

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 999 307**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/6886 (2008.01)
C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2005** **E 18167823 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2024** **EP 3428191**

54 Título: **B7-H1 y tratamiento de carcinoma de células renales**

30 Prioridad:

06.10.2004 US 616590 P
11.01.2005 US 642794 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
25.02.2025

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (100.00%)**
200 First Street S.W.
Rochester, MN 55905, US

72 Inventor/es:

CHENG, LIEPING;
STROME, SCOTT E. y
KWON, EUGENE D.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 999 307 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

B7-H1 y tratamiento de carcinoma de células renales

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE. UU. n.º 60/616.590, presentada el 6 de octubre de 2004, y de la solicitud provisional de EE. UU. n.º 60/642.794, presentada el 11 de enero de 2005.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a moléculas inmunes expresadas en tejido canceroso, y más particularmente a evaluar la expresión de moléculas inmunes en células tumorales y en leucocitos infiltrantes tumorales.

Antecedentes

10 Un determinante importante para el inicio y la progresión del cáncer es la capacidad de las células cancerosas de evadir el sistema inmune del hospedador. La presencia en tejido canceroso de, por ejemplo, moléculas inmunes inadecuadas, inapropiadas o inhibidoras puede restringir la capacidad del hospedador de generar respuestas al cáncer.

15 Las divulgaciones de la patente de EE. UU. n.º 6.803.192 describe B7-H1 como una molécula inmunorreguladora. El documento de patente EP1537878A1 describe composiciones inmunopotenciadoras que inhiben la función de PD-1 o B7-H1 y que son útiles para el tratamiento del cáncer o de infecciones. El documento de patente WO 01/14557 A1 describe PD-1 como un receptor para B7-H1.

Sumario

La presente invención se define por las reivindicaciones independientes 1 y 2.

20 La invención se basa en parte en el hallazgo de que en pacientes con carcinoma de células renales (RCC), el riesgo de muerte es proporcional al número de células tumorales y/o leucocitos en el tumor, que expresan la glucoproteína humana co-estimuladora B7-H1. Tal como se emplea en la presente memoria, el término "B7-H1" hace referencia a B7-H1 de cualquier especie mamífera y el término "hB7-H1" hace referencia a B7-H1 humana. Se dan a conocer más detalles sobre polipéptidos y ácidos nucleicos de B7-H1 en la patente de EE. UU. n.º 6.803.192.

25 La invención proporciona agentes para su uso en métodos de tratamiento de sujetos que tienen un RCC basado en la expresión de B7-H1 por células del cáncer. Los leucocitos en un tumor se denominan algunas veces en el presente documento "leucocitos infiltrantes del tumor" o "leucocitos que infiltran un/el tumor".

30 Más concretamente, la invención proporciona un agente para su uso en un método de tratamiento del cáncer. El método implica: (a) identificar a un sujeto con cáncer, en donde algunas o todas las células del cáncer o algunos o todos los leucocitos infiltrantes del tumor del cáncer expresan B7-H1; y (b) administrar al sujeto un agente que interfiere con la interacción entre B7-H1 y un receptor para B7-H1. El agente puede unirse a B7-H1 o a un receptor para B7-H1, p.ej., el receptor PD-1. El agente se une a B7-H1 o el receptor de PD-1. El agente es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo (p.ej., Fab', F(ab')₂ o el fragmento Fv de cadena sencilla (scFv)). El cáncer es RCC.

El sujeto es un ser humano.

35 Tal como se emplea en la presente memoria, "interfiere con una interacción entre B7-H1 y un receptor para B7-H1" significa que bloquea completamente una interacción física entre la molécula de B7-H1 y un receptor para B7-H1 de forma tal que prácticamente no hay interacción física entre la molécula de B7-H1 y el receptor.

40 "Polipéptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable y significan cualquier cadena de aminoácidos unida a un péptido, independientemente de la modificación post-traducción o de la longitud. Los polipéptidos útiles para la invención incluyen variantes de polipéptidos que son idénticos a los correspondientes polipéptidos de tipo silvestre pero que difieren por más de 50 (p. ej., no más de: 45; 40; 35; 30; 25; 20; 19; 18; 17; 16; 15; 14; 13; 12; 11; 10; nueve; ocho; siete; seis; cinco; cuatro; tres; dos; o una) sustitución(es) conservadora(s). Todo lo que se requiere es que la variante del polipéptido tenga por lo menos 20% (p. ej., al menos 25; 30%; 35%; 40%; 45%; 50%; 60%; 70%; 80%; 85%; 90%; 93%; 95%; 96%; 97%; 98%; 99%; 99,5%; 99,8%; 99,9%; o 100% o más) de la actividad del polipéptido de tipo silvestre. Las sustituciones conservadoras típicamente incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos:

45 glicina y alanina; valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparagina, glutamina, serina y treonina; lisina, histidina y arginina; y fenilalanina y tirosina.

50 Tal como se emplea en la presente memoria, los "leucocitos infiltrantes del tumor" pueden ser linfocitos T (como linfocitos T CD8⁺ y/o linfocitos T CD4⁺), linfocitos B u otras células de linaje de médula ósea como granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), monocitos, macrófagos, células dendríticas (es decir, células dendríticas interdigitales), histiocitos y linfocitos citolíticos naturales.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente el experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. En caso de conflicto, regirá el presente documento, incluidas las definiciones. A continuación, se describen los métodos y materiales preferidos, aunque se pueden emplear métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en este documento en la práctica o los ensayos de la presente invención. Los materiales, métodos y ejemplos descritos en esta memoria son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Otras características y ventajas de la invención serán obvias a partir de la siguiente descripción, de los dibujos y de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una serie de fotomicrografías (con una ampliación de 400X) que muestra la inmunotinción (con un anticuerpo específico para hB7-H1) de: una muestra de RCC con alta expresión de hB7-H1 en la célula tumoral (Fig. 1A); una muestra de RCC con alta expresión de hB7-H1 en leucocitos (Fig. 1B); una muestra de RCC sin expresión detectable de hB7-H1 en las células tumorales ni en los leucocitos (Fig. 1C); y una muestra de riñón normal sin expresión detectable de hB7-H1 en los túbulos proximales (Fig. 1D).

La Fig. 2 es una serie de gráficos lineales que muestran las asociaciones de la expresión de hB7-H1 con muerte por RCC en 196 sujetos de los que se obtuvieron muestras de RCC de células claras para análisis.

La Fig. 2A muestra la asociación de la expresión de hB7-H1 en el tumor con muerte por RCC (coeficiente de riesgo 2,91; IC95% [intervalo de confianza] 1,39 - 6,13; $p=0,005$). Las tasas de supervivencia específicas de cáncer (con error estándar [SE] y el cantidad que aún está en riesgo se indican entre paréntesis) a 1, 2 y 3 años después de la nefrectomía fueron: 87,8% (4,1%, 53), 72,3% (6,0%, 30), y 63,2% (7,2%, 11), respectivamente, para pacientes con muestras que tuvieron $\geq 10\%$ expresión de hB7-H1 en el tumor en comparación con 93,6% (2,3%, 95), 88,4% (3,4%, 48) y 88,4% (3,4%, 19), respectivamente, para pacientes con muestras que tuvieron $<10\%$ de expresión de hB7-H1 en el tumor.

La Fig. 2B muestra la asociación de una puntuación ajustada para la expresión de hB7-H1 en leucocitos con muerte por RCC (coeficiente de riesgo 3,58; IC95% 1,74 - 7,37; $p<0,001$). Las tasas de supervivencia específicas del cáncer (SE, cantidad aún en riesgo) a 1, 2 y 3 años fueron: 83,5% (6,2%, 26), 63,9% (9,2%, 13) y 53,6% (10,2%, 5), respectivamente, para pacientes con muestras que tuvieron una puntuación de la expresión de hB7-H1 en leucocitos ≥ 100 ; en comparación con 93,5% (2,1%, 122), 86,2% (3,3%, 65), y 84,8% (3,5%, 25), respectivamente, para pacientes con muestras que tuvieron puntuaciones <100 .

La Fig. 2C muestra la asociación de alta expresión de hB7-H1 intratumoral general con muerte por RCC (coeficiente de riesgo 4,53; IC95% 1,94 - 10,56; $p<0,001$). Las tasas de supervivencia específicas de cáncer (SE, cantidad aún en riesgo) a 1, 2 y 3 años fueron: 87,0% (3,8%, 61), 70,0% (5,8%, 32), y 61,9% (6,8%, 13), respectivamente, para pacientes con muestras que tuvieron alta expresión de hB7-H1 intratumoral general; en comparación con 94,9% (2,2%, 87), 91,9% (3,1%, 46), y 91,9% (3,1%, 17), respectivamente, para pacientes con muestras que tuvieron $<10\%$ de expresión de hB7-H1 en el tumor y <100 en leucocitos (baja expresión intratumoral general).

La Fig. 3 es una ilustración de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de la hB7-H1 inmadura de longitud total, es decir, hB7-H1 que incluye un péptido inicial de aproximadamente 22 aminoácidos.

La Fig. 4 es una ilustración de la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 2) del ADNc que codifica la hB7-H1 inmadura de longitud total.

La Fig. 5 es una ilustración de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) de la B7-H1 murina inmadura de longitud total.

La Fig. 6 es una ilustración de la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 4) del ADNc que codifica la B7-H1 murina inmadura de longitud total.

Descripción detallada

Los inventores han descubierto que los pacientes con carcinoma de células renales (RCC) que han aumentado los niveles de células tumorales y/o de leucocitos infiltrantes del tumor que expresan la glucoproteína co-estimuladora hB7-H1 presentan mayor riesgo de muerte por RCC. Asimismo, los niveles elevados de hB7-H1 expresados en células tumorales y/o leucocitos infiltrantes del tumor se asociaron con tumores más agresivos, y esta asociación persistió incluso después de controlar los indicadores tradicionales de progresión de RCC, que incluyen, por ejemplo, etapa del tumor, ganglios, metástasis (TNM); tamaño del tumor primario; grado nuclear; y necrosis histológica tumoral.

La expresión de B7-H1 en células mamíferas normales no activadas se limita en gran medida, si no exclusivamente, a las células de linaje de macrófagos y provee un posible origen de señal co-estimuladora para la regulación de la activación de los linfocitos T. En contraste, la expresión aberrante de B7-H1 por las células tumorales se ha implicado

en el deterioro de la función y supervivencia de los linfocitos T, lo que resulta en inmunidad antitumoral defectuosa para el hospedante.

Los inventores han descubierto que los tumores RCC humanos expresan hB7-H1. En particular, se descubrió que la hB7-H1 se expresa tanto en tumores de carcinoma de células renales (RCC) como en leucocitos que infiltran tumores de RCC. En contraste, los túbulos proximales de la corteza renal, de donde se cree que surgen tumores de células claras, no expresaron hB7-H1.

Se obtuvieron muestras clínicas de 196 pacientes que se trataron con nefrectomía radical o cirugía conservadora de nefronas para RCC de células claras unilateral entre 2000 y 2002 del Registro de Nefrectomía de la Clínica Mayo (Mayo Clinic Nephrectomy Registry). La detección inmunohistológica y la cuantificación de la expresión de hB7-H1 en las muestras revelaron que los pacientes cuyas muestras tumorales exhibieron altos niveles de expresión intratumoral de hB7-H1 (contribuidos por las células solas, los leucocitos solos o por la combinación de tumor y/o leucocitos) presentaron tumores agresivos y conllevaron notablemente un mayor riesgo de muerte por RCC.

La combinación de más hB7-H1 en las células tumorales y en los leucocitos infiltrantes del tumor (alta expresión de hB7-H1 intratumoral) fue un indicador incluso más fuerte del desenlace de los pacientes o bien en las células tumorales que expresan hB7-H1 o en los leucocitos infiltrantes de tumores solos. Los altos niveles de expresión de hB7-H1 intratumoral estuvieron también significativamente asociados con el compromiso de los ganglios linfáticos regionales, metástasis distante, grado nuclear avanzado, y la presencia de necrosis histológica tumoral.

En base a su capacidad de deteriorar el funcionamiento y la supervivencia de linfocitos T específicos de tumores activadas, B7-H1, expresada por las células tumorales (p. ej., células de RCC) o por los leucocitos infiltrantes, puede contribuir a la inmunosupresión comúnmente observada en sujetos con cáncer (p. ej., RCC) y puede servir como un determinante crítico de las respuestas de los sujetos a la inmunoterapia para el manejo de cáncer avanzado (p. ej., IL-2, IL-12, IFN- α , vacunación o terapia adoptiva de linfocitos T). Esto presenta la posibilidad de que administrar a pacientes con cáncer agentes que interfieran con la interacción de B7-H1 con su receptor (p. ej., PD-1) pueda servir como método de inmunoterapia, particularmente en sujetos cuyo alto nivel de expresión de B7-H1 intratumoral previamente los haya convertido en insensibles o prácticamente insensibles a otros modos de inmunoterapia.

Estos hallazgos respaldan los agentes para su uso en los métodos de la presente descripción, que se describen a continuación.

Métodos de diagnóstico

Se divulga, pero no se describe como tal, un método de diagnóstico del cáncer en un sujeto. El método implica: (a) proveer una muestra de tejido de un sujeto que se sospecha que tiene, o que es propenso a desarrollar cáncer del tejido, en donde la muestra contiene células de ensayo, en donde las células de ensayo son células del tejido o leucocitos infiltrantes del tejido; y (b) evaluar si las células de ensayo expresan B7-H1. La expresión de algunas o todas las células de ensayo es un indicio de que el sujeto tiene cáncer. Dado que una amplia variedad de células cancerosas expresan B7-H1 en sus superficies, los métodos son particularmente útiles para diagnosticar cualquiera de dichos tipos de cáncer. Las células de ensayo pueden, por lo tanto, ser por ejemplo células de mama, células de pulmón, células de colon, células pancreáticas, células renales, células de estómago, células de hígado, células óseas, células hematológicas (p. ej., células linfoides, células granulocíticas, monocitos o macrófagos), células de tejido neuronal, melanocitos, células de ovario, células de testículo, células de próstata, células cervicales, células vaginales, células vesicales o cualquier otra célula mencionada en este documento. Asimismo, las células de ensayo pueden ser leucocitos presentes en los tejidos relevantes que contengan cualquiera de las células de ensayo anteriormente mencionadas. Los leucocitos infiltrantes del tejido pueden ser linfocitos T (linfocitos T CD4⁺ y/o linfocitos T CD8⁺) o linfocitos B. Dichos leucocitos pueden también ser neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, macrófagos, histiocitos o linfocitos citolíticos naturales. Los sujetos pueden ser mamíferos e incluyen, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos (p. ej., monos, babuinos o chimpancés), caballos, vacas (o bueyes o toros), cerdos, ovejas, cabras, gatos, conejos, cobayos, hámsteres, ratas, jerbos o ratones.

Como se describe en la presente memoria, los métodos divulgados proporcionan una serie de ventajas y usos diagnósticos. Se puede evaluar el nivel de polipéptido y/o ARNm de B7-H1. El nivel de B7-H1 se evalúa en una muestra de tejido para diagnosticar o para confirmar la presencia de cáncer en el sujeto del cual se obtiene el tejido.

Los métodos para detectar un polipéptido en una muestra de tejido son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos (o fragmentos de estos) que se unen a un epítipo específico para B7-H1 se pueden utilizar para evaluar si las células de ensayo de la muestra de tejido expresan B7-H1. Dichos anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales. En dichos ensayos, el anticuerpo propiamente dicho, o un anticuerpo secundario que se une a este, pueden ser detectablemente marcados. En forma alternativa, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y se puede usar avidina detectablemente marcada (un polipéptido que se une a biotina) para detectar la presencia del anticuerpo biotinilado. Las combinaciones de estos planteamientos (incluidos los ensayos "sándwich de múltiples capas") familiares para aquellos con experiencia en la técnica se pueden emplear para aumentar la sensibilidad de las metodologías. Algunos de estos ensayos que detectan proteínas (p. ej., ELISA o inmunoelectrotransferencia) se

pueden aplicar a lisados de células, y otros (p. ej., métodos inmunohistoquímicos o citometría de flujo de fluorescencia) se pueden aplicar a cortes histológicos o suspensiones celulares sin lisar. La muestra de tejido puede ser, por ejemplo, tejido pulmonar, epitelial, conjuntivo, vascular, muscular, neuronal, esquelético, linfático, prostático, cervical, mamario, esplénico, gástrico, intestinal, oral, esofágico, dérmico, hepático, renal, vesical, tiroideo, adrenérgico, cerebral, de vesícula biliar, pancreático, uterino, ovárico o testicular.

Los métodos de detección de un ARNm en una muestra de tejido se conocen en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden lisar y un ARNm en los lisados o en el ARN purificado o semipurificado de los lisados se puede detectar mediante cualquiera de una diversidad de métodos como, aunque sin limitarse a ello, ensayos de hibridación que emplean sondas de ADN o ARN específicas de genes marcados (p. ej., ensayos de transferencia de Northern) y metodologías de RT-PCR cuantitativas o semicuantitativas que emplean cebadores de oligonucleótidos específicos de genes apropiados. Como alternativa, se pueden llevar a cabo ensayos de hibridación *in situ* semicuantitativos que emplean, por ejemplo, cortes de tejido o suspensiones celulares no lisadas, y sondas de ADN o ARN detectablemente marcadas (p. ej., en forma fluorescente o enzimática). Otros métodos para cuantificar ARNm incluyen ensayo de protección de ARN (RPA) y SAGE.

Los métodos de evaluación del nivel de expresión de B7-H1 (ARN y/o polipéptido) pueden ser cuantitativos, semicuantitativos o cualitativos. Por lo tanto, por ejemplo, el nivel de expresión de B7-H1 se puede determinar como un valor discreto. Por ejemplo, si se usa RT-PCR cuantitativa, el nivel de expresión de ARNm de B7-H1 se puede medir como un valor numérico, correlacionando la señal de detección derivada del ensayo cuantitativo con la señal de detección de una concentración conocida de: (a) secuencia de ácido nucleico de B7-H1 (p. ej., ADNc de B7-H1 o transcripto de B7-H1); o (b) una mezcla de ARN o ADN que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica B7-H1. Alternativamente, el nivel de expresión de B7-H1 se puede evaluar usando cualquiera de una diversidad de sistemas semicuantitativos/cualitativos conocidos en la técnica. Por lo tanto, el nivel de expresión de B7-H1 en una célula o muestra de tejido puede expresarse como, por ejemplo, (a) uno o más de "excelente", "bueno", "satisfactorio", "insatisfactorio" y/o "deficiente"; (b) uno o más de "muy alto", "alto", "medio", "bajo" y/o "muy bajo"; o (c) uno o más de "++++", "+++", "++", "+", "+/-" y/o "-". Si se desea, el nivel de expresión de B7-H1 en tejido de un sujeto se puede expresar en relación con la expresión de B7-H1 de (a) un tejido de un sujeto que se sabe que no es canceroso (p. ej., un ganglio linfático de riñón o pulmón contralateral o no comprometido); o (b) un tejido correspondiente de uno o más de otros sujetos que se sabe que no presentan el cáncer de interés, preferiblemente que se sabe que no tienen cáncer.

Los métodos para evaluar la cantidad de etiqueta dependen de la naturaleza de la etiqueta y se conocen en la técnica. Las etiquetas apropiadas incluyen, sin limitación, radionúclidos (p. ej., ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^3H o ^{32}P), enzimas (p. ej., fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, luciferasa o β -galactosidasa), proteínas o restos fluorescentes (p. ej., fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, proteína fluorescente verde (GFP) o proteína fluorescente azul (BFP)) o restos luminiscentes (p. ej., nanopartículas Qdot™ provistas por Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CA). Otros ensayos aplicables incluyen inmunoprecipitación cuantitativa o ensayos de fijación de complementos.

En los ensayos de diagnóstico divulgados, un sujeto es diagnosticado con cáncer si la proporción de células de ensayo del sujeto que expresan B7-H1 es mayor que un valor control. El valor control puede ser, por ejemplo: (a) la proporción de células que expresan B7-H1 en el correspondiente tejido del sujeto que se sabe no son cancerosas (p. ej., ganglio linfático no comprometido o riñón o pulmón contralateral); o (b) la proporción de células que expresan B7-H1 en un tejido correspondiente de uno o más de otros sujetos que se sabe que no tienen el cáncer de interés, preferiblemente que se sabe que no tienen ningún cáncer.

Los métodos se pueden usar por sí solos o junto con otros procedimientos para diagnosticar cáncer. Por ejemplo, si se desea o prefiere, el nivel de células de ensayo que expresan B7-H1 en una muestra de tejido que es, o que se sospecha que es cancerosa, se puede evaluar antes, durante o después de evaluar los niveles de otras moléculas que son marcadores de cáncer diagnósticos útiles. Dichos marcadores diagnósticos pueden ser, aunque sin limitarse a ello, antígenos asociados a tumores (TAA). Los TAA relevantes incluyen, entre otros, antígeno carcinoembrionario (CEA), MAGE (antígeno de melanoma) 1-4, 6 y 12, MUC (mucina) (p. ej., MUC-1, MUC-2, etc.), tirosinasa, MART (antígeno de melanoma), Pmel 17 (gp100), secuencia de intrones GnT-V (secuencia V de intrones V N-acetilglucosaminiltransferasa), PSA (antígeno específico de próstata), PSMA (antígeno de membrana específico de próstata), PRAME (antígeno de melanoma), β -catenina, MUM-1-B (producto génico mutado ubicuo de melanoma), GAGE (antígeno de melanoma) 1, BAGE (antígeno de melanoma) 2-10, c-ERB2 (HER2/neu), EBNA (antígeno nuclear del virus Epstein-Barr) 1-6, gp75, papiloma virus humano (VPH) E6 y E7, proteína de resistencia pulmonar p53m (LRP), Bcl-2, Ki-67 y gen VHL (von Hippel-Lindau).

Método de identificación de sujetos con cáncer que probablemente se beneficiarían de la inmunoterapia

También se divulga, pero no se reivindica como tal, un método de identificación de un candidato para inmunoterapia. Este método comprende proporcionar una muestra de tejido de un sujeto con cáncer del tejido. La muestra de tejido contiene células de ensayo, en donde las células de ensayo son células cancerosas o leucocitos infiltrantes del tumor. Se determina el nivel de células de ensayo en la muestra de tejido que expresa B7-H1, de modo tal que si no se

detecta la expresión de B7-H1 en las células de ensayo, o si menos de un nivel umbral inmunoinhibidor de las células de ensayo expresa B7-H1, es más probable que el sujeto se beneficie con la inmunoterapia.

El nivel umbral inmunoinhibidor es un nivel predeterminado de las células de ensayo relevantes que expresan B7-H1. Si las células de ensayo de un sujeto con cáncer de interés contienen un nivel de células que expresan B7-H1 que es menor que el nivel umbral inmunoinhibidor de células que expresan B7-H1 (según lo predeterminado para el cáncer relevante), es más probable que ese sujeto se beneficie con la inmunoterapia que otro sujeto con el mismo tipo de cáncer, pero cuyas células de ensayo correspondientes contienen un nivel de células que expresan B7-H1 igual o mayor que el nivel umbral inmunoinhibidor. El nivel umbral inmunoinhibidor se puede obtener efectuando análisis clínicos estadísticos conocidos en la técnica, p. ej., aquellos descritos en la presente memoria.

Los métodos de evaluación de si las células de ensayo expresan B7-H1 son los mismos que aquellos descritos anteriormente para los métodos de diagnóstico. Dichos métodos, también como se describió precedentemente, pueden ser cualitativos, semicuantitativos o cualitativos.

La "inmunoterapia" puede ser inmunoterapia activa o inmunoterapia pasiva. Para la inmunoterapia activa, el tratamiento se basa en la estimulación *in vivo* del sistema inmune hospedante endógeno para que reaccione contra tumores con la administración de agentes modificadores de la respuesta inmune. Estos agentes modificadores de la respuesta inmune se describen a continuación.

Para inmunoterapia pasiva, el tratamiento implica la administración de agentes con reactividad inmune al tumor establecida (como células efectoras inmunes o anticuerpos) que pueden mediar directa o indirectamente los efectos antitumorales y no necesariamente dependen del sistema inmune del hospedante intacto. Los ejemplos de células efectoras inmunes incluyen leucocitos, p. ej., los leucocitos infiltrantes del tumor anteriormente descritos, linfocitos T (como linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y/o linfocitos T cooperadores CD4⁺), linfocitos citolíticos (como linfocitos citolíticos naturales y linfocitos citolíticos activados por linfocinas), linfocitos B y células presentadoras de antígenos (como células dendríticas y macrófagos).

La inmunoterapia también puede ser uno o más de los métodos que se describen a continuación (en "Métodos de tratamiento" y "Métodos para inhibir la expresión de B7-H1).

Método de pronóstico

También se divulga, pero no se reivindica como tal, un método de determinación del pronóstico de un sujeto con cáncer. Este método implica: (a) proporcionar una muestra de tejido de un sujeto con cáncer del tejido, en donde la muestra de tejido contiene células de ensayo, en donde las células de ensayo son células cancerosas o leucocitos infiltrantes del tumor; y (b) determinar el nivel de células de ensayo en la muestra de tejido que expresan B7-H1. Si un nivel pronóstico, o más de un nivel pronóstico, de las células de ensayo expresa B7-H1, el sujeto es más propenso a morir de cáncer que si menos de un nivel pronóstico de las células de ensayo expresa B7-H1. El nivel pronóstico es un valor predeterminado obtenido realizando análisis clínicos estadísticos conocidos en la técnica, p. ej., aquellos descritos en la presente invención.

Por lo tanto, por ejemplo, si las células de ensayo de un sujeto con cáncer contienen un nivel significativo de células que expresan B7-H1, pero menos de un nivel pronóstico de células que expresan B7-H1 (según lo predeterminado para el cáncer relevante), el sujeto con cáncer no será más propenso a morir del cáncer que un sujeto con el mismo cáncer, pero cuyas células de ensayo correspondientes no contienen células detectables que expresan B7-H1. Por otra parte, si las células de ensayo de un sujeto con cáncer contienen más de un nivel pronóstico de células que expresan B7-H1, el sujeto con cáncer será más propenso a morir del cáncer que un sujeto con el mismo cáncer, pero cuyas células de ensayo correspondientes no contienen células detectables que expresan B7-H1 o un nivel de células que expresan B7-H1 que un nivel pronóstico de células que expresan B7-H1. Asimismo, para sujetos con cáncer que tienen niveles de células que expresan B7-H1 en poblaciones de células de ensayo apropiadas mayores que los niveles pronóstico, las probabilidades de morir del cáncer probablemente serán proporcionales al nivel de células que expresan B7-H1 en la población de células de ensayo.

Tal como se emplea en la presente memoria, "evaluar si las células de ensayo expresan B7-H1" o "evaluar el nivel de células de ensayo en las muestras de tejido que expresan B7-H1" se puede lograr por cualquiera de los métodos previamente descritos. Los métodos de pronóstico en general suelen ser cuantitativos o semicuantitativos.

Los sujetos pueden ser cualquiera de aquellos mencionados en "Métodos de diagnóstico" y los tipos de cáncer pueden ser cualquiera de los siguientes: cáncer renal, cáncer hematológico (p. ej., leucemia o linfoma), cáncer neurológico, melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gastrointestinal, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer genitourinario, cáncer de huesos o cáncer vascular.

Agentes para su uso en los métodos de tratamiento

- La invención incluye un agente para su uso en un método de tratamiento del cáncer. El método implica: (a) identificar a un sujeto con cáncer, algunas o todas las células del cáncer o todos los leucocitos infiltrantes del tumor del cáncer que expresa B7-H1; y (b) administrar al sujeto un agente que interfiere con la interacción entre B7-H1 y un receptor para B7-H1. Estos métodos se pueden llevar a cabo en forma subsiguiente a, o sin, realizar ninguno de los métodos anteriormente descritos. El agente es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, como p. ej., un fragmento Fab', F(ab')₂ o un fragmento scFv que se une a B7-H1, o un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, que se une a un receptor para B7-H1, concretamente al receptor PD-1. El receptor PD-1 se describe en más detalle en la patente de EE. UU. n.º 6.808.710.
- El agente propiamente dicho se puede administrar a un sujeto. En general, el agente puede suspenderse en un vehículo farmacéuticamente aceptable (p. ej., solución fisiológica) y administrarse por vía oral o infusión intravenosa (i.v.), o inyectarse en forma subcutánea, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, intrarrectal, intravaginal, intranasal, intragástrica, intratraqueal o intrapulmonar. El agente puede administrarse, por ejemplo, directamente a un sitio de respuesta inmune, p. ej., un ganglio linfático en la región de un tejido u órgano afectado o bazo. La dosis requerida depende de la elección de la ruta de administración; la naturaleza de la formulación; la naturaleza de la enfermedad del paciente; la talla del sujeto, el peso, el área superficial, la edad, el sexo; otros fármacos que se administren; y el criterio del médico. Las dosis adecuadas están en el intervalo de 0,0001-100,0 mg/kg. Se pueden esperar amplias variaciones en las dosis necesarias en vista de la variedad de los compuestos disponibles y las diferentes eficiencias de las distintas rutas de administración. Por ejemplo, se esperaría que la administración oral requiera dosis más altas que la administración por inyección i.v. Las variaciones en estos niveles de dosis se pueden ajustar usando rutinas empíricas estándar para optimización, como entenderá el experto en la técnica. Las administraciones pueden ser individuales o múltiples (p. ej., 2, 3, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100, 150 o más). La encapsulación del compuesto en un vehículo de administración adecuado (p. ej., micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) puede aumentar la eficiencia de administración, particularmente para administración oral.
- Alternativamente, si el agente es un polipéptido, un polinucleótido que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido se puede administrar a las células apropiadas en un mamífero. La expresión de la secuencia codificante se puede dirigir a cualquier célula del cuerpo del sujeto. No obstante, la expresión preferiblemente se dirigirá a las células en, o próximas, al tejido linfóide que drena un tejido u órgano afectado. La expresión de la secuencia codificante se puede dirigir, por ejemplo, a células que comprenden el tejido canceroso (p. ej., leucocitos infiltrantes del tumor y células del tumor) o células inmunes, p. ej., linfocitos B, macrófagos/monocitos o células interdigitales o dendríticas. Esto se puede lograr, por ejemplo, con el uso de dispositivos de administración de micropartículas o microcápsulas poliméricas, biodegradables conocidas en la técnica y/o anticuerpos específicos de tejido o células.
- Otra forma de lograr la absorción del ácido nucleico es usando liposomas, que se pueden preparar por métodos convencionales. Los vectores se pueden incorporar solos a estos vehículos de administración o se pueden incorporar conjuntamente con anticuerpos específicos del tejido. En forma alternativa, se puede preparar un conjugado molecular compuesto por un plásmido u otro vector unido a poli-L-lisina por fuerzas electroestáticas o covalentes. La poli-L-lisina se une a un ligando que se puede unir a un receptor en las células diana [Cristiano et al. (1995), J. Mol. Med. 73:479]. En forma alternativa, la selección específica del tejido se puede obtener mediante el uso de elementos reguladores de la transcripción específicos de tejidos (TRE) conocidos en la técnica. La administración de "ADN desnudo" (es decir, sin un vehículo de administración) a un sitio intramuscular, intradérmico o subcutáneo es otro medio para lograr la expresión *in vivo*.
- En los polinucleótidos relevantes (p. ej., vectores de expresión), la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés con una metionina iniciadora y opcionalmente una secuencia de selección está operativamente unida a un promotor o combinación de potenciador-promotor. Las secuencias de aminoácidos cortos pueden actuar como señales para dirigir proteínas a compartimientos intracelulares específicos. Dichas secuencias de señalización se describen en detalle en la patente de EE. UU. n.º 5.827.516.
- Los potenciadores proporcionan la especificidad de expresión en términos de tiempo, localización y nivel. A diferencia de un promotor, un potenciador puede funcionar cuando se localiza a distancias variables del sitio de inicio de la transcripción, siempre y cuando esté presente un promotor. Un potenciador también puede localizarse hacia el sitio de inicio de la transcripción. Para tener la secuencia codificante bajo el control de un promotor, es necesario posicionar el sitio de inicio de la traducción del marco de lectura de traducción del péptido o polipéptido entre uno y aproximadamente cincuenta nucleótidos en dirección 3' del promotor. La secuencia codificante del vector de expresión está operativamente unida a una región de terminación de la transcripción.
- Los vectores de expresión adecuados incluyen plásmidos y vectores víricos tales como herpes virus, retrovirus, virus de la variolovacuna, virus de la variolovacuna atenuados, virus de la viruela aviar, adenovirus y virus adenoasociados, entre otros.

Los polinucleótidos se pueden administrar en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son vehículos biológicamente compatibles que son adecuados para administrar a un ser humano, p. ej., solución salina fisiológica o liposomas. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad del polinucleótido que es capaz de producir un resultado deseable desde el punto de vista médico (p. ej., menor proliferación de células cancerosas) en un sujeto tratado. Como se conoce en la técnica médica, la dosis para cualquier paciente depende de muchos factores, incluida la talla del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se ha de administrar, el sexo, el momento y la ruta de administración, la salud general y otros fármacos que se administren de manera concomitante. Las dosis suelen variar, pero una dosis preferida para administración del polinucleótido oscila entre aproximadamente 10^6 y aproximadamente 10^{12} copias de la molécula de polinucleótido. Esta dosis se puede administrar en forma repetida según sea necesario. Las rutas de administración pueden ser cualquiera de las mencionadas anteriormente.

Asimismo, el método puede ser un procedimiento *ex vivo* que implica proveer una célula recombinante que es, o proviene de, una célula obtenida de un sujeto y se ha transfectado o transformado *ex vivo* con uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más agentes que interfieren con una interacción entre B7-H1 y un receptor para B7-H1, de forma tal que la célula expresa el(los) agente(s); y administrar la célula al sujeto. Las células pueden ser células obtenidas de un tejido canceroso (p. ej., células tumorales y/o leucocitos infiltrantes del tumor) o de un tejido no canceroso obtenido preferiblemente de un sujeto a quien se le han de administrar estas células o de otro sujeto. El donante y el receptor de las células puede tener haplotipos del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC; HLA en seres humanos) idénticos. De manera óptima, el donante y el receptor son gemelos homocigóticos o son el mismo individuo (es decir, son autólogos). Las células recombinantes también se pueden administrar a receptores que no tienen, o que tienen solamente una, dos, tres o cuatro moléculas MHC en común con las células recombinantes, p. ej., en situaciones en las que el receptor está seriamente inmunocomprometido, en donde solamente las células incompatibles están disponibles, y/o donde se requiere o se desea solamente la supervivencia a largo plazo de las células recombinantes.

La eficacia del agente se puede evaluar tanto *in vitro* como *in vivo*. En síntesis, se puede ensayar la capacidad del agente, por ejemplo, de (a) inhibir la interacción entre B7-H1 y un receptor para B7-H1, (b) inhibir el crecimiento de células cancerosas, (c) inducir la muerte de las células cancerosas, o (d) tornar las células cancerosas más susceptibles a respuestas inmunes mediadas por las células generadas por los leucocitos (p. ej., linfocitos y/o macrófagos). Para estudios *in vivo*, el agente puede, por ejemplo, inyectarse en un animal (p. ej., un modelo de cáncer de ratón) y pueden entonces evaluarse sus efectos sobre el cáncer. En función de los resultados, se pueden determinar un intervalo de dosis y una ruta de administración adecuados.

Como se usa en la presente solicitud, el término "anticuerpo" hace referencia a una molécula de anticuerpo entera (p. ej., IgM, IgG, IgA, IgD o IgE) generada por uno cualquiera de una diversidad de métodos conocidos en la técnica. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal. Son también útiles los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos humanizados hechos de anticuerpos no humanos (p. ej., de ratón, rata, jerbo o hámster). Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "fragmento de anticuerpo" se refiere a un fragmento de unión a antígenos, p. ej., Fab, F(ab')₂, Fv y fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv). Un fragmento scFv es un polipéptido sencillo que incluye tanto regiones variables de cadena pesada como de cadena ligera del anticuerpo del cual deriva el scFv.

Los fragmentos de anticuerpo que contienen el dominio de unión de la molécula se pueden generar mediante técnicas conocidas. Por ejemplo: los fragmentos F(ab')₂ se pueden producir por digestión de pepsina de moléculas de anticuerpo; y los fragmentos Fab se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro de fragmentos F(ab')₂ o tratando las moléculas de anticuerpo con papaína y un agente reductor. Véase, p. ej., National Institutes of Health, *1 Current Protocols In Immunology*, Coligan *et al.*, ed. 2.8, 2.10 (Wiley Interscience, 1991). Los fragmentos de scFv se pueden producir, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.642.334.

Los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados se pueden producir por técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo, usando los métodos descritos en Robinson *et al.*, solicitud de patente internacional PCT/US86/02269 publicada como WO 87/02671; Akira *et al.*, solicitud de patente europea 184.187; Taniguchi, solicitud de patente europea 171.496; Morrison *et al.*, solicitud de patente europea 173.494; Neuberger *et al.*, solicitud PCT WO 86/01533; Cabilly *et al.*, patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Cabilly *et al.*, solicitud de patente europea 125.023; Better *et al.* (1988) *Science* 240, 1041-43; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139, 3521-26; Sun *et al.* (1987) *PNAS* 84, 214-18; Nishimura *et al.* (1987) *Canc. Res.* 47, 999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314, 446-49; Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80, 1553-59; Morrison, (1985) *Science* 229, 1202-07; Oi *et al.* (1986) *BioTechniques* 4, 214; Winter, patente de EE. UU. n.º 5.225.539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321, 552-25; Veroeayan *et al.* (1988) *Science* 239, 1534; y Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141, 4053-60.

Tal como se emplea en la presente memoria, un "fragmento funcional" de un receptor para B7-H1 significa un fragmento de un receptor para B7-H1 que es más pequeño que el receptor para B7-H1 maduro de tipo silvestre y que tiene por lo menos 10 % (p. ej., por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, por lo menos 99%, o 100% o más) de la capacidad del receptor maduro de tipo silvestre para B7-H1 de

unirse a B7-H1. Tal como se emplea en la presente memoria, un "fragmento funcional" de B7-H1 significa un fragmento del polipéptido B7-H1 maduro de tipo silvestre que es más pequeño que el polipéptido B7-H1 maduro de tipo silvestre y tiene por lo menos 10% (p. ej., por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, por lo menos 99%, o 100% o más) de la capacidad del B7-H1 maduro de tipo silvestre de unirse al receptor para B7-H1. Los métodos para ensayar y comparar la capacidad de las moléculas de unirse unas con otras se conocen en la técnica.

Tal como se emplea en la presente memoria, el término "soluble" distingue a los receptores usados en la presente invención de sus homólogos unidos a las membranas celulares. Un receptor soluble, o un fragmento funcional soluble de un receptor puede contener, por ejemplo, un dominio extracelular (unión al ligando), pero carece de la región transmembrana que causa la retención de un receptor en la superficie celular. Los métodos para producir receptores solubles o sus fragmentos se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, expresar un fragmento de ADN que codifica un dominio extracelular de un receptor en un sistema vector de expresión/hospedante celular adecuado.

El término "tratamiento", tal como se emplea en la presente memoria, significa la administración de un agente a un sujeto que tiene cáncer (o se sospecha que tiene cáncer), con el propósito de curar, paliar, aliviar, curar, prevenir o mitigar el trastorno, el síntoma del trastorno, la enfermedad secundaria al trastorno o la predisposición al trastorno. Una "cantidad eficaz" de un agente terapéutico (o composición) es una cantidad del agente (o composición) que es capaz de producir un resultado deseable desde el punto de vista médico en un sujeto tratado. El método de la invención se puede llevar a cabo solo o junto con otros fármacos o terapias.

Tal como se emplea en la presente memoria, "profilaxis" puede significar la prevención completa de los síntomas de una enfermedad, un retraso en el inicio de los síntomas de una enfermedad o una atenuación en la gravedad de los síntomas de la enfermedad posteriormente desarrollados. Tal como se emplea en la presente memoria, "terapia" puede significar una supresión completa de los síntomas de una enfermedad o una reducción en la gravedad de los síntomas de la enfermedad.

Métodos de inhibición de la expresión de B7-H1

También se divulga, pero no se reivindica como tal, un método de inhibición de la expresión de B7-H1 en una célula tumoral o un leucocito infiltrante del tumor. El método implica: (a) identificar a un sujeto con cáncer, en donde el cáncer contiene una célula diana que expresa B7-H1, en donde la célula diana es una célula tumoral o un leucocito infiltrante del tumor; y (b) introducir en la célula diana: (i) un oligonucleótido antisentido que se hibrida a un transcrito de B7-H1, en donde el oligonucleótido antisentido inhibe la expresión de B7-H1 en la célula; o (ii) un ARN de interferencia de B7-H1 (ARNi). Estos métodos se pueden llevar a cabo después de, o sin haber llevado a cabo ninguno de los métodos anteriormente descritos.

Dado que, como se observó previamente, la expresión de B7-H1 aberrante dificulta la función y la supervivencia de los linfocitos T específicos de tumores, es probable que al inhibir la expresión celular de B7-H1, así como también al interferir con la interacción entre B7-H1 y su receptor, las respuestas inmunes antitumorales puedan ser restauradas. Por consiguiente, el método puede ser útil para terapia y/o profilaxis de cualquier cáncer mencionado en la presente invención. El método se puede usar, por ejemplo, en el tratamiento de RCC.

Los compuestos antisentido en general se utilizan para interferir con la expresión de proteínas, por ejemplo, o bien interfiriendo directamente con la traducción de una molécula de ARNm diana, por degradación mediada por RNasa-H del ARNm diana, por interferencia con formación de casquete en 5' del ARNm, por prevención de la unión del factor de traducción al ARNm diana por enmascaramiento del casquete en 5', por inhibición de la poliadenilación de ARNm. La interferencia con la expresión de proteínas surge de la hibridación del compuesto antisentido con su ARNm diana. Se elige un sitio de selección específico en un ARNm diana de interés para la interacción con un compuesto antisentido. Por lo tanto, por ejemplo, para modulación de poliadenilación, un sitio diana preferido en una diana de ARNm es una señal de poliadenilación o un sitio de poliadenilación. Para disminuir la estabilidad o degradación del ARNm, las secuencias desestabilizantes son sitios diana preferidos. Una vez que se han identificado uno o más sitios diana, se eligen oligonucleótidos que son lo suficientemente complementarios al sitio diana (es decir, se hibridan lo suficientemente bien bajo condiciones fisiológicas y con suficiente especificidad) para dar el efecto deseado.

El término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ARN, ADN o un mimético de cualquiera de estos. El término incluye oligonucleótidos compuestos por nucleobases naturales, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (esqueleto). El enlace o esqueleto normal de ARN o ADN es un conector fosfodiéster de 3' a 5'. El término también hace referencia, sin embargo, a oligonucleótidos compuestos totalmente por, o que tienen porciones que contienen, oligonucleótidos no naturales que funcionan en un modo similar a los oligonucleótidos que contienen solamente componentes naturales. Dichos oligonucleótidos sustituidos modificados a menudo se prefieren frente a las formas nativas, debido a sus propiedades deseables, como por ejemplo mejor absorción celular, mayor afinidad hacia una secuencia diana y mayor estabilidad en presencia de nucleasas. En los miméticos, la estructura de la base central (pirimidina o purina) en general está conservada, pero (1) los azúcares están o bien modificados o reemplazados por otros componentes y/o (2) los enlaces inter-nucleobase están modificados. Una clase de mimético de ácido nucleico

que ha probado ser muy útil se denomina ácido nucleico de proteína (ANP). En las moléculas de ANP, el esqueleto de azúcar se reemplaza con un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto aminoetilglicina. Las bases son retenidas y se unen directamente a los átomos de nitrógeno aza de la porción amida del esqueleto. ANP y otros miméticos se describen en detalle en la patente de EE. UU. n.º 6.210.289.

- 5 Los oligómeros antisentido pueden comprender en general aproximadamente 8 a aproximadamente 100 (p. ej., aproximadamente 14 a aproximadamente 80 o aproximadamente 14 a aproximadamente 35) nucleobases (o nucleósidos en donde las nucleobases son naturales).

- 10 Los oligonucleótidos antisentido pueden por sí solos introducirse en una célula o un vector de expresión que contiene una secuencia nucleica (operativamente unida a TRE) que codifica el oligonucleótido antisentido puede introducirse a la célula. En este último caso, el oligonucleótido producido por el vector de expresión es un oligonucleótido de ARN y el oligonucleótido de ARN estará compuesto absolutamente por componentes naturales.

Si los oligonucleótidos antisentido se administran *per se*, se pueden suspender en un vehículo farmacéuticamente aceptable (p. ej., solución salina fisiológica) y se administran bajo las mismas condiciones anteriormente descritas para agentes que interfieren con una interacción entre B7-H1 y un receptor para B7-H1.

- 15 Si un vector de expresión que contiene una secuencia de ácido nucleico (operativamente unido a TRE) que codifica el oligonucleótido antisentido se administra a un sujeto, la expresión de la secuencia codificante puede dirigirse a una célula tumoral del leucocito infiltrante del tumor en el cuerpo del sujeto usando cualquier técnica que se dirija a la célula o el tejido anteriormente descrita para vectores que expresan polipéptidos que interfieren con una interacción entre B7-H1 y un receptor para B7-H1.

- 20 El ARN de interferencia bicatenario (ARNi) homólogo al ADN de B7-H1 también se puede usar para reducir la expresión de B7-H1 en las células tumorales y/o en los leucocitos infiltrantes del tumor. Véanse, p. ej., Fire et al. (1998) Nature 391:806-811; Romano y Masino (1992) Mol. Microbiol. 6:3343-3353; Cogoni et al. (1996) EMBO J. 15:3153-3163; Cogoni y Masino (1999) Nature 399:166-169; Misquitta y Paterson (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:1451-1456; y Kennerdell y Carthew (1998) Cell 95:1017-1026.

- 25 Las cadenas de ARN sentido y antisentido del ARNi se pueden construir en forma individual usando síntesis química y reacciones de ligadura enzimáticas, empleando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada cadena puede sintetizarse químicamente usando nucleótidos naturales o nucleótidos modificados diseñados para aumentar la estabilidad biológica de la molécula o para aumentar la estabilidad física del bicatenario formado entre las cadenas sentido y antisentido, p. ej., derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina. La cadena sentido o antisentido puede también producirse biológicamente usando un vector de expresión en el que una secuencia de B7-H1 diana (de longitud total o un fragmento) se ha subclonado en una orientación sentido o antisentido. Las cadenas de ARN sentido y antisentido se pueden alinear *in vitro* antes de la administración del ARNs a las células. En forma alternativa, el alineamiento puede tener lugar *in vivo* después de que las cadenas sentido y antisentido hayan sido administradas secuencialmente a las células del tumor y/o a los leucocitos infiltrantes del tumor.

- 35 La interferencia del ARNi de cadena doble puede también producirse introduciendo en las células tumorales y/o los leucocitos infiltrantes del tumor un polinucleótido desde el cual los ARN sentido y antisentido se pueden transcribir bajo la dirección de promotores separados, o una sola molécula de ARN que contiene las secuencias sentido y antisentido puede transcribirse bajo la dirección de un solo promotor.

- 40 Se ha de entender que determinados fármacos y moléculas pequeñas también se pueden usar para inhibir la expresión de B7-H1 en las células del tumor y/o los leucocitos que infiltran el tumor.

Un experto en la técnica apreciará que el ARNi, el fármaco y los métodos de moléculas pequeñas pueden ser, tal como los métodos antisentido descritos anteriormente, *in vitro* e *in vivo*. Asimismo, los métodos y condiciones de administración son los mismos que aquellos para los oligonucleótidos antisentido.

- 45 En cualquiera de los métodos anteriores para inhibir la interacción entre B7-H1 y un receptor para B7-H1, y para inhibir la expresión de B7-H1, se pueden usar uno o más agentes (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 15, 18, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 o más) incluidos, por ejemplo, compuestos inhibidores, oligonucleótidos antisentido, ARNi, fármacos o moléculas pequeñas (o vectores que los codifican).

- 50 Asimismo, dichos agentes se pueden utilizar junto con uno o más (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12, 15, 18, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 o más) agentes complementarios, incluidos citocinas inmunomoduladoras, factores de crecimiento, factores antiangiogénicos, estímulos inmunogénicos y/o anticuerpos específicos de cualquiera de estos. Dichos agentes complementarios se pueden administrar antes, en simultáneo o después de la administración de cualquiera de los agentes precedentemente mencionados.

Los ejemplos de citocinas inmunomoduladoras, factores de crecimiento y factores angiogénicos incluyen, aunque sin limitarse a ello, interleucina (IL)-1 a 25 (p. ej., IL-2, IL-12 o IL-15), interferón-γ (IFN-γ), interferón-α (IFN-α), interferón-

β (IFN- β), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (G-CSF), endostatina, angiostatina y trombospondina. Las citocinas inmunomoduladoras, factores de crecimiento, factores angiogénicos incluyen sustancias que sirven, por ejemplo, para inhibir infecciones (p. ej., antibióticos antimicrobianos estándar), inhibir la activación de linfocitos T o inhibir las consecuencias de la activación de los linfocitos T. Por ejemplo, si se desea reducir una respuesta inmune de tipo Th1 (p. ej., en una respuesta DTH), se puede usar una citocina tal como interleucina (IL)-4, IL-10 o IL-13 o un anticuerpo específico para una citocina tal como IL-12 o interferón- γ (IFN- γ). Alternativamente, si se desea inhibir una respuesta inmune de tipo Th2 (p. ej., en una respuesta de hipersensibilidad de tipo inmediata), se puede usar una citocina tal como IL-12 o IFN- γ o un anticuerpo específico para IL-4, IL-10 o IL-13 como un agente complementario. Son también de interés los anticuerpos (o cualquiera de los fragmentos o derivados de anticuerpos anteriormente descritos) específicos para citocinas y quimiocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8, factores de necrosis tumoral α (TNF- α), proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1, MIP-3 α , proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), péptido activador de neutrófilos epiteliales 78 (ENA-78), proteína inducible de interferón γ 10 (IP10), Rantes, y cualquier otra citocina o quimiocina apropiada mencionada en este documento.

En algunos casos, puede ser conveniente aumentar la respuesta inmune en un sujeto mediante la administración de uno o más agentes modificadores de la respuesta inmune. Dichos agentes modificadores de la respuesta inmune incluyen, además de cualquiera de las citocinas inmunomoduladoras, factores de crecimiento y factores angiogénicos anteriormente mencionados, estímulos inmunogénicos que se pueden administrar mediante el receptor de linfocitos T específico de antígenos (TCR) expresado en la superficie del linfocito T. Más comúnmente, aunque no necesariamente, dicho estímulo se provee en la forma de un antígeno para el cual el TCR es específico. Si bien dichos antígenos en general serán proteína, pueden ser también carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos o moléculas híbridas que tienen componentes de dos o más de estos tipos de moléculas, p. ej., glucoproteínas o lipoproteínas. No obstante, el estímulo inmunogénico puede también ser provisto por otros ligandos de TCR agonistas, como anticuerpos específicos para los componentes del TCR (p. ej., regiones variables de la cadena α o de la cadena β de TCR) o anticuerpos específicos para el complejo CD3 asociado con TCR. Los antígenos útiles como estímulos inmunogénicos incluyen aloantígenos (p. ej., un aloantígeno de MHC) en, por ejemplo, una célula que presenta antígenos (APC) (p. ej., una célula dendrítica (DC), un macrófago, un monocito o una célula B). Las DC de interés son DC interdigitales y no DC foliculares; las DC foliculares presentan antígenos para los linfocitos B. Para practicidad, las DC interdigitales se denominan en este documento DC. Los métodos para aislar las DC de tejidos tales como sangre, médula ósea, bazo o ganglios linfáticos se conocen en la técnica, ya que son métodos que se generan *in vitro* a partir de células precursoras en dichos tejidos.

Son también útiles como estímulos inmunogénicos los antígenos de polipéptidos y epítomos de péptidos derivados de ellos (ver a continuación). Los polipéptidos no procesados se procesan mediante APC en epítomos de péptidos que se presentan a los linfocitos T sensibles en la forma de complejos moleculares con moléculas MHC en la superficie de la APC. Los estímulos inmunogénicos útiles también incluyen una fuente de antígeno tal como un lisado o bien de células tumorales o de células infectadas con un microorganismo infeccioso de interés. Las APC (p. ej., DC) pre-expuestas (p. ej., co-cultivando) a polipéptidos antigénicos, epítomos de péptidos de dichos polipéptidos o lisados de tumor (o células infectadas) también se pueden usar como estímulos inmunogénicos. Dichas APC pueden también ser "sensibilizadas" con antígeno mediante el cultivo con una célula cancerosa o célula infectada de interés; las células cancerosas o infectadas pueden opcionalmente irradiarse o calentarse (p. ej., hervirse) antes del cultivo sensibilizador. Además, las APC (especialmente DC) pueden "sensibilizarse" con ARN total, ARNm o ARN que codifica TAA aislado.

Alternativamente, se puede proveer un estímulo inmunogénico en la forma de células (p. ej., células tumorales o células infectadas que producen el antígeno de interés). A su vez, se pueden proveer estímulos inmunogénicos en la forma de híbridos celulares condensando APC (p. ej., DC) con células tumorales [Gong et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(6):2716-2718; Gong et al. (1997) Nature Medicine 3(5):558-561; Gong et al. (2000) J. Immunol. 165(3):1705-1711] o células infectadas de interés.

Son también útiles como estímulos inmunogénicos las proteínas de choque térmico unidas a epítomos de péptidos antigénicos derivados de antígenos (p. ej., antígenos asociados al tumor o antígenos producidos por microorganismos infecciosos) [Srivastava (2000) Nature Immunology 1(5):363-366]. Las proteínas de choque térmico de interés incluyen, sin limitación, glucoproteína 96 (gp96), proteína de choque térmico (hsp) 90, hsp70, hsp110, proteína regulada por glucosa 170 (grp170) y calreticulina. Los estímulos inmunogénicos pueden incluir una o más proteínas de choque térmico (p. ej., una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) aisladas de células de tumores. Dichos tumores son preferiblemente, aunque no necesariamente, del mismo sujeto (i) a quien se le ha de administrar el agente que interfiere con la interacción entre B7-H1 y un receptor para B7-H1, o (ii) en cuyas células tumorales o leucocitos infiltrantes del tumor se ha de inhibir la expresión de B7-H1. Las células tumorales también se pueden obtener, por ejemplo, de otro individuo que tenga el mismo tipo de tumor que el sujeto, o un tipo de tumor asociado. Alternativamente, la proteína de choque térmico se puede aislar de las células mamíferas que expresan un transcriptosoma preparadas a partir de las células tumorales de interés.

Como se indicó anteriormente, los estímulos inmunogénicos pueden ser cualquiera de una amplia variedad de células tumorales, APC "sensibilizadas" con células tumorales, células híbridas o TAA (ver arriba), epítomos de péptidos de

dicho TAA y APC "sensibilizadas" con TAA o los epítomos de péptidos de ellos. Tal como se emplea en la presente memoria, un "TAA" es una molécula (p. ej., una molécula de proteína) expresada por una célula tumoral y que (a) difiere cualitativamente de su contraparte expresada en células normales, o (b) se expresa en un nivel superior en células tumorales que en células normales. Por lo tanto, un TAA puede diferir de su contrapartida (p. ej., por uno o más residuos de aminoácidos en donde la molécula es una proteína), o puede ser idéntico a su contrapartida expresada en células normales. Preferiblemente no se expresa en células normales. Como alternativa, se expresa en un nivel por lo menos dos veces mayor (p. ej., dos veces, tres veces, cinco veces, diez veces, 20 veces, 40 veces, 100 veces, 500 veces, 1.000 veces, 5.000 veces o 15.000 veces mayor) en una célula tumoral que en la contraparte normal a las células tumorales. Los TAA relevantes incluyen, sin limitación, cualquiera de los TAA mencionados anteriormente.

Las administraciones de los agentes y/o el agente o agentes complementarios pueden ser sistémicas (p. ej. intravenosas) o locales, p. ej., durante una cirugía por inyección o infusión directa al tejido que comprende las células del cáncer y/o los leucocitos que infiltran el tumor. Las administraciones pueden también ser mediante cualquier ruta, dosis y esquema mencionados en este documento.

A su vez, se entiende que los métodos anteriormente descritos se pueden usar en combinación con una cualquiera de una diversidad de otras modalidades terapéuticas conocidas en la técnica, como quimioterapia, inmunoterapia, radioterapia o genoterapia, entre otras.

Tanto en los métodos para inhibir la interacción entre B7-H1 y un receptor para B7-H1 como en los métodos para inhibir la expresión de B7-H1, el cáncer puede ser cualquier cáncer mencionado en este documento, e incluye, p. ej., carcinoma de células renales. Los sujetos pueden ser mamíferos e incluyen, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos (p. ej., monos, babuinos o chimpancés), caballos, vacas (bueyes o toros), cerdos, ovejas, cabras, gatos, conejos, cobayos, hámsteres, ratas, jerbos o ratones.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, no limitar, las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1. Materiales y métodos

Selección de pacientes

Tras la aprobación del Comité de Revisión Institucional de la Clínica Mayo (Mayo Clinic Institutional Review Board), se identificaron 429 pacientes del Registro de Nefrectomía Clínica de la Clínica Mayo que habían sido previamente tratados con nefrectomía radical o cirugía conservadora de nefronas para RCC de células claras esporádico unilateral entre 2000 y 2002. Dado que las características patológicas y los desenlaces de los pacientes difieren por subtipo de RCC, todos los análisis se restringieron a pacientes tratados con RCC de células claras solamente, los subtipos de RCC más comunes [Cheville et al. (2003) Am. J. Surg. Pathol. 27:612-624]. Puesto que el anticuerpo monoclonal específico de hB7-H1, 5H1 (ver a continuación), puede teñir de manera reproducible tejido fresco-congelado, pero no tejido fijado en parafina [Dong et al. (2002) Nature Med. 8:793-800], los pacientes fueron seleccionados en base a la disponibilidad de tejido fresco-congelado.

Características patológicas

Las características patológicas examinadas incluyeron subtipo histológico, tamaño del tumor, estadio del tumor primario, compromiso de ganglios linfáticos regionales y metástasis distintas en la nefrectomía (2002 TNM), grado nuclear y necrosis histológica tumoral. Los portaobjetos microscópicos de todas las muestras fueron revisados por un patólogo urológico antes de tomar conocimiento del desenlace del paciente. El subtipo histológico se clasificó de acuerdo con los lineamientos de Union Internationale Contre le Cancer, de American Joint Committee on Cancer y de las Directrices de Heidelberg [Storkel et al. (1997) Cancer 80:987-989; Kovacs et al. (1997) J. Pathol. 183:131-133]. El grado nuclear se asignó usando criterios estandarizados [Lohse et al. (2002) Am. J. Clin. Pathol. 118:877-886]. La necrosis histológica tumoral se definió como la presencia de cualquier necrosis tumoral coagulativa microscópica. Los cambios degenerativos tales como hialinización, hemorragia y fibrosis no se consideraron necrosis.

Tinción inmunohistoquímica de las muestras de tumor

Los criocortes generados a partir de muestras de tumores de RCC y muestras corticales renales normales (5 µm de espesor) se montaron en portaobjetos Superfrost Plus, se secaron al aire y se fijaron en acetona enfriada con hielo. Los cortes se tiñeron usando el kit de detección Dako Autostainer and Dako Cytomation Labeled Polymer (EnVision+) HRP detection kit™ (Dako; Carpinteria, California). Los portaobjetos fueron bloqueados con H₂O₂ durante 10 minutos, seguido por incubación con el anticuerpo anti-B7-H1 primario durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se aplicó luego un reactivo secundario conjugado a peroxidasa de rábano picante (inmunoglobulina anti-ratón de cabra) a los portaobjetos a temperatura ambiente durante 15 minutos seguido por incubación con cromógeno-sustrato durante 10 minutos. Finalmente, los cortes se contra-tiñeron durante 3 minutos con hematoxilina de Schmidt modificada. El

anticuerpo primario utilizado en este estudio fue 5H1, un anticuerpo monoclonal anti-hB7-H1 de ratón [Dong et al. (2002) Nature Med. 8:793-800]. Los tumores renales benignos y los linfocitos T periféricos no se tiñeron en este estudio. Los controles de tejidos positivos para tinción de hB7-H1 fueron tejidos de amígdalas humanas. Los anticuerpos con compatibilidad de isotipo irrelevantes se usaron para tinción no específica.

5 Cuantificación de la expresión de hB7-H1

Los porcentajes de células tumorales y leucocitos que se tiñeron positivamente para hB7-H1 fueron cuantificados en incrementos de 5-10% por un patólogo urológico sin conocimiento previo del desenlace del paciente. El grado de infiltración de leucocitos se determinó y registró como ausente, focal (agregados linfoides diseminados), moderado o marcado. Una puntuación ajustada que representa una expresión de hB7-H1 en leucocitos se calculó como porcentaje de leucocitos que se tiñeron positivamente para hB7-H1 y se multiplicó por el grado de infiltración de leucocitos (0=ausente, 1=focal, 2=moderado, 3=marcado).

Métodos estadísticos

Las comparaciones entre las características patológicas y la expresión de hB7-H1 se evaluaron usando las pruebas chi cuadrado, exacta de Fisher y suma de rangos de Wilcoxon. La supervivencia específica del cáncer se estimó usando el método de Kaplan-Meier. La duración del seguimiento se calculó desde la fecha de la nefrectomía hasta la fecha de muerte o del último seguimiento. La causa de la muerte se determinó a partir del certificado de defunción o de la correspondencia del médico. Se usaron diagramas de dispersión del porcentaje de células que se tiñeron positivamente para hB7-H1 frente a la diferencia en la supervivencia observada y la supervivencia esperada a partir de un modelo de regresión de riesgo proporcional de Cox (formalmente conocido como residual Martingale) para identificar valores de corte potenciales para expresión de hB7-H1 [Therneau et al. (2000) Modeling Survival Data: Extending the Cox Model, ed. 1 (Springer-Verlag, Ann Arbor), pág. 87-92]. Las asociaciones de estos valores de corte con muerte por RCC se evaluaron usando modelos de regresión de riesgo proporcional de Cox de una sola variable y después de ajustar para estado del tumor primario, compromiso de ganglios linfáticos regionales, metástasis distantes, tamaño del tumor, grado nuclear y necrosis histológica tumoral, una característica por vez. La asociación de la expresión de hB7-H1 con la muerte por RCC también se ajustó para la puntuación SSIGN (estadio, tamaño, grado y necrosis) de la Clínica Mayo, una puntuación pronóstico compuesta específicamente desarrollada para pacientes con RCC de células claras [Frank et al. (2002) J. Urol. 168:2395-2400]. Los análisis estadísticos se realizaron usando el paquete de software SAS (SAS Institute, Cary, Carolina del Norte) y los valores $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Ejemplo 2. Supervivencia de pacientes de RCC con muestras de tejido frescas-congeladas disponibles

De los 429 pacientes elegibles para el estudio, 196 (46%) contaron con tejido fresco-congelado disponible para investigación de laboratorio. Los pacientes que contaron con tejidos frescos-congelados presentaron tumores más grandes en comparación con aquellos que no (mediana del tamaño del tumor 6,0 cm frente a 5,0 cm; $p=0,008$). No obstante, ninguna otra característica estudiada fue significativamente diferente entre los dos grupos. Asimismo, no hubo una diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia específica de cáncer entre los pacientes con y sin tejidos frescos-congelados ($p=0,314$).

En el último seguimiento, 39 de los 196 pacientes estudiados habían fallecido, incluidos 30 pacientes que fallecieron de RCC de células claras en una mediana de 1,1 años después de la nefrectomía (intervalo 0 - 2,5). Entre los 157 pacientes que aún estaban vivos en el último seguimiento, la mediana de duración del seguimiento fue 2,0 años (intervalo 0 - 4,1). Las tasas de supervivencia del cáncer estimadas (error estándar, cantidad aún en riesgo) a 1, 2 y 3 años de la nefrectomía fueron 91,4% (2,1%, 148), 81,8% (3,3%, 78) y 77,9% (3,8%, 30), respectivamente.

Ejemplo 3. Correlación de la expresión de hB7-H1 en células de tumores RCC con desenlace de pacientes

La tinción inmunohistológica de las 196 muestras de RCC de células claras o bien no revelaron ninguna expresión de hB7-H1 por las células tumorales de RCC o revelaron grados variables de hB7-H1 expresado por las células tumorales de RCC y/o por los leucocitos infiltrantes del tumor (Tablas 1 y 2, y Fig. 1). A su vez, los túbulos proximales dentro de la corteza suprarrenal, de donde se cree que surgen los tumores RCC, no exhibieron expresión de hB7-H1 entre las 20 muestras corticales renales normales estudiadas (Fig. 1).

Los porcentajes de células tumorales que se tiñeron positivamente para hB7-H1 en las 196 muestras estudiadas se resumen en la Tabla 1. Un diagrama de dispersión de la expresión de hB7-H1 en el tumor frente al riesgo esperado de muerte de cada paciente sugirió que un valor de corte de 10% sería apropiado para estos datos. Hubo 73 (37,2%) pacientes con muestras que tenían $\geq 10\%$ expresión de hB7-H1 en las células tumorales.

Tabla 1. Porcentaje de expresión de hB7-H1 en los tumores de 196 muestras de RCC de células claras

% de expresión de hB7-H1	N (%)
0	66 (33,7)

% de expresión de hB7-H1	N (%)
5	57 (29,1)
10	27 (13,8)
15	4 (2,0)
20	15 (7,7)
25	3 (1,5)
30	6 (3,1)
40	2 (1,0)
50	4 (2,0)
60	3 (1,5)
70	3 (1,5)
80	2 (1,0)
90	3 (1,5)
100	1 (0,5)

Tabla 2. Puntuación ajustada para expresión de hB7-H1 en leucocitos en 196 muestras de RCC de células claras

Infiltración de leucocitos *	% de expresión de hB7-H1	Puntuación ajustada	N (%)
0	0	0	81 (41,3)
1	5	5	4 (2,0)
1	10	10	1 (0,5)
1	30	30	2 (1,0)
1	50	50	4 (2,0)
1	60	60	3 (1,5)
1	70	70	22 (11,2)
1	80	80	12 (6,1)
1	90	90	10 (5,1)
2	5	10	3 (1,5)
2	10	20	4 (2,0)
2	20	40	2 (1,0)
2	30	60	2 (1,0)
2	50	100	6 (3,1)
2	60	120	1 (0,5)
2	70	140	9 (4,6)
2	80	160	7 (3,6)
2	90	180	8 (4,1)
3	5	15	1 (0,5)
3	20	60	1 (0,5)
3	30	90	4 (2,0)
3	70	210	2 (1,0)
3	80	240	4 (2,0)
3	90	270	2 (1,0)
3	100	300	1 (0,5)

*El grado de infiltración de leucocitos se registró como 0=ausente, 1=focalmente presente, 2=moderadamente presente o 3=marcadamente presente.

5 Las asociaciones de expresión de hB7-H1 en el tumor con muerte por RCC, tanto con una sola variable como después de ajustar para estadio TNM, tamaño del tumor, grado nuclear y necrosis histológica tumoral se exponen en la Tabla 3. Con una sola variable, los pacientes con muestras que tenían $\geq 10\%$ expresión de hB7-H1 en el tumor estuvieron cercanos a ser 3 veces más propensos a morir de RCC comparados con los pacientes con muestras que tenían $<10\%$ expresión (coeficiente de riesgo 2,91; IC95% 1,39 - 6,13; $p=0,005$; Fig. 2A). En análisis multifactoriales, los pacientes con muestras que tenían $\geq 10\%$ expresión de hB7-H1 en el tumor fueron significativamente más propensos a morir de RCC, incluso después de ajustar para estado del tumor primario, metástasis distantes o tamaño del tumor primario.

Tabla 3. Asociaciones de expresión de hB7-H1 con muerte por RCC en 196 muestras de RCC de células claras

Expresión de hB7-H1 en el tumor $\geq 10\%$	Coeficiente de riesgo (IC95%)*	Valor de p
Modelo monofactorial	2,91 (1,39 - 6,13)	0,005
Ajustado para:		
2002 Estadio del tumor primario (T)	2,83 (1,34 - 5,96)	0,006
Ganglio linfático regional	1,97 (0,87 - 4,45)	0,103
Compromiso (N)		
Metástasis distantes (M)	2,24 (1,06 - 4,73)	0,035
Tamaño del tumor primario	2,88 (1,37 - 6,06)	0,005
Grado nuclear	1,96 (0,90 - 4,30)	0,092
Necrosis histológica tumoral	1,69 (0,78 - 3,65)	0,183
Expresión de hB7-H1 en leucocitos ≥ 100		
Modelo monofactorial	3,58 (1,74 - 7,37)	$<0,001$
Ajustado para:		
2002 Estadio del tumor primario (T)	3,34 (1,62 - 6,90)	0,001
Ganglio linfático regional	3,59 (1,74 - 7,41)	$<0,001$
Compromiso (N)		
Metástasis distantes (M)	2,16 (1,03 - 4,53)	0,042
Tamaño del tumor primario	2,64 (1,27 - 5,46)	0,009
Grado nuclear	3,03 (1,46 - 6,29)	0,003
Necrosis histológica tumoral	2,87 (1,39 - 5,95)	0,004
Alta expresión de hB7-H1 intratumoral general		
Modelo monofactorial	4,53 (1,94 - 10,56)	$<0,001$
Ajustado para:		
2002 Estadio del tumor primario (T)	4,07 (1,74 - 9,51)	0,001
Ganglio linfático regional	3,36 (1,39 - 8,16)	0,007
Compromiso (N)		
Metástasis distantes (M)	3,12 (1,32 - 7,38)	0,009
Tamaño del tumor primario	4,25 (1,82 - 9,91)	$<0,001$
Grado nuclear	3,09 (1,28 - 7,50)	0,012
Necrosis histológica tumoral	2,68 (1,12 - 6,42)	0,027

*Los coeficientes de riesgo representan el riesgo de muerte por RCC de células claras para la característica mencionada, o bien con una sola variable o después del ajuste multifactorial. Por ejemplo, los pacientes con muestras que tenían $\geq 10\%$ expresión de hB7-H1 en el tumor fueron 2,9 veces más propensos a morir de RCC en comparación con los pacientes con muestras que tenían $<10\%$ de expresión de hB7-H1 en el tumor, incluso después de ajustar para el tamaño del tumor primario ($p=0,005$).

10 Las puntuaciones ajustadas para la expresión de hB7-H1 en leucocitos se resumen en la Tabla 2. Hubo 40 (20,4%) muestras con una puntuación ajustada de hB7-H1 de leucocitos de 100 o más (esencialmente infiltración de leucocitos

moderada o marcada con por lo menos 50% de la tinción de los leucocitos positiva para hB7-H1), que pareció ser un valor de corte razonable para examinar e ilustrar la asociación de esta característica con el desenlace de los pacientes. Las asociaciones de la expresión de hB7-H1 en leucocitos con muerte por RCC se resumen en la Tabla 3. Con una sola variable, los pacientes con muestras que tenían una puntuación ajustada de hB7-H1 en leucocitos ≥ 100 fueron 3,6 veces más propensos a morir de RCC en comparación con los pacientes que tenían muestras con puntuaciones <100 (coeficiente de riesgo 3,58; IC95% 1,74 - 7,37; $p<0,001$; Fig. 2B). Los pacientes con muestras que demostraron altos niveles de expresión de hB7-H1 en leucocitos eran significativamente más propensos a morir de RCC incluso después de ajustar para estadio TNM, tamaño del tumor primario, grado nuclear o necrosis histológica tumoral.

Dado que la expresión de hB7-H1 en el tumor y en los leucocitos estuvo significativamente asociada con el resultado de los pacientes de una sola variable y después del ajuste multifactorial, se evaluó la combinación de estas dos características. Hubo 87 (44,4%) muestras que tuvieron o bien $\geq 10\%$ expresión de hB7-H1 en el tumor o una puntuación ajustada para expresión de hB7-H1 en leucocitos ≥ 100 (es decir, alta expresión de hB7-H1 intratumoral general). Veintiséis (13,3%) de estas muestras tuvieron ambas características. A la inversa, 109 (55,6%) muestras tuvieron $<10\%$ expresión de hB7-H1 en el tumor y <100 expresión de hB7-H1 en leucocitos (es decir, baja expresión de hB7-H1 intratumoral general). Las asociaciones de esta característica combinada con muerte por RCC se resumen en la Tabla 3. Con una sola variable, los pacientes con muestras que tuvieron expresión de hB7-H1 intratumoral general fueron 4,5 veces más propensos a morir de RCC en comparación con los pacientes con muestras que tenían $<10\%$ expresión en el tumor y <100 expresión en leucocitos (coeficiente de riesgo 4,53; IC95% 1,94 - 10,56; $p<0,001$). Después de ajustar la puntuación SSIGN de la Clínica Mayo, los pacientes con alta expresión de hB7-H1 intratumoral general siguieron teniendo el doble de probabilidad de morir por RCC comparados con los pacientes con baja expresión de hB7-H1 intratumoral general, aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística (coeficiente de riesgo 2,19; IC95% 0,91-5,24; $p=0,079$). No obstante, los pacientes con muestras que tuvieron alta expresión de hB7-H1 intratumoral general fueron significativamente más propensos a morir de RCC después de ajustar para estadio de TNM, tamaño del tumor primario, grado nuclear y necrosis histológica tumoral, una característica por vez. Se investigó la asociación de la expresión de hB7-H1 combinada en leucocitos y tumores con las características patológicas bajo estudio. Los altos niveles de expresión de hB7-H1 intratumoral general estuvieron significativamente asociados con compromiso de los ganglios linfáticos regionales, metástasis distantes, grado nuclear avanzado y presencia de necrosis histológica tumoral (Tabla 4).

Tabla 4. Asociaciones de expresión de hB7-H1 en tumores y leucocitos con características patológicas en 196 muestras de RCC de células claras

Característica	Alta expresión de hB7-H1 intratumoral general		Valor de p
	No N=109	Sí N=87	
	N (%)		
2002 Estadio del tumor primario			
pT1 y pT2	88 (80,7)	62 (71,3)	0,120
pT3 y pT4	21 (19,3)	25 (28,7)	
Compromiso de ganglios linfáticos regionales			
pNx y pN0	108 (99,1)	76 (87,4)	$<0,001$
pN1 y pN2	1 (0,9)	11 (12,6)	
Metástasis distantes			
pM0	99 (90,8)	69 (79,3)	0,022
pM1	10 (9,2)	18 (20,7)	
Tamaño del tumor primario			
<5 cm	46 (42,2)	25 (28,7)	0,051
≥ 5 cm	63 (57,8)	62 (71,3)	
Grado nuclear			
1 y 2	69 (63,3)	23 (26,4)	$<0,001$
3	36 (33,0)	50 (57,5)	
4	4 (3,7)	14 (16,1)	
Necrosis histológica del tumor			
Ausente	94 (86,2)	55 (63,2)	$<0,001$

Característica	Alta expresión de hB7-H1 intratumoral general		Valor de p
	No	Sí	
	N=109	N=87	
	N (%)		
Presente	15 (13,8)	32 (36,8)	

REIVINDICACIONES

1. Un agente para su uso en un método de tratamiento del cáncer, comprendiendo el método:
 - (a) identificar a un sujeto con cáncer, en donde algunas o todas las células del cáncer o algunos o todos los linfocitos infiltrantes del tumor del cáncer expresan B7-H1; y
 - 5 (b) administrar al sujeto el agente que interfiere con la interacción entre B7-H1 y un receptor para B7-H1, en donde el agente comprende un anticuerpo, o un fragmento del mismo, que se une a PD-1, en donde el cáncer es carcinoma de células renales, y en donde el sujeto es un ser humano.
2. Un agente para su uso en un método de tratamiento del cáncer, comprendiendo el método:
 - 10 (a) identificar a un sujeto con cáncer, en donde algunas o todas las células del cáncer o algunos o todos los linfocitos infiltrantes del tumor del cáncer expresan B7-H1; y
 - (b) administrar al sujeto el agente que interfiere con la interacción entre B7-H1 y un receptor para B7-H1, en donde el agente comprende un anticuerpo, o un fragmento del mismo, que se une a B7-H1, en donde el cáncer es carcinoma de células renales, y
 - 15 en donde el sujeto es un ser humano.

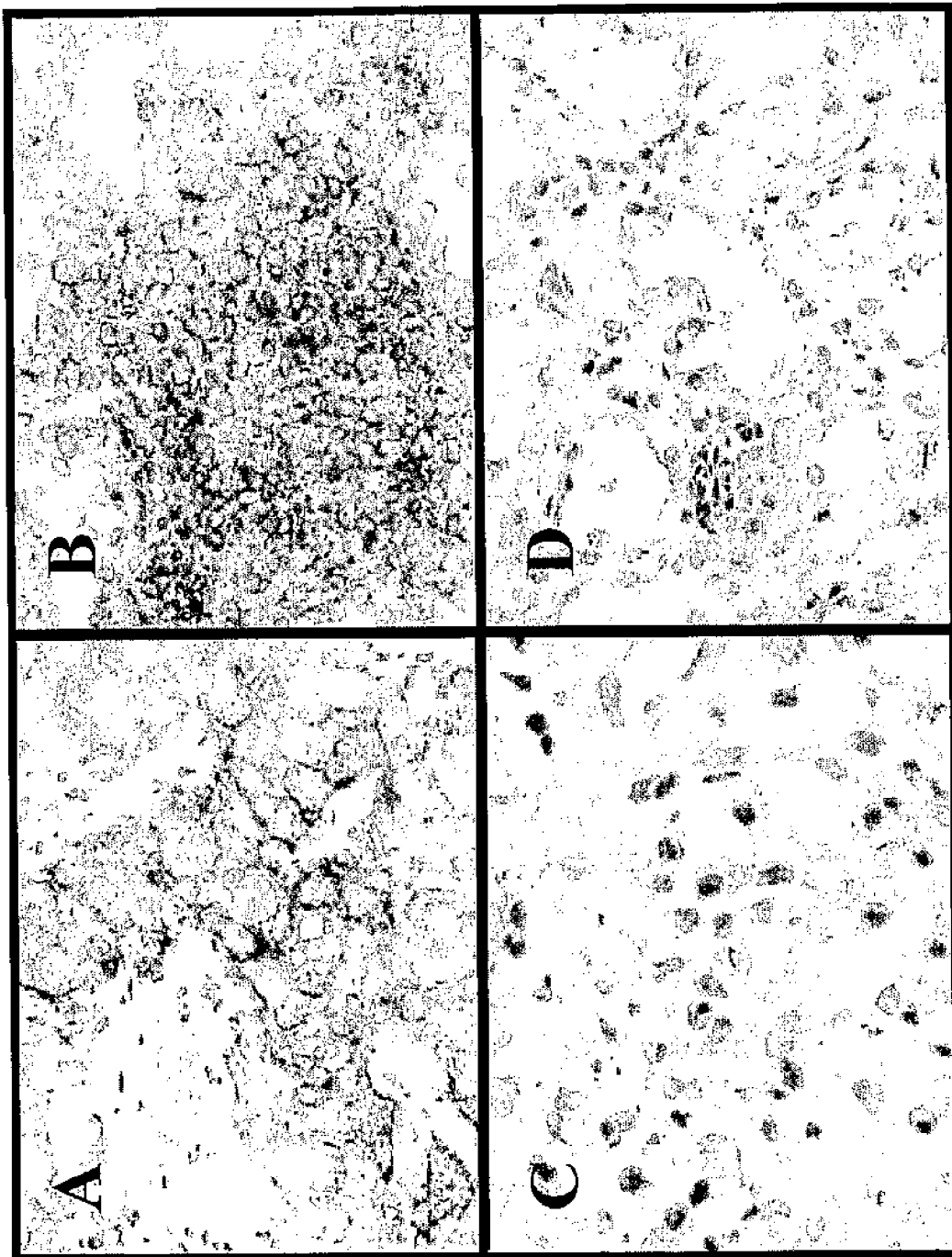


FIG. 1

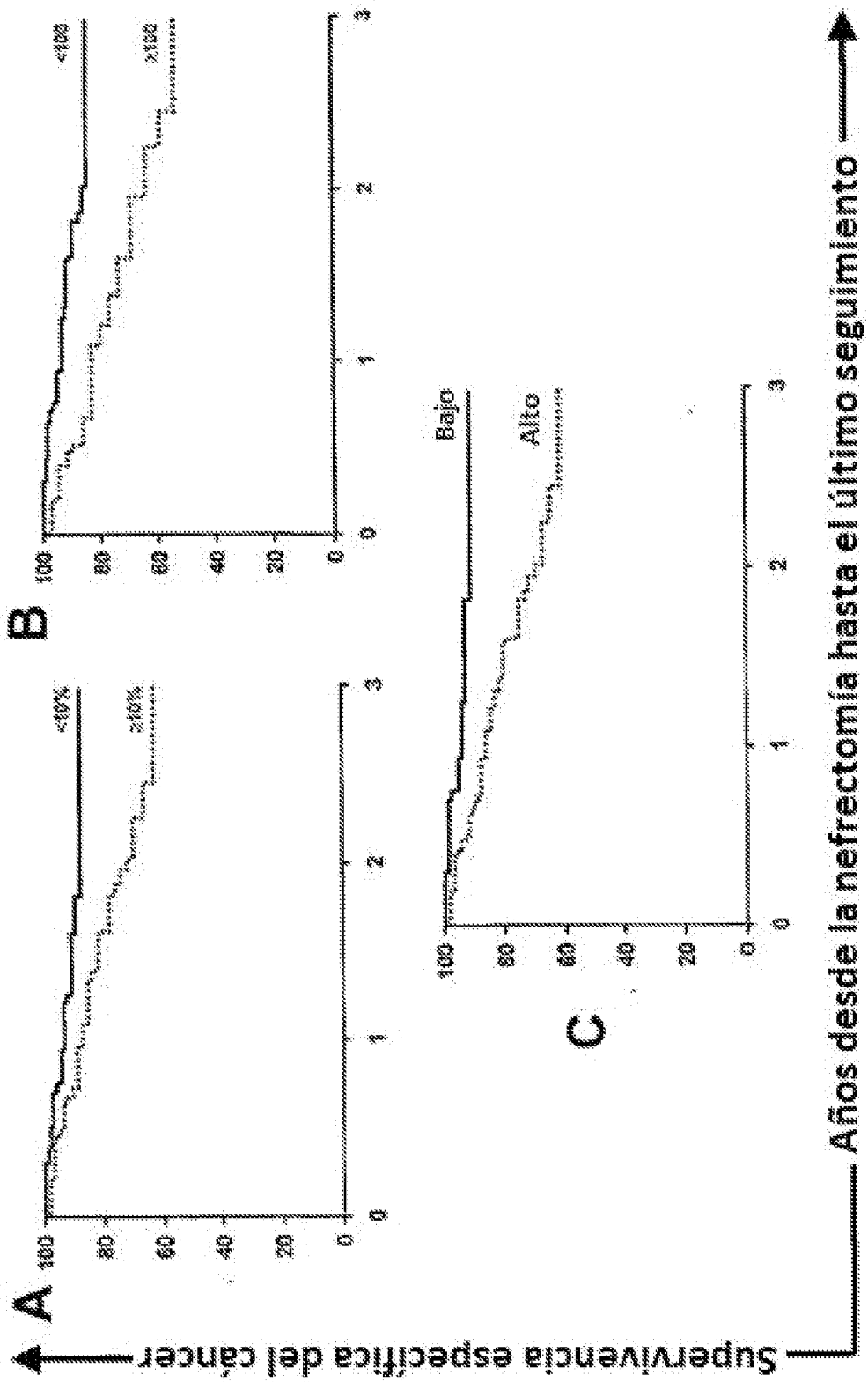


FIG. 2

FIG. 3

MRIFAVFIFMTYWHELLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIV
YWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQD
AGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVD PVTSEHELTCQAEGYPK
AEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEE
NHTAELVIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGI
QDTNSKKQSDTHLEET

FIG. 4

ATGAGGATATTTGCTGTCTTTATATTCATGACCTACTGGCATTGCTGAACGC
ATTTACTGTACGGTTCCCAAGGACCTATATGTGGTAGAGTATGGTAGCAATA
TGACAATTGAATGCAAATTTCCAGTAGAAAAACAATTAGACCTGGCTGCACT
AATTGTCTATTGGGAAATGGAGGATAAGAACATTATTCAATTTGTGCATGGA
GAGGAAGACCTGAAGGTTTCAGCATAGTAGCTACAGACAGAGGGCCCGGCTG
TTGAAGGACCAGCTCTCCCTGGGAAATGCTGCACTTCAGATCACAGATGTGA
AATTGCAGGATGCAGGGGTGTACCGCTGCATGATCAGCTATGGTGGTGCCGA
CTACAAGCGAATTACTGTGAAAGTCAATGCCCCATACAACAAAATCAACCAA
AGAATTTTGGTTGTGGATCCAGTCACCTCTGAACATGAACTGACATGTCAGGC
TGAGGGCTACCCCAAGGCCGAAGTCATCTGGACAAGCAGTGACCATCAAGTC
CTGAGTGGTAAGACCACCACCACCAATTCCAAGAGAGAGGAGAAGCTTTTCA
ATGTGACCAGCACACTGAGAATCAACACAACAATAATGAGATTTTCTACTG
CACTTTTAGGAGATTAGATCCTGAGGAAAACCATACAGCTGAATTGGTCATC
CCAGAACTACCTCTGGCACATCCTCCAAATGAAAGGACTCACTTGGTAATTCT
GGGAGCCATCTTATTATGCCTTGGTGTAGCACTGACATTCATCTTCCGTTTAA
GAAAAGGGAGAATGATGGATGTGAAAAAATGTGGCATCCAAGATACAACT
CAAAGAAGCAAAGTGATACACATTTGGAGGAGACG

FIG. 5

MRIFAGIIFTACCHLLRAFTITAPKDLVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVV.
 YWEKEDEQVIQFVAGEEDLKPQHHSNFRGRASLPKDQLKGNAAALQITDVKLQDA
 GUYCCIIISYGGADYKRITLKVNPYRKINQRISVDPATSEHELICQAEGYPEAEVI
 WTNSDHQPVSGKRSVTTSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPGQN
 HTAELIPELPATHPPQNRTHWVLLGSILLFLIVVSTVLLFLRKQVRMLDVEKCGV
 EDTSSKNRNDTQFEET

FIG. 6

ATGAGGATATTTGCTGGCATTATATTCACAGCCTGCTGTCACTTGCTACGGGC
 GTTACTATCACGGCTCCAAAGGACTTGTACGTGGTGGAGTATGGCAGCAAC
 GTCACGATGGAGTGCAGATTCCCTGTAGAACGGGAGCTGGACCTGCTTGCGT
 TAGTGGTGTACTGGGAAAAGGAAGATGAGCAAGTGATTTCAGTTTGTGGCAGG
 AGAGGAGGACCTTAAGCCTCAGCACAGCAACTTCAGGGGGAGAGCCTCGCT
 GCCAAAGGACCAGCTTTTGAAGGGAAATGCTGCCCTTCAGATCACAGACGTC
 AAGCTGCAGGACGCAGGCGTTTACTGCTGCATAATCAGCTACGGTGGTGCGG
 ACTACAAGCGAATCACGCTGAAAGTCAATGCCCCATACCGCAAAATCAACCA
 GAGAATTTCCGTGGATCCAGCCACTTCTGAGCATGAACTAATATGTCAGGCC
 GAGGGTTATCCAGAAGCTGAGGTAATCTGGACAAACAGTGACCACCAACCCG
 TGAGTGGGAAGAGAAGTGTCACCACTTCCCGGACAGAGGGGGATGCTTCTCAA
 TGTGACCAGCAGTCTGAGGGTCAACGCCACAGCGAATGATGTTTTCTACTGT
 ACGTTTTGGAGATCACAGCCAGGGCAAAACACACAGCGGAGCTGATCATCC
 CAGAACTGCCTGCAACACATCCTCCACAGAACAGGACTCACTGGGTGCTTCT
 GGGATCCATCCTGTTGTTCCCTCATTGTAGTGTCCACGGTCCTCCTCTTCTTGAG
 AAAACAAGTGAGAATGCTAGATGTGGAGAAATGTGGCGTTGAAGATACAAG
 CTCAAAAAACCGAAATGATACACAATTTCGAGGAGACG