

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 793 330**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2010** **E 17179204 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020** **EP 3279215**

54 Título: **Agentes de unión específica contra B7-H1**

30 Prioridad:

24.11.2009 US 264061 P

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

13.11.2020

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE LIMITED (100.0%)
Milstein Building, Granta Park
Cambridge, Cambridgeshire CB21 6GH, GB**

72 Inventor/es:

**QUEVA, CHRISTOPHE;
MORROW, MICHELLE;
HAMMOND, SCOTT;
ALIMZHANOV, MARAT;
BABCOOK, JOHN;
FOLTZ, IAN;
KANG, JASPAL SINGH;
SEKIROV, LAURA;
BOYLE, MELANIE;
CHODORGE, MATTHIEU;
MULGREW, KATHLEEN ANN y
STEWART, ROSS**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 793 330 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 de unión específica contra B7-H1

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a agentes de unión específica contra la proteína B7-H1 y usos de tales agentes. En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales totalmente humanos dirigidos a B7-H1 y usos de estos anticuerpos. Los aspectos de la presente invención también se refieren a líneas celulares que expresan tales agentes de unión específica o anticuerpos. Los agentes de unión específica descritos son útiles como agentes de diagnóstico y para el tratamiento de enfermedades asociadas con la actividad y/o expresión de B7-H 1.

15 Descripción de la técnica relacionada

[0002] Una respuesta inmune adaptativa implica la activación, la selección, y la proliferación clonal de las dos clases principales de linfocitos llamados células T y células B. Después de encontrarse con un antígeno, las células T proliferan y se diferencian en células efectoras específicas de antígeno, mientras que las células B proliferan y se diferencian en células secretoras de anticuerpos. La activación de células T es un proceso de múltiples pasos que requiere varios eventos de señalización entre la célula T y una célula presentadora de antígenos (APC). Para que se produzca la activación de células T, deben administrarse dos tipos de señales a una célula T en reposo. El primer tipo está mediado por el receptor de células T (TCR) específico de antígeno y confiere especificidad a la respuesta inmunitaria. El segundo tipo, coestimulador, regula la magnitud de la respuesta y se administra a través de receptores de accesorios en la célula T.

[0003] Una señal coestimuladora primario se suministra a través del receptor CD28 de activación tras el acoplamiento de sus ligandos B7-1 o B7-2. En contraste, el acoplamiento del receptor inhibitorio CTLA-4 por los mismos ligandos B7-1 o B7-2 da lugar a la atenuación de una respuesta de células T. Por lo tanto, las señales de CTLA-4 antagonizan la coestimulación mediada por CD28. A altas concentraciones de antígeno, la coestimulación de CD38 anula el efecto inhibitorio de CTLA-4. La regulación temporal de la expresión de CD28 y CTLA-4 mantiene un equilibrio entre las señales de activación y señales inhibitorias y asegura el desarrollo de una respuesta inmunitaria eficaz, protegiendo al mismo tiempo contra el desarrollo de autoinmunidad.

[0004] Los homólogos moleculares de CD28 y CTLA-4 y sus ligandos similares a B-7 han sido recientemente identificados. ICOS es un receptor coestimulador similar a CD28. PD-1 (muerte programada 1) es un receptor inhibitorio y un homólogo de CTLA-4. Esta descripción se refiere a la modulación de las respuestas inmunitarias mediadas por B7-H 1.

[0005] B7-H1, también conocida como PD-L1, es una proteína transmembrana de tipo I de aproximadamente 53 kDa de tamaño. En los seres humanos, B7-H1 se expresa en un número de tipos de células inmunes incluyendo células T activadas y agotadas/anérgicas, en células B vírgenes y activadas, así como en las células mieloides dendríticas (DC), monocitos y mastocitos. También se expresa en células no inmunes incluyendo islotes del páncreas, las células de Kupffer del hígado, el endotelio vascular y epitelio seleccionado, por ejemplo del epitelio de las vías respiratorias y epitelio del túbulo renal, donde su expresión se potencia durante los episodios inflamatorios. La expresión de B7-H1 también se encuentra en niveles aumentados en un número de tumores, incluyendo, pero no limitado a, mama, colon, colorrectal, de pulmón, renal, incluyendo carcinoma de células, gástrico, de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer hepatocelular (HCC), y cáncer de páncreas, así como melanoma.

[0006] B7-H1 es un miembro de la familia de proteínas B7, que contiene dos dominios Ig extracelulares, un dominio de tipo V N-terminal seguido por un dominio de tipo C. El dominio intracelular de 30 aminoácidos de longitud no contiene motivos de señalización obvios, pero lleva un sitio potencial para la fosforilación de la proteína quinasa C. La forma murina de B7-H1 tiene una identidad de aminoácidos del 69% con la forma humana de B7-H1, y también comparte una estructura conservada.

[0007] Se sabe que B7-H1 se une dos ligandos alternativos, el primero de éstos, PD-1, es un receptor de transmembrana tipo I de 50-55 kDa que se identificó originalmente en una línea de células T sometida a apoptosis inducida por activación. PD-1 se expresa en células T, células B, y monocitos activados, así como en otras células del sistema inmune y se une tanto a B7-H1 (PD-L1) como a la B7-DC (PD-L2) relacionada. La segunda es el miembro de la familia B7, B7-1, que se expresa en las células T, células B, monocitos y células presentadoras de antígenos activadas.

[0008] PD-1 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) que contiene un único dominio similar a Ig V en su región extracelular. El dominio citoplásmico de PD-1 contiene dos tirosinas, con la tirosina más proximal a la membrana (VAYEEL en PD-1 de ratón) situada dentro de un ITIM (motivo inhibitorio inmunoreceptor basado en tirosina). La presencia de un ITIM en PD-1 indica que esta molécula funciona para atenuar la señalización de

receptor de antígeno por el reclutamiento de fosfatasa citoplásmicas. Las proteínas PD-1 humanas y murinas comparten una identidad de aminoácidos de aproximadamente el 60% con la conservación de los cuatro sitios de N-glicosilación potenciales, y los residuos que definen el dominio Ig-V. El ITIM en la región citoplasmática y el motivo similar a ITIM que rodea la tirosina carboxi-terminal (TEYATI en humanos y ratón) también se conservan entre ortólogos humanos y murinos.

[0009] Se cree que la señalización a través del eje PD-1/B7-H1 realiza funciones críticas no redundantes en el sistema inmune, mediante la regulación negativa de las respuestas de células T. Esta regulación está implicada en el desarrollo de células T en el timo, en la regulación de respuestas inflamatorias crónicas y en el mantenimiento tanto de la tolerancia periférica como el privilegio inmune. La naturaleza crítica de estas funciones se ejemplifica en ratones deficientes de PD-1, que exhiben un fenotipo autoinmune. La deficiencia de PD-1 en los ratones C57BL/6 da lugar a la glomerulonefritis y artritis similares al lupus progresivas y crónicas. En ratones Balb/c, la deficiencia de PD-1 conduce a la miocardiopatía grave debido a la presencia de anticuerpos auto-reactivos específicos del tejido del corazón. La función de señalización a través de B7-H1/B7-1 es menos clara, pero se cree que también está involucrada en la administración de señales reguladoras negativas a células T y células presentadoras de antígeno.

[0010] Se cree que la expresión de B7-H1 en las células tumorales ayuda a los tumores en la evasión de la detección y la eliminación por el sistema inmune. B7-H1 funciona a este respecto a través de varios mecanismos alternativos incluyendo la dirección del agotamiento y la anergia del tumor infiltrando linfocitos T, estimulando la secreción de citocinas represivas inmunes en el microambiente tumoral, estimulando la función de células T reguladoras represivas y la protegiendo células tumorales que expresan B7-H1 de la lisis mediante células T citotóxicas específicas de células tumorales.

[0011] En general, existe una necesidad de proporcionar procedimientos terapéuticos seguros y efectivos para trastornos asociados con la represión de una respuesta inmune, tal como, por ejemplo, el cáncer e infecciones virales crónicas. La modulación de las respuestas inmunes implicadas en estos trastornos se puede lograr mediante la manipulación de la vía B7-H1/PD-1.

[0012] El documento US 2009/055944 se refiere a anticuerpos monoclonales humanos que se unen a PD-L1. El documento EP 1 537 878 se refiere a composiciones que inhiben la función de PD-1, PD-L1 o PD-L2 y terapias de uso. Strome et al., (Cancer Research, vol. 63, 2003, páginas 6501-6505) se refiere al bloqueo de B7-H1 que aumenta la inmunoterapia adoptiva de células T para el carcinoma de células escamosas. Blank et al., (International Journal of Cancer, vol. 119, 2006, páginas 317-327) se refiere a PD-L1 (B7-H1) que aumenta las respuestas de células T específicas de tumor humano in vitro. Ning et al., (Journal of Clinical Immunology, vol. 27, 2006, páginas 117-130) se refiere a una potente inmunidad antitumoral sistémica inducida por la vacunación con células tumorales modificadas genéticamente con antígeno asociado a tumor prostático quimiotáctico y el bloqueo de B7-H1. El documento WO 2009/089149 se refiere a antagonistas de B7-H1 (CD274) que inducen la apoptosis de células tumorales. El documento WO 2006/133396 se refiere a procedimientos y composiciones para el tratamiento de infecciones persistentes. Zhang et al., (Blood, 114, 2009, 1545-1552) se refiere a interacciones PD-1/PD-L1 que inhiben respuestas inmunes antitumorales en un modelo de leucemia mieloide aguda. Nomi et al., (Clinical Cancer Research, 13, 2007, 2151-2157) se refiere a la significancia clínica y al potencial terapéutico del mecanismo de muerte programada 1 en cáncer pancreático humano. Parekh et al., (The Journal of Immunology, 182, 2009, 2816-2826) se refiere al bloqueo de PD-1/PD-L que previene la inducción de anergia y que mejora las actividades antitumorales de células NKT invariantes activadas por glicolípidos. El documento EP 2 172 219 se refiere a un agente anti-cáncer que comprende un ligando iNKT y anticuerpo anti-PD-1 o anticuerpo anti-PD-L1. El documento WO 2010/077634 se refiere a anticuerpos-anti-PD-L1 y su uso para mejorar la función de células T. Brahmer et al. (New England Journal of Medicine, 366, 2012 2455-2465) se refiere a la seguridad y la actividad de un anticuerpo anti-PD-Li en pacientes con cáncer avanzado.

Descripción resumida de la invención

[0013] La presente invención se refiere a agentes de unión específica que se unen específicamente a B7-H1 e inhiben la actividad biológica de B7-H1. En particular, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión del mismo, que se une específicamente a B7-H1 humano, en el que el anticuerpo o fragmento de unión del mismo comprende: (a) un dominio variable de cadena pesada que tiene el aminoácido de SEQ ID NO: 72, y (b) un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77.

[0014] En un caso de la descripción, la descripción se refiere a agentes de unión específica que se unen específicamente a B7-H1 y de ese modo inhiben la actividad de B7-H1. En otro caso de la descripción, la descripción se refiere a agentes de unión específica que se unen específicamente a B7-H1 y de ese modo inhiben la unión de B7-H1 a PD-1. En otro caso más de la descripción, la descripción se refiere a agentes de unión específica que bloquean la supresión de células T inducida por B7-H1 y de ese modo mejoran la inmunidad anti-tumoral. En otro caso más de la descripción, la descripción se refiere además a agentes de unión específica que pueden estimular además una o más de las siguientes actividades, incluyendo la proliferación de células T, secreción de IFN- γ y/o IL-2 en reacciones de linfocitos mixtos. Los casos de la descripción se refieren a agentes de unión específica que se unen específicamente a B7-H1 e inhiben la actividad biológica de B7-H1. En un caso el agente de

unión específica inhibe al menos el 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos el 95% de la actividad biológica que tendría lugar en ausencia del agente de unión específica.

5 **[0015]** Los casos de la descripción se refieren a agentes de unión específica que se unen específicamente a B7-H1 y de ese modo inhiben la actividad de B7-H1. En un caso, el agente de unión específica inhibe al menos el 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos el 95% de la actividad de B7-H1 que tendría lugar en ausencia del agente de unión específica.

10 **[0016]** Los casos de la descripción se refieren a agentes de unión específica que se unen específicamente a B7-H1 y de ese modo inhiben la unión a PD-1. En un caso, el agente de unión específica inhibe al menos el 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95% de la unión del receptor ligando B7-H1/PD-1 en comparación con lo que tendría lugar en ausencia del agente de unión específica.

15 **[0017]** En otro caso, los agentes de unión específica de la descripción pueden inhibir la unión de PD-1/Fc a B7-H1 humana expresa en células ES-2. En un caso, el agente de unión específica inhibe la unión con una IC50 de menos de 1 nM, 0,5 nM, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07 o 0,06 nM. Además, en otro caso, los anticuerpos de la descripción tienen una IC50 de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 0,06 nM; o de aproximadamente 0,5 nM a aproximadamente 0,06 nM; o de aproximadamente 0,1 nM a aproximadamente 0,06 nM; o de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 0,1 nM; o de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 0,5 nM.

20 **[0018]** Los casos de la descripción se refieren a agentes de unión específica que se unen específicamente a B7-H1 y de ese modo inhiben la unión a su ligando B7-1. En un caso, el agente de unión específica inhibe al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, 95% , 96%, 97%, 98% 99% o 100% la unión receptor ligando B7-H1 en comparación con lo que tendría lugar en ausencia del agente de unión específica.

25 **[0019]** Los casos de la descripción se refieren a agentes de unión específica que se unen específicamente a B7-H1 e inhiben la proliferación tumoral inducida por B7-H1. En un caso, el agente de unión específica inhibe al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos el 95% de la proliferación tumoral inducida por B7-H1 que tendría lugar en ausencia del agente de unión específica.

30 **[0020]** Otros casos de la descripción se refieren a agentes de unión específica que se unen específicamente a B7-H1 y de ese modo inhiben la supervivencia de células tumorales inducida por B7-H1. En un caso, el agente de unión específica inhibe al menos el 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95% de la supervivencia de células tumorales inducida por B7-H1 de la que tendría lugar en ausencia del agente de unión específica.

35 **[0021]** Otros casos de la descripción se refieren a agentes de unión específica que se unen específicamente a B7-H1 y por lo tanto inhiben el crecimiento del tumor de líneas celulares de cáncer A375 o HPAC. En un caso, el agente de unión específica inhibe al menos el 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos el 95% del crecimiento de las células cancerosas en el día 30 en comparación con un isotipo de control.

40 **[0022]** Otros casos de la descripción se refieren a agentes de unión específica que se unen específicamente a B7-H1 y de ese modo inhiben la supresión de las células T reactivas tumorales mediada por B7-H1, mejorando así la actividad citotóxica antitumoral de células T. En un caso, el agente de unión específica inhibe al menos el 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95% de supresión de la actividad de células T reactivas tumorales por B7-H1 que tendría lugar en ausencia del agente de unión específica.

45 **[0023]** Otros casos de la descripción se refieren a agentes de unión específica que se unen específicamente a B7-H1 y de ese modo mejoran la inmunidad antitumoral. En un caso, el agente de unión específica aumenta en al menos el 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al

menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos el 95% de la inmunidad antitumoral que tendría lugar en ausencia del agente de unión específica.

5 **[0024]** Otros casos de la descripción se refieren a agentes de unión específica que se unen específicamente a B7-H1 y de ese modo inhiben la proliferación celular. En un caso, el agente de unión específica inhibe al menos el 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos el 95% de la proliferación celular que tendría lugar en ausencia del agente de unión específica.

10 **[0025]** Otros casos de la descripción se refieren a agentes de unión específica que se unen específicamente a B7-H1 y aumenta la actividad citolítica (CTL) específica contra células tumorales que expresan B7-H1. En un caso, los anticuerpos de la descripción tienen una EC50 de menos de o igual a 100 nM, 50 nM o 1 nM. Además, en otro caso, los anticuerpos de la descripción tienen una EC50 de aproximadamente 100 nM hasta aproximadamente 1 nM; o de aproximadamente 50 nM hasta aproximadamente 1 nM; o de aproximadamente 20 nM hasta aproximadamente 1 nM; o de aproximadamente 100 nM hasta aproximadamente 50 nM; o de aproximadamente 100 nM hasta aproximadamente 70 nM.

20 **[0026]** Otros casos de la descripción se refieren a agentes de unión específica que se unen específicamente a B7-H1 e inhiben la supresión de la proliferación de células T mediada por B7-H1 a una EC50 de menos de o igual a 100 nM. En un caso, los anticuerpos de la descripción tienen una EC50 de menos de o igual a 100 nM, por ejemplo, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 o 10 nM. Además, en otro caso, los anticuerpos de la descripción tienen una EC50 de aproximadamente 100 nM hasta aproximadamente 10 nM; o de aproximadamente 50 nM hasta aproximadamente 10 nM; o de aproximadamente 20 nM hasta aproximadamente 10 nM; o de aproximadamente 100 nM hasta aproximadamente 50 nM; o de aproximadamente 100 nM hasta aproximadamente 70 nM; o de aproximadamente 100 nM hasta aproximadamente 80 nM.

30 **[0027]** Los agentes de unión específica también inhiben la adhesión, la motilidad, invasión y metástasis celular de células tumorales y, además, los agentes de unión específica son útiles para reducir el crecimiento del tumor. Los mecanismos por los cuales esto se puede lograr pueden incluir, y no están limitados a, inhibición de la actividad B7-H1.

35 **[0028]** En una realización de la presente invención, el agente de unión específica es un anticuerpo. En una realización de la presente invención, el agente de unión específica es un anticuerpo monoclonal. En una realización de la presente invención, el agente de unión específica es un anticuerpo monoclonal completamente humano o un fragmento del mismo. Tales anticuerpos monoclonales pueden ser referidos en el presente documento como anticuerpos anti-B7-H1 o anticuerpos de la presente invención.

40 **[0029]** Los anticuerpos, anticuerpos monoclonales y anticuerpos monoclonales humanos incluyen los anticuerpos de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, por ejemplo IgG2. En un caso de la descripción, el agente de unión específica es un anticuerpo monoclonal totalmente humano del isotipo IgG2. Este isotipo ha reducido potencial de provocar la función efectora en comparación con otros isotipos, que pueden conducir a una toxicidad reducida. En otro caso de la descripción, el agente de unión específica es un anticuerpo monoclonal totalmente humano del isotipo IgG1. El isotipo IgG1 tiene un mayor potencial para provocar citotoxicidad mediada por células dirigidas por anticuerpo (ADCC) en comparación con otros isotipos, que pueden conducir a la mejora de la eficacia. El isotipo IgG1 tiene estabilidad mejorada en comparación con otros isotipos, por ejemplo, IgG4, que pueden conducir a una mejor biodisponibilidad/facilidad de fabricación/semivida más larga. En un caso, el anticuerpo monoclonal totalmente humano del isotipo IgG1 es del alotipo z, za o f. En un caso de la descripción, el agente de unión específica tiene propiedades terapéuticas deseables, seleccionadas de una o más de los siguientes: alta afinidad de unión para B7-H1, capacidad de inhibir la actividad de B7-H1 in vitro e in vivo, la capacidad de inhibir la supervivencia de células tumorales mediada por B7-H1, y la capacidad de inhibir la supresión de las células T reactivas tumorales mediada por B7-H1, lo cual puede a su vez reducir la proliferación, la motilidad, invasión, metástasis de células tumorales y el crecimiento del tumor.

55 **[0030]** En un caso, la descripción incluye anticuerpos que se unen específicamente a B7-H1 con afinidades muy altas (Kd). En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica se une a B7-H1 con una afinidad de unión (Kd) de menos de 5 nanomolar (nM). En otros casos, el agente de unión específica se une con una Kd de menos de 4 nM, 3 nM, 2,5 nM, 2 nM o 1 nM. Además, en algunos otros casos, los anticuerpos de la descripción se unen a B7-H1 con una Kd de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 1 nM; o de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 2 nM; o de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 3 nM; o de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 4 nM; o de aproximadamente 3 nM a aproximadamente 1 nM; o de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 1 nM. En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica se une a B7-H1 con una Kd de menos de 950 picomolar (pM). En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica se une a B7-H1 con una Kd de menos de 900 pM. En otros casos, el agente de unión específica se une a B7-H1 con una Kd de menos de 800 pM, 700 pM o 600 pM. En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica se une a B7-H1 con una Kd de menos de 500 pM. En otros casos, el agente de unión específica se une a B7-H1 con una Kd

de menos de 400 pM. En aún otros casos, el agente de unión específica se une a B7-H1 con una Kd de menos de 300 pM. En algunos otros casos, el agente de unión específica se une a B7-H1 con una Kd de menos de 200 pM. En algunos otros casos, el agente de unión específica se une a B7-H1 con una Kd de menos de 100 pM. Además, en algunos otros casos, los anticuerpos de la descripción se unen a B7-H1 con una Kd de aproximadamente 900 pM a aproximadamente 100 pM; o de aproximadamente 900 pM a aproximadamente 200 pM; o de aproximadamente 900 pM a aproximadamente 300 pM; o de aproximadamente 900 pM a aproximadamente 400 pM; o de aproximadamente 900 pM a aproximadamente 500 pM; o de aproximadamente 900 pM a aproximadamente 600 pM; o de aproximadamente 900 pM a aproximadamente 700 pM; o de aproximadamente 200 pM a aproximadamente 100 pM; o de aproximadamente 300 pM a aproximadamente 200 pM; o de aproximadamente 400 pM a aproximadamente 300 pM. En algunos otros casos, el agente de unión específica se une a B7-H1 con una Kd de menos de 90 pM, 80 pM, 70 pM, 60 pM, 50 pM o 55pM. En algunos otros casos, el agente de unión específica se une a B7-H1 con una Kd de menos de 60 pM. En algunos otros casos, el agente de unión específica se une a B7-H1 con una Kd de menos de 55 pM. Además, en algunos otros casos, los anticuerpos de la descripción se unen a B7-H1 con una Kd de aproximadamente 100 pM a aproximadamente 50 pM; o de aproximadamente 100 pM a aproximadamente 70 pM; o de aproximadamente 100 pM a aproximadamente 80 pM; o de aproximadamente 100 pM a aproximadamente 90 pM; o de aproximadamente 70 pM a aproximadamente 50 pM; o de aproximadamente 60 pM a aproximadamente 50 pM; o de aproximadamente 55 pM a aproximadamente 50 pM. La Kd se puede evaluar utilizando un procedimiento descrito en este documento o conocido por un experto en la técnica (por ejemplo, un ensayo de BIAcore, ELISA) (Biacore International AB, Uppsala, Suecia). Los agentes de unión específica de la descripción tienen afinidades de unión considerablemente mejoradas para B7-H1 en comparación con los anticuerpos indicados en la técnica anterior.

[0031] Las propiedades de unión del agente de unión específica o anticuerpo de la descripción también se pueden medir mediante referencia a las velocidades de disociación o asociación (k_{off} y k_{on} respectivamente).

[0032] En un caso de la descripción, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción pueden tener una velocidad de k_{on} (anticuerpo (Ab) + antígeno (Ag)^{km} → Ab-Ag) de al menos $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, al menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, o al menos $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, tal como se mide mediante un ensayo BIAcore. Además, en algunos otros casos, los anticuerpos de la descripción tienen una velocidad k_{on} de aproximadamente $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a aproximadamente $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; o de aproximadamente $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a aproximadamente $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; o de aproximadamente $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a aproximadamente $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; o de aproximadamente $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a aproximadamente $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, tal como se mide mediante un ensayo BIAcore.

[0033] En otro caso de la descripción, el agente de unión específica o un anticuerpo pueden tener una velocidad k_{off} ((Ab-Ag)^{koff} → anticuerpo (Ab) + antígeno (Ag)) de menos de $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-1} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-2} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-3} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-4} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-5} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-6} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-7} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-8} s^{-1} , menos de $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$, menos de 10^{-9} s^{-1} , o menos de 10^{-10} s^{-1} , tal como se mide mediante un ensayo BIAcore. Además, en algunos otros casos, los anticuerpos de la descripción tienen una velocidad k_{off} de aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a aproximadamente $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; o de aproximadamente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ a aproximadamente $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, tal como se mide mediante un ensayo BIAcore.

[0034] El agente de unión específica de la descripción se une específicamente a B7-H1 humana. En algunos ejemplos, el agente de unión específica de la descripción no se une otras proteínas inmune co-moduladores, por ejemplo, PD-L2 humana, B7-H2 humana, B7-H3 humana, CD28 humana, CTLA-4 humana y PD1 humana.

[0035] En otro caso, el agente de unión específica de la descripción es de reacción cruzada con otras proteínas B7-H1 de otras especies. En un caso, el agente de unión específica de la descripción es de reacción cruzada con B7-H1 de mono cynomolgus. En otro caso, el agente de unión específica de la descripción es de reacción cruzada con la B7-H1 de ratón, por ejemplo, 2.7A4. En otro caso, el agente de unión específica de la descripción es de reacción cruzada con B7-H1 de mono cynomolgus y con el B7-H1 de ratón, por ejemplo, 2.7A4. En otro caso, el agente de unión específica de la descripción es de reacción cruzada con B7-H1 de mono cynomolgus, pero no con B7-H1 de ratón, por ejemplo, 2.9D10 y 2.14H9.

[0036] En un caso, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende cualquiera de las secuencias de la cadena pesada (VH) que se muestra en la Tabla 8. En otro caso, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende una cualquiera de las secuencias de cadena pesada de los anticuerpos 2.9D10, 2.7A4, 2.14H9, 3.15G8, 2.20A8, 3.18G1, 2.7A4OPT, o 2.14H9OPT. La promiscuidad de la cadena ligera está bien establecida en la técnica, por lo tanto, un agente de unión específica o un anticuerpo que comprende una secuencia que comprende cualquiera de las secuencias de cadena pesada de anticuerpos 2.9D10, 2.7A4, 2.14H9, 3.15G8, 2.20A8, 3.18G1, 2.7A4OPT, o 2.14H9OPT, u otro anticuerpo como se describe en el presente documento, pueden comprender además cualquiera de las secuencias de cadena ligera (VL) que se muestran en la Tabla 9 o de los anticuerpos 2.9D10, 2.7A4, 2.14H9, 3.15G8, 2.20A8, 3,18 G1, 2.7A4OPT o 2.14H9OPT, u otro anticuerpo como se describe en el presente documento. En otro caso, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende cualquiera de las secuencias de cadena pesada

de anticuerpos 2.9D10, 2.7A4, 2.14H9, 3.15G8, 2.20A8, 3.18G1, 2.7A4OPT, o 2.14H9OPT y que comprende además la secuencia de la cadena ligera correspondiente del anticuerpo 2.9D10, 2.7A4, 2.14H9, 3.15G8, 2.20A8, 3.18G1, 2.7A4OPT, o 2.14H9OPT. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal totalmente humano.

5 [0037] En un caso, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende cualquiera de las secuencias de cadena ligera que se muestran en la Tabla 9. En otro caso, el agente de unión específica o el anticuerpo comprende una secuencia que comprende cualquiera de las secuencias de cadena ligera de los anticuerpos 2.9D10, 2.7A4, 2.14H9, 3.15G8, 2.20A8, 3.18G1, 2.7A4OPT, o 2.14H9OPT. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal totalmente humano.

10 [0038] En otro caso, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende cualquiera de las secuencias de cadena pesada de anticuerpo 2.7A4 y que comprende además la secuencia de cadena ligera de anticuerpo 2.7A4. En otro caso, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende cualquiera de la secuencia de cadena pesada del anticuerpo 2.14H9 y que comprende además la secuencia de cadena ligera de anticuerpo 2.14H9. En otro caso, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende cualquiera de las secuencias de cadena pesada de anticuerpo 2.9D10 y que comprende además la secuencia de cadena ligera de anticuerpo 2.9D10. En otro caso, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende cualquiera de las secuencias de cadena pesada de anticuerpo 2.7A.4OPT y que comprende además la secuencia de cadena ligera de anticuerpo 2.7A.4OPT. En otro caso, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende cualquiera de las secuencias de cadena pesada de anticuerpo 2.14H9OPT y que comprende además la secuencia de cadena ligera de anticuerpo 2.14H9OPT.

15 [0039] En algunos casos, el agente de unión específica es cualquiera de los anticuerpos monoclonales como se muestra en la Tabla 1. En algunos casos, el agente de unión específica es un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en: 2.7A4, 2.14H9, 2.9 D10, 2.7A4OPT o 2.14H9OPT. En un caso, el agente de unión específica comprende uno o más de los anticuerpos monoclonales completamente humanos 2.7A4, 2.14H9, 2.9D10, 2.7A4OPT o 2.14H9OPT. En ciertos casos, el agente de unión específica es un anticuerpo monoclonal 2.7A4. En ciertos otros casos, el agente de unión específica es un anticuerpo monoclonal 2.14H9. En aún otros casos, el agente de unión específica es anticuerpo monoclonal 2.9D10. En ciertos casos, el agente de unión específica es anticuerpo monoclonal 2.7A4OPT. En ciertos otros casos, el agente de unión específica es anticuerpo monoclonal 2.14H9OPT. En casos adicionales, el agente de unión específica es derivable de cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores.

20 [0040] En otro caso, el agente de unión específica puede comprender una secuencia que comprende una cualquiera de las CDR1, CDR2 o CDR3 de las secuencias variables de la cadena pesada codificadas por un polinucleótido en un plásmido designado 2.7A4_G, 2.14H9_G, y 2.9D10_NG que fueron depositados en NCIMB con el número 41598, el 19 de noviembre de 2008, con el número 41597 el 19 de noviembre de 2008, y con el número 41599, el 19 de noviembre de 2008, respectivamente.

25 [0041] En otro caso, el agente de unión específica puede comprender una secuencia que comprende una cualquiera de las CDR1, CDR2 o CDR3 de las secuencias de dominio variable de cadena ligera codificadas por un polinucleótido en un plásmido designado 2.7A4_G, 2.14H9_G y 2.9D10_NG que fueron depositados con el número 41598, el 19 de noviembre de 2008, con el número 41597, el 19 de noviembre de 2008, o con el número 41599 el 19 de noviembre de 2008, respectivamente.

30 [0042] En un caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR3 codificada por el polinucleótido en el plásmido designado 2.7A4_G que fue depositado en la NCIMB bajo el número de depósito 41598 el 19 de noviembre de 2008 y una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera que comprende una CDR3 codificada por el polinucleótido en el plásmido designado 2.7A4_G que fue depositado en la NCIMB bajo el número de depósito 41598 el 19 de noviembre de 2008.

35 [0043] En otro caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada que comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres de las CDR del anticuerpo codificadas por el polinucleótido en plásmido designado 2.7A4_G que fue depositado en la NCIMB bajo el número de depósito 41598 el 19 de noviembre de 2008.

40 [0044] En otro caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera que comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres de las CDR del anticuerpo codificadas por el polinucleótido en plásmido designado 2.7A4_G que fue depositado en la NCIMB bajo el número de depósito 41598 el 19 de noviembre de 2008.

45 [0045] En otro caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada que comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres

de las CDR del anticuerpo codificadas por el polinucleótido en plásmido 2.7A4_G designado que fue depositado en la NCIMB bajo el número de depósito 41598 el 19 de noviembre de 2008 y una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera que comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres de las CDR del anticuerpo codificadas por el polinucleótido en el plásmido designado 2.7A4_G que fue depositado en la NCIMB bajo el número de depósito 41598 el 19 de noviembre 19 de 2008.

[0046] En un caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR3 codificada por el polinucleótido en el plásmido designado 2.14H9_G que fue depositado en el NCIMB con el número 41597 el 19 de noviembre de 2008.

[0047] En un caso, el agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada que comprende una CDR3 codificada por el polinucleótido en el plásmido designado 2.14H9_G que fue depositado en el NCIMB con el número 41597, el 19 de noviembre de 2008, y una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera que comprende una CDR3 codificada por el polinucleótido en el plásmido designado 2.14H9_G que fue depositado en el NCIMB con el número 41597 el 19 de noviembre 19 de 2008.

[0048] En otro caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada que comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres de las CDR del anticuerpo codificadas por el polinucleótido en plásmido designado 2.14H9_G que fue depositado en el NCIMB con el número 41597 el 19 de noviembre de 2008.

[0049] En otro caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera que comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres de las CDR del anticuerpo codificadas por el polinucleótido en plásmido designado 2.14H9_G que fue depositado en el NCIMB con el número 41597 el 19 de noviembre de 2008.

[0050] En otro caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada que comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres de las CDR del anticuerpo codificadas por el polinucleótido en plásmido 2.14H9_G designado que fue depositado en el NCIMB con el número 41597 el 19 de noviembre de 2008 y una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera que comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres de las CDR del anticuerpo codificadas por el polinucleótido en el plásmido designado 2.14H9_G que fue depositado en el NCIMB con el número 41597 el 19 de noviembre de 2008.

[0051] En un caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR3 codificada por el polinucleótido en el plásmido designado 2.9D10_NG que fue depositado en el NCIMB con el número 41599 el 19 de noviembre de 2008.

[0052] En un caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR3 codificada por el polinucleótido en el plásmido designado 2.9D10_NG que fue depositado en el NCIMB con el número 41599 el 19 de noviembre de 2008 y una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera que comprende una CDR3 codificada por el polinucleótido en el plásmido designado 2.9D10_NG que fue depositado en el NCIMB con el número 41599 el 19 de noviembre de 2008.

[0053] En otro caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada que comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres de las CDR del anticuerpo codificadas por el polinucleótido en plásmido designado 2.9D10_NG que fue depositado en el NCIMB con el número 41599 el 19 de noviembre de 2008.

[0054] En otro caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera que comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres de las CDR del anticuerpo codificada por el polinucleótido en plásmido designado 2.9D10_NG que fue depositado en el NCIMB con el número 41599 el 19 de noviembre de 2008.

[0055] En otro caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada que comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres de las CDR del anticuerpo codificadas por el polinucleótido en plásmido 2.9D10_NG designado que fue depositado en el NCIMB con el número 41599 el 19 de noviembre de 2008 y una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera que comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres de las CDR del anticuerpo codificadas por el polinucleótido en el plásmido designado 2.9D10_NG que fue depositado en el NCIMB con el número 41599 el 19 de noviembre de 2008.

- [0056] En otro caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo codificada por el polinucleótido en el plásmido designado 2.7A4_G que se depositó en el número NCIMB 41598 el 19 de noviembre de 2008.
- 5 [0057] En otro caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo codificada por el polinucleótido en el plásmido designado 2.14H9_G que fue depositado en el NCIMB con el número 41597 el 19 de noviembre de 2008.
- 10 [0058] En otro caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende una secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo codificada por el polinucleótido en el plásmido designado 2.9D10_NG que fue depositado en el NCIMB con el número 41599 el 19 de noviembre de 2008.
- 15 [0059] En otro caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo codificado por el polinucleótido en el plásmido designado 2.7A4_G que fue depositado en el NCIMB con el número 41598 el 19 de noviembre 2008.
- 20 [0060] En otro caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo codificado por el polinucleótido en el plásmido designado 2.14H9_G que fue depositado en el NCIMB con el número 41597 el 19 de noviembre 2008.
- 25 [0061] En otro caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende un dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo codificado por el polinucleótido en el plásmido designado 2.9D10_NG que fue depositado en el NCIMB con el número 41599 el 19 de noviembre de 2008.
- 30 [0062] En otro caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo codificada por el polinucleótido en el plásmido designado 2.7A4_G que fue depositado en el NCIMB con el número 41598 el 19 de noviembre de 2008 y una secuencia de dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo codificada por el polinucleótido en el plásmido designado 2.7A4_G que fue depositado en el NCIMB con el número 41598 el 19 de noviembre 2008.
- 35 [0063] En otro caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende una secuencia de dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo codificada por el polinucleótido en el plásmido designado 2.14H9_G que fue depositado en el NCIMB con el número 41597 el 19 de noviembre de 2008 y una secuencia de dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo codificada por el polinucleótido en el plásmido designado 2.14H9_G que fue depositado en el NCIMB con el número 41597 el 19 de noviembre de 2008.
- 40 [0064] En otro caso, un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo codificada por el polinucleótido en el plásmido designado 2.9D10_NG que fue depositado en el NCIMB con el número 41599 el 19 de noviembre de 2008 y una secuencia de dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo codificada por el polinucleótido en el plásmido designado 2.9D10_NG que fue depositado en el NCIMB con el número 41599 el 19 de noviembre de 2008.
- 45 [0065] En un caso, un agente de unión específica o un anticuerpo puede comprender una secuencia que comprende una CDR1 de cadena pesada (HCDR1), una CDR2 de cadena pesada (HCDR2) y una CDR3 de cadena pesada (HCDR3) seleccionada de una cualquiera de las secuencias que se muestran en la Tabla 8. En un caso, un agente de unión específica o un anticuerpo puede comprender una secuencia que comprende una CDR1 de cadena ligera (LCDR1), una CDR2 de cadena ligera (LCDR2) y una CDR3 de cadena ligera (LCDR3) seleccionada de una cualquiera de las secuencias que se muestran en la Tabla 9. En un caso, un agente de unión específica o un anticuerpo puede comprender una secuencia que comprende una HCDR1, HCDR2 y HCDR3 seleccionada de una cualquiera de las CDR de anticuerpos 2.9D10, 2.7A4, 2.14H9, 3.15G8, 2.20A8, o 3.18G1. En un caso, un agente de unión específica o un anticuerpo puede comprender una secuencia que comprende una LCDR1, LCDR2 y LCDR3 seleccionada de una cualquiera de las CDR de anticuerpos 2.9D10, 2.7A4, 2.14H9, 3.15G8, 2.20A8, o 3.18G1.
- 50 [0066] Un caso adicional es un agente de unión específica o un anticuerpo que se une específicamente a B7-H1 y comprende una secuencia que comprende una de las secuencias de CDR2 y una de las secuencias de CDR3 mostradas en la Tabla 9. En un caso adicional, el agente de unión específica o anticuerpo comprende además una secuencia que comprende: una secuencia de CDR2 y una secuencia de CDR3 como se muestra en la Tabla 8 y/o en la Tabla 9. En un caso adicional, el agente de unión específica o el anticuerpo comprende además una secuencia que comprende: una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3 tal como se muestran en la Tabla 8 y/o en la Tabla 9.
- 55 [0067] En otro caso, el agente de unión específica o anticuerpo puede comprender una secuencia que comprende una cualquiera de una CDR1, una CDR2 o una CDR3 de uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales completamente humanos 2.7A4, 2.14H9 o 2.9D10, tal como se muestra en la Tabla 8. En otro caso, el agente de unión específica o anticuerpo puede comprender una secuencia que comprende una cualquiera de una CDR1, una
- 60
- 65

CDR2 o una CDR3 de uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales completamente humanos 2.7A4, 2.14H9 o 2.9D10, tal como se muestra en la Tabla 9. En un caso, el agente de unión específica o anticuerpo puede comprender una secuencia que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de uno cualquiera de anticuerpos monoclonales completamente humanos 2.7A4, 2.14H9, 2.9D10, 2.7A4OPT o 2.14H9OPT, tal como se muestra en la

5 Tabla 8. En otro caso, el agente de unión específica o anticuerpo puede comprender una secuencia que comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales completamente humanos 2.7A4, 2.14H9, 2.9D10, 2.7A4OPT o 2.14H9OPT, tal como se muestra en la Tabla 9.

En otro caso, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende la secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 de 2.7A4 anticuerpo monoclonal totalmente humano como se muestra en la Tabla 8 y la

10 secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 de anticuerpo monoclonal totalmente humano 2.7A4, tal como se muestra en la Tabla 9. En otro caso, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende la secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 de anticuerpo monoclonal totalmente humano 2.14H9, tal como se muestra en la Tabla 8 y una secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 de anticuerpo monoclonal totalmente humano 2.14H9, tal como se muestra en la Tabla 9. En otro caso, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que

15 comprende la secuencia de CDR1, CDR2 y CDR3 de anticuerpo monoclonal totalmente humano 2.9D10, tal como se muestra en la Tabla 8 y la secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 de anticuerpo monoclonal totalmente humano 2.9D10, tal como se muestra en la Tabla 9. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal totalmente humano.

20 **[0068]** Se observa que los expertos en la técnica pueden lograr fácilmente determinaciones de CDR. Véase por ejemplo, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, NIH Publicación 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. Kabat ofrece múltiples alineamientos de secuencias de cadenas de inmunoglobulina para numerosas especies de isotipos de anticuerpos. Las secuencias alineadas se numeran según un único sistema de numeración, el sistema de numeración de Kabat. Las secuencias de Kabat se han actualizado desde la

25 publicación en 1991 y están disponibles como una base de datos electrónica de secuencias (actualmente disponible en el sitio web de la base de datos de Kabat; ver también Nucleic Acids Research, 2000, 28 (1), 214-218). Cualquier secuencia de inmunoglobulina puede enumerarse según Kabat mediante la realización de una alineación con la secuencia de referencia Kabat. Por consiguiente, el sistema de numeración de Kabat proporciona un sistema uniforme para la enumeración de cadenas de inmunoglobulina.

30 **[0069]** Un caso adicional de la descripción es un agente de unión específica o anticuerpo que comprende una secuencia que comprende la secuencia contigua que abarca las regiones de marco variable y CDR, específicamente desde FR1 hasta FR4 o CDR1 hasta CDR3, de una cualquiera de las secuencias de 2.9D10, 2.7 A4, 2.14H9, 3.15G8, 2.20A8, 3.18G1, 2.7A4OPT, o 2.14H9OPT, o como se muestra en la Tabla 8 o en la Tabla 9. Un caso

35 adicional de la descripción es un agente de unión específica o un anticuerpo que comprende una secuencia que comprende la secuencia contigua que abarca las regiones de marco variable y CDR, específicamente desde FR1 hasta FR4 o CDR1 hasta CDR3, de una cualquiera de las secuencias de 2.9D10, 2.7A4, 2.14H9, 3.15G8, 2.20A8, 3.18G1, 2.7A4OPT, o 2.14H9OPT o como muestra en la Tabla 8 y la Tabla 9. En un caso, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende las secuencias contiguas que abarcan las

40 regiones de marco variable y CDR, específicamente desde FR1 hasta FR4 o desde CDR1 hasta CDR3, de una cualquiera de las secuencias de anticuerpos monoclonales 2.9D10, 2.7A4, 2.14H9, 3.15G8, 2.20A8, 3.18G1, 2.7A4OPT, o 2.14H9OPT o tal como se muestra en la Tabla 8 o en la Tabla 9. Un caso adicional de la descripción es un agente de unión específica o anticuerpo que comprende una secuencia que comprende la secuencia contigua que abarca las regiones de marco variable y CDR, específicamente desde FR1 hasta FR4 o desde CDR1 hasta

45 CDR3, de una cualquiera de las secuencias de anticuerpos monoclonales 2.9D10, 2.7A4, 2.14H9, 3.15G8, 2.20A8, 3.18G1, 2.7A4OPT, o 2.14H9OPT o tal como se muestra en la Tabla 8 y la Tabla 9. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal totalmente humano.

50 **[0070]** En otro caso, un agente de unión específica o anticuerpo de la descripción comprende una secuencia de CDR3 como se muestra en la Tabla 8 o 9; o una cualquiera de una secuencia de CDR1, una CDR2 o una de CDR3 como se muestra en la Tabla 8 o 9; o una secuencia de CDR1, una CDR2 y una de CDR3 de una secuencia de dominio variable de cadena ligera como se muestra en la Tabla 8; o una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3 de una secuencia de dominio variable de cadena pesada como se muestra en la Tabla 9.

55 **[0071]** Un caso proporciona un agente de unión específica o anticuerpo, o parte del mismo de unión a antígeno, en el que el agente o el anticuerpo, o parte del mismo de unión a antígeno, comprende una secuencia que comprende la SEC ID No.: 2, SEQ ID NO.:7, SEQ ID NO.: 12, SEQ ID NO.: 17, SEQ ID NO.:22, SEQ ID NO.:27, SEQ ID NO.:32, SEQ ID NO.:37, SEQ ID NO.:42, SEQ ID NO.:47, SEQ ID NO.:52, SEQ ID NO.:57, SEQ ID NO.:62, SEQ ID NO.:67, SEQ ID NO.:72, o SEQ ID NO.:77.

60 **[0072]** Un caso proporciona un agente de unión específica o anticuerpo, o parte del mismo de unión a antígeno, en el que el agente o anticuerpo, o parte del mismo de unión a antígeno, comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID N°: 2. En un caso, el agente de unión específica o anticuerpo, o parte del mismo de unión a antígeno, comprende además una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de

65 SEQ ID NO.:7. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal totalmente humano.

[0085] En otro caso, el agente de unión específica o anticuerpo, o parte del mismo de unión a antígeno, comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos un 90% de identidad con la de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67.

[0086] En otro caso, el agente de unión específica o anticuerpo, o parte del mismo de unión a antígeno, comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO.:72. En otro caso, el agente de unión específica o anticuerpo, o parte del mismo de unión a antígeno, comprende además una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO.:77. En algunos casos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal totalmente humano. En la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72, un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77

[0087] En otro caso, el agente de unión específica o anticuerpo, o parte del mismo de unión a antígeno, comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene al menos un 90% de identidad con la de aminoácidos de SEQ ID NO: 72 y comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77.

[0088] En un caso, el agente de unión específica o el anticuerpo comprende variantes o derivados de las CDR descritas en este documento, las secuencias contiguas que abarcan las regiones de marco variable y CDR (específicamente desde FR1 hasta FR4 o desde CDR1 hasta CDR3), las secuencias de cadenas ligeras o pesadas descritas en el presente documento, o los anticuerpos descritos en el presente documento. Las variantes incluyen agentes de unión específica o anticuerpos que comprenden secuencias que tiene hasta veinte, dieciséis, diez, nueve o menos, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis adiciones, sustituciones, deleciones, y/o inserciones de aminoácidos en cualquiera de las CDR1, CDR2 o CDR3 como se muestra en la Tabla 8 o en la Tabla 9, las secuencias contiguas abarcando las regiones marco variable y CDR (específicamente desde FR1 hasta FR4 o desde CDR1 hasta CDR3) como se muestra en la Tabla 8 o en la Tabla 9, las secuencias de cadena ligera o pesada descritas en el presente documento, o con los anticuerpos monoclonales descritos en este documento. Las variantes incluyen agentes de unión específica o anticuerpos que comprenden secuencias que tienen una, dos o tres, adiciones, sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en cualquiera de las CDR1, CDR2 o CDR3 como se muestra en la Tabla 8 o en la Tabla 9, las secuencias contiguas abarcando las regiones de marco variable y CDR (específicamente desde FR1 hasta FR4 o desde CDR1 hasta CDR3), tal como se muestra en la Tabla 8 o en la Tabla 9, las secuencias de cadena ligera o pesada descritas en el presente documento, o con los anticuerpos monoclonales descritos en este documento. Las variantes incluyen agentes de unión específica o anticuerpos que comprenden secuencias que tienen al menos aproximadamente 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 o aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con cualquiera de las CDR1, CDR2 o CDR3, tal como se muestra en la Tabla 8 o Tabla 9, las secuencias contiguas abarcando las regiones marco variable y CDR (específicamente de FR1 a FR4 o de CDR1 a CDR3), tal como se muestra en la Tabla 8 o en la Tabla 9, las secuencias de cadena ligera o pesada descritas en el presente documento, o con los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento. El porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos se puede determinar por cualquier procedimiento conocido para un experto en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, alineación de proteína por parejas. En un caso, las variantes comprenden cambios en las secuencias de CDR o secuencias de cadena ligera o pesada descritas en este documento que son de origen natural o se introducen por modificación genética in vitro de secuencias nativas utilizando técnicas de ADN recombinante o técnicas de mutagénesis. Las variantes de origen natural incluyen las que se generan in vivo en las secuencias de nucleótidos de la línea germinal correspondientes durante la generación de un anticuerpo a un antígeno extraño.

[0089] En un caso, las variantes incluyen agentes de unión específica o anticuerpos que comprenden secuencias que tienen (a) una CDR1 de VH que tienen una secuencia de aminoácidos idéntica a o que comprende 1, 2, o 3 sustituciones de residuos de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 3;
 (b) una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a o que comprende 1, 2, o 3 sustituciones de residuos de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 4;
 (c) una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a o que comprende 1, 2, o 3 sustituciones de residuos de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 5;
 (d) una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a o que comprende 1,2, o 3 sustituciones de residuos de aminoácidos en relación con a CDR1 de VL de SEQ ID NO: 8;
 (e) una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a o que comprende 1, 2, o 3 sustituciones de residuos de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 9; y
 (f) una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a o que comprende 1, 2, ó 3 sustituciones de residuos de aminoácidos con relación a la SEQ ID NO: 10.

[0090] En otro caso, las variantes incluyen agentes de unión específica o anticuerpos que comprenden secuencias que tienen (a) una CDR1 de VH que tienen una secuencia de aminoácidos idéntica a o que comprenden 1, 2, o 3 sustituciones de residuos de aminoácidos con relación a la SEQ ID NO: 23 ;
 (b) una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a o que comprende 1, 2, o 3 sustituciones de residuos de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 24;

(c) una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a o que comprende 1, 2, o 3 sustituciones de residuos de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 25;

(d) una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a o que comprende 1, 2, o 3 sustituciones de residuos de aminoácidos en relación con CDR1 de VL de SEQ ID NO: 28;

5 (e) una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a o que comprende 1, 2, o 3 sustituciones de residuos de aminoácidos con respecto a SEQ ID NO: 29; y

(f) una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a o que comprende 1, 2, ó 3 sustituciones de residuos de aminoácidos con relación a la SEQ ID NO: 30.

10 **[0091]** En un caso, el derivado puede ser un heteroanticuerpo, es decir, un anticuerpo en el que dos o más anticuerpos están unidos entre sí. Los derivados incluyen anticuerpos que han sido modificados químicamente. Los ejemplos incluyen la unión covalente de uno o más polímeros, tales como polímeros solubles en agua, hidratos de carbono ligados por N o ligados por O, azúcares, fosfatos, y/o otras moléculas semejantes. Los derivados se modifican de una manera que es diferente del anticuerpo de origen natural o inicial, ya sea en el tipo o localización de las moléculas unidas. Los derivados incluyen además la delección de uno o más grupos químicos que se encuentran naturalmente presentes en el anticuerpo.

20 **[0092]** En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO.: 2. En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica o el anticuerpo comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO.: 2, en el que la SEQ ID NO.: 2 comprende cualquiera de las combinaciones únicas de los residuos de línea germinal y no de la línea germinal indicados por cada fila de la Tabla 10. En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica o el anticuerpo comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO.: 2, en el que la SEQ ID NO.: 2 comprende uno cualquiera, dos cualesquiera, tres cualesquiera, cuatro cualesquiera o los cinco residuos de la línea germinal, como se indica en la Tabla 10. En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO.: 2, en el que la SEQ ID NO.: 2 comprende cualquiera de las combinaciones únicas de los residuos de línea germinal y no de la línea germinal indicados por cada fila de la Tabla 10. En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO.: 2, en el que la SEQ ID NO.: 2 comprende uno cualquiera, dos cualesquiera, tres cualesquiera, cuatro cualesquiera, cinco cualesquiera, o los cinco residuos de la línea germinal, tal como se indica en la Tabla 10.

35 **[0093]** En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO.: 7, en el que la SEQ ID NO.: 7 comprende cualquiera de las combinaciones únicas de residuos de la línea germinal y no de la línea germinal indicados por cada fila de la Tabla 11 y cualquiera de las combinaciones únicas de los residuos de la línea germinal y no de la línea germinal indicados por cada fila de la Tabla 11. En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO.: 7, en la que la SEQ ID NO.:7 comprende uno cualquiera, dos cualesquiera, tres cualesquiera, cuatro cualesquiera, cinco cualesquiera, para los cinco residuos de la línea germinal, tal como se indica en la Tabla 11.

40 **[0094]** En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO.: 12. En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica o el anticuerpo comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO.: 12, en el que la SEQ ID NO.: 12 comprende una cualquiera de las combinaciones únicas de residuos de la línea germinal y no de la línea germinal indicados por cada fila de la Tabla 12. En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica o el anticuerpo comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO.: 12, en la que SEQ ID NO.: 12 comprende uno cualquiera, dos cualesquiera o los dos residuos de la línea germinal, tal como se indica en la Tabla 12.

50 **[0095]** En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO.: 17. En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica o el anticuerpo comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO.: 17, en el que la SEQ ID NO.: 17 comprende cualquiera de las combinaciones únicas de residuos de la línea germinal y no de la línea germinal indicados por cada fila de la Tabla 13. En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica o el anticuerpo comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO.: 17, en el que la SEQ ID NO.: 17 comprende uno cualquiera, dos cualesquiera, tres cualesquiera, cuatro cualesquiera o los cuatro residuos de la línea germinal, tal como se indica en la Tabla 13.

60 **[0096]** En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO.: 27. En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica o el anticuerpo comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO.: 27, en el que la SEQ ID NO.: 27 comprende una cualquiera de las combinaciones únicas de residuos de la línea germinal y no de la línea germinal indicados por cada fila de la Tabla 14. En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica o el anticuerpo comprende una secuencia que comprende la SEQ ID NO.: 27, en el que la SEQ ID NO.: 27 comprende uno cualquiera, dos cualesquiera, tres cualesquiera o los tres residuos de la línea germinal, tal como se indica en la Tabla 14.

65

5 [0097] Un caso adicional de la descripción es un agente de unión específica o anticuerpo que compite por la unión a B7-H1 con el agente de unión específica o anticuerpo de la descripción. En otro caso de la descripción, existe un anticuerpo que compite por la unión a B7-H1 con el agente de unión específica o anticuerpo de la descripción. En otro caso, el agente de unión específica o anticuerpo compite por la unión a B7-H1 con uno cualquiera de anticuerpos monoclonales completamente humanos 2.7A4, 2.14H9 o 2.9D 10, 2.7A4OPT o 2.14H9OPT. "Compite" indica que el agente de unión específica o anticuerpo compite por la unión a B7-H1 con uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales completamente humanos 2.7A4, 2.14H9 o 2.9D10, 2.7A4OPT o 2.14H9OPT, es decir, la competencia es unidireccional.

10 [0098] Los casos de la descripción incluyen un agente de unión específica o anticuerpo que compite de forma cruzada con cualquiera de los anticuerpos monoclonales completamente humanos 2.7A4, 2.14H9 o 2.9D10, 2.7A4OPT o 2.14H9OPT para la unión a B7-H1. "Compite de forma cruzada" indica que el agente de unión específica o anticuerpo compite por la unión a B7-H1 con uno cualquiera de anticuerpos monoclonales completamente humanos 2.7A4, 2.14H9 o 2.9D10, 2.7A4OPT o 2.14H9OPT, y viceversa, es decir, la competencia es bidireccional.

15 [0099] Un caso adicional de la descripción es un agente de unión específica o anticuerpo que se une al mismo epítipo o epítopos en el dominio extracelular de B7-H1 humana que el agente de unión específica o anticuerpo de la descripción. Los casos de la descripción también incluyen un agente de unión específica o anticuerpo que se une al mismo epítipo o epítopos en el dominio extracelular de B7-H1 humana que uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales completamente humanos 2.7A4, 2.14H9 o 2.9D10, 2.7A4OPT o 2,14 H9OPT.

20 [0100] En un caso, el agente de unión específica o el anticuerpo se une a un epítipo en B7-H1 humana que incluye al menos uno o más de los siguientes aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Asp en la posición 122 y Arg en la posición 125. En otro caso, un anticuerpo de la descripción se une a un epítipo en B7-H1 humana que comprende al menos dos de los siguientes tres residuos de aminoácidos de Asp en la posición 122, Arg en la posición 125 y Arg en la posición 113. En otro caso, el anticuerpo se une a un epítipo en B7-H1 humana, en el que el anticuerpo no muestra ninguna unión a Ile en la posición 54, Ser en la posición 117 y Ala en la posición 121 en B7-H1 humana. En aún un caso más, un anticuerpo de la descripción pierde su capacidad para unirse a B7-H1 humana si la Arg en la posición 113 está mutada a Ala, o a una Tyr, o a una Leu, tal como se determina por un ensayo de competición en comparación a la unión a B7-H1 de tipo salvaje. En aún un caso más, un anticuerpo de la descripción pierde su capacidad para unirse a B7-H1 humana si la Arg en la posición 125 está mutada a Ala, o a una Gln, o a una Ser, tal como se determina por un ensayo de competición en comparación a la unión a B7-H1 de tipo salvaje. En aún un caso más, un anticuerpo de la descripción retiene su capacidad para unirse a B7-H1 humana si la Arg en la posición 123 está mutada a una Ala, o a una Phe, o a una Thr, tal como se determina por un ensayo de competición en comparación a la unión a B7-H1 de tipo salvaje. En este caso, el anticuerpo es 2.14H9. En otro caso, el anticuerpo es 2.14H9OPT.

25 [0101] En un caso, el agente de unión específica o el anticuerpo se une a un epítipo en el dominio extracelular de B7-H1 humana que comprende al menos uno o más de los siguientes aminoácidos Asp en la posición 122 y Thr en la posición 20. En un caso, el anticuerpo se une a al menos dos de las siguientes tres residuos de aminoácidos de Phe en la posición 19, Thr en la posición 20 y Asp en la posición 122 en B7-H1 humana. En otro caso, no muestra unión a al menos uno de los siguientes tres residuos de aminoácidos de Ile en la posición 54, Met en la posición 115, Ser en la posición 117 y Ala en la posición 121 en B7-H1 humana. En aún un caso más, un anticuerpo de la descripción pierde su capacidad para unirse a B7-H1 humana si la Phe en la posición 19 se muta a una Ala, o a una Gly, o a una Ser, tal como se determina por un ensayo de competición en comparación a la unión a B7-H1 de tipo salvaje. En aún un caso más, un anticuerpo de la descripción pierde su capacidad para unirse a B7-H1 humana si la Thr en la posición 20 se muta a una Ala, o a una Val, o a un Asp, tal como se determina por un ensayo de competición en comparación a la unión a B7-H1 de tipo salvaje. En aún un caso más, un anticuerpo de la descripción pierde su capacidad de unirse a B7-H1 humana si el Asp en la posición 122 está mutado a una Asn, o a un Glu, tal como se determina por un ensayo de competición, en comparación con la unión a B7-H1 de tipo salvaje. En aún un caso más, un anticuerpo de la descripción retiene su capacidad para unirse a B7-H1 humana si la Arg en la posición 123 está mutada a una Ala, o a una Phe, o a una Thr, tal como se determina por un ensayo de competición en comparación a la unión a B7-H1 de tipo salvaje. En un ejemplo, el anticuerpo es 2.7A4. En otro caso, el anticuerpo es 2.7A4OPT.

30 [0102] En un caso, el agente de unión específica es un anticuerpo biespecífico. Un anticuerpo biespecífico es un anticuerpo que tiene especificidad de unión para al menos dos epítopos diferentes en el mismo o en diferentes proteínas. Los procedimientos para hacer anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Millstein et al, Nature, 305: 537-539 (1983); Trauneker et al, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991); Suresh et al, Methods in Enzymology, 121: 210 (1986); Kostelny et al, J. Immunol, 148 (5): 1547-1553 (1992); Hollinger et al, Proc Natl Sci USA., 90: 6.444-6.448 (1993) ; Gruber et al, J. Immunol., 152: 5368 (1994); Patente de Estados Unidos nº 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; 5.601.81; 95731168; 4.676.980; y 4.676.980, WO 94/04690; WO 91/00360; WO 92/200373; WO 93/17715; WO 92/08802; y EP 03089.)

65

[0103] Los casos de la descripción descrita en este documento se refieren a anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a B7-H1 y afectan a la función de B7-H1. Otros ejemplos se refieren a anticuerpos completamente humanos que se unen específicamente a B7-H1 y sus preparaciones con propiedades deseables desde una perspectiva terapéutica, incluyendo alta afinidad de unión para B7-H1, alta selectividad para la inhibición de la señalización de B7-H1, baja toxicidad, la capacidad de bloquear la actividad del receptor PD-1, la capacidad de inhibir la supervivencia de células tumorales inducida por B7-H1 a través de la supresión inmune, la capacidad de inhibir la represión de la inmunidad antitumoral mediada por B7-H1, que a su vez puede inhibir las enfermedades relacionadas con la proliferación o la invasión, incluyendo enfermedades neoplásicas, y/o la capacidad de las células tumorales para crecer in vitro e in vivo. Aún otros casos se refieren a un procedimiento de reprimir la inhibición de células T mediada por B7-H1 en un animal mediante la administración a un animal en necesidad del mismo de una cantidad eficaz de una composición que comprende los anticuerpos de la descripción. Aún otros casos se refieren a anticuerpos completamente humanos que se unen específicamente a B7-H1 y sus preparaciones que no resultan en una respuesta significativa de anticuerpos humanos anti-quiméricos (HACA), permitiendo de este modo la administración repetida.

[0104] En un caso de la descripción, se proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica cualquiera de los agentes de unión específica o anticuerpos de la descripción. En un caso es una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera o la cadena pesada de un anticuerpo de la descripción. En un caso la molécula de ácido nucleico codifica la cadena ligera o la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal totalmente humano de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. En un caso, la molécula de ácido nucleico codifica la cadena ligera o la cadena pesada de cualquiera de los anticuerpos monoclonales completamente humanos 2.7A4, 2.14H9, 2.9D10, 2.7A4OPT y 2.14H9OPT. En otro caso, la molécula de ácido nucleico codifica la cadena ligera y la cadena pesada de cualquiera de los anticuerpos monoclonales completamente humanos 2.7A4, 2.14H9, 2.9D10, 2.7A4OPT y 2.14H9OPT. La descripción también abarca polinucleótidos que se hibridan en condiciones de rigurosidad de hibridación rigurosas o más bajas, tal como se define en el presente documento, a polinucleótidos que codifican cualquiera de los agentes de unión específica o anticuerpos descritos en este documento.

[0105] En otro caso de la descripción, se proporciona un vector que comprende una molécula o moléculas de ácido nucleico que se han descrito anteriormente en este documento, en el que el vector codifica un agente de unión específica como se ha descrito anteriormente en este documento. En un caso de la descripción, se proporciona un vector que comprende una molécula o moléculas de ácido nucleico que se han descrito anteriormente en este documento, en el que el vector codifica una cadena ligera y/o una cadena pesada de un anticuerpo, tal como se define anteriormente en este documento. En un caso, el vector comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal totalmente humano. En un caso, el vector comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera o la cadena pesada de cualquiera de los anticuerpos monoclonales completamente humanos 2.7A4, 2.14H9, 2.9D10, 2.7A4OPT y 2.14H9OPT. En otro caso, el vector comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera y la cadena pesada de cualquiera de los anticuerpos monoclonales completamente humanos 2.7A4, 2.14H9, 2.9D10, 2.7A4OPT y 2.14H9OPT.

[0106] En un caso adicional, se proporciona una célula huésped transformada con cualquiera de las moléculas de ácido nucleico como se han descrito anteriormente. En otro caso de la descripción, se proporciona una célula huésped que comprende el vector que comprende la molécula de ácido nucleico como se ha descrito anteriormente. En un caso, la célula huésped puede comprender más de un vector.

[0107] Tal como se conoce en la técnica, los anticuerpos pueden ser ventajosamente, por ejemplo, anticuerpos policlonales, oligoclonales, monoclonales, quiméricos, humanizados, y/o anticuerpos completamente humanos.

[0108] Se entenderá que los casos de la descripción no se limitan a ninguna forma particular de un anticuerpo o procedimiento de generación o producción. En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica es un fragmento de unión de un anticuerpo monoclonal totalmente humano. Por ejemplo, el agente de unión específica puede ser un anticuerpo de longitud completa (por ejemplo, que tiene una región Fc humana intacta) o un fragmento de unión a anticuerpo (por ejemplo, un Fab, Fab' o F(ab')₂, Fv, dAb u otro fragmento de anticuerpo conocido, tal como se describe en más detalle a continuación). Además, los anticuerpos pueden ser anticuerpos de un solo dominio, tales como dominios VH o VL únicos camélidos o humanos que se unen a B7-H1, tal como un fragmento dAb.

[0109] Los casos de la descripción descritos en este documento también proporcionan células para producir estos anticuerpos. Ejemplos de células incluyen hibridomas, o células creadas de forma recombinante, tales como células ováricas de hámster chino (CHO), variantes de células CHO (por ejemplo DG44) y células NS0 que producir anticuerpos contra B7-H1. Información adicional sobre las variantes de células CHO se pueden encontrar en Andersen y Reilly (2004) Current Opinion in Biotechnology 15, 456-462.

[0110] El anticuerpo puede fabricarse a partir de un hibridoma que secreta el anticuerpo, o de una célula modificada genéticamente recombinante que ha sido transformada o transfectada con un gen o genes que codifican el anticuerpo.

5 [0111] Además, un caso de la descripción es un procedimiento para producir un agente de unión específica o un anticuerpo de la descripción mediante el cultivo de células huésped bajo condiciones en las que una molécula de ácido nucleico se expresa para producir el agente de unión específica o el anticuerpo seguido por la recuperación del agente de unión específica o anticuerpo. En un caso, es un procedimiento de producción de un anticuerpo de la descripción mediante el cultivo de células huésped bajo condiciones en las que una molécula de ácido nucleico se expresa para producir el anticuerpo, seguido de la recuperación del anticuerpo. Aún otros casos incluyen un anticuerpo de la descripción producido por el procedimiento de cultivar una célula huésped que expresa un anticuerpo codificado por una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la descripción, y aislar dicho anticuerpo a partir de dicho cultivo.

15 [0112] Debe tenerse en cuenta que los casos de la descripción también incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de un anticuerpo de la descripción, incluyendo secuencias de ácidos nucleicos optimizadas para aumentar los rendimientos de anticuerpos o fragmentos de los mismos cuando se transfectan en células huésped para la producción de anticuerpos.

20 [0113] Un caso adicional en este documento incluye un procedimiento de producir anticuerpos que se unen específicamente a B7-H1 e inhiben la actividad biológica de B7-H1, por inmunización de un mamífero con células que expresan B7-H1, membranas celulares aisladas que contienen B7-H1, B7-H1 purificada, o un fragmento de la misma, y/o una o más secuencias ortólogas o fragmentos de las mismas.

25 [0114] Un caso adicional en este documento incluye un procedimiento de producción de anticuerpos de alta afinidad que se unen específicamente a B7-H1 e inhiben la actividad biológica de B7-H1, por inmunización de un mamífero con células que expresan B7-H1, membranas celulares aisladas que contienen B7-H1, B7-H1 purificada, o un fragmento de la misma, y/o una o más secuencias ortólogas o fragmentos de las mismas.

30 [0115] Otros casos se basan en la generación e identificación de anticuerpos aislados que se unen específicamente a B7-H1 e inhiben la actividad biológica de B7-H1. B7-H1 se expresa en un número de tipos de tumores. Los anticuerpos que se unen específicamente a B7-H1 pueden prevenir la supervivencia de células tumorales mediada por B7-H1 e inhibir la represión de las respuestas inmunes anti-umorales mediada por B7-H1 a través de la supresión inmune, esto puede a su vez reducir la invasión, metástasis de células tumorales, crecimiento tumoral, y otras propiedades.

35 [0116] Además, el anticuerpo puede fabricarse a partir de un hibridoma que secreta el anticuerpo, o de una célula modificada genéticamente de forma recombinante que ha sido transformada o transfectada con un gen o genes que codifican el anticuerpo.

40 [0117] En un caso hay un hibridoma que produce el agente de unión específica o anticuerpo de la descripción. En un caso hay un hibridoma que produce la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo de la descripción. En un caso el hibridoma puede producir una cadena ligera y/o una cadena pesada de un anticuerpo monoclonal totalmente humano. En otro caso, el hibridoma produce la cadena ligera y/o la cadena pesada del anticuerpo monoclonal totalmente humano, 2.7A4, 2.14H9, 2.9D10, 2.7A4OPT y 2.14H9OPT. Alternativamente, el hibridoma puede producir un anticuerpo que se une al mismo epítipo o epítipos que el anticuerpo monoclonal totalmente humano 2.7A4, 2.14H9, 2.9D10, 2.7A4OPT y 2.14H9OPT. Alternativamente, el hibridoma puede producir un anticuerpo que compite por la unión a B7-H1 con anticuerpo monoclonal totalmente humano 2.7A4, 2.14H9, 2.9D10, 2.7A4OPT y 2.14H9OPT. Alternativamente, el hibridoma puede producir un anticuerpo que compite de forma cruzada para la unión a B7-H1 con anticuerpo monoclonal totalmente humano 2.7A4, 2.14H9, 2.9D10, 2.7A4OPT y 2.14H9OPT.

50 [0118] En otros casos, la presente descripción proporciona composiciones, incluyendo un agente de unión específica o anticuerpo de la descripción o un fragmento de unión del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

55 [0119] Todavía otros casos de la descripción incluyen procedimientos de tratamiento de una enfermedad proliferativa o relacionada con la invasión en un animal mediante la administración al animal de una dosis terapéuticamente eficaz de un agente de unión específica de la descripción. En ciertos casos, el procedimiento comprende además la selección de un animal en necesidad de tratamiento para una enfermedad proliferativa o relacionada con la invasión, y la administración al animal de una dosis terapéuticamente eficaz de un agente de unión específica de la descripción. En ciertos casos, el animal es humano. En ciertos casos, el agente de unión específica es un anticuerpo monoclonal totalmente humano. En ciertos casos, el agente de unión específica es un anticuerpo de la descripción y puede seleccionarse del grupo que consiste en 2.7A4, 2.14H9 o 2.9D10, 2.7A4OPT o 2.14H9OPT.

60 [0120] Todavía otros casos de la descripción incluyen procedimientos de inhibición de enfermedades relacionadas con la proliferación de células o la invasión celular, con un componente mediado por B7-H1, en un animal mediante la administración al animal de una dosis terapéuticamente eficaz de un agente de unión específica de la descripción. En ciertos casos, el procedimiento comprende además la selección de un animal en necesidad de tratamiento de una enfermedad relacionada con la proliferación o la invasión con un componente mediado por B7-H1, y administrar

a dicho animal una dosis terapéuticamente eficaz de un agente de unión específica de la descripción. En ciertos casos, el animal es humano. En ciertos casos, el agente de unión específica es un anticuerpo monoclonal totalmente humano. En ciertos casos, el agente de unión específica es un anticuerpo de la descripción y puede seleccionarse del grupo que consiste en 2.7A4, 2.14H9 o 2.9D10, 2.7A4OPT o 2.14H9OPT.

5
10
15
[0121] Todavía otros casos de la descripción incluyen procedimientos para inhibir la invasión de células tumorales, metástasis celular o el crecimiento tumoral en un animal administrando al animal una dosis terapéuticamente eficaz de un agente de unión específica de la descripción. En ciertos casos, el procedimiento comprende además la selección de un animal en necesidad de tratamiento para la invasión de células tumorales, metástasis celular o el crecimiento tumoral, y la administración al animal de una dosis terapéuticamente eficaz de un agente de unión específica de la descripción. En ciertos casos, el animal es humano. En ciertos casos, el agente de unión específica es un anticuerpo monoclonal totalmente humano. En ciertos casos, el agente de unión específica es un anticuerpo de la descripción y puede seleccionarse del grupo que consiste en 2.7A4, 2.14H9 o 2.9D10, 2.7A4OPT o 2.14H9OPT.

20
[0122] Todavía otros casos de la descripción incluyen procedimientos de tratamiento de un animal que padece una enfermedad neoplásica mediante la administración al animal de una dosis terapéuticamente eficaz de un agente de unión específica de la descripción. En ciertos casos, el procedimiento comprende además la selección de un animal en necesidad de tratamiento para una enfermedad neoplásica, y administrar al animal una dosis terapéuticamente eficaz de un agente de unión específica de la descripción.

25
[0123] Todavía otros casos de la descripción incluyen procedimientos de tratamiento de un animal que padece una enfermedad no neoplásica mediante la administración al animal de una dosis terapéuticamente eficaz de un agente de unión específica de la descripción. En ciertos casos, el procedimiento comprende además la selección de un animal en necesidad de tratamiento para una enfermedad no neoplásica, y administrar al animal una dosis terapéuticamente eficaz de un agente de unión específica de la descripción.

30
[0124] Todavía otros casos de la descripción incluyen procedimientos de tratamiento de un animal que padece una infección viral crónica, mediante la administración al animal de una dosis terapéuticamente eficaz de un agente de unión específica de la descripción. En ciertos casos, el procedimiento comprende además la selección de un animal en necesidad de tratamiento para la infección viral crónica, y administrar al animal una dosis terapéuticamente eficaz de un agente de unión específica de la descripción.

35
[0125] Todavía otros casos de la descripción incluyen procedimientos de tratamiento de un animal que padece un tumor maligno mediante la administración al animal de una dosis terapéuticamente eficaz de un agente de unión específica de la descripción. En ciertos casos, el procedimiento comprende además la selección de un animal en necesidad de tratamiento para un tumor maligno, y administrar al animal una dosis terapéuticamente eficaz de un agente de unión específica de la descripción.

40
45
[0126] Todavía otros casos de la descripción incluyen procedimientos de tratamiento de un animal que padece una enfermedad o afección asociada con la expresión de B7-H1 mediante la administración al animal de una dosis terapéuticamente eficaz de un agente de unión específica de la descripción. En ciertos casos, el procedimiento comprende además la selección de un animal en necesidad de tratamiento para una enfermedad o afección asociada con la expresión de B7-H1, y administrar al animal una dosis terapéuticamente eficaz de un agente de unión específica de la descripción.

50
55
[0127] Un tumor maligno puede seleccionarse del grupo que consiste en: tumores sólidos tales como melanoma, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón no de células pequeñas, glioma, carcinoma hepatocelular (hígado), cáncer de vesícula biliar, tumor de tiroides, cáncer de hueso, cáncer gástrico (estómago), cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de útero, cáncer de vulva, cáncer de endometrio, cáncer testicular, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, glioblastoma, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, carcinoma de esófago, cáncer cerebral/del SNC, cáncer de cabeza y cuello, cánceres neuronales, mesotelioma, sarcomas, biliar (colangiocarcinoma), adenocarcinoma del intestino delgado, tumores malignos pediátricos, carcinoma epidermoide, sarcomas, cáncer de las membranas pleurales/peritoneales y leucemia, incluyendo leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, y mieloma múltiple.

60
65
[0128] Las enfermedades proliferativas o relacionadas con la invasión tratables incluyen enfermedades neoplásicas, como melanoma, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón no de células pequeñas, glándula salival, glioma, carcinoma hepatocelular (hígado), cáncer de vesícula biliar, tumor de tiroides, cáncer de hueso, cáncer gástrico (estómago), cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, cáncer vulvar, cáncer endometrial, cáncer testicular, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, glioblastoma, cáncer de tiroides, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, carcinoma esofágico, cáncer de cerebro/SNC, cánceres neuronales, cáncer de cabeza y cuello, mesotelioma, sarcomas, biliar (colangiocarcinoma), adenocarcinoma de intestino delgado, neoplasias pediátricas, carcinoma epidermoide, sarcomas, cáncer de membranas pleurales/peritoneales y leucemia, que incluyen leucemia

mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda y mieloma múltiple. Las infecciones virales crónicas tratables incluyen VIH, virus de hepatitis B (VHB) y virus de hepatitis C (VHC) en humanos, virus de inmunodeficiencia simia (VIS) en monos y virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV) en ratones.

- 5 **[0129]** La invasión y/o la proliferación de células relacionadas con la enfermedad pueden ser cualquier invasión y/o proliferación celular anormal, indeseable o patológica, por ejemplo la invasión y/o proliferación de células relacionadas con el tumor.
- 10 **[0130]** En un caso, la enfermedad neoplásica es un tumor sólido seleccionado de uno cualquiera de los siguientes carcinomas de mama, colon, colorrectal, próstata, estómago, gástrico, de ovario, esófago, páncreas, vesícula biliar, cáncer de pulmón no de células pequeñas, tiroides, endometrio, cabeza y cuello, renal, carcinoma de células renales, vejiga y gliomas.
- 15 **[0131]** En un caso, la presente descripción es adecuada para usar en la inhibición de B7-H1, en pacientes con un tumor que depende solo, o en parte, de B7-H1.
- 20 **[0132]** Todavía otros casos de la descripción incluyen el uso de un agente de unión específica o anticuerpo de la descripción en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un animal que padece una enfermedad proliferativa o relacionada con la invasión. En ciertos casos, el uso comprende además la selección de un animal en necesidad de tratamiento para una enfermedad proliferativa o relacionada con la invasión.
- 25 **[0133]** Todavía otros casos de la descripción incluyen el uso de un agente de unión específica o anticuerpo de la descripción de la preparación de medicamento para el tratamiento de la proliferación o enfermedad relacionada con la invasión, con un componente mediado por B7-H1, en un animal. En ciertos casos, el uso comprende además la selección de un animal en necesidad de tratamiento para la proliferación o enfermedad relacionada con la invasión, con un componente mediado por B7-H1.
- 30 **[0134]** Todavía otros casos de la descripción incluyen el uso de un agente de unión específica o anticuerpo de la descripción de la preparación de medicamento para el tratamiento de la invasión de células tumorales, metástasis celular o el crecimiento tumoral en un animal. En ciertos casos, el uso comprende además la selección de un animal en necesidad de tratamiento para la invasión de células tumorales, metástasis celular o tumor.
- 35 **[0135]** Todavía otros casos de la descripción incluyen el uso de un agente de unión específica o anticuerpo de la descripción en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un animal que padece una enfermedad neoplásica. En ciertos casos, el uso comprende además la selección de un animal en necesidad de tratamiento para una enfermedad neoplásica.
- 40 **[0136]** Todavía otros casos de la descripción incluyen el uso de un agente de unión específica o anticuerpo de la descripción en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un animal que padece una enfermedad en la que la etiología está asociada con un agente infeccioso, tal como, por ejemplo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o cáncer de cuello uterino. En ciertos casos, el uso comprende además la selección de un animal en necesidad de tratamiento para una enfermedad neoplásica.
- 45 **[0137]** Todavía otros ejemplos de la descripción incluyen el uso de un agente de unión específica o anticuerpo de la descripción en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un animal que padece una enfermedad no neoplásica. En ciertos casos, el uso comprende además la selección de un animal en necesidad de tratamiento para una enfermedad no neoplásica.
- 50 **[0138]** Todavía otros ejemplos de la descripción incluyen el uso de un agente de unión específica o anticuerpo de la descripción en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un animal que sufre de una infección viral crónica. En ciertos casos, el uso comprende además seleccionar un animal en necesidad de tratamiento para una enfermedad no neoplásica. En aún otros casos, el uso comprende además enfermedad ocular, enfermedad inflamatoria, enfermedad cardiovascular y sepsis.
- 55 **[0139]** Todavía otros ejemplos de la descripción incluyen el uso de un agente de unión específica o anticuerpo de la descripción en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un animal que padece un tumor maligno. En ciertos casos, el uso comprende además seleccionar un animal en necesidad de tratamiento para un tumor maligno.
- 60 **[0140]** Todavía otros ejemplos de la descripción incluyen el uso de un agente de unión específica o anticuerpo de la descripción en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un animal que padece una enfermedad o afección asociada con la expresión de B7-H1. En ciertos casos, el uso comprende además seleccionar un animal en necesidad de tratamiento para una enfermedad o afección asociada con la expresión de B7-H1.

- [0141] Todavía otros ejemplos de la descripción incluyen un agente de unión específica o el anticuerpo de la descripción para usar como un medicamento para el tratamiento de un animal que padece una enfermedad proliferativa o relacionados con la invasión.
- 5 [0142] Todavía otros ejemplos de la descripción incluyen un agente de unión específica o anticuerpo de la descripción para usar como un medicamento para el tratamiento de un animal que padece la invasión de células tumorales, metástasis celular o el crecimiento tumoral en un animal.
- 10 [0143] Todavía otros ejemplos de la descripción incluyen un agente de unión específica o anticuerpo de la invención para usar como un medicamento para el tratamiento de un animal que padece una enfermedad o afección asociada con la expresión de B7-H1.
- 15 [0144] En un ejemplo, el tratamiento de una enfermedad proliferativa o relacionada con la invasión; una enfermedad neoplásica; una enfermedad no neoplásica; un tumor maligno; o una infección viral crónica; o una enfermedad o afección asociada con la expresión de B7-H1, comprende tratar, mejorar, prevenir, cualquiera de las enfermedades o afecciones mencionadas anteriormente.
- 20 [0145] En un caso, el tratamiento de una enfermedad neoplásica comprende la inhibición del crecimiento del tumor, retraso del crecimiento tumoral, regresión del tumor, encogimiento del tumor, aumento del tiempo para el recrecimiento del tumor tras el cese del tratamiento, el aumento de tiempo para la recurrencia del tumor, la desaceleración de la progresión de la enfermedad.
- 25 [0146] En un caso, el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con la expresión de B7-H1 comprende inhibir el crecimiento de células que expresan B7-H1.
- 30 [0147] En algunos casos, después de la administración del agente de unión específica o el anticuerpo de la descripción, se administra un agente aclarador para eliminar el exceso de anticuerpo circulante de la sangre.
- [0148] En algunos casos de la descripción, el animal a tratar es un humano.
- 35 [0149] En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica es un anticuerpo monoclonal totalmente humano.
- [0150] En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos monoclonales completamente humanos 2.7A4, 2.14H9 y 2.9D10.
- 40 [0151] Los casos de la descripción incluyen un conjugado que comprende el agente de unión específica como se describe en el presente documento, y un agente terapéutico. En algunos casos de la descripción, el agente terapéutico es una toxina. En otros casos, el agente terapéutico es un radioisótopo. En aún otros casos, el agente terapéutico es una composición farmacéutica.
- 45 [0152] En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para destruir selectivamente una célula cancerosa en un paciente. El procedimiento comprende la administración de un conjugado de anticuerpo completamente humano a un paciente. El conjugado de anticuerpo completamente humano comprende un anticuerpo que puede unirse a B7-H1 y un agente. El agente es o bien una toxina, un radioisótopo, u otra sustancia que destruye una célula de cáncer. El conjugado de anticuerpo de este modo destruye selectivamente la célula cancerosa.
- 50 [0153] En un aspecto, se proporciona un anticuerpo completamente humano conjugado que se une específicamente a B7-H1. Unido al anticuerpo está un agente, y la unión del anticuerpo a una célula da como resultado la administración del agente a la célula. En un caso, el anticuerpo completamente humano conjugado mencionado anteriormente se une a un dominio extracelular de B7-H1. En otro caso, el anticuerpo y la toxina conjugada son internalizados por una célula que expresa B7-H1. En otro caso, el agente es un agente citotóxico. En otro caso, el agente es, por ejemplo, saporina, o inmunoconjugados basados en auristatina, exotoxina de pseudomonas, gelonina, ricina, caliqueamicina o maitansina, y similares. En todavía otro caso, el agente es un radioisótopo.
- 55 [0154] El agente de unión específica o el anticuerpo de la descripción pueden administrarse solos, o pueden administrarse en combinación con anticuerpos adicionales o fármacos quimioterapéuticos o terapia de radiación o vacunas terapéuticas. Por ejemplo, una mezcla de anticuerpos monoclonal, oligoclonal o policlonal de B7-H1 que bloquean la represión de la inmunidad antitumoral mediada por B7-H1 se puede administrar en combinación con un fármaco que se ha demostrado que inhibe la proliferación de células tumorales.
- 60
- 65

[0155] Según otro aspecto de la descripción, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un agente de unión específica o anticuerpo de la descripción y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 [0156] Otro caso de la descripción incluye un procedimiento de diagnóstico de enfermedades o afecciones en las que se utiliza un anticuerpo como se describe en este documento para detectar la presencia y/o nivel de B7-H1 en un paciente o muestra del paciente. En un caso, la muestra del paciente es sangre o suero sanguíneo o la orina. En otros casos, se presentan los procedimientos para la identificación de factores de riesgo, el diagnóstico de la enfermedad, y estadificación de la enfermedad, que implican la identificación de la expresión y/o sobreexpresión de B7-H1 utilizando anticuerpos anti-B7-H1. En algunos casos, los procedimientos comprenden administrar a un
10 paciente un conjugado de anticuerpo completamente humano que se une selectivamente a B7-H1 en una célula. El conjugado de anticuerpo comprende un anticuerpo que se une específicamente a B7-H1 y un marcador. Los procedimientos comprenden además observar la presencia del marcador en el paciente. Una cantidad relativamente alta del marcador indicará un riesgo relativamente alto de la enfermedad y una cantidad relativamente baja del marcador indicará un riesgo relativamente bajo de la enfermedad. En un caso, el marcador es una proteína
15 fluorescente verde.

[0157] La descripción proporciona además procedimientos para ensayar la presencia y/o nivel de B7-H1 en una muestra de paciente, que comprenden poner en contacto un anticuerpo tal como se describe en este documento con una muestra biológica de un paciente, y detectar el nivel de unión entre dicho anticuerpo y B7-H1 en dicha muestra.
20 En los casos más específicos, la muestra biológica es sangre, plasma o suero.

[0158] Otro caso de la descripción incluye un procedimiento para diagnosticar una afección asociada con la expresión de B7-H1 en una célula poniendo en contacto el suero o una célula con un anticuerpo como se describe en el presente documento, y detectar después la presencia de B7-H1. En un caso, la afección puede ser una enfermedad proliferativa o relacionada con la invasión incluyendo, pero no limitado a, una enfermedad neoplásica.
25

[0159] En otro caso, la descripción incluye un kit de ensayo para la detección de B7-H1 en tejidos, células o fluidos corporales de mamíferos. Dicho kit sería útil para la detección de enfermedades relacionadas con B7-H1. El kit incluye un agente de unión específica o el anticuerpo de la descripción y un medio para indicar la reacción del agente de unión específica o anticuerpo con B7-H1, si está presente. En un caso, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En un caso, el anticuerpo que se une a B7-H1 está marcado. En otro caso, el anticuerpo es un anticuerpo primario no marcado y el kit incluye además un medio para detectar el anticuerpo primario. En un caso, los medios para detectar incluyen un segundo anticuerpo marcado que es un anticuerpo anti-inmunoglobulina. El anticuerpo puede marcarse con un marcador seleccionado del grupo que consiste en un fluorocromo, una enzima,
30 un radionúclido y un material radiopaco.
35

[0160] En algunos casos, los agentes de unión específica o anticuerpos descritos en el presente documento se pueden modificar para mejorar su capacidad de fijar el complemento y participar en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En otros casos, los agentes de unión específica o anticuerpos pueden ser modificados para mejorar su capacidad de activar las células efectoras y participar en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC). En aún otros casos, los agentes de unión específica o anticuerpos se pueden modificar tanto para mejorar su capacidad de activar las células efectoras y participar en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) como para mejorar su capacidad de fijar el complemento y participar en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).
40
45

[0161] En algunos casos, los agentes de unión específica o anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser modificados para reducir su capacidad de fijar el complemento y participar en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En otros casos, los agentes de unión específica o anticuerpos pueden ser modificados para reducir su capacidad de activar las células efectoras y participar en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC). En aún otros casos, los agentes de unión específica o anticuerpos descritos en el presente documento se pueden modificar tanto para reducir su capacidad de activar las células efectoras y participar en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) como para reducir su capacidad de fijar el complemento y participar en dependiente del complemento la citotoxicidad (CDC).
50

[0162] En ciertos casos, la semivida de un agente de unión específica o anticuerpo descrito en el presente documento y de las composiciones de la descripción es al menos aproximadamente 4 a 7 días. En ciertos casos, la semivida de un agente de unión específica o anticuerpo descrito en el presente documento y de las composiciones de la descripción es de al menos aproximadamente 2 a 5 días, de 3 a 6 días, 4 a 7 días, 5 a 8 días, 6 a 9 días, 7 a 10 días, 8 a 11 días, de 8 a 12, 9 a 13, 10 a 14, 11 a 15, 12 a 16, 13 a 17, 14 a 18, 15 a 19, o 16 a 20 días. En otros casos, la semivida de un agente de unión específica o anticuerpo descrito en el presente documento y de las composiciones de la descripción es de al menos aproximadamente 17 a 21 días, de 18 a 22 días, de 19 a 23 días, de 20 a 24 días, 21 a 25, día, de 22 a 26 días, de 23 a 27 días, de 24 a 28 días, de 25 a 29 días, o 26 a 30 días. En todavía otros casos, la semivida de un agente de unión específica o anticuerpo descrito en el presente documento y de composiciones de la descripción puede ser de hasta aproximadamente 50 días. En ciertos casos, las vidas medias de anticuerpos y las composiciones de la descripción pueden ser prolongadas por procedimientos conocidos en la técnica. Tal prolongación puede a su vez reducir la cantidad y/o frecuencia de dosificación de las
55
60
65

composiciones de anticuerpos. Los anticuerpos con semividas mejoradas in vivo y los procedimientos para su preparación se describen en la Patente de Estados Unidos N° 6.277.375; y publicaciones internacionales Nos. WO 98/23289 y WO 97/3461.

5 **[0163]** En otro caso, la descripción proporciona un artículo de fabricación que incluye un recipiente. El recipiente incluye una composición que contiene un agente de unión específica o un anticuerpo como se describe en el presente documento, y un prospecto o etiqueta que indica que la composición puede usarse para tratar enfermedades relacionadas con adhesión, invasión, angiogénesis y/o proliferación celular, incluyendo, pero no limitado a, enfermedades que se caracterizan por la expresión o sobreexpresión de B7-H1.

10 **[0164]** En otros casos, la descripción proporciona un kit para el tratamiento de enfermedades que implican la expresión de B7-H1, que comprende un agente de unión específica o un anticuerpo como se describe en el presente documento, y las instrucciones para administrar los anticuerpos monoclonales a un sujeto en necesidad de tratamiento.

15 **[0165]** La presente descripción proporciona la formulación de las proteínas que comprenden una región Fc variante. Es decir, una región Fc de origen no natural, por ejemplo una región Fc que comprende uno o más residuos de aminoácidos de origen no natural. También abarcados por las regiones Fc variantes de la presente descripción están las regiones Fc que comprenden deleciones, adiciones y/o modificaciones de aminoácidos.

20 **[0166]** La semivida en suero de las proteínas que comprenden las regiones Fc se puede aumentar mediante el aumento de la afinidad de unión de la región Fc para FcRn. En un caso, la proteína variante de Fc tiene una semivida en suero mejorada con respecto a la molécula comparable.

25 **[0167]** En otro caso, la presente descripción proporciona una variante de Fc, en donde la región Fc comprende al menos un aminoácido de origen no natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 239, 330 y 332, según se numeran por el índice EU, tal como se establece en Kabat. En un caso específico, la presente descripción proporciona una variante de Fc, en donde la región Fc comprende al menos un aminoácido de origen no natural seleccionado del grupo que consiste en 239D, 330L y 332E, según se numera por el índice EU, tal como se establece en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender además aminoácidos adicionales de origen no natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 252, 254, y 256, según se numeran por el índice EU, tal como se establece en Kabat. En un caso específico, la presente descripción proporciona una variante de Fc, en donde la región Fc comprende al menos un aminoácido de origen no natural seleccionado del grupo que consiste en 239D, 330L y 332E, según se numera por el índice EU, tal como se establece en Kabat y al menos un aminoácido de origen no natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 252Y, 254T y 256E, según se numera por el índice EU, tal como se establece en Kabat.

35 **[0168]** En otro caso, la presente descripción proporciona una variante de Fc, en donde la región Fc comprende al menos un aminoácido de origen no natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235 y 331, según se numeran por el índice EU, tal como se establece en Kabat. En un caso específico, la presente descripción proporciona una variante de Fc, en donde la región Fc comprende al menos un aminoácido de origen no natural seleccionado del grupo que consiste en 234F, 235F, 235Y, 235E y 331S, según se numeran por el índice EU, tal como se establece en Kabat. En un caso específico adicional, una variante de Fc de la descripción comprende los residuos de aminoácidos de origen no natural 234F, 235F, y 331S, según se numeran por el índice EU, tal como se establece en Kabat. En otro caso específico, una variante de Fc de la descripción comprende los residuos de aminoácidos de origen no natural 234F, 235Y, y 331S, según se numeran por el índice EU, tal como se establece en Kabat. En otro caso específico, una variante de Fc de la descripción comprende los residuos de aminoácidos de origen no natural 234F, 235E y 331S, según se numeran por el índice EU, tal como se establece en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender además aminoácidos adicionales de origen no natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 252, 254, y 256, según se numeran por el índice EU, tal como se establece en Kabat. En un caso específico, la presente descripción proporciona una variante de Fc, en donde la región Fc comprende al menos un aminoácido de origen no natural seleccionado del grupo que consiste en 234F, 235F, 235Y, 235E y 331S, según se numeran por el índice EU, tal como se establece en Kabat; al menos un aminoácido de origen no natural seleccionado del grupo que consiste en 234F, 235F, y 331S, según se numeran por el índice EU, tal como se expone en Kabat, y al menos un aminoácido de origen no natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 252Y, 254T y 256E, según se numeran por el índice EU, tal como se expone en Kabat. Tal como se usa en el presente documento, las designaciones "OPT" y "TM" son sinónimos y se utilizan para describir los anticuerpos de la descripción modificados genéticamente para introducir las tres mutaciones; L234F y L235E en la bisagra y P331S en el dominio CH2 de la molécula IgG para eliminar su capacidad para desencadenar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos y citotoxicidad dependiente del complemento (Oganessian V. et al. (2008), Acta Cryst., D64: 700-704).

50 **[0169]** En otro caso, la presente descripción proporciona una formulación de proteína variante de Fc, en donde la región Fc comprende al menos un aminoácido de origen no natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 239, 330 y 332, según se numeran por el índice EU, tal como se establece en Kabat. En un caso específico, la presente descripción proporciona una formulación de proteína variante de Fc, en donde la región

Fc comprende al menos un aminoácido de origen no natural seleccionado del grupo que consiste en 239D, 330L y 332E, según se numeran por el índice EU, tal como se establece en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender además aminoácidos adicionales de origen no natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 252, 254, y 256, según se numeran por el índice EU, tal como se establece en Kabat. En un caso específico, la presente descripción proporciona una formulación de proteína variante de Fc, en donde la región Fc comprende al menos un aminoácido de origen no natural seleccionado del grupo que consiste en 239D, 330L y 332E, según se numeran por el índice EU, tal como se establece en Kabat y al menos un aminoácido de origen no natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 252Y, 254T y 256E, según se numeran por el índice EU, tal como se establece en Kabat.

[0170] En otro caso, la presente descripción proporciona una formulación de proteína variante de Fc, en donde la región Fc comprende al menos un aminoácido de origen no natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235 y 331, según se numeran por el índice EU, tal como se establece en Kabat. En un caso específico, la presente descripción proporciona una formulación de proteína variante de Fc, en donde la región Fc comprende que ocurre al menos un aminoácido de origen no natural seleccionado del grupo que consiste en 234F, 235F, 235Y, 235E y 331S, según se numeran por el índice de EU, tal como se establece en Kabat. Opcionalmente, la región Fc puede comprender además aminoácidos adicionales de origen no natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 252, 254, y 256, según se numeran por el índice EU, tal como se establece en Kabat. En un caso específico, la presente descripción proporciona una formulación de proteína variante de Fc, en donde la región Fc comprende al menos un aminoácido de origen no natural seleccionado del grupo que consiste en 234F, 235F, 235Y, 235E y 331S, según se numeran por el índice de EU, tal como se establece en Kabat; y al menos un aminoácido de origen no natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 252Y, 254T y 256E, según se numeran por el índice EU, tal como se establece en Kabat.

[0171] Los procedimientos para generar regiones Fc de origen no natural son conocidos en la técnica. Por ejemplo, las sustituciones y/o deleciones de aminoácidos pueden ser generadas mediante procedimientos de mutagénesis, incluyendo, pero no limitado a, mutagénesis dirigida al sitio (Kunkel, Proc Natl Acad. Sci USA. 82: 488-492 (1985)), mutagénesis por PCR (Higuchi, en "PCR Protocols: A guide to methods and applications", Academic Press, San Diego, pp 177-183 (1990).), y la mutagénesis de casete (Wells et al, Gene 34: 315-323 (1985)). Preferiblemente, la mutagénesis dirigida al sitio se lleva a cabo por el procedimiento de PCR de solapamiento por extensión (Higuchi, en "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", Stockton Press, Nueva York, pp 61-70 (1989)). La técnica de PCR de solapamiento por extensión (Higuchi, *ibid.*) también se puede usar para introducir cualquier mutación deseada en una secuencia diana (el ADN de partida). Por ejemplo, la primera ronda de PCR en el procedimiento de extensión por solapamiento implica la amplificación de la secuencia diana con un cebador externo (cebador 1) y un cebador de mutagénesis interno (cebador 3), y por separado con un segundo cebador externo (cebador 4) y un cebador interno (cebador 2), produciendo dos segmentos de PCR (segmentos A y B). El cebador de mutagénesis interno (cebador 3) está diseñado para contener desajustes a la secuencia diana que especifican la mutación o mutaciones deseadas. En la segunda ronda de PCR, los productos de la primera ronda de PCR (segmentos A y B) se amplifican por PCR utilizando los dos cebadores externos (cebadores 1 y 4). El segmento de PCR de longitud completa resultante (segmento C) se digiere con enzimas de restricción y el fragmento de restricción resultante se clona en un vector apropiado. Como primera etapa de la mutagénesis, el ADN de partida (por ejemplo, que codifica una proteína de fusión Fc, un anticuerpo o simplemente una región Fc), se clona de manera operativa en un vector de mutagénesis. Los cebadores están diseñados para reflejar la sustitución de aminoácidos deseados. Otros procedimientos útiles para la generación de regiones Fc variantes son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.624.821; 5.885.573; 5.677.425; 6.165.745; 6.277.375; 5.869.046; 6.121.022; 5.624.821; 5.648.260; 6.528.624; 6.194.551; 6.737.056; 6.821.505; 6.277.375; US publicación de patente núms 2004/0002587 y publicaciones PCT WO 94/29351; WO 99/58572; WO 00/42072; WO 02/060919; WO 04/029207; WO 04/099249; WO 041063351).

[0172] En algunos casos de la descripción, los patrones de glicosilación de los anticuerpos proporcionados en este documento están modificados para mejorar la función efectora de ADCC y CDC. Ver Shields RL et al., (2002) JBC. 277: 26733; Shinkawa T et al., (2003) JBC. 278: 3466 y Okazaki A et al, (2004) J. Mol. Biol., 336: 1239. En algunos casos, una proteína variante de Fc comprende una o más glicofomas genéticamente modificadas, es decir, una composición de hidratos de carbono que está unida covalentemente a la molécula que comprende una región Fc. Las glicofomas modificadas pueden ser útiles para una variedad de propósitos, incluyendo, pero no limitado a, aumentar o reducir la función efectora. Las glicofomas modificadas pueden ser generados por cualquier procedimiento conocido para un experto en la técnica, por ejemplo mediante el uso de cepas modificadas o expresión variante, mediante la coexpresión con una o más enzimas, por ejemplo DI N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTI11), mediante la expresión de una molécula que comprende una región Fc en diversos organismos o líneas celulares de diversos organismos, o mediante la modificación de hidratos de carbono después de expresar la molécula que comprende la región Fc. Los procedimientos para generar glicofomas modificadas son conocidos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan, a los descritos en Umana et al, 1999, Nat. Biotechnol 17: 176-180; Davies et al, 20017 Biotechnol Bioeng 74: 288-294; Shields et al, 2002, J Biol Chem 277: 26733-26740; Shinkawa et al, 2003, J Biol Chem 278: 3.466-3.473) Patente de Estados Unidos. No. 6.602.684; No. serie Estados Unidos. No. 10/277.370; No. serie Estados Unidos. No. 10/113.929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954A1; tecnología Pottelligent® (BioWa, Inc. Princeton, NJ); tecnología de modificación

de glicosilación GlycoMAb® (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Suiza). Véase, por ejemplo, el documento WO 00061739; EA01229125, US 20030115614; Okazaki et al, 2004, JMB, 336: 1239-1249.

[0173] También se conoce en la técnica que la glicosilación de la región Fc puede ser modificada para aumentar o reducir la función efectora (véase, por ejemplos, Umana et al, 1999, Nat Biotechnol 17: 176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74: 288-294; Shields et al, 2002, J Biol Chem 277: 26733-26740; Shinkawa et al, 2003, J Biol Chem 278: 3.466-3.473), patente de Estados Unidos. No. 6.602.684; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954A1; tecnología Potillegent® (BioWa, Inc. Princeton, NJ); tecnología de modificación de glicosilación GlycoMAb® (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Suiza). Por consiguiente, en un caso, las regiones Fc de los anticuerpos de la descripción comprenden glicosilación alterada de residuos de aminoácidos. En otro caso, la glicosilación alterada de los residuos de aminoácidos resulta en una función efectora reducida. En otro caso, la glicosilación alterada de los residuos de aminoácidos resulta en una función efectora incrementada. En un caso específico, la región Fc tiene fucosilación reducida. En otro caso, la región Fc es afucosilada (véase, por ejemplos, la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2005/0226867).

Breve descripción de los dibujos

[0174]

La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra los efectos de los anticuerpos anti-B7-H1 de la descripción en la proliferación de células T en el ensayo con microesferas.

La figura 2 es un gráfico de barras que muestra un aumento de la proliferación de células T por los anticuerpos anti-B7-H1 de la descripción en el ensayo DCMLR.

La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra la liberación de IFN- γ por anticuerpos anti-B7-H1 de la descripción en el ensayo DCMLR.

La Figura 4 es un gráfico que muestra el intervalo de confianza del 95% de IC50 de anti-B7-H1 mediante anticuerpos anti-B7-H1 de la descripción en el ensayo de inhibición de ligandos B7-H1 humano/PD1 humano para evaluar el impacto de cambio y mutación germinal de clase IgG sobre la actividad de los anticuerpos.

La Figura 5 es un gráfico de líneas que muestra los resultados de un ensayo ELISA que se realizó para evaluar la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-B7-H1 de la descripción a antígenos co-moduladores.

La Figura 6 es un gráfico de barras que muestra los efectos de los anticuerpos anti-B7-H1 de la descripción en el ensayo de Tet-recall in-vitro.

La Figura 7 es un gráfico de barras que muestra los resultados de la prueba de actividad agonista de anticuerpos anti-B7-H1 de la descripción usando el ensayo de Tet-recall.

Las Figuras 8A/B/C son gráficos de líneas que muestran el efecto de anticuerpos anti-B7-H1 de la descripción en las células HPAC en un modelo de xenoinjerto de ratón.

Las Figuras 9A/B/C son gráficos de líneas que muestran el efecto de anticuerpos anti-B7-H1 de la descripción en las células A375 en un modelo de xenoinjerto de ratón.

Las Figuras 10A/B son gráficos de líneas que muestran el efecto de anticuerpos anti-B7-H1 de la descripción en las células HPAC en un modelo de xenoinjerto de ratón.

La Figura 11 es un gráfico de líneas que muestra el efecto de anticuerpos anti-B7-H1 de la descripción en las células HPAC en un modelo de xenoinjerto de ratón.

Las figuras 12A/B/C/D son gráficos de líneas que muestran el efecto de anticuerpos anti-B7-H1 de la descripción en células A375 en un modelo de xenoinjerto de ratón.

Las figuras 13A/B son gráficos de líneas que muestran el efecto de anticuerpos anti-B7-H1 de la descripción en las células A375 en un modelo de xenoinjerto de ratón con y sin la presencia de células T.

Las figuras 14A/B son gráficos de líneas que muestran el efecto de anticuerpos anti-B7-H1 de la descripción en las células A375 en un modelo de xenoinjerto de ratón con y sin la presencia de células T.

La Figura 15 es un gráfico de líneas que muestra el efecto de anticuerpos anti-B7-H1 de la descripción en las células A375 en un modelo de xenoinjerto de ratón.

Definiciones

[0175] A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tendrán los significados que se entienden comúnmente por los expertos en la técnica. Además, a menos que se indique de otra manera por el contexto, los términos singulares incluirán plurales y los términos en plural incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con el cultivo de células y de tejidos, biología molecular, la química y la hibridación de proteínas y de oligo- o polinucleótidos descritas en este documento son aquellas bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica.

[0176] Se utilizan técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante o como se realiza habitualmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente según procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: (3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001)) A Laboratory

Manual. Las nomenclaturas utilizadas en relación con las técnicas y procedimientos de química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en el presente documento de laboratorio son aquellas bien conocidos y comúnmente utilizadas en la técnica. Se utilizan técnicas estándar para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación, y administración farmacéutica, y tratamiento de pacientes.

[0177] Tal como se utiliza según la presente descripción, los siguientes términos, a menos que se indique otra cosa, se entenderá que tienen los siguientes significados:

Un antagonista o inhibidor puede ser un polipéptido, ácido nucleico, hidratos de carbono, lípidos, compuesto de peso molecular pequeño, un oligonucleótido, un oligopéptido, ARN de interferencia (ARNi), antisentido, una proteína recombinante, un anticuerpo, o fragmentos de los mismos o conjugados o proteínas de fusión de los mismos. Para una revisión de ARNi ver Milhavet O, Gary DS, Mattson MP. (Rev. Pharmacol 2003 Dec; 55 (4): 629-48 Review.) y antisentido (ver Opalinska JB, Gewirtz AM (Sci STKE 2003 28 de Oct; 2003 (206): pe47).

[0178] Un compuesto se refiere a cualquier compuesto de peso molecular pequeño con un peso molecular de menos de aproximadamente 2000 Daltons.

[0179] El término "B7H1" se refiere a la B7-H humana, B7H1, B7-H1, homólogo 1 de B7, antígeno CD274, PDCD1L1, PDCD1LG1, ligando 1 de PDCD1, PDL1, PDL-1, precursor de ligando 1 de la muerte celular programada 1 o ligando 1 de muerte celular programada.

[0180] El término "neutralizante" o "inhibe" cuando se refiere a un agente de unión específica, tal como un anticuerpo, se refiere a la capacidad de dicho agente para eliminar, reducir, o reducir significativamente, la actividad de un antígeno diana. Por consiguiente, un anticuerpo anti-B7-H1 "neutralizante" de la descripción es capaz de eliminar o reducir significativamente la actividad de B7-H1. Un anticuerpo neutralizante, antagonista o inhibidor que se une específicamente a B7-H1 puede, por ejemplo, actuar bloqueando la unión de B7-H1 a sus ligandos afines. Idealmente, un anticuerpo neutralizante contra B7-H1 inhibe la represión de la inmunidad de células T mediada por B7-H1. Un anticuerpo neutralizante, antagonista o inhibidor que se une específicamente a B7-H1 puede, por ejemplo, actuar inhibiendo la unión de B7-H1 a PD-1 y/o a B7-1.

[0181] "La inhibición de la actividad biológica de B7-H1" abarca una inhibición de la actividad de B7-H1 en al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30 %, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80 %, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95% en comparación con la actividad biológica en ausencia de un agente de unión específica o anticuerpo de la descripción.

[0182] El término "polipéptido" se usa en el presente documento como un término genérico para referirse a proteína, fragmentos, o análogos de una secuencia polipeptídica natural. Por lo tanto, las proteínas, fragmentos y análogos naturales son especies del género polipéptido. Los polipéptidos preferidos según la descripción comprenden las moléculas de inmunoglobulina humanas de cadena pesada y las moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera kappa humanas, así como moléculas de anticuerpo formadas por combinaciones que comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada con moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera, tales como moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera kappa o lambda, y viceversa, así como fragmentos y análogos de los mismos. Los polipéptidos preferidos según la descripción pueden también comprender únicamente las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada humana o sus fragmentos.

[0183] El término "de origen natural", tal como se usa en el presente documento, tal como se aplica a un objeto, se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificado intencionadamente por el hombre en el laboratorio o de otro modo es de origen natural.

[0184] El término "secuencia de control", tal como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar o para afectar a la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que están conectados. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariontes, tales secuencias de control incluyen generalmente promotor, sitio de unión ribosomal, y secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotes, generalmente, tales secuencias de control pueden incluir promotores, potenciadores, intrones, secuencias de terminación de la transcripción, secuencias señal de poliadenilación, y regiones 5' y 3' no traducidas. El término "secuencias de control" pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de pareja de fusión.

[0185] El término "polinucleótido" se refiere en el presente documento a una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos, o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido, o hetero-dúplex ARN-ADN. El término incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN.

[0186] El término "oligonucleótido" en el presente documento incluye nucleótidos de origen natural y nucleótidos modificados unidos entre sí por enlaces de origen natural y no natural. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que comprenden generalmente una longitud de 200 bases o menos. Preferiblemente, los oligonucleótidos son de 10 a 60 bases de longitud y lo más preferiblemente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 a 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos son normalmente de cadena sencilla, por ejemplo, para sondas; aunque los oligonucleótidos pueden ser bicatenarios, por ejemplo para usar en la construcción de un mutante génico. Los oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos sentido o antisentido.

[0187] El término "nucleótidos de origen natural" en el presente documento incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" en el presente documento incluye nucleótidos con grupos de azúcares modificados o sustituidos y similares. El término "enlaces oligonucleotídicos" en el presente documento incluye enlaces de oligonucleótidos, tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforanilato, fosforoamidoato, y similares. Véase por ejemplo, LaPlanche et al. Nucl. Acids Res. 14: 9081 (1986); Stec et al. J. Am. Chem. Soc. 106: 6077 (1984); Stein et al. Nucl. Acids Res. 16: 3209 (1988); Zon et al. Anti-Cancer Drug Design 6: 539 (1991); Zon et al. Oligonucleotides and analogs: A practical approach, pág. 87-108 (F. Eckstein, Ed, Oxford University Press, Oxford Inglaterra (1991)); Stec et al. Patente de Estados Unidos No. 5.151.510; Uhlmann y Peyman Chemical Reviews 90: 543 (1990).

[0188] Un oligonucleótido puede incluir un marcador para la detección, si se desea.

[0189] El término "hibridar selectivamente" referido en este documento significa unirse de forma detectable y específica. Los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos se hibridan selectivamente a cadenas de ácido nucleico bajo hibridación y lavado que minimizan cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos no específicos. Se pueden utilizar condiciones de alta rigurosidad para lograr condiciones de hibridación selectivas como se conocen en la técnica y se discuten en este documento. Generalmente, la homología de secuencias de ácido nucleico entre los polinucleótidos, oligonucleótidos, o fragmentos de anticuerpo y una secuencia de ácido nucleico de interés será de al menos 80%, y más típicamente con homologías preferiblemente crecientes de al menos 85%, 90%, 95%, 99 %, y 100%.

[0190] Las condiciones de hibridación rigurosas incluyen, pero no se limitan a, hibridación con ADN unido a filtro en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) (0,9 M NaCl/90 mM citrato de Na, pH 7,0) a aproximadamente 45°C seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC/0,1% SDS a aproximadamente 50-65°C, condiciones altamente rigurosas, tales como hibridación con el ADN unida al filtro en 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en 0,1X SSC/0,2% SDS a aproximadamente 60°C, o cualesquiera otras condiciones de hibridación rigurosas conocidas por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Ausubel, FM et al., eds., 1989 Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, en las páginas 6.3.1 a 6.3.6 y 2.10.3).

[0191] Dos secuencias de aminoácido son "homólogas" si hay una identidad parcial o completa entre sus secuencias. Por ejemplo, 85% de homología significa que el 85% de los aminoácidos son idénticos cuando las dos secuencias se alinean para la máxima coincidencia. Los huecos (en cualquiera de las dos secuencias que se están emparejados) se permiten en un emparejamiento maximizado; se prefieren longitudes de hueco de 5 o menos, con 2 o menos siendo más preferido. Alternativamente y preferiblemente, dos secuencias de proteínas (o secuencias de polipéptidos derivadas de ellas de al menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud) son homólogas, tal como este término se usa en este documento, si tienen una puntuación de alineamiento de más de 5 (en unidades de desviación estándar) utilizando el programa ALIGN con la matriz de datos de mutación y una penalización por hueco de 6 o mayor. Ver Dayhoff, MO, en el Atlas of Protein Sequence and Structure, pág. 101-110 (Volumen 5, Fundación para la Investigación Biomédica Nacional (1972)) y el Suplemento 2 de este volumen, págs. 1-10. Las dos secuencias o partes de ellas son más preferiblemente homólogas si sus aminoácidos son idénticos en un 50% o más cuando se alinean óptimamente utilizando el programa ALIGN. Se debe entender que puede haber diferentes regiones de homología dentro de las dos secuencias de ortólogos. Por ejemplo, los sitios funcionales de ortólogos de ratón y ortólogos humanos pueden tener un mayor grado de homología que las regiones no funcionales.

[0192] El término "corresponde a" se usa en el presente documento para significar que una secuencia de polinucleótidos es homóloga (es decir, es idéntica, no estrictamente relacionada evolutivamente) a toda o una parte de una secuencia de polinucleótidos de referencia, o que una secuencia polipeptídica es idéntica a una secuencia de polipéptido de referencia.

[0193] En contraposición, el término "complementario a" se usa en el presente documento para significar que la secuencia complementaria es homóloga a toda o una parte de una secuencia de polinucleótidos de referencia. Para ilustración, la secuencia de nucleótidos "TATAC" corresponde a una secuencia de referencia "TATAC" y es complementaria a una secuencia de referencia "GTATA".

[0194] El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótidos o de aminoácidos son idénticas (es decir, en una base de nucleótido por nucleótido o residuo por residuo) sobre la ventana de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias

óptimamente alineadas sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que la base de ácidos nucleicos (por ejemplo, A, T, C, G, U, o I) o residuos de aminoácidos son idénticos en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. El término "identidad sustancial" tal como se utiliza en el presente documento indica una característica de una secuencia de polinucleótidos o aminoácidos, en donde el polinucleótido o aminoácidos comprende una secuencia que tiene al menos 85 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90 a 95 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 99 por ciento de identidad de secuencia, en comparación con una secuencia de referencia sobre una ventana de comparación de al menos 18 posiciones de nucleótidos (6 aminoácidos), frecuentemente sobre una ventana de al menos 24-48 posiciones de nucleótidos (8-16 aminoácidos), en la que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia que puede incluir deleciones o adiciones que suman el 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia sobre la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande. Tal como se utiliza en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Ver Immunology – A Synthesis (2ª Edición, E.S. Golub y D.R. Gren, Eds, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts (1991)).

[0195] Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como alfa,alfa-disustituidos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de la presente descripción. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxi prolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N, N, N-trimetilisina, ϵ -N-acetilsina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxi prolina). En la notación polipeptídica usada en este documento, la dirección izquierda es la dirección amino terminal y la dirección derecha es la dirección carboxilo terminal, de acuerdo con el uso y la convención estándar. Del mismo modo, a menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de las secuencias de polinucleótidos monocatenarios es el extremo 5'; la dirección de la izquierda de las secuencias polinucleotídicas bicatenarias se denomina dirección 5'. La dirección de adición de 5' a 3' de transcritos de ARN nacientes se denomina dirección de transcripción; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que son del extremo 5' a 5' del transcrito de ARN se denominan "secuencias en dirección 5'"; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en el extremo 3' al 3' del transcrito de ARN se denominan "secuencias en dirección 3'". Aplicado a polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando están óptimamente alineadas, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco predeterminados, comparten al menos 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos un 95 por ciento de identidad de secuencia, y lo más preferiblemente al menos un 99 por ciento de identidad de secuencia. Preferiblemente, las posiciones de los residuos que no son idénticos difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales de hidroxilo alifático es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina, e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservadores preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato y asparagina-glutamina. Como se analiza en este documento, se contemplan variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina en la presente descripción, siempre que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, 90%, 95%, y más preferiblemente 99% de identidad de secuencia con los anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina descritas en este documento. En particular, se contemplan reemplazos conservadores de aminoácidos. Los reemplazos conservadores son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que tienen cadenas laterales relacionadas. Los aminoácidos genéticamente codificados generalmente se dividen en familias: (1) ácido = aspartato, glutamato; (2) básico = lisina, arginina, histidina; (3) no polar = alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polar sin carga = glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Las familias más preferidas son: la serina y la treonina son una familia hidroxialifática; asparagina y glutamina son una familia que contiene amida; alanina, valina, leucina e isoleucina son una familia alifática; y la fenilalanina, el triptófano y la tirosina son una familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina o un reemplazo similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado no tenga un efecto importante sobre la función o propiedades de unión de la molécula resultante, especialmente si la sustitución no implica un aminoácido dentro del sitio de marco. Si un cambio de aminoácido da como resultado un péptido funcional puede determinarse fácilmente ensayando la actividad específica del derivado polipeptídico. Los ensayos se describen en detalle en este documento. Los expertos en la técnica pueden preparar fácilmente fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina. Los extremos amino y carboxi preferidos de los fragmentos o análogos se encuentran cerca de los límites de los dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales se pueden identificar por comparación de los datos de la secuencia de nucleótidos y/o

aminoácidos con las bases de datos públicas o privadas de secuencia. Preferiblemente, se utilizan métodos de comparación computarizados para identificar motivos de secuencias o dominios previstos de conformación de las proteínas que aparecen en otras proteínas de estructura y/o función conocida. Los métodos para identificar secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida son conocidos. Bowie et al. Science 253:164 (1991). Por lo tanto, los ejemplos que anteceden demuestran que los expertos en la técnica pueden reconocer motivos de secuencias y conformaciones estructurales que pueden utilizarse para definir dominios estructurales y funcionales según los anticuerpos descritos en el presente documento. Los residuos de glutaminilo y asparaginilo se desamidán frecuentemente en los residuos de glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente. Estos residuos se desamidán en condiciones neutras o básicas. La forma desamidada de estos residuos se encuentra dentro del alcance de esta descripción.

[0196] En general, los residuos de cisteína en las proteínas están unidos por enlaces disulfuro de cisteína-cisteína o están estéricamente protegidos de la formación de enlaces disulfuro cuando son una parte de la región de proteína plegada. La formación de enlaces disulfuro en las proteínas es un proceso complejo, que se determina por el potencial redox del medio y las enzimas de intercambio tiol-disulfuro especializadas (Creighton, *Methods Enzymol* 107, 305-329, 1984; Houee-Levin, *Methods Enzymol* 353, 35-44, 2002). Cuando un residuo de cisteína no tiene un par en la estructura de proteína y no está estéricamente protegido por el pliegue, puede formar un enlace disulfuro con una solución libre de cisteína en un proceso conocido como reordenamiento de disulfuro. En otro proceso conocido como mezcla de disulfuro, las cisteínas libres también pueden interferir con los enlaces disulfuro de origen natural (tales como los presentes en estructuras de anticuerpo) y dar lugar a una unión débil, una actividad biológica baja y/o baja estabilidad.

[0197] Las sustituciones de aminoácidos preferidas son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (4) alteran las afinidades de unión, y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de tales análogos. Los análogos pueden incluir diversas mutaciones de una secuencia distinta de la secuencia del péptido de origen natural. Por ejemplo, sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples (preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservativas) se pueden realizar en la secuencia de origen natural (preferiblemente en la parte del polipéptido fuera del dominio o dominios que forman contactos intermoleculares). Una sustitución de aminoácidos conservativa no debería sustancialmente cambiar las características estructurales de la secuencia parental (por ejemplo, un aminoácido de sustitución no debería tender a romper una hélice que se produce en la secuencia original, ni alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan la secuencia parental). Se describen ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptido reconocidas en la técnica en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed, WH Freeman and Company, New York (1984).); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds, Garland Publishing, Nueva York, NY (1991)); y Thornton et al *Nature* 354: 105 (1991). Además, tales procedimientos se pueden utilizar para hacer sustituciones o deleciones de aminoácidos de uno o más residuos de cisteína de regiones variables que participan en un enlace disulfuro intracatenario para generar moléculas de anticuerpo que carecen de uno o más enlaces disulfuro intracatenarios.

[0198] El término "región CDR" o "CDR" pretende indicar las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo que confieren la especificidad de unión del antígeno al anticuerpo. Las CDR pueden ser definidas según el sistema de Kabat (Kabat, EA et al. (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*, 5ª edición. Departamento de Salud y Servicios Humanos, Administración Pública, NIH, Washington Estados Unidos), y ediciones posteriores. Un anticuerpo contiene típicamente 3 CDR de cadena pesada y 3 CDR de cadena ligera. El término CDR o CDRs se utiliza en el presente documento con el fin de indicar, según el caso, una de estas regiones o varias, o incluso la totalidad, de estas regiones que contienen la mayoría de los residuos de aminoácidos responsables de la unión por afinidad del anticuerpo por el antígeno o el epítipo que reconoce.

[0199] La tercera CDR de la cadena pesada (HCDR3) tiene una mayor variabilidad de tamaño (mayor diversidad esencialmente debido a los mecanismos de la disposición de los genes que dan lugar a ella). Puede ser tan corta como 2 aminoácidos aunque el tamaño más largo conocido es 26. La longitud de CDR también puede variar según la longitud que la región de marco variable subyacente en particular pueda acomodar. Funcionalmente, HCDR3 juega un papel en parte en la determinación de la especificidad del anticuerpo (Segal et al, *PNAS*, 71: 4298 a 4302, 1974, Amit et al, *Science*, 233: 747-753, 1986, Chothia et al, *J. Mol Biol.*, 196: 901-917, 1987, Chothia et al, *Nature*, 342: 877- 883, 1989, Caton et al, *J. Immunol.*, 144: 1965-1968, 1990, Sharon et al, *PNAS*, 87: 4.814-4817, 1990, Sharon et al, *J. Immunol.*, 144: 4.863 a 4.869, 1990, Kabat et al, *J. Immunol.*, 147: 1709-1719, 1991).

[0200] El término "un conjunto de CDR" en el presente documento comprende CDR1, CDR2 y CDR3. Por lo tanto, un conjunto de HCDR se refiere a HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y un conjunto de LCDR se refiere a LCDR1, LCDR2 y LCDR3.

[0201] Las variantes de los dominios VH y VL y las CDR de la presente descripción, incluyendo aquellos para los que se indican secuencias de aminoácidos en el presente documento, y que se pueden emplear en la selección de agentes de unión y anticuerpos para B7-H1 pueden obtenerse por medio de procedimientos de alteración de la secuencia o mutación y la detección del reconocimiento de antígeno con las características deseadas. Ejemplos de características deseadas incluyen, pero no se limitan a: aumento de la afinidad de unión por el antígeno en relación

con anticuerpos conocidos que son específicos para el antígeno; aumento de la neutralización de una actividad de antígeno en relación con anticuerpos conocidos que son específicos para el antígeno si se conoce la actividad; capacidad competitiva especificada con un anticuerpo o ligando conocido para el antígeno en una relación molar específica; capacidad para inmunoprecipitar el complejo ligando-receptor; capacidad de unirse a un epítipo determinado; epítipo lineal, por ejemplo, secuencia de péptido identificada utilizando el análisis de unión de péptido, por ejemplo, utilizando los péptidos seleccionados en conformación lineal y/o conformación restringida; epítipo conformacional, formado por los residuos no continuos; capacidad para modular una nueva actividad biológica de B7-H1, o de molécula dirección 3'; capacidad de unirse a y/o neutralizar B7-H1 para conseguir cualquier otra propiedad deseada. Las técnicas requeridas para hacer sustituciones dentro de secuencias de aminoácidos de CDR, dominios VH o VL de anticuerpo y sitios de unión a antígeno están disponibles en la técnica. Las variantes de las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento pueden ser producidas y utilizarse en la presente descripción. Siguiendo el ejemplo de la química computacional en la aplicación de técnicas de análisis de datos multivariados para las relaciones estructura/propiedad y actividad (Wold, et al. *Multivariate data analysis in chemistry* (Ed.: B. Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holanda, 1984) relaciones cuantitativas entre actividad y propiedad de los anticuerpos se pueden derivar usando técnicas matemáticas bien conocidas, como la regresión estadística, reconocimiento y clasificación de patrones (Norman et al *Applied Regression Analysis* Wiley-Interscience; tercera edición (abril de 1998); Kandel, Abraham y Backer, Eric *Computer-assisted reasoning in cluster analysis*. Prentice Hall PTR, (11 de mayo, 1995); Krzanowski, Wojtek *Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective* (Oxford Statistical Science Series, n ° 22 (papel)) Oxford University Press; (diciembre de 2000); Witten, Ian H. & Frank, *Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations*. Morgan Kaufmann; (11 de octubre, 1999); Denison David GT (Editor), Christopher C. Holmes, Bani K. Mallick, Adrian FM Smith. *Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression* (serie Wiley de probabilidad y estadística). John Wiley & Sons; (Julio de 2002); Ghose, Arup K. & Viswanadhan, Vellarkad N. *Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools and Applications in Drug Discovery*). En algunos casos las propiedades de anticuerpos se pueden derivar de modelos empíricos y teóricos (por ejemplo, análisis de posibles residuos de contacto o la propiedad fisicoquímica calculada) de secuencia de anticuerpo, estructuras funcionales y tridimensionales y estas propiedades se pueden considerar por separado y en combinación. Un sitio de unión antígeno-anticuerpo compuesto por un dominio VH y un dominio VL está típicamente formado por seis bucles de polipéptidos: tres del dominio variable de cadena ligera (VL) y tres del dominio variable de cadena pesada (VH). El análisis de anticuerpos de estructura atómica conocida ha elucidado relaciones entre la secuencia y estructura tridimensional de los sitios de combinación de anticuerpos. Estas relaciones implican que, excepto para la tercera región (bucle) en los dominios VH, los bucles del sitio de unión tienen una de un pequeño número de conformaciones de cadena principal: estructuras canónicas. La estructura canónica formada en un bucle particular ha demostrado estar determinada por su tamaño y la presencia de ciertos residuos en lugares clave, tanto en el bucle y como en regiones marco.

[0202] Este estudio de relación entre la secuencia y la estructura se puede utilizar para la predicción de los residuos en un anticuerpo de secuencia conocida, pero de una estructura tridimensional desconocida, que son importantes en el mantenimiento de la estructura tridimensional de su bucles de CDR y por lo tanto mantener la especificidad de unión. Estas predicciones se pueden respaldar mediante la comparación de las predicciones con el resultado de los experimentos de optimización avanzados. En un enfoque estructural, se puede crear un modelo de la molécula de anticuerpo usando cualquier paquete libremente disponible o comercial, tal como WAM. Un paquete de software de visualización y análisis de proteínas, tal como Insight II (Accelrys, Inc.) o Deep View puede utilizarse para evaluar posibles sustituciones en cada posición en la CDR. Esta información puede entonces ser utilizada para hacer sustituciones que puedan tener un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad o conferir otras propiedades deseables.

[0203] El término "fragmento de polipéptido" como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que tiene una delección amino-terminal y/o carboxi-terminal, pero en el que la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia de origen natural deducida, por ejemplo, de una secuencia de ADNc de longitud completa. Los fragmentos normalmente son de al menos 5, 6, 8 o 10 aminoácidos de longitud, preferiblemente al menos 14 aminoácidos de longitud, más preferiblemente al menos 20 aminoácidos de longitud, normalmente al menos 50 aminoácidos de longitud, y aún más preferiblemente al menos 70 aminoácidos largo. El término "análogo" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a polipéptidos que se componen de un segmento de al menos 25 aminoácidos que tiene identidad sustancial con una parte de una secuencia de aminoácidos deducida y que tiene al menos una de las siguientes propiedades: (1) unión específica para B7-H1, bajo condiciones de unión adecuadas, (2) capacidad para bloquear la unión de B7-H1 a proteína adecuada, o (3) capacidad para inhibir la actividad de B7-H1. Típicamente, los análogos polipeptídicos comprenden una sustitución conservadora de aminoácidos (o adición o delección) con respecto a la secuencia de origen natural. Los análogos típicamente son de al menos 20 aminoácidos de longitud, preferiblemente al menos 50 aminoácidos de longitud o más, y a menudo pueden ser tan largos como de longitud completa del polipéptido de origen natural.

[0204] Los análogos peptídicos se utilizan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido plantilla. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos". Fauchere, J. *Adv. Res Drugs* 15:29 (1986); Veber y Freidinger *TINS* p.392 (1985); y Evans et al. *J. Med. Chem.* 30: 1229 (1987). Tales compuestos se desarrollan a menudo con la

ayuda de modelado molecular informatizado. Los miméticos de péptidos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), tal como un anticuerpo humano, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado del grupo que consiste en: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis y trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, y $-\text{CH}_2\text{SO}-$, por procedimientos bien conocidos en la técnica. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) se puede utilizar para generar péptidos más estables. Además, los péptidos restringidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de secuencia consenso sustancialmente idéntica pueden ser generados por procedimientos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch Ann Rev. Biochem 61: 387 (1992); por ejemplo, añadiendo residuos de cisteína internos capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclen el péptido.

[0205] Como se usa en el presente documento "anticuerpo" y "anticuerpos" (inmunoglobulinas) puede ser un anticuerpo oligoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), un anticuerpo camérido, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con CDR injertado, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo catalítico, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo totalmente humano, un anticuerpo anti-idiotípico y anticuerpos que pueden ser marcados en forma soluble o unida, así como fragmentos, variantes o derivados de los mismos, ya sea solos o en combinación con otras secuencias de aminoácidos proporcionadas por técnicas conocidas. Un anticuerpo puede ser de cualquier especie. Un anticuerpo comprende un polipéptido o grupo de polipéptidos que están compuestos de al menos un dominio de unión que se forma a partir del plegamiento de las cadenas de polipéptido que tienen espacios de unión tridimensionales con formas de superficie internos y distribuciones de carga complementarias a las características de un determinante antigénico de un antígeno. Un anticuerpo tiene típicamente una forma tetramérica, que comprende dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" y una "pesada". Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman un sitio de unión del anticuerpo. Los anticuerpos nativos son usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene regularmente espaciados puentes disulfuro intracatenarios. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Las cadenas ligeras se clasifican como cadenas lambda o cadenas kappa basados en la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena ligera. El dominio variable de una cadena ligera kappa también puede ser indicada en el presente documento como VK. El término "región variable" también puede usarse para describir el dominio variable de una cadena pesada o cadena ligera. Los residuos de aminoácidos particulares se cree que forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman un sitio de unión a anticuerpo. Tales anticuerpos pueden derivarse de cualquier mamífero, incluyendo, pero no limitado a, seres humanos, monos, cerdos, caballos, conejos, perros, gatos, ratones, etc.

[0206] El término "anticuerpo" o "anticuerpos" incluye fragmentos de unión de los anticuerpos de la descripción, fragmentos de ejemplo incluyen Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena única, anticuerpos de dominio único, anticuerpos de dominio, fragmentos Fv, fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos F(ab')₂, fragmentos de anticuerpos que exhiben la actividad biológica deseada, región variable estabilizada por disulfuro (dsFv), región variable dimérica (diacuerpo), anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id contra anticuerpos de la descripción), intracuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase.

[0207] La digestión de anticuerpos con la enzima papaína da como resultado dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, también conocidos como fragmentos "Fab" y un fragmento "Fc", que no tienen actividad de unión a antígeno pero que tienen la capacidad de cristalizar. La digestión de anticuerpos con la enzima pepsina da como resultado el fragmento F(ab')₂ en el que los dos brazos de la molécula de anticuerpo permanecen unidos y comprenden dos sitios de unión a antígeno. El fragmento F(ab')₂ tiene la capacidad de reticular con el antígeno.

[0208] "Fv" cuando se usa en el presente documento, se refiere al fragmento mínimo de un anticuerpo que conserva el reconocimiento del antígeno y los sitios de unión a antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y cadena ligera en estrecha asociación no covalente o 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. Colectivamente, las seis CDRs confieren especificidad de unión a antígeno al

anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad menor que el sitio de unión.

5 **[0209]** "Fab" cuando se utiliza en el presente documento se refiere a un fragmento de un anticuerpo que comprende el dominio constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

10 **[0210]** "dAb" cuando se utiliza en el presente documento se refiere a un fragmento de un anticuerpo que es la unidad de unión funcional más pequeña de un anticuerpo humano. Un "dAb" es un anticuerpo de dominio único y comprende el dominio variable de una cadena pesada de anticuerpo (dominio VH) o el dominio variable de una
15 cadena ligera de anticuerpo (dominio VL). Cada dAb contiene tres de los seis CDR de origen natural (Ward et al., Binding activities of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* 341, 544-546 (1989); Holt, et al, Domain antibodies: protein for therapy, *Trends Biotechnol* 21, 484-49 (2003)) con pesos moleculares que oscilan del 11 al 15 kDa, que son cuatro veces más pequeños que una unión de antígeno y fragmento (Fab)₂ y la mitad del tamaño de una molécula de cadena simple Fv (scFv).

20 **[0211]** "Camélidos" cuando se utiliza en el presente documento se refiere a moléculas de anticuerpos compuestas de dímeros de cadena pesada que están desprovistos de cadenas ligeras, pero sin embargo tienen un amplio repertorio de unión al antígeno (Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363: 446-448).

25 **[0212]** El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6.444-6.448 (1993).

30 **[0213]** Se ha demostrado que fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de antígenos de unión. Ejemplos de fragmentos de unión son (Ward, ES et al, (1989) *Nature* 341, 544-546.) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (McCafferty et al (1990) *Nature*, 348, 552-554) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (Holt et al (2003) *Trends in Biotechnology* 21, 484-490) el fragmento Fv que
35 consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward, ES et al., *Nature* 341, 544-546 (1989), McCafferty et al (1990) *Nature*, 348, 552-554, Holt et al (2003) *Trends in Biotechnology* 21, 484-490], que consiste en un dominio VH o VL; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas de Fv de cadena sencilla (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlace peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird et al, (1988) *Science*, 242, 423-426., Huston et al, (1988) *PNAS USA*, 85, 5879-5883); (viii) dímeros Fv biespecíficos de cadena única (PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o fragmentos multiespecíficos construidos mediante fusión génica (WO94/13804; Holliger, P. (1993) et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90 6444 a 6448.). Las moléculas Fv, scFv o diacuerpo se pueden estabilizar mediante la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL (Reiter, Y. et al, *Nature Biotech*, 14, 1239-1245, 1996). También se pueden realizar minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 (Hu, S. et al, (1996) *Cancer Res.*, 56, 3.055-3.061). Otros ejemplos de fragmentos de unión son Fab', que se diferencia de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxilo terminal del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo, y Fab'-SH, que es un fragmento Fab' en el que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre.

50 **[0214]** El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y son responsables de la especificidad de unión de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDRs) tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan las regiones marco (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina beta conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de
60 unión a antígeno de anticuerpos (véase, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological interest*, Servicio de Salud 5ª Ed. Pública, Institutos nacionales de Salud, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes en general, no están implicados directamente en la unión al antígeno, pero pueden influir en la afinidad de unión a antígeno y pueden exhibir diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la ADCC, CDC, y/o apoptosis.

65 **[0215]** El término "región hipervariable" cuando se usa en el presente documento se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que están asociados con su unión a antígeno. Las regiones hipervariables

comprenden los residuos de aminoácidos de las "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del dominio variable de cadena ligera y los residuos 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio variable de la cadena pesada; Kabat y col, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Servicio de Salud Pública 5ª edición, National Institutes of.. Salud, Bethesda, MD (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, J. Mol Biol, 196: 901-917 (1987)). Los residuos de "marco variables" o FR o son aquellos residuos del dominio variable que flanquean las CDR. Los residuos de FR están presentes en los anticuerpos de dominio quiméricos, humanizados, humanos, diacuerpos, vaccibodies, anticuerpos lineales, y biespecíficos.

[0216] Como se usa en este documento, "agente de unión específica", "proteína de unión específica", "proteína de unión diana" y términos similares se refieren a un agente, por ejemplo un anticuerpo, o fragmento de unión del mismo, que se une preferentemente a un sitio diana. En un caso, el agente de unión específica es específico para un solo sitio diana. En otros casos, el agente de unión específica es específico para más de un sitio diana. En un caso, el agente de unión específica puede ser un anticuerpo monoclonal y el sitio diana puede ser un epítipo. Un agente de unión específica puede comprender al menos un dominio de unión a antígeno (por ejemplo, una CDR) de un anticuerpo, en el que dicho dominio se fusiona o está contenido dentro de un armazón de proteína heteróloga, por ejemplo un armazón de proteína que no es anticuerpo.

[0217] "Los fragmentos de unión" de un anticuerpo se producen mediante técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, dAb y anticuerpos de cadena única. Un anticuerpo que no sea un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" se entiende que tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un anticuerpo inhibe sustancialmente la adhesión de un receptor a un contrarreceptor cuando un exceso de anticuerpo reduce la cantidad de receptor unido al contrarreceptor en al menos aproximadamente 20%, 40%, 60% o 80%, y más habitualmente mayor de aproximadamente 85% (medida en un ensayo de unión competitiva in vitro).

[0218] El término "epítipo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse específicamente a un receptor de inmunoglobulina o de células T. Los determinantes epitópicos consisten habitualmente en agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y pueden, pero no siempre, tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Un anticuerpo se dice que se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es $\leq 1 \mu\text{M}$, preferentemente $\leq 100 \text{ nM}$ y lo más preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$.

[0219] El término "agente" se usa en el presente documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto hecho de materiales biológicos.

[0220] "Activo" o "actividad" en lo que se refiere a un polipéptido B7-H1 se refiere a una parte de polipéptido AB7-H1 que tiene una actividad inmunológica o biológica de un polipéptido B7-H1 nativo. "Biológica" cuando se utiliza en el presente documento se refiere a una función biológica que resulta de la actividad del polipéptido B7-H1 nativo. Una actividad biológica de B7-H1 preferida incluye, por ejemplo, la proliferación celular, la adhesión celular y la invasión celular mediada por B7-H1.

[0221] "Mamífero" cuando se usa en el presente documento, se refiere a cualquier animal que se considera un mamífero. Preferiblemente, el mamífero es humano.

[0222] "Animal" cuando se usa en el presente documento abarca animales considerados mamífero. Preferiblemente, el animal es humano.

[0223] El término "paciente" incluye sujetos humanos y veterinarios.

[0224] El término "mAb" se refiere al anticuerpo monoclonal.

[0225] "Liposoma" cuando se utiliza en el presente documento se refiere a una vesícula pequeña que puede ser útil para la administración de fármacos que pueden incluir el polipéptido B7-H1 de la descripción o anticuerpos a un polipéptido B7-H1 a un mamífero.

[0226] "Marcador" o "marcado" como se utiliza en el presente documento se refiere a la adición de un resto detectable a un polipéptido, por ejemplo, un radiomarcador, marcador fluorescente, marcador quimioluminiscente, marcador, marcador enzimático o un grupo biotínico. Los radioisótopos o radionúclidos pueden incluir ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I, marcadores fluorescentes pueden incluir rodamina, fósforos a base de lantánidos o FITC y marcadores enzimáticos pueden incluir peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina.

[0227] Marcadores adicionales incluyen, a modo de ilustración y no de limitación: enzimas, tales como glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ("G6PDH"), alfa-D-galactosidasa, glucosa oxidasa, amilasa glucosa, anhidrasa carbónica,

acetilcolinesterasa, lisozima, malato deshidrogenasa y peroxidasa; colorantes; marcadores fluorescentes adicionales o agentes fluorescentes incluyen, tales como fluoresceína y sus derivados, fluorocromo, GFP (GFP para "Green Fluorescent Protein"), dansilo, umbeliferona, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído, y fluorescamina; fluoróforos tales como criptatos y quelatos de lantánidos, por ejemplo europio etc (ensayos de Perkin Elmer y Cisbio); marcadores quimioluminiscentes o quimioluminiscentes, tales como isoluminol, luminol y los dioxetanos; sensibilizadores; coenzimas; sustratos de enzimas; partículas, tales como partículas de látex o de carbono; solución coloidal metálica; cristalito; liposomas; células, etc., que pueden marcarse además con un colorante, catalizador u otro grupo detectable; moléculas tales como biotina, digoxigenina o 5-bromodesoxiuridina; restos de toxina, tales como por ejemplo, un resto de toxina seleccionada de un grupo de la exotoxina de *Pseudomonas* (PE o un fragmento citotóxico o mutante de la misma), toxina de la difteria o un fragmento citotóxico o mutante del mismo, una toxina botulínica A, B, C, D, E o F, ricina o un fragmento citotóxico de la misma, por ejemplo ricina A, abrina o un fragmento citotóxico de la misma, saporina o un fragmento citotóxico de la misma, proteína antiviral de fitolaca o un fragmento citotóxico de la misma y briodina 1 o un fragmento citotóxico de la misma.

[0228] El término "agente farmacéutico o fármaco" como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto químico o composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra adecuadamente a un paciente. Otros términos químicos en la presente memoria se utilizan según el uso convencional en la técnica, como se ejemplifica por El diccionario McGraw-Hill de Términos Químicos (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

[0229] Como se usa en el presente documento, "sustancialmente puro" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, sobre una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferiblemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en donde la especie objeto comprende al menos aproximadamente 50 por ciento (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, más preferiblemente más de aproximadamente 85%, 90%, 95% y 99%. Lo más preferiblemente, la especie objeto se purifica hasta homogeneidad esencial (las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante procedimientos de detección convencionales) donde la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

[0230] "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc de Ig (FcR) (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), monocitos, neutrófilos, y macrófagos) reconocen el anticuerpo unidos en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar la ADCC, células NK, expresan Fc γ RIII solamente, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 9 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC in vitro, tal como el descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.500.362, o 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse in vivo, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et al. *PNAS (EE.UU.)* 95: 652-656 (1988).

[0231] La "Citotoxicidad dependiente de complemento" y "CDC" se refieren al mecanismo por el cual los anticuerpos llevan a cabo su función de destrucción celular. Se inicia por la unión de C1q, un constituyente del primer componente del complemento, el dominio Fc de Ig, IgG o IgM, que están en complejo con el antígeno (Hughes-Jones, NC, y B. Gardner. 1979. *Mol. Immunol* 16: 697). C1q es una glicoproteína grande, estructuralmente compleja de ~ 410 kDa presente en el suero humano a una concentración de 70 ug/ml (Cooper, NR 1985. *Adv Immunol* 37: 151). Junto con dos serina proteasas, C1r y C1s, C1q forma el complejo C1, el primer componente del complemento. Al menos dos de las cabezas globulares N-terminales de C1q debe estar unidas a la Fc de Ig para la activación de C1, por lo tanto, para la iniciación de la cascada del complemento (Cooper, NR 1985. *Adv Immunol* 37. 151).

[0232] El término "semivida de anticuerpo" como se usa en este documento significa una propiedad farmacocinética de un anticuerpo que es una medida del tiempo de supervivencia medio de moléculas de anticuerpos después de su administración. La semivida del anticuerpo se puede expresar como el tiempo requerido para eliminar el 50 por ciento de una cantidad conocida de inmunoglobulina del cuerpo del paciente o de un compartimento específico del mismo, por ejemplo, tal como se mide en suero o plasma, es decir, semivida en circulación, o en otros tejidos. La semivida puede variar de una inmunoglobulina o clase de inmunoglobulina a otra. En general, un aumento en la semivida de anticuerpo tiene como resultado un aumento del tiempo medio de residencia del anticuerpo administrado (MRT) en circulación.

[0233] El término "isotipo" se refiere a la clasificación de región constante de cadena pesada o ligera de un anticuerpo. Los dominios constantes de anticuerpos no están implicados en la unión al antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada, un anticuerpo humano dado o inmunoglobulina se pueden asignar a una de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM. Varias de estas clases se pueden dividir además en subclases

(isotipos), por ejemplo, IgG1 (gamma 1), IgG2 (gamma 2), IgG3 (gamma 3), y IgG4 (gamma 4), y IgA1 y IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. De las diversas clases de inmunoglobulinas humanas, solamente IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM son conocidos para activar el complemento. IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4 son conocidos para unirse a receptores Fc gamma, que median diversas funciones efectoras incluyendo ADCC. Las regiones constantes de cadena ligera humana se pueden clasificar en dos clases principales, kappa y lambda.

[0234] Si se desea, el isotipo de un anticuerpo que se une específicamente B7-H1 se puede cambiar, por ejemplo para tomar ventaja de una propiedad biológica de un isotipo diferente. Por ejemplo, en algunas circunstancias puede ser deseable en relación con la generación de anticuerpos como anticuerpos terapéuticos contra B7-H1 que los anticuerpos sean capaces de fijar el complemento y participar en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Hay un número de isotipos de anticuerpos que son capaces de hacerlo, incluyendo, sin limitación, los siguientes: IgM murina, IgG2a murina, IgG2b murina, IgG3 murina, IgM humana, IgA humana, IgG1 humana, e IgG3 humana. En otros casos puede ser deseable en relación con la generación de anticuerpos como anticuerpos terapéuticos contra B7-H1 que los anticuerpos sean capaces de unirse a receptores de Fc en células efectoras y participen en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC). Hay un número de isotipos de anticuerpos que son capaces de hacerlo, incluyendo, sin limitación, los siguientes: IgG2a murina, IgG2b murina, IgG3 murina, IgG1 humana, e IgG3 humana. Se apreciará que los anticuerpos que se generan no necesitan inicialmente poseer un tal isotipo, sino, más bien, el anticuerpo tal como se genera puede poseer cualquier isotipo y puede cambiarse el isotipo del anticuerpo después usando técnicas convencionales que son bien conocidas en la técnica. Tales técnicas incluyen el uso de técnicas recombinantes directas (véase por ejemplo, patente de EE.UU. n° 4.816.397), técnicas de fusión célula-célula (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Nos. 5.916.771 y 6.207.418), entre otros.

[0235] A modo de ejemplo, los anticuerpos anti-B7-H1 discutidos en este documento son anticuerpos completamente humanos. Si un anticuerpo tuviera la unión deseada a B7-H1, podría cambiarse fácilmente el isotipo para generar un isotipo IgM humana, IgG1 humana, o IgG3 humano, mientras que todavía poseen la misma región variable (que define la especificidad del anticuerpo y parte de su afinidad). Tal molécula sería entonces capaz de fijar el complemento y participar en CDC y/o ser capaz de unirse a los receptores Fc en las células efectoras y participar en la ADCC.

[0236] "Ensayos de sangre completa" utilizan sangre no fraccionada como una fuente de efectores naturales. La sangre contiene complemento en el plasma, junto con efectores celulares que expresan FcR, tales como células polimorfonucleares (PMNs) y células mononucleares (CMN). Por lo tanto, los ensayos de sangre completa permiten la evaluación simultánea de la sinergia de ambos mecanismos efectores de ADCC y CDC in vitro.

[0237] Una cantidad "terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento es una cantidad que proporciona alguna mejora o beneficio al sujeto. Dicho de otra manera, una cantidad "terapéuticamente eficaz" es una cantidad que proporciona cierto alivio, mitigación y/o disminución de al menos un síntoma clínico. Los síntomas clínicos asociados con los trastornos que pueden ser tratados por los procedimientos de la descripción son bien conocidos para los expertos en la técnica. Además, los expertos en la técnica apreciarán que los efectos terapéuticos no necesitan ser completos o curativos, siempre y cuando se proporcione algún beneficio al sujeto.

[0238] Los cánceres de ejemplo en los seres humanos incluyen un tumor de vejiga, tumor de mama, tumor de próstata, carcinoma de células basales, cáncer de tracto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer de cerebro y del SNC (por ejemplo, tumor de glioma), cáncer cervical, coriocarcinoma, cáncer de colon y recto, cáncer de tejido conectivo, cáncer del sistema digestivo; cáncer endometrial, cáncer de esófago; cáncer de ojo; cáncer de cabeza y cuello; cáncer gástrico; neoplasia intra-epitelial; cáncer de riñón; cáncer de laringe; leucemia; cáncer de hígado; cáncer de pulmón (por ejemplo, de células pequeñas y de células no pequeñas); linfoma incluyendo linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin; melanoma; mieloma, neuroblastoma, cáncer de la cavidad oral (por ejemplo, labio, lengua, boca y la faringe); cáncer de ovarios; cáncer de páncreas, retinoblastoma; rhabdomyosarcoma; cáncer rectal, cáncer renal, cáncer del sistema respiratorio; sarcoma, cáncer de piel; cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides; cáncer uterino, cáncer del sistema urinario, así como otros carcinomas y sarcomas.

[0239] Los ejemplos de infecciones crónicas en seres humanos incluyen el VIH, virus de la hepatitis B (VHB) y virus de la hepatitis C (VHC).

[0240] El término "y/o", como se usa en el presente documento es para ser tomada como una descripción específica de cada una de las dos características especificadas o componentes con o sin la otra. Por ejemplo, "A y/o B" es para ser tomada como una descripción específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, al igual que si cada uno se establece de forma individual en el presente documento.

Estructura de los anticuerpos

5 [0241] La unidad estructural básica del anticuerpo es conocida por comprender un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La parte amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento del antígeno. La parte carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa, o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgA, e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variable y constante se unen por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, con la cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase, en general, Ch Fundamental Immunology. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed., Raven Press, Nueva York (1989)).

[0242] Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo.

15 [0243] Por lo tanto, un anticuerpo intacto tiene dos sitios de unión. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son los mismos.

20 [0244] Las cadenas muestran todas la misma estructura general de regiones marco relativamente conservadas (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también llamadas CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas por las regiones marco, permitiendo la unión a un epítipo específico. De N-terminal a C-terminal, tanto las cadenas ligera como pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es según las definiciones de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987); Chothia et al. Nature 342: 878-883 (1989).

25 [0245] Un anticuerpo biespecífico o bifuncional es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena pesada/ligera diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse mediante una variedad de procedimientos que incluyen fusión de hibridomas o unión de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990), Kostelny et al. J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992).
30 Los anticuerpos biespecíficos no existen en forma de fragmentos que tienen un único sitio de unión (por ejemplo, Fab, Fab', y Fv).

[0246] Típicamente, un dominio VH se empareja con un dominio VL para proporcionar un sitio de unión al antígeno del anticuerpo, aunque un dominio VH o VL solo se puede usar para unirse al antígeno. El dominio VH (véase la Tabla 9) puede ser emparejado con el dominio VL (véase la Tabla 13), de modo que se forma un sitio de unión a antígeno de anticuerpo que comprende los dominios VH y VL.

Anticuerpos humanos y humanización de anticuerpos

40 [0247] Los anticuerpos humanos evitan algunos de los problemas asociados con anticuerpos que poseen regiones constantes y/o variables de rata o murinas. La presencia de tales proteínas murinas o derivadas de rata puede conducir a la rápida eliminación de los anticuerpos o puede conducir a la generación de una respuesta inmune contra el anticuerpo en un paciente. Con el fin de evitar la utilización de anticuerpos murinos o derivados de rata, anticuerpos completamente humanos pueden generarse mediante la introducción de loci de anticuerpo humano funcional en un roedor, otro mamífero o animal de modo que el roedor, otro mamífero o animal produce anticuerpos completamente humanos.

50 [0248] Un procedimiento para generar anticuerpos completamente humanos es a través del uso de cepas de XenoMouse® de ratones que han sido diseñados para contener fragmentos configurados de línea germinal de hasta, pero menos de 1000 kb del locus de cadena pesada humana y locus de cadena ligera kappa. Véase Mendez et al Nature Genetics 15: 146-156 (1997) y Green y Jakobovits J. Exp Med 188: 483-495 (1998). Las cepas XenoMouse® están disponibles de Amgen, Inc. (Fremont, California, EE.UU.).

55 [0249] Tales ratones, a continuación, son capaces de producir moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos humanos y son deficientes en la producción de moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos murinos. Las tecnologías utilizadas para lograr los mismos se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 08/759.620, presentada el 3 de diciembre de 1996 y la Solicitud de Patente Internacional Nos. WO 98/24893, publicada el 11 de junio de 1998, y WO 00/76310, publicada el 21 de diciembre de 2000.

60 [0250] Véase también Mendez et al. Nature Genetics 15: 146-156 (1997).

65 [0251] La producción de las cepas de XenoMouse® de ratones se discute y resume en la publicación de Estados Unidos N° de serie 2003/0093820, presentada el 30 de noviembre de 2001 y las patentes de Estados Unidos Nos. 6.162.963, 6.150.584, 6.114.598, 6.075.181 y 5.939.598 y las patentes japonesas No. 3 068 180 B2, 3 068 506 B2, y 3 068 507 B2. Ver también Patente europea No. EP 0 463 151 B1, concesión publicada el 12 de junio de 1996, la Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/02602, publicada el 3 de febrero de 1994, la Solicitud de Patente

Internacional N° WO 96/34096, publicada el 31 de octubre de 1996, WO 98/24893, publicada el 11 de junio de 1998, el documento WO 00/76310, publicado el 21 de diciembre de 2000.

5 **[0252]** En un enfoque alternativo, otros, incluyendo GenPharm International, Inc., han utilizado un enfoque de "minilocus". En el enfoque minilocus, un locus de Ig exógeno es imitado por medio de la inclusión de piezas (genes individuales) del locus de Ig. Por lo tanto, uno o más genes de VH, uno o más genes de DH, uno o más genes de JH, una región constante mu, y por lo general una segunda región constante (preferiblemente una región constante gamma) se forman en un constructo para la inserción en un animal. Este enfoque se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.545.807 de Surani et al. y la patente de Estados Unidos Nos. 5.545.806, 5.625.825, 5.625.126, 10 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.877.397, 5.874.299, y 6.255.458 cada una de Lonberg y Kay, la Patente de Estados Unidos N° 5.591.669 y 6,023.010 de Krimpenfort y Berns, en la patente de Estados Unidos N° 5.612.205, 5.721.367, y 5.789.215 de Berns et al., y la patente de Estados Unidos N° 5.643.763 de Choi y Dunn. Véase también la Patente Europea No. 0 546 073 B1, la Solicitud de Patente Internacional Nos. WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, 15 WO 97/13852, y WO 98/24884 y en la Patente de Estados Unidos N° 5.981.175.

[0253] Ver también Top Taylor et al., 1992, Chen et al., 1993, Tuailon et al., 1993, Choi et al., 1993, Lonberg et al., (1994), Taylor et al., (1994), y Tuailon et al., (1995), Fishwild et al. (1996).

20 **[0254]** Kirin también ha demostrado la generación de anticuerpos humanos a partir de ratones en los que, a través de fusión de microcélulas, se han introducido grandes piezas de cromosomas, o cromosomas enteros. Véase la Solicitud de Patente Europea Nos. 773 288 y 843 961.

25 **[0255]** Además, se hna generado ratones KMTM, que son el resultado de cruzamiento de los ratones Tc de Kirin con ratones con minilocus de Medarex (HuMab). Estos ratones poseen el transcromosoma IgH humano de los ratones Kirin y el transgén de la cadena kappa de los ratones Genpharm (Ishida et al, Cloning Stem Cells, (2002) 4: 91-102).

30 **[0256]** Los anticuerpos humanos también pueden derivarse por procedimientos in vitro. Los ejemplos adecuados incluyen pero no se limitan a expresión en fagos (CAT, Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion (anteriormente Proliferon), Affimed) expresión en ribosomas (CAT), expresión en levadura, y similares.

Preparación de anticuerpos

35 **[0257]** Los anticuerpos, como se describe en el presente documento, se prepararon a través de la utilización de la tecnología Xenomouse®, tal como se describe a continuación. Dichos ratones son capaces de producir moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos humanos y son deficientes en la producción de moléculas de inmunoglobulina y anticuerpos murinos. Las tecnologías utilizadas para lograr los mismos se describen en las patentes, solicitudes y referencias dadas a conocer en la sección de antecedentes en la presente memoria. En particular, sin embargo, un caso preferido de la producción transgénica de ratones y anticuerpos de los mismos se describe en la solicitud de 40 patente US n° de serie 08/759.620, presentada el 3 de diciembre de 1996 y la Solicitud de Patente Internacional n° WO 98/24893, publicada el 11 de junio de 1998 y el documento WO 00/76310, publicado el 21 de diciembre de 2000. Véase también Mendez et al Nature Genetics 15: 146-156 (1997).

45 **[0258]** Mediante el uso de tal tecnología, se han producido anticuerpos monoclonales totalmente humanos para una variedad de antígenos. Esencialmente, las líneas Xenomouse® de ratones se inmunizan con un antígeno de interés (por ejemplo, B7-H1), células linfáticas (tales como células B) se recuperan de los ratones hiperinmunizados y los linfocitos recuperados se fusionan con una línea celular de tipo mieloides para preparar líneas celulares de hibridoma inmortales. Estas líneas celulares de hibridoma se criban y se seleccionan para identificar líneas celulares de hibridoma que producían anticuerpos específicos para el antígeno de interés. En este documento se proporcionan procedimientos para la producción de múltiples líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos a B7-H1. Además, se proporcionan la caracterización de los anticuerpos producidos por tales líneas celulares, 50 incluyendo análisis de secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras de tales anticuerpos.

55 **[0259]** Alternativamente, en lugar de ser fusionadas con células de mieloma para generar hibridomas, las células B puede ensayarse directamente. Por ejemplo, las células B CD19 + pueden aislarse a partir Xenomouse® hiperinmune y dejar proliferar y diferenciarse en células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Los anticuerpos de las células sobrenadantes se criban por ELISA para la reactividad contra el inmunógeno B7-H1. Los sobrenadantes también podrían ser examinados para inmunorreactividad contra fragmentos de B7-H1 para mapear adicionalmente 60 los diferentes anticuerpos para la unión a dominios de interés funcional en B7-H1. Los anticuerpos también pueden seleccionarse de otras proteínas humanas relacionadas y en contra la rata, el ratón, y humano no primate, tales como mono Cynomolgus, ortólogos de polipéptido B7-H1, la última para determinar las especies de reactividad cruzada. Las células B de los pocillos que contienen anticuerpos de interés se pueden inmortalizar por varios procedimientos incluyendo la fusión para hacer hibridomas ya sea de pocillos individuales o de pocillos agrupados, o 65 por la infección con EBV o transfección por conocidos genes de inmortalización y a continuación cultivos en un medio adecuado. Alternativamente, las células individuales de plasma que secretan anticuerpos con las

especificidades deseadas se aíslan entonces usando un ensayo de placa hemolítica específica de B7-H1 (véase, por ejemplo Babcook et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 7843-48 (1996)). Las células diana para la lisis son preferiblemente glóbulos rojos de oveja (SRBC) recubiertos con el antígeno B7-H1.

5 **[0260]** En presencia de un cultivo de células B que contiene células plasmáticas que secretan la inmunoglobulina de interés y el complemento, la formación de una placa indica lisis mediada por B7-H1 específica de los glóbulos rojos de oveja que rodean a la célula plasmática de interés. La única célula plasmática específica de antígeno en el centro de la placa puede ser aislada y la información genética que codifica la especificidad del anticuerpo se aísla de la
10 célula plasmática individual. Usando transcripción inversa seguida por PCR (RT-PCR), el ADN que codifica las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo se puede clonar. Tal ADN clonado puede insertarse entonces adicionalmente en un vector de expresión adecuado, preferiblemente un casete de vector tal como un pcDNA, más preferiblemente un vector tal pcDNA que contiene los dominios constantes de inmunoglobulina de
15 cadena pesada y ligera. El vector generado puede transfectarse entonces en células huésped, por ejemplo, células HEK293, células CHO, y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir la transcripción, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

[0261] Como se apreciará, los anticuerpos que se describen en el presente documento pueden expresarse en líneas celulares distintas de líneas celulares de hibridoma. Las secuencias que codifican anticuerpos concretos se pueden utilizar para transformar una célula huésped de mamífero adecuada. La transformación puede ser por cualquier
20 procedimiento conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped, incluyendo, por ejemplo empaquetar el polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y transducir una célula huésped con el virus (o vector) o mediante procedimientos de transfección conocidos en la técnica, como se ejemplifica por la patente de los Estados Unidos Nos. 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461, y 4.959.455. El procedimiento de transformación usado depende del huésped a transformar. Los procedimientos para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien
25 conocidos en la técnica e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del polinucleótido (s) en liposomas, y microinyección directa del ADN en los núcleos.

[0262] Las líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para expresión son bien conocidos en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la NCIMB, incluyendo pero no limitado a
30 células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células 293 de riñón epitelial humano (HEK293), y un número de otras líneas celulares. Las líneas celulares de preferencia particular se seleccionan a través de la determinación de qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión y producen
35 anticuerpos con propiedades de unión a B7-H1 constitutiva.

[0263] En la técnica de fusión célula-célula, un mieloma, célula CHO u otra línea celular se preparan que posean una cadena pesada con cualquier isotipo deseado y otro mieloma, célula CHO o cualquier otra línea celular se prepara que posean la cadena ligera. Tales células pueden, después, fusionarse y se puede aislar una línea celular que
40 expresa un anticuerpo intacto.

[0264] Por consiguiente, se generan los candidatos de anticuerpo que cumplan los atributos "estructurales" deseados como se discutió anteriormente, por lo general, pueden estar provistos de al menos algunos de los atributos "funcionales" deseados a través de cambio de isotipo.
45

[0265] En la técnica de fusión célula-célula, un mieloma, células CHO u otra línea celular se preparan que posean una cadena pesada con cualquier isotipo deseado y otro mieloma, células CHO o cualquier otra línea celular se preparan que posean la cadena ligera. Tales células pueden, después, fusionarse y se puede aislar una línea celular que expresa un anticuerpo intacto.
50

[0266] Por consiguiente, se generan los candidatos de anticuerpo que cumplen los atributos "estructurales" deseados como se discutió anteriormente, por lo general, pueden estar provistos de al menos algunos atributos "funcionales" deseados a través de cambio de isotipo.
55

Secuencias de anticuerpos

[0267] Los casos de la descripción incluyen los anticuerpos enumerados a continuación en la Tabla 1. Esta tabla indica el número de identificación de cada anticuerpo, junto con el número de ID de SEQ del dominio variable de los correspondientes genes y polipéptidos de cadena pesada y de cadena ligera, respectivamente. A cada secuencia del anticuerpo se le ha dado un número de identificación.
60

Tabla 1

ID No. de mAb	Secuencia	SEQ Id NO:
2.7A4	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada	1

	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de cadena pesada	2
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera	6
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de cadena ligera	7
2.9D10	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada	11
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de cadena pesada	12
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera	16
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de cadena ligera	17
2.14H9	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada	21
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de cadena pesada	22
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera	26
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de cadena ligera	27
2.20A8	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada	31
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de cadena pesada	32
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera	36
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de cadena ligera	37
3.15G8	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada	41
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de cadena pesada	42
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera	46
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de cadena ligera	47
3.18G1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada	51
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de cadena pesada	52
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera	56
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de cadena ligera	57
2.7A4OPT	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada	61
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de cadena pesada	62
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera	66
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de cadena ligera	67
2.14H9OPT	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada	71
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de cadena pesada	72
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera	76
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de cadena ligera	77

5 **[0268]** Los casos de la descripción incluyen formulaciones farmacéuticas estériles de anticuerpos anti-B7-H1 que son útiles como tratamientos para las enfermedades. Tales formulaciones inhibirían la unión de B7-H1 a uno o más de sus ligandos afines, tratando de este modo las afecciones patológicas en las que, por ejemplo, B7-H1 en suero o tejido es anormalmente elevada. Los anticuerpos de la descripción poseen preferiblemente una afinidad adecuada para inhibir potentemente la actividad de B7-H1, o inhibir la unión de B7-H1 a uno o más de sus ligandos afines, y preferiblemente tienen una duración adecuada de acción para permitir una dosificación poco frecuente en seres humanos. Una duración prolongada de acción permitirá programas de dosificación menos frecuentes y más convenientes por vías parenterales alternativas tales como inyección subcutánea o intramuscular.

10 **[0269]** Las formulaciones estériles se pueden crear, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y reconstitución del anticuerpo. El anticuerpo normalmente se almacenará en forma liofilizada o en solución. Las composiciones de anticuerpo terapéuticas generalmente se colocan en un recipiente que tienen un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tiene un adaptador que permite la recuperación de la formulación, tal como un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

15 **[0270]** La vía de administración del anticuerpo es según procedimientos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, intratecal, inhalación o intralesional, inyección directa a un sitio de tumor, o mediante sistemas de liberación sostenida tal como se indica a continuación. El anticuerpo se administra preferiblemente de forma continua por infusión o por inyección de bolo.

20 **[0271]** Una cantidad efectiva de anticuerpo a emplearse terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la vía de administración, y la condición del paciente. Según ello, se prefiere que el médico titule la dosificación y modifique la ruta de administración según se requiera para obtener el efecto terapéutico óptimo. Típicamente, el médico administrará anticuerpo hasta que se alcance una dosis que consiga el efecto deseado. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante ensayos convencionales o mediante los ensayos descritos en el presente documento.

25 **[0272]** Los anticuerpos, como se describe en el presente documento, se puede preparar en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable. Esta composición terapéutica puede administrarse por vía intravenosa o a través de la nariz o el pulmón, preferiblemente como un aerosol líquido o en polvo (liofilizado). La composición también puede administrarse por vía parenteral o subcutánea según se desee. Cuando se administra sistémicamente, la composición terapéutica debe ser estéril, libre de pirógenos y en una solución parenteralmente aceptable que tiene debidamente en cuenta el pH, isotonicidad, y estabilidad. Estas condiciones son conocidas por los expertos en la técnica. Brevemente, las formulaciones de dosificación de los compuestos descritos en el presente documento se preparan para su almacenamiento o administración mezclando el compuesto que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes, o estabilizadores farmacéuticamente aceptables. Tales materiales no son tóxicos para los receptores de las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como TRIS HCl, fosfato, citrato, acetato y otras sales de ácido orgánico; antioxidantes tales como ácido ascórbico; péptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez residuos), tales como poliarginina, proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico, o arginina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo celulosa o sus derivados, glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones, tales como sodio y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN, PLURONICS o polietilenglicol.

30 **[0273]** Las composiciones estériles para inyección se pueden formular según la práctica farmacéutica convencional como se describe en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20a ed, Lippincott Williams & Wilkens Publishers (2003)). Por ejemplo, se puede desear la disolución o suspensión del compuesto activo en un vehículo tal como agua o aceite vegetal de origen natural como aceite de sésamo, cacahuete, o semilla de algodón o un vehículo graso sintético como oleato de etilo o similar. Tampones, conservantes, antioxidantes y similares pueden incorporarse según la práctica farmacéutica aceptada.

35 **[0274]** Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido, cuyas matrices que están en forma de artículos conformados, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietil-metacrilato) como se describe por Langer et al, J. Biomed Mater Res, (1981) 15: 167-277 y Langer, Chem. Tech, (1982) 12: 98-105, o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de Estados Unidos No. 3.773.919, EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman et al. , Biopolymers, (1983) 22: 547-556), etileno-acetato de vinilo no degradable (Langer et al, supra), copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico, tales como el LUPRON Depot™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico y ácido glicólico y acetato de leuprolide), y poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133.988).

40 **[0275]** Mientras que los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo

más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante un largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, lo que resulta en una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización de proteínas dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si el mecanismo de agregación se descubre que es la formación de enlaces SS intermoleculares a través del intercambio de disulfuro, la estabilización puede lograrse modificando los residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

[0276] Las composiciones de liberación sostenida incluyen también preparaciones de cristales del anticuerpo suspendido en formulaciones adecuadas capaces de mantener los cristales en suspensión. Estas preparaciones cuando se inyectan por vía subcutánea o intraperitoneal pueden producir un efecto de liberación sostenida. Otras composiciones también incluyen anticuerpos atrapados en liposomas. Los liposomas que contienen tales anticuerpos se preparan mediante procedimientos conocidos per se: patente de Estados Unidos. No. DE 3218121; Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., (1985) 82: 3688-3692; Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1980) 77: 4.030-4.034; EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; 142.641; solicitud de patente japonesa 83-118008; Patente de Estados Unidos. Nº 4.485.045 y 4.544.545; y EP 102.324.

[0277] La dosificación de la formulación de anticuerpo para un paciente dado se determinará por el médico encargado tomando en consideración diversos factores conocidos por modificar la acción de los fármacos incluyendo la gravedad y tipo de enfermedad, peso corporal, sexo, dieta, tiempo y vía de administración, otras medicaciones y otros factores clínicos relevantes. Las dosificaciones terapéuticamente eficaces se pueden determinar ya sea en procedimientos in vitro o in vivo.

[0278] Una cantidad eficaz de los anticuerpos, que se describe en el presente documento para ser empleada terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la vía de administración, y la condición del paciente. Según ello, se prefiere que el terapeuta titule la dosificación y modifique la vía de administración según se requiera para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 0,0001/kg, 0,001 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,1 mg/kg, 1 mg/kg, 10 mg/kg hasta 100 mg/kg, 1000 mg/kg, 10000 mg/kg o más, del peso corporal del paciente en función de los factores mencionados anteriormente. La dosificación puede estar entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,25 mg/kg, 0,0001 y 0,15 mg/kg, 0,0001 y 0,10 mg/kg, 0,001 y 0,5 mg/kg, 0,01 y 0,25 mg/kg o 0,01 y 0,10 mg/kg de peso corporal del paciente en función de los factores mencionados anteriormente. Típicamente, el médico administrará el anticuerpo terapéutico hasta que se alcance una dosis que consiga el efecto deseado. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante ensayos convencionales o como se describe en el presente documento.

[0279] Las dosis de los anticuerpos de la descripción puede ser repetidas y las administraciones se pueden separar en al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses, o al menos 6 meses.

[0280] Se entenderá que la administración de entidades terapéuticas según las composiciones y procedimientos del presente documento se administrarán con portadores, excipientes, adecuados y otros agentes que se incorporan en formulaciones para proporcionar una mejor transferencia, administración, tolerancia, y similares. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, jaleas, ceras, aceites, lípidos, lípidos (aniónicos o catiónicos) que contienen vesículas (tales como Lipofectin™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite-en-agua y emulsiones 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 según la presente descripción, siempre que el ingrediente activo en la formulación no se inactive por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración Consulte también Baldrick P. "El desarrollo de excipientes farmacéuticos: la necesidad de orientación preclínica" Regul. Toxicol Pharmacol 32 (2): 210-8 (2000), Wang W. "liofilización y desarrollo de productos farmacéuticos de proteínas sólidas." Int J. Pharm 203 (1-2): 1-60 (2000), Charman WN "lípidos, fármacos lipófilos, y fármaco oral de administración-algunos conceptos emergentes" J Pharm Sci 0,89 (8): 967-78 (2000), Powell et al. "Compendio de excipientes para formulaciones parenterales" PDA J Pharm Sci Technol. 52: 238-311 (1998) y las citas correspondientes para información adicional relacionada con formulaciones, excipientes y portadores bien conocidos para los químicos farmacéuticos.

Diseño y generación de otros productos terapéuticos

[0281] Según la presente descripción y en base a la actividad de los anticuerpos que se producen y caracterizan en el presente documento con respecto a B7-H1, se facilita y revela al experto en la técnica el diseño de otras modalidades terapéuticas más allá de restos de anticuerpo. Tales modalidades incluyen, sin limitación, agentes terapéuticos de anticuerpos avanzados, tales como anticuerpos biespecíficos, inmunotoxinas, agentes terapéuticos radiomarcados, y los dominios V de anticuerpo simple, agente de unión similar a anticuerpo basado en armazóns que no son región V, anticuerpos de dominio único, generación de agentes terapéuticos peptídicos, dominios de

unión a B7-H1 en nuevos armazones, terapias génicas, particularmente intracuerpos, agentes terapéuticos antisentido, y moléculas pequeñas.

5 **[0282]** Puede proporcionarse un sitio de unión a antígeno por medio de la disposición de CDR en armazones de proteína no anticuerpo, tales como fibronectina o citocromo B, etc. (Haan y Maggos (2004) *BioCentury*, 12 (5): A1-A6; Koide et al. (1998) *Journal of Molecular Biology*, 284: 1141 - 1151; Nygren et al. (1997) *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 463 - 469) o aleatorizando o mutando residuos de aminoácidos de un bucle dentro de un esqueleto proteico para conferir especificidad de unión para una diana deseada. Los armazones para diseñar nuevos sitios de unión en proteínas han sido revisados en detalle por Nygren et al. (Nygren y otros (1997) *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 463 - 469). Los armazones de proteínas para los miméticos de anticuerpos se describen en el documento WO / 0034784, en el que los inventores describen proteínas (miméticos de anticuerpos) que incluyen un dominio de fibronectina tipo III que tiene al menos un bucle aleatorizado. Un armazón adecuado en el que injertar una o más CDR, por ejemplo, un conjunto de HCDR puede ser proporcionado por cualquier miembro del dominio de la superfamilia de genes de inmunoglobulinas. El armazón puede ser una proteína humana o no humana. Una ventaja de un armazón de proteína no anticuerpo es que puede proporcionar un sitio de unión a antígeno en una molécula de armazón que es más pequeña y/o es más fácil de fabricar que al menos algunas moléculas de anticuerpo. Un tamaño pequeño de un miembro de unión puede conferir propiedades fisiológicas útiles, tales como la capacidad de entrar en las células, penetrar profundamente en los tejidos o alcanzar dianas dentro de otras estructuras, o unirse dentro de las cavidades de proteínas del antígeno diana. El uso de sitios de unión a antígeno en armazones de proteína no anticuerpo se revisa en Wess, 2004 (Wess, L. En: *BioCentury*, The Bernstein Report on BioBusiness, 12 (42), A1-A7, 2004). Típicas son proteínas que tienen una cadena principal estable y uno o más bucles variables, en los que la secuencia de aminoácidos del bucle o bucles está mutada específica o aleatoriamente para crear un sitio de unión a antígeno que se une al antígeno diana. Dichas proteínas incluyen los dominios de unión a IgG de la proteína A de *S. aureus*, transferrina, albúmina, tetranectina, fibronectina (por ejemplo, décimo dominio de fibronectina tipo III), lipocalinas así como gamma-cristalina y otros armazones Affilin™ (Scil Proteins) Los ejemplos de otros enfoques incluyen "Microcuerpos" sintéticos basados en ciclótidos - proteínas pequeñas que tienen enlaces disulfuro intramoleculares, Microproteínas (Versabodies™, Amunix) y proteínas repetidas de anquirina (DARPin, Molecular Partners).

30 **[0283]** Además de las secuencias de anticuerpos y/o un sitio de unión al antígeno, un agente de unión específica según la presente descripción, puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo, formando un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o para impartir a la molécula otra característica funcional además de la capacidad para unirse al antígeno. Los agentes de unión específica de la descripción pueden llevar un marcador detectable, o pueden conjugarse con una toxina o un resto de direccionamiento o enzima (por ejemplo, mediante un enlace o unión peptídico). Por ejemplo, un agente de unión específica puede comprender un sitio catalítico (por ejemplo, en un dominio de enzima), así como un sitio de unión a antígeno, en el que el sitio de unión al antígeno se une al antígeno y por lo tanto se orienta al sitio catalítico para el antígeno. El sitio catalítico puede inhibir la función biológica del antígeno, por ejemplo, por escisión.

40 **[0284]** En relación con la generación de anticuerpos terapéuticos avanzados, donde la fijación del complemento es un atributo deseable, puede ser posible eludir la dependencia del complemento para la muerte celular a través del uso de anticuerpos biespecíficos, inmunotoxinas o radiomarcadores, por ejemplo.

45 **[0285]** Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden generar que comprenden (i) dos anticuerpos uno con una especificidad para B7-H1 y otro para una segunda molécula que se conjugan entre sí, (ii) un único anticuerpo que tiene una cadena específica para B7-H1 y una segunda cadena específica para una segunda molécula, o (iii) un anticuerpo de una cadena simple que tiene especificidad para B7-H1 y la otra molécula. Tales anticuerpos biespecíficos pueden generarse usando técnicas que son bien conocidas; por ejemplo, en relación con (i) y (ii) véase por ejemplo, Fanger et al. *Immunol Methods* 4: 72-81 (1994) y Wright y Harris, supra. y en relación con (iii) véase por ejemplo, Traunecker et al. *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7: 51-52 (1992). En cada caso, la segunda especificidad puede hacerse como se desee. Por ejemplo, la segunda especificidad puede hacerse para los receptores de activación de cadena pesada, incluyendo, sin limitación, CD16 o CD64 (véase por ejemplo, Deo et al *Immunol Today* 18: 127 (1997)) o CD89 (véase por ejemplo, Valerius et al., *Blood* 90: 4.485-4.492 (1997)).

55 **[0286]** Los anticuerpos también pueden modificarse para actuar como inmunotoxinas mediante el uso de técnicas que son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Vitetta *Immunol Today* 14: 252 (1993). Véase también la Patente de Estados Unidos Nº 5.194.594. En relación con la preparación de anticuerpos radiomarcados, tales anticuerpos modificados, también pueden ser fácilmente preparados mediante técnicas que son bien conocidas en la técnica. Véase por ejemplo, Junghans et al. en *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2ª edición, Chafner y Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). Véase también la patente de Estados Unidos Nos. 4.681.581, 4.735.210, 5.101.827, 5.102.990 (RE 35.500), 5.648.471, y 5.697.902. Cada inmunotoxina o molécula radiomarcada serían propensos a matar las células que expresan el dominio de oligomerización de la subunidad de la enzima multimérica deseado.

65 **[0287]** Cuando un anticuerpo se une a un agente (por ejemplo, radioisótopo, composición farmacéutica, o una toxina) se contempla que el agente posee una propiedad farmacéutica seleccionada de entre el grupo de

antimitótico, alquilante, antimetabolito, antiangiogénico, apoptosis, alcaloide, COX-2, y agentes antibióticos y combinaciones de los mismos. El agente puede ser seleccionado del grupo de las mostazas de nitrógeno, derivados de etilenimina, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas, triazenos, análogos de ácido fólico, antraciclinas, taxanos, inhibidores de COX-2, análogos de pirimidina, análogos de purina, antimetabolitos, antibióticos, enzimas, epipodofilotoxinas, complejos de coordinación de platino, alcaloides de vinca, ureas sustituidas, derivados de metilhidrazina, supresores adrenocorticales, antagonistas, endostatina, taxoles, camptotecinas, oxaliplatino, doxorubicinas y sus análogos, y una combinación de los mismos. Ejemplos de toxinas incluyen, además, gelonina, exotoxina de *Pseudomonas* (PE), PE40, PE38, toxina de la difteria, ricina, abrina, alfa toxina, saporina, ribonucleasa (ARNasa), ADNasa I, enterotoxina estafilocócica-A, proteína antiviral de fitolaca, gelonina endotoxina de *Pseudomonas*, miembros de la familia enedina de moléculas, tales como caliqueamicina y esperamicina, así como derivados, combinaciones y modificaciones de las mismas. Las toxinas químicas también se pueden tomar del grupo que consiste de duocarmicina (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.703.080 y la Patente de Estados Unidos N° 4.923.990), metotrexato, doxorubicina, melfalán, clorambucilo, ARA-C, vindesina, mitomicina C, cis-platino, etopósido, bleomicina y 5-fluorouracilo. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos también incluyen adriamicina, doxorubicina, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina (Ara-C), ciclofosfamida, tiotepa, Taxotere (docetaxel), busulfán, citoxina, taxol, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (véase, patente de EE.UU. n° 4.675.187), melfalán y otras mostazas de nitrógeno relacionadas. Las toxinas adecuadas y los agentes quimioterapéuticos se describen en Remington Pharmaceutical Sciences, 19a Ed. (Mack Publishing Co., 1995), y en Goodman y Gilman The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7ª Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985). Otras toxinas y/o agentes quimioterapéuticos adecuados son conocidos por los expertos en la técnica.

[0288] Los ejemplos de radioisótopos incluyen emisores gamma, emisores de positrones, y emisores de rayos x que se pueden utilizar para la localización y/o terapia, y emisores beta y emisores alfa que pueden ser utilizados para la terapia. Los radioisótopos descritos anteriormente como útiles para diagnósticos, pronósticos y estadificación también son útiles para la terapia.

[0289] Ejemplos no limitantes de agentes anti-cáncer o anti-leucemia incluyen antraciclinas, tales como doxorubicina (adriamicina), daunorubicina (daunomicina), idarrubicina, detorrubicina, carminomicina, epirubicina, esorubicina, y morfolino y derivados sustituidos, combinaciones y modificaciones de los mismos. Los agentes farmacéuticos de ejemplo incluyen cis-platino, taxol, caliqueamicina, vincristina, citarabina (Ara-C), ciclofosfamida, prednisona, daunorubicina, idarubicina, fludarabina, clorambucilo, interferón alfa, hidroxiurea, temozolomida, talidomida, y bleomicina, y derivados, combinaciones y modificaciones de los mismos. Preferiblemente, el anti-cáncer o anti-leucemia es doxorubicina, morfolinodoxorubicina, o morpholinodaunorubicina.

[0290] Los anticuerpos de la descripción también abarcan anticuerpos que tienen semividas (por ejemplo, semividas en suero) en un mamífero, preferiblemente un humano, mayor que la de un anticuerpo no modificado. En un caso, la semivida del anticuerpo es mayor que aproximadamente 15 días, más que aproximadamente 20 días, más de aproximadamente 25 días, más de aproximadamente 30 días, más de aproximadamente 35 días, más de aproximadamente 40 días, más que aproximadamente 45 días, más que aproximadamente 2 meses, más de aproximadamente 3 meses, más de aproximadamente 4 meses, o más de aproximadamente 5 meses. El aumento de la semivida de los anticuerpos de la presente descripción o fragmentos de los mismos en un mamífero, preferiblemente un humano, dan como resultado un título de suero más alto de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo en el mamífero, y por lo tanto, reducen la frecuencia de la administración de dicho anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y/o reducen la concentración de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que van a administrarse. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen mayor semivida in vivo se pueden generar por técnicas conocidas para los expertos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de los mismos con un aumento de la semivida in vivo se pueden generar mediante la modificación (por ejemplo, sustitución, delección o adición) de residuos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre el dominio Fc y el receptor FcRn (véase, por ejemplo, publicación Internacional Nos. WO 97/34631 y WO 02/060919).

[0291] Los anticuerpos o fragmentos de los mismos con una mayor semivida in vivo se pueden generar mediante la unión a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de moléculas de polímero tales como polietilenglicol de alto peso molecular (PEG). El PEG puede estar unido a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo con o sin un enlazador multifuncional, ya sea a través de la conjugación específica de sitio del PEG al extremo N o C-terminal de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos o a través de grupos épsilon-amino presentes en los residuos de lisina. Se utilizará la derivatización de polímero lineal o ramificado que resulta en una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación se seguirá de cerca mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas para asegurar la conjugación apropiada de moléculas de PEG a los anticuerpos. El PEG sin reaccionar se puede separar de los conjugados anticuerpo-PEG mediante, por ejemplo, cromatografía por exclusión por tamaño o cromatografía de intercambio iónico.

[0292] Como se entenderá por un experto en la técnica, en los casos anteriores, aunque los valores de afinidad pueden ser importantes, otros factores pueden ser tan importantes o más, dependiendo de la función particular del anticuerpo. Por ejemplo, para una inmunotoxina (toxina asociada a un anticuerpo), el acto de la unión del anticuerpo

a la diana puede ser útil; sin embargo, en algunos casos, es la internalización de la toxina en la célula lo que es el resultado final deseado. Como tal, los anticuerpos con un porcentaje alto de internalización pueden ser deseables en estas situaciones. Por lo tanto, en un caso, se contemplan anticuerpos con una alta eficiencia en la internalización. Una alta eficiencia de internalización se puede medir como un porcentaje de anticuerpo internalizado, y puede ser de un valor bajo a 100%. Por ejemplo, en diversos casos, 0,1-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-45, 45-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-99, y 99-100% puede ser una alta eficiencia. Como se apreciará por un experto en la técnica, la eficiencia deseable puede ser diferente en diferentes casos, dependiendo de, por ejemplo, el agente asociado, la cantidad de anticuerpo que puede ser administrado a un área, los efectos secundarios del complejo anticuerpo-agente, el tipo (por ejemplo, el tipo de cáncer) y la gravedad del problema a tratar.

[0293] En otros casos, los anticuerpos descritos en la presente memoria proporcionan un kit de ensayo para la detección de la expresión de B7-H1 en los tejidos o células de mamífero con el fin de la detección de una enfermedad o trastorno asociado con cambios en la expresión de B7-H1. El kit comprende un anticuerpo que se une a B7-H1 y medios para indicar la reacción del anticuerpo con el antígeno, si está presente.

[0294] En algunos casos, se proporciona un artículo de fabricación que comprende un recipiente, que comprende una composición que contiene un anticuerpo que se une específicamente a B7-H1, y un prospecto o etiqueta que indica que la composición puede utilizarse para tratar la enfermedad mediada por la expresión de B7-H1. Preferiblemente un mamífero y, más preferiblemente, un ser humano, reciben el anticuerpo que se une específicamente a B7-H1.

Combinaciones

[0295] El tratamiento antitumoral definido en el presente documento se puede aplicar como una terapia única o puede implicar, además de los compuestos de la descripción, la cirugía convencional, trasplante de médula ósea y células madre periféricas o radioterapia o quimioterapia. La quimioterapia puede incluir una o más de las siguientes categorías de agentes antitumorales:

(i) otros fármacos antiproliferativos/antineoplásicos y combinaciones de los mismos, como se usa en oncología médica, tales como agentes alquilantes (por ejemplo cis-platino, oxaliplatino, carboplatino, ciclofosfamida, mostaza de nitrógeno, melfalán, clorambucilo, busulfán, temozolamida y nitrosoureas); antimetabolitos (por ejemplo gemcitabina y antifolatos tales como fluoropirimidinas como 5-fluorouracilo y tegafur, raltitrexed, metotrexato, arabinósido de citosina, e hidroxiaurea); antibióticos antitumorales (por ejemplo antraciclinas como adriamicina, bleomicina, doxorubicina, daunomicina, epirubicina, idarubicina, mitomicina-C, dactinomicina y mitramicina); agentes antimetabólicos (por ejemplo alcaloides de vinca como vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina y taxoides como taxol y taxotere e inhibidores de poloquinasa); e inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo epipodofilotoxinas como etopósido y tenipósido, amsacrina, topotecan y camptotecina);

(ii) agentes citostáticos tales como antiestrógenos (por ejemplo tamoxifeno, fulvestrant, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno y yodoxifeno), antiandrógenos (por ejemplo bicalutamida, flutamida, nilutamida y acetato de ciproterona), antagonistas de LHRH o agonistas de LHRH (por ejemplo goserelina, leuprorelina y buserelina), progestógenos (por ejemplo acetato de megestrol), inhibidores de aromatasas (por ejemplo como anastrozol, letrozol, vorazol y exemestano) e inhibidores de 5-alfa reductasa tales como finasterida;

(iii) agentes anti-invasión (por ejemplo inhibidores de la familia de c-Src quinasa como 4-(6-cloro-2,3-metilendioxi-anilino)-7-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]-5-tetrahidropiran-4-iloxiquinazolina (AZD0530; Solicitud de Patente Internacional WO 01/94341) y N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-[6-[4-(2-hidroxietil) piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-ilamino]tiazol-5-carboxamida (dasatinib, BMS-354825; J. Med. Chem, 2004, 47, 6658-6661), e inhibidores de metaloproteinasas como marimastat, inhibidores de la función del receptor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa o inhibidores de la actividad de la catepsina, los inhibidores de proteasas de serina por ejemplo matriptasa, hepsina, uroquinasa e inhibidores de la función $\alpha v \beta 6$ de integrina.

(iv) agentes citotóxicos, tales como fludarabina, 2-clorodesoxiadenosina, clorambucilo o doxorubicina y la combinación de los mismos tales como fludarabina + ciclofosfamida, CVP : ciclofosfamida + vincristina + prednisona, ACVBP: doxorubicina + ciclofosfamida + vindesina + bleomicina + prednisona, CHOP: ciclofosfamida + doxorubicina + vincristina + prednisona, CNOP: ciclofosfamida + mitoxantrona + vincristina + prednisona, m-BACOD: metotrexato + bleomicina + doxorubicina + ciclofosfamida + vincristina + dexametasona + leucovorina, MACOP-B.: metotrexato + doxorubicina + ciclofosfamida + vincristina + prednisona a dosis fija + bleomicina + leucovorina, o ProMACE CytaBOM: prednisona + doxorubicina + ciclofosfamida + etopósido + citarabina + bleomicina + vincristina + metotrexato + leucovorina.

(v) inhibidores de la función del factor de crecimiento: por ejemplo tales inhibidores incluyen anticuerpos del factor de crecimiento y anticuerpos de receptor de factor de crecimiento (por ejemplo el anticuerpo anti-erbB2 trastuzumab [Herceptin®], el anticuerpo anti-EGFR panitumumab, el anticuerpo anti-erbB1 cetuximab [Erbix, C225] y cualquier anticuerpo contra el factor de crecimiento o contra el receptor del factor de crecimiento descritos por Stern et al Critical Reviews in oncology/hematology, 2005, Vol 54, pp11-29); tales inhibidores también incluyen inhibidores de tirosina quinasa, por ejemplo inhibidores de la familia del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo inhibidores de la tirosina quinasa de la familia EGFR, tales como N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolin-4-amina (gefitinib, ZD 1839), N-(3-etilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)quinazolin-4-amina (erlotinib, OSI-774) y 6-acrilamido-N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-(3-morfolinopropoxi)quinazolin-4-amina (CI 1033), inhibidores de tirosina quinasa erbB2 tales como lapatinib, inhibidores de la familia del factor de crecimiento de

hepatocitos, inhibidores de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas tales como imatinib, inhibidores de serina/treonina quinasas (por ejemplo inhibidores Ras/Raf tales como inhibidores de farnesil transferasa, por ejemplo sorafenib (BAY 43-9006)), inhibidores de señalización celular a través de MEK y/o AKT quinasas, inhibidores de la familia del factor de crecimiento de hepatocitos, inhibidores de c-kit, inhibidores de quinasa abl, inhibidores de la quinasa del receptor IGF (factor de crecimiento similar a la insulina); inhibidores de la aurora quinasa (por ejemplo AZD1152, PH739358, VX-680, MLN8054, R763, MP235, MP529, VX-528 y AX39459) e inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina tales como inhibidores de CDK2 y/o inhibidores de CDK4, y los inhibidores de las proteínas de señalización de supervivencia, tales como Bcl-2, Bcl-XL por ejemplo ABT-737;

(vi) agentes antiangiogénicos tales como los que inhiben los efectos del factor de crecimiento endotelial vascular, [por ejemplo, el anticuerpo contra el factor de crecimiento endotelial vascular bevacizumab (Avastin™)] e inhibidores de la tirosina quinasa del receptor VEGF, tales como 4-(4-bromo-2-fluoroanilino)-6-metoxi-7-(1-metilpiperidin-4-ilmetoxi)quinazolina (ZD6474; Ejemplo 2 en WO 01/32651), 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-pirrolidin-1-ilpropoxi)quinazolina (AZD2171; Ejemplo 240 en WO 00/47212), vatalanib (PTK787; WO 98/35985) y SU11248 (sunitinib; WO 01/60814), compuestos tales como los descritos en las solicitudes de patente internacional WO97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856, WO 98/13354, WO00/47212 y WO01/32651, anticuerpos del receptor del factor de crecimiento endoteliales anti vasculares tales como anticuerpos anti-KDR y anticuerpos anti-Flt1, y compuestos que funcionan por otros mecanismos (por ejemplo linomida, inhibidores de la función $\alpha v\beta 3$ de integrina y angiostatina) o el factor 1 estimulador de colonias (CSF-1) o el receptor de CSF-1; Detalles adicionales sobre AZD2171 se pueden encontrar en Wedge et al (2005) Cancer Research. 65 (10): 4389-400. Detalles adicionales sobre AZD6474 se pueden encontrar en Ryan y Wedge (2005) British Journal of Cancer. 92 Suppl 1: S6-13.

(vii) agentes que causan daño vascular, tales como combretastatina A4 y los compuestos descritos en las solicitudes de patente internacionales WO 99/02166, WO 00/40529, WO 00/41669, WO 01/92224, WO 02/04434 y WO 02/08213;

(viii) terapias antisentido, por ejemplo las que están dirigidas a las dianas enumeradas anteriormente, tales como ISIS 2503, un antisentido anti-ras o G3139 (Genasense), un antisentido anti bcl2;

(ix) enfoques de terapia génica, incluyendo por ejemplo propuestas para sustituir genes aberrantes tales como p53 o BRCA1 o BRCA2 aberrantes, GDEPT (terapia con enzima profármaco dirigida por genes) tales como los que usan citosina desaminasa, timidina quinasa o una nitrorreductasa bacteriana y enfoques para aumentar la tolerancia del paciente a la quimioterapia o radioterapia, tales como terapia génica de resistencia a múltiples fármacos;

(x) enfoques de inmunoterapia, incluyendo por ejemplo el tratamiento con alemtuzumab (CAMPATH-1H™, un anticuerpo monoclonal dirigido a CD52, o el tratamiento con anticuerpos dirigidos a CD22, enfoques ex vivo e in vivo para incrementar la inmunogenicidad de células tumorales del paciente, la transfección con citoquinas tales como interleuquina 2, interleuquina 4 o factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, enfoques para disminuir la anergia de células T, tales como el tratamiento con anticuerpos monoclonales que inhiben la función de CTLA-4, enfoques que usan células inmunitarias transfectadas tales como células dendríticas de citoquinas transfectadas, enfoques usando líneas celulares tumorales transfectadas con citoquinas y enfoques utilizando anticuerpos anti-idiotípicos, la transferencia adoptiva de células T utilizando células T que han sido activada o dirigidas no específicamente a un antígeno específico de interés ex vivo;

(xi) enfoques de vacunación, incluyendo por ejemplo el tratamiento con una vacuna dirigida contra una infección viral específica, como el VIH o HBV, tratamiento con una vacuna dirigida contra un antígeno específico de tumor;

(xii) inhibidores de la degradación de proteínas tales como el inhibidor del proteasoma, tales como Velcade (Bortezomid); y

(xiii) enfoques terapéuticos bioterapéuticos por ejemplo aquellos que utilizan péptidos o proteínas (tales como anticuerpos o construcciones de dominio receptor externo solubles) que secuestran los ligandos del receptor, bloquean la unión del ligando a receptor o disminuyen la señalización del receptor (por ejemplo debido a la degradación del receptor mejorado o los niveles de expresión disminuidos).

[0296] En un caso, el tratamiento antitumoral definido en este documento puede implicar, además de los compuestos de la descripción, el tratamiento con otros fármacos antiproliferativos/antineoplásicos y combinaciones de los mismos, como se usa en oncología médica, tales como agentes alquilantes (por ejemplo cis-platino, oxaliplatino, carboplatino, ciclofosfamida, mostaza de nitrógeno, melfalán, clorambucilo, busulfán, temozolamida y nitrosoureas); antimetabolitos (por ejemplo gemcitabina y antifolatos tales como fluoropirimidinas como 5-fluorouracilo y tegafur, raltitrexed, metotrexato, arabinósido de citosina, e hidroxiaurea); antibióticos antitumorales (por ejemplo antraciclinas como adriamicina, bleomicina, doxorubicina, daunomicina, epirubicina, idarubicina, mitomicina-C, dactinomicina y mitramicina); agentes antimetabólicos (por ejemplo alcaloides de vinca como vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina y taxoides como taxol y taxotere e inhibidores de poloquinasa); e inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo epipodofilotoxinas como etopósido y tenipósido, amsacrina, topotecán y camptotecina).

[0297] El tratamiento en conjunto puede conseguirse por medio de la dosificación simultánea, secuencial o separada de los componentes individuales del tratamiento. Tales productos de combinación emplean los compuestos de esta descripción, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, dentro del intervalo de dosificación descrito anteriormente y el otro agente farmacéuticamente activo dentro de su intervalo de dosificación aprobado.

EJEMPLOS

65

[0298] Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos realizados y los resultados obtenidos, se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes en las enseñanzas en el presente documento.

5 **EJEMPLO 1: EXPRESIÓN DE B7-H1 HUMANA RECOMBINANTE**

[0299] El ADNc de B7-H1 humano cDNA (Dong, H. et al, 1999, Nat Med 5: 1365 a 1369) se amplificó a partir del clon Image 7262208 (ATCC) usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y después se clonó en los sitios Nhe 1 y EcoR1 del vector pcr3.1Bid. Este constructo se lipofectó en células CHO (colección American Tissue Type, catálogo CCL-61 #) y la expresión en la superficie celular se confirmó por selección de células activadas por fluorescencia (FACS).

[0300] El dominio extracelular de B7-H1 humana (residuos de aminoácidos 1-239) fusionado a la región Fc de la IgG1 humana se adquirió de R & D Systems Inc., No. de catálogo 156-B7-100.

15 **EJEMPLO 2: INMUNIZACIÓN Y TITULACIÓN**

Inmunización

20 [0301] Los anticuerpos monoclonales contra B7-H1 humana se desarrollaron inmunizando secuencialmente ratones Xenomouse® (cepas Xenomouse: XMG2 (IgG2 kappa/lambda) y XMG4 (IgG4 kappa/lambda) Amgen, Inc. Vancouver, British Columbia, Canadá), ya sea con 5-10 ug de B7-H1/Fc de la proteína quimera o 1-2x10⁶ (6) células CHO que expresan recombinante B7-H1 humana como se describe en el Ejemplo 1.

25 [0302] Las inmunizaciones se llevaron a cabo según los procedimientos descritos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de serie 08/759.620, presentada el 3 de diciembre de 1996, y la Solicitud de Patente Internacional Nos. WO 98/24893, publicada el 11 de junio de 1998, y WO 00/76310, publicados 21 de diciembre de 2000.

30 [0303] Los programas de inmunización se resumen en la Tabla 2.

Selección de los animales para recoger mediante el título

35 [0304] Los títulos de anticuerpos en los sueros de los ratones inmunizados se determinaron en un ensayo ELISA. Las placas (Corning Costar, cat # 3368) se recubrieron con la proteína humana B7-H1/Fc (R & D Systems Inc., n° de catálogo 156-B7-100). Los anticuerpos específicos de B7-H1 se detectaron con anticuerpo de ratón anti-IgG humana y anticuerpo de cabra anti-ratón IgG Fc conjugado a peroxidasa de rábano picante. Típicamente, se seleccionaron cinco animales con los títulos más altos dentro de cada cohorte de inmunización para el aislamiento de linfocitos y la generación de hibridomas.

40

Tabla 2. Resumen de los programas de inmunización

Grupo	Inmunógeno	Cepa	No. de ratones	Rutas de inmunización
1	Proteína B7-H1/Fc recombinante humana	IgG2	10	IP/SC, dos veces/semana, durante 5 semanas
2	Proteína B7-H1/Fc recombinante humana	IgG4	10	IP/SC, dos veces/semana, durante 5 semanas
3	Células CHO que expresan B7-H1 humana	IgG2	10	IP/SC, dos veces/semana, durante 5 semanas
4	Células CHO que expresan B7-H1 humana	IgG4	10	IP/SC, dos veces/semana, durante 5 semanas

"IP" se refiere a "intraperitoneal" y "SC" se refiere a "subcutánea"

45 **EJEMPLO 3: RECUPERACIÓN D ELINFOCITOS, AISLADOS DE CÉLULAS b, FUSIONES Y GENERACIÓN DE HIBRIDOMAS**

[0305] Los ratones inmunizados se sacrificaron por dislocación cervical, y los ganglios linfáticos drenados se recogieron y se combinaron a partir de cada cohorte. Las células linfoides se disociaron por trituración en DMEM para liberar las células de los tejidos y las células se suspendieron en DMEM. Se contaron las células, y se añadieron 0,9 ml de DMEM por 100 millones de linfocitos al sedimento celular para resuspender las células suavemente pero completamente. Usando 100 ul de miroesferas magnéticas CD90+ por 100 millones de células, las

50

células se marcaron mediante la incubación de las células con las microesferas magnéticas a 4°C durante 15 minutos. La suspensión de células marcadas magnéticamente que contiene hasta 10⁸ células positivas (o hasta 2x10⁹ células totales) se cargó en una columna LS + y la columna se lavó con DMEM. El efluente total se recogió como la fracción CD90-negativa (la mayoría de estas células se espera que sean células B).

[0306] La fusión se realizó mezclando células B lavadas enriquecidas anteriores y células P3X63Ag8.653 del mieloma no secretor compradas de ATCC, cat. # CRL 1580 (Kearney et al, J. Immunol. 123, 1979, 1548-1550) en una relación 1:1. La mezcla de células se sedimentó suavemente por centrifugación a 800 x g. Después de la eliminación completa del sobrenadante, las células se trataron con 2-4 ml de solución de pronasa (Calbiochem, Cat # 53702; 0,5 mg/ml en PBS) durante no más de 2 minutos. Después se añadieron 3-5 ml de FBS para detener la actividad enzimática y la suspensión se ajustó a 40 ml de volumen total usando solución de electrofusión celular, (ECF, sacarosa 0,3 M, Sigma, Cat # S7903, 0,1 mM acetato de magnesio, Sigma, Cat # M2545, 0,1 mM acetato de calcio, Sigma, Cat # C4705). Se retiró el sobrenadante después de la centrifugación y las células se resuspendieron en 40 ml de ECFS. Esta etapa de lavado se repitió y las células de nuevo se volvieron a suspender en ECFS hasta una concentración de 2x10⁶ células/ml.

[0307] La electrofusión de células se realizó usando un generador de fusión (modelo ECM2001, Genetronic, Inc., San Diego, CA). El tamaño de la cámara de fusión utilizada fue de 2,0 ml, con las siguientes configuraciones instrumentales:

Condición de alineamiento: voltaje 50 V, tiempo: 50 s.
Rotura de membrana a: voltaje: 3000 V, tiempo: 30 us
tiempo de retención post-fusión: 3 s

[0308] Después de ECF, las suspensiones celulares se retiraron con cuidado de la cámara de fusión en condiciones estériles y se transfirieron a un tubo estéril que contenía el mismo volumen de medio de cultivo para hibridoma (DMEM, JRH Biosciences), 15% de FBS (Hyclone), suplementado con L-glutamina, pen/strep, OPI (oxaloacetato, piruvato, insulina bovina) (todos de Sigma) y IL-6 (Boehringer Mannheim). Las células se incubaron durante 15-30 minutos a 37°C, y después se centrifugaron a 400 xg (1.000 rpm) durante cinco minutos. Las células se resuspendieron suavemente en un pequeño volumen de medio de Selección para hibridoma (medio de cultivo para hibridoma suplementado con 0,5 x HA (Sigma, cat. # A9666)), y el volumen se ajustó apropiadamente con más Medio de Selección, para hibridoma basado en una distribución por placas final de 5x10⁶ células B totales por placa de 96 pocillos y 200 ul por pocillo. Las células se mezclaron suavemente y se pipetearon en placas de 96 pocillos y se dejaron crecer. En el día 7 ó 10, se eliminó la mitad del medio, y las células realimentaron con Medio de Selección para hibridoma.

[0309] Los hibridomas se cultivaron de forma rutinaria en el medio selectivo. Los sobrenadantes agotados recogidos de los hibridomas se probaron en varios ensayos como se describe en los Ejemplos 4-5. Sólo a tener en cuenta, los anticuerpos que comiencen con 3, por ejemplo, 3.15G8, son IgG4 y anticuerpos que comiencen con un 2, por ejemplo, 2.9D10, son IgG2.

EJEMPLO 4. UNIÓN A CÉLULAS UNIDAS A B7-H1 HUMANA Y DE MONO CYNOMOLGUS

[0310] Los sobrenadantes recogidos de células de hibridoma se ensayaron para evaluar la capacidad de los anticuerpos secretados de unirse a células 293T que expresan transitoriamente B7-H1 humana o de cynomolgus de longitud completa. Una línea de células 293T transfectadas de manera simulada se utilizó como control negativo. Las células diluidas en PBS que contenía FBS al 2% se sembraron a una densidad de 2500-3000 de expresión y 15000-17500 células de control falsamente transfectadas en 40 ul/pocillo en placas de 384 pocillos (Corning Costar, n° de catálogo 3712). Inmediatamente después de la siembra, se añadieron 10 ul/pocillo de sobrenadantes de hibridoma y las placas se incubaron durante 1,5 horas a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 10 ul/pocillo de IgG Fc antihumana de cabra conjugada con Cy5 (700 ng/ml, Jackson Immunoresearch, catálogo # 109-175-098) y las placas se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente antes de la lectura de la señal de fluorescencia en el instrumento FMAT 8200 (Applied Biosystems). Los resultados para 6 sobrenadantes de hibridoma se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Unión de los sobrenadantes de hibridoma a B7-H1 humana o de cynomolgus unida a células

ID anticuerpo	Unión a B7-H1 humana			Unión a B7-H1 de mono cynomolgus		
	Recuento	FL1	FL1xrecuento	Recuento	FL1	FL1xrecuento
2.9D10	22	7176	157872	54	5526,9	298 454
2.14H9	31	10289	318949	56	6777,9	379 561
3.15G8	22	8811	193850	64	8647,1	553414
2.20A8	34	10283	349622	65	7930,5	51548
2.7A4	37	6975.9	258108	59	8697,7	513164
3.18G1	21	10862	228106	66	10336,3	682195

EJEMPLO 5: INHIBICIÓN DE LA UNIÓN RECEPTOR-LIGANDO B7-H1/PD-1

[0311] Para determinar la potencia relativa de los sobrenadantes que contienen anticuerpos, su capacidad para inhibir la unión de la proteína/Fc PD-1 humano a B7-H1 humana expresada en la superficie de las células CHO fue evaluada. 25000 células/pocillo se sembraron en 50 ul de medio en pocillos de una placa de cultivo tisular de 384 pocillos (Corning Costar, nº de catálogo 3712). Al día siguiente, se añadieron 50 ul/pocillo de sobrenadante de hibridoma diluido (1:5) y se incubaron las placas a 4°C durante 1 hora en un agitador. Se añadió proteína PD-1 biotinilada humana/Fc (R & D Systems, nº de catálogo 1086-PD) a una concentración final de 1,25 ug/ml y las placas se incubaron a 4°C durante 1 hora en un agitador. Las células se lavaron y se fijaron en 100 ul de PBS que contenía 3,7% de formaldehído y 3% de albúmina de suero bovino durante 20 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron y se incubaron en 100 ul de PBS que contenía 0,6% de H₂O₂ y 3% de albúmina de suero bovino durante 10 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron y se incubaron en 50 ul de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante diluido a 1:4000 durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron antes de la detección de la señal. Los datos se representan como el porcentaje de (DOMax-Domin), donde DOMax es el valor promedio obtenido con las células incubadas con los sobrenadantes de hibridoma irrelevantes en presencia de proteína PD-1/Fc humana conjugada con biotina y D_{omin} es el valor promedio obtenido con las células incubadas con sobrenadantes de hibridoma irrelevantes en la ausencia de la proteína PD-1/Fc humana conjugada con biotina. 0% de respuesta máxima indica 100% de inhibición de unión de B7-H1/PD-1 por un sobrenadante de hibridoma (Tabla 4).

Tabla 4. Inhibición de la unión de PD1 humana a células que expresan B7-H1 humana por sobrenadantes de hibridoma

ID Anticuerpo	Unión de PD1-Fc a células CHO-huB7-H1 (% del máximo)
2.9D10	-5
2.14H9	5
3.15G8	4
2.20A8	0
2.7A4	0
3.18G1	5

EJEMPLO 6: UNIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-B7-H1 PURIFICADOS A B7-H1 HUMANA, B7-DC HUMANA, B7-H1 DE RATÓN

[0312] Se determinó la capacidad de unión de los anticuerpos purificados a B7H1, B7-DC humanos, B7H1 de ratón y mono cynomolgus mediante análisis FACS. Brevemente, las células 293T se transfectaron como control o se transfectaron transitoriamente con B7-H1 humana o B7-DC humana usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, nº de catálogo 11668). Las células de ratón J558 que expresan B7-H1 de ratón se obtuvieron de ATCC (nº de catálogo TIB-6). Las células se resuspendieron en PBS que contenía 2% de FBS (tampón FACS) y se sembraron a 50000 células/pocillo en placas de fondo en V. Se añadieron anticuerpos de control anti-B7-H1 e isotipos diluidos en un tampón FACS a una concentración final de 5 ug/ml y las placas se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Después de lavar con tampón FACS, se agregó anti-Fc Cy5 humano de cabra (5 ug/ml, Jackson Immunoresearch, catálogo # 109-175-098) y 7-AAD (5 ug/ml) y las placas se incubaron durante 15 min a 4 °C antes de ser lavada de nuevo con tampón FACS y leerse en un instrumento FACSCalibur. La Tabla 5 muestra capacidad de los anticuerpos purificados (5 ug/ml) para unirse a células 293T transfectadas con B7-H1 humana. Ninguno de los anticuerpos seleccionados se unen a células 293T transfectadas con B7-DC humana o a células J558 que expresan B7-H1 de ratón. El anticuerpo anti-B7-DC (PD-L2) humano de ratón (I + D Systems Cat # MAB1224, detectado con anticuerpo anti-Fc Cy5 de ratón de cabra, Jackson Immunoresearch) se utilizó como control positivo para la expresión de B7-DC. El anticuerpo de rata anti-B7-H1 de ratón conjugado a PE (eBioscience, clon M1H5, detectado con anticuerpo de cabra anti-Fc Cy5 de rata, Jackson Immunoresearch) se utilizó como control positivo para la expresión de B7-H1 de ratón.

Tabla 5. Unión de anticuerpos anti-B7-H1 purificados a B7-H1 humana, B7-H1 de ratón o B7-DC humana unidas a células

ID de Ab	B7-H1 humana(h)/293T (geopromedio)	B7-DC humana(h)/293T (geopromedio)	293T (geopromedio)	J558 (geopromedio)
2.9D10	463,3	8,7	8,9	3,2
2.14H9	792,1	11,4	9,9	3,0
3.15G8	1183,3	10,1	9,4	3,2
2.20A8	462,8	9,5	8,4	3,3
2.7A4	753,8	10,5	9,4	3,2
3.18G1	1539,6	9,7	10,5	3,2
IgG2	7,6	9,5	9,1	3,1

IgG4	10,7	8,8	9,3	3,2
------	------	-----	-----	-----

EJEMPLO 7: UNIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-B7-H1 PURIFICADOS A CÉLULAS T HUMANAS Y DE MONO CYNOMOLGUS ESTIMULADAS

5 **[0313]** Se incubaron placas de 96 pocillos de alta unión con 100 ul/pocillo de anticuerpo anti-CD3 diluido a 1 ug/ml en PBS (clon OKT3, eBioscience, catálogo # 160037) a 4°C durante la noche. Las células T humanas se aislaron del paquete leucocitario congelado utilizando el kit de enriquecimiento de células T (StemCell Technologies, catálogo # 19051). Las placas de mAb anti-CD3 recubiertas se lavaron con PBS y las células T purificadas se añadieron en 200 ul de medio de ICM a 360000 células/pocillo y se cultivaron durante 72 horas. Las células T se recogieron a
 10 continuación, se lavaron en tampón FACS y se mezclaron con anticuerpos anti-B7-H1 purificados diluidos o anticuerpos IgG2 o IgG4 humanos irrelevantes a una concentración final de 1 ug/ml en placas de 96 pocillos de ensayo con fondo en V (50 ul/pocillo). Después de 2 horas de incubación a 4°C, las células T se lavaron dos veces en tampón FACS y después se tiñeron con anticuerpos de cabra anti-IgG Fc humano conjugado con Cy5 (5 ug/ml, Jackson Immunoresearch, Catalog # 109-175-098) y 7-AAD (10 ug/ml). Las células se incubaron durante 30 min a 4
 15 °C antes de ser lavadas de nuevo con tampón FACS y ser leídas en un instrumento FACSCalibur. La población de linfocitos en vivo fue seleccionada para el análisis basado en dispersión frontal y lateral, así como tinción negativa para 7-AAD.

20 **[0314]** Para la activación de las células T de mono cynomolgus, se incubaron placas de 96 pocillos de alta unión con 100 ul/pocillo de anticuerpo de cabra anti-IgG Fc de ratón diluido a 1 ug/ml en PBS a 4°C durante la noche. Las placas se lavaron con PBS y se incubaron con anticuerpo anti-CD3 diluido a 1 ug/ml en medio ICM (clon SP-34, catálogo de BD # 556610) a 37°C durante 2 horas. Se aislaron PBMC de mono cynomolgus de sangre periférica (Bioreclamation, catálogo #CYNWBCPT). Las placas de mAb anti-CD3 recubiertas se lavaron con PBS y las PBMC
 25 aisladas se añadieron en 200 ul de medio de ICM a ~ 200000 células/pocillo y se cultivaron durante 72 horas. Las células se recogieron a continuación, se lavaron en tampón FACS y se mezclaron con anticuerpos anti-B7-H1 purificados diluidos o anticuerpos IgG2 o IgG4 humanos irrelevantes a una concentración final de 1 ug/ml en placas de 96 pocillos de ensayo con fondo en V (50 ul/pocillo). Después de 2 horas de incubación a 4°C, las células se lavaron dos veces en tampón FACS y después se tiñeron con anticuerpo de cabra anti- IgG Fc humano conjugado con Cy5 (5 ug/ml, Jackson Immunoresearch, Catalog # 109-175-098), anticuerpo anti-CD3 conjugado con FITC
 30 (diluido 1:25 Biospecialty) y 7-AAD (10 ug/ml). Las células se incubaron durante 1 hora a 4 °C antes de lavarse de nuevo con tampón FACS y ser leídas en un instrumento FACSCalibur. La población de linfocitos T de mono fue seleccionada para el análisis basado en dispersión frontal y lateral, así como tinción positiva para marcador CD3 y tinción negativa para 7-AAD. La Tabla 6 muestra la capacidad de los anticuerpos anti-B7-H1 purificados (1 ug/ml) para unirse a células T humanas activadas, así como a las células T de mono cynomolgus activadas.
 35

Tabla 6. Unión de anticuerpos anti-B7-H1 purificados a células T humanas o de mono cynomolgus estimuladas

ID de Ab	Células T humanas (geopromedio)	Células T de cyno (geopromedio)
2.9D10	49,0	106,8
2.14H9	53,0	106,3
3.15G8	48,0	92,8
2.20A8	41,0	80,7
2.7A4	49,0	103,9
3.18G1	45,0	94,6
IgG2	10,0	nd
IgG4	10,0	17,6

40 **EJEMPLO 8: INHIBICIÓN DE LA UNIÓN DE RECEPTOR-LIGANDO B7-H1/PD-1**

[0315] Se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-B7-H1 humanos purificados para inhibir la unión de proteína PD-1/Fc humana a B7-H1 humana expresada en la superficie de células ES-2 (ATCC, nº de catálogo CRL-1978). Brevemente, se sembraron 50000 células/pocillo en 50 ul de PBS en pocillos de una placa de cultivo tisular de 384
 45 pocillos (Corning Costar, nº de catálogo 3712). A continuación, se añadieron 50 ul/pocillo de un anticuerpo monoclonal diluido a una concentración final de 2,5, 0,5, 0,1, 0,02, 0,004, 0,008, 0,00016 nM y las placas se incubaron a 4°C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces y se agregaron 100 ul/pocillo de proteína PD-1/Fc biotinilada humana (10 ug/ml, R & D Systems, nº de catálogo 1086-PD) y las placas se incubaron a 4°C durante 1
 50 hora. Las células se lavaron una vez y se añadieron 100 ul/pocillo de estreptavidina conjugada con Cy5 y las placas se incubaron a 4°C durante 15 min antes de ser lavadas de nuevo con PBS que contiene 2% de FCS y ser leídas en un instrumento FACSCalibur. Algunos pocillos se incubaron con anticuerpos monoclonales IgG2 e IgG4 humanos irrelevantes con o sin PD-1/Fc humanas conjugadas con biotina para establecer el nivel mínimo (0%) y máximo (100%) de unión de B7-H1/PD-1. El porcentaje de la inhibición en relación con la concentración de anticuerpo se analizó utilizando la herramienta de ajuste de curvas (software GraphPad Prism) para calcular el valor IC50 para

cada anticuerpo, que se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Inhibición de la unión de PD1 humano a célula ES-2 que expresa B7-H1 humana por anticuerpos anti-B7-H1 purificados

5

ID de Ab	IC50, nM
2.9D10	0,109
2.14H9	0,083
3.15G8	0,148
2.20A8	0,198
2.7A4	0,077
3.18G1	0,140

EJEMPLO 9: DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS DE ANTICUERPOS ANTI-B7-H1 SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS T CD4

10 [0316] Se ha demostrado que la proteína B7-H1 copresentada con anticuerpo anti-CD3 en microesferas inhibe la activación de las células T medida por CD3 (Freeman et al, J. Exp Med, 2000, 192 (7): 1027-1034; Bennet et al, The Journal of Immunology, 2003, 170: 711-718). La capacidad de los anticuerpos anti-B7-H1 monoclonales humanos purificados para interferir con la supresión de la activación de células T mediada por B7-H1 se determinó de la siguiente manera.

15 [0317] Brevemente, 5x10⁸ (8) microesferas/ml de Dynabeads M-450 lavadas y activadas con tosilo (Invitrogen, Cat # 140.13) fueron recubiertas con 50 ug/ml de anticuerpo anti-CD3 humano de ratón (BD Bioscience, Cat # 555329) en tampón 0,1 M de fosfato de sodio (pH 7,4-8,0) a 37 °C durante 24 horas con agitación. 4x10⁸ de microesferas recubiertas con CD3/ml fueron acopladas adicionalmente con IgG1 Fc humana recombinante (R & D Systems, Cat # 110-HG-100) a 160 ug/ml o con la proteína recombinante humana B7-H1/Fc (R & D Systems, Cat # 156-B7-100) a 80 ug/ml en combinación con la proteína IgG1 Fc humana a 80 ug/ml (concentración total de 160 ug/ml) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas con agitación. Las microesferas se incubaron entonces en PBS que contenía 0,05% de albúmina de suero bovino a temperatura ambiente durante 1 hora, se lavaron cuatro veces en 0,1% de BSA y 2 mM de EDTA en PBS (pH 7,4) y finalmente se resuspendieron en medio RPMI1640 que contenía 10% de FBS a 5x10⁷ (7) microesferas/ml.

25 [0318] Se aislaron monocitos de sangre periférica a partir de un paquete de leucaféresis utilizando centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare 17-1440-03), se resuspendieron en RPMI 1640 sin suero (Gibco 22400-089), y las células T CD4⁺ se aislaron de PBMC usando el kit Dynal de aislamiento negativo de CD4 (Invitrogen, n° cat 113-37D) según las instrucciones del fabricante. Se mezclaron 10 ul de microesferas recubiertas con 10 ul de anticuerpo anti-B7-H1 o control IgG2/4 en un tubo de muestra y se incubaron a temperatura ambiente durante 3-4 horas en un agitador. Las células T CD4⁺ purificadas se cultivaron en placas a 10⁵ células/80 ul/pocillo en placas de 96 pocillos (Corning, n° de cat 3603) y se añadió la mezcla de microesferas-anticuerpo a 20 ul/pocillo a un volumen total de 100 ul/pocillo. La activación de células T en ausencia de efecto inhibitor de B7-H1 se determinó usando microesferas recubiertas con anticuerpo anti-CD3 y la proteína Fc IgG1 humana. Las células se cultivaron durante 5 días y se recogieron los sobrenadantes y se analizaron para la liberación de IFN- γ utilizando kit II BD Elisa de IFN- γ (BD Cat. No.550612) por instrucciones del fabricante. La proliferación celular se midió en el día 5 mediante la adición de 10 ul/pocillo de alamarblue (Invitrogen DAL 1025). Las células se incubaron durante 5 horas, y la fluorescencia se cuantificó en un espectrofotómetro SpectraMax Gemini EM con una longitud de onda de excitación de 545 nm y una longitud de onda de emisión de 600 nm. Los datos se representan como el porcentaje de D₀max, donde D₀max es el valor promedio obtenido con células T activadas con microesferas anti-CD3/IgG1Fc. Ver Figura 1.

45 **EJEMPLO 10: DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS DE ANTICUERPOS ANTI-B7-H1 SOBRE LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T CD4 EN UN ENSAYO DE LINFOCITOS MIXTOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS-CÉLULAS T**

50 [0319] La mejora de la activación de las células T con los anticuerpos dirigidos contra B7-H1 se determinó en un ensayo de linfocitos mixtos de células dendríticas y células T (DCMLR). Las células dendríticas se generan a partir de precursores de monocitos como se describe previamente (Curr Protoc Immunol 2001 May; Capítulo 7: Unidad 7.32). Se aislaron monocitos de sangre periférica a partir de un paquete de leucaféresis utilizando centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare 17-1440-03), se resuspendieron en RPMI 1640 libre de suero (Gibco 22400-089), y se dejaron adherir a matrices T150 de cultivo celular (Corning 430825). Después de 1 hora a 37 °C, se eliminaron las células no adherentes y las células se cultivaron en RPMI suplementado con suero humano al 5% (Invitrogen 34005100). Se añadieron citoquinas a una concentración final de 2 ng/ml de GM-CSF (BD Biosciences 550 068) y 10 ng/ml de IL-4 (BD Biosciences 554605). Los medios frescos con citoquinas se añadieron cada 2 - 3 días. En el día 6 de cultivo, las células se sometieron a maduración con 20 ng/ml de TNF-alfa (BD Biosciences 554618) y se dejaron incubar durante 24 horas. Se recogieron las células dendríticas maduras, se fenotiparon, y se congelaron para su uso posterior.

55

[0320] Se aislaron las células T CD4 + a partir de PBMC utilizando un kit de aislamiento magnético (Dyna 113.17) por las instrucciones del fabricante y se cultivaron en un MLR primario como se describe anteriormente (J Immunol 1 abril 2003; 170 (7): 3637-44). Las células T CD4+ de respuesta alogénica 1.5E5 se cultivaron en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (Costar 3595) con células dendríticas en una relación célula T:células dendríticas de 1:2,5. Las preparaciones de células dendríticas fueron tratadas con 100 ug/ml de mitomicina C (Sigma M4287) antes de la adición de cocultivo para evitar cualquier proliferación de linfocitos contaminantes. Se añadieron anticuerpos a diversas concentraciones en un volumen final de 200 ul de RPMI + suero humano al 10%. La incorporación de timidina se midió en el día 5 mediante un pulso de 16 h con [³H] timidina (1 uci/pocillo, Perkin-Elmer NET027001MC). Los sobrenadantes se recogieron antes del marcaje radiactivo y se analizaron para la liberación de IFN-gamma con el ensayo Luminex (BioRad 171-B11921) según las instrucciones del fabricante. El aumento de la proliferación de células T por los anticuerpos anti-B7-H1 de experimentos repetidos se muestra en la Figura 2. En la figura 3 se muestra la correspondiente liberación de IFN-gamma.

15 EJEMPLO 11: ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE ANTICUERPOS B7-H1

[0321] Las secuencias de dominio variable de cadena pesada y las secuencias del dominio variable de cadena ligera de los anticuerpos se secuenciaron para determinar sus secuencias de ADN. La información de secuencia completa para los anticuerpos anti-B7-H1 se proporciona en la lista de secuencias con las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos para cada combinación de cadenas gamma y kappa o lambda. Se analizaron las secuencias pesadas variables para determinar la familia VH y la secuencia de la región J. Las secuencias se tradujeron a continuación para determinar la secuencia primaria de aminoácidos y se compararon con las secuencias de VH y la región J de la línea germinal para evaluar hipermutaciones somáticas.

[0322] Las tablas 8 y 9 son tablas que comparan las regiones de la cadena pesada del anticuerpo con su región de cadena pesada de la línea germinal afín y las regiones de la cadena ligera del anticuerpo con su región de cadena ligera de la línea germinal afín. La numeración de los aminoácidos es mediante numeración numérica.

[0323] Los genes de inmunoglobulina se someten a diversas modificaciones durante la maduración de la respuesta inmune, incluyendo la recombinación entre los segmentos de los genes V, D y J, cambio de isotipo, y la hipermutación en las regiones variables. La recombinación y la hipermutación somática son las bases para la generación de diversidad de anticuerpos y afinidad de maduración, pero también pueden generar una responsabilidad secuencial que puede hacer que la producción comercial de tales inmunoglobulinas como agentes terapéuticos sea difícil o aumentar el riesgo de inmunogenicidad del anticuerpo. En general, las mutaciones en regiones CDR pueden contribuir a la mejora de la afinidad y la función, mientras que las mutaciones en regiones marco pueden aumentar el riesgo de inmunogenicidad. Este riesgo se puede reducir al revertir las mutaciones de marco variable en la línea germinal, garantizando al mismo tiempo que la actividad del anticuerpo no se ve afectada de manera adversa. Algunas responsabilidades estructurales pueden ser generadas por los procesos de diversificación, o pueden existir dentro de secuencias de línea germinal que contribuyen a los dominios variables de cadena pesada y ligera. Independientemente de la fuente, puede ser deseable eliminar las posibles responsabilidades estructurales que pueden resultar en inestabilidad, agregación, heterogeneidad de producto o aumento de la inmunogenicidad. Ejemplos de responsabilidades indeseables incluyen cisteínas no apareadas (que puede conducir a recombinación de enlace disulfuro o la formación de aducto de sulfhidrilo variable), sitios de glicosilación unidos a N (que resultan en la heterogeneidad de la estructura y la actividad), así como sitios de desamidación (por ejemplo, NG, NS), isomerización (DG), oxidación (metionina expuesta), e hidrólisis (DP).

[0324] Con el fin de reducir el riesgo de inmunogenicidad, y mejorar las propiedades farmacéuticas de los anticuerpos principales, puede ser deseable reducir el número de mutaciones de la línea germinal y/o eliminar las responsabilidades estructurales.

[0325] Por lo tanto, en un caso, donde un anticuerpo particular difiere de su respectiva secuencia de línea germinal en el nivel de aminoácidos, la secuencia del anticuerpo se puede mutar de nuevo a la secuencia de línea germinal. Tales mutaciones correctoras pueden ocurrir en uno, dos, tres o más posiciones, o una combinación de cualquiera de las posiciones mutadas, usando técnicas de biología molecular convencionales. Las tablas 10-14 siguientes ilustran las posiciones de tales variaciones de regreso a la línea germinal para mAb 2.9D10, 2.7A4 y 2.14H9. Cada fila representa una combinación única de residuos de la línea germinal y no germinal en la posición indicada en negrita. La posición del aminoácido está representada por numeración numérica.

[0326] En otro caso, la descripción incluye la sustitución de cualquier responsabilidad estructural en la secuencia que podrían afectar a la heterogeneidad de los anticuerpos de la descripción. Tales responsabilidades incluyen sitios de glicosilación, cisteínas no apareadas, metioninas expuestas en la superficie, etc. Para reducir el riesgo de dicha heterogeneidad se propone que se realicen cambios para eliminar una o más de dichas responsabilidades estructurales.

[0327] En un caso, puede ser deseable eliminar uno o más sitios de consenso de glicosilación ligados a N de la línea germinal de anticuerpos o secuencia de anticuerpo. Un experto en la técnica sería fácilmente capaz de identificar un

sitio de glicosilación. Normalmente una secuencia del sitio de consenso de glicosilación ligado a N tiene la secuencia de Asn-cualquier aminoácido-Ser o Thr, donde el aminoácido del medio no puede ser una prolina (Pro). En otro caso, las cisteínas no apareadas pueden ser reemplazadas solas o en conjunción con otros cambios estructurales. Una cisteína no apareada puede ser mutada a un aminoácido apropiado que tiene propiedades de cadena lateral comparables, tal como una serina.

5

[0328] Como se hace referencia en el presente documento, una secuencia que está optimizado es una secuencia que se ha mutado en una o más posiciones de nuevo a su secuencia de línea germinal o puede ser modificada para eliminar uno o más responsabilidades, tales como responsabilidades estructurales. Una secuencia optimizada también puede incluir una secuencia que se ha mutado en una o más posiciones de nuevo a su secuencia de línea germinal y que también se ha modificado adicionalmente para eliminar una o más responsabilidades estructurales.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 8

Cadena pesada	V	D	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	Línea germinal			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSY-WMS	WVROAPGKGLEWVA	NIKQDGESEKYVDSVKG	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	##WFGEL#FDY	WGQGLVTVSS
2.14H9	VH3-7	D3-10	JH4B		---R---				EGG---A---	
	Línea germinal			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTPSSY-WMS	WVROAPGKGLEWVA	NIKQDGESEKYVDSVKG	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	#QL##YF#DY	WGQGLVTVSS
3.15G8	VH3-7	D6-6	JH4B				---G---	F---	V--YSD---	
	Línea germinal			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSY-WMS	WVROAPGKGLEWVA	NIKQDGESEKYVDSVKG	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	DMNYYYGMDV	WGQGT-TVTVSS
2.9D10	VH3-7	D1-1	JH6B				---G-Q---		---G-D---	
	Línea germinal			EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFSSY-MN	WVROAPGKGLEWVS	SISSSSYIYYA	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	##TAMV#EDY	WGQGLVTVSS
2.7A4	VH3-21	D5-5	JH4B		---T---		---GD---	F---	DLV-S-A---	
	Línea germinal			EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTF-SSYAMS	WVROAPGKGLEWVS	AISGGSGTYYA	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	##YDSSG##DY	WGQ3TLVTVSS
2.20A8	VH3-23	D3-22	JH4B		---N---		--R---		DLH---YL--	
	Línea germinal			EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTF-SSYAMS	WVROAPGKGLEWVS	AISGGSGTYYA	RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	##IGSY##DY	WGQGLVTVSS
3.18G1	VH3-23	D5-5	JH4B		---N---		T---F-FS---	F---V-S---	VLV-FNNGCW---	

Tabla 9

Cadena ligera	v	J	I. FR1	CDRI	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	Linea germinal		EIVLTQSF- GTLSSLSPG ERATLSC	RASQCVSSSYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	GASSRAT	GIPDRFSGSGGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYC	QQYGS#AWT	FGQGTKVEIK
2.14H9	A27	JK1		---R---		D----		----LP--	----E----
	Linea germinal		EIVLTQSF- GTLSSLSPG ERATLSC	RASQSVSSSYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	CASSRAT	GIPDRFSGSGGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYC	QQYGS#PT	FGPGTKVDIK
2.9D10	A27	JK3		---N---	-F-----F	-T----		---- --	-----
	Linea germinal		DIQMTQSP SSVSAS- VGDRVITTC	RASQGISSWLA	WYQQKPGKAPKLLIY	AASSLQS	GVPSRFSGSGGTDFTLT ISGLQPEDFAVYYC	QQANSFPPT	FGQGTKVEIK
3.15G8	L5	JK1		-----	---S-----	---G---		--SHL---	-----
	Linea germinal		DIQMTQSP SSVSAS- VGDRVITTC	RASQGISSWLA	WYQQKPGKAPKLLIY	AASSLQS	GVPSRFSGSGGTDFTLT ISSLQPEDFAVYYC	QQANSF#T	FGGGTKVEIK
2.20A8	L5	JK4		---R---		-IR---		----PL-	-----
	Linea germinal		SYELTQPP SVS- VSPGQ- TARITC	SGDALPKKYAY	WYQQKSGQAPVLVIY	EDSKRPS	GIPERFSGSSGCTMATLT ISGAQVEDEADYYC	YSTDSSGNHR V	FGGGTKLTVL
2.7A4	V2-7	JL3		---Q-VF		-----		---R----	---R----
	Linea germinal		SYLV- LTQPPSVS- VAPGQ- TARITC	GGNIGSKSVH	WYQQKPGQAPVLVIY	DDSDRPS	GIPERFSGSSGNTATLT ISRVEAGDEADYYC	QVWDSSDRV V	FGGGTKLTVL

(continuación)

Cadena ligera	v	J	I. FR1	CDRI	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
3.18G1	V2-14	JL2	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----	-----N-----	----- -----

Tabla 10. Ejemplos de mutaciones de cadena pesada de 2.7A4 (SEQ ID NO: 2) en la línea germinal en el número de residuo Indicado

31	55	56	80	87
S	S	S	F	K
T	S	S	F	K
S	G	S	F	K
T	G	S	F	K
S	S	D	F	K
T	S	D	F	K
S	G	D	F	K
T	G	D	F	K
S	S	S	Y	K
T	S	S	Y	K
S	G	S	Y	K
T	G	S	Y	K
S	S	D	Y	K
T	S	D	Y	K
S	G	D	Y	K
T	G	D	Y	K
S	S	S	F	R
T	S	S	F	R
S	G	S	F	R
T	G	S	F	R
S	S	D	F	R
T	S	D	F	R
S	G	D	F	R
T	G	D	F	R
S	S	S	Y	R
T	S	S	Y	R
S	G	S	Y	R
T	G	S	Y	R
S	S	D	Y	R
T	S	D	Y	R
S	G	D	Y	R
T	G	D	Y	R

5 **[0329]** En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO.: 2. En ciertos casos, SEQ ID NO.: 2 comprende cualquiera de las combinaciones de residuos de la línea germinal y no de la línea germinal indicados por cada fila de la Tabla 10. En algunos casos, SEQ ID NO: 2 comprende uno cualquiera, dos cualesquiera, tres cualesquiera, cuatro cualesquiera, cinco cualesquiera o los cinco residuos de la línea germinal, tal como se indica en la Tabla 10. En ciertos casos, SEQ ID NO: 2 comprende cualquiera de las combinaciones únicas de los residuos de la línea germinal y no de la línea germinal indicados por cada fila de la tabla 10. En un ejemplo específico, la secuencia no de la línea germinal se retromuta a la línea germinal en la posición 80, donde se cambia F a Y y en la posición 87, donde se cambia K a R. Un ejemplo específico de dicha secuencia es 2.7A4VHOPT, tal como se muestra en la tabla 15.

15 **Tabla 11: Mutaciones de ejemplo de la cadena ligera de 2.7A4 (SEQ ID NO: 7) en la línea germinal en el número de residuo indicado**

17	29	32	33	104
T	K	A	Y	K
A	K	A	Y	K
T	Q	A	Y	K
A	Q	A	Y	K
T	K	V	Y	K
A	K	V	Y	K
T	Q	V	Y	K
A	Q	V	Y	K
T	K	A	F	K
A	K	A	F	K
T	Q	A	F	K
A	Q	A	F	K

T	K	V	F	K
A	K	V	F	K
T	Q	V	F	K
A	Q	V	F	K
T	K	A	Y	R
A	K	A	Y	R
T	Q	A	Y	R
A	Q	A	Y	R
T	K	V	Y	R
A	K	V	Y	R
T	Q	V	Y	R
A	Q	V	Y	R
T	K	A	F	R
A	K	A	F	R
T	Q	A	F	R
A	Q	A	F	R
T	K	V	F	R
A	K	V	F	R
T	Q	V	F	R
A	Q	V	F	R
T	K	A	Y	R
A	K	A	Y	R
T	Q	A	Y	R
A	Q	A	Y	R
T	K	V	Y	R
A	K	V	Y	R
T	Q	V	Y	R
A	Q	V	Y	R
T	K	A	F	R
A	K	A	F	R
T	Q	A	F	R
A	Q	A	F	R
T	K	V	F	R
A	K	V	F	R
T	Q	V	F	R
A	Q	V	F	R

5 [0330] En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO: 7. En ciertos casos, SEQ ID NO: 7 comprende cualquiera de las combinaciones de residuos de la línea germinal y no de la línea germinal indicados por cada fila de la Tabla 11. En algunos casos, SEQ ID NO: 7 comprende uno cualquiera, dos cualesquiera, tres cualesquiera, cuatro cualesquiera, cinco cualesquiera o los cinco residuos de la línea germinal, tal como se indica en la Tabla 11. En ciertos casos, SEQ ID NO: 7 comprende cualquiera de las combinaciones únicas de los residuos de la línea germinal y no de la línea germinal indicados por cada fila de la Tabla 11. Los ejemplos específicos del dominio ligero variable de 2.7A4 que se ha mutado a secuencias de la línea germinal particulares incluyen 2.7A4 VLOPT (optimizado donde la secuencia no de la línea germinal se ha mutado de una A a una T en la posición 17 y una R a una K en la posición 104) tal como se muestra en la tabla 15.

15 **Tabla 12. Ejemplos de mutaciones de cadena pesada de 2.9D10 (SEQ ID NO: 12) en la línea germinal en el número de residuo indicado**

56	58
G	K
S	K
G	Q
S	Q

20 [0331] En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO: 12. En ciertos casos, SEQ ID NO: 12 comprende una cualquiera de las combinaciones de residuos de la línea germinal y no de la línea germinal indicada por cada fila de la Tabla 12. En algunos casos, SEQ ID NO: 12 comprende uno cualquiera, dos cualquiera, o los dos residuos de la línea germinal, tal como se indica en la Tabla 12. En ciertos casos, SEQ ID NO: 12 comprende una cualquiera de las combinaciones únicas de los residuos de la línea germinal y no de la línea germinal indicados por cada fila de la tabla 12.

Tabla 13. Ejemplos de mutaciones de la cadena ligera de 2.9D10 (SEQ ID NO: 17) en la línea germinal en el número indicado de residuos

32	37	50	52
S	Y	Y	A
N	Y	Y	A
S	F	Y	A
N	F	Y	A
S	Y	F	A
N	Y	F	A
S	F	F	A
N	F	F	A
S	Y	Y	T
N	Y	Y	T
S	F	Y	T
N	F	Y	T
S	Y	F	T
N	Y	F	T
S	F	F	T
N	F	F	T
S	Y	Y	A
N	Y	Y	A
S	F	Y	A
N	F	Y	A
S	Y	F	A
N	Y	F	A
S	F	F	A
N	F	F	A
S	Y	Y	T
N	Y	Y	T
S	F	Y	T
N	F	Y	T
S	Y	F	T
N	Y	F	T
S	F	F	T
N	F	F	T

5 [0332] En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO: 17. En ciertos casos, SEQ ID NO: 17 comprende una cualquiera de las combinaciones de residuos de la línea germinal y no de la línea germinal indicados por cada fila de la Tabla 13. En algunos casos, SEQ ID NO: 17 comprende uno cualquiera, dos cualesquiera, tres cualesquiera, cuatro cualesquiera, o los cuatro de los residuos de la línea germinal, tal como se indica en la Tabla 7. En ciertos casos, la SEQ ID NO.: 17 comprende
 10 cualquiera de las combinaciones únicas de residuos de la línea germinal y no de la línea germinal indicados por cada fila de la Tabla 13. La SEQ ID NO: 17 puede estar alterada o alterarse adicionalmente mediante cambios no en la línea germinal a la SEQ ID NO: 17. En un ejemplo, la SEQ ID NO: 17 se puede alterar, tal como de F a Y en la posición 37 y de F a Y en la posición 50.

15 **Tabla 14. Ejemplos de mutaciones de cadena ligera 2.14H9 (SEQ ID NO: 27) a la línea germinal en el número de residuo Indicado**

28	51	104
R	G	K
S	G	K
R	D	K
S	D	K
R	G	K
S	G	K
R	D	K
S	D	K
R	G	E
S	G	E
R	D	E
S	D	E

ES 2 793 330 T3

R	G	E
S	G	E
R	D	E
S	D	E

5 **[0333]** En algunos casos de la descripción, el agente de unión específica o anticuerpo comprende una secuencia que comprende SEQ ID NO: 27. En ciertos casos, SEQ ID NO: 27 comprende una cualquiera de las combinaciones de residuos de la línea germinal y no de la línea germinal indicados por cada fila de la Tabla 14. En algunos casos, SEQ ID NO: 27 comprende uno cualquiera, dos cualesquiera, tres cualesquiera, o los tres residuos de la línea germinal, tal como se indica en la Tabla 14. En ciertos casos, SEQ ID NO.: 27 comprende una cualquiera de las combinaciones únicas de residuos de la línea germinal y no de la línea germinal indicados por cada fila de la Tabla 14. Los ejemplos específicos de dominio ligero variable de 2.7A4 que se ha mutado a una secuencia de línea germinal particular, incluyendo 2.14H9OPT (optimizado donde la secuencia no de la línea germinal se ha mutado de E a K en la posición 104) tal como se muestra en la Tabla 15.

10 **[0334]** La cadena pesada de 2.14H9 se puede cambiar en el aminoácido 31 de la SEQ ID NO: 22 de R a S.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Tabla 15

	<u>II. FR1</u>	<u>CDR1</u>	<u>III. FR2</u>	<u>CDR2</u>	<u>FR3</u>	<u>CDR3</u>	<u>FR4</u>
2.7A4 OPT Cadena pesada	EVQLVESGGGLVKPG GSLRLSCAASGFTFS	TYSMN	WVRQAPGKG LEWVS	SISS GDYI YYAD SVKG	RFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR	DLVTSM VAFDY	WGQGTL VTVSS
2.7A4 OPT Cadena ligera	SYELTQPPSVSVSPGQ TARITC	SGDALPQK YVF	WYQQKSGQA PVLVIY	EDSK RPS	GIPERFSGSSSGTMATL TISGAOVEDEADYYC	YSTDRSG NHRV	FGGGTK LTVL
2.14H 9OPT Cadena ligera	EIVLTQSPGTLSPGE RATLSC	RASQRVSS SYLA	WYQQKPGQA PRLIY	DASS RAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYC	QQYGSLP WT	FGQGTK VEIK

Ejemplos de mutación de la línea germinal específica

[0335] Las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL de anticuerpos anti-B7-H1 sin línea germinal (NG) 2.7A4, 2.14H9 y 2.9D10 fueron alineadas con las secuencias de línea germinal humana conocidas en la base de datos VBASE (Tomlinson, 1997; <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>), y la línea germinal más cercana fue identificada por la similitud de secuencia. La línea germinal más cercana a los anticuerpos anti-B7-H1 se describe en las Tablas 16 y 17. Sin considerar los residuos Vernier (Foote y Winter, J Mol Biol Mar 20: 224 (2): 487-99, 1992), que se dejaron sin cambios, las posiciones a ser cambiadas se describen en la Tabla 18.

Tabla 16: Emparejamientos de la línea germinal V y J más próximos de cadena pesada anti-B7-H1

	V	J
Cadena pesada de 2.7A4	VH3_ (3-21)	JH4b
Cadena pesada de 2.9D10	VH3_ (3-07)	JH6b
Cadena pesada de 2.14H9	VH3_ (3-07)	JH4b

Tabla 17: Emparejamientos de la línea germinal V y J más próximos de cadena ligera anti-B7-H1

	V	J
Cadena ligera de 2.7A4	VL3_ (3p)	JL2
Cadena ligera de 2.9D10	VK3_ (A27)	JK3
Cadena ligera de 2.14H9	VK3_ (A27)	JK1

[0336] Teniendo en cuenta el anticuerpo 2.7A4, hay 2 cambios en los marcos variables del dominio VH y 2 cambios en los marcos variables del dominio VL. Estos residuos, situados en Kabat número 79 y 83 (o los residuos 80 y 87 si es por numeración numérica) para el dominio VH y Kabat número 18 y 103 (o los residuos 17 y 104 si es por numeración numérica) para el dominio VL, se volvieron a la línea germinal humana. Véase la Tabla 18. Para el anticuerpo 2.14H9 no hay cambios en los marcos variables del dominio VH y hay 1 cambio en los marcos variables del dominio VL. Este residuo, que se encuentra en Kabat número 103 en el dominio VL (o 104 si el residuo se calcula utilizando la numeración numérica), se revirtió a la línea germinal humana. Véase la Tabla 18. En anticuerpo 2.9D10 no hay cambios en los marcos variables del dominio VH y 2 cambios en el dominio VL, que se encuentra con la numeración Kabat en números de Kabat 36 y 49 (o los residuos de numeración numérica 37 y 50). Sin embargo, esos 2 residuos se encuentran en posición de Vernier y no se han mutado para no alterar las estructuras en bucle de CDR.

Tabla 18: Ejemplo de residuos mutados durante formación de la línea de germinación para dominios V de anti-B7-H1. Los residuos se enumeran según la nomenclatura de Kabat

Dominio V de la línea germinal formada	Mutaciones
2.7A4VHOPT	F79Y + K83R
2.7A4VLOPT	A18T + R103K
2.14H9VLOPT	E103K

[0337] La mutación de la línea germinal de estos residuos de aminoácidos se llevó a cabo usando técnicas estándar de mutagénesis dirigida al sitio con los cebadores mutagénicos apropiados. Las secuencias de la línea germinal mutada tienen el prefijo "OPT" después del nombre de anticuerpo, por ejemplo, 2.7A4VHOPT, 2.7VLOPT y 2.14H9VLOPT. Las IgG de línea germinal mutada se reevaluaron a continuación en el ensayo de inhibición de ligando B7-H1/hPD1 humana para confirmar que no había habido una reducción de la actividad de anticuerpo in vitro.

[0338] Ejemplos de actividades para anticuerpos anti-B7-H1 de línea germinal mutada frente a línea germinal no mutada se proporcionan en la Figura 4.

Ejemplo de síntesis de genes y reformateo como IgG1 e IgG1-TM

[0339] Los clones fueron convertidos de scFv a formato IgG por sub-clonación de los dominios VH y VL en vectores que expresan cadenas pesadas y ligeras respectivamente de anticuerpo completo. Los dominios VH se clonaron en el vector pEU15.1 para expresar IgG1 o en el vector pEU15.1-TM para expresar anticuerpos IgG1-TM. Ambos vectores contienen dominios constantes de cadena pesada humana y elementos reguladores de expresar la cadena pesada de IgG completa en células de mamífero. El vector pEU15.1-TM es un vector pEU15.1 de IgG1 humana modificada. Fue diseñado para introducir las tres mutaciones; L234F y L235E en la bisagra y P331S en el dominio CH2 de la molécula IgG para eliminar su capacidad de desencadenar citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos y citotoxicidad dependiente del complemento (Oganessian V. et al. (2008), Acta Cryst., D64: 700-704). La modificación del vector se realizó usando técnicas estándar de mutagénesis dirigida al sitio con los cebadores mutagénicos apropiados.

[0340] Los dominios VL se clonaron en vectores pEU4.4 y pEU3.4 para la expresión de dominios constantes de la cadena ligera lambda y kappa humanas, respectivamente, con elementos reguladores para expresar la cadena ligera de IgG completa en células de mamífero. Los vectores para la expresión de cadenas pesadas y cadenas ligeras fueron descritas originalmente en Vaughan et al. (Nature Biotechnology 14 (3): 309-314, 1996). Estos vectores han sido diseñados simplemente mediante la introducción de un elemento OriP.

[0341] Para obtener las IgG, los vectores de expresión de cadena pesada y ligera de IgG se transfectaron en células de mamífero EBNA-HEK293 (Invitrogen R620-07). Las IgG se expresaron y se secretaron en el medio. El producto recogido se combinó y se centrifugó antes de la purificación. La IgG se purificó usando cromatografía de Proteína A utilizando un sistema de purificación de AKTA Express (GE Healthcare) previamente desinfectado para evitar cualquier contaminación por endotoxina de la muestra. Los sobrenadantes de cultivo se cargan en columnas HiTrap™ MabSelectSure™ (GE Healthcare, 11-0034-93) de 1 ml y se lavaron con Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 250 mM. La IgG unida se eluyó de la columna usando 0,1 M de citrato de sodio (pH 3,0) y se neutralizó mediante la adición de 1 M de Tris-HCl (pH 9,0). Al material eluido se cambió el tampón por PBS usando columnas NAP10 (Amersham, 17-0854-02) y se filtró antes de determinar los niveles de concentración de proteína y endotoxina. La concentración de IgG se determinó espectrofotométricamente usando un coeficiente de extinción basado en la secuencia de aminoácidos de la IgG (Vaughan et al. supra). El nivel de endotoxina se determinó usando el sistema portátil de prueba de Endosafe PTS (Charles River Laboratories) equipado con cartuchos LAL de 1-0,1 EU/mL y 10-0,1 EU/mL (Charles River Laboratories, PT520). La IgG purificada se analizó para determinar la degradación por SDS-PAGE.

[0342] Los anticuerpos anti-B7-H en el formato IgG1-TM se evaluaron y se compararon con los mismos anticuerpos, pero en el formato IgG1 en el ensayo de inhibición de ligando B7-H1/hPD1 humano para confirmar que no había habido una reducción en anticuerpos en la actividad in vitro debido al cambio de isotipo de IgG (Figura 4).

EJEMPLO 12: ENSAYO DE UNIÓN DE B7H1/Fc HUMANO A PD1/FC HUMANO – HTRF®

[0343] El ensayo descrito es un ensayo TR-FRET homogéneo usando la tecnología de ensayo HTRF® que no requiere pasos de lavado. A una placa de microtitulación Costar 3676 se añadieron 5 ul/pocillo de PD1/Fc biotinilado a 1 nM diluida en PBS. Esto fue seguido por la adición de 5 ul/pocillo de estreptavidina XL^{ent} (CisBio) a 4 nM diluida en tampón de ensayo (PBS + BSA al 0,1% + 0,8 M KF). Se agregaron 5 ul/pocillo de una titulación de material de muestra diluida en PBS a los pocillos relevantes. Para la definición de la unión total, se añadieron 5 ul de PBS o tampón de muestra pertinente por pocillo. Para definir la unión no específica, se utilizó un exceso (600 nM) de B7H1/Fc o PD1/Fc no marcados. El proceso final fue la adición de 5 ul/pocillo de B7H1/Fc marcado con criptatos (marcador criptato - CisBio, B7H1/Fc – RnD Systems) diluido 1:100 en tampón de ensayo. La placa de ensayo se dejó durante 3 horas a temperatura ambiente antes de leerse en un lector de placas compatible con HTRF®.

[0344] Ejemplo de determinaciones de IC50 en el ensayo de inhibición de ligando B7-H1 humano/PD1 humano para anticuerpos anti-B7-H1 se proporciona en la Tabla 19. Todos los anticuerpos anti-B7-H1 humanos están en el formato IgG1-TM.

Tabla 19. Ejemplo de la determinación IC50 (n = 2) en el ensayo de inhibición de ligando B7-H1 humano/PD1 humano para IgG anti-B7-H1

Anticuerpo	Media aritmética	Desviación estándar
2.9D10	1,1E-10	3,6E-11
2.7A4OPT	1,6E-10	1,4E-10
2.14H9OPT	1,1E-10	7,5E-11

EJEMPLO 13: ENSAYO DE UNIÓN DE B7H1/Fc HUMANO A B7-1/FC HUMANO – HTRF®

[0345] El ensayo descrito es un ensayo TR-FRET homogéneo usando la tecnología de ensayo HTRF® que no requiere pasos de lavado. A una placa de microtitulación Costar 3676 se añadieron 5 ul/pocillo de B7-1/Fc biotinilado a 8 nM diluida en PBS. Esto fue seguido por la adición de 5 ul/pocillo de estreptavidina XL^{ent} (CisBio) a 20 nM diluida en tampón de ensayo (PBS + BSA al 0,1% + 0,8 M KF). Se agregaron 5 ul/pocillo de una titulación de material de muestra diluida en PBS a los pocillos relevantes. Para la definición de la unión total, se añadieron 5 ul de PBS o tampón de muestra pertinente por pocillo. Para definir la unión no específica, se utilizó un exceso (200 nM) de B7H1/Fc o PD1/Fc no marcados. El proceso final fue la adición de 5 ul/pocillo de B7H1/Fc marcado con criptatos (marcador criptato - CisBio, B7H1/Fc – RnD Systems) diluido 1:100 en tampón de ensayo. La placa de ensayo se dejó durante la noche a 4°C antes de recuperar la temperatura ambiente y leerse en un lector de placas compatible con HTRF®.

[0346] Ejemplo de determinaciones de IC50 en el ensayo de inhibición de ligando B7-1 humano/PD1 humano para anticuerpos anti-B7-H1 se proporciona en la Tabla 19. Todos los anticuerpos anti-B7-H1 humanos están en el formato IgG1-TM.

Tabla 20. Ejemplo de la determinación IC50 (n = 2) en el ensayo de inhibición de ligando B7-1 humano/B7-H1 humano para IgG anti-B7-H1

Anticuerpo	Media aritmética	Desviación estándar
2.9D10	5,41E-11	1,61E-11
2.7A4OPT	5,31E-11	4,03E-13
2.14H9OPT	4,93E-11	1,50E-11

5 **EJEMPLO 14: REACTIVIDAD CRUZADA DE ANTICUERPOS ANTI-B7-H1 CON OTRAS PROTEÍNASCOMODULADORAS INMUNES**

10 **[0347]** Se realizó análisis ELISA para determinar la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-B7-H1 IgG1-TM para otras moléculas inmunes co-moduladoras. Los ELISA consistieron en recubrir placas Maxisorp (Nunc) a 4°C durante la noche con 250 ng por pocillo de dominio extracelular (ECD) de B7-H1 humana (R & D Systems, 156-B7), PD-L2 humana (R & D Systems, 1224-PL), B7-H2 humana (R & D Systems, 165- B7), B7-H3 humana (R & D Systems, 1027-B3), CD28 humano (R & D Systems, 342-CD), CTLA-4 humana (R & D Systems, 325-CT) y PD1 humana (R & D Systems, 1086-PD) seguido de bloqueo de las placas con PBS que contenía 3% de leche en polvo secada a temperatura ambiente durante 1 h. También se investigó la reactividad cruzada murina mediante el recubrimiento de la ECD de B7-H1 murina (R & D Systems, 1019-B7). Las IgG1-TM anti-B7-H1 biotiniladas diluidas a 100 nM en PBS que contenía 3% de leche seca en polvo, se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h para permitir la unión. Las IgG biotiniladas unidas se detectaron con estreptavidina marcada con europio N1 (Perkin Elmer, 1244-360) a 0,2 ug/mL. El experimento de control que demuestra recubrimiento de antígeno sobre la placa NUNC se realizó utilizando los anticuerpos comerciales IgG2a de ratón anti-B7-H1 humana (R & D Systems, MAB156), IgG2b de ratón anti-PD-L2 humana (R & D Systems, MAB1224), IgG2b de ratón anti-B7-H2 humana (R & D Systems, MAB165), IgG1 de ratón anti-B7-H3 humana (R & D Systems, MAB1027), IgG1 de ratón anti-CD28 humano (R & D Systems, MAB342), IgG2a de ratón anti-CTLA-4 humano (Abcam, ab33320), IgG2b de ratón anti-PD1 humana (R & D Systems, MAB1086) y IgG2a de rata anti-B7-H1 de ratón (R & D Systems, MAB1019). Los anticuerpos primarios se incubaron a 5 ug/ml en PBS que contenía 3% de leche en polvo secada durante 2 horas a temperatura ambiente. La detección se llevó a cabo incubando el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma, A2554) o anti-IgG de rata conjugado con peroxidasa (Sigma, A5795) diluido 1:5000 en PBS que contenía 3% de leche en polvo secada durante 1 hora a temperatura ambiente y la adición posterior de TMB (Sigma, T0440). Los ocho antígenos podrían ser detectados en la placa Maxisorp Nunc. La unión no específica se determinó usando pocillos recubiertos con el control de isotipo IgG1 en 5 ug/mL. Las reactividades cruzadas se calcularon en un porcentaje de la unión específica al antígeno con relación a B7-H1 humana.

35 **[0348]** La reactividad cruzada de los 3 anticuerpos anti-B7-H1 IgG1-TM 2.7A4OPT, 2.9D10 y 2.14H9OPT frente al panel de ocho antígenos co-moduladores inmunes se determinó por triplicado. A 100 nM de concentración de anticuerpo, los tres anticuerpos anti-B7-H1 no muestran reactividad cruzada para ninguna de las siete moléculas inmunes humanas co-moduladoras que se probaron (Figura 5). El anticuerpo IgG1-TM anti-B7-H1 2.7A4OPT muestra una reactividad cruzada medible para B7-H1 murina con un nivel de señal de 5,3% de promedio en comparación con el 100% de unión a la B7-H1 humana. Los otros dos anticuerpos anti-B7-H1 probados, 2.9D10 y 2.14H9OPT, no muestran ninguna reactividad cruzada para B7-H1 murina (Figura 5).

40 **EJEMPLO 15: AFINIDAD DE ANTICUERPOS ANTI-B7-H1 PARA B7-H1 HUMANO Y DE CYNOMOLGUS**

45 **[0349]** La afinidad de unión y parámetros cinéticos de los anticuerpos anti-B7-H1 en el formato IgG1-TM a B7-H1 monomérica humana y de cynomolgus se determinaron mediante resonancia de plasmón superficial usando un instrumento BIAcore T100 (BIAcore, Uppsala, Suecia). En resumen, los experimentos se realizaron a 25 °C usando tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,05% v/v tensoactivo P20) como tampón de ejecución. Las IgG se capturaron por afinidad en la superficie de un chip sensor CM5 (BIAcore) a través de la proteína G, que se acopló con amina a la superficie de CM5 para conseguir la densidad de ~500 unidades de respuesta (RU), según las instrucciones del fabricante (Handbook BIAapplications, BIAcore). Los dominios extracelulares (ECD) FlagHis₁₀ ("His₁₀" descritas como SEQ ID NO: 93) de B7-H1 humana o de cynomolgus monomérica recombinante se utilizaron como analitos. Las diluciones de ECD de B7-H1 (200 a 3,12 nM) en el tampón de ejecución se inyectaron a un caudal constante de 100 ul/min durante 60 segundos. Todas las mediciones se corrigieron con el punto de referencia restando del sensograma obtenido la celda de flujo de control (activada-desactivada), así como por doble referencia con inyecciones en blanco (concentración de analito en cero). Los datos se analizaron usando el paquete de software T-100 BIAevaluation y se ajustaron a un simple modelo de Langmuir 1:1 de unión con R_{max} local y el índice de refracción aparente fijado en 0. Los datos fueron calculados a partir de al menos dos experimentos independientes. Los efectos de transporte de masas se limitan al mantener el nivel de IgG capturadas por afinidad por debajo de 250 UR. Los sensogramas obtenidos con todos los anticuerpos probados se podrían ajustar fácilmente al modelo de unión monoexponencial 1:1 dando excelentes ajustes con valores Chi² consistentemente ≤ 0,3.

[0350] La afinidad de anticuerpos anti-B7-H1 2.7A4OPT y 2.14H9OPT para B7-H1 monomérica humana es 1 nM y 175 pM respectivamente (Tabla 21).

Tabla 21: Análisis de afinidad y parámetros cinéticos de anticuerpos anti-B7H1 para la unión a B7H1 humano

mAb/B7H1 HUMANO	K _d (nM)	K _{on} (M ¹ s ⁻¹)	k _{off} (M ¹ s ⁻¹)
Anticuerpo de referencia 1	6,3	1,36 x 10 ⁶	0,0086
2.7A4OPT	1	1,24 x 10 ⁶	0,0012
2.14H9OPT	0,175	2 x 10 ⁶	0,00035

[0351] La afinidad de anticuerpos anti-B7-H1 2.7A4OPT y 2.14H9OPT para B7-H1 monomérica de cynomolgus es 835 pM y 367 pM respectivamente (Tabla 22). Esos dos anticuerpos son fuertemente reactivos de forma cruzada para B7-H1 de cynomolgus, ya que las afinidades están muy cercanas a las de B7-H1 humana.

Tabla 22: Análisis de afinidad y parámetros cinéticos de anticuerpos anti-B7H1 para la unión a B7H1 de cynomolgus

mAb/B7H1 CYNO	K _d (nM)	K _{on} (M ¹ s ⁻¹)	k _{off} (M ¹ s ⁻¹)
Anticuerpo de referencia 1	4,64	1,36 x 10 ⁶	0,00863
2.7A4OPT	0,835	1,31 x 10 ⁶	0,0011
2.14H9OPT	0,367	1 x 10 ⁶	0,00037

EJEMPLO 16: MAPEO DE PEÍTOPOS DE ANTICUERPOS ANTI-B7-H1

[0352] Se realizó el mapeo de epítopos para identificar residuos de B7-H1 humana implicados en la unión de anticuerpos anti-B7-H1. La estructura del dominio extracelular de B7H1 humana en complejo con PD1 murina se ha descrito previamente en la literatura (Lin, D et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 105, p3011-3016) y revela que catorce residuos de B7-H1 están implicados en la unión a PD1 (Tabla 23).

Tabla 23: Residuos de B7-H1 humana implicados en la unión a PD1 murina.

Aminoácido	Posición
Phe	19
Thr	20
Asp	26
Ile	54
Tyr	56
Gln	66
Arg	113
Met	115
Ser	117
Ala	121
Asp	122
Tyr	123
Lys	124
Arg	125

[0353] Los anticuerpos anti-B7-H1 compiten por la unión de B7-H1 humana a PD1 humana (Ejemplos 5, 8 y 12) por lo que deben interactuar con algunos de los 14 residuos si suponemos que hay diferencias insignificantes entre la interfaz de unión de B7H1 a PD1 humana y de ratón (identidad de aminoácidos del 62% entre la secuencia de dominio extracelular de la dos especies). Se generarán mutantes de B7-H1 de un aminoácido para las 14 posiciones descritas en la Tabla 23. Los mutantes se probaron para la unión a anticuerpos anti-B7-H1 mediante ELISA de fagos y la capacidad de competir en la unión de anticuerpos anti-B7-H1 a B7-H1 humana en ensayos de competición HTRF®. Todos los anticuerpos anti-B7-H1 descritos están en el formato IgG1-TM.

Clonación de la infusión de genes del dominio extracelular de B7-H1 humano con bacteriófago gen III para la expresión en fagos

[0354] El gen que codifica el dominio extracelular de la proteína B7-H1 humano (número de acceso Uniprot Q9NZQ7, amino ácido [19-238]) se ha sintetizado externamente por DNA2.0 Inc. y amplificado por PCR usando los cebadores B7H1_FOR (5 '-AATAATGGCCCAGCCGGCCATGGCCTTTACCGTGACGGTACCG-3') y B7H1_REV (5 'AATAATGCGGCCGCCCTTTTCGTTTGGGGGATGC-3') para introducir los sitios de restricción Sfi I y Not I en 5' y 3' respectivamente. A continuación, el producto de PCR se clonó direccionalmente en el vector pCANTAB6 (McCafferty J. et al., 1994, Appl. Biochem. Biotechnol., Vol. 47, p157-173) usando los sitios de restricción Sfi I y Not I. La cepa de

E. coli TG1 se transformó con la ligación y las colonias individuales se analizaron mediante secuenciación para identificar un transformante B7-H1 llamado B7-H1_pCANTA6.

Generación e identificación de mutantes de B7-H1

[0355] Se han generado mutantes de B7-H1 mediante mutagénesis de saturación en los 14 residuos de la interfaz de PD1 usando cebadores NNS completamente aleatorios (Tabla 24) y el plásmido B7-H1_pCANTA6 como plantilla de ADN. La mutagénesis se realizó con el kit QuickChange Multi Site Directed Mutagenesis de Stratagene (nº de catálogo 200513) según las instrucciones del fabricante. Las reacciones mutagénicas se usaron para transformar la cepa de E. coli TG1 y las colonias individuales se rastrearon mediante secuenciación para identificar variantes de B7-H1. Un total de 252 variantes fueron identificadas entre las 280 posibles (20 aminoácidos por 14 posiciones) y se escogieron con cuidado en 3 placas de cultivo de 96 pocillos.

Tabla 24: Cebadores mutagénicos utilizados para generar variantes de B7-H1

Nombre del cebador	Secuencia
B7H1_SDM_F19_f	5'-GCCGGCCATGGCCNNSACCGTGACGGTACCGAAAAG-3'
B7H1_SDM_T20_f	5'-GCCGGCCATGGCCCTTTNNSGTGACGGTACCGAAAAG-3'
B7H1_SDM_D26_f	5'-CCGTGACGGTACCGAAANNSTTGTATGTGGTGGAGTATGG-3'
B7H1_SDM_I54_f	5'-GGATCTTGCTGCCCTTNSGTCTACTGGGAAATGGAGGACAAG-3'
B7H1_SDM_Y56_f	5'-GGATCTTGCTGCCCTTATCGTCNNSTGGGAAATGGAGGACAAG-3'
B7H1_SDM_Q66_f	5'-GGAGGACAAGAACATCATCNNSSTTTGCCATGGAGAGGAGG-3'
B7H1_SDM_R113_f	5'-ATGCCGGGGTCTACNNSTGTATGATCTCTTACGGCGG-3'
B7H1_SDM_M115_f	5'-ATGCCGGGGTCTACCGCTGTNNSATCTCTTACGGCGG-3'
B7H1_SDM_S117_f	5'-CTACCGCTGTATGATC NNSTACGGCGGGTCCG-3'
B7H1_SDM_A121_f	5'-GATCTCTTACGGCGGTNNSGATTACAAACGGATAACC-3'
B7H1_SDM_D122_f	5'-GATCTCTTACGGCGGTGCCNNSTACAAACGGATAACC-3'
B7H1_SDM_Y123_f	5'-CGGCGGTGCCGATNNSAAACGGATAACCGTAAAGG-3'
B7H1_SDM_K124_f	5'-CGGCGGTGCCGATTACNNSCGGATAACCG TAAAGG-3'
B7H1_SDM_R125_f	5'-GCGGTGCCGATTACAAANNSATAACCGTAAAGGTAAACG-3'

ELISA en fagos de mutantes de B7-H1 para la unión a anticuerpos anti-B7-H1

[0356] La unión de los mutantes B7-H1 a anticuerpos anti-B7-H1 2.14H9OPT, 2.7A4OPT o anticuerpo de referencia Ab # 1 se ha evaluado mediante ELISA de fagos después de asegurarse de que el dominio extracelular de B7-H1 en fusión con la proteína del gen III se puede visualizar en la superficie del fago. Los cultivos de TG1 seleccionados fueron cultivados y se sobreinfectaron con fago auxiliar M13K07 para producir partículas de fago que expresan mutantes B7-H1 en su superficie. Los sobrenadantes de fagos se bloquearon en PBS + 3% de leche desnatada y se incubaron en placas NUNC Maxisorb revestidas previamente durante la noche con 1 ug/ml de 2.14H9OPT, 2.7A4OPT o anticuerpo de Referencia # 1 en PBS y se bloquearon con PBS + 3% de leche desnatada. Los fagos unidos se detectaron usando estreptavidina acoplada con europio (Perkin Elmer) después de la incubación con un anticuerpo secundario anti-M13 biotinilado (Progen).

[0357] Entre los 14 residuos de B7-H1 humana ubicados en la interfaz de PD1, cuatro no están implicados en la unión a cualquiera de los tres anticuerpos anti-B7-H1 ensayados (Asp26, Tyr56, Glu66 y Lys124). Sus reemplazos por una alanina o una glicina no afectan significativamente la señal de unión. Basándose en los datos de ELISA de fagos, un total de 28 mutantes representativos de 2 a 3 cambios de clave para cada uno de las otras 10 posiciones se han seleccionado para confirmar su perfil de unión, pero utilizando proteínas purificadas.

Ensayos de competición bioquímicos

[0358] El dominio extracelular de B7-H1 humana de tipo salvaje y mutantes se expresaron en bacterias y se purificaron por cromatografía de afinidad, tal como se ha descrito previamente (Bannister D. et al., 2006, Biotechnology and Bioengineering, 94, 931-937).

[0359] Los ensayos de competición HTRF® miden la unión del anticuerpo anti-B7-H1 a B7-H1 marcada con His flag. La titulación de muestras de B7-H1 sin marcar, preparada como se describe anteriormente, competirá con B7-H1 marcada con His Flag para la unión al anticuerpo anti-B7-H1, lo que lleva a una reducción de señal de ensayo. Los anticuerpos 2.14H9OPT, 2.7A4OPT y anticuerpo de referencia # 1 se utilizaron para establecer ensayos de competición para la caracterización de la unión relativa de B7-H1 de tipo salvaje o mutantes purificadas. Esto confirmará qué residuos de B7-H1 se requieren para la unión de anticuerpos. Se añadieron 10 ul de la muestra de B7-H1 a una placa de ensayo de 384 pocillos de bajo volumen (Coming 3673). Esto fue seguido por la adición de 5 ul de cualquiera de 2.14H9OPT 0,29 nM, o 2.7A4OPT 1,15 nM, o anticuerpo de referencia 1 1,15nM conjugado con DyLight649 según las instrucciones del fabricante (ThermoFisher, 53051) y 5 uL de una solución mixta de criptato anti-FLAG 0,43 nM (Cisbio Internacional, 61FG2KLB) y B7-H1 humana marcada con His Flag 1,25 nM. Las placas de ensayo se incubaron durante 4 horas a temperatura ambiente antes de la lectura de fluorescencia con resolución

en el tiempo a 620 nm y 665nm de emisión de longitud de onda utilizando un lector de placas Envision (Perkin Elmer).

5 **[0360]** Tres residuos adicionales de B7-H1 (Ile54, Ser117 y Ala121) no están implicados en la unión a 2.14H9OPT y 2.7A4OPT, ya que la IC50 de mutantes de B7-H1 para aquellos residuos son similares o ligeramente modificados en comparación con B7-H1 de tipo salvaje. Los datos de competición a los 3 anticuerpos anti-B7-H1 para el tipo salvaje y todos los otros mutantes de B7-H1 se resumen en la Tabla 25.

10 **Tabla 25: IC50 en nM en los ensayos de competición de B7H1 humano por la unión a anticuerpos anti-B7H1**

Muestra de B7-H1	Ensayo de competición IC50 en nM		
	2.14H9OPT IgG1-TM	2.7A4OPT IgG1-TM	Ab de referencia 1
B7H1 de tipo salvaje	0,76	2,79	1,89
B7H1_F19A	0,56	Sin inhibición	27,6
B7H1_F19G	0,56	Sin inhibición	15,3
B7H1_F19S	0,66	Sin inhibición	21,6
B7H1_T20A	0,45	Sin inhibición	2,3
B7H1_T20V	0,64	Sin inhibición	1,9
B7H1_T20D	0,83	Sin inhibición	1,9
B7H1_R113A	Sin inhibición	Sin inhibición	172
B7H1_R113Y	Sin inhibición	4,6	3,9
B7H1_R113L	Sin inhibición	Sin inhibición	2
B7H1_M115A	3,9	6,9	86
B7H1_M115G	30,4	4,6	Sin inhibición
B7H1_M115D	Sin inhibición	5,8	Sin inhibición
B7H1_D122E	29,6	Sin inhibición	35,2
B7H1_D122N	15,5	Sin inhibición	2,5
B7H1_Y123A	232	1,77	Sin inhibición
B7H1_Y123F	0,5	2,21	Sin inhibición
B7H1_Y123T	427	2,07	Sin inhibición
B7H1_R125A	Sin inhibición	3	11,7
B7H1_R125Q	Sin inhibición	2,4	18,4
B7H1_R125S	Sin inhibición	2,7	9,7

15 **[0361]** Arg113 y Arg125 están fuertemente implicados en la unión a 2.14H9OPT. El reemplazo por una Ala u otros aminoácidos (Tyr o Leu en la posición 113 y Gln o Ser en la posición 125) conduce a una pérdida total de la unión a ese anticuerpo. El perfil de unión de aquellos mutantes de B7-H1 a 2.7A4OPT o anticuerpo Referencia # 1 es similar a B7-H1 de tipo salvaje. Esto demuestra que la pérdida de la unión no es debida a una modificación estructural general de B7-H1 como por ejemplo una proteína desplegada, sino a una implicación directa de los residuos con la unión de 2.14H9OPT. Esos datos también demuestran que el epítipo de unión de 2.14H9OPT es diferente de los epítopos de 2.7A4OPT y anticuerpo de referencia # 1. Met115, Asp122 y Tyr123 también están implicados en la unión a 2.14H9OPT pero en menor medida. La sustitución de Met115 por una Ala no afecta a la unión a 2.14H9OPT o 2.7A4OPT, pero el reemplazo por una Asn conduce a una pérdida total de la actividad de unión a 2.14H9OPT, pero no a 2.7A4OPT. De manera similar, la sustitución de Asp 122 por un Asn afecta a la unión a 2.14H9OPT pero no al anticuerpo de referencia # 1. La mutación de Tyr123 por una Ala o una Thr modifica en gran medida el perfil de unión a 2.14H9OPT pero no a 2.7A4OPT. Curiosamente, una sustitución por una Phe no cambia la unión a 2.14H9OPT lo que sugiere que el grupo hidroxilo de la tirosina 123 no está implicado en la interacción de unión.

25 **[0362]** Phe19, Thr20 y Asp122 están fuertemente implicados en la unión a 2.7A4OPT. Todos los mutantes de B7-H1 en esas posiciones no tienen unión al anticuerpo pero sí se unen a 2.14H9OPT o al anticuerpo Referencia # 1 de una manera similar a B7-H1 de tipo salvaje, exceptuado el mutante B7H1_D122E que se une a esos 2 anticuerpos con menos eficiencia. Estos tres residuos son específicos para el epítipo de unión de mAb 2.7A4OPT y no son compartidos por los epítopos de 2.14H9OPT o del anticuerpo de referencia # 1. Arg113 también está involucrado en el epítipo de 2.7A4OPT pero en menor medida. La sustitución por una Ala no afecta a la unión a ese anticuerpo, pero las mutaciones de Tyr o Leu conducen a una pérdida total de la unión. Esas mutaciones en la posición 113 no afectan a la unión al anticuerpo de referencia # 1, lo cual muestra que los mutantes de B7-H1 están todavía en una conformación correcta. Es posible que la sustitución por un aminoácido voluminoso como una Tyr pueda introducir algunos impedimentos estéricos. Estos resultados sugieren que Arg113 no participa directamente en el contacto con el anticuerpo 2.7A4OPT pero está muy cerca del epítipo de unión real.

35 **[0363]** Este ejemplo demuestra que los tres anticuerpos anti-B7-H1 2.14H9OPT, 2.7A4OPT y anticuerpo de referencia # 1 tienen epítopos de unión distintos en la interfaz de B7-H1 con PD1. Además, es posible que estos anticuerpos también puedan unirse a otros residuos de B7-H1 humana pero no se encuentran en la interfaz de PD1.

EJEMPLO 17. DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS DE ANTICUERPOS ANTI-B7-H1 EN UNA RESPUESTA DE CÉLULAS T DE MEMORIA A CONCENTRACIONES SUBÓPTIMAS DE UNA ANTÍGENO DE MEMORIA

[0364] Se ha demostrado que la interacción de B7-H1 con PD-1 inhibe las respuestas específicas de células T a antígeno. A fin de evaluar el efecto de anticuerpos anti-B7-H1 en esta inhibición se realizó un ensayo sub-óptimo de memoria de antígeno.

[0365] Los monocitos de sangre periférica (PBMC) se aislaron de capas leucocitarias de sangre humana utilizando centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare 17-1440-03) según las instrucciones del fabricante. Después del aislamiento, las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 Glutamax I (Gibco, 61870) suplementado con 1% penicilina/estreptomicina (GIBCO, 15140) y 4% de suero AB humano (Invitrogen 34005), y posteriormente se cultivaron en placas de cultivo de fondo redondo de 96 pocillos (Corning, 3799) a 37°C, 5% de CO₂, con o sin 0,1 ug/ml de toxoide del tétanos (Calbiochem 582231) a una densidad de 1x10⁵ células por pocillo. Después de tres días de cultivo, se añadieron anticuerpos anti-B7-H1 en el formato IgG1-TM o isotipo de control a las concentraciones indicadas y los cultivos regresaron a 37°C durante 2 días, momento en que se recogieron y se analizaron los sobrenadantes mediante DELFIA para determinar los niveles de interferón- γ . La mejora de la liberación de interferón- γ por anticuerpos anti-B7-H1 se muestra en la Figura 6.

[0366] Los anticuerpos anti-B7-H1 2.9D10, 2.7A4OPT y 2.14H9OPT son capaces de aumentar la liberación de interferón- γ . Estos datos confirman la capacidad de 2.9D10, 2.7A4OPT y 2.14H9OPT para mejorar las respuestas específicas de células T a antígeno.

EJEMPLO 18. DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS DE ANTICUERPOS ANTI-B7-H1 EN UNA RESPUESTA DE CÉLULAS T DE MEMORIA A CONCENTRACIONES SUBÓPTIMAS DE UNA ANTÍGENO DE MEMORIA

[0367] Se ha sugerido que B7-H1 puede tener potenciales propiedades de señalización inhibitoras. El potencial de los anticuerpos anti-B7-H1 para actuar como agonista que podría impulsar dicha señalización inhibitora fue probado mediante el examen de su capacidad para inhibir una respuesta de memoria de antígeno.

[0368] Los monocitos de sangre periférica (PBMC) se aislaron de capas leucocitarias de una muestra de sangre humana utilizando centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare 17-1440-03) según las instrucciones del fabricante. Después del aislamiento, las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 Glutamax I (Gibco, 61870) suplementado con 1% penicilina/estreptomicina (GIBCO, 15140) y 4% suero AB humano (Invitrogen 34005), y posteriormente se cultivaron, a una densidad de 1x10⁵ células por pocillo, en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos de fondo redondo (Corning, 3799) a 37°C, 5% de CO₂, junto con 5 ug/ml de toxoide del tétanos (Calbiochem 582231) y en presencia o ausencia de concentraciones variables de anticuerpos anti-B7-H1 en el formato IgG1-TM o isotipo de control. Un anticuerpo contra un coreceptor de células T se ha utilizado como control positivo. Después de 5 días de cultivo, las células se pulsaron con 0,5 uCi/pocillo de timidina tritiada durante aproximadamente 16 horas con el fin de evaluar la actividad proliferativa.

[0369] No se observaron efectos inhibidores con anticuerpos anti-B7-H1 2.9D10, 2.7A4 y 2.14H9, en contraste con el control positivo, como se muestra en la Figura 7. Esto sugiere que los anticuerpos 2.9D10, 2.7A4 y 2.14H9 son antagonistas puros, sin ninguna actividad agonista.

EJEMPLO 19. ACTIVIDAD DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL DE ANTICUERPOS ANTI-B7-H1

[0370] La actividad in vivo de anticuerpos anti-B7-H1 humanos se investigó en modelos de xenoinjerto de ratón utilizando ratones inmunocomprometidos NOD/SCID (inmunodeficiencia combinada diabética no obesa/ grave). Los ratones se injertaron por vía subcutánea (SC) con líneas celulares de cáncer humano que expresan B7-H1 humana y las células T CD4 + y CD8 + humanas que fueron aisladas a partir de células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos y se cultivaron para enriquecerse en células T efectoras alorreactivas. Las dosis de anticuerpos intraperitoneales (IP) anti-B7-H1 humanos se les dio a los ratones inoculados con la línea celular de cáncer pancreático humano HPAC o la línea celular de melanoma humano A375. Se observó el efecto de los anticuerpos sobre el crecimiento tumoral hasta un volumen de tumor de 2.000 mm³ o necrosis tumoral macroscópica.

[0371] Para generar líneas de células T CD4 + T CD8 +, se enriquecieron PBMC humanas de donantes sanos para obtener células T CD4 + o CD8 + mediante la adición de 1 ml de producto enriquecimiento de células T RosetteSep por 20 ml de sangre entera. Esto fue seguido por una incubación de 20 minutos y posterior aislamiento por centrifugación en gradiente de densidad utilizando el medio de densidad RosetteSep DM-L. Después de la centrifugación, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS. Las células T CD4 + y CD8 + enriquecidas se cultivaron por separado durante 7-10 días en medio suplementado con rhIL-2 y cada una combinada con células A375 o células HPAC tratadas con mitomiosina C. Se recogieron las células T y se cultivaron por separado de nuevo durante 7-10 días en medio suplementado con rhIL-2 y se combinaron con células A375 o células HPAC tratadas con mitomiosina C. Se recogieron las células T CD4 + y CD8 + y se combinaron en una proporción de 1: 1.

[0372] Las líneas celulares de cáncer de A375, HPAC y PBMC enriquecidas con células T CD4 + y CD8 + se mezclaron inmediatamente antes de la administración subcutánea (SC) en las relaciones efector a diana (E:T) indicadas. El número de inoculación de las células para cada línea celular de cáncer se determinó mediante estudios de dosis de formación empírica de tumores; en general, se injertaron en cada animal 2,5 X 10⁶ células en un volumen total de 0,2 ml.

[0373] Seis animales fueron asignados a cada grupo experimental. Los animales recibieron un anticuerpo de control de isotipo humano IgG2a o IgG1OPT (también denominado en el presente documento como "IgG1TM") o los anticuerpos anti-B7-H1 2.14H9 IgG2a, 2.14H9OPT, 2.7A4OPT o anticuerpo Referencia # 1 en el formato IgG1OPT. Se llevaron a cabo un total de ocho experimentos independientes y diseños de estudio para cada experimento se presentan en las Tablas 26 - 33. Los anticuerpos anti-B7-H1 descritos están en el formato IgG1OPT salvo que se especifique.

[0374] La primera dosis (200 µL) del artículo de ensayo se administró IP 1 hora después del injerto de las células cancerosas/T efectoras; los animales recibieron hasta 4 dosis adicionales del artículo de prueba en los días de estudio 3, 5, 8 y/o 10. Como control positivo para mejorar alorreactividad en algunos estudios, rhIL-2 se administró IP 1 hora después del injerto de células de cáncer/células T efectoras; los animales recibieron 4 dosis diarias adicionales de rhIL-2 durante 4 días consecutivos. Se observó la formación de tumor en cada animal una o dos veces a la semana. Los tumores se midieron mediante un calibre; los volúmenes tumorales (V) se calcularon utilizando la fórmula siguiente:

$$V(\text{mm}^3) = 0,5 (\text{longitud (mm)} \times \text{anchura (mm)} \times \text{anchura (mm)})/2$$

[0375] Para cada grupo, los resultados se presentan como la media aritmética. El efecto contra el cáncer, expresado como el porcentaje de inhibición de crecimiento tumoral (TGI), se calculó mediante el procedimiento siguiente:

$$\% \text{ TGI} = [1 - (V \text{ tumor promedio del grupo de tratamiento}) / (V \text{ tumor promedio del grupo de control})] \times 100$$

[0376] En el estudio 1, los anticuerpos anti-B7-H1 IgG2a 2.14H9 y 2.7A4OPT inhibieron significativamente el crecimiento de células cancerosas HPAC (páncreas) en el día 30 hasta en un 61% y 50% respectivamente, en comparación con el grupo de control de isotipo (figura 8 y Tabla 26).

Tabla 26: Estudio-1. Grupos de tratamiento y porcentaje de inhibición del crecimiento del tumor en ratones injertados con células de cáncer HPAC después de la administración intravenosa de anticuerpos anti-B7-H1

Grupo	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg/ratón)	% TGI en el día 30
1	Ninguno	NA	NA
2	Ninguno	NA	NA
3	rhIL-2	10 ⁵ U/dosis	NA
4	Isotipo humano IgG2a	20	NA
5	Isotipo humano IgG1OPT	20	NA
6	IgG2a 2.14H9	20	50
7	IgG2a 2.14H9	10	22
8	IgG2a 2.14H9	1	56
9	IgG2a 2.14H9	0,1	61
10	2.7 A4OPT	20	< 1
11	2.7 A4OPT	10	30
12	2.7 A4OPT	1	50
13	2.7 A4OPT	0,1	15

NA = no aplicable

[0377] En el estudio 2, los anticuerpos anti-B7-H1 2.14H9OPT y 2.7A4OPT inhibieron el crecimiento de células cancerosas HPAC (páncreas) en día 39 hasta en un 70% y 68% respectivamente, en comparación con el grupo de control de isotipo (Figura 9 y Tabla 27).

Tabla 27: Estudio-2. Grupos de tratamiento y porcentaje de inhibición del crecimiento del tumor en ratones injertados con células de cáncer HPAC después de la administración intravenosa de anticuerpos anti-B7-H1

Grupo	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg/ratón)	% TGI en el día 39
1	Ninguno	NA	NA
2	Ninguno	NA	NA
3	rhIL-2	10 ⁵ U/dosis	NA
4	Isotipo humano IgG1OPT	20	NA
5	2.14 H9OPT	20	67
6	2.14 H9OPT	10	28

7	2.14 H9OPT	1	63
8	2.14 H9OPT	0,1	70
9	2.7 A4OPT	20	54
10	2.7 A4OPT	10	61
11	2.7 A4OPT	1	50
12	2.7 A4OPT	0,1	68
NA = no aplicable			

[0378] En el estudio 3, el anticuerpo anti-B7-H1 2.14H9OPT inhibió significativamente el crecimiento de células cancerosas HPAC (páncreas) en el día 30 hasta en un 60% en comparación con el grupo de control de isotipo (Figura 10 y Tabla 28).

5 **Tabla 28: Estudio-3. Grupos de tratamiento y porcentaje de inhibición del crecimiento del tumor en ratones injertados con células de cáncer HPAC después de la administración intravenosa de anticuerpos anti-B7-H1**

Grupo	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg/ratón)	% TGI en el día 30
1	Ninguno	NA	NA
2	Ninguno	NA	NA
3	rhIL-2	10 ⁵ U/dosis	NA
4	Isotipo humano IgG1OPT	5	NA
5	Anticuerpo de referencia 1	5	37
6	2.14 H9OPT	5	60
7	2.14 H9OPT	1	57
8	2.14 H9OPT	0,1	57
9	2.14 H9OPT	0,01	26
NA = no aplicable			

10 [0379] En el Estudio 4, el anticuerpo anti-B7-H1 2.14H9OPT inhibió significativamente el crecimiento de células cancerosas HPAC (páncreas) en el día 22 hasta un 74% en comparación con el grupo de control de isotipo (Figura 11 y Tabla 29).

15 **Tabla 29: Estudio-4. Grupos de tratamiento y porcentaje de inhibición del crecimiento del tumor en ratones injertados con células de cáncer HPAC después de la administración intravenosa de anticuerpos anti-B7-H1**

Grupo	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg/ratón)	% TGI en el día 22
1	Ninguno	NA	NA
2	Ninguno	NA	NA
3	IgG1OPT humana	5	NA
4	2.14 H9OPT	5	74
5	2.14 H9OPT	1	55
6	2.14 H9OPT	0,1	26
7	2.14 H9OPT	0,01	21

20 [0380] En el Estudio 5, la administración IP de anticuerpos anti-B7-H1 IgG2a 2.14H9 o 2.7OPT en el modelo de xenoinjerto A375 (melanoma) también inhibió significativamente el crecimiento del tumor en el día 29 hasta en un 64% y 61% respectivamente, en comparación con el grupo de control de isotipo (Figura 12 y Tabla 30).

Tabla 30: Estudio-5. Grupos de tratamiento y porcentaje de inhibición del crecimiento del tumor en ratones injertados con células de cáncer A375 después de la administración intravenosa de anticuerpos anti-B7-H1

Grupo	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg/ratón)	% TGI en el día 29
1	Ninguno	NA	NA
2	rhIL-2	10 ⁵ U/dosis	NA
3	Isotipo humano IgG2a	10	NA
4	Isotipo humano IgG2a	1	NA
5	Isotipo humano IgG2a	0,1	NA
6	Isotipo humano IgG1OPT	10	NA
7	Isotipo humano IgG1OPT	1	NA
8	Isotipo humano IgG1OPT	0,1	NA
9	IgG2a 2.14H9	10	54
10	IgG2a 2.14H9	1	37
11	IgG2a 2.14H9	0,1	64
12	2.7A4OPT	10	21
13	2.7A4OPT	1	61

14	2.7A4OPT	0,1	55
NA = no aplicable			

[0381] En el estudio 6, el anticuerpo anti-B7-H1 2.14H9OPT inhibió significativamente el crecimiento de células cancerosas A375 (melanoma) cuando se combinó con células T en el día 25 hasta en un 77% en comparación con el grupo de control de isotipo (Figura 13 y Tabla 31).

5 **Tabla 31: Estudio-6. Grupos de tratamiento y porcentaje de inhibición del crecimiento del tumor en ratones injertados con células de cáncer A375 después de la administración intravenosa de anticuerpos anti-B7-H1**

Grupo	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg/ratón)	% TGI en el día 25
1	Ninguno	NA	NA
2	Ninguno	NA	NA
3	IgG1OPT humana	5	NA
4	IgG1OPT humana; sin células T	5	NA
5	2.14 H9OPT	5	67
6	2.14 H9OPT	1	77
7	2.14 H9OPT	0,1	72
8	2.14 H9OPT; sin células T	1	13
9	2.14 H9OPT; sin células T	0,1	25
NA = no aplicable			

10 [0382] En el Estudio 7, el anticuerpo anti-B7-H1 2.14H9OPT inhibió significativamente el crecimiento de células cancerosas A375 (melanoma) cuando se combinó con células T en el día 25 hasta en un 82% en comparación con el grupo de control de isotipo (Figura 14 y Tabla 32).

15 **Tabla 32: Estudio-7. Grupos de tratamiento y porcentaje de inhibición del crecimiento del tumor en ratones injertados con células de cáncer A375 después de la administración intravenosa de anticuerpos anti-B7-H1**

Grupo	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg/ratón)	% TGI en el día 25
1	Ninguno	NA	NA
2	Ninguno	NA	NA
3	IgG1OPT humana	5	NA
4	IgG1OPT humana; sin células T	5	NA
5	2.14 H9OPT	5	55
6	2.14 H9OPT	1	82
7	2.14 H9OPT	0,1	72
8	2.14 H9OPT; sin células T	1	36
9	2.14 H9OPT; sin células T	0,1	27
NA = no aplicable			

20 [0383] En el Estudio 8, el anticuerpo anti-B7-H1 2.14H9OPT inhibió significativamente el crecimiento de células cancerosas A375 (melanoma) cuando se combina con las células T en el día 25 hasta en un 93% en comparación con el grupo de control de isotipo (Figura 15 y Tabla 33).

Tabla 33: Estudio-8. Grupos de tratamiento y porcentaje de inhibición del crecimiento del tumor en ratones injertados con células de cáncer A375 después de la administración intravenosa de anticuerpos anti-B7-H1

Grupo	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg/ratón)	Programación de la dosis (día de estudio)	% TGI en el día 25
1	Ninguno	NA	NA	NA
2	Ninguno	NA	NA	NA
3	IgG1OPT humana	1	1, 3, 5, 8, 10	NA
4	2.14 H9OPT	1	1	93
5	2.14 H9OPT	1	1, 5	91
6	2.14 H9OPT	1	1, 10	93
7	2.14 H9OPT; sin células T	1	1, 5, 10	66
8	2.14 H9OPT; sin células T	1	1, 3, 5, 8, 10	64
NA = no aplicable				

5 **[0384]** Estos resultados demostraron que los anticuerpos anti-B7-H1 humanos 2.14H9 IgG2a, 2.14H9OPT y 2.7A4OPT tienen una potente actividad contra el cáncer in vivo en modelos de ratón por xenoinjerto de cánceres humanos y proporcionan evidencia de que estos anticuerpos anti-B7-H1 humanos pueden tener actividad como una terapia de agente único para el tratamiento de pacientes con cánceres que expresan B7-H1.

10 **[0385]** La memoria anterior se considera que es suficiente para permitir a un experto en la técnica poner en práctica la invención. La descripción anterior y los Ejemplos detallan ciertos casos preferidos de la descripción y describen el mejor modo contemplado por los inventores. Se entenderá, sin embargo, que no importa lo detallado que lo anterior pueda aparecer en el texto, la descripción puede ponerse en práctica de muchas maneras y la descripción debe ser interpretada según las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 **[0386]**
 <110> Alimzhanov, Marat
 Babcock, John
 Boyle, Melanie
 20 Chodorge, Matthieu
 Foltz, Ian
 Hammond, Scott
 Queva, Christophe
 Kang, Jaspal Singh
 25 Morrow, Michelle
 Sekirov, Laura
 <120> Agentes de unión específica contra B7-H1
 <130> MED0543.PCT
 30 <150> US 61/264,061
 <151> 2009-11-24
 <160> 80
 35 <170> Cambridge Antibody Technology patent software version 1.0
 <210> 1
 <211> 360
 40 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> 2.7A4
 45 <400> 1
 gaggtgcagc tggctcgagtc tggcggcgga ctggtgaagc ctggcggctc cctgagactg 60
 tcttgcgccg ccagtggtt tacattcagt acctactcca tgaactgggt ccgccaggca 120
 50 ccaggcaagg gcctggaatg ggtgtcctcc atctcatcca gtggcgacta catctactac 180
 gccgactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctcctgttc 240
 55 ctgcagatga actccctgaa ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggacctg 300
 gtgacatcca tgggtggcctt cgactactgg ggtcagggca ctctcgtcac agtgtcctct 360
 60 <210> 2
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 65 <220>
 <223> 2.7A4
 <400> 2

ES 2 793 330 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 10 Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Asp Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
 15 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 Ala Arg Asp Leu Val Thr Ser Met Val Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 20 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 25 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <220>
 <223> 2.7A4
 <400> 3
 35 Thr Tyr Ser Met Asn
 40 <210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <220>
 <223> 2.7A4
 <400> 4
 50 Ser Ile Ser Ser Ser Gly Asp Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 Gly
 55 <210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60 <220>
 <223> 2.7A4
 <400> 5
 65 Asp Leu Val Thr Ser Met Val Ala Phe Asp Tyr
 <210> 6

ES 2 793 330 T3

```

<211>      324
<212>      ADN
<213>      Homo sapiens

5  <220>
   <223>      2.7A4

   <400>      6
tcttacgagc tgaccagcc tccttccgtg tccgtgtctc caggacaggc agccagaatc      60
10 acctgttccg gcgacgcct gcctcagaaa tacgtgttct ggtatcagca gaagtccggc      120
   caggcccctg tgctggtgat ctacgaggac tccaagcggc cttccggcat ccctgagcgg      180
15 ttctccggct cctcttccgg caccatggcc accctgacca tctctggcgc ccaggtggag      240
   gacgaggccg actactactg ctactccacc gacagatccg gcaaccacag agtgtttggg      300
20 gggggtacta gactgaccgt gctg                                          324

   <210>      7
   <211>      108
   <212>      PRT
25 <213>      Homo sapiens

   <220>
   <223>      2.7A4

30 <400>      7
   Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
   5 10 15
35 Ala Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Gln Lys Tyr Val
   20 25 30
   Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
   35 40 45
40 Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
   50 55 60
45 Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
   65 70 75 80
   Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Arg Ser Gly Asn His
   85 90 95
50 Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
   100 105

   <210>      8
   <211>      11
55 <212>      PRT
   <213>      Homo sapiens

   <220>
   <223>      2.7A4

60 <400>      8
   Ser Gly Asp Ala Leu Pro Gln Lys Tyr Val Phe
   5 10
65 <210>      9
   <211>      7
   <212>      PRT

```

ES 2 793 330 T3

<213> Homo sapiens
 <220>
 <223> 2.7A4
 5 <400> 9
 Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 5
 10 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <220>
 <223> 2.7A4
 <400> 10
 20 Tyr Ser Thr Asp Arg Ser Gly Asn His Arg Val
 5 10
 <210> 11
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> 2.9D10
 <400> 11
 gaggtgcagc tggctcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg 60
 35 tcttgcgctg cttccggatt caccttctcc tcctactgga tgccttgggt gcgccaggct 120
 cctggcaagg gactggaatg ggtggccaac atcaagcagg acggcggcga gcagtactac 180
 40 gtggactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcg cagagactgg 300
 aactacggct actacgacat ggacgtgtgg ggccagggca ccaccgtgac agtgtcctct 360
 <210> 12
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <220>
 <223> 2.9D10
 <400> 12
 55 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 60 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 65 Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Gly Glu Gln Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

ES 2 793 330 T3

gaccggttct cggctctgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatctc caggctggaa 240
 cctgaggact tcgctgtgta ctattgccag cagtacggct cctccatctt caccttcgga 300
 5 ccaggaacaa aggtcgacat caaa 324

10 <210> 17
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <220>
 <223> 2.9D10

<400> 17
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 5 10 15

20 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

25 Ile Phe Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

30 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Ile
 85 90 95

35 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

40 <210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <220>
 <223> 2.9D10

<400> 18
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Tyr Leu Ala
 5 10

50

55 <210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> 2.9D10

60 <400> 19
 Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr
 5

65 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 793 330 T3

<220>
 <223> 2.9D10

5 <400> 20
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Ile Phe Thr
 5

10 <210> 21
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <220>
 <223> 2.14H9

<400> 21
 gaggtgcagc tggctcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg 60
 20 tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc cggactgga tgtcttgggt gcgccaggct 120
 cctggcaagg gactggaatg ggtggccaac atcaaacagg atggctctga gaagtactac 180
 25 gtggactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctcctgtac 240
 ctgcagatga actccctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc ccgggagggc 300
 30 ggatggttcg gcgagctggc cttcgattac tggggccagg gcaccctggt gacagtgtcc 360
 tct 363

35 <210> 22
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <220>
 <223> 2.14H9

<400> 22
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 5 10 15
 45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 50 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55
 55 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 60 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 60 Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 65 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 23

ES 2 793 330 T3

```

<211>      5
<212>      PRT
<213>      Homo sapiens

5  <220>
   <223>      2.14H9

   <400>      23
Arg Tyr Trp Met Ser
10              5

   <210>      24
   <211>      17
   <212>      PRT
   <213>      Homo sapiens

   <220>
   <223>      2.14H9

20  <400>      24
Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
              5              10              15

25  Gly

   <210>      25
   <211>      12
   <212>      PRT
   <213>      Homo sapiens

   <220>
   <223>      2.14H9

35  <400>      25
Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr
              5              10

40

   <210>      26
   <211>      324
   <212>      ADN
   <213>      Homo sapiens

   <220>
   <223>      2.14H9

50  <400>      26
gagatcgtgc tgaccagtc ccctggcacc ctgtctctgt ctcccggcga gagagccacc      60
ctgtcttgcc gggcctccca gcggtgtcc tcctcctacc tggcctggta tcagcagaaa      120
55  cccggacagg ccctaggct gctgatctac gacgcctcct ccagagccac cggcatcct      180
gaccggttct ccggctctgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatctc ccggctggaa      240
60  cctgaggact ttgccgtgta ttactgccag cagtacggct ccctgccttg gaccttcggc      300
caggggaaccg aggtggagat caaa      324

65  <210>      27
   <211>      108
   <212>      PRT
   <213>      Homo sapiens

```


ES 2 793 330 T3

<213> Homo sapiens
 <220>
 <223> 2.20A8
 5 <400> 31
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc aactatgcca tgagttgggt cgcaggct 120
 10 ccaggaagg ggctggagtg ggtctcggct attcgtggtg gtggtgtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 15 ctgcaaata acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatctt 300
 cactatgata gtagtgggta tcttgactac tggggccagg gaaccctggc caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 32
 <211> 121
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> 2.20A8
 30 <400> 32
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 5 10 15
 35 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 40 Ser Ala Ile Arg Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 45 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 50 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Leu His Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 55 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 33
 <211> 5
 <212> PRT
 60 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> 2.20A8
 <400> 33
 65 Asn Tyr Ala Met Ser
 5

ES 2 793 330 T3

```

5  <210>      34
    <211>      17
    <212>      PRT
    <213>      Homo sapiens

    <220>
    <223>      2.20A8

10  <400>      34
    Ala Ile Arg Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
           5           10           15

    Gly

15

    <210>      35
    <211>      12
    <212>      PRT
20  <213>      Homo sapiens

    <220>
    <223>      2.20A8

25  <400>      35
    Asp Leu His Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Leu Asp Tyr
           5           10

30  <210>      36
    <211>      321
    <212>      ADN
    <213>      Homo sapiens

35  <220>
    <223>      2.20A8

    <400>      36
40  gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
    atcacttgtc gggcgagtc gggatattcg agctggtag cctggtatca gcagaaaccg      120
    gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct atatccaggt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
45  aggttttagcg gcagtgggtc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct      240
    gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcctctcac tttcggcgga      300
    gggaccaagg tggagatcaa a      321

50

    <210>      37
    <211>      107
    <212>      PRT
55  <213>      Homo sapiens

    <220>
    <223>      2.20A8

60  <400>      37
    Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
           5           10           15

65  Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Ser Trp
           20           25           30

    Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45

```

ES 2 793 330 T3

Tyr Ala Ile Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 5 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu
 85 90 95
 10 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 15 <210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <220>
 <223> 2.20A8
 <400> 38
 25 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Ser Trp Leu Ala
 5 10
 30 <210> 39
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> 2.20A8
 35 <400> 39
 Ala Ile Ser Arg Leu Gln Ser
 5
 40 <210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <220>
 <223> 2.20A8
 <400> 40
 50 Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
 5
 55 <210> 41
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> 3.15G8
 <400> 41
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60
 65 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agctattgga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaggtga gaaatactat 180

ES 2 793 330 T3

gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgttt 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtct attactgtgc gagagttcag 300
 5 ctctacagtg actactttga ctactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctct 357

10 <210> 42
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <220>
 <223> 3.15G8

<400> 42
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 5 10 15
 20 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 25 Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 30 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 35 Ala Arg Val Gln Leu Tyr Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

40 <210> 43
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <220>
 <223> 3.15G8

50 <400> 43
 Ser Tyr Trp Met Ser
 5

55 <210> 44
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

60 <220>
 <223> 3.15G8

<400> 44
 Asn Ile Lys Gln Asp Gly Gly Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 5 10 15
 65 Gly

ES 2 793 330 T3

5 <210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 10 <220>
 <223> 3.15G8
 <400> 45
 Val Gln Leu Tyr Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr
 5 10

 15 <210> 46
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 20 <220>
 <223> 3.15G8
 <400> 46
 25 gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtc ggggtattag agctggtag cctggatca gcagaaatca 120
 30 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccggtt tgcaaagtgg ggtccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatttag caacttacta ttgtcaacag agtcacagtc tccctccgac gttcggccaa 300
 35 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

 40 <210> 47
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 45 <220>
 <223> 3.15G8
 <400> 47
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 5 10 15
 50 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 55 Tyr Ala Ala Ser Gly Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 60 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Ser Leu Pro Pro
 85 90 95
 65 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

ES 2 793 330 T3

```

5   <210>      48
    <211>      11
    <212>      PRT
    <213>      Homo sapiens

    <220>
    <223>      3.15G8

10  <400>      48
    Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
                5                10

15  <210>      49
    <211>      7
    <212>      PRT
    <213>      Homo sapiens

    <220>
    <223>      3.15G8

20  <400>      49
    Ala Ala Ser Gly Leu Gln Ser
                5

25  <210>      50
    <211>      9
    <212>      PRT
    <213>      Homo sapiens

    <220>
    <223>      3.15G8

35  <400>      50
    Gln Gln Ser His Ser Leu Pro Pro Thr
                5

40  <210>      51
    <211>      363
    <212>      ADN
    <213>      Homo sapiens

45  <220>
    <223>      3.18G1

    <400>      51
50  gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagac ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc      60
    tcctgtgcag cctctggatt cacctttaac agctatgcca tgagctgggt cgcaggct      120
    ccaggaaagg ggctggagtg ggtctcaact attagtggtg gtggtggttt cacattctcc      180
55  gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt      240
    ctgcagatga acagcctgag agtcgaggac tcggccgtat attcctgtgc gaaagtcctt      300
60  gttggattta acaatggctg ctgggactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc      360
    tca                                             363

65  <210>      52
    <211>      121
    <212>      PRT
    <213>      Homo sapiens

```

ES 2 793 330 T3

<220>
 <223> 3.18G1

 <400> 52
 5 Glu Val Gln Leu₅ Leu Glu Ser Gly Gly Asp₁₀ Leu Val Gln Pro Gly₁₅ Gly

 Ser Leu Arg Leu₂₀ Ser Cys Ala Ala Ser₂₅ Gly Phe Thr Phe Asn₃₀ Ser Tyr
 10 Ala Met Ser₃₅ Trp Val Arg Gln Ala₄₀ Pro Gly Lys Gly₄₅ Leu Glu Trp Val

 Ser Thr₅₀ Ile Ser Gly Ser Gly₅₅ Gly Phe Thr Phe Ser₆₀ Ala Asp Ser Val
 15 Lys Gly Arg Phe Thr₇₀ Ile Ser Arg Asp Asn₇₅ Ser Lys Asn Thr Leu Phe₈₀
 20 Leu Gln Met Asn₈₅ Ser Leu Arg Val Glu Asp₉₀ Ser Ala Val Tyr Ser₉₅ Cys

 Ala Lys Val Leu₁₀₀ Val Gly Phe Asn Asn₁₀₅ Gly Cys Trp Asp Tyr₁₁₀ Trp Gly
 25 Gln Gly Thr₁₁₅ Leu Val Thr Val Ser Ser₁₂₀

 30 <210> 53
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 35 <220>
 <223> 3.18G1

 <400> 53
 40 Ser Tyr Ala Met Ser₅

 45 <210> 54
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 50 <220>
 <223> 3.18G1

 <400> 54
 Thr Ile Ser Gly₅ Ser Gly Gly Phe Thr Phe₁₀ Ser Ala Asp Ser Val₁₅ Lys
 55 Gly

 60 <210> 55
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 65 <220>
 <223> 3.18G1

 <400> 55
 Val Leu Val Gly Phe Asn Asn Gly Cys Trp Asp Tyr

ES 2 793 330 T3

```

                5                10

5  <210>          56
   <211>          324
   <212>          ADN
   <213>          Homo sapiens

10 <220>
   <223>          3.18G1

   <400>          56
   tcctatgtgc tgactcagcc accctcgggtg tcagtggccc caggacagac ggccaggatt      60
15 acctgtgggg gaaacaacat tggaagtaaa agtgtgcact ggtaccagca gaagccaggc      120
   caggcccctg tgctggtcgt ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgagcga      180
20 ttctctggct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcagcagggt cgaagccggg      240
   gatgaggccg actattactg tcaggtgtgg gatagtagta atgatcatgt ggtattcggc      300
   ggagggacca agctgaccgt ccta                                             324

25 <210>          57
   <211>          108
   <212>          PRT
   <213>          Homo sapiens

30 <220>
   <223>          3.18G1

   <400>          57
35 Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
   5 10 15
   Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val
   20 25 30
40 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
   35 40 45
45 Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
   50 55 60
   Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
   65 70 75 80
50 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Asn Asp His
   85 90 95
   Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
   100 105

55 <210>          58
   <211>          11
   <212>          PRT
60 <213>          Homo sapiens

   <220>
   <223>          3.18G1

65 <400>          58
   Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
   5 10

```

ES 2 793 330 T3

```

5    <210>      59
      <211>      7
      <212>      PRT
      <213>      Homo sapiens

      <220>
      <223>      3.18G1

10   <400>      59
      Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
           5

15   <210>      60
      <211>      11
      <212>      PRT
      <213>      Homo sapiens

20   <220>
      <223>      3.18G1

      <400>      60
25   Gln Val Trp Asp Ser Ser Asn Asp His Val Val
           5                               10

30   <210>      61
      <211>      360
      <212>      ADN
      <213>      Homo sapiens

      <220>
      <223>      2.7A4_opti

35   <400>      61
      gaggtgcagc tggctcagtc tggcggcgga ctggtgaagc ctggcggctc cctgagactg      60
      tcttgcgccg ccagtggcctt tacattcagt acctactcca tgaactgggt cgcgccaggca      120
40   ccaggcaagg gcctggaatg ggtgtcctcc atctcatcca gtggcgacta catctactac      180
      gccgactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctcctgtat      240
45   ctgcagatga actccctgag agccgaggac accgccgtgt actactgcg cagggacctg      300
      gtgacatcca tgggtggcctt cgactactgg ggtcagggca ctctcgtcac agtgtcctct      360

50   <210>      62
      <211>      120
      <212>      PRT
      <213>      Homo sapiens

55   <220>
      <223>      2.7A4_opti

      <400>      62
60   Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
           5                               10
      Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
           20                               25                               30

65   Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
           35                               40                               45
      Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Asp Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

```

ES 2 793 330 T3

```

          50              55              60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
5  65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85      90      95
10 Ala Arg Asp Leu Val Thr Ser Met Val Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
    100      105      110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    115      120
15 <210>          63
    <211>          5
    <212>          PRT
    <213>          Homo sapiens
20 <220>
    <223>          2.7A4_opti
25 <400>          63
    Thr Tyr Ser Met Asn
          5
30 <210>          64
    <211>          17
    <212>          PRT
    <213>          Homo sapiens
35 <220>
    <223>          2.7A4_opti
    <400>          64
    Ser Ile Ser Ser Ser Gly Asp Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
          5      10      15
40 Gly
45 <210>          65
    <211>          11
    <212>          PRT
    <213>          Homo sapiens
50 <220>
    <223>          2.7A4_opti
    <400>          65
55 Asp Leu Val Thr Ser Met Val Ala Phe Asp Tyr
          5      10
60 <210>          66
    <211>          324
    <212>          ADN
    <213>          Homo sapiens
    <220>
    <223>          2.7A4_opti
65 <400>          66
    tcttacgagc tgaccagacc tccttcgctg tccgtgtctc caggacagac ggccagaatc
                                                                 60

```

ES 2 793 330 T3

acctgttccg gcgacgccct gcctcagaaa tacgtgttct ggtatcagca gaagtccggc 120
 caggcccctg tgctggtgat ctacgaggac tccaagcggc cttccggcat ccctgagcgg 180
 5 ttctccggct cctcttccgg caccatggcc accctgacca tctctggcgc ccaggtggag 240
 gacgaggccg actactactg ctactccacc gacagatccg gcaaccacag agtgtttggt 300
 gggggtacta agctgaccgt gctg 324

<210> 67
 <211> 108
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> 2.7A4_opti

20 <400> 67
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 5 10 15
 25 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Gln Lys Tyr Val
 20 25 30
 Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 30 Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
 65 70 75 80
 35 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Arg Ser Gly Asn His
 85 90 95
 40 Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 68
 <211> 11
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> 2.7A4_opti

50 <400> 68
 Ser Gly Asp Ala Leu Pro Gln Lys Tyr Val Phe
 5 10

55 <210> 69
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

60 <220>
 <223> 2.7A4_opti

65 <400> 69
 Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 5

ES 2 793 330 T3

```

<210>      70
<211>      11
<212>      PRT
<213>      Homo sapiens
5
<220>
<223>      2.7A4_opti
<400>      70
10 Tyr Ser Thr Asp Arg Ser Gly Asn His Arg Val
           5                               10

<210>      71
<211>      363
<212>      ADN
<213>      Homo sapiens
15
<220>
<223>      2.14H9_opti
20
<400>      71
gaggtgcagc tggctcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg      60
25 tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc cggtactgga tgtcttgggt gcgccaggct      120
cctggcaagg gactggaatg ggtggccaac atcaaacagg atggctctga gaagtactac      180
30 gtggactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctccctgtac      240
ctgcagatga actccctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc ccgggagggc      300
ggatggttcg gcgagctggc cttcgattac tggggccagg gcaccctggt gacagtgtcc      360
35 tct                                                                                   363

<210>      72
<211>      121
<212>      PRT
<213>      Homo sapiens
40
<220>
<223>      2.14H9_opti
45
<400>      72
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
           5                               10
50 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
           20                               25                               30
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
           35                               40                               45
55 Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
           50                               55                               60
60 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
           65                               70                               75                               80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85                               90                               95
65 Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
           100                              105
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

```

ES 2 793 330 T3

	115	120	
5	<210> 73 <211> 5 <212> PRT <213> Homo sapiens		
10	<220> <223> 2.14H9_opti		
	<400> 73 Arg Tyr Trp Met Ser 5		
15			
20	<210> 74 <211> 17 <212> PRT <213> Homo sapiens		
	<220> <223> 2.14H9_opti		
25	<400> 74 Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys 5 10 15		
30	Gly		
35	<210> 75 <211> 12 <212> PRT <213> Homo sapiens		
40	<220> <223> 2.14H9_opti		
	<400> 75 Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr 5 10		
45			
50	<210> 76 <211> 324 <212> ADN <213> Homo sapiens		
55	<220> <223> 2.14H9_opti		
	<400> 76		
55	gagatcgtgc tgaccagtc ccctggcacc ctgtctctgt ctcccggcga gagagccacc	60	
	ctgtcttgcc gggcctcca gcgggtgtcc tcctcctacc tggcctgta tcagcagaaa	120	
60	cccggacagg ccctaggct gctgatctac gacgcctcct ccagagccac cggcatcct	180	
	gaccggttct ccggctctgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatctc ccggctgaa	240	
	cctgaggact ttgccgtgta ttactgccag cagtacggct ccctgccttg gaccttcggc	300	
65	caggaacca aggtggagat caaa	324	
	<210> 77		

ES 2 793 330 T3

<211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <220>
 <223> 2.14H9_opti
 <400> 77
 10 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 15 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 20 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 25 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 30
 <210> 78
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <220>
 <223> 2.14H9_opti
 <400> 78
 40 Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 5 10
 45 <210> 79
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <220>
 <223> 2.14H9_opti
 <400> 79
 Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 5
 55
 <210> 80
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60 <220>
 <223> 2.14H9_opti
 65 <400> 80
 Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro Trp Thr
 5

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado o fragmento de unión del mismo que se une específicamente a B7-H1 humano, en el que el anticuerpo o fragmento de unión del mismo comprende:
- 5 a. un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72; y
b. un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77.
2. Fragmento de unión, según la reivindicación 1, en el que dicho fragmento de unión se selecciona del grupo que consiste en un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv.
- 10 3. Anticuerpo, o fragmento de unión del mismo, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo comprende además una variante de Fc, en el que la región Fc comprende al menos un aminoácido no natural seleccionado del grupo que consiste en 234F, 235F y 331S, tal como se numera por el índice EU tal como se establece en Kabat.
- 15 4. Anticuerpo, según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal totalmente humano.
5. Molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo, o fragmento de unión del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 20 6. Célula huésped transfectada con un vector que comprende la molécula de ácido nucleico, según la reivindicación 5.
7. Anticuerpo producido mediante un procedimiento que comprende cultivar dicha célula huésped, según la reivindicación 6, que expresa un anticuerpo codificado por dicha molécula de ácido nucleico, según la reivindicación 6, y aislar dicho anticuerpo de dicho cultivo.
- 25 8. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, o fragmento de unión del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 7, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 30 9. Composición farmacéutica, según la reivindicación 8, para usar en terapia.
10. Anticuerpo, o fragmento de unión del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 7, o composición farmacéutica, según la reivindicación 8, para usar en el tratamiento de un tumor maligno en un animal; y opcionalmente en el que dicho animal es humano.
- 35 11. Anticuerpo, o fragmento de unión del mismo, para usar, según la reivindicación 10, o composición farmacéutica para usar, según la reivindicación 10, en el que dicho tumor maligno se selecciona del grupo que consiste en: melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, carcinoma de células renales, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer del esófago, cáncer de huesos, cáncer de próstata, carcinoma de células basales, cáncer del tracto biliar, cáncer del cerebro y del SNC, coriocarcinoma, cáncer de tejido conectivo, cáncer del sistema digestivo, cáncer endometrial, cáncer de ojo, cáncer intraepitelial, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfoma, mieloma, neuroblastoma, cáncer de la cavidad oral, cáncer de ovario, rhabdomyosarcoma, sarcoma, cáncer de piel, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer uterino, cáncer del tracto urinario y cáncer de páncreas.
- 40 12. Anticuerpo, o fragmento de unión del mismo, para usar, según la reivindicación 11, o composición farmacéutica para usar, según la reivindicación 11, en el que dicho tumor maligno es cáncer de vejiga.
- 50 13. Anticuerpo, o fragmento de unión del mismo, para usar, según la reivindicación 11, o composición farmacéutica para usar, según la reivindicación 11, en el que dicho tumor maligno es cáncer de pulmón.
14. Anticuerpo, o fragmento de unión del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 7, o composición farmacéutica, según la reivindicación 8, para usar en el tratamiento de una infección viral crónica en un animal; opcionalmente en el que dicho animal es humano.
- 55 15. Anticuerpo, o fragmento de unión del mismo, para usar, según la reivindicación 14, o composición farmacéutica para usar, según la reivindicación 14, en la que dicha infección viral crónica se selecciona del grupo que consiste en: VIH, VHB y VHC.
- 60 16. Anticuerpo, o fragmento de unión del mismo, para usar, según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en el que el uso comprende la administración del anticuerpo, o fragmento de unión del mismo, solos o en combinación con anticuerpos adicionales, fármacos quimioterapéuticos, terapia de radiación o vacunas terapéuticas.
- 65

Figura 1

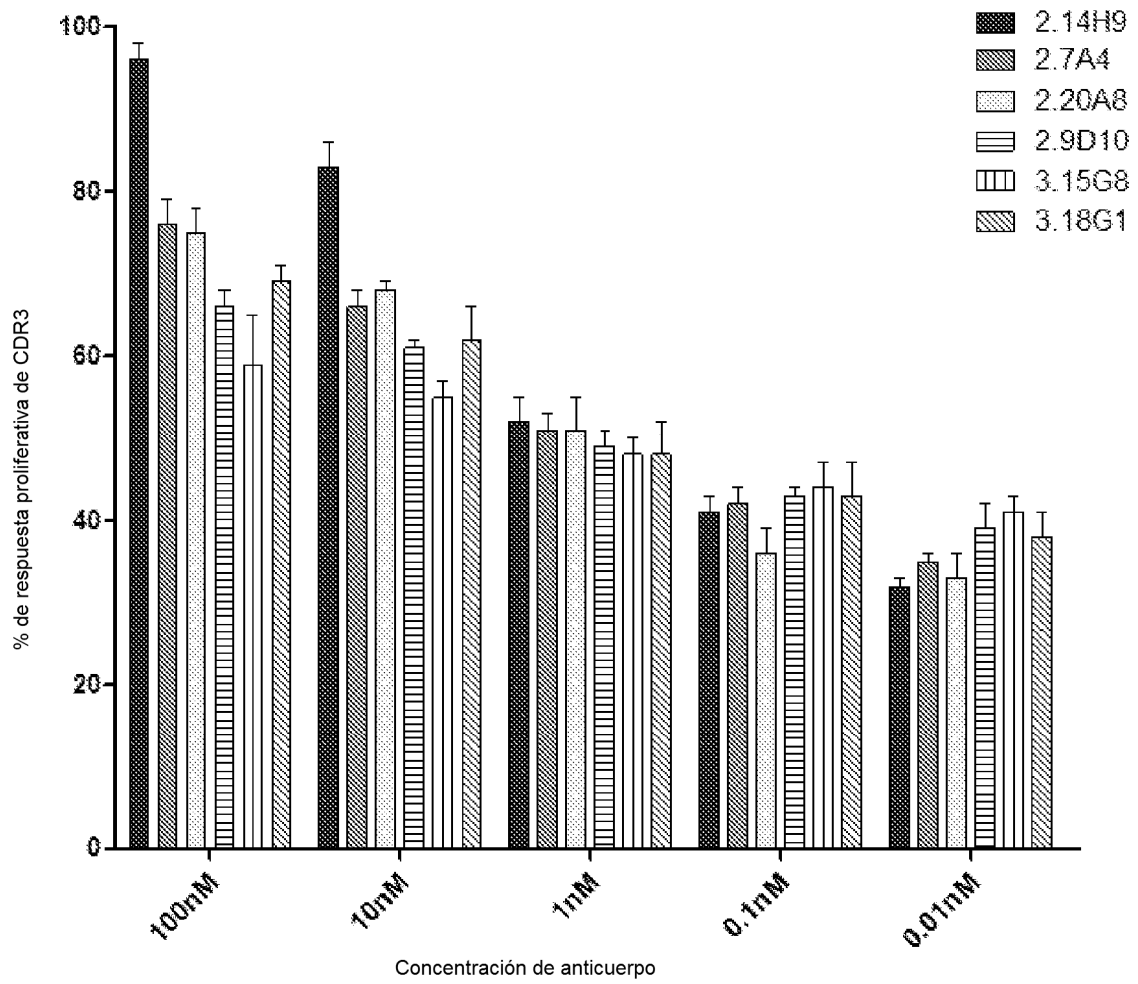


Figura 2

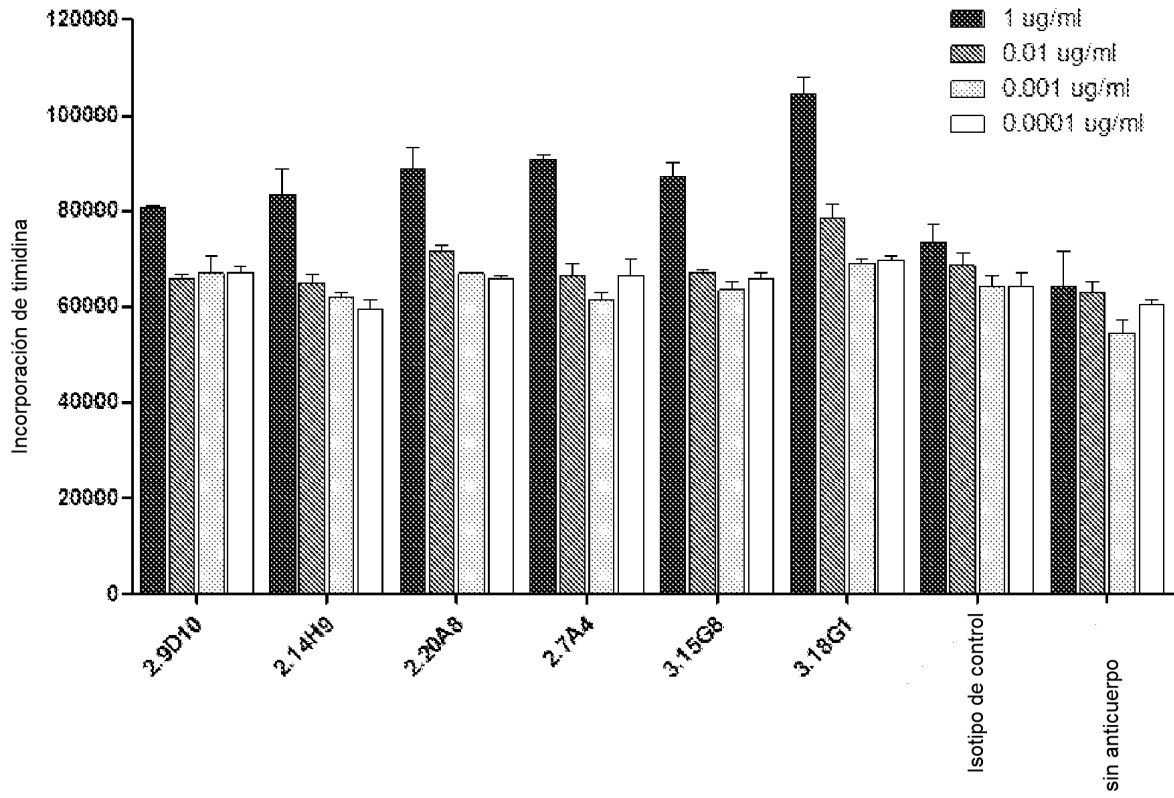


Figura 3

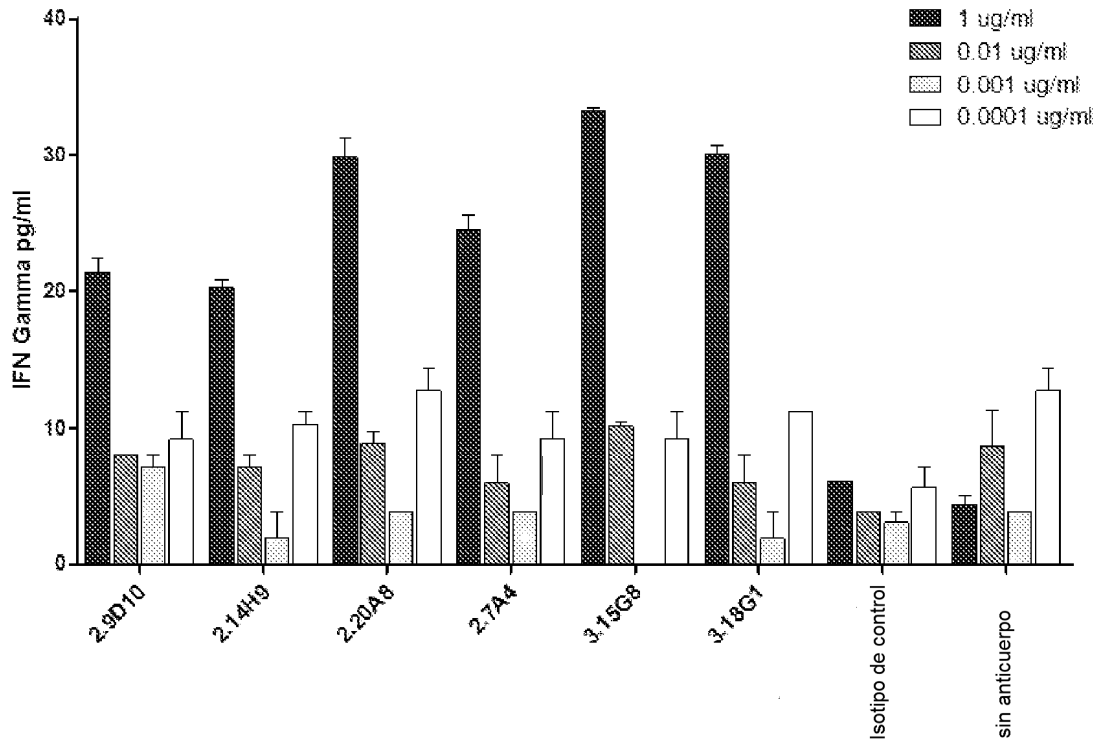


Figura 4

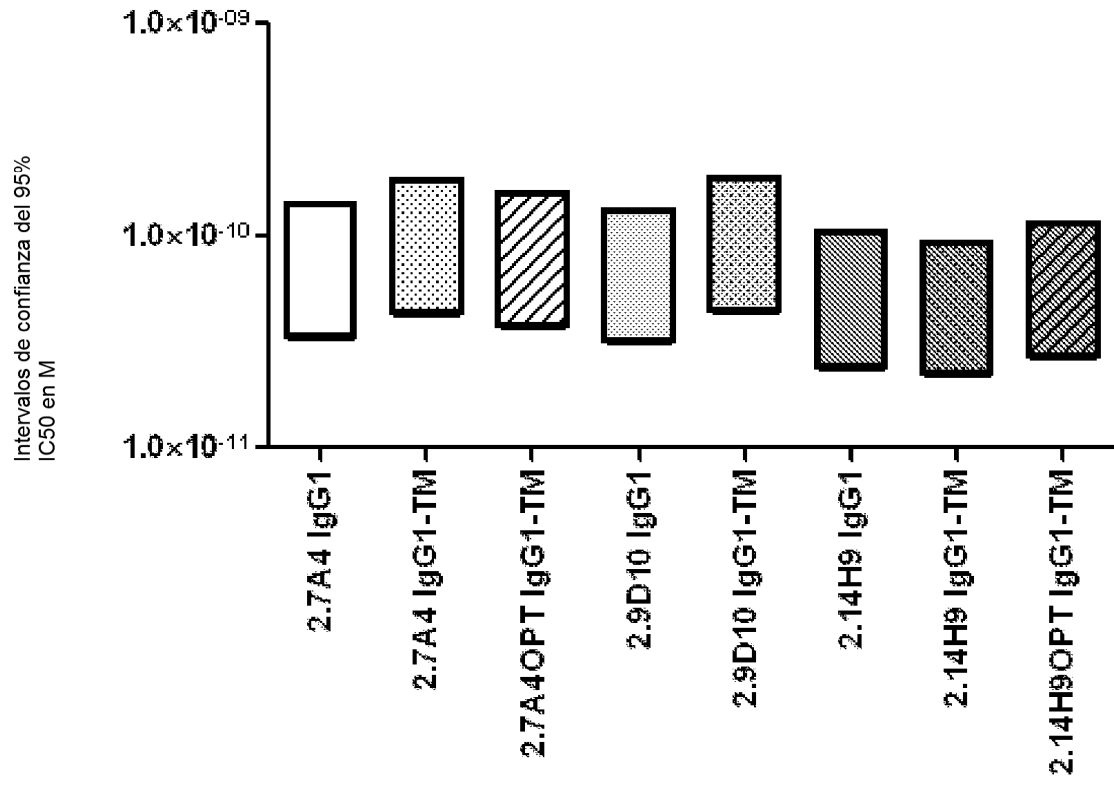


Figura 5

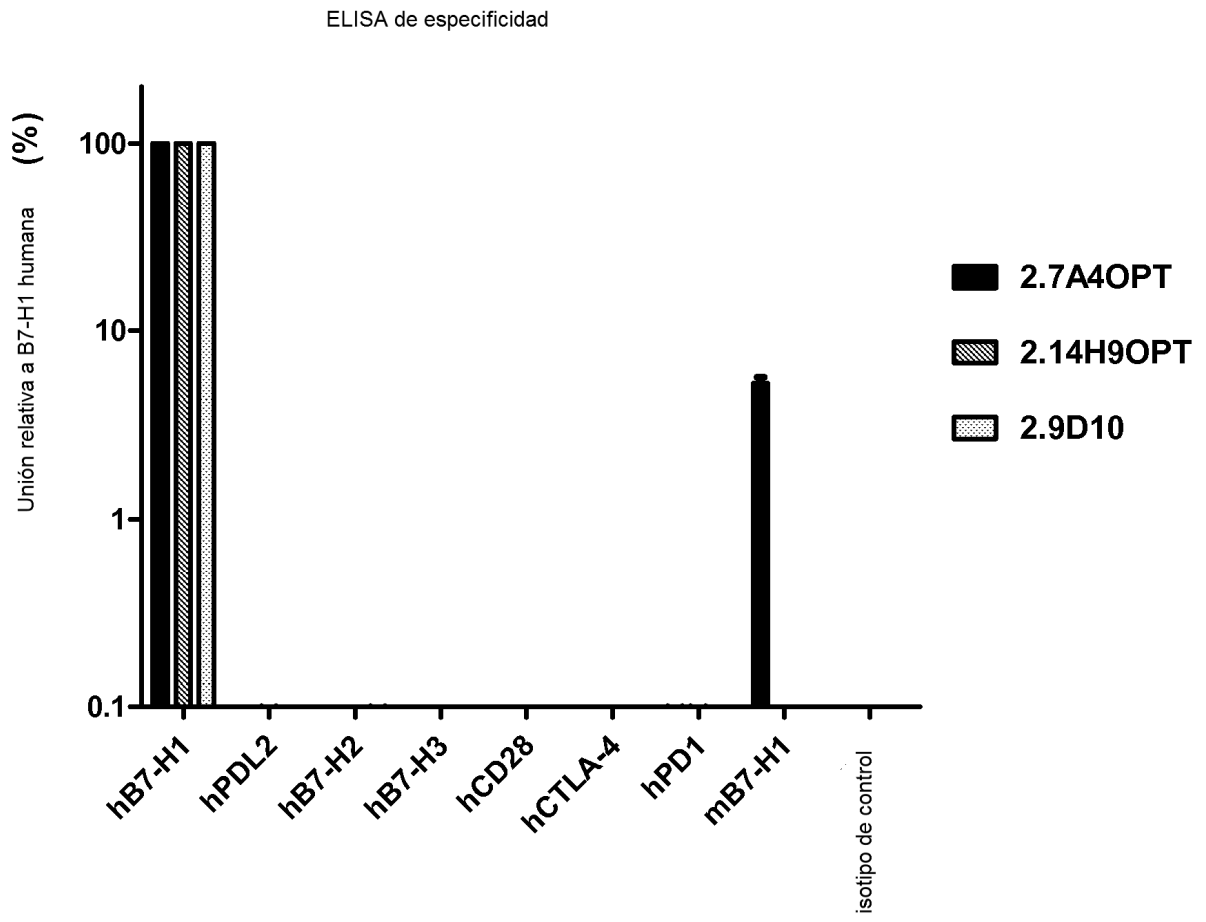


Figura 6

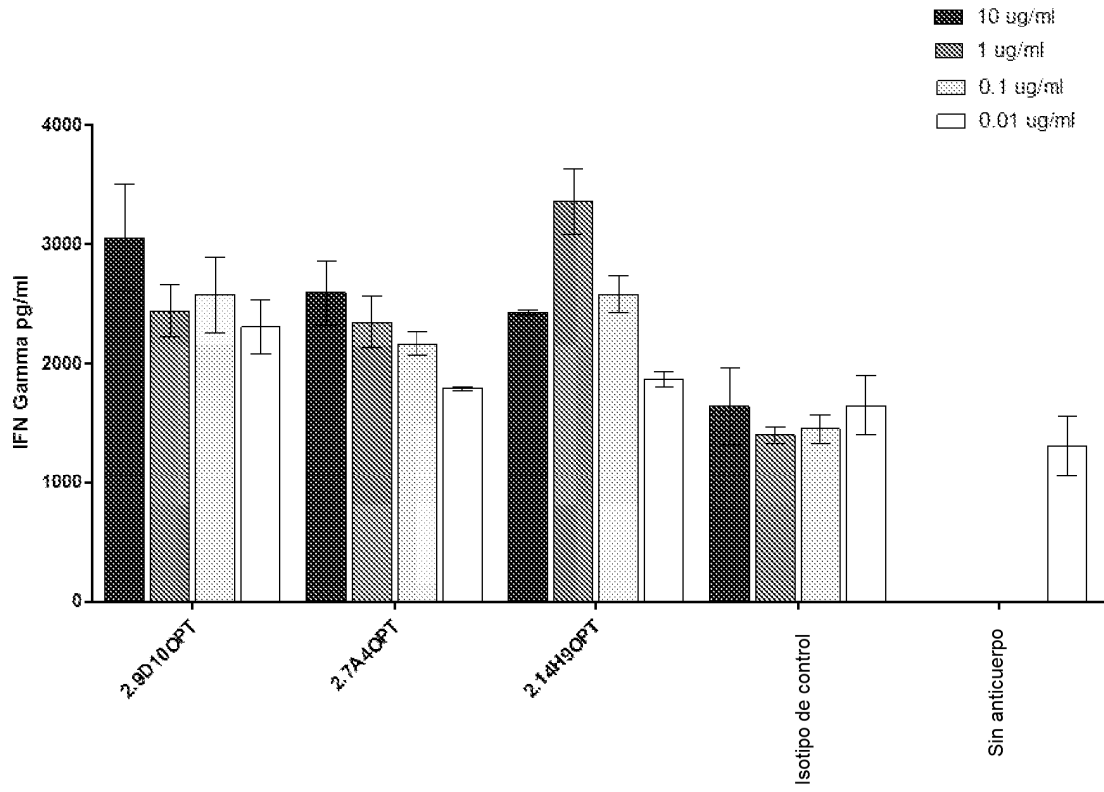


Figura 7

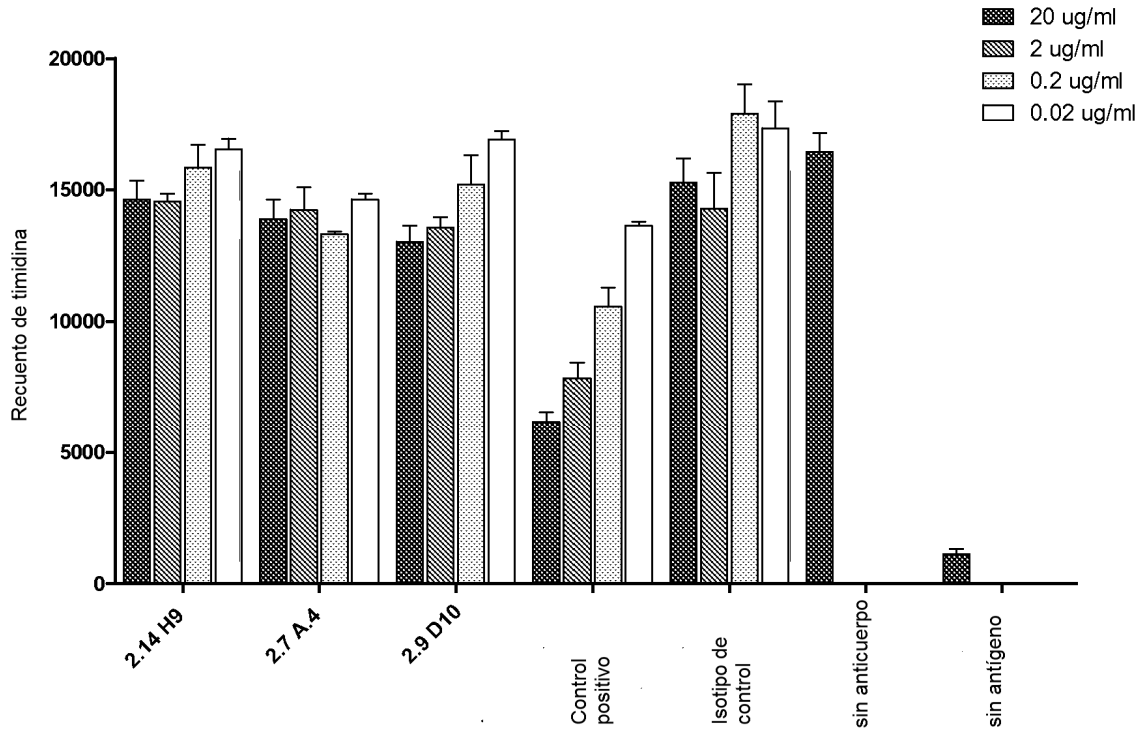
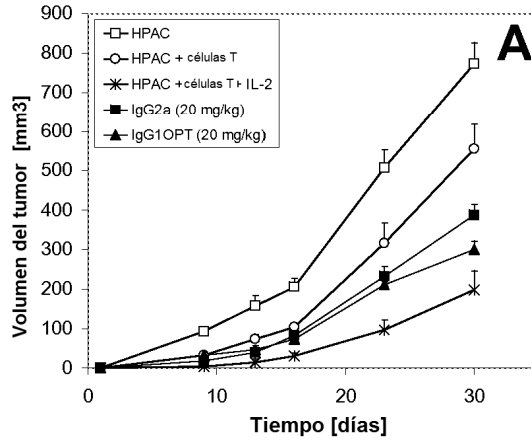


Figura 8

Grupo de control



Anticuerpos anti-B7-H1

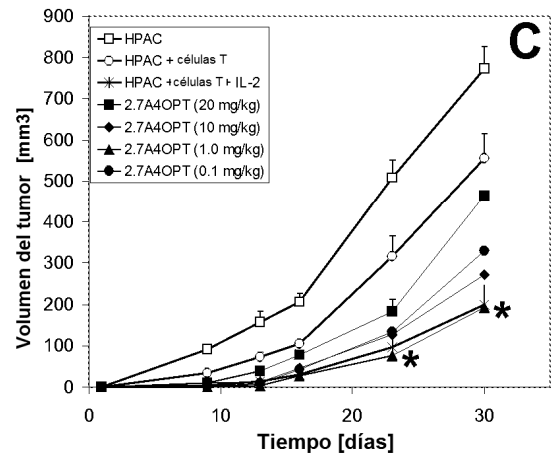
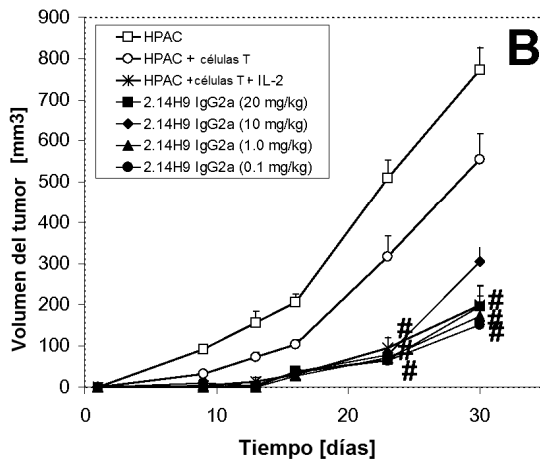
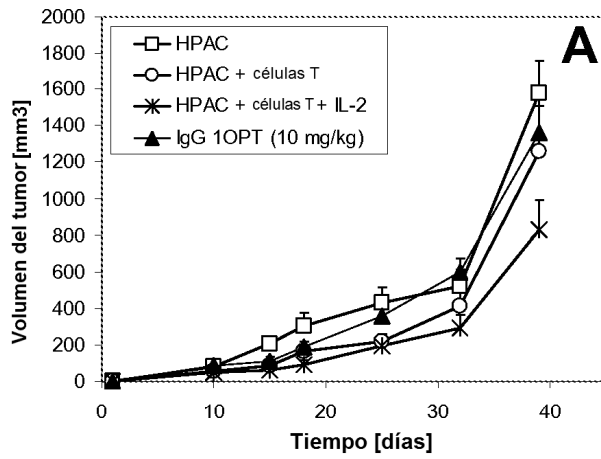


Figura 9

Grupos de control



Anticuerpos anti-B7-H1

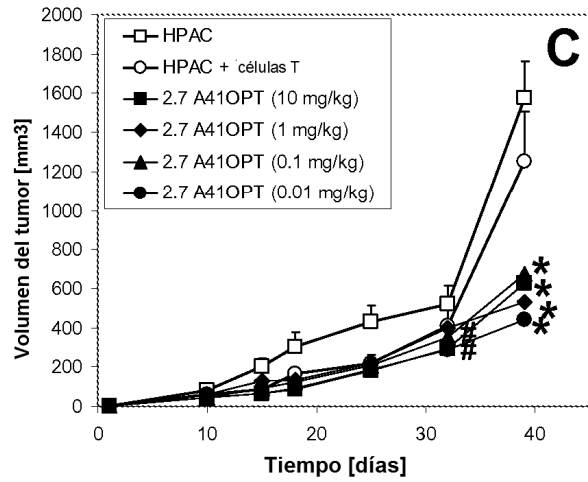
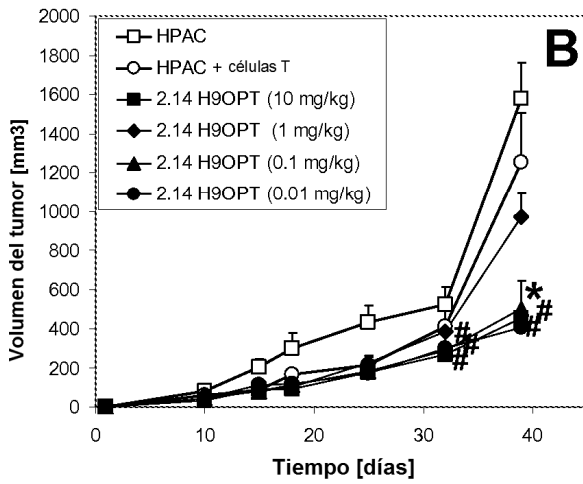


Figura 10

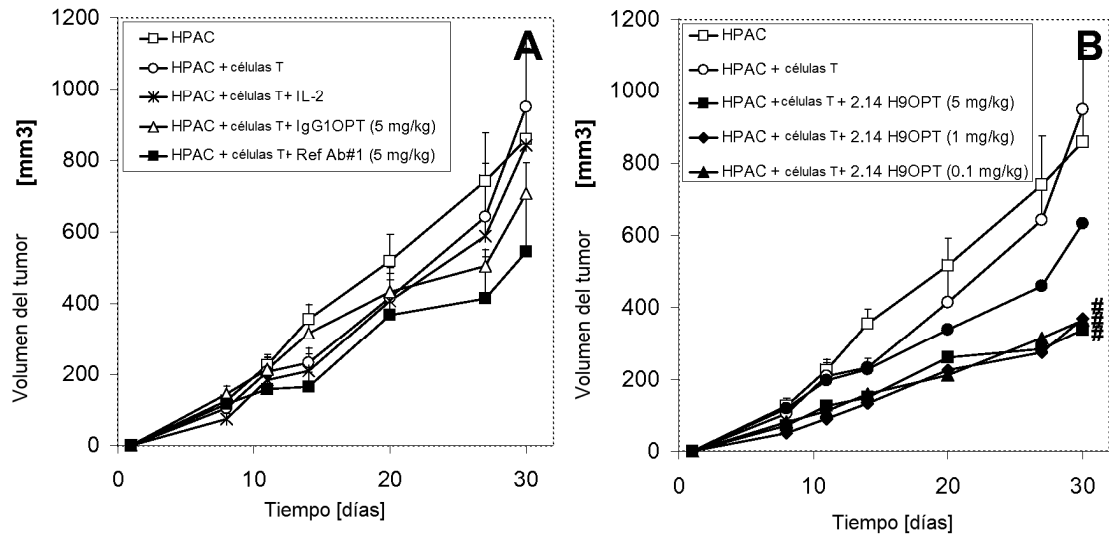


Figura 11

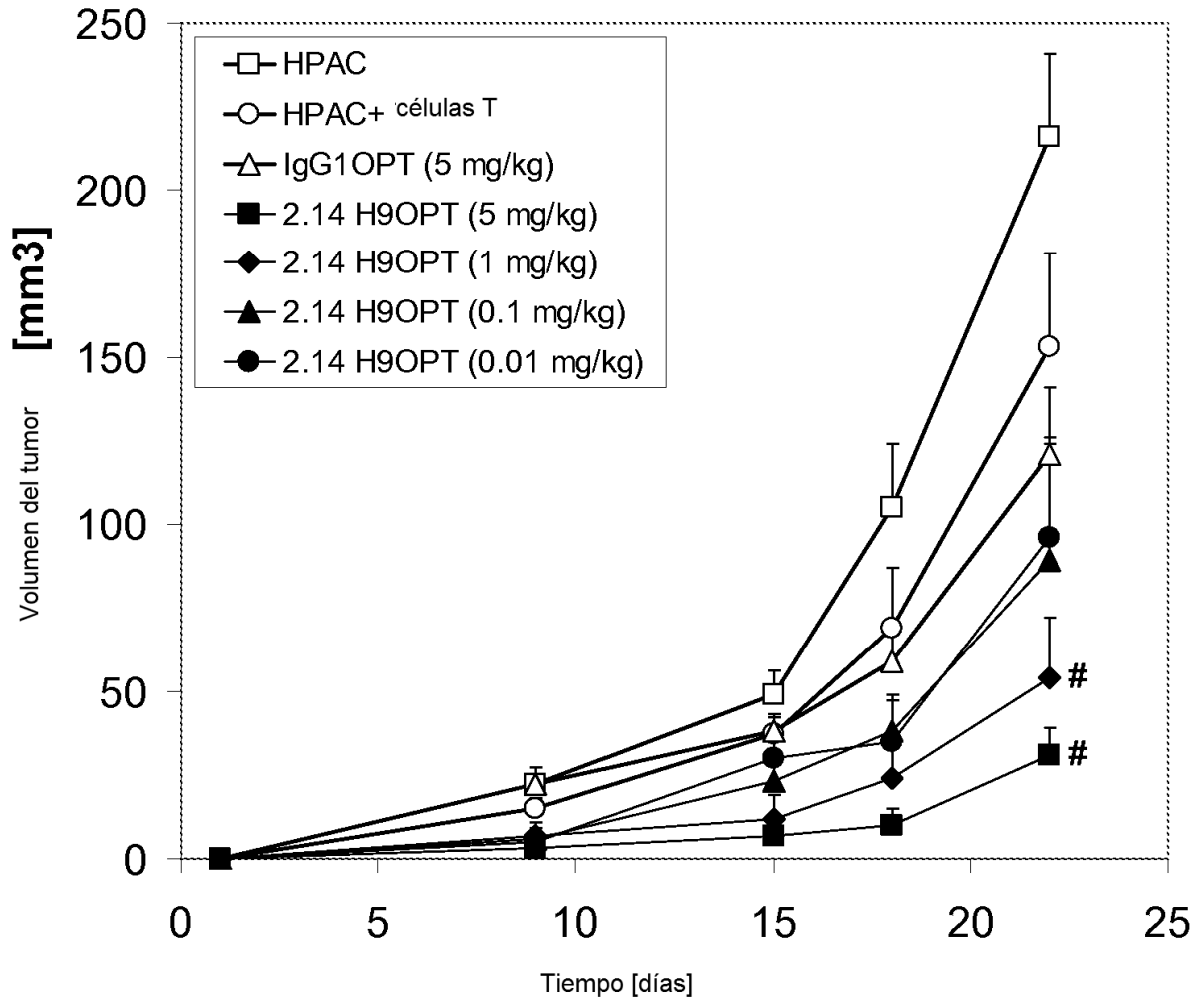


Figura 12

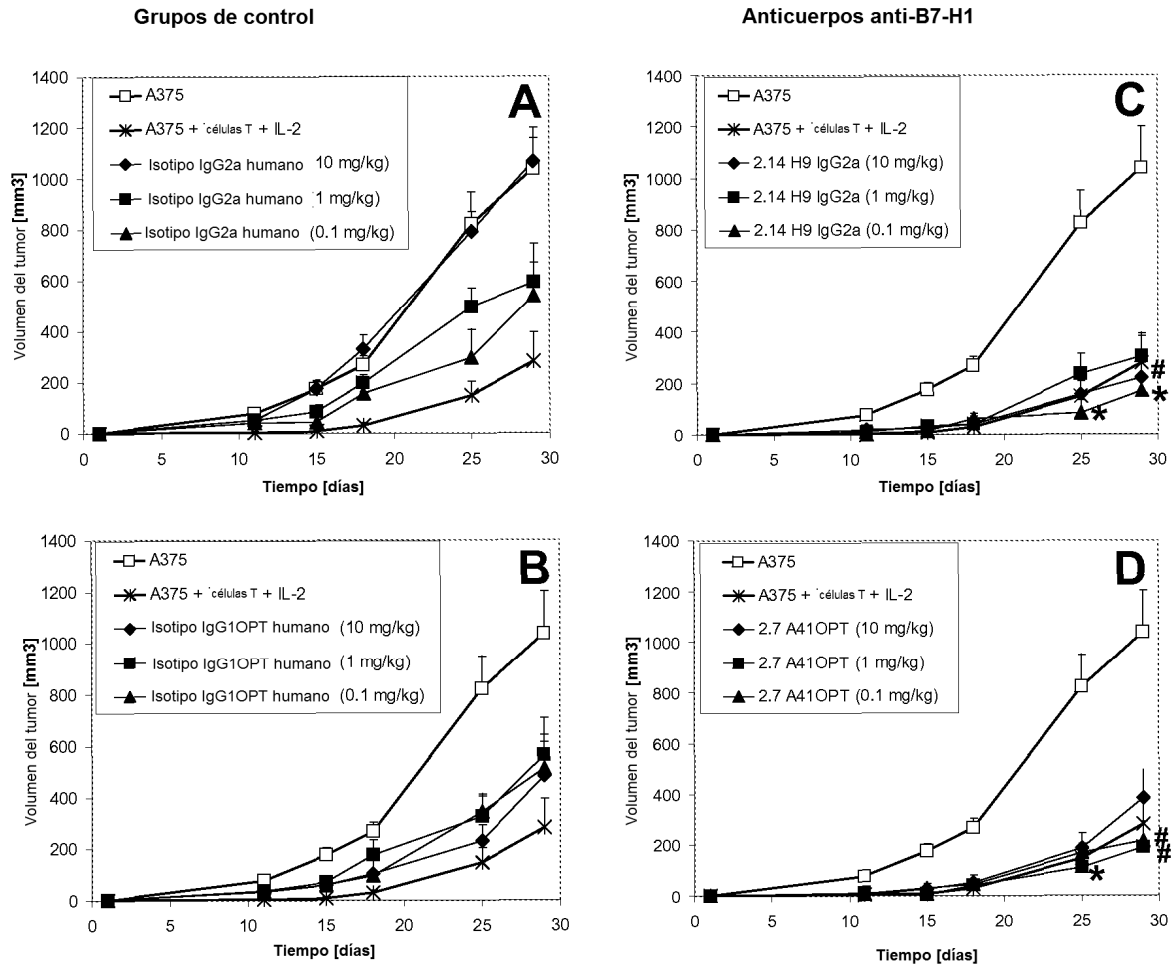


Figura 13

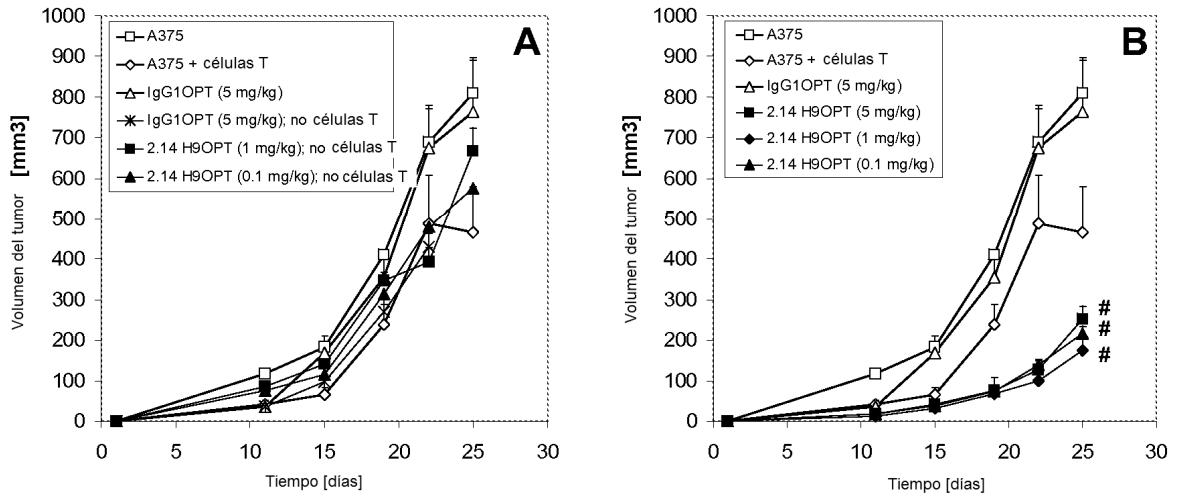


Figura 14

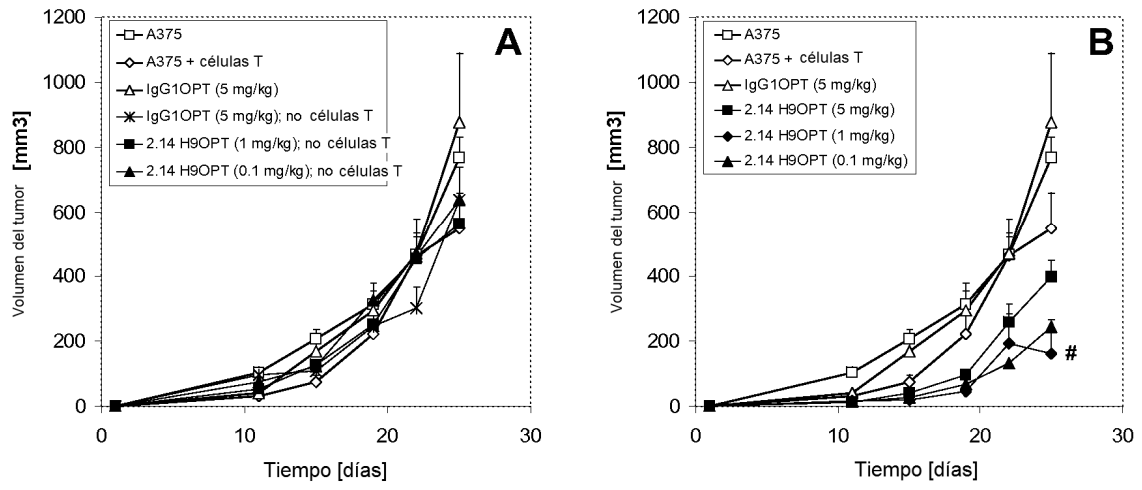


Figura 15

