



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 285 157**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 14/025 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03745713 .2**

86 Fecha de presentación : **04.04.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1490407**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.2004**

54

Título: **Inducción de inmunidad antitumoral CTL a través del desencadenamiento *en vivo* de 4-1 BB y/o CD 40.**

30

Prioridad: **04.04.2002 US 115620**

73

Titular/es: **Academisch Ziekenhuis Leiden h.o.d.n.
Leids Universitair Medisch Centrum
Albinusdreef 2
2333 ZA Leiden, NL**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

72

Inventor/es: **Diehl, Linda;
Van Mierlo, Geertje;
Melief, Cornelis, J., M.;
Toes, Rene y
Offringa, Rienk**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 285 157 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

Inducción de inmunidad antitumoral CTL a través del desencadenamiento *en vivo* de 4-1 BB y/o CD 40.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con métodos y mezclas para tratar tumores ó enfermedades infecciosas, donde la mezcla incluye un anticuerpo agonístico anti CD-40 ó un fragmento del mismo. Además las mezclas pueden incluir secuencias de polipéptidos ó de ácido nucleico, que tienen ó codifican un epítotope de célula T clase I MHC ó clase II restringido por MHC.

Fundamento de la invención

Muchos tumores escapan a la vigilancia de nuestro sistema inmune. En los pacientes con cáncer, hay claramente un defecto cualitativo y/ó cuantitativo, en los mecanismos específicos del sistema inmune para eliminar células de tumor. Uno de éstos mecanismos es suministrado por las células citotóxicas T (CTL), que pueden reconocer y matar células infectadas por virus ó transformadas en células de cáncer. Previamente se había postulado que las células dendríticas (CD) estimulan las células ayudadoras T las cuales, a su vez, suministran ayuda para la activación de CTL. Los presentes inventores han demostrado que la célula ayudadora T no está suministrando señales de ayuda directamente al CTL (mediante secreción de IL2), sino que, la célula ayudadora T está suministrando una señal a la CD que induce superficie celular ya no caracterizada y/o moléculas solubles que pueden activar CTL en ausencia de células ayudadoras T. La señal suministrada por la célula ayudadora T a la CD es mediada por la interacción de CD40L-CD40. Este novedoso hallazgo ha suministrado una oportunidad única para la inmunoterapia de cáncer.

El sistema inmune es capaz de matar células autólogas cuando ellas son infectadas por virus ó cuando ellas se transforman en células de cáncer. Un mecanismo tan potencialmente peligroso debe, claramente, estar bajo estricto control. Las CTL del sistema inmune circulan como precursores inactivos. Para ser activado, el precursor de célula asesina T debe reconocer su péptido antígeno específico, el cual se presenta como moléculas clase I MHC sobre APC profesional. Sin embargo, para preparar éstas células T, el APC también necesita presentar al antígeno en un contexto coestimulador apropiado como el suministrado por, entre otros, las moléculas superficiales coestimuladoras B7.1 y B7.2 y por la limpoquina IL-12.

Hasta hace poco se creía que para activar completamente la CTL se requería que una célula ayudadora T reconociera el mismo antígeno sobre el mismo APC. La célula ayudadora T específica suministraría citoquinas tal como las necesitara IL-2 para la activación del CTL. Sin embargo Guerder y Matzinger (J. Exp. Med. 176:553 (1992)) propusieron el modelo de "licenciamiento" para la activación del CTL. En éste modelo se sugería que cuando la célula ayudadora T reconociera su antígeno sobre una APC profesional, liberaría una señal de activación a la APC, que como resultado sería capaz de activar de modo subsecuente una CTL sin necesidad de que la célula ayudadora T estuviera presente. Sólo muy recientemente ha sido elucidado el mecanismo molecular del modelo de licenciamiento. Schoenberger *et al.* (Nature 393:480 (1998)) describieron el papel de la ruta CD40L-CD40 en el modelo de licenciamiento. La interacción entre la célula ayudadora T y CD a través del enlazamiento con CD40L-CD40 genera la activación de la CD, habilitando la CD de esa forma para preparar eficientemente la CTL no expuesta a tratamiento previo.

La CD circula a través de los tejidos de nuestro cuerpo, y puede de esta manera recolectar, procesar y presentar los antígenos. Después de la recolección del los antígenos, ellos migran a los nodos de drenaje de linfa donde ellos presentan los antígenos a las células T. Es bien sabido que, para desempeñarse de forma óptima, una CD necesita ser activada. Las CD en descanso expresa sólo niveles modestos de MHC y de moléculas coestimuladoras, y son pobres estimuladores de las células T. Las CD pueden ser activadas por citoquinas inflamatorias y productos bacterianos, los cuales generan sobrerregulación de MHC y de moléculas coestimuladoras. La activación de CD hasta una CD completamente madura, expresando niveles óptimos de moléculas MHC, moléculas coestimuladoras y linfoquinas tales como IL-12, requiere del desencadenamiento adicional de éstas células a través del receptor CD 40. Consecuentemente, la combinación de las citoquinas inflamatorias en el sitio de toma del antígeno y la interacción de CD 40L-CD 40, durante la interacción de la célula ayudadora T, generan una óptima capacidad para permitir a la CD que active la CTL.

Muchos tumores escapan a la vigilancia inmune de mecanismos específicos de CTL. Si la CD recoge antígeno de tumor bajo condiciones no inflamatorias, el número de células ayudadoras T que se activan puede ser demasiado bajo para inducir que suficientes CTL sean activadas para inducir una respuesta anti-tumor apropiada. Este concepto ha movido a los investigadores a ayudar al sistema inmune mediante la administración de citoquinas tales como IL-2 e IL-12 que estimulan directamente la actividad CTL, ó incrementando la presentación de antígeno mediante administración de células de tumor transfectadas con GM-CSF. Estas estrategias han hallado resultados variables aunque alentadores.

Es claro que aún existe una gran necesidad de hallar caminos que generen y/o incrementen las respuestas protectoras anti-tumor, que involucran inmunidad celular y humoral. Se halló que la ruta de activación CD40 es una ruta inmunoregulatoria importante para la generación de respuestas inmunes primarias celular y humoral. Como se describió arriba, la ruta CD40 sobre la CD es responsable por la inducción de respuestas CTL anti-tumor. Adicionalmente, la activación de la ruta CD40 sobre macrófagos estimula una fuerte actividad tumoricida.

El efecto cardinal del desencadenamiento CD40, bien sea por células Th CD40L⁺ ó por anti-CD40 Ab agonístico (en caso de que no esté disponible suficiente ayuda de células T) es la maduración de la CD, lo cual confiere a éstas células la capacidad de presentar antígeno en el contexto de las señales coestimuladoras requeridas para la preparación de la CTL no expuesta a tratamiento previo(5). La señal coestimuladora entregada por CD80 y CD86, que están
 5 ambas expresadas a altos niveles sobre CD maduras, al receptor CD28 sobre células T, ha sido investigado en forma muy extensa (revisado en (6:7)). Aunque esta señal juega un papel básico sobre la activación de células T, otras rutas coestimuladoras adicionales también contribuyen en este proceso. Una de éstas involucra el par receptor-ligando 4-1 BB/4-1 BBL. 4-1 BB es un miembro de la familia receptor-TNF (RTNF) y está expresado sobre células T CD8⁺ y CD4⁺ (8, 9). Su ligando natural, 4-1BBL, está expresado sobre células B, macrófagos y CD (10-12). Estudios *in vitro*
 10 han demostrado que la estimulación de células T, con 4-1BB Ab agonístico incrementó la proliferación inducida por TCR y la producción de citoquina por células T. Aunque tanto las células Th CD4⁺ y CTL CD8⁺ podrían ser coestimuladas de ésta forma, las células T CD8⁺ respondieron mejor que las células T CD4⁺ al desencadenamiento de 4-1BB (8, 13). De acuerdo con ello, se demostró que el bloqueo de la coestimulación *in vitro* de 4-1BB inhibe la activación de células T mediada por APC (14, 15), y ratones deficientes en 4-1BBL mostraron una capacidad reducida
 15 para elevar la inmunidad CTL contra infecciones virales (16, 18). De modo correspondiente, la administración de anti 4-1BB Ab agonístico en ratones mostró amplificar la generación de CTL en un modelo de murina para injerto versus enfermedad del anfitrión (13) y también generó rechazo de tumores pobremente inmunogénicos en ratones que tenían tumores (19).

20 Resumen de la invención

La invención se relaciona con moléculas enlazantes de CD40, que pueden ser usadas en una mezcla farmacéutica como tales ó en conjunto con péptidos activantes de CTL, incluyendo antígenos de tumores ó antígenos de agentes infecciosos. Dicha mezcla es útil para incrementar el efecto anti-tumor de una vacuna de péptido para tumor, ó para de
 25 otra forma activar las CTLs de modo que las CTLs activadas puedan actuar contra las células infectadas ó de tumor. Las moléculas enlazantes de CD40 pueden incluir moléculas de anticuerpo, así como homólogos, análogos y formas de las mismas derivadas ó modificadas, incluyendo fragmentos de inmunoglobulinas como Fab, (Fab')₂ y Fv, así como pequeñas moléculas incluyendo péptidos, oligonucleótidos, peptidomiméticos y compuestos orgánicos que se enlazan a CD40 y activan la respuesta de CTL. Los péptidos que activan CTL incluyen el péptido E1-A derivado de adenovirus,
 30 que tiene la secuencia SGPSNTPPEI (SEQ ID NO: 2), y el péptido HPV 16 E7 derivado de papilomavirus humano tipo 16, que tiene la secuencia RAHYNIVTF (SEQ ID NO: 3).

La molécula enlazantes de CD40 y el péptido activante de CTL pueden ser administrados a un paciente por medios adecuados, incluyendo inyección, ó pueden administrarse codificando el fragmento genético de tal péptido ó molécula,
 35 y de éste modo la molécula y péptido pueden producirse *in vivo* ó *ex vivo*. Tal terapia genética es conducida de acuerdo con métodos bien conocidos en el medio. Si la transfección ó infección del fragmento genético es hecha *ex vivo*, pueden administrarse al paciente las células infectadas ó transfectadas, ó estos pasos pueden ser hechos *in vivo* donde se producen la molécula y el péptido en forma endógena. Si es hecha *ex vivo*, la infección ó transfección pueden ser hechas mediante métodos convencionales, incluyendo electroporación, transfección con fosfato de calcio, microinyección
 40 ó incorporando el fragmento genético dentro de liposomas adecuados. Para incorporar el fragmento genético pueden usarse vectores incluyendo un retrovirus, adenovirus ó un vector de parvovirus, ó plásmidos, los cuales luego son expresados *in vivo* ó *ex vivo*.

Se demuestra aquí que la ayuda a la célula T para la preparación de la CTL es mediada a través de interacciones de CD40-Ligando CD40 (CD 40L) y que puede restaurarse la falta de preparación de la CTL en ausencia de células
 45 T CD4⁺, vía activación de la CD40 mediada por anticuerpo monoclonal (mAb), la que proviene de APC derivado de médula ósea, en presencia de péptido activadores de CTL incluyendo antígenos de tumor. Además, el bloqueo de CD40L expresado por células T CD4⁺ genera falla en la elevación de la inmunidad de CTL. Este defecto puede ser superado mediante desencadenamiento *in vivo* de CD40. La estimulación *in vivo* de CD40 puede incrementar marcadamente la eficacia de vacunas antitumor a base de péptidos, ó de otro modo activar CTLs para provocar una
 50 reacción de célula anti-tumor ó anti-infectada.

También se anota que un péptido activador de CTL puede volverse tolerogénico, significando que se inhibe la reacción del anfitrión contra las células que expresan tal péptido, en ausencia de anti-CD40. Sin embargo, tal péptido
 55 combinado con un anticuerpo activador anti-CD40 convierte la tolerancia en fuerte activación de CTL. Además, como se anotó arriba, el ligamiento a CD 40 puede suministrar una vacuna de péptido tumor-específica protectora que tiene la capacidad para inducir inmunidad terapéutica CTL en ratones que tienen tumor.

Estos hallazgos juntos muestran que el par CD40-Ligando CD40 actúa como un interruptor que determina si las
 60 CTL periféricas no expuestas a tratamiento previo son tolerados ó preparados. Por ello, los agentes enlazantes de CD40 tales como anticuerpos monoclonales y otros ligandos estimuladores pueden ser usados de modo efectivo en combinación con un péptido activador de CTL.

Adicionalmente, se demuestra aquí que el desencadenamiento de 4-1BB a través de por ejemplo, anticuerpos ago-
 65 nísticos anti- 4-1BB entrega una poderosa señal coestimuladora a CTL, señal que puede reemplazar de modo efectivo la necesidad de ayuda a la célula T CD4⁺ en la preparación cruzada de inmunidad antígeno-específica de CTL. 4-1BB puede convertir una vacuna de péptido que de otra forma sería tolerogénica, en una formulación capaz de preparar efectivamente CTL. La activación inicial de CTL no expuesta a tratamiento previo puede ocurrir en ausencia de

ES 2 285 157 T3

coestimulación de 4-1BB pero esta señal permite un incremento en la supervivencia de CTL estimulado por antígeno. El desencadenamiento de la inmunidad de CTL independiente de ayudador T mediante la coestimulación de 4-1BB requiere de una estimulación previa del TCR y coestimulación dependiente de CD-28. La señal de supervivencia mediada por 4-1BB es de este modo posicionada corriente abajo de la estimulación de TCR antígeno-específico y de la coestimulación dependiente de CD-28 de CTL no expuesta a tratamiento previo. Las moléculas enlazantes de 4-1BB, como tales ó en combinación con molécula enlazante de CD40 y/o péptidos activadores de CTL, pueden así ser usados en la preparación de medicamentos para la inducción, amplificación y persistencia de respuestas antígeno-específicas de CTL, por ejemplo en el incremento de la potencia de vacunas antitumor.

10 Breve descripción de las figuras

Figura 1

La preparación cruzada de CTLs específicas de E1B requiere de células ayudadoras T CD4⁺

15 Se probaron a diferentes relaciones efector/objetivo esplenocitos de ratones normales (a) ó B6 (b) reducidos en CD4 inmunizados con Ad5E1BALB/c MECs para lisis de células objetivo singeneicas MEC cargadas con el péptido E1B₁₉₂₋₂₀₀ (líneas sólidas) el cual se deriva de adenovirus humano y tiene la secuencia VNIRNCCYI (ID de SEC No: 1) ó un péptido de control HPV-16E7₄₉₋₅₇ restringido por D^d (líneas punteadas). Cada línea representa un ratón. Los datos mostrados representan un experimento, de tres desarrollados con resultados similares.

Figura 2

Activación de CD40 reemplaza células ayudadoras T CD4⁺

25 Se inmunizaron esplenocitos de ratón B6 reducidos en CD4 (a, b) ó a los que se removió el I-Ab (c,d) deficientes en clase II, con Ad5E1BALB/c MECs y fueron tratados bien fuera con el anticuerpo (Ab) FGK45 activador de CD40 (a, c) ó un isotipo de anticuerpo de control (b, d). Estos esplenocitos fueron probados para actividad CTL específica de E1B sobre células objetivo singeneicas MEC cargadas con el péptido E1B₁₉₂₋₂₀₀ (líneas sólidas) ó el péptido de control HPV-16E7₄₉₋₅₇ (líneas punteadas). Cada línea representa un ratón individual. La información representada es de dos experimentos independientes. Relación E/T, relación efector/objetivo.

Figura 3

35 *Las células B no son esenciales como APCs para preparación cruzada ó para restauración de preparación cruzada mediada por anti_CD40*

40 Se tomaron esplenocitos de ratones no tratados (a) ó ratones B6 MT (b, c) reducidos en CD4 deficientes en células B, los cuales fueron inmunizados con Ad5E1BALB/c MECs y los cuales recibieron bien fuera un isotipo de anticuerpo de control (b) ó el anticuerpo FGK45 activador de CD40 (c). Estos esplenocitos fueron probados para actividad CTL específica de E1B sobre células objetivo singeneicas MEC cargadas con el péptido E1B₁₉₂₋₂₀₀ (líneas sólidas) ó el péptido de control HPV E7₄₉₋₅₇ (líneas punteadas). Cada línea representa un ratón individual. La información mostrada representa un experimento de dos realizados con resultados similares.

45 Figura 4

El bloqueo de CD40L previene la preparación cruzada de CTLs específicas de E1B

50 Se tomaron esplenocitos de ratones B6 inmunizados con Ad5E1BALB/c MECs y se les trató con anticuerpo MR-1 bloqueador de CD40L (a), ó anticuerpo de control (b), ó de ratones tratados con el anticuerpo MR-1 bloqueador de CD40L en combinación con el anticuerpo FGK45 activador de CD40 (c) 24 horas después de la inmunización. Estos esplenocitos fueron probados para actividad CTL Específica de E1B sobre células objetivo singeneicas MEC cargadas con el péptido E1B₁₉₂₋₂₀₀ (líneas sólidas) ó el péptido de control HPV-16E7₄₉₋₅₇ (líneas punteadas). Cada línea representa un ratón individual. Los datos mostrados representan un experimento, de tres desarrollados con resultados similares. Relación E/T, relación efector/objetivo.

Figura 5

Los ratones inyectados s.c. con el péptido E1-A ya no son capaces de montar CTL específicas de E1-A

60 Se inyectaron s.c. dos veces ratones C57BL/6 (una semana de intervalo) con 20 µg de péptido E1-A (a, b) ó péptido de control (c, d) en IFA y se le realizó prueba de desafío i.p un día más tarde con SAMB7 (b, d) donde una línea de célula expresaba altas cantidades de péptido E1-A. Se probó la citotoxicidad específica a E1-A de cultivos en volumen derivados de estos ratones, sobre células objetivo pulsadas con péptido E1-A (-■-) ó el péptido HPV 16 E7 (-○-). Se muestra lisis específica de cultivos representativos en volumen a diferentes relaciones efector a objetivo (E/T). Este experimento ha sido repetido 4 veces con resultados comparables.

ES 2 285 157 T3

Figura 6

La aceptación de péptido E1-A es distribuida rápidamente en forma sistémica después de la inyección s.c. en IFA

5 Se usaron células de bazo derivadas de ratones no tratados C57BL/6 (-) ó inyectados 16 horas antes con 100 μ g de péptido E1-A ó HPV 16 E7 en IFA, como células estimuladoras para un clon CTL específico de E1-A. En diferentes concentraciones efector a estimulador se demostró incorporación de [³H]-timidina (cpm) \pm S.E.M., sin sustracción de conteos de la línea base. Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes.

10 Figura 7

La inducción de la tolerancia a CTL es revertida hasta preparación de CTL después del estímulo en vivo con CD 40

15 Se inyectaron ratones salvajes tipo C57BL/6 (a, b) y ratones H-2^bCD40 -/- (c, d) s.c. con 20 μ g de péptido de E1A en IFA solo (c), en combinación con un anticuerpo de control de rata IgG2A (a) ó en combinación con el anti-CD40 mAb FGK-45 (b, d). Sobre cultivos en volumen de estos ratones se probó la citotoxicidad específica de E1-A, sobre células objetivo pulsadas con el péptido E1-A (-■-), el péptido HPV16 E7 (-○-) ó células de tumor transformadas Ad5E1 (-◆-). Se muestra lisis específica de cultivos representativos en volumen a diferentes relaciones E/T. El experimento ha sido repetido 18 veces (ratones B6) y 2 veces (ratones CD40 -/-), respectivamente con resultados comparables. En (e) se muestra el porcentaje de lisis específica de 23 y 37, respectivamente, cultivos CTL de volumen derivados de ratones B6 inyectados con péptido E1-A en IFA solo (izquierda) ó en combinación con el anti-CD40 mAb (derecha) a una relación E/T de 60. Se muestran la media más la desviación estándar de cada grupo (E1-A versus E1-A+anti-CD40: p<0.01, prueba t de student).

25 Figura 8

Terapia de células transformadas HPV16 E6 y E7 por tratamiento de combinación de péptidos junto con estimulación CD40 en vivo

30 Se inyectaron ratones s.c. con 25.000 células singeneicas transformadas HPV16 (TC-1). Se dejaron sin tratar ratones C57BL/6 (-○-) ó después de 6 días recibieron 100 μ g de péptido HPV16 E7 i.p. en IFA (-□-), 100 μ g de péptido HPV16 E7- i.p. en IFA en combinación con el anti-CD40 mAb FGK-45 (-■-) ó un péptido de control i.p. en IFA en combinación con el anti-CD40 mAb FGK-45 (-●-). En (a) se representa el porcentaje de ratones que tenían tumor para diferentes grupos de tratamiento (n=10).

35

Las diferencias entre el grupo tratado con el péptido HPV16 más el anti-CD40 mAb y los otros tres grupos fueron estadísticamente significativas (p<0.01) (prueba de Log-Rank). En (b) se muestra el porcentaje de animales sobrevivientes (grupo tratado con péptido E7 vs grupo tratado con péptido E7 más anti-CD40: p = 0.002, prueba de Log-Rank).

40

Figura 9

El desencadenamiento en vivo a través de 4-1BB restaura la preparación de CTL específicas de Ad5 en ausencia de ayuda de células T

45

Se vacunaron ratones B6, bien fuera no reducidos (a) ó reducidos para células T CD4⁺ (b, c, d) con 10⁷ TAP k.o. Ad5E1MEC s.c., en combinación con dosis sistémicas de Ab control (b), anti-CD40 Ab (c) ó anti-4-1BB Ab (d). En un experimento separado, ratones normales B6 recibieron una dosis de 20 μ g de péptido de E1A en IFA, bien fuera en combinación con dosis sistémicas de Ab control (e), anti-CD40 (f) ó anti-4-1BB Ab (g). Se reestimularon *in vitro* por 6 días esplenocitos para ratones inmunizados y subsecuentemente se les probó su citotoxicidad antígeno-específica sobre células objetivo cargadas con el péptido E1B (paneles a-d) ó el péptido E1-A (paneles e-g) (■), el péptido HPV16 E7 (□) ó Ad5E1MEC (O gris). En cada uno de 3 experimentos separados se han observado en forma reproducible los efectos estimulatorios de 4-1BB Ab sobre la preparación de CTL específicas de Ad5 por células de tumor y el péptido de la vacuna.

55

Figura 10

La administración sistémica de anti-4-1BB Ab no induce activación en vivo de CD

60 a: Se inyectaron dos veces ratones B6 con 100 μ g de control Ab (histogramas gris claro), anti-CD40 Ab (gris oscuro, panel izquierdo) ó el anti-4-1BB Ab (gris oscuro, panel derecho). Tres días después se aislaron células de bazo y se marcaron con anti-CD 11c y anti-CD86. Se representan los niveles de expresión CD86 sobre células CD11c+ en el bazo. b: Se aisló médula ósea B6 y se le cultivó *in vitro* por 7 días en medio que contenía GM-CSF. El día 7 se activaron las células por adición de 10 μ g/ml Poli I:C ó se las dejó sin tratar. 48 horas después se analizó la expresión 4-1BB de las células (línea negra) ó se las marcó con control Ab (relleno gris claro). Se confirmó la activación de BMDC tratadas con Poli I:C midiendo la expresión CD86 (no mostrada).

65

ES 2 285 157 T3

Figura 11

La coestimulación a través de 4-1BB es antígeno dependiente y genera un incremento en la supervivencia de células T antígeno específicas

- 5 a: Se inyectaron ratones B6 con 5×10^6 células T CD8⁺ transgénicas TCR específicas de Ad5E1A que estaban etiquetadas con CFSE *in vitro*. Tres días después estos ratones recibieron una combinación de vacuna de péptido de E1A y Ab como se indica en la figura. La vacunación con péptido involucró una dosis simple s.c. de 20 μ g en IFA, mientras que se administraron dosis de 100 μ g de Ab i.p. sobre tres días consecutivos luego de la vacunación con péptido. El día 3 después de la inyección del péptido, se aislaron células del bazo y se analizaron por FACS buscando la presencia de células T CD8⁺/CFSE⁺. El histograma muestra la intensidad de CFSE de células T CD8⁺.
- 10 b: Se inyectaron ratones B6 Thy 1.1 con 5×10^6 células T CD8⁺ transgénicas TCR específicas de péptido E1-A, de origen B6 Thy 1.2. Tres días después estos ratones recibieron una combinación de vacuna de péptido E1-A y Ab, como se indica en la figura (dosis y tiempos, como arriba). 11 días luego de la inyección de la vacuna de péptido, se tomaron muestras de sangre y se las analizó mediante FACS buscando la presencia de células T CD8⁺/Thy1.2⁺ (de origen transgénico TCR específico de péptido E1-A).
- 15

Figura 12

- 20 *Se sobrerregula 4-1BBL sobre CD activadas. Se aisló médula ósea de B6 y se cultivó *in vitro* en medio que contenía GM-CSF por 7 días*

El día 7, se dejaron sin tratar células (a) ó activadas con 10 μ g/ml de Poli I:C (b) ó con 2 μ g/ml de murina fragmentador de CD40L (c). Luego de 48 horas, se tiñeron las células buscando CD11c en combinación con, bien fuera control Ab (líneas negras) ó anti -4-1BBL Ab (líneas llenas grises). Los histogramas muestran la población de células CD11c⁺.

25

Figura 13

- 30 *Tanto CD28 como 4-1BB contribuyen a la preparación cruzada de CTL específica de tumor*

Se dejaron ratones B6 sin tratar ó fueron inmunizados s.c. con 10^7 células de tumor transformadas con Ad5E1, en combinación con bloqueo anti-4-1BBL Ab, control de isotipo Ab y/ó CTLA4-Ig, como se indica en la figura. 10 días después de la inmunización se aislaron células de bazo y se las reestimuló *in vitro* ó 6 días. Se analizaron cultivos en volumen buscando la presencia de CTL antígeno específico mediante doble marcado con antígeno anti-CD8 y un anti-INF γ Ab después de una estimulación toda la noche con 1 μ g/ml del epítipo CTL codificado con E1B. Los datos mostrados son un promedio de los resultados de tres experimentos independientes. Las barras de error muestran valores S.E.M.

35

40 Figura 14

La coestimulación a través de señalización con CD28 es un prerequisite para la eficacia del tratamiento anti-4-1BB Ab

- 45 Se vacunaron ratones B6, bien fuera reducidos (b, d) ó no (a) en células CD4⁺, con s.c. 10^7 Ad5E1MEC en combinación con control Ab (b), anti-4-1BB Ab (c), ó anti-4-1 BB Ab en combinación con CTLA4-Ig (d). 10 días después de la vacunación se colectaron esplenocitos y se reestimularon *in vitro* por 7 días. Se probó la citotoxicidad específica de E1B en cultivos de volumen sobre células objetivo cargadas con el péptido E1B (■), el péptido HPV16 E7 (□) ó células de tumor transformadas con Ad5E1 (gris O) (e). Se muestra la lisis promedio de estos cultivos de volumen sobre células cargadas con péptido E1B, a una relación efector/objetivo de 60:1. Las barras de error representan valores S.E.M. de 6 ratones sobre dos experimentos independientes.
- 50

Figura 15

- 55 *La coestimulación CD28 facilita la inducción de expresión de 4-1BB sobre células T desencadenadas con TCR*

Se cultivaron células de bazo B6 en presencia de las cantidades indicadas de anti-CD3 Ab ligado a placa y/o anti-CD 28 Ab ligado a placa (5 μ g/ml). Después de 24 horas, las células T CD8⁺ fueron analizadas, buscando la expresión de 4-1BB.

60

Figura 16

*La señalización con 4-1BB sinergiza con la señalización con CD40, en la inducción *in vivo* de CTL específicas de E1A*

- 65 Se vacunaron ratones C57BL/6 con péptido E1-A s.c. con 100 microgramos de anti-CD40 Ab FGK-45, anti-4-1BB Ab 3H3, ó una combinación de ambos i.p. en PBS. Diez días después se aislaron células de bazo y se las analizó buscando la presencia de CTL específicas de E-1A mediante marcado con tetrámeros CD8-APC y D^b-E1A.

ES 2 285 157 T3

Se describen los números absolutos de células T CD8⁺ en el bazo (panel superior) y el porcentaje de CTL específicas de E1-A dentro de la población CD8⁺ (panel inferior).

Figura 17

5

El enlazamiento en vivo de CD40 conduce a la eliminación de tumores establecidos

Se inyectaron ratones con células de tumor que expresaban Ad5E1A. En el momento en que los ratones habían desarrollado tumores palpables, fueron dejados sin tratar (círculos cerrados) ó fueron inyectados i.v. con un anticuerpo activador de CD40 (círculos abiertos). Cuando el tamaño del tumor superó 1 cm³, se sacrificaron los ratones para evitar un sufrimiento innecesario.

Figura 18

15 *La activación in vivo de CD40 conduce a la dispersión sistémica de CTL específicas de tumor*

Los ratones fueron inyectados con células de tumor que expresaban Ad5E1A. En el momento en que los ratones habían desarrollado tumores palpables, ellos fueron dejados sin tratar ó fueron tratados con anti-CD40 mAb. Diez días después de la inyección con anti-CD40 mAb, se sacrificaron los ratones y se ejecutó análisis de FACS sobre sangre, bazo y nodos de linfa. En aproximadamente el 30% (n=23) de los ratones no tratados se detectaron CTL específicas de E1-A solo en los nodos de tumor que drenaban linfa (A) mientras que no se observaron CTL específicas de E1-A en los otros animales de éste grupo (no está mostrado). En contraste, se detectaron fácilmente CTL específicas de E1-A en ratones que tenían tumor tratados con anti-CD40 mAb (n=29; B). Se muestra el número de células T CD8⁺ específicas de E1-A como porcentaje del total de células T CD8⁺ en sangre (media + SEM). De cuatro experimentos realizados, se muestra uno representativo. *Prueba t de Student $p < 0,01$.

Figura 19

La presencia del epítipo de CTL derivado de E1-A es detectada solo en el nodo del tumor que drena linfa

30

Se inyectaron 4×10^6 células T transgénicas específicas de E1-A marcadas con CFSE i.v. en ratones que tenían un tumor que expresaba Ad5E1A. Siete días más tarde se tomaron el bazo, nodo de tumor que drenaba linfa y un nodo que no drenaba linfa y se les analizó mediante FACS buscando CTL específicas de E1-A. Se muestran los resultados obtenidos para el nodo de tumor que drenaba linfa (área negra) y el bazo (línea gris) y es representativo de 12 ratones. Los resultados fueron comparables para ratones tratados con anti-CD40 y para los no tratados.

Figura 20

El desencadenamiento en vivo de CD40 conduce a la infiltración de tumor por CTL específicas de Ad5E1A

40

Se inyectaron ratones con células de tumor que expresaban Ad5E1A. En el momento en que se desarrollaron tumores palpables, los ratones fueron dejados sin tratar ó fueron tratados i.v. con el anticuerpo activador de CD40. Cinco días después se sacrificaron los ratones y se determinó la infiltración en el tumor de CTL específicas de E1-A mediante análisis de FACS. Los números en la esquina derecha superior representan el porcentaje de células TM positivas del total de células CD8⁺.

Figura 21

La activación local de CD40 causa inmunidad antitumor sistémica

50

Se inyectaron en ambos flancos ratones con células de tumor que expresaban Ad5E1A. En el momento en que se habían desarrollado tumores palpables en ambos flancos, se suministró intratumoral en uno de los tumores antiCD40 ó PBS como control. A) Diez días después del tratamiento se tomaron muestras de sangre y se analizaron por FACS para determinar la presencia de CTL específicas de Ad5E1A. Los resultados representan el número de células T CD8⁺ específicas de E1-A, como un porcentaje del total de CD8. (media + SEM, n=7). *Prueba t de Student $p < 0,05$, **Prueba t de Student $p > 0,01$; sin diferencias significativas entre tratamiento intratumoral y tratamiento anti-CD40. B) Porcentaje de ratones que tenían un tumor en el flanco tratado $p < 0,01$. C) Porcentaje de ratones que tenían un tumor en el flanco no tratado $p = 0,05$.

Figura 22

Las células T CD8⁺ pero no las células T CD4⁺ son cruciales para la erradicación del tumor después de la ligación en vivo con CD40

65

Se inyectaron ratones con células de tumor que expresaban Ad5E1A. En el momento en que se desarrollaron tumores palpables, se inició el tratamiento. Los ratones no recibieron ningún tratamiento, recibieron tratamiento anti-CD40 mAb, ó una combinación de anti-CD40 mAb con un reductor de CD8- ó CD4-Ab. Cuando el tamaño del tumor superó 1 cm³, se sacrificaron los ratones para evitar un sufrimiento innecesario.

Figura 23

Los tumores que expresan Ad5E1A no expresan CD40

- 5 Se efectuó análisis FACS sobre células marcadas con anticuerpo anti-CD40 marcado en PE (línea negra) ó anticuerpo de control de isotipo (área gris). Se usaron células dendríticas activadas con LPS como control positivo (línea punteada).

Descripción detallada

- 10 Pueden hacerse las moléculas enlazantes de CD40 de la invención por técnicas convencionales de producción y tamizaje. En *Nature* 393: 474-77 (1998) se describen un anticuerpo monoclonal de rata y uno de hamster CD40 anti-ratón ("Mabs") y están comercialmente disponibles (Pharmigen Inc. CA). El CD40 anti-ratón Mab, designado FGK45, el cual es usado en los experimentos descritos abajo, es descrito por Rolink. A. *et al.*, *Immunity* 5, 319-330 (1996).
- 15 Anticuerpos agonísticos anti-4-1 BB son descritos en Hurtado *et al.* (1997) y Shuford *et al.* (1997). Los CD40 MAbs anti-humano pueden ser hechos siguiendo técnicas bien conocidas en el medio y descritas por Köhler y C. Milstein (*Nature*, 1975: 256: 495-497). Pueden elevarse los MAbs inmunizando roedores (por ejemplo ratones, ratas, hamsters y cobayos), con bien sea CD40 nativo como está expresado en células ó purificado de plasma humano u orina, ó CD40 recombinante ó sus fragmentos, expresados en un sistema procariótico ó eucariótico. Para la inmunización
- 20 pueden usarse otros animales (por ejemplo primates no humanos, ratones transgénicos que expresan inmunoglobulinas humanas y ratones inmunodeficientes severos combinados (IDSC) transplantados con linfocitos humanos B. Los hibridomas pueden ser generados por procedimientos convencionales fusionando linfocitos B de animales inmunizados, con células de mieloma (por ejemplo Sp2/0 y NS0) como fue descrito por G. Köhler y C. Milstein *Id.* Adicionalmente, pueden generarse los MAbs anti-CD40 mediante el tamizaje de Fv de cadena simple recombinante ó bibliotecas Fab de linfocitos humanos B en sistemas de exposición de fagos. Puede probarse la especificidad de los MAbs al CD40 mediante ensayo inmunosorbente de enzima enlazada (ELISA), inmunomanchado occidental u otras técnicas inmunológicas. Puede hacerse seguimiento a la actividad activante de los anticuerpos sobre las CTLs, en combinación con un péptido activante de CTL empleando las técnicas descritas en los Ejemplos abajo.

- 30 Para el tratamiento de humanos, deberían usarse preferiblemente los Mabs anti-CD40 como anticuerpos humanos ó humanizados quiméricos, Desinmunizados. Tales anticuerpos pueden reducir la inmunogenicidad y así evitar la respuesta del anticuerpo humano anti-ratón (HAMA). Es preferible que el anticuerpo sea IgG4, IgG2 u otro IgG ó IgM genéticamente mutado que no aumente la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (S.M. Canfield y S.L. Morrison, *J. Exp.Med.*, 1991: 173: 1483-1491) y complemente la citólisis mediada (Y.Xu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1994: 69: 3468-3474; V.L. Pulito *et al.*, *J. Immunol.*, 1996; 156: 2840-2850).

- Los anticuerpos quiméricos son producidos por procesos recombinantes bien conocidos en el medio y tienen una región animal variable y una región humana constante. Los anticuerpo humanizados tienen un mayor grado de secuencias peptídicas humanas que los anticuerpos quiméricos. En un anticuerpo humanizado, solo la complementariedad que determina las regiones (CDRs) que son responsables por el enlazamiento y especificidad del antígeno, son derivados de animales y tienen una secuencia de aminoácidos que corresponde al anticuerpo animal, y sustancialmente todas las porciones restantes de la molécula (excepto, en algunos casos, pequeñas porciones de las regiones marco dentro de la región variable) son derivadas de humanos y corresponden en secuencia de aminoácidos a un anticuerpo humano. Ver L. Riechmann *et al.*, *Nature*, 1988; 332: 323-327; G. Winter, *Patente de Estados Unidos* No. 5.225.539; C. Queen *et al.*, patente número U.S. 5.530.101.

- Los anticuerpos desinmunizados son anticuerpos en los cuales se han eliminado los epítopes de las células T y B, como está descrito en la Aplicación de Patente Internacional PCT/GB98/01473. cuando ellos son aplicados *in vivo*, tienen inmunogenicidad reducida.

- 50 Los anticuerpos humanos pueden ser hechos por varias diferentes vías, incluyendo el uso de bibliotecas de expresión de inmunoglobulina humana (Stratagene Corp., La Jolla, California) para producir fragmentos de anticuerpos humanos (VH, VL, Fv, Fd, Fab, ó (Fab')₂) y usando estos fragmentos para construir anticuerpos totalmente humanos usando técnicas similares a aquellas usadas para producir anticuerpos quiméricos. Los anticuerpo humanos también pueden ser producidos en ratones transgénicos con un genoma de inmunoglobulina humana. Tales ratones están disponibles en Abgenix, Inc., Fremont, California, y Medarex, Inc., Annandale, New Jersey.

- Uno puede también crear moléculas de enlazamiento a cadenas de péptido simple, en las cuales se conectan las regiones Fv de cadena liviana y pesada. En la patente U.S. No. 4.946. 778 se describen los anticuerpos de cadena simple ("ScFv") y el método de su construcción. Alternativamente, Fab pueden ser construidos y expresados por medios similares (M.J. Evans *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 1995; 184: 123-138). Todos los anticuerpos total y parcialmente humanos son menos inmunogénicos que los MAbs totalmente de murina y los fragmentos y anticuerpos de cadena simple son también menos inmunogénicos. Por ello, es menos probable que todos estos tipos de anticuerpos evoquen una respuesta inmune ó alérgica. Consecuentemente, ellos están mejor adecuados para administración *in vivo* en humanos que los anticuerpos totalmente animales, especialmente cuando se requiere administración repetida ó de largo plazo. Adicionalmente, el menor tamaño del fragmento de anticuerpo puede ayudar a mejorar la biodisponibilidad de tejido, lo cual puede ser crítico para la mejor acumulación de dosis en indicaciones de aguda enfermedad, tales como tratamiento de tumor.

Basado en las estructuras moleculares de las regiones variables de los MAb anti-CD40 ó los péptidos que activan CTL conocidos, uno podría usar modelamiento molecular y diseño molecular racional para generar y discriminar moléculas que imiten las estructuras moleculares de la región enlazante de los anticuerpos ó de los péptidos, respectivamente, y activar CTLs. Estas pequeñas moléculas pueden ser péptidos, peptidomiméticos, oligonucleótidos u otros compuestos orgánicos. Las moléculas imitadoras pueden ser usadas para el tratamiento de cánceres e infecciones. De modo alternativo, uno podría usar procedimientos de tamizaje de gran escala comunmente usados en el campo para aislar moléculas adecuadas a partir de bibliotecas de compuestos.

En un aspecto, la divulgación se relaciona así con una mezcla que incluye un anticuerpo anti-4-1BB agonístico, ó fragmento del mismo que estimula al receptor 4-1BB. Preferiblemente, además la mezcla incluye un anticuerpo anti-CD40 agonístico ó fragmento del mismo que estimula al receptor CD40.

En un aspecto adicional, la divulgación se relaciona con una mezcla que incluye bien sea (a) un anticuerpo anti-CD40 agonístico ó fragmento del mismo que estimula al receptor CD40, y cuya mezcla además incluye una ó más moléculas seleccionadas de entre proteínas, polipéptidos, péptidos, virus ó secuencias de ácidos nucleicos que tienen ó codifican un epítope de célula T clase I MHC ó clase II restringido en MHC.

En WO07/41440 y en WO02/070006 se describen métodos para seleccionar y producir epítopes adecuados de célula T clase I MHC ó clase II restringido en MHC. Preferiblemente, el epítope de célula T clase I MHC ó clase II restringido en MHC, son péptidos. Preferiblemente los péptidos tienen una longitud de por lo menos 8 aminoácidos, más preferiblemente por lo menos 22 aminoácidos. Los péptidos preferidos tienen una longitud de 8 a 10 aminoácidos, más preferiblemente 22 a 45 aminoácidos.

En un aspecto adicional, la divulgación se relaciona con el uso de a) un anticuerpo anti-4-1BB agonístico, ó fragmento del mismo que estimula al receptor 4-1BB, b) un anticuerpo anti-CD40 agonístico, ó fragmento del mismo que estimula al receptor CD40 ó c) ambos en la manufactura de un medicamento para la inducción de inmunidad sistémica de célula T contra un antígeno. El medicamento puede además incluir una ó más moléculas seleccionadas de entre proteínas, polipéptidos, péptidos, virus ó secuencias de ácidos nucleicos que tienen ó codifican un epítope de célula T clase I MHC ó clase II restringido en MHC en la manufactura de un medicamento para la inducción de inmunidad sistémica de célula T contra un antígeno. Preferiblemente, el antígeno es un epítope de célula T clase I MHC ó clase II restringido en MHC. Preferiblemente el antígeno es un antígeno de un tumor ó de células de tumor, más preferiblemente el antígeno es un antígeno tumor específico. Alternativamente, el antígeno puede ser un antígeno de agente infeccioso. Un antígeno preferido es un antígeno HPV, más preferiblemente el antígeno HPV es un péptido que tiene la secuencia RAHYNIVTF (Seq ID No:3). En otro aspecto la invención se relaciona con el uso de un anticuerpo anti-CD40 agonístico, ó fragmento del mismo que estimula al receptor CD40 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor ó de un agente infeccioso mediante inducción de inmunidad sistémica de célula T, donde el tratamiento no incluye inmunización (por ejemplo vacunación) con un antígeno del tumor ó agente infeccioso.

Puede determinarse fácilmente la dosis para las moléculas de la invención mediante extrapolación de las pruebas *in vitro* y ensayos descritos abajo ó de experimentos con animales ó de pruebas clínicas con humanos. Preferencialmente, las moléculas de la invención serían administradas por inyección, en el caso de anticuerpos ó proteínas, aunque ciertas moléculas pequeñas pueden ser adecuadas para administración oral. Abajo se describen los ensayos y pruebas que demuestran la eficacia de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

La señalización a través de CD40 puede reemplazar las células ayudadoras T CD4⁺ en la preparación CTL

Se empleó un sistema de modelo bien caracterizado para investigar el mecanismo de ayuda de la célula T para la activación primaria de respuestas *in vivo* CTL CD8⁺. Ratones C57BL/6 (con el complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) H-2^b) inmunizados con células embrionarias (MECs) de ratón BALB/c (H-2^d) alogénico que expresaban la región temprana 1 del adenovirus humano tipo 5 (Ad5EI-BALB/c MECs) generaron fuertes respuestas CTL contra el epítope restringido por H-2D^b de la proteína E1B del adenovirus E1B (E1B₁₉₂₋₂₀₀) (Figura 1a). Como las moléculas alogeneicas H-2^d MHC expresadas por las MECs Ad5EI-BALB/c no pueden preparar CTLs anfitriones restringidos por H-2^b, la generación de CTLs específicas de E1B debe requerir preparación cruzada, esto es, la toma y representación, restringida por H-2^b, del antígeno por el APCs anfitrión. La preparación cruzada de CTLs específicas de E1B es estrictamente dependiente del ayudador (Figura 1b), puesto que los ratones reducidos en células ayudadoras T CD4⁺ (Th) antes de la inmunización no subieron más una respuesta CTL específica de E1B.

Para investigar si la señalización a través de CD40 puede reemplazar las células ayudadoras T CD4⁺ en la preparación de CTL, se les redujo a los ratones *in vivo* las células T CD4⁺ antes de la inmunización con MECs Ad5E1BALB/c. Un día después de la inmunización, los ratones recibieron una inyección sencilla del anticuerpo activador anti-ratón CD40mAbFGK45 ó un anticuerpo de control de idéntico isotipo. La administración de FGK45 a ratones inmunizados, reducidos en CD4 generó la restauración eficiente de las respuestas CTL específicas de E1B (Figura 2a), mientras que el tratamiento con el anticuerpo de control no lo hizo (Figura 2b). No se detectó preparación de CTL específicas de E1B en ratones no expuestas a tratamiento previo tratados con FGK45 solo (no mostrado). Para tener en cuenta la posi-

bilidad de que el efecto de FGK45 fuera mediado a través de las células CD4⁺ remanentes que no fueron reducidas por el tratamiento con el anticuerpo CD4, se inmunizaron con las MECs Ad5E1BALB/c, ratones B6 a los que se removió I-A^b, los cuales carecían de células T CD4⁺ periféricas funcionales maduras. La respuesta a la inmunización en estos ratones es espejo de lo visto con los ratones reducidos en CD4, en que las CTL específicas de E1B fueron detectables solo en los ratones que recibieron el anticuerpo activador de CD40 (Figura 2c) y no en aquellos que recibieron el anticuerpo de control (Figura 2d).

También se estudió si los requerimientos de anticuerpos anti-CD40 en la preparación de CTLs en ratones reducidos en CD4, podrían ser reemplazados por lipopolisacáridos bacterianos (LPS) (50 µg intravenosos), un potente inductor de citoquinas proinflamatorias, ó por administración de IL-2 (1x10⁵ unidades en adyuvante incompleto de Freund, subcutáneo) después de la inmunización con MECs Ad5E1BALB/c. Mientras que los ratones reducidos en CD4 tratados con FGK45 mostraron una fuerte actividad de CTL específica de E1B, ninguno de los tratamientos con IL-2 ó LPS generó una preparación detectable de CTL (no mostrado).

El ligamiento de CD40 sobre células B sobrerregula su actividad coestimuladora, sugiriendo un papel de éstas células en la restauración de la preparación de CTL mediante el tratamiento con anticuerpo activadores de CD40. Para tratar esta pregunta, se inmunizaron ratones B6 \square MT, los cuales carecen de células B maduras, con los MECs alogénicos Ad5E1-BALB/c. La preparación cruzada de CTL's específicas de E1B no requirió células B maduras (Figura 3a). Sin embargo, cuando tenían reducidas las células CD4⁺, los ratones deficientes en células B no generaron una respuesta CTL específica de E1B (Figura 3b). La activación a través de CD40 con el anticuerpo monoclonal FGK45 restauró completamente la capacidad de los ratones \square MT reducidos en CD4 para preparar CTL's específicas de E1B (Figura 3c). Así no se requiere de células B como APCs ó células accesorias para la preparación cruzada en este sistema modelo, ni son requeridas para la restauración mediada por CD40 de la preparación cruzada de CTLs en ausencia de células ayudadoras T CD4⁺. Estos resultados muestran que la activación de APC derivados de médula ósea a través de CD40, puede obviar el requerimiento por células ayudadoras T CD4⁺ en la preparación cruzada de CTL's específicas de E1B.

Ejemplo 2

El bloqueo de la habilidad de las células ayudadoras T CD4⁺ para interactuar con APC a través de la ruta CD40L-CD40 previene respuestas de CTL antígeno-específicas en ratones normales

Si la interacción CD40L-CD40 representa la ruta fisiológica empleada por las células ayudadoras T CD4⁺ para ayudar a las CTLs, se esperaría que el bloqueo de la habilidad de las células T CD4⁺ para interactuar con APC a través de la interacción CD40L-CD40 disminuyera la preparación de las respuestas de CTL's específicas de E1B en ratones normales. Se inmunizaron ratones B6 con MECs de Ad5E1BALB/c y luego se les trató bien fuera con anticuerpo MR1 bloqueador de CD40L ó con anticuerpo de control. El bloqueo de CD40L generó una reducción drástica de las respuestas CTL específicas de E1B (Figura 4a) comparada con la eficiente preparación de CTL vista en ratones que recibieron los anticuerpos de control (Figura 4b). La deficiencia en preparación inducida por el bloqueo de CD40L fue restablecida completamente siguiendo la señalización de CD40 con FGK45 (Figura 4c). Así, la deficiencia en la preparación de CTL inducido por el bloqueo de CD40L radica en el fallo de las células T_H para transmitir, antes que recibir, señales mediadas por CD40L.

Ejemplo 3

Incapacidad de las CTL Específicas de E1A para dar respuesta después de la administración del péptido

Se ha empleado un sistema modelo previamente descrito (Toes *et al.*, J. Immunol. 156:3911 (1996)). Se ha demostrado que la vacunación s.c. con el epítipo de CTL derivado de Ad5E1A, SGPSNTPPEI (Seq ID No: 2), en IFA impide que los ratones controlen el sobrecrecimiento de tumores que expresan

Ad5E 1a. Esto indica que la vacuna E1A/IFA indujo supresión antes que inducción de inmunidad de CTL Específicas de E1A. Además, la administración de la vacuna E1A/IFA a ratones TCR-transgénicos receptores de células T, los cuales expresan las cadenas α y β de TCR de un clon CTL específico de E1A, suprimió fuertemente la inmunidad mediada por CTL tumor-específica. Estos experimentos examinaron los efectos de la administración de péptido sobre una población CTL monoclonal. Para establecer si la vacunación s.c. con péptido de E1A también induce tolerancia de CTL E1A específica al nivel de CTL policlonal, se inyectaron ratones tipo salvaje (ts) C57BL/6 bien fuera con péptido de E1A (Figura 5a y 5b) ó con un péptido de control (Figura 5c y 5d). Un día después, los ratones fueron mejorados con una línea de célula singénica que expresaba altos niveles de péptido E1A en su superficie (Fig. 5c y 5d). La inyección en los ratones de ésta línea de célula preparada con el péptido de control, induce rápidamente inmunidad específica E1A (Figura 5d). Sin embargo, la habilidad de los ratones para subir la respuesta CTL E1A específica fue anulada después de la inyección de la vacuna E1A/IFA (Figura 5b). Estos datos indican que la inyección del péptido de E1A no solo conduce a tolerancia E1A específica en ratones TCR-transgénicos sino también en ratones que expresan un repertorio policlonal de células T Específicas de E1A.

Puesto que la inyección s.c. de la vacuna E1A/IFA conduce a tolerancia sistémica CTL, se investigó si el péptido de E1A es dispersado sistémicamente y presentado al CTL precursor en la periferia. Por ello, se inyectaron ratones s.c. con el péptido de E1A ó con péptido de control derivado de Virus de Papiloma Humano (HPV) 16 E7, emulsificados en

IFA. Se aislaron células de bazo de estos ratones 16 horas después y se utilizaron como células estimuladoras para un clon CTL específico de E1A *in vitro*. Los esplenocitos de los ratones inyectados con el péptido de E1A s.c. indujeron proliferación específica, mientras que los esplenocitos de los ratones inyectados con el péptido E7 s.c. fallaron en ello (Figura 6). Además, un clon CTL de control no proliferó sobre células de bazo derivadas de ratones inyectados con E1A (datos no mostrados). Así, estos datos indican que el péptido E1A inyectado s.c. con péptido de E1A en IFA es presentado sistémicamente en la periferia por, entre otros, esplenocitos.

En vista de los efectos de tolerancia de de la vacuna de péptido de E1A descritos arriba, surgió la pregunta de si el desencadenamiento de CD40 *in vivo* es suficiente para prevenir la tolerización periférica de CTL y para restaurar la preparación de CTL. Por ello se investigó si la inyección de péptidos tolerizantes combinada con el desencadenamiento *in vivo* de CD40 podría prevenir la inducción de tolerancia periférica de CTL conducente a inmunidad de CTL específica de tumor.

En los ejemplos 1 y 2 se ha demostrado que el desencadenamiento *in vivo* de CD40 puede reemplazar el requerimiento por células ayudadoras CD4⁺ en la preparación de respuestas de CTL dependientes de ayudador. Puesto que se ha implicado la actividad ayudadora mediada por células T CD4⁺ en la prevención de la inducción de la tolerancia periférica de CTL, los inventores pusieron atención a la pregunta de si el desencadenamiento *in vivo* de CD40 es suficiente para prevenir la tolerancia periférica de CTL específica de E1A. Con éste objetivo se inyectaron ratones con vacuna E1A/IFA en combinación con el activante anti-CD40 mAb FGK-45. Los ratones que recibieron ésta combinación elevaron fuertes respuestas CTL específicas de E1A (Figura 7b y 7e) mientras que los ratones que recibieron la vacuna E1A/IFA (Fig 7e) ó mAb solo, no lo hicieron (no mostrado). La combinación de vacuna E1A/IFA con anti-CD40 mAb falló en sacar CTL en ratones deficientes en CD40 (Figura 7c y 7d). Además, la coinyección de la vacuna E1A/IFA con un control mAb de idéntico isotipo (Fig 6a) ó IL2 falló en convertir la tolerancia de CTL inducida por la vacuna E1A/IFA en preparación de CTL (no mostrada). En la figura 7e se muestra el rango y variación de respuestas al epítipo E1A en animales vacunados con péptido de E1A solamente, ó con péptido de E1A más anti-CD40. Así la activación sistémica de CD40 puede reversar la tolerancia CTL periférica inducida por péptidos hacia inmunidad mediada por CTL tumor específica y péptido.

Hubo una fuerte correlación entre la inducción de inmunidad específica de E1A y la presencia de células T CD8⁺ en el bazo de ratones vacunados que marcaron con tetrámeros H-2-D^b conjugados en PE que contenían el péptido de E1A (D^b/E1A). Dentro de los 10 días después de la vacunación, pudieron detectarse mediante citometría de flujo, células T CD8⁺, marcadas con tetrámeros D^b/E1A en ratones inyectados con el péptido de E1A y anti-CD40 mAb, pero no inyectados con el péptido de E1A solo (no mostrado). En los ratones inyectados con E1A, el porcentaje de células CD8⁺ que coloreadas con los tetrámeros D^b/E1A era aproximadamente de 3%. En ratones vacunados con adenovirus completo, el cual induce una potente inmunidad específica de E1A, se detectaron cantidades comparables de células de bazo CD8⁺ reactivas al tetrámero D^b/E1A. Estos resultados indican que la expansión de las células T CD8⁺ específicas de E1A en ratones que recibieron la vacuna E1A/IFA en combinación con el mAb anti-CD40 fue sustancial y equivalente a la hallada en animales vacunados con virus.

Ejemplo 4

El desencadenamiento de CD40 aumenta fuertemente la eficacia de las vacunas anti-cáncer a base de péptidos

Aunque los hallazgos descritos arriba, muestran que la provisión de ayuda a través del desencadenamiento de CD40 es suficiente para prevenir la tolerancia de CTL después de la administración de vacuna tolerogénica de péptido, ellos no tienen en cuenta la pregunta sobre si la eficacia de las vacunas anti-cáncer, que normalmente inducen inmunidad protectora en lugar de tolerancia, puede ser aumentada mediante activación a través de CD40. Se examinó si el desencadenamiento *in vivo* de CD40 es benéfico para el resultado de la vacunación con un péptido derivado de HPV16 E7. La vacunación con éste péptido induce inmunidad protectora mediada por CTL contra un desafío con células de tumor transformadas por HPV16. Además este péptido puede ser usado en un ajuste terapéutico cuando es cargado sobre CD activadas *in vitro*, sugiriendo que se aumenta la respuesta anti-tumor cuando es presentada por CD activadas.

Los ratones que recibieron el péptido E7 en combinación con desencadenamiento de CD40 subieron una respuesta a CTL más potente, comparada con la de los ratones tratados solamente con péptido E7 (datos no mostrados), indicando que el desencadenamiento de CD40 también aumenta la eficacia de la vacuna de péptido HPV16 E7 y confirmando los hallazgos con el péptido de E1A descritos arriba. Además, los ratones tratados 6 días después de una inyección s.c. de células de tumor transformadas con HPV16 E6/E7 negativas a CD40 con el péptido HPV16 E7 sólo (cuadrados abiertos), son capaces de retardar el crecimiento del tumor, pero finalmente la mayoría de los animales sucumben a tumor (Figura 8). Sin embargo, cuando se combinó la vacunación con péptido HPV16 E7 con inyección del anti-CD40 mAb, se redujo marcadamente el crecimiento del tumor y 7 de cada 10 ratones rechazaron el tumor mientras que los animales inyectados con un péptido de control y el anti-CD40 mAb fueron incapaces de controlar el sobrecrecimiento del tumor. Estos resultados muestran que el efecto de las regulaciones de la vacunación pueden incrementarse marcadamente cuando se combina la inmunización con el desencadenamiento *in vivo* de CD40. Estos datos suministran la base para el desarrollo de vacunas anti-tumor extremadamente potentes y novedosas para pacientes con cáncer.

Ejemplo 5

*El desencadenamiento *in vivo* a través de 4-1BB otorga a las CTL no expuestas a tratamiento previo una licencia para matar*

5 El desencadenamiento *in vivo* de CD40 de APC a través de la administración de un anticuerpo anti-CD40 (Ab) agonístico puede reemplazar la necesidad de actividad de ayudador T (Th) CD4+ en la preparación cruzada de específico de CTL Ad5. Inyectamos células embrionarias de ratón transformadas con Ad5E1 (Ad5MEC) dentro de ratones B6 C57BL/6 reducidos en células Th CD4+ singenéticas, en combinación con bien fuera anti CD40 ó anti 4-1BB Ab.
10 Estas Ad5MEC fueron derivadas de ratones deficientes en TAP y por ello son incapaces de presentar los epítopes Ad5E1 codificados en CTL en el contexto de su propio MHC (20).

De modo consecuente, la preparación de CTL específicas de Ad5E1 en este ajuste, basa su confianza en la presentación cruzada de antígenos de tumor por las APC anfitrionas. La inducción de CTL específicas de Ad5E1B es
15 dependiente de Th CD4+, ya que los ratones reducidos en células T CD4+ fallaron en subir una respuesta CTL específica de E1B (Fig 9b). La administración sistémica de anti-CD40 (Ab) agonístico en éstos animales reducidos en CD4 restauró la preparación cruzada específica de E1B (Figura 9c). De modo interesante, la administración sistémica de un anti-4-1BB Ab agonístico generó una preparación igualmente eficiente de CTL específica de E1B en la ausencia de ayuda de las células T CD4+ (Figura 9d). Un método diferente para inducir inmunidad de CTL antígeno específica
20 contra tumores es a través de la vacunación con mínimos epítopes de péptidos en adyuvante (IFA). De modo notable, en el caso de los epítopes derivados de AdSE1A (sic) y E1B, tales vacunas a base de péptido inducen tolerancia de CTL en lugar de preparación, a menos que se coadministre anti-CD40 Ab agonístico (4). Por ello, investigamos también si en este ajuste un desencadenamiento a través de 4-1BB podría permitir la preparación de CTL, inyectando ratones B6 con vacuna de péptido de E1A en combinación con anti-4-1BB Ab, anti-CD40 Ab ó anticuerpo de control. En realidad,
25 no sólo la coinyección de anti-CD40 sino también la coinyección de anti-4-1BB convirtió la vacuna tolerogénica de péptido en una formulación inmunogénica (Fig 1E-G). Se obtuvieron resultados similares cuando se hizo seguimiento a inmunidad a CTL Específicas de E1A mediante manchado de los esplenocitos con tetrámeros de péptido H-2D^d E1A (no mostrado). Así, el desencadenamiento *in vivo* de 4-1BB puede prevenir la inducción de tolerancia péptido específica, y en cambio generar la preparación de una potente respuesta a CTL Específicas de E1A. Tomados juntos,
30 estos datos demuestran que la señal 4-1BB suministra de modo eficiente CTL con una licencia para matar y como tal puede reemplazar la necesidad de desencadenamiento de CD40 a través de las células Th ó la administración de anti-CD40 Ab agonístico.

35 Ejemplo 6

El anti-4-1BB Ab no induce la activación de CD

El conocimiento actual de los patrones de expresión de CD-40 y 4-1BB podría argumentar que la señal suministrada
40 por la administración *in vivo* de anti-CD40 Ab es entregada a las APC mientras que el anti-4-1BB Ab es entregado directamente a las CTL. Para excluir la posibilidad de que el anticuerpo anti-4-1BB, en vez de estimular directamente las células T antígeno específicas, pudiera mediar su efecto sobre la preparación de CTL (Fig. 9) en una forma directa mediante la activación del antígeno que presenta CD, investigamos si la inyección del anticuerpo anti-4-1BB activa CD
45 *in vivo*. Se inyectaron ratones B6 con anti-4-1BB, anti-CD40 ó Ab control y se analizó la expresión de CD86 (B7.2) sobre CD CD11c⁺ aislados de los bazos de éstos ratones. Tal como se esperaba, el desencadenamiento *in vivo* de CD40 generó un aumento en la expresión de CD86, indicando una activación *in vivo* de CD. En contraste, después del desencadenamiento *in vivo* de 4-1BB, ó administración de Ab de control de rata, no hubo incremento en la expresión de CD86 sobre CD (Fig. 10a). La falla del anti-4-1BB Ab para inducir activación de CD está de acuerdo con el hecho de que ni las CD maduras ni las inmaduras expresan niveles detectables de 4-1BB, implicando que las CD no son
50 receptivas al desencadenamiento 4-1BB (Fig. 10b). Por ello, el anticuerpo anti-4-1BB no parece afectar la población de CD sino que más bien media su efecto estimulador sobre la preparación de CTL a través de la estimulación directa de células T CD8⁺.

55 Ejemplo 7

La coestimulación a través de 4-1BB genera incremento en la supervivencia de CTL estimuladas por antígeno

Para investigar de qué manera el anti-4-1BB Ab agonístico permite la preparación de CTL Ad5 específicas independiente de las ayudadoras T, explotamos las poblaciones de células T transferidas adoptivamente desde el receptor de células T específicas del péptido Ad5E1A (TCR) de ratones transgénicos (21). Se hizo el seguimiento *in vivo* de éstas células T por dos diferentes vías. Primero se marcaron en forma fluorescente células T transgénicas TCR con el pigmento CFSE y fueron transferidos a ratones B6 normales, después de lo cual fueron vacunados éstos ratones con el péptido AdSE1A en IFA con ó sin tratamiento anti-4-1BB Ab. De modo interesante, los datos revelaron que la
65 proliferación de células T transgénicas TCR fue igualmente desencadenada en ratones que habían recibido el péptido de E1A, bien fuera con ó sin anti-4-1BB Ab (Fig. 11a). Por ello, el anti-4-1BB Ab no habilita la preparación de CTL incrementando la activación inicial ó la capacidad proliferativa de las células T antígeno específicas.

En una segunda aproximación, transferimos células T transgénicas TCR Ad5Específicas de E1A, las cuales eran de origen B6 Thy 1.2 dentro de ratones B6 Thy 1.1 congénicos. Estos ratones fueron vacunados con el péptido Ad5E1A en IFA, con ó sin tratamiento anti-4-1BB Ab. La Figura 3b muestra que a 11 días después de la vacunación, se observó expansión masiva de células T CD8⁺ de origen TCR transgénico en ratones vacunados con péptido de E1A en combinación con anti-4-BB1, pero no en ratones que recibieron bien fuera péptido de E1A ó anti-4-BB1 Ab solos. Por ello, la acumulación de CTL específicas de E1A requirió de la presencia de señal coestimuladora 4-1BB. Además, la estimulación de la inmunidad de CTL CD8⁺ a través de 4-1BB dependió de la presencia de un desencadenador específico del antígeno. Tomados juntos, los datos en la Figura 3 demuestran que el desencadenamiento con 4-1BB no es esencial para la activación inicial de CTL, sino que promueve la supervivencia de CTL estimuladas por antígeno, permitiendo de ese modo la expansión de éstas CTL.

Ejemplo 8

15 *Involucramiento de las interacciones 4-1BBL/4-1BB en la preparación de CTL*

Puesto que el desencadenamiento *in vivo* de 4-1BB permite la preparación de CTL en ausencia de la señal de activación de CD dependiente de CD40 (Fig. 9) esto implica que para una eficiente preparación de CTL, es suficiente la presentación de antígeno por CD no activada en combinación con un anti-4-1BB Ab activador. La necesidad de co-administración de anti-4-1BB Ab también indicó que las CD no activadas aparentemente no eran capaces de estimular las CTL a través de 4-1BB. Por eso, analizamos la expresión del ligando natural para éste receptor, 4-1BBL, sobre CD maduras e inmaduras. Las CD no activadas expresan bajos niveles de 4-1BBL (Fig. 12a) mientras que la expresión de ésta molécula es fuertemente incrementada por activación en presencia de I:C trímero de CD40L ó Poli I:C (Fig. 12b y c, respectivamente). Esta inducción de 4-1BBL fue observada por desencadenamiento de CD40 *in vivo* en CD. El incremento en expresión de 4-1BBL fue acompañado en paralelo por elevados niveles de CD86 en las CD activadas. Esto sugiere que ambas señales coestimuladoras contribuyen a la capacidad de CD maduras, en contraposición a las CD inmaduras, para inducir la inmunidad CTL.

Nosotros realizamos experimentos de inmunización de células de tumor en ratones B6 normales que tenían en células Th CD4⁺, en los cuales la señal de maduración de CD dependiente de Th requirió que la preparación cruzada de CTL estuviera intacta. El bloqueo de las señales CD28 y 4-1BB fue realizado mediante administración de bloqueador anti-4-1BBL Ab ó CTLA4-Ig, respectivamente. Se inmunizaron ratones B6 con Ad5E1MEC en combinación con dosis sistémicas de anti-4-1BBL Ab y/ó CTLA4-Ig. De modo interesante, el bloqueo *in vivo* de anti-4-1BBL generó una marcada reducción en el número de CTL antígeno-específicas inducida por la vacuna de células de tumor (Fig. 13). El bloqueo de la coestimulación de CD28 inhibió completamente la inducción de CTL y, por ello el bloqueo adicional de 4-1BBL en combinación con CTLA4-Ig no tuvo efecto extra. Estos datos indican que las interacciones 4-1BBL/4-1BB son importantes para la preparación cruzada de CTL antígeno-específicas, en la medida que el bloqueo de la interacción entre éstas dos moléculas disminuye notoriamente el número de CTL tumor-específicas que son sostenidas. Sin embargo, en ausencia de la señal coestimuladora a través de CD28, suministrado por CD activadas apropiamente, la señal suministrada por 4-1BBL aparentemente no es capaz de habilitar la preparación de CTL y, como resultado, la inducción de la inmunidad de CTL anti tumor es totalmente anulada.

Ejemplo 9

45 *La señal de 4-1BB depende de la coestimulación de CD28*

Los experimentos de bloqueo *in vivo* sugirieron una dominancia de la coestimulación de CD28 sobre la señal de 4-1BB. Por ello, investigamos si en ausencia de la coestimulación de CD28 la administración de anti-4-1BB Ab aún suministraría a las CTL licencia para matar. Ratones B6 fueron reducidos en células T CD4⁺ e inmunizados con Ad5E1MEC en combinación con administración de anti-4-1BB Ab y/o CTLA4-Ig. Los ratones que recibieron anti-4-1BB Ab subieron fuertemente respuestas CTL específicas de E1B, pero los ratones que adicionalmente recibieron CTLA4-Ig no lo hicieron (Fig. 14). Estos datos indican que el efecto positivo del desencadenamiento de 4-1BB en la inducción de inmunidad de CTL depende de la presencia de la señal coestimuladora intacta de CD28. Además, estos datos sugieren que los niveles basales de CD80/CD86 expresados por CD no activadas proveen suficiente coestimulación a través de CD28 para permitir coestimulación adicional a través de la ruta 4-1BB.

Estudios *in vitro* han demostrado que la expresión 4-1BB sobre células T no expuestas a tratamiento previo está ausente y que el desencadenamiento TCR, a través de entrecruzamiento por anti-CD3 Ab, genera un rápido incremento en la expresión de superficie 4-1BB (8). Como nuestros datos soportan la conclusión de que la coestimulación a través de CD28 es un prerrequisito para que haya señal de 4-1BB, investigamos si el desencadenamiento de CD28 contribuye a la regulación de 4-1BB sobre células T no expuestas a tratamiento previo. Por ello, se estimularon *in vitro* células de bazo no expuestas a tratamiento previo con anti-CD3 Ab enlazado a placa y se analizó la expresión de 4-1BB 24 horas después (Fig. 16). Es claro que son suficientes fuertes señales a través de TCR (altas concentraciones de anti-CD3 Ab) para inducir expresión de 4-1BB dentro de las 24 horas. Sin embargo, cuando se estimulan las células T con menores concentraciones de anti-CD3, se pierde en gran medida su capacidad para regular 4-1BB (Fig. 16). Estas menores concentraciones de anti-CD3 Ab proveen un desencadenador TCR más débil, el cual es más probable que se parezca a una señal *in vivo* de la clase suministrada por la vacuna de células de tumor. De modo importante, bajo

ES 2 285 157 T3

estas condiciones más fisiológicas, la coestimulación a través del receptor CD28 restauró la capacidad de las células T para expresar elevados niveles de 4-1BB. Estos hallazgos concuerdan con el hecho de que el bloqueo de la ruta CD 28 *in vivo* anula la coestimulación a través de 4-1BB (Fig. 14 y 15). Además, ellos fortalecen la noción de que la coestimulación con CD28 a las células T estimuladas por antígeno es una señal importante de la regulación con 4-1BB de células T no expuestas a tratamiento previo, haciendo por ello éstas células susceptibles al desencadenamiento con 4-1BB.

Ejemplo 10

Habilitando la preparación de CTL por una vacuna de células de tumor ó a base de péptidos a través de la administración de una combinación sinérgica de anti-CD40 y anti-4-1BB Ab

Puesto que el anti-CD40 Ab y el anti-4-1BB Ab posibilitan la preparación de CTL mediante la vacuna de péptido de E1A en una forma similar, mientras que el desencadenamiento de 4-1BB dependía de la coestimulación con CD28, investigamos si la combinación de ambos Ab podría generar una inducción aún mayor de la inmunidad de CTL. Nuestros datos revelaron que la combinación de vacuna de péptido de E1A con ambos Ab, en verdad tiene fuertes efectos sinérgicos en la inducción de la respuesta de CTL. En ratones que recibieron ambos Ab, tanto los números absolutos como relativos de células T CD8⁺ tetrámero-positivos, se incrementaron por lo menos 5 a 10 veces comparado con los ratones que recibieron solo uno de los Ab (Fig. 17).

Ejemplo 11

Inducción de inmunidad terapéutica antitumor a través de la administración de anti-CD40 agonístico Ab a sujetos que tienen tumor

Puesto que la activación *in vivo* de APC a través de la inyección de anti-CD40 Ab habilita la preparación cruzada de CTL específicas de tumor, en ratones que tiene reducidas las células T CD4⁺ inmunizados con células de tumor, este procedimiento podría también promover la inducción de inmunidad antitumor en animales que tienen tumor. La iniciación de respuestas CTL anti-tumor en ratones que tienen tumor, es dificultada más posiblemente por la falta de presentación de antígeno por APC adecuadamente activadas. Esto podría deberse a insuficiente reclutamiento de APC hasta el sitio del tumor y/o la falla de las APC de tumor cargadas con antígeno para activarse y redistribuirse hasta los nodos de drenaje de linfa, el sitio donde tiene lugar el encuentro con -y preparación de- células T no expuestas a tratamiento previo. En especial, la falta de señales de “peligro” inflamatorio, la falta de ayuda de células T específicas de tumor y la secreción de citoquinas inmunomodulatorias por el tumor, podrían generar falla de APC para hacer la preparación cruzada de respuestas de CTL anti tumor (22).

En vista de éstas consideraciones, inyectamos con anti-CD40 Ab ratones B6 inmunocompetentes que tenían tumores (subcutáneos) de células transformadas por Ad5. Mientras que en los animales de control los tumores crecieron progresivamente, los ratones tratados con anti-CD40 fueron capaces de rechazar sus tumores (Fig. 18). De modo interesante, en los animales de control sólo detectamos bajos números de CTL específicas de E1A en los nodos de drenaje de linfa, mientras que los ratones tratados con anti-CD40 mostraron claramente elevados números de CTL específicas de E1A tanto en los nodos de drenaje y colaterales de linfa como la sangre periférica (Fig. 19a-c).

De modo importante, la localización de la presentación del antígeno es similar en los ratones de control y en los tratados con anti-CD40, en que en ambos casos ésta es detectada únicamente en el nodo de drenaje de linfa del tumor y no en el nodo de linfa colateral (Fig. 20). Como se describió arriba, debido a la falta de señales de “peligro” inflamatorio, aparentemente las APC fallan en preparar en forma entrecruzada respuestas de CTL anti-tumor en los animales de control. En contraste, en los ratones tratados con anti-CD40 Ab la señal de CD40 habilita estas APC para preparar de modo efectivo inmunidad de CTL específicas de AdSE1A y, como resultado, estas CTL son capaces de abandonar el nodo de drenaje de linfa y ganar acceso a otros órganos periféricos linfoides, así como al tumor. Este último hecho es confirmado por el hecho de que las CTL específicas de A5E1A son detectadas primariamente en los tumores de ratones tratados con anti-CD40 Ab (Figura 21) La noción de que el tratamiento con anti-CD40 resulta en una inmunidad de CTL sistémica efectiva, es adicionalmente soportada por el hecho de que el desencadenamiento local *in vivo* a través de CD40 por inyección intratumoral de anti-CD40 Ab dentro del tumor sobre un flanco, también generó rechazo del tumor no tratado sobre el otro flanco (Fig. 22a-c). Este experimento también demuestra que puede lograrse la terapia efectiva anti-tumor tanto después de administración sistémica como local del anti-CD40 Ab.

Dos experimentos adicionales suministran entendimiento adicional sobre los mecanismos a través de los cuales la inyección de anti-CD40 Ab genera rechazo de tumor. Primero, se confirmó el papel de éstas CTL en la erradicación de tumores por el hecho de que la terapia antitumor con anti-CD40 Ab no es efectiva en ratones que han sido reducidos en sus células T CD8⁺, mientras que aún es efectiva en ratones que están reducidos en sus células T CD4⁺ (Fig. 23). En segundo lugar debe notarse que otros han hallado que anti-CD40 Ab inhibe el crecimiento de los tumores que expresan CD40 a través de la inducción directa de la apoptosis de células de tumor (23-25). De modo importante, nuestras células de tumor carecen de expresión CD40 (Fig. 24). Por ello, el efecto terapéutico del anti-CD40 Ab en éste ajuste actúa a través de la inducción de una respuesta tumoricida de CTL.

Ejemplo 12

Inducción de inmunidad terapéutica antitumor a través de la administración de una combinación sinérgica de anti-CD40 y anti-4-1BB Ab a sujetos que tienen tumor

5 Nuestrs datos muestran que la administración de anti-CD40 Ab agonístico, aparte de habilitar la preparación de CTL contra vacunas a base de péptido y células de tumor, puede también habilitar al sistema inmune para que eleve la inmunidad terapéutica de CTL contra tumores preexistentes. Puesto que anti-CD40 y 4-1BB Ab tienen capacidades similares para estimular la inmunidad de CTL, y actúan de modo sinérgico en la estimulación de respuestas inducidas por vacunas de péptidos (ver arriba), esperamos una muy poderosa capacidad terapéutica de ésta potente combinación de Ab en relación con la inducción de inmunidad de CTL en ratones que tienen tumor.

15 Los siguientes descripción, términos, expresiones y ejemplos son únicamente ejemplificantes y no limitantes. La invención incluye todos los equivalentes de las modalidades, tanto conocidas como desconocidas. La invención está limitada solo por las reivindicaciones que siguen y no por cualquier declaración en cualquier otra parte de éste documento ó en cualquier otra fuente.

Referencias

- 20 1. **Schoenberger, S. P., R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa, C. J. Melief.** 1998. La ayuda de células T para linfocitos T citotóxicos es mediada por interacciones CD40-CD40L. *Nature*. 393: 480-3.
- 25 2. **Ridge, J. P., F. Di Rosa, P. Matzinger.** 1998. Una célula dendrítica condicionada puede ser un puente temporal entre una ayudadora T CD4⁺ y una célula T asesina. *Nature*. 393: 474-8.
3. **Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, R. A. Flavell, J. F. Miller, W. R. Heath.** 1998. La ayuda para respuestas de célula T citotóxica es mediada por señalización de CD40. *Nature*. 393: 478-80.
- 30 4. **Diehl, L., A. T. den Boer, S. P. Schoenberger, E. I. van der Voort, T. N. Schumacher, C. J. Melief, R. Offringa, R. E. Toes.** 1999. La activación de CD40 *en vivo* supera la tolerancia inducida por péptido del linfocito T citotóxico periférico y aumenta la eficacia de vacunas anti-tumor. *Nat Med*. 5: 774-9.
- 35 5. **Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, K. Palucka.** 2000. Immunobiología de células dendríticas. *Annu Rev Immunol*. 18: 767-811
6. **Lenschow, D. J., T. L. Walunas, J. A. Bluestone.** 1996. Sistema CD28B7 de coestimulación de células T. *Annu Rev Immunol*. 14: 233-58
- 40 7. **Chambers, C. A., J. P. Allison.** 1999. Regulación coestimuladora de la función de célula T. *Curr Opin Cell Biol*. 11: 203-10.
8. **Hurtado, J. C., Y. J. Kim, B. S. Kwon.** 1997. Las señales a través de 4-1BB son coestimuladoras para células T esplénicas previamente activadas e inhiben la muerte de la célula inducida por la activación. *J Immunol*. 158: 2600-9.
- 45 9. **Takahashi, C., R. S. Mittler, A. T. Vella.** 1999. Último desarrollo: 4-1BB es una señal real de supervivencia de célula T CD8. *J Immunol*. 162: 5037-40.
- 50 10. **Goodwin, R. G., W. S. Din, T. Davis-Smith, D. M. Anderson, S. D. Gimpel, T. A. Sato, C. R. Maliszewski, C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, et al.** 1993. Clonado molecular de un ligando para el gene 4-1BB de célula T inducible: un miembro de una familia emergente de citoquinas con homología al factor de necrosis de tumor. *Eur J Immunol*. 23: 2631-41.
- 55 11. **Alderson, M. R., C. A. Smith, T. W. Tough, T. Davis-Smith, R. J. Armitage, B. Falk, E. Roux, E. Baker, G. R. Sutherland, W. S. Din.** 1994. Caracterización molecular y biológica de 4-1BB humano y su ligando. *Eur J Immunol*. 24: 2219-27.
12. **DeBenedette, M. A., A. Shahinian, T. W. Mak, T. H. Watts.** 1997. Coestimulación de linfocitos T de CD28 por ligando 4-1BB. *J Immunol*. 158: 551-9.
- 60 13. **Shuford, W. W., K. Klussman, D. D. Tritchler, D. T. Loo, J. Chalupny, A. W. Siadak, T. J. Brown, J. Emswiler, H. Raecho, C. P. Larsen, T. C. Pearson, J. A. Ledbetter, A. Aruffo, R. S. Mittler.** 1997. Las señales coestimuladoras de 4-1BB inducen preferencialmente la proliferación de células T CD8⁺ y conducen a la amplificación *in vivo* de respuestas de células T citotóxicas. *J Exp Med*. 186: 47-55.
- 65 14. **DeBenedette, M. A., N. R. Chu, K. E. Pollok, J. Hurtado, W. F. Wade, B. S. Kwon, T. H. Watts.** 1995. Papel del ligando 4-1BB en la coestimulación del crecimiento de linfocito T y su regulación sobre linfomas M12 B mediante cAMP. *J Exp Med*. 181: 985-92.

15. **Hurtado, J. C., S. H. Kim, K. E. Pollok, Z. H. Lee, B. S. Kwon.** 199. Papel potencial de 4-1BB en activación de célula T. Comparación con la molécula coestimuladora CD28. *J Immunol.* 155: 3360-7.
- 5 16. **DeBenedette, M. A., T. Wen, M. F. Bachmann, P. S. Ohashi, B. H. Barber, K. L. Stocking, J. J. Peschon, T. H. Watts.** 1999. El análisis del ligando de 4-1BB en ratones deficientes en (4-1BBL) y de ratones que carecen tanto de 4-1BBL y CD28 revela un papel para 4-1BBL en el rechazo de aloinjerto de piel y en la respuesta de célula T citotóxica al virus de la influenza. *J Immunol.* 163: 4833-41.
- 10 17. **Tan, J. T., J. K. Whitmire, R. Ahmed, T. C. Pearson, C. P. Larsen.** 1999. Ligando 4-1BB, un miembro de la familia TNF, es importante para la generación de respuestas antivirales de célula T CD8. *J Immunol.* 163: 4859-68.
- 15 18. **Tan, J. T., J. K. Whitmire, K. Murali-Krishna, R. Ahmed, J. D. Altman, R. S. Mittler, A. Sette, T. C. Pearson, C. P. Larsen.** 2000. La coestimulación de 4-1BB es requerida para la inmunidad antiviral protectora después de la vacunación con péptido. *J Immunol.* 164: 2320-5.
- 20 19. **Melero, I., W. W. Shuford, S. A. Newby, A. Aruffo, J. A. Ledbetter, K. E. Hellstrom, R. S. Mittler, L. Chen.** 1997. Anticuerpos monoclonales contra la molécula de activación de la célula T 4-1BB erradican tumores establecidos. *Nat Med.* 3: 682-5.
- 25 20. **Schoenberger, S. P., E. I. van der Voort, G. M. Krietemeijer, R. Offringa, C. J. Melief, R. E. Toes.** 1998. La preparación cruzada de respuestas CTL *in vivo* no requiere péptidos antigénicos en el retículo endoplásmico de células inmunizantes. *J Immunol.* 161: 3808-12.
- 30 21. **Toes, R. E., R. Offringa, R. J. Blom, C. J. Melief, W. M. Kast.** 1996. La vacunación con péptido puede conducir a incremento en el crecimiento de tumor a través de inducción de tolerancia específica de células T. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 7855-60.
- 35 22. **Melief, C. J., R. E. Toes, J. P. Medema, S. H. van der Burg, F. Ossendorp, R. Offringa.** 2000. Estrategias para inmunoterapia de cáncer. *Adv Immunol.* 75: 235-82.
- 40 23. **Hess, S., H. Engelmann.** 1996. Una novedosa función de CD40: Inducción de muerte celular en células transformadas. *J Exp Med.* 183: 159-67.
- 45 24. **Hirano, A., D. L. Longo, D. D. Taub, D. K. Ferris, L. S. Young, A. G. Eliopoulos, A. Agathangelou, N. Cullen, J. Macartney, W. C. Fanslow, W. J. Murphy.** 1999. Inhibición de crecimiento de carcinoma humano de seno mediante un ligando CD40 humano soluble recombinante. *Blood.* 93: 2999-3007.
- 50 25. **Young, L. S., A. G. Eliopoulos, N. J. Gallagher, C. W. Dawson.** 1998. CD40 y células epiteliales: a través de la gran separación. *Immunol Today.* 19: 502-6.
- 55
60
65

ES 2 285 157 T3

REIVINDICACIONES

5 1. El uso de un anticuerpo anti-CD40 agonístico, ó un fragmento del mismo, el cual estimula al receptor de CD40, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor ó agente infeccioso mediante la inducción de la inmunidad sistémica de la célula T contra un antígeno del tumor ó agente infeccioso, donde el tratamiento no incluye inmunización con un antígeno del tumor ó agente infeccioso.

10 2. El uso de acuerdo con la Reivindicación 1, donde las células de tumor ó infectadas no expresan el receptor CD40.

3. El uso de acuerdo con las Reivindicaciones 1 ó 2, donde el receptor CD40 objetivo del anticuerpo anti-CD40 agonístico está expresado en las células dendríticas del sujeto tratado.

15 4. El uso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones precedentes, donde la inducción de la inmunidad sistémica de la célula T es una respuesta de célula T citotóxica.

5. El uso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo anti-CD40 agonístico ó fragmento del mismo es humano, humanizado, quimérico ó desinmunizado.

20 6. El uso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones precedentes, donde el fragmento es un fragmento V_H, V_L, Fv, Fd, Fab, (Fab)₂ ó scFv de un anticuerpo humano.

25 7. El uso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones precedentes, donde el medicamento es para inyección ó para administración oral.

8. El uso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones precedentes, donde la inyección es una inyección intratumoral.

30 9. El uso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones precedentes, donde el antígeno es un antígeno específico de tumor.

35 10. El uso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones precedentes, donde el antígeno es un antígeno de virus de papiloma humano (HPV) ó adenovirus.

FIG. 1B

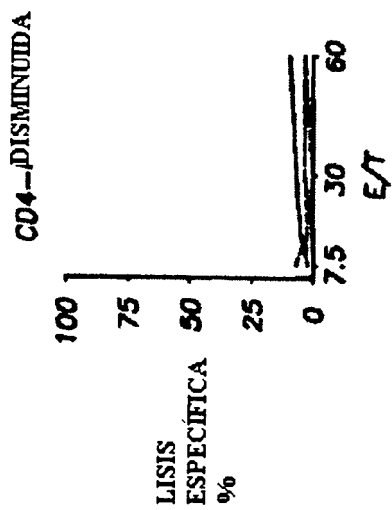
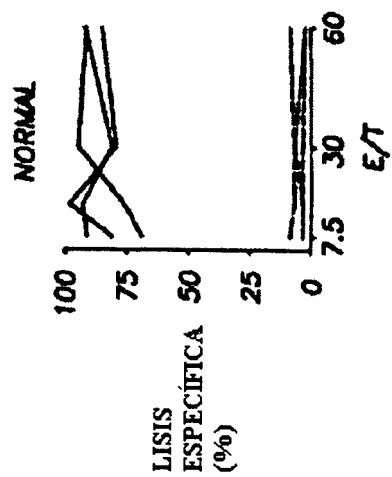
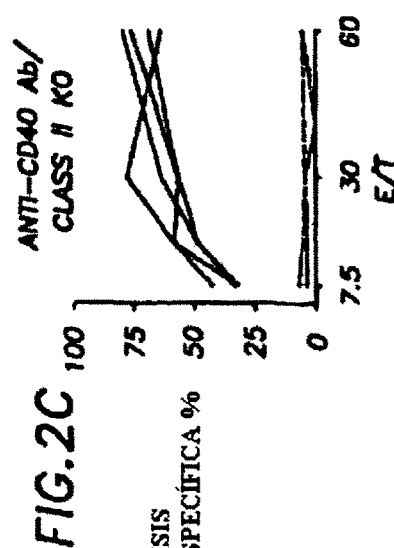
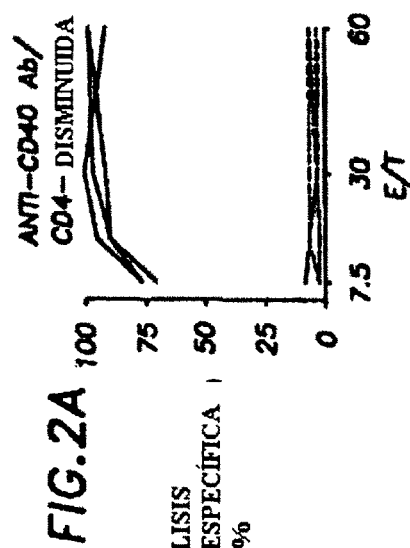
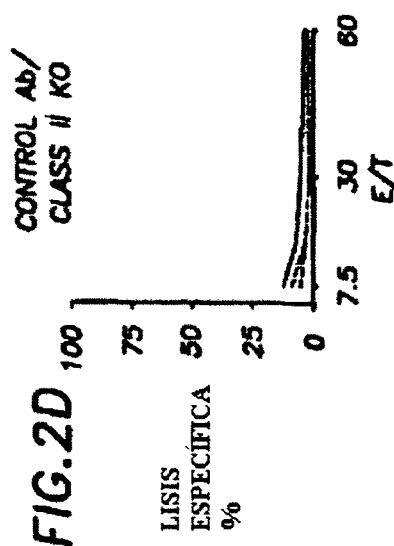
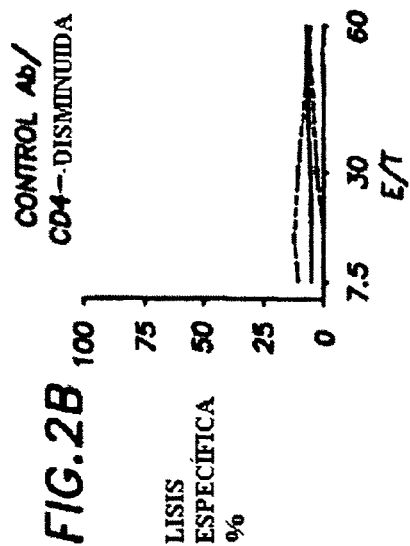
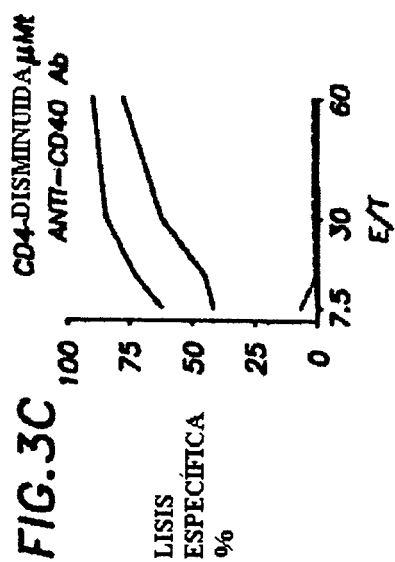
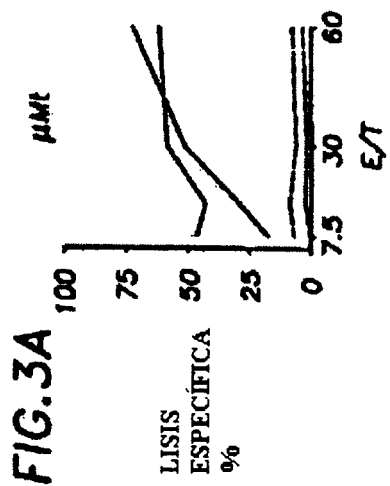


FIG. 1A







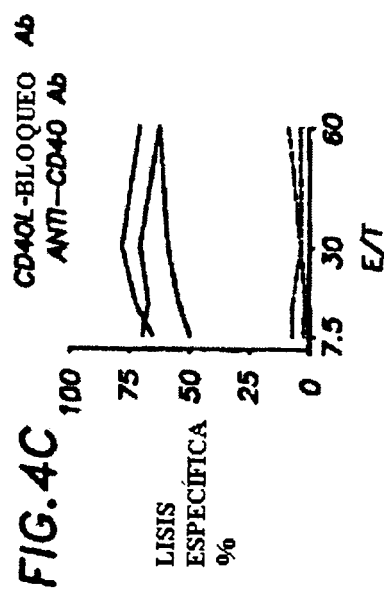
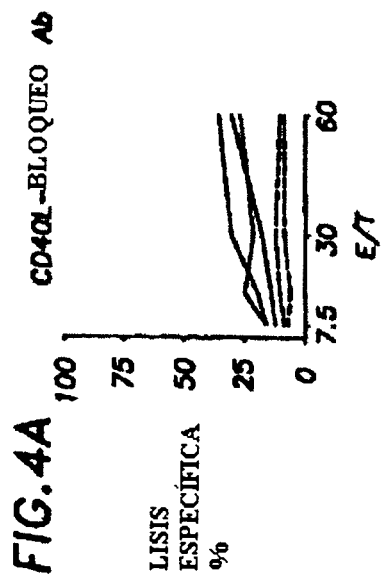
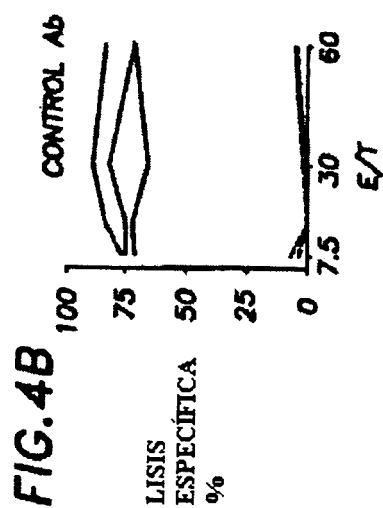


FIG.5A

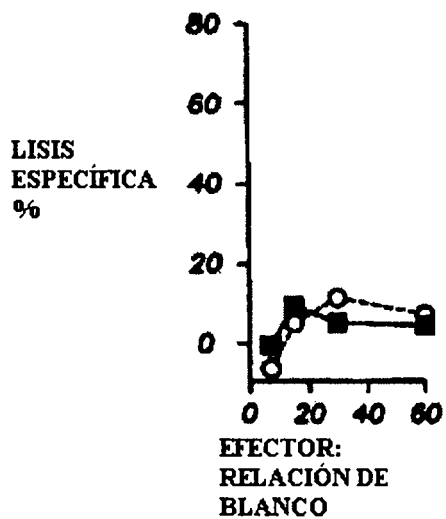


FIG.5B

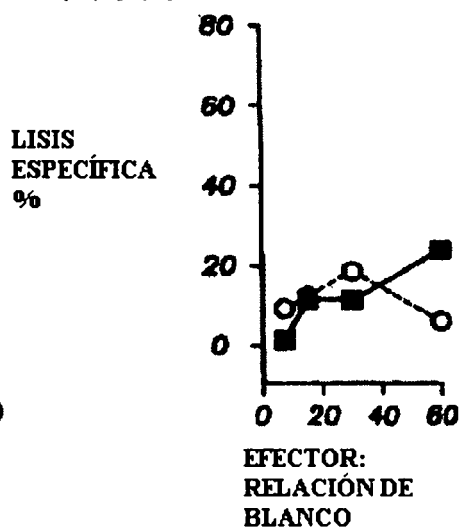


FIG.5C

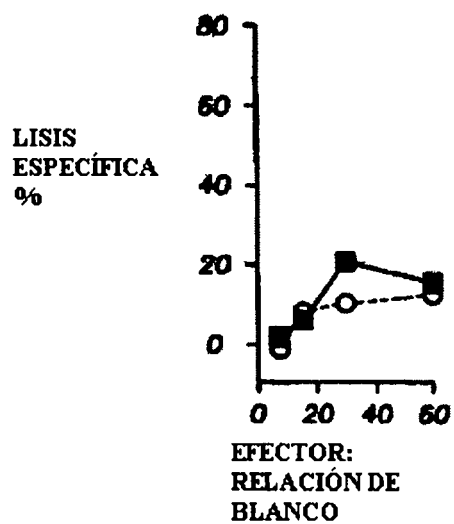


FIG.5D

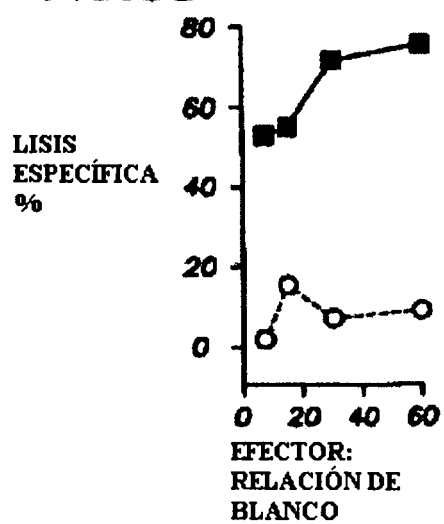
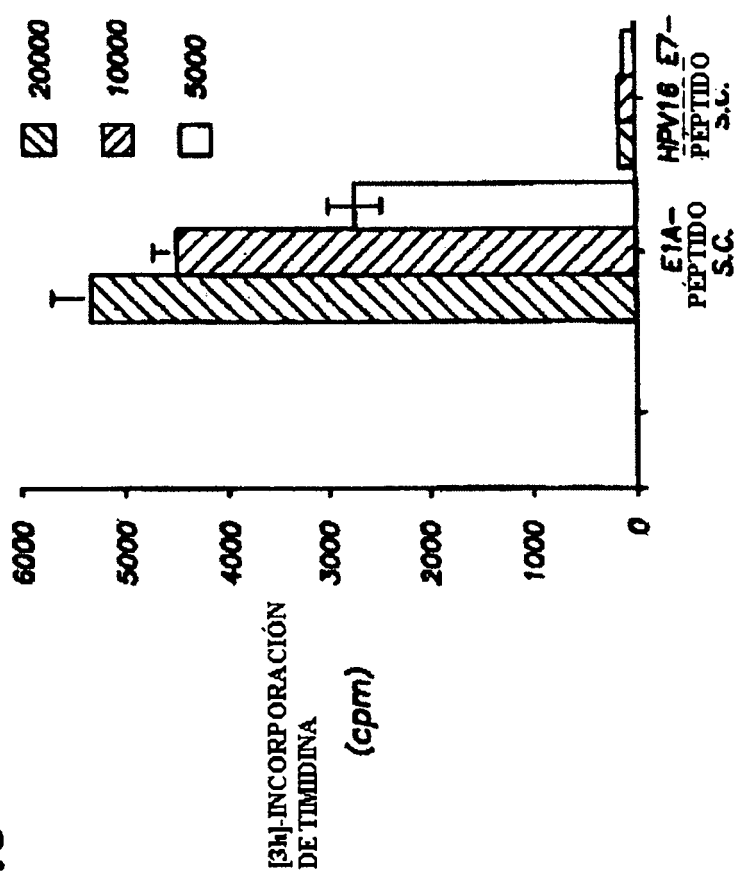
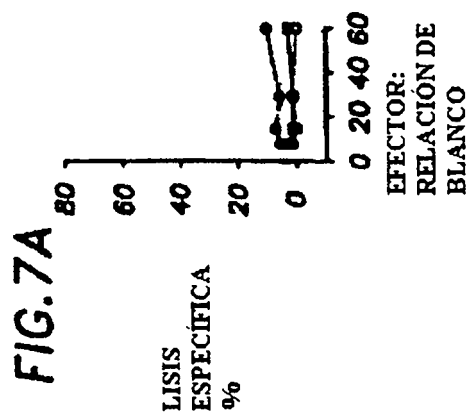
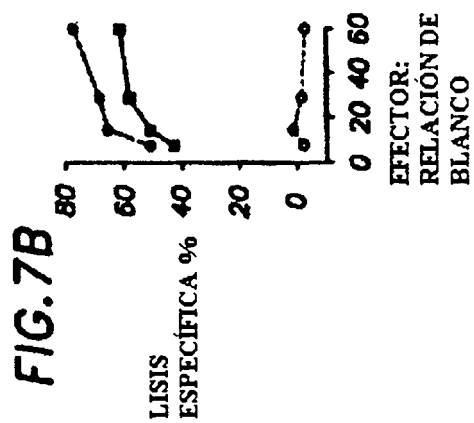
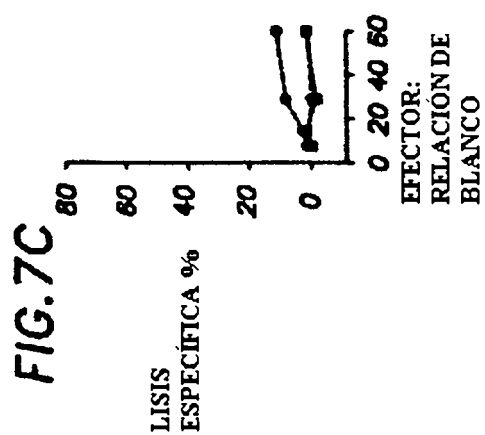
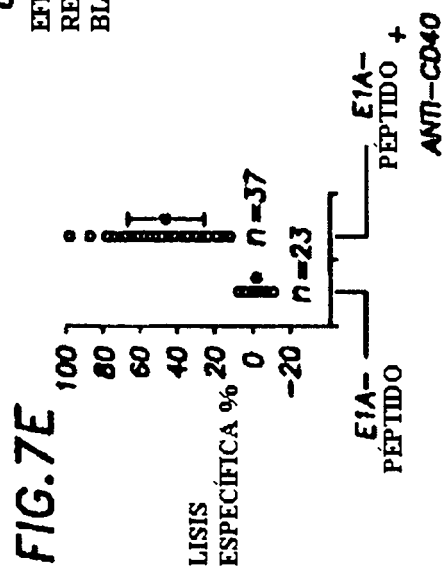
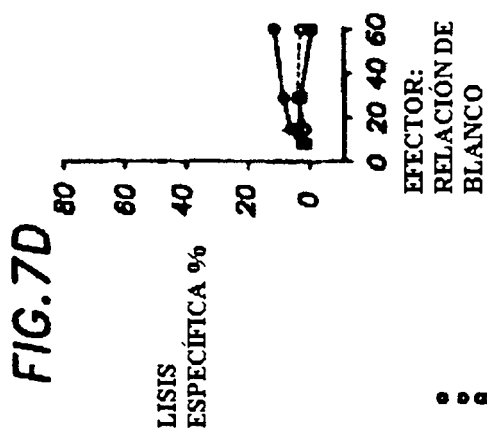


FIG. 6







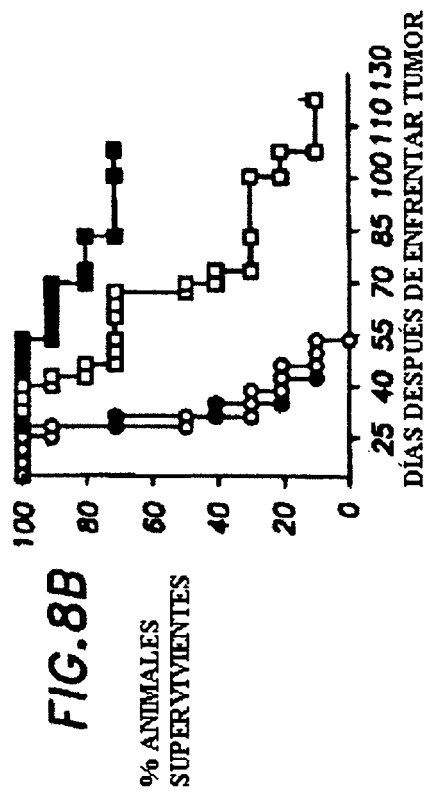
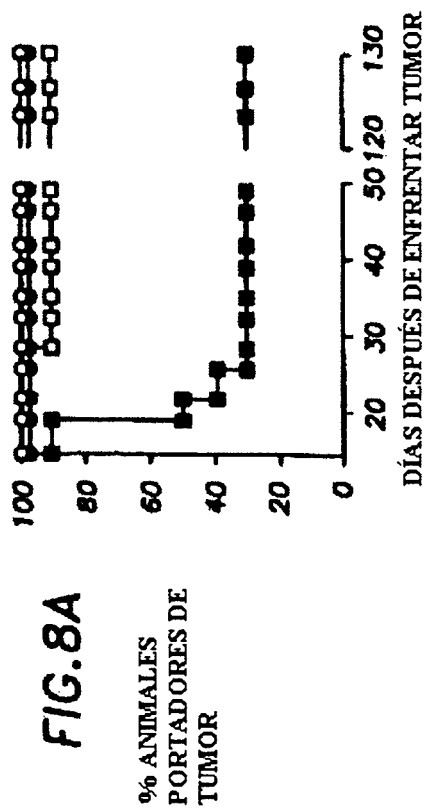


Fig 9

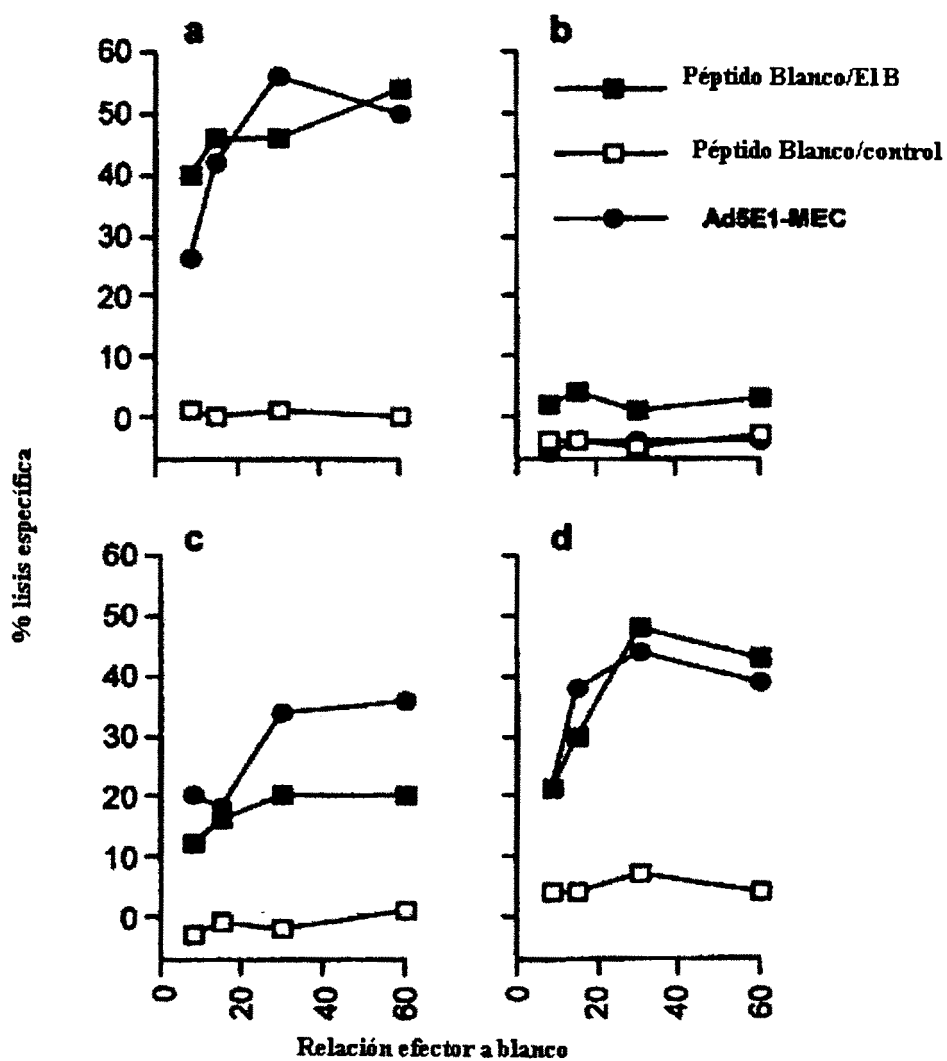


Fig 9

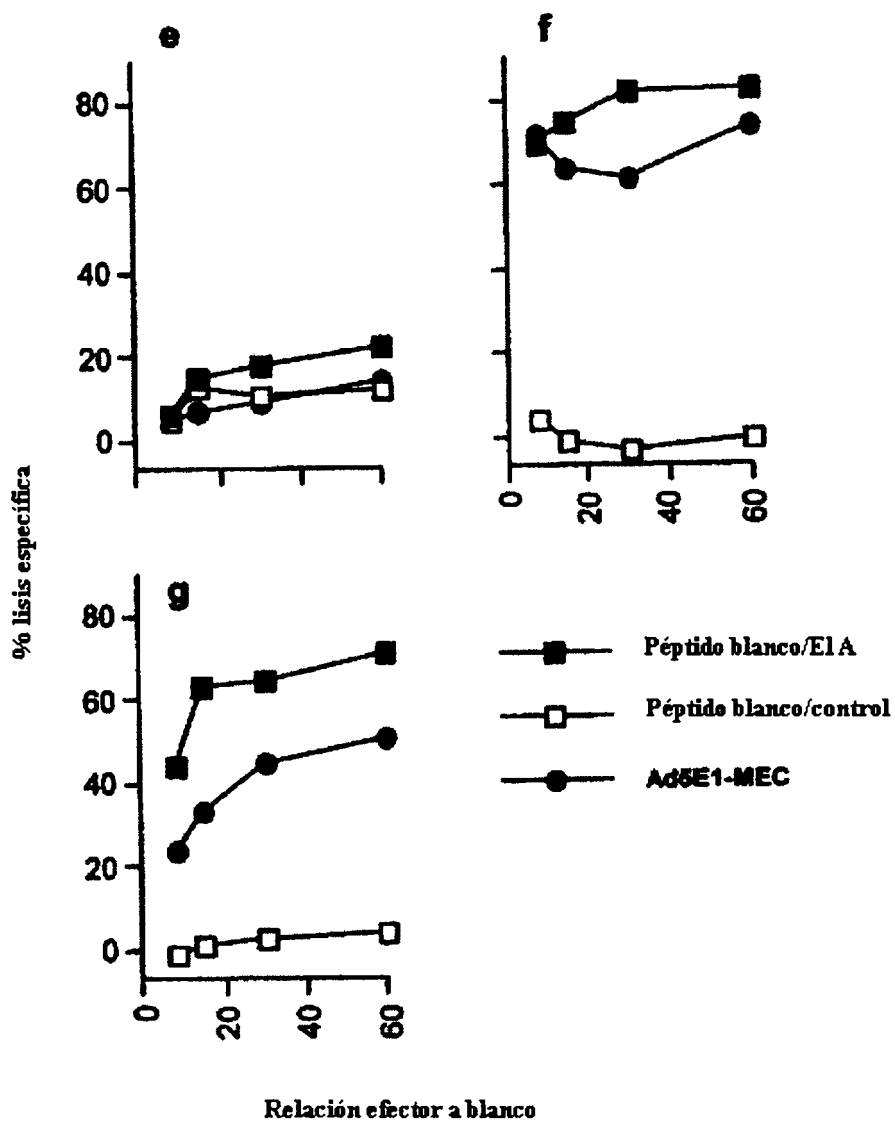


Fig 10

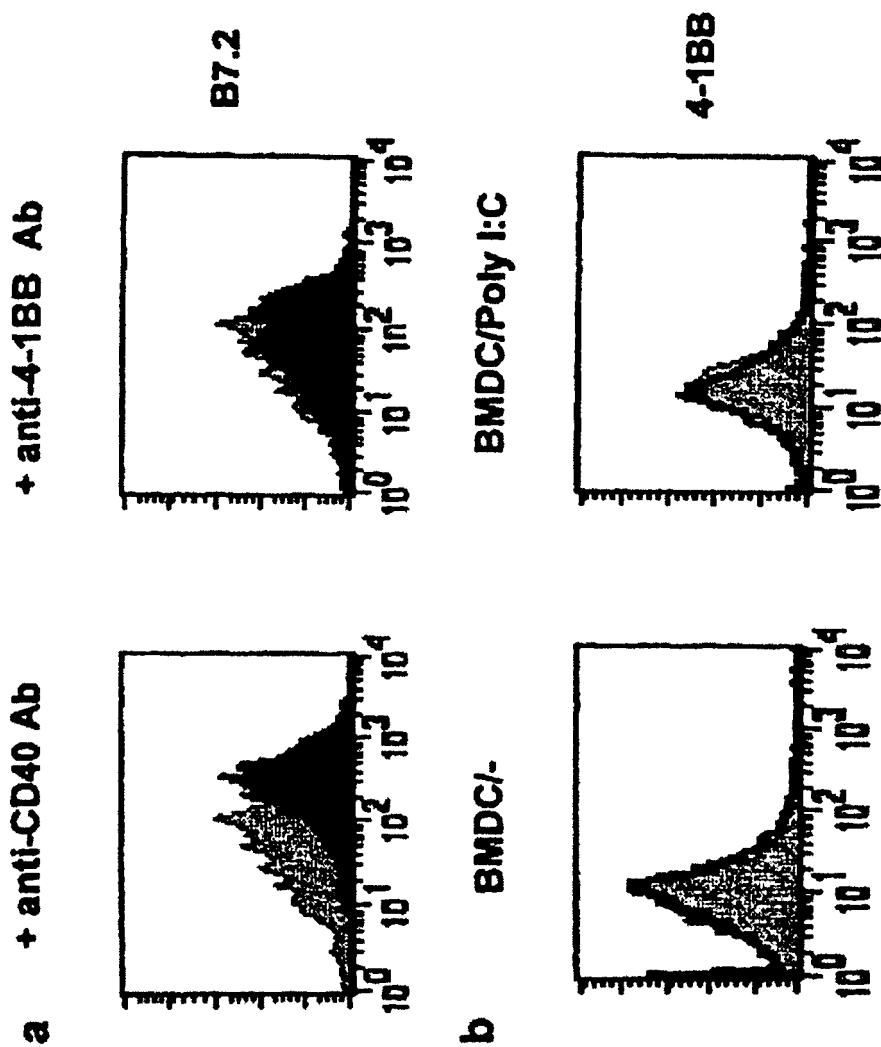


Fig 11a

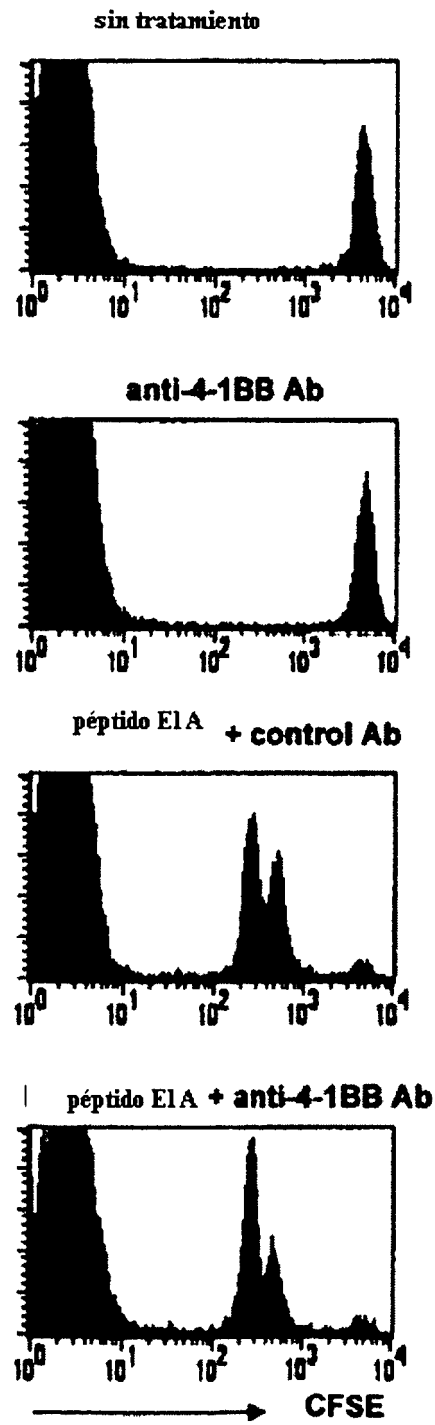


Fig 11b

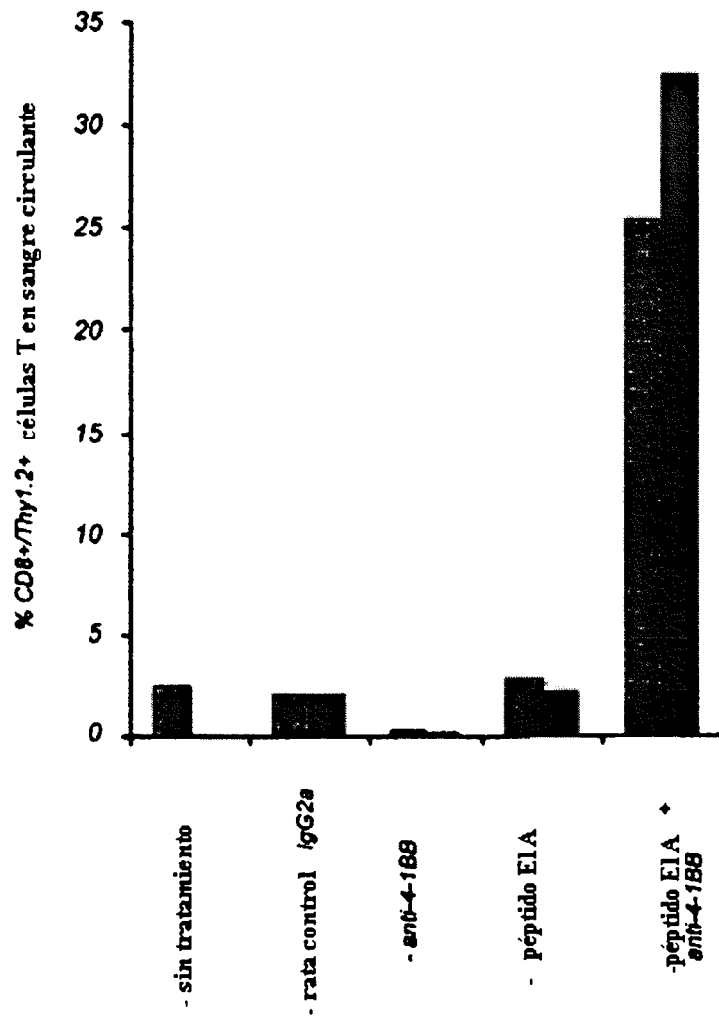


Fig 12

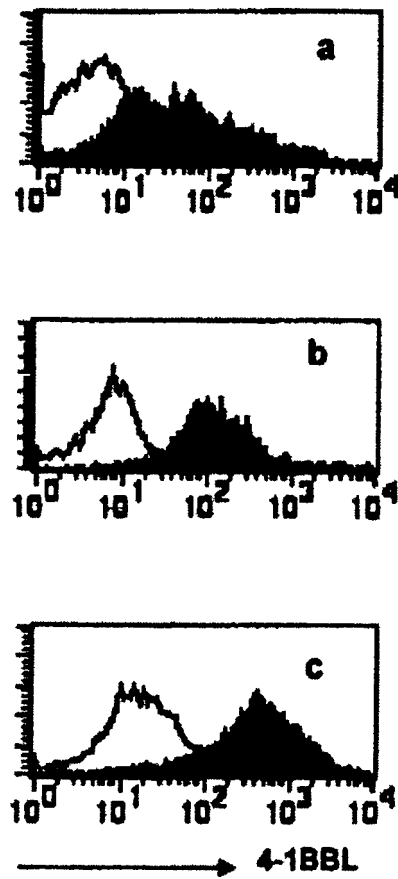


Fig 13

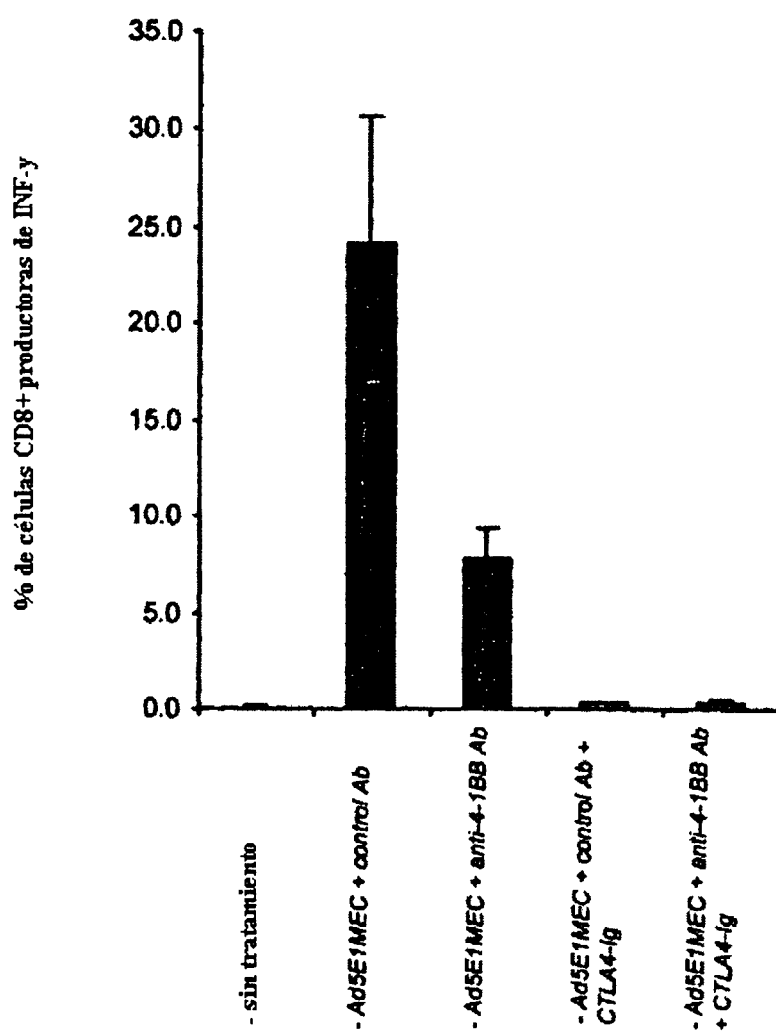


Fig 14

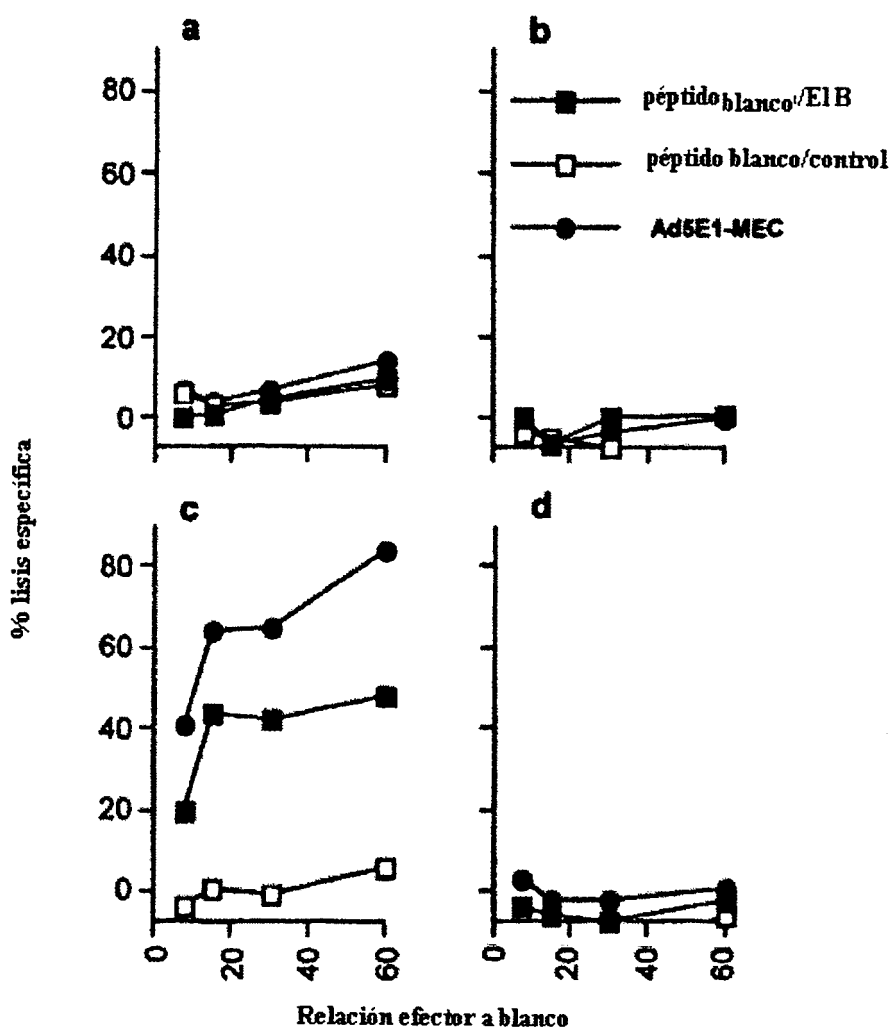


Fig 14e

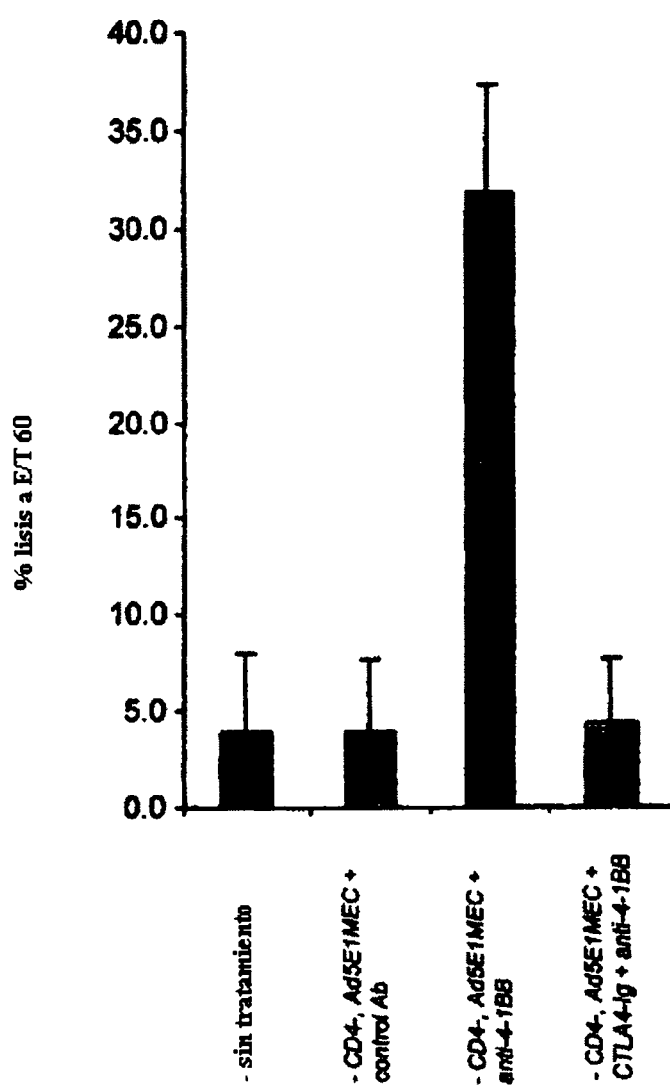


Fig 15

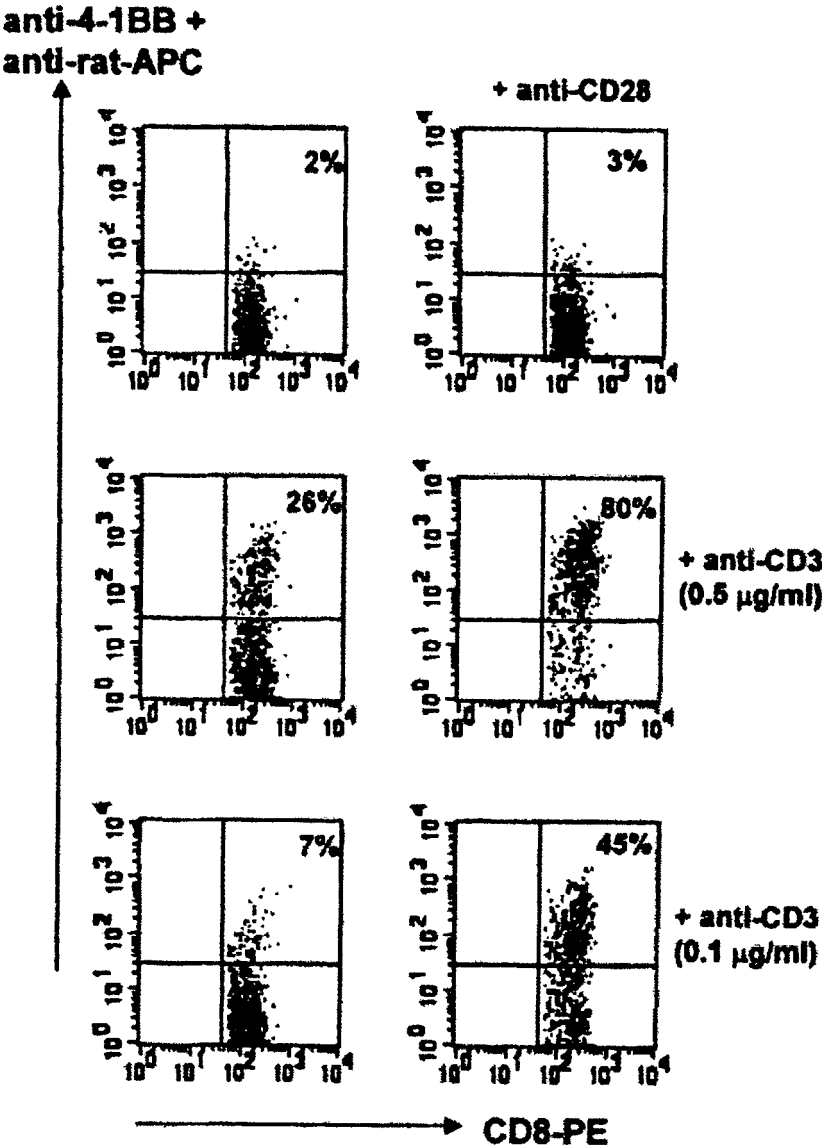


Fig 16

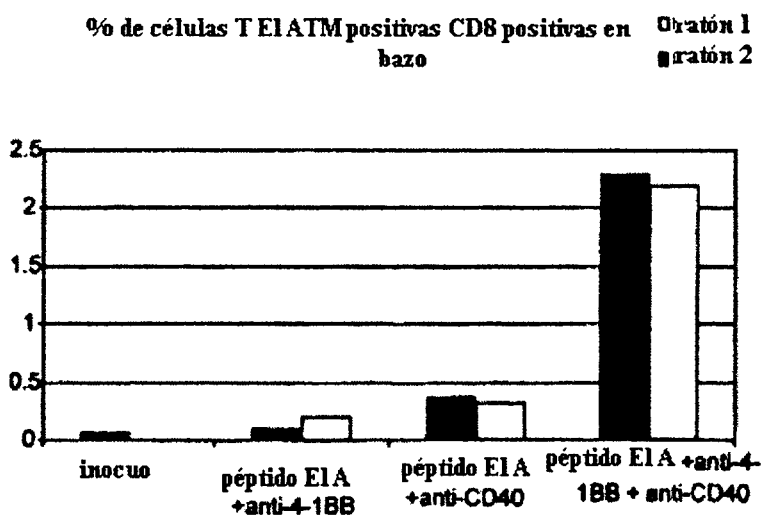
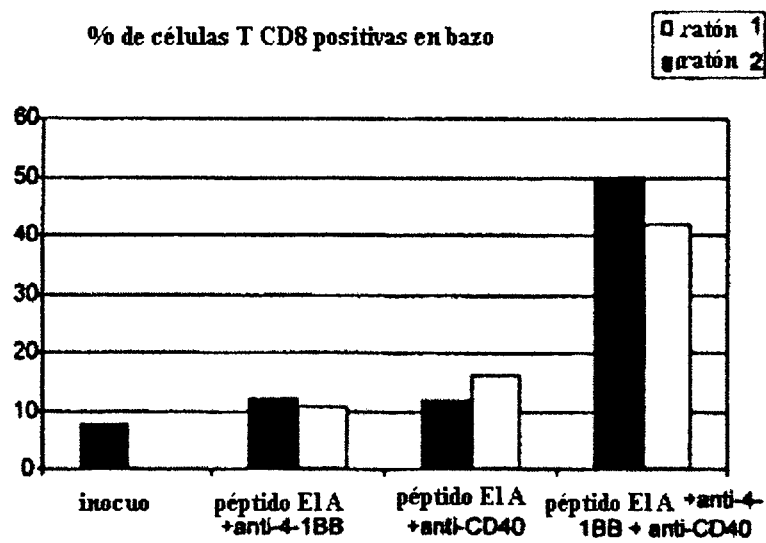
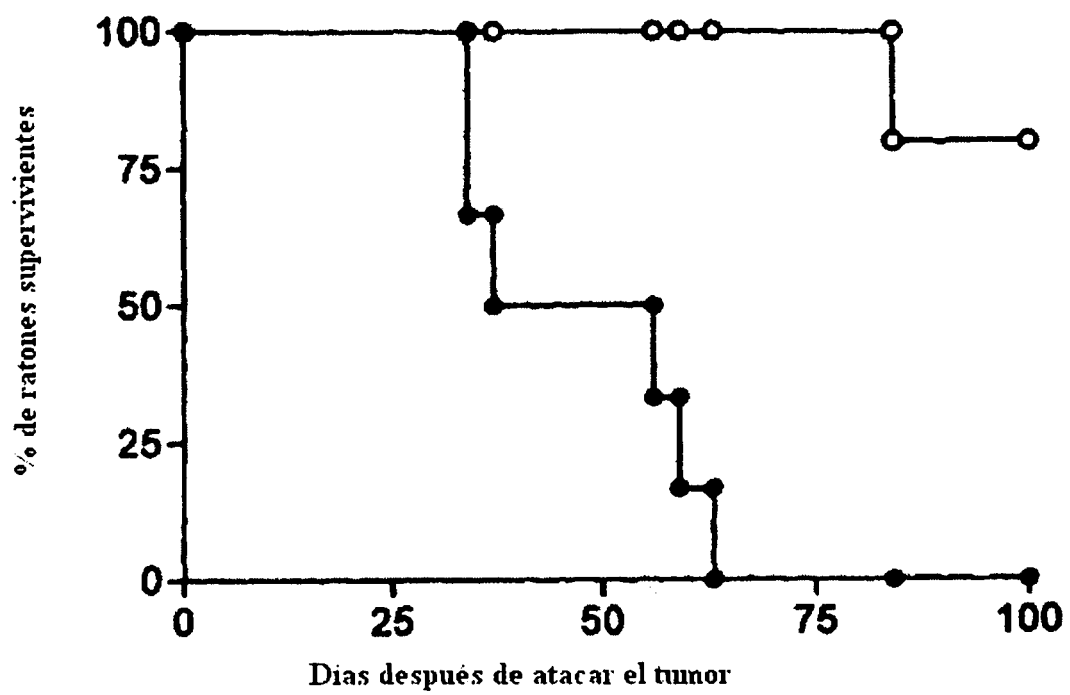


Fig 17



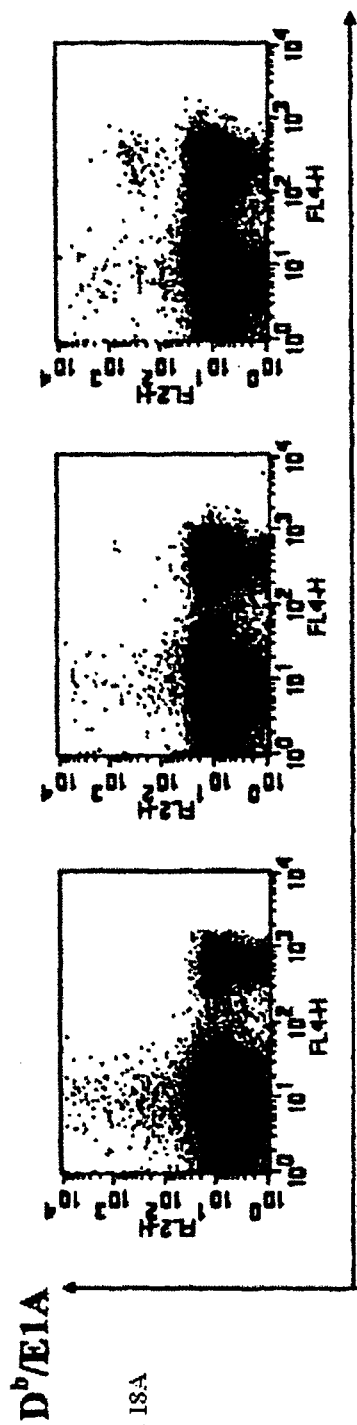


Fig. 18A

CD8

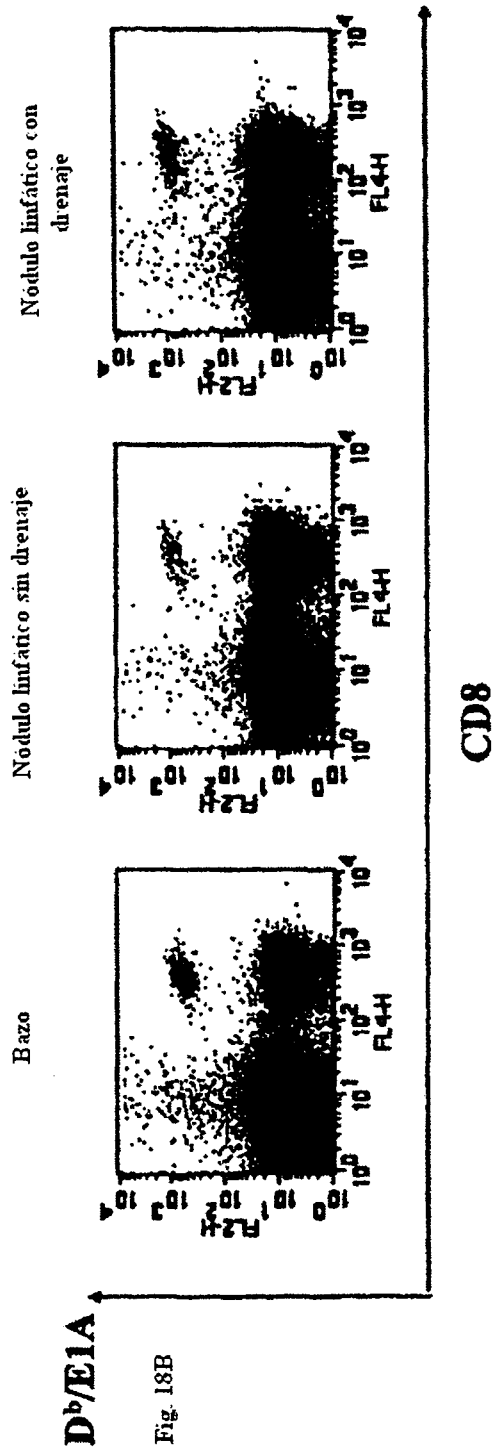


Fig. 18B

Fig 18c

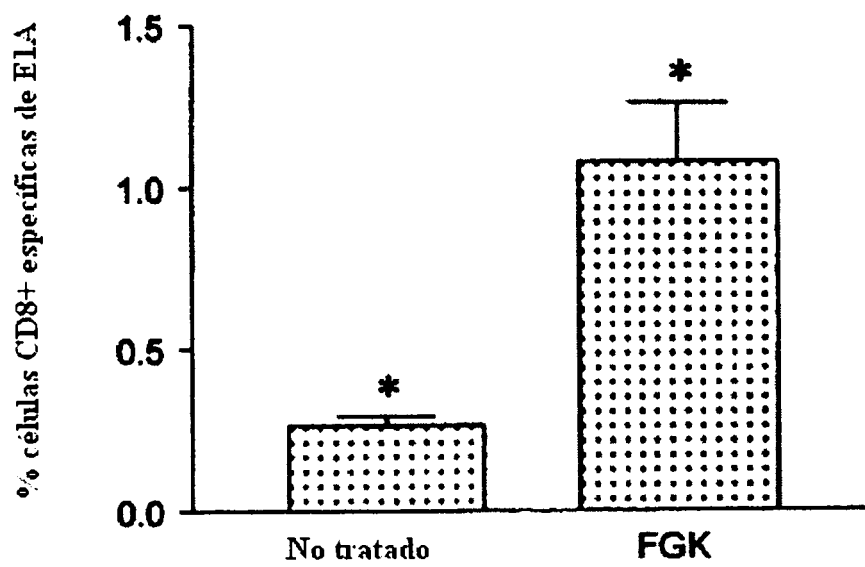


Fig 19

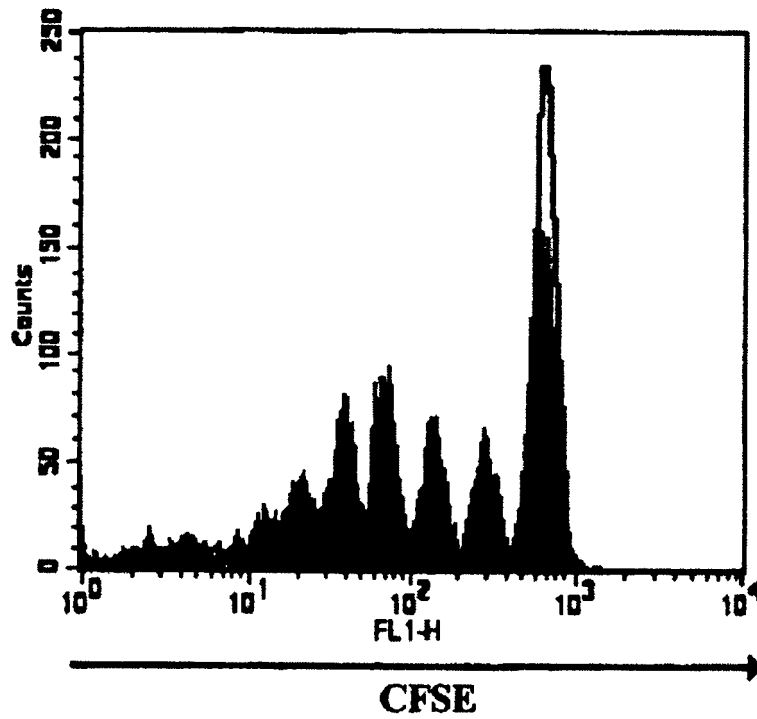


Fig 20

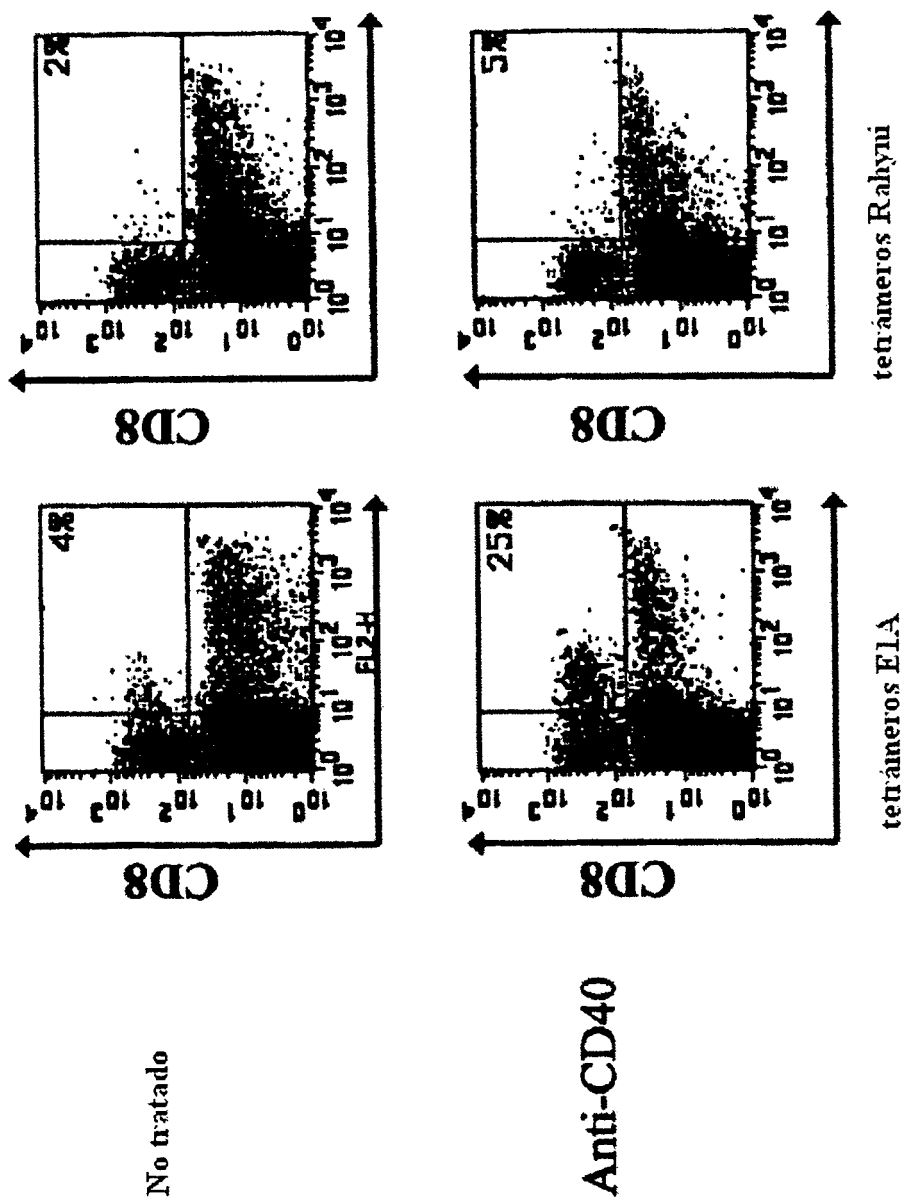


Fig 21a

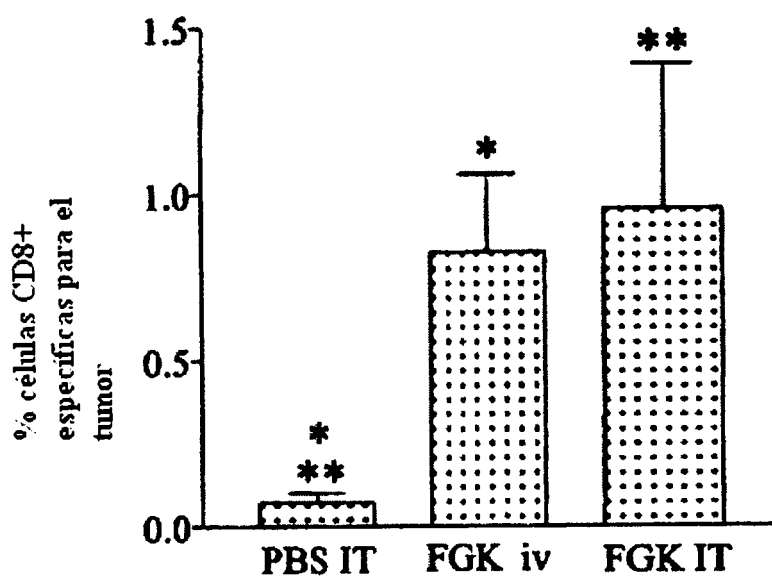


Fig 21b

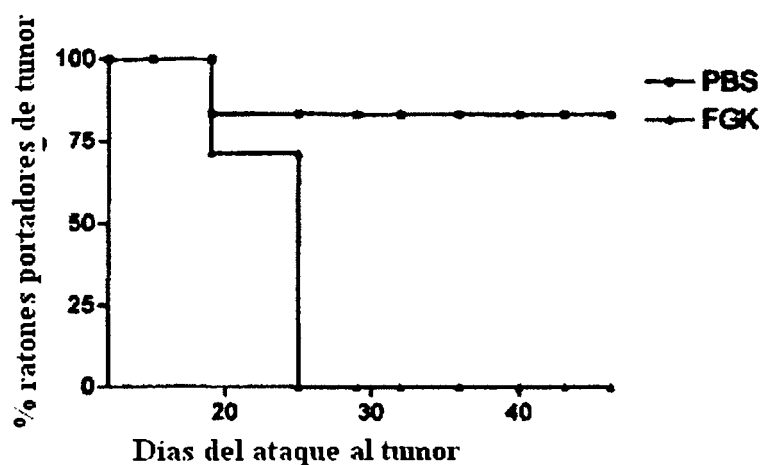


Fig 21c

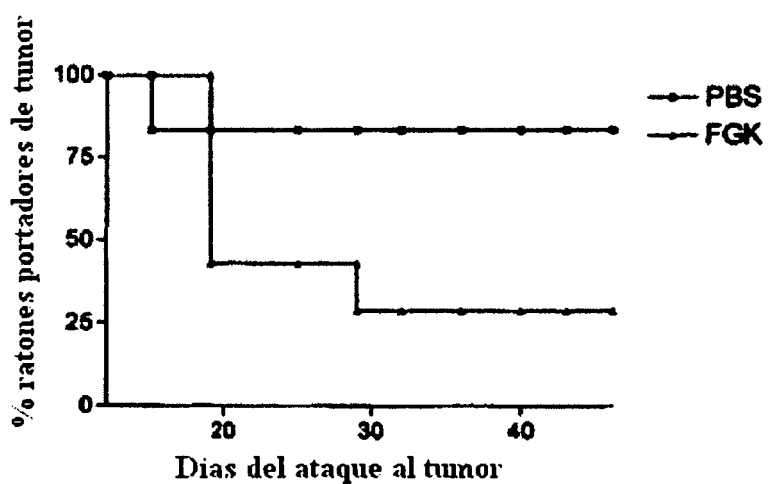


Fig 22

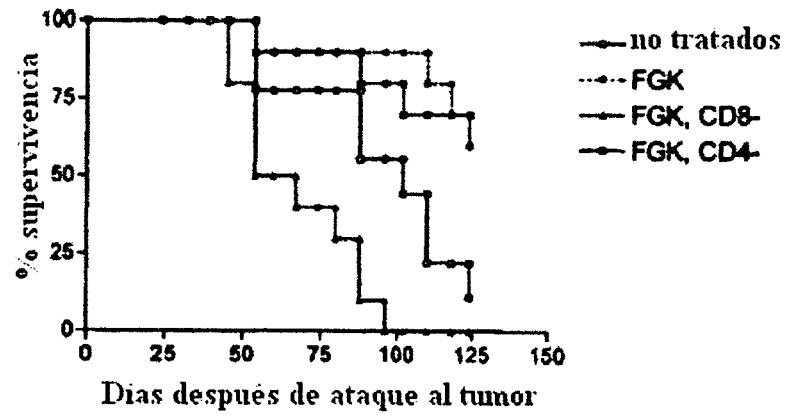


Fig 23

