administra tras el tratamiento con radiación, y en donde dicho anticuerpo bloqueante de B7-H1 es un anticuerpo anti B7-H1.
2. El anticuerpo bloqueante de B7-H1 para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo monoclonal contra B7-H1.
3. El anticuerpo bloqueante de B7-H1 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el tratamiento con radiación es irradiación de rayos X.
4. El anticuerpo bloqueante de B7-H1 para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el tratamiento con radiación es una irradiación de rayos X única o múltiple.
5. El anticuerpo bloqueante de B7-H1 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-4, en donde el tratamiento con radiación es de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más irradiaciones de rayos X.
6. El anticuerpo bloqueante de B7-H1 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde la dosificación de rayos X utilizada en cada irradiación es de 5-20 Gy.
7. El anticuerpo bloqueante de B7-H1 para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la dosificación de rayos X utilizada en cada irradiación es de 5-8, 5-12 o 5-15 Gy.
8. El anticuerpo bloqueante de B7-H1 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de colon y melanoma.
9. El anticuerpo bloqueante de B7-H1 para el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el cáncer es cáncer de mama o cáncer de próstata.
10. El anticuerpo bloqueante de B7-H1 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicho método comprende además administrar un agente quimioterapéutico.
11. El anticuerpo bloqueante de B7-H1 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 10, en donde dicho anticuerpo bloqueante de B7-H1 se administra en un plazo de 9 días tras el tratamiento con radiación.





B7-H1

FIG. 1A

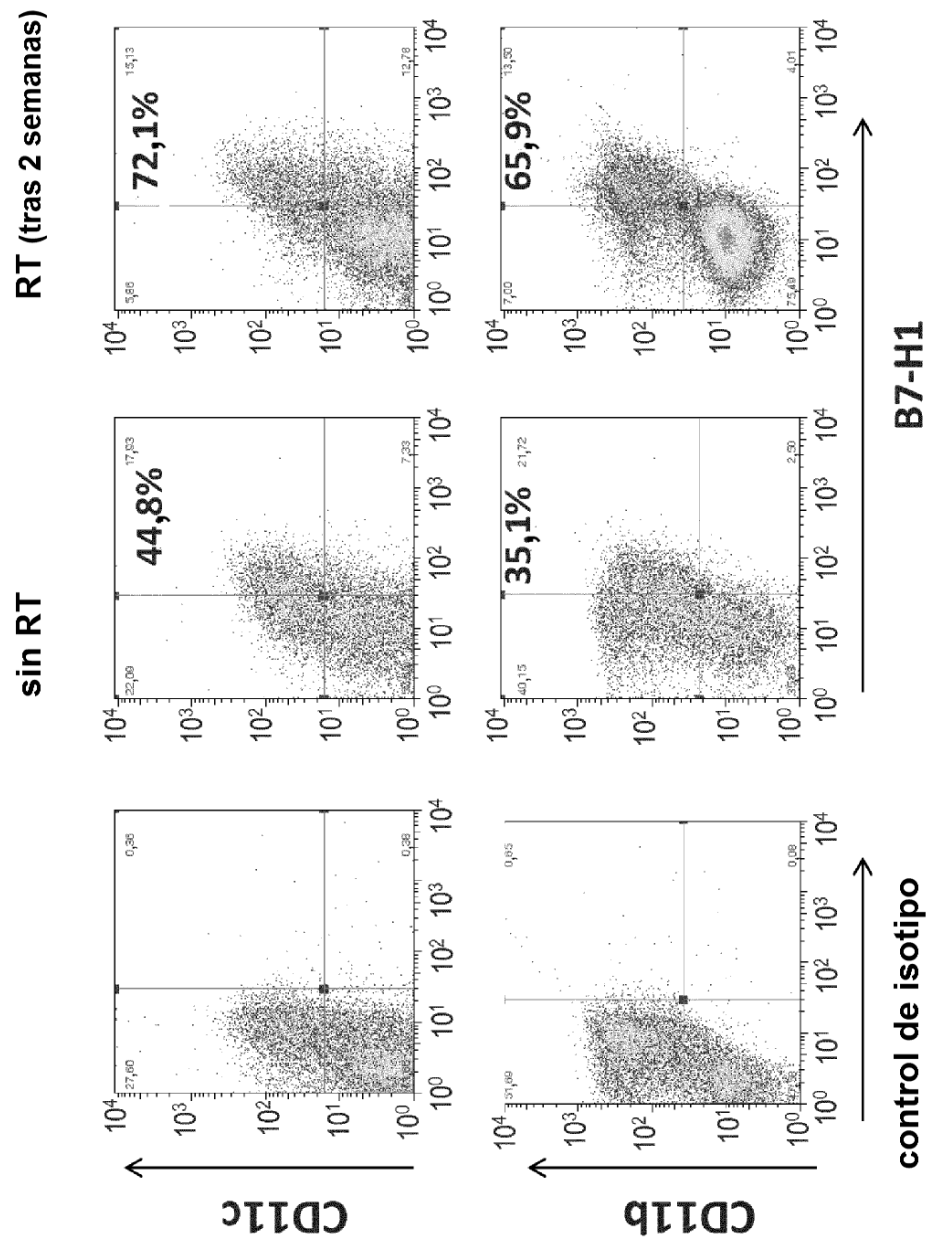


FIG. 1B

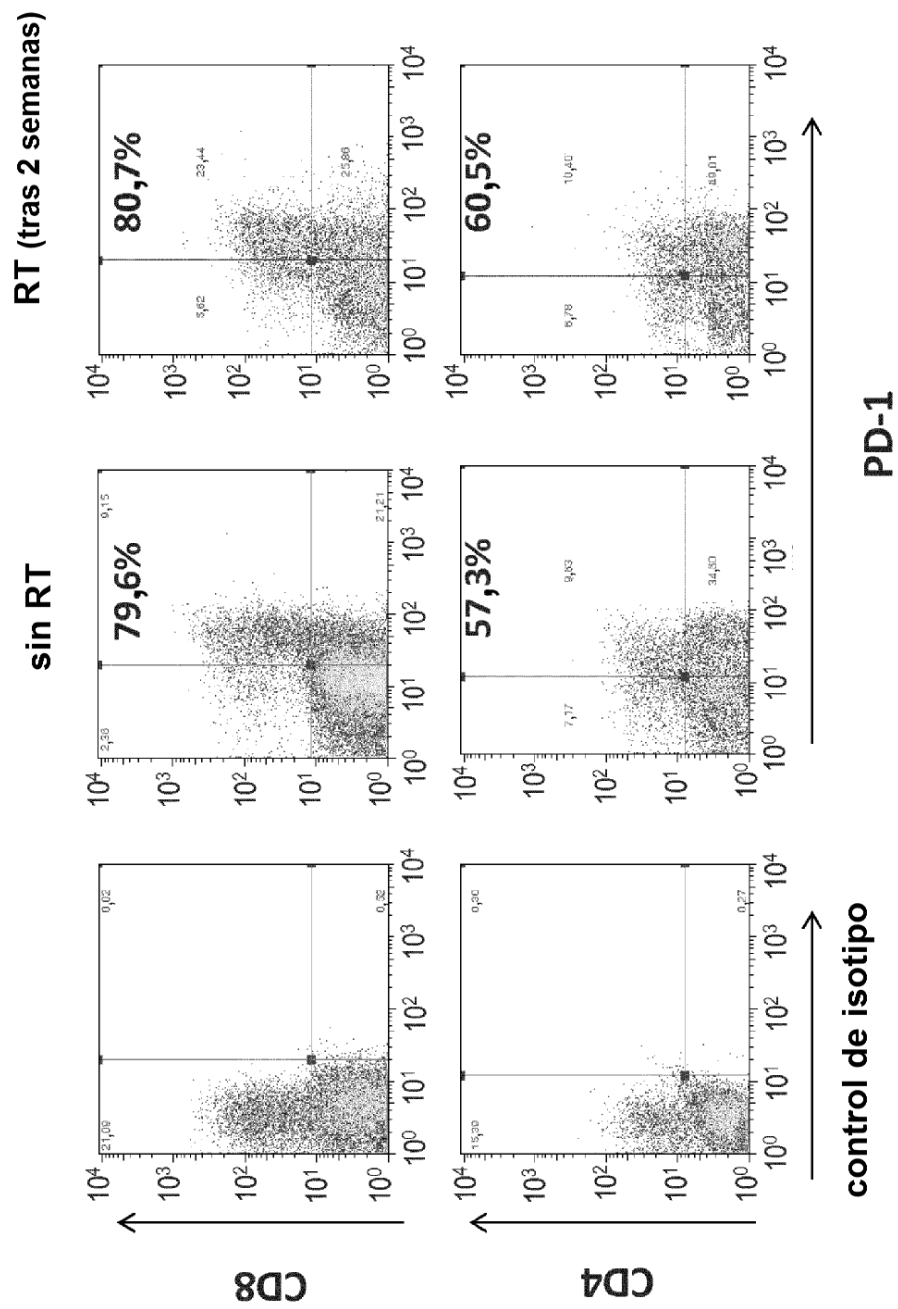
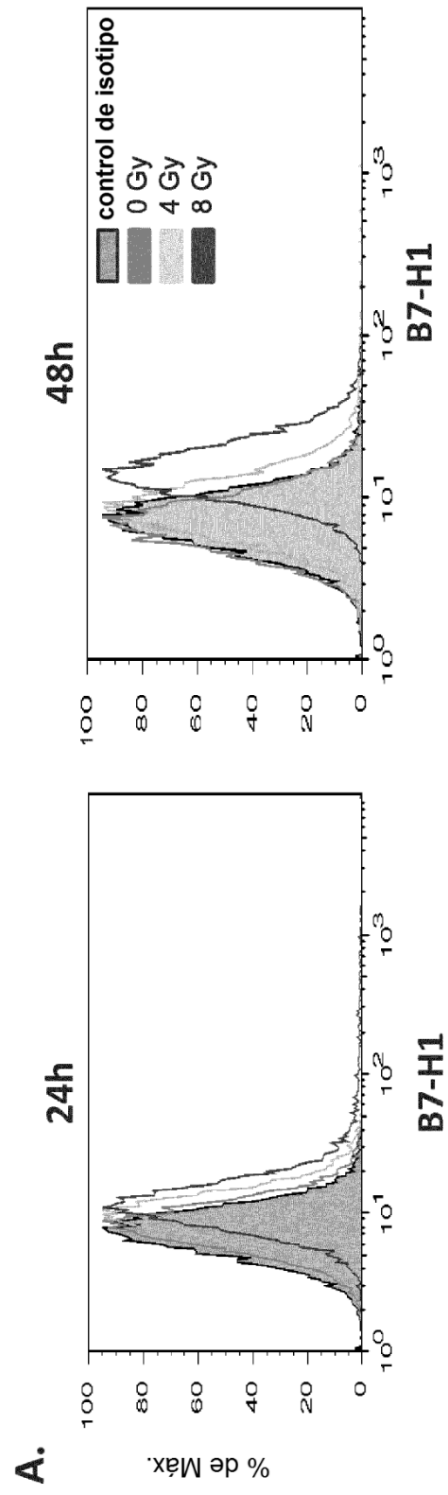


FIG. 1C



**FIG. 2**

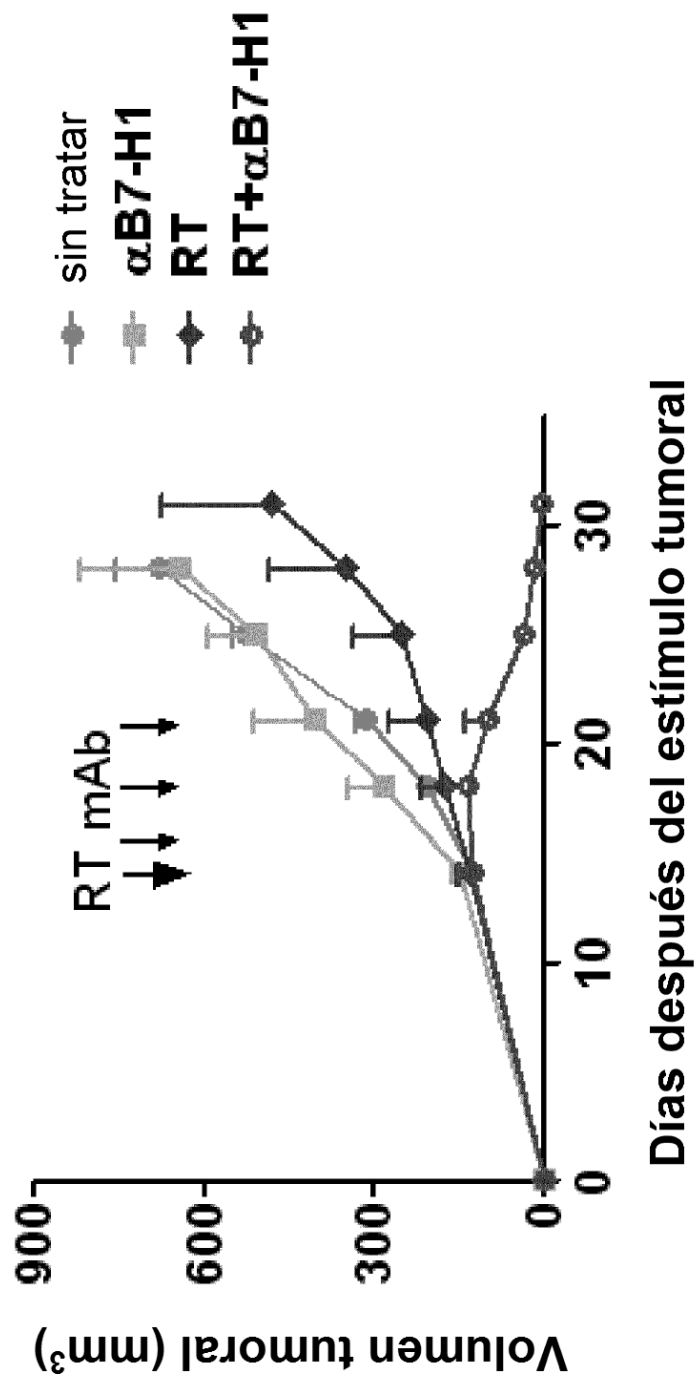


FIG. 3