

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 673**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.12.2013 PCT/US2013/072918**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2014 WO14089113**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2013 E 13811698 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.01.2019 EP 2925350**

54 Título: **Mejora de la actividad anticancerosa de proteínas de fusión FC inmunomoduladoras**

30 Prioridad:

03.12.2012 US 201261732760 P

15.03.2013 US 201361801187 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2019

73 Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US

72 Inventor/es:

ENGELHARDT, JOHN, J.;
KORMAN, ALAN, J.;
QUIGLEY, MICHAEL;
SELBY, MARK, J. y
WANG, CHANGYU

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 715 673 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

Mejora de la actividad anticancerosa de proteínas de fusión FC inmunomoduladoras

- 5 A lo largo de esta solicitud, diversas publicaciones se citan entre paréntesis por el nombre del autor y fecha, o por Patente n.º o Publicación de Patente n.º. Pueden encontrarse citas completas para estas publicaciones al final de la memoria descriptiva inmediatamente antes de las reivindicaciones.

Campo de la invención

- 10 La presente divulgación se refiere a ipilimumab afucosilado, un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 humano, para su uso en el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención

- 15 El sistema inmunitario es capaz de controlar el desarrollo tumoral y de mediar la regresión tumoral. Esto requiere la generación y activación de linfocitos T específicos de antígeno tumoral. Múltiples receptores coestimuladores de linfocitos T y reguladores negativos de linfocitos T, o receptores coinhibidores, actúan en colaboración para controlar la activación, proliferación y aumento o pérdida de función efectora de linfocitos T. Entre las moléculas coestimuladoras y coinhibidoras de linfocitos T más tempranas y mejor caracterizadas se encuentran CD28 y CTLA-4 (Rudd *et al.*, 2009). CD28 proporciona señales coestimuladoras para la implicación de receptores de linfocitos T mediante la unión a ligandos B7-1 y B7-2 en células presentadoras de antígenos, mientras que CTLA-4 proporciona una regulación negativa por descenso de la señal de la proliferación y función de linfocitos T. CTLA-4, que también se une a los ligandos B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), pero con mayor afinidad que CD28, actúa como regulador negativo de la función de linfocitos T a través de rutas tanto celulares autónomas (o intrínsecas) como celulares no autónomas (o extrínsecas). El control intrínseco de la función T efectora CD8 y CD4 (T_{ef}) está mediado por la expresión inducible en la superficie de CTLA-4 como resultado de la activación de linfocitos T y la inhibición de la proliferación de linfocitos T y la proliferación de citocinas por implicación multivalente de ligandos B7 en células opuestas (Peggs *et al.*, 2008).

- 30 Se han identificado otros diversos receptores coestimuladores e inhibidores y ligandos que regulan las respuestas de los linfocitos T. Los ejemplos de receptores estimuladores incluyen el coestimulador inducible de linfocitos T (ICOS), CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), CD27, proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides (GITR) y mediador de entrada de virus del herpes (HVEM), mientras que los ejemplos de receptores inhibidores incluyen muerte programada-1 (PD-1), atenuador de linfocitos B y T (BTLA), dominio de inmunoglobulina y mucina de linfocitos T-3 (TIM-3), gen de activación de linfocitos-3 (LAG-3), receptor de adenosina A2a (A2aR), receptor G1 de tipo lectina de células asesinas (KLRG-1), receptor 2B4 de linfocitos citolíticos naturales (CD244), CD160, inmunorreceptor de linfocitos T con dominios Ig e ITIM (TIGIT) y el receptor del supresor de la activación de linfocitos T con dominio V de Ig (VISTA), (Mellman *et al.*, 2011; Pardoll, 2012b; Baitsch *et al.*, 2012). Estos receptores y sus ligandos proporcionan dianas para agentes terapéuticos diseñados para estimular o prevenir la supresión, de una respuesta inmunitaria para atacar de esta manera células tumorales (Weber, 2010; Flies *et al.*, 2011; Mellman *et al.*, 2011; Pardoll, 2012b). Los receptores o ligandos de receptores estimuladores son dianas de agentes agonistas, mientras que los receptores o ligandos de receptores inhibidores son dianas de agentes bloqueantes. Entre los enfoques más prometedores para mejorar la actividad antitumoral inmunoterapéutica se encuentra el bloqueo de los denominados “puntos de control inmunitarios”, que se refiere a la plétora de rutas de señalización inhibitoras que regulan el sistema inmunitario y son esenciales para mantener la autotolerancia y modular la duración y amplitud de respuestas inmunitarias fisiológicas en tejidos periféricos para minimizar lesiones tisulares colaterales (véase, por ejemplo, Weber, 2010; Pardoll 2012b). Como muchos de los puntos de control inmunitarios se inician por interacciones ligando-receptor, pueden bloquearse fácilmente por anticuerpos o modularse por formas recombinantes de ligandos o receptores.

- Los anticuerpos anti-CTLA-4, cuando se entrecruzan, suprimen la función de los linfocitos T *in vitro* (Krummel y Allison, 1995; Walunas *et al.*, 1994). Los linfocitos T reguladores (T_{reg}), que expresan CTLA-4 de manera constitutiva, controlan la función de los linfocitos T efectores (T_{ef}) de una manera no autónoma de la célula. Los T_{reg} que son deficientes en CTLA-4 tienen deteriorada la función supresora (Wing *et al.*, 2008) y los anticuerpos que bloquean la interacción de CTLA-4 con B7 pueden inhibir la función de los T_{reg} (Read *et al.*, 2000; Quezada *et al.*, 2006). Más recientemente, También se ha demostrado que los T_{ef} controlan la función de los linfocitos T por medio de rutas extrínsecas (Corse *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). El control extrínseco de la función de los linfocitos T por T_{reg} y T_{ef} se realiza por medio de la capacidad de células positivas para CTLA-4 de retirar ligandos B7 en células presentadoras de antígeno, limitando de esta manera su potencial coestimulador (Qureshi *et al.*, 2011; Onishi *et al.*, 2008). Se cree que el bloqueo por anticuerpos de interacciones CTLA-4/B7 promueve la activación de linfocitos T_{ef} al interferir con señales negativas transmitidas por la implicación de CTLA-4; este control intrínseco de activación y proliferación de linfocitos T puede promover la proliferación de linfocitos tanto T_{ef} como T_{reg} (Krummel y Allison, 1995; Quezada *et al.*, 2006). En los primeros estudios con modelos animales, se demostró que el bloqueo con anticuerpos de CTLA-4 exacerbaba la autoinmunidad (Perrin *et al.*, 1996; Hurwitz *et al.*, 1997). Por extensión a la inmunidad tumoral, la capacidad de anti-CTLA-4 de provocar regresión de tumores establecidos proporcionó un ejemplo

impresionante del potencial terapéutico del bloqueo de CTLA-4 (Leach *et al.*, 1996).

Se seleccionaron anticuerpos humanos contra CTLA-4 humano, ipilimumab y tremelimumab, para inhibir la interacciones CTLA-4-B7 (Keler *et al.*, 2003; Ribas *et al.*, 2007) y se han ensayado en diversos ensayos clínicos para múltiples malignidades (Hoos *et al.*, 2003; Acierito *et al.*, 2011). A menudo se observaron regresiones tumorales y estabilización de la enfermedad y el tratamiento con estos anticuerpos ha estado acompañado de acontecimientos adversos con infiltrados inflamatorios capaces de afectar a diversos sistemas de órganos. En 2011, ipilimumab, que tiene una región constante de IgG1, se aprobó en los Estados Unidos y en Europa para el tratamiento de melanoma irreseccable o metastásico basándose en una mejoría de la supervivencia global en un ensayo de fase III de pacientes con melanoma avanzado tratados previamente (Hodi *et al.*, 2010).

O'Mahony *et al.*, Clin Cancer Res 2007;13(3), 958-964 informan sobre un estudio piloto de bloqueo de CTLA-4 después del fracaso de una vacuna contra el cáncer en pacientes con malignidad avanzada. Se observó que los T_{reg} detectados por expresión de CD4+CD25+CD62L+ disminuían en puntos de tiempo tempranos, pero rebotaban a niveles iguales o superiores a los valores de referencia en el momento de la siguiente infusión de ipilimumab.

Se han usado varios anticuerpos diferentes para demostrar la actividad del bloqueo anti-CTLA-4 en modelos de ratón, incluyendo anticuerpos de hámster anti-CTLA-4, 9H10 (IgG2b de hámster sirio [Krummel y Allison, 1995]) y 4F10 (IgG1 de hámster armenio [Walunas *et al.*, 1994]), y el anticuerpo de ratón anti-CTLA-4 de ratón (9D9-IgG2b murino) generado en un ratón transgénico con CTLA-4 humano (Quezada *et al.*, 2006; Peggs *et al.*, 2009). 9D9-IgG2b anti-CTLA-4 se ha ensayado en diversos modelos de tumor subcutáneo de ratón, tales como el fibrosarcoma Sa1N, adenocarcinomas de colon MC38 y CT26, y melanoma B16. A excepción de Sa1N, la monoterapia con anti-CTLA-4 ha mostrado una actividad antitumoral moderada (Quezada *et al.*, 2006; Mitsui *et al.*, 2010). IgG2b murino puede unirse a receptores Fcγ de inmunoglobulina (FcγR), entre los que se incluyen FcγRIIB, FcγRIII y FcγRIV (Nimmerjahn y Ravetch, 2005). Por consiguiente, Es posible que la implicación multivalente de CTLA-4 por 9D9-IgG2b unido a linfocitos T y células positivas para FcγR pueda ocasionar una señal negativa agonista y hacer que este anticuerpo sea menos eficaz en el bloqueo de CTLA-4 que un anticuerpo de bloqueo sin propiedades de unión a FcγR.

Para determinar la potencia relativa de anticuerpos anti-CTLA-4 de ratón en la actividad antitumoral, se generó una serie de variantes de isotipo 9D9 que diferían en su afinidad por FcγR. Los datos presentados en el presente documento iluminan los mecanismos, que implican la reducción de linfocitos T reguladores (T_{reg}) mediante los cuales el bloqueo de CTLA-4 media efectos antitumorales. Se ha demostrado que estos mecanismos se aplican a otras dianas determinadas en linfocitos T, por ejemplo, GITR, OX40 e ICOS, pero no a otras, por ejemplo, PD-1. Una comprensión en desarrollo de la biología proporciona nuevas vías para mejorar la actividad antitumoral de proteínas de fusión Fc que se unen a y alteran la actividad de dianas inmunomoduladoras en linfocitos T, y permite realizar predicciones sobre qué receptores inmunomoduladores pueden establecerse como diana satisfactoriamente por el mecanismo de reducción de T_{reg}.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a ipilimumab afucosilado para su uso en el tratamiento del cáncer.

En el presente documento también se desvela un método para mejorar, optimizar o maximizar la eficacia antitumoral de una proteína de fusión Fc que se une específicamente a una diana, por ejemplo, una diana inmunomoduladora, presente en un linfocito T en un sujeto que padece un cáncer o una enfermedad causada por un agente infeccioso, y altera la actividad de la diana, potenciando de esta manera una respuesta inmunitaria endógena contra células del cáncer o el agente infeccioso, comprendiendo el método seleccionar, diseñar o modificar la región Fc de la proteína de fusión Fc para mejorar la unión de dicha región Fc a un receptor de Fc de activación. De acuerdo con la invención, la proteína de fusión Fc es un anticuerpo anti-CTLA-4. Otros anticuerpos son, por ejemplo, un anticuerpo anti-GITR, anti-OX40, anti-ICOS o anti-CD137. En realizaciones preferidas, la diana se expresa en T_{reg} en el sitio del tumor a un nivel mayor que en T_{ef} en un sitio de tumor.

También se desvela en el presente documento una proteína de fusión Fc que se une específicamente a una diana, por ejemplo, una proteína receptora inmunomoduladora, presente en un linfocito T en un sujeto que padece un cáncer o una enfermedad causada por un agente infeccioso, y altera la actividad de la diana, potenciando de esta manera una respuesta inmunitaria endógena contra células del cáncer o el agente infeccioso, donde la capacidad del anticuerpo de potenciar una respuesta inmunitaria endógena se ha mejorado, optimizado o maximizado por un método que comprende seleccionar, diseñar o modificar la región Fc de la proteína de fusión Fc para mejorar la unión de dicha región Fc a un receptor de Fc de activación.

También se desvela en el presente documento un método para potenciar una respuesta inmunitaria endógena en un sujeto que padece un cáncer o una enfermedad causada por un agente infeccioso para tratar de esta manera al sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión Fc, donde la región Fc de la proteína de fusión Fc se ha seleccionado, diseñado o modificado para mejorar la unión de dicha región Fc a un receptor de Fc de activación.

En el presente documento se desvela adicionalmente un método para inmunoterapia de un sujeto que padece cáncer o una enfermedad causada por un agente infeccioso, comprendiendo dicho método: (a) seleccionar un sujeto que es un candidato adecuado para inmunoterapia, comprendiendo la selección (i) evaluar la presencia de células supresoras de origen mieloide (MDSC) en una muestra de tejido de ensayo y (ii) seleccionar el sujeto como un candidato adecuado basándose en la presencia de MDSC en la muestra de tejido de ensayo; y (b) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión Fc inmunomoduladora al sujeto seleccionado.

Otras características y ventajas de la presente divulgación serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y ejemplos, que no deben considerarse limitantes.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la unión de diferentes isotipos del anticuerpo de ratón anti-CTLA-4 de ratón, 9D9, a células CTLA-4⁺.

La figura 2 muestra un análisis farmacocinético de concentraciones en suero de isotipos de anti-CTLA-4 en ratones C57BL/6.

La figura 3 muestra los efectos de diferentes isotipos del anticuerpo de ratón anti-CTLA-4 de ratón, 9D9, sobre la actividad antitumoral en un modelo de ratón de adenocarcinoma CT26 singénico: A, IgG de ratón de control (anticuerpo humano anti-toxina diftérica con un isotipo de IgG1 de ratón, también usado como control en otros experimentos); B, anti-CTLA-4-γ1D265A; C, anti-CTLA-4-γ2b; D, anti-CTLA-4-γ2a. Se muestra el número de ratones sin tumor (ST) por grupo para cada grupo de 10 ratones.

La figura 4 muestra un análisis de linfocitos T antitumorales como un porcentaje de células CD45⁺ en ratones portadores de tumores CT26 tratados con anti-CTLA-4: A, linfocitos T CD8⁺, B, linfocitos T CD4⁺, C, T_{reg}.

La figura 5 muestra las relaciones antitumorales entre T_{ef} CD8⁺ y T_{reg} (A), y entre T_{ef} CD4⁺ y T_{reg} (B), en ratones portadores de tumores CT26 tratados con anti-CTLA-4.

La figura 6 muestra un análisis de T_{reg} periféricos (ganglio linfático) en ratones portadores de tumores CT26 tratados con anti-CTLA-4.

La figura 7 muestra la actividad antitumoral de cuatro isotipos diferentes de ratón anti-CTLA-4, medida por cambios en los volúmenes tumorales en ratones individuales tratados con estos isotipos, en un modelo tumoral de adenocarcinoma de colon MC38: A, anticuerpo IgG1 de ratón de control; B, IgG1 anti-CTLA-4; C, IgG1D265A anti-CTLA-4; D, IgG2a anti-CTLA-4; D, IgG2b anti-CTLA-4.

La figura 8 muestra los cambios en las medias de volúmenes tumorales (A) y medianas de volúmenes tumorales (B) de tumores de adenocarcinoma de colon MC38 singénicos en grupos de ratones tratados con anticuerpos de ratón anti-CTLA-4 de diferentes isotipos.

La figura 9 muestra un análisis de citometría de flujo de linfocitos infiltrantes de tumor MC38 (TIL) de ratones tratados con anticuerpos anti-CTLA-4 especificados. A, Porcentaje de células CD45⁺ que también son CD4⁺; B, Porcentaje de células CD45⁺ que también son CD8⁺; C, Porcentaje de células CD4⁺ que también son Foxp3⁺.

La figura 10 muestra relaciones entre T_{ef} CD8 y CD4 y T_{reg} en tumores MC38 de ratones tratados con isotipos de IgG anti-CTLA-4 especificados. A, Relación entre T_{ef} CD8 y T_{reg} de TIL (células CD8⁺/células CD4⁺ Foxp3⁺); B, Relación entre T_{ef} CD4 y T_{reg} de TIL (células CD4⁺ Foxp3⁺/células CD4⁺ Foxp3⁺).

La figura 11 muestra la actividad antitumoral de diferentes isotipos anti-CTLA-4 de ratón en un modelo de ratón de fibrosarcoma Sa1N singénico, medida por los cambios en los volúmenes tumorales de ratones individuales tratados con estos isotipos: A, anticuerpo IgG1 de ratón de control; B, IgG2a anti-CTLA-4; C, IgG1D265A anti-CTLA-4.

La figura 12 muestra los cambios en las medias (A) y medianas de volúmenes tumorales (B) de tumores de fibrosarcoma Sa1N singénicos en grupos de ratones tratados con anticuerpos de ratón anti-CTLA-4 de diferentes isotipos.

La figura 13 muestra un análisis de citometría de flujo de TIL de Sa1N de ratones tratados con anticuerpos anti-CTLA-4 especificados. A, Porcentaje de células CD45⁺ que también son CD8⁺; B, Porcentaje de células CD45⁺ que también son CD4⁺; C, Porcentaje de células CD4⁺ que también son Foxp3⁺.

La figura 14 muestra relaciones entre T_{ef} CD8 y CD4 y T_{reg} en injertos de tumores Sa1N singénicos de ratones tratados con isotipos de IgG anti-CTLA-4 especificados. A, Relación entre T_{ef} CD8 y T_{reg} de TIL (células CD8⁺/células CD4⁺ Foxp3⁺); B, Relación entre T_{ef} CD4 y T_{reg} de TIL (células CD4⁺ Foxp3⁺/células CD4⁺ Foxp3⁺).

La figura 15 muestra el reclutamiento dependiente de isotipo de MDSC (A) y la producción de IL-1α (B) en tumores de ratones portadores de tumores MC38 tratados con diferentes isotipos de anticuerpo anti-CTLA-4.

La figura 16 muestra los efectos de isotipos de anti-CTLA-4 sobre la secreción de citocinas Th1/2 intratumorales. A, IFN-γ; B, IL-13; C, TNF-α; D, IL-10.

La figura 17 muestra los efectos de diferentes isotipos del anticuerpo de rata anti-GITR de ratón, DTA-1, sobre la actividad antitumoral medida por cambios en los volúmenes tumorales en ratones individuales tratados con estos isotipos en un modelo de adenocarcinoma de colon MC38: A, anticuerpo IgG1 de ratón de control; B, IgG1 de ratón anti-GITR; C, IgG2b de rata anti-GITR; D, IgG2a de ratón anti-GITR. Se muestra el número de ratones ST por grupo para cada grupo de 10 ratones.

La figura 18 muestra los cambios en las medias (A) y medianas de volúmenes tumorales (B) de tumores MC38 en grupos de ratones tratados con anticuerpos anti-GITR de diferentes isotipos.

La figura 19 muestra un análisis de citometría de flujo de bazos (A-C) y TIL (D-F) de ratones portadores de tumores MC38 tratados con los diferentes isotipos anti-GITR (DTA-1) y anti-CTLA-4 (9D9) y el anticuerpo de

control indicados. A, Porcentaje de linfocitos T CD8⁺ en bazo; B, Porcentaje de células CD4⁺ en bazo; C, Porcentaje de células CD4⁺ que también son Foxp3⁺ en bazo; D, Porcentaje de linfocitos T CD8⁺ en TIL; E, Porcentaje de células CD4⁺ en TIL; F, Porcentaje de células CD4⁺ que también son Foxp3⁺ en TIL.

La figura 20 muestra los efectos de diferentes isotipos del anticuerpo de rata anti-GITR de ratón, DTA-1, modificado dos veces por ingeniería genética para minimizar la agregación, sobre la actividad antitumoral medida por cambios en los volúmenes tumorales en ratones individuales tratados con estos isotipos en un modelo de MC38: A, anticuerpo IgG1 de ratón de control; B, IgG1 de ratón anti-GITR; C, IgG1-D265A de ratón anti-GITR; D, IgG2a de ratón anti-GITR; E, IgG2b de ratón anti-GITR; F, IgG2b de rata anti-GITR. Se muestra el número de ratones ST por grupo para cada grupo de 9 ratones.

La figura 21 muestra los cambios en las medias (A) y medianas de volúmenes tumorales (B) de tumores MC38 en grupos de ratones tratados con anticuerpos anti-GITR de diferentes isotipos modificados por ingeniería genética dos veces.

La figura 22 muestra un análisis de citometría de flujo de los efectos de diferentes isotipos de anti-GITR ("mGITR" modificado dos veces por ingeniería genética DTA-1 o los anticuerpos "DTA-1" modificados por ingeniería genética originalmente) y anti-CTLA-4 (9D9) sobre T_{reg} Foxp3⁺/CD4⁺ en bazos (A) y TIL (B) de ratones portadores de tumores MC38.

La figura 23 muestra la actividad antitumoral de diferentes isotipos anti-GITR de ratón diferentes en un modelo de ratón de fibrosarcoma Sa1N, medida por los cambios en los volúmenes tumorales de ratones individuales tratados con estos isotipos: A, anticuerpo IgG1 de ratón de control; B, IgG2a de ratón anti-GITR; C, IgG2b de rata anti-GITR; D, IgG1 de ratón anti-GITR; E, IgG1-D265A de ratón anti-GITR. Se muestra el número de ratones ST por grupo para cada grupo de hasta 10 ratones.

La figura 24 muestra los cambios en las medias (A) y medianas de volúmenes tumorales (B) de tumores Sa1N en grupos de ratones tratados con anticuerpos anti-GITR (DTA-1) de diferentes isotipos.

La figura 25 muestra los efectos de diferentes isotipos de anti-GITR (DTA-1) y anti-CTLA-4 (9D9) sobre T_{reg} Foxp3⁺/CD4⁺ en bazos (A) y TIL (B) de ratones portadores de tumores Sa1N.

La figura 26 muestra los efectos de la afucosilación de anticuerpos anti-CTLA-4 (9D9) sobre la actividad antitumoral medida por cambios en los volúmenes tumorales en ratones individuales tratados con estos anticuerpos en un modelo de tumor MC38: A, anticuerpo IgG1 de ratón de control; B, IgG1D265A anti-CTLA-4; C, IgG2b anti-CTLA-4; D, IgG2b anti-CTLA-4 no fucosilada (NF); E, IgG2a anti-CTLA-4; F, IgG2a anti-CTLA-4-NF. Se muestra el número de ratones ST por grupo para cada grupo de 12 ratones.

La figura 27 muestra los cambios en las medias (A) y medianas de volúmenes tumorales (B) de tumores MC38 en grupos de ratones tratados con anticuerpos anti-CTLA-4 de diferentes isotipos y variantes no fucosiladas.

La figura 28 muestra la actividad antitumoral de diferentes isotipos anti-OX40 en un modelo de ratón de adenocarcinoma de colon CT26 singénico, medida por los cambios en los volúmenes tumorales de ratones individuales tratados con estos isotipos: A, anticuerpo IgG1 de ratón de control; B, IgG1 de rata anti-OX40; C, IgG1 de ratón anti-OX40; D, IgG2a de ratón anti-OX40. Se muestra el número de ratones ST por grupo para cada grupo de 10 ratones.

La figura 29 muestra la actividad antitumoral de diferentes isotipos de anti-OX40 en un modelo de tumor de ratón CT26 singénico estadificado, medida por los cambios en los volúmenes tumorales de ratones individuales tratados con estos isotipos: A, anticuerpo IgG1 de ratón de control; B, IgG1-D265A de ratón anti-OX40; C, IgG1 de ratón anti-OX40; D, IgG2a de ratón anti-OX40. Se muestra el número de ratones ST por grupo para cada grupo de 8 ratones en grupos que contenían algún ratón ST.

La figura 30 muestra la actividad antitumoral de diferentes isotipos de proteínas de fusión Fc anti-ICOS en un modelo de ratón de sarcoma Sa1N singénico, medida por los cambios en los volúmenes tumorales de ratones individuales tratados con estos isotipos: A, anticuerpo IgG1 de ratón de control; B, proteína de fusión ICOSL-IgG1 de ratón; C, proteína de fusión ICOSL-IgG1 humana; D, anticuerpo IgG2b de rata anti-ICOS de ratón, 17G9. Se muestra el número de ratones ST por grupo para cada grupo de hasta 10 ratones.

La figura 31 muestra los efectos del anticuerpo ICOS anti-ratón, 17G9, sobre T_{reg} Foxp3⁺/CD4⁺ (A) y Foxp3⁺/CD45⁺ (B) en comparación con anticuerpo de control IgG1 en tumores de ratones portadores de tumores MC38.

La figura 32 muestra un primer estudio (experimento n.º 1) de la actividad antitumoral de diferentes isotipos de un anticuerpo anti-PD-1 de ratón en un modelo de ratón de tumor MC38 singénico, medida por los cambios en los volúmenes tumorales de ratones individuales tratados con estos isotipos: A, anticuerpo IgG1 de ratón de control; B, IgG1 anti-PD-1; C, IgG1D265A anti-PD-1; D, IgG2a anti-PD-1. Se muestra el número de ratones ST por grupo para cada grupo de 11 ratones.

La figura 33 muestra los cambios en las medias (A) y medianas de volúmenes tumorales (B) de tumores MC38 en grupos de ratones tratados con anticuerpos anti-PD-1 de diferentes isotipos (experimento n.º 1).

La figura 34 muestra un análisis de citometría de flujo de los efectos de diferentes isotipos de anticuerpos anti-PD-1 sobre el porcentaje de subseries de linfocitos T que se infiltran en un tumor MC38 en ratones portadores de tumores: A, T_{ef} CD8⁺; B, T_{ef} CD4⁺; C, T_{reg} FoxP3⁺/CD4⁺.

La figura 35 muestra el segundo estudio (experimento n.º 2) de la actividad antitumoral de diferentes isotipos de un anticuerpo anti-PD-1 de ratón en un modelo de ratón de tumor MC38 singénico, medida por los cambios en los volúmenes tumorales de ratones individuales tratados con estos isotipos: A, anticuerpo IgG1 de ratón de control; B, IgG1 anti-PD-1; C, IgG1D265A anti-PD-1; D, IgG2a anti-PD-1. Se muestra el número de ratones ST por grupo para cada grupo de 11 ratones.

La figura 36 muestra los cambios en las medias (A) y medianas de volúmenes tumorales (B) de tumores MC38

en grupos de ratones tratados con anticuerpos anti-PD-1 de diferentes isotipos (experimento n.º 2).

Descripción detallada de la invención

5 Ciertos aspectos de la presente divulgación se refieren a métodos para mejorar, optimizar o maximizar la eficacia antitumoral de una proteína de fusión Fc, tal como un anticuerpo, que se une específicamente a una diana, por ejemplo, una diana inmunomoduladora tal como CTLA-4, GITR o ICOS, sobre un linfocito T en un paciente que padece cáncer o una enfermedad infecciosa. Sin embargo, no es necesario que la diana sea una diana inmunomoduladora que esté implicada en la regulación de una respuesta inmunitaria; es aún más importante que
10 sea una diana que se expresa a un alto nivel en T_{reg} en el sitio del tumor en comparación con el nivel de expresión en T_{ef} en el sitio del tumor. Adicionalmente, la diana preferentemente se expresa a un alto nivel en T_{reg} en el sitio del tumor en comparación con el nivel de expresión en T_{reg} y T_{ef} en la periferia. En determinados casos, la diana es un receptor o ligando inmunomodulador y la unión de la proteína de fusión Fc altera la actividad de la diana, potenciando de esta manera una respuesta inmunitaria endógena contra células del cáncer.

15 Los métodos desvelados comprenden seleccionar, diseñar o modificar la región Fc de la proteína de fusión Fc para aumentar la unión de dicha región Fc a un receptor de Fc de activación (FcR). En determinados casos, esta unión aumentada al FcR de activación media una reducción de T_{reg} selectivamente en el sitio del tumor, por ejemplo, por ADCC. Este mecanismo de acción, que implica la reducción selectiva de T_{reg} selectivamente en el sitio del tumor, se ejemplificó por primera vez en diversos modelos tumorales de ratón usando anticuerpos anti-CTLA-4 de ratón que comprendían regiones de Fc variantes correspondientes a diferentes isotipos de IgG. Se demostró que el mecanismo también era operativo con proteínas de fusión Fc que se unen a otros receptores inmunomoduladores entre los que se incluyen los receptores coestimuladores GITR, OX40 e ICOS. Por lo tanto, los métodos de la presente invención no están limitados a anticuerpos anti-CTLA-4, sino que también se aplican a anticuerpos y otras
20 proteínas de fusión Fc que se unen a diversos receptores, entre los que se incluyen GITR, OX40 e ICOS. El mecanismo subyacente de este fenómeno de reducción de T_{reg} sugiere que CD137 y TIGIT también son buenas dianas, mientras que es poco probable que ciertos receptores, entre los que se incluyen PD-1, LAG-3, TIM-3 y CD27, sean dianas adecuadas.

30 En el presente documento se desvela una proteína de fusión Fc que se une específicamente a una diana inmunomoduladora en un linfocito T en un sujeto que padece un cáncer o una enfermedad causada por un agente infeccioso, habiéndose mejorado la actividad antitumoral o anti-agente infeccioso de dicha proteína de fusión Fc por los métodos desvelados en el presente documento.

35 También se desvelan en el presente documento métodos para potenciar una respuesta inmunitaria endógena en un paciente que padece un cáncer o una enfermedad causada por un agente infeccioso para tratar de esta manera al paciente, comprendiendo los métodos administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión Fc antitumoral o anti-agente infeccioso, donde la capacidad de la proteína de fusión Fc de potenciar una respuesta inmunitaria endógena contra células del cáncer o anti-agente infeccioso se ha mejorado por cualquiera de
40 los métodos desvelados en el presente documento.

Términos

45 Con el fin de que se pueda entender más fácilmente la presente divulgación, primero se definen determinados términos. Tal como se usa en la presente solicitud, excepto cuando se indica expresamente otra cosa en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tendrá el significado expuesto a continuación. A lo largo de la solicitud se exponen otras definiciones adicionales.

50 "Administración" se refiere a la introducción física de una composición que comprende un agente terapéutico en un sujeto, usando cualquiera de los diversos métodos y sistemas de liberación conocidos por los expertos en la materia. Las vías de administración preferidas para los anticuerpos de la invención incluyen la vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, espinal u otras vías de administración parentales, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La frase "administración parenteral", como se usa en el presente documento, significa modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin
55 limitación, inyección e infusión intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intratecal, intralinfática, intralesional, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal, así como electroporación *in vivo*. Como alternativa, un anticuerpo de la invención se puede administrar por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.
60 La administración también se puede realizar, por ejemplo, una vez, multitud de veces, y/o durante uno o más períodos prolongados.

Un "anticuerpo" (Ab) incluirá, sin limitación, una glicoproteína inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno y comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una parte de unión a antígeno de la misma. Cada cadena H comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como Vh) y una región constante de cadena pesada. La región

constante de cadena pesada comprende tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno.

Los anticuerpos normalmente se unen específicamente a su antígeno afin con alta afinidad, reflejada por una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-11} M^{-1} o menor. En general, se considera que cualquier K_D mayor de aproximadamente 10^{-4} M^{-1} indica unión no específica. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo que "se une específicamente" a un antígeno se refiere a un anticuerpo que se une al antígeno y a antígenos sustancialmente idénticos con alta afinidad, lo que significa que tiene una K_D de 10^{-7} M o menos, preferentemente de 10^{-8} M o menos, incluso más preferentemente de 5×10^{-9} M o menos y, aún más preferentemente, comprendida entre 10^{-8} M y 10^{-10} M o menos, pero no se une con alta afinidad a antígenos no relacionados. Un antígeno es "sustancialmente idéntico" a un antígeno dado si presenta un alto grado de identidad de secuencia con el antígeno dado, por ejemplo, si presenta al menos un 80 %, al menos un 90 %, preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 97 %, o incluso más preferentemente al menos un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia del antígeno dado. A modo de ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a CTLA-4 humano también puede tener reactividad cruzada con antígenos CTLA-4 de ciertas especies de primate, pero es posible que no reaccione de forma cruzada con antígenos CTLA-4 de ciertas especies de roedores o con un antígeno distinto de CTLA-4, por ejemplo, un antígeno PD-1 humano.

La inmunoglobulina puede proceder de cualquiera de los isotipos conocidos comúnmente, incluyendo, pero sin limitaciones, IgA, IgA secretora, IgG e IgM. El isotipo de IgG puede dividirse en subclases en ciertas especies: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 en seres humanos, e IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 en ratones. "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por los genes de la región constante de cadena pesada. "Anticuerpo" incluye, a modo de ejemplo, tanto anticuerpos de origen natural como anticuerpos no naturales; anticuerpos monoclonales y policlonales; anticuerpos quiméricos y humanizados; anticuerpos humanos o no humanos; anticuerpos completamente sintéticos; y anticuerpos monocatenarios.

Un "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a CTLA-4 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de CTLA-4). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a CTLA-4 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de CTLA-4 de especies diferentes. Por otra parte, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o agentes químicos. En comparación, un ácido nucleico "aislado" se refiere a una composición de materia de ácido nucleico que es notablemente diferente, es decir, tiene una identidad química, naturaleza y utilidad distintiva de los ácidos nucleicos como existen de manera natural. Por ejemplo, un ADN aislado, a diferencia del ADN nativo, es una parte autónoma de un ADN nativo y no una parte integral de un complejo estructural de mayor tamaño, el cromosoma, que se encuentra de forma natural. Además, un ADN aislado, a diferencia del ADN nativo, puede usarse como un cebador de PCR o una sonda de hibridación para, entre otras cosas, medir la expresión génica y detectar mutaciones o genes biomarcadores para diagnosticar enfermedades o predecir la eficacia de un agente terapéutico. Un ácido nucleico también puede purificarse para liberarse sustancialmente de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, usando técnicas convencionales bien conocidas en este campo.

Las frases "un anticuerpo anti-antígeno", "un anticuerpo que reconoce a un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en el presente documento con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

La expresión "anticuerpo monoclonal" ("mAc") se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una sola composición molecular, es decir, moléculas de anticuerpo cuyas secuencias primarias son esencialmente idénticas y que presentan una sola especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando técnicas de hibridoma, recombinantes, transgénicas u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Un anticuerpo "humano" (HuMAb) se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables en las que tanto las regiones marco como las CDR provienen de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también proviene de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como de un ratón,

se han injertado en secuencias marco humanas. Las expresiones anticuerpos "humanos" y "completamente humanos" se usan como sinónimos.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo en el que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de los dominios CDR de un anticuerpo no humano se han reemplazado con aminoácidos correspondientes derivados de moléculas de inmunoglobulina humana. En un caso de una forma humanizada de un anticuerpo, algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de los dominios CDR se han reemplazado con aminoácidos de inmunoglobulinas humanas, mientras que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos dentro de una o más regiones CDR no cambian. Son permisibles pequeñas adiciones, deleciones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos siempre que no anulen la capacidad del anticuerpo de unirse a un antígeno particular. Un anticuerpo "humanizado" conserva una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original.

Un "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que las regiones variables proceden de una especie y las regiones constantes proceden de otra especie, tal como un anticuerpo en el que las regiones variables proceden de un anticuerpo de ratón y las regiones constantes proceden de un anticuerpo humano.

Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo entero, que incluye generalmente la "parte de unión a antígeno" ("fragmento de unión a antígeno") de un anticuerpo intacto que conserva la capacidad de unirse específicamente al antígeno al que se une el anticuerpo intacto, o la región Fc de un anticuerpo que conserva la capacidad de unión a FcR.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" (ADCC) se refiere a una reacción mediada por células *in vitro* o *in vivo*, en la que células citotóxicas no específicas que expresan FcR (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), macrófagos, neutrófilos y eosinófilos) reconocen un anticuerpo unido a un antígeno de la superficie en una célula diana y posteriormente provocan lisis de la célula diana. En principio, puede activarse cualquier célula efectora con un FcR de activación para que medie ADCC.

Una "proteína de unión" se refiere a una proteína que se une específicamente a un resto particular o diana con alta afinidad. Los ejemplos de proteínas de unión incluyen, pero sin limitación, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo, adnectinas, minicuerpos, aficuerpos, aflinas, la región de unión a la diana de un receptor, moléculas de adhesión celular, ligandos, enzimas, citocinas y quimiocinas. En casos preferidos de la presente invención, una proteína de unión comprende una región Fc de un anticuerpo.

Un "cáncer" se refiere a un grupo amplio de diversas enfermedades caracterizado por el crecimiento incontrolado de células anómalas en el cuerpo. La división y el crecimiento celular no regulados tienen como resultado la formación de células o tumores malignos que invaden tejidos vecinos y también pueden metastatizar a partes distantes del cuerpo a través del sistema linfático o el torrente sanguíneo.

Un "receptor de la superficie celular" se refiere a moléculas y complejos de moléculas que pueden recibir una señal y transmitir dicha señal a través de la membrana plasmática de una célula. Los ejemplos de receptores de la superficie celular de la presente divulgación incluyen CTLA-4, GITR, OX40, ICOS, PD-1, CD127, TIGIT y FcR.

Una "célula efectora" se refiere a una célula del sistema inmunitario que expresa uno o más FcR y media en una o más funciones efectoras. Preferentemente, la célula expresa al menos un tipo de un receptor de Fc de activación, tal como, por ejemplo, FcγRIII humano y realiza la función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), linfocitos NK, monocitos, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos.

Una "función efectora" se refiere a la interacción de una región Fc de anticuerpo con un receptor de Fc o ligando, o un acontecimiento bioquímico que resulta de la misma. Los ejemplos de "funciones efectoras" incluyen unión con C1q, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), unión a receptor Fc, funciones efectoras mediadas por FcγR tales como ADCC y fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP), y regulación negativa de un receptor de la superficie celular (por ejemplo, el receptor de linfocitos B; BCR). Dichas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo).

Una "proteína de fusión Fc", usada indistintamente en el presente documento con una "proteína de unión que comprende una región Fc", se refiere a una proteína que incluye dentro de su estructura una proteína de unión unida operativamente a una región Fc. La parte no Fc de una proteína de fusión Fc media en la unión a la diana y es funcionalmente análoga a, por ejemplo, las regiones variables de un anticuerpo. Los ejemplos bien conocidos de proteínas de unión que comprenden una región Fc incluyen anticuerpos e inmunoadhesinas.

Un "receptor de Fc" o "FcR" es un receptor que se une a la región Fc de una inmunoglobulina. Los FcR que se unen a un anticuerpo IgG comprenden receptores de la familia FcγR, incluyendo variantes alélicas y las formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. La familia FcγR consiste en tres receptores de activación (FcγRI, FcγRIII y FcγRIV en ratones; FcγRIA, FcγRIIA y FcγRIIIA en seres humanos) y un receptor inhibidor (FcγRIIB). En la tabla 1

se resumen diversas propiedades de FcγR humanos. La mayoría de los tipos de células efectoras innatas coexpresan uno o más FcγR de activación y el FcγRIIB inhibidor, mientras que los linfocitos citolíticos naturales (NK) expresan selectivamente un receptor de Fc de activación (FcγRIII en ratones y FcγRIIIA en seres humanos) pero no el FcγRIIB inhibidor en ratones ni en seres humanos.

Una "región Fc" (región de fragmento cristizable) o "dominio Fc" o "Fc" se refiere a la región C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo que media en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedador, incluyendo la unión a receptores de Fc localizados en varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) o al primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Por lo tanto, la región Fc es un polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de región constante de inmunoglobulina. En los isotipos de anticuerpo IgG, IgA e IgD, la región Fc está compuesta por dos fragmentos de proteína idénticos, derivados del segundo (CH₂) y tercer (CH₂) dominios constantes de las dos cadenas pesadas del anticuerpo; las regiones Fc de IgM e IgE contienen tres dominios constantes de cadena pesada (dominios CH₂-4) en cada cadena polipeptídica. En el caso de IgG, la región Fc comprende dominios de inmunoglobulina Cy2 y Cy3 y la bisagra entre Cy1 y Cy2. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana, como se define normalmente, se extiende desde un resto de aminoácido en la posición C226 o P230 hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada, donde la numeración está de acuerdo con el índice EU de Kabat. El dominio CH₂ de una región Fc de IgG humana se extiende desde aproximadamente el aminoácido 231 a aproximadamente el aminoácido 340, mientras que el dominio CH₃ está situado en el lado C-terminal de un dominio CH₂ en una región Fc, es decir, se extiende desde aproximadamente el aminoácido 341 a aproximadamente el aminoácido 447 de una IgG. Como se usa en el presente documento, la región Fc puede ser un Fc de secuencia nativa o un Fc variante. Fc también puede referirse a esta región aislada o en el contexto de un polipéptido o proteína que comprende Fc tal como una "proteína de unión que comprende una región Fc", también denominada "proteína de fusión Fc" (por ejemplo, un anticuerpo o inmunoadhesina).

Tabla 1. Propiedades de FcγR humanos

Fcγ	Variantes alélicas	Afinidad por IgG humana	Preferencia de isotipo	Distribución celular
FcγRI	Ninguna descrita	Alta (K _D -10 nM)	IgG1=3>4>>2	Monocitos, macrófagos, neutrófilos activados, ¿células dendríticas?
FcγRIIA	H131	Baja a media	IgG1>3>2>4	Neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, plaquetas
	R131	Baja	IgG1>3>4>2	
FcγRIIIA	V158	Media	IgG1=3>>4>2	linfocitos NK, monocitos, macrófagos, mastocitos, eosinófilos, ¿células dendríticas?
	F158	Baja	IgG1=3>>4>2	
FcγRIIB	I232	Baja	IgG1=3=4>2	linfocitos B, monocitos, macrófagos, células dendríticas, mastocitos
	T232	Baja	IgG1=3=4>2	

Una "malignidad hematológica" incluye un linfoma, leucemia, mieloma o malignidad linfoide, así como un cáncer de bazo y de ganglios linfáticos. Los linfomas a modo de ejemplo incluyen tanto linfomas de linfocitos B como linfomas de linfocitos T. Los linfomas de linfocitos B incluyen tanto linfomas de Hodgkin como la mayoría de los linfomas no Hodgkin. Los ejemplos no limitantes de linfomas de linfocitos B incluyen linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma folicular, linfoma de tejido linfático asociado a la mucosa, linfoma linfocítico de células pequeñas (coincide con leucemia linfocítica crónica), linfoma de células del manto (MCL), linfoma de Burkitt, linfoma mediastínico de linfocitos B grandes, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma nodal de zona marginal de linfocitos B, linfoma esplénico de la zona marginal, linfoma intravascular de linfocitos B grandes, linfoma de derrame primario, granulomatosis linfomatoide. Los ejemplos no limitantes de linfomas de linfocitos T incluyen linfoma extranodal de linfocitos T, linfomas cutáneos de linfocitos T, linfoma anaplásico de células grandes y linfoma angioinmunoblástico de linfocitos T. Las malignidades hematológicas también incluyen leucemia, tal como, pero sin limitación, leucemia secundaria, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica y leucemia linfoblástica aguda. Las malignidades hematológicas también incluyen mielomas, tales como, pero sin limitación, mieloma múltiple y mieloma múltiple indolente. La expresión malignidad hematológica incluye otros cánceres hematológicos y/o asociados con linfocitos B o linfocitos T.

Una "respuesta inmunitaria" se refiere a una respuesta biológica dentro de un vertebrado contra agentes extraños,

protegiendo dicha respuesta al organismo contra estos agentes y contra las enfermedades causadas por ellos. La respuesta inmunitaria está mediada por la acción de una célula del sistema inmunitario (por ejemplo, un linfocito T, linfocito B, linfocito citolítico natural (NK), macrófago, eosinófilo, mastocito, célula dendrítica o neutrófilo) y macromoléculas solubles producidas por cualquiera de estas células o el hígado (incluyendo anticuerpos, citocinas y complemento) que ocasionan direccionamiento selectivo, unión a, daño en, destrucción de y/o eliminación en el cuerpo de un vertebrado de patógenos invasores, células o tejidos infectados por patógenos, células cancerosas u otras células anómalas, o, en los casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Un "inmunomodulador" o "inmunorregulador" se refiere a un componente de una ruta de señalización que puede estar implicada en la modulación, regulación o modificación de una respuesta inmunitaria. "Modulación", "regulación" o "modificación" de una respuesta inmunitaria se refiere a cualquier alteración en una célula del sistema inmunitario o en la actividad de dicha célula. Dicha modulación incluye la estimulación o supresión del sistema inmunitario que puede manifestarse por un aumento o disminución en el número de diversos tipos celulares, un aumento o disminución en la actividad de estas células, o cualquier otro cambio que puede producirse dentro del sistema inmunitario. Se han identificado inmunomoduladores tanto inhibidores como estimuladores, de los que algunos pueden tener una función aumentada en un microentorno tumoral. En casos preferidos de la divulgación, el inmunomodulador está localizado en la superficie de un linfocito T. Una "diana inmunomoduladora" o "diana inmunorreguladora" es un inmunomodulador que se establece como diana para la unión de, y cuya actividad se altera por la unión de, una sustancia, agente, resto, compuesto o molécula. Las dianas inmunomoduladoras incluyen, por ejemplo, receptores en la superficie de una célula ("receptores inmunomoduladores") y ligandos de receptores ("ligandos inmunomoduladores").

Una "proteína de fusión Fc inmunomoduladora" o "proteína de fusión Fc inmunorreguladora" se refiere a una proteína de fusión Fc que se une a un inmunomodulador y, como resultado de esta unión, aumenta o inhibe la cantidad o actividad del inmunomodulador.

"Inmunoterapia" se refiere al tratamiento de un sujeto que padece, o con riesgo de contraer o de padecer una recidiva de, una enfermedad mediante un método que comprende inducir, aumentar, suprimir o modificar de otra forma una respuesta inmunitaria.

"Potenciación de una respuesta inmunitaria endógena" significa el aumento de la eficacia o potencia de una respuesta inmunitaria existente en un sujeto. Este aumento de eficacia y potencia puede conseguirse, por ejemplo, superando mecanismos que suprimen la respuesta inmunitaria endógena del hospedador o estimulando mecanismos que mejoran la respuesta inmunitaria endógena del hospedador.

Una "proteína" se refiere a una cadena que comprende al menos dos restos de aminoácido unidos de manera consecutiva, sin que haya ningún límite superior sobre la longitud de la cadena. Uno o más aminoácidos de la proteína pueden contener una modificación tal como, pero sin limitación, glicosilación, fosforilación o formación de enlaces disulfuro. El término "proteína" se usa indistintamente en el presente documento con "polipéptido".

Una "ruta de transducción de señales" o una "ruta de señalización" se refiere a dos o más agentes químicos y la relación bioquímica entre ellos que interviene en la transmisión de una señal de una célula a otra célula, o de una parte de una célula a otra parte de la célula.

Un "sujeto" incluye cualquier ser humano o animal no humano. La expresión "animal no humano" incluye, pero sin limitación, vertebrados tales como primates no humanos, ovejas, perros, conejos, roedores tales como ratones, ratas y cobayas, especies aviares tales como pollos, anfibios y reptiles. En realizaciones preferidas, el sujeto es un mamífero tal como un primate no humano, oveja, perro, gato, conejo, hurón o roedor. En realizaciones más preferidas de cualquier aspecto de la invención desvelada, el sujeto es un ser humano. Los términos, "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosificación terapéuticamente eficaz" de un fármaco o agente terapéutico, tal como una proteína de fusión Fc de la invención, es cualquier cantidad del fármaco que, cuando se usa solo o en combinación con otro agente terapéutico, promueve la regresión de la enfermedad como se demuestra por una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los periodos sin síntomas de enfermedad, o una prevención del deterioro o discapacidad debida a la enfermedad padecida. Una cantidad o dosificación terapéuticamente eficaz de un fármaco incluye una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "dosificación profilácticamente eficaz", que es cualquier cantidad del fármaco que, cuando se administra solo o en combinación con otro agente terapéutico a un sujeto con riesgo de desarrollar una enfermedad o de padecer una recidiva de una enfermedad, inhibe el desarrollo o recidiva de la enfermedad. La capacidad de un agente terapéutico de promover la regresión de la enfermedad o de inhibir el desarrollo o recidiva de la enfermedad puede evaluarse usando diversos métodos conocidos por el experto en la materia, tal como en sujetos humanos durante ensayos clínicos, en sistemas de modelos animales predictivos de la eficacia en seres humanos, o ensayando la actividad del agente en ensayos *in vitro*.

A modo de ejemplo, un agente anticanceroso promueve la regresión del cáncer en un sujeto.

En realizaciones preferidas, una cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco promueve la regresión del cáncer hasta el punto de eliminar el cáncer. "Promover la regresión del cáncer" significa que la administración de una cantidad eficaz del fármaco, solo o en combinación con un agente antineoplásico, ocasiona una reducción del crecimiento o tamaño del tumor, necrosis del tumor, una reducción en la gravedad de al menos un síntoma de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de periodos sin síntomas de la enfermedad, una prevención del deterioro o discapacidad debida a la enfermedad padecida, o mejoría de otra manera de síntomas de la enfermedad en el paciente. Además, los términos "eficaz" y "eficacia" con respecto a un tratamiento incluyen tanto la eficacia farmacológica como la seguridad fisiológica. La eficacia farmacológica se refiere a la capacidad del fármaco de promover la regresión del cáncer en el paciente. La seguridad fisiológica se refiere al nivel de toxicidad, u otros efectos fisiológicos adversos a nivel celular, de órganos y/o de organismo (efectos adversos) resultantes de la administración del fármaco.

A modo de ejemplo, para el tratamiento de tumores, una cantidad o dosificación terapéuticamente eficaz del fármaco preferentemente inhibe el crecimiento celular o el crecimiento tumoral al menos aproximadamente en un 20 %, más preferentemente al menos aproximadamente en un 40 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente en un 60 % y, aún más preferentemente, al menos aproximadamente en un 80 % con respecto a los sujetos no tratados. En las realizaciones más preferidas, una cantidad o dosificación terapéuticamente eficaz del fármaco inhibe completamente el crecimiento celular o el crecimiento tumoral, es decir, inhibe preferentemente el crecimiento celular o el crecimiento tumoral en un 100 %. La capacidad de un compuesto de inhibir el crecimiento tumoral puede evaluarse en un sistema de modelo animal, tal como los modelos tumorales de ratón adenocarcinoma de colon CT26, adenocarcinoma de colon MC38 y fibrosarcoma Sa1N descritos en el presente documento, que son predictivos de la eficacia en tumores humanos. Como alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto de inhibir el crecimiento celular, pudiendo medirse dicha inhibición *in vitro* mediante ensayos conocidos por el experto en la materia. En otras realizaciones preferidas de la invención, puede observarse regresión tumoral y esta puede continuar durante un periodo de al menos aproximadamente 20 días, más preferentemente al menos aproximadamente 40 días o incluso más preferentemente al menos aproximadamente 60 días.

"Tratamiento" o "terapia" de un sujeto se refiere a cualquier tipo de intervención o proceso realizado en, o la administración de un agente activo al sujeto con el objetivo de invertir, aliviar, mejorar, inhibir, ralentizar o prevenir la aparición, la progresión, el desarrollo, la gravedad o la recidiva de un síntoma, complicación, condición o indicios bioquímicos asociados con una enfermedad.

Efectos del Isotipo de Anticuerpos Anti-CTLA-4 sobre la Eficacia Antitumoral y las Subseries de Linfocitos T

La mayoría de los anticuerpos terapéuticos que se han comercializado son de isotipo IgG1 humana, que puede inducir una fuerte ADCC y CDC en comparación con otros isotipos de anticuerpos humanos. Adicionalmente, los anticuerpos terapéuticos IgG1 tienen estabilidad a largo plazo en la sangre mediada por la unión al receptor de Fc neonatal (FcRn). La actividad de varios anticuerpos terapéuticos, entre los que se incluyen el anti-CD20 rituximab (RITUXAN®) (Dall'Ozzo *et al.*, 2004), anti-Her2 trastuzumab (HERCEPTIN®) (Gennari *et al.*, 2004), anti-factor de necrosis tumoral- α (anti-TNF- α) infliximab (REMICADE®) (Louis *et al.*, 2004) y anti-RhD (Miescher *et al.*, 2004) está mediada, al menos en parte, por ADCC. La CDC también se considera un posible mecanismo antitumoral de rituximab (Idusogie *et al.*, 2000) y alemtuzumab (CAMPATH®) (Crowe *et al.*, 1992). Por lo tanto, no es sorprendente que los esfuerzos por mejorar la eficacia de anticuerpos terapéuticos se hayan centrado recientemente en la mejora de las funciones efectoras, especialmente ADCC y CDC (Natsume *et al.*, 2009). Se han notificado enfoques satisfactorios, en particular, que implican mejorar la actividad de unión de la región Fc de anticuerpos a Fc γ RIIIa o C1q mediante la introducción de mutaciones de aminoácidos en las regiones Fc o mediante la modificación de oligosacáridos unidos a Fc.

Sin embargo, en el caso de agentes, por ejemplo, anticuerpos, que se unen a agentes inmunomoduladores en linfocitos T y aumentan una respuesta de linfocitos T, presumiblemente es indeseable utilizar un anticuerpo que sea citotóxico para los linfocitos T a través de, por ejemplo, ADCC, CDC o ADCP, ya que esto va en contra del objetivo de reforzar la cantidad y actividad de estos linfocitos T en la regulación positiva de la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.682.736, que desvela el anticuerpo anti-CTLA-4 humano, tremelimumab, enseña que "no es preferido utilizar un anticuerpo que destruya las células", y que, en su lugar, es deseable "simplemente inhibir la unión de CTLA-4 con sus ligandos para mitigar la regulación negativa de linfocitos T". La patente identifica además isotipos de anticuerpos, incluyendo IgG1 e IgG3 humanas, con capacidad de CDC, y otros isotipos, incluyendo IgG2 e IgG4 humanas, que no median en la CDC. También se desvela que ciertos isotipos de anticuerpos indeseables, por ejemplo, IgG1 o IgG3 humanas, pueden cambiarse al isotipo deseable IgG2 o IgG4 usando técnicas convencionales bien conocidas en este campo. Consistente con estas enseñanzas, La patente de Estados Unidos n.º 6.682.736 también desvela que la mayoría de los anticuerpos de CTLA-4 analizados en el presente documento, incluyendo tremelimumab, son del isotipo IgG2 humano deseable, que pueden cambiarse fácilmente de isotipo para generar el isotipo también deseable IgG4.

Ahora se reconoce que CTLA-4 ejerce su función fisiológica principalmente a través de dos efectos distintos sobre las dos subseries principales de linfocitos T CD4⁺: (1) modulación negativa de la actividad de linfocitos T auxiliares, y (2) mejora de la actividad inmunosupresora de linfocitos T reguladores (T_{reg}) (Lenschow *et al.*, 1996; Wing *et al.*, 2008; Peggs *et al.*, 2009). Se sabe que los T_{reg} expresan constitutivamente altos niveles de CTLA-4 en la superficie y se ha sugerido que esta molécula es esencial para su función reguladora (Takahashi *et al.*, 2000; Birebent *et al.*, 2004). Por consiguiente, la población de T_{reg} puede ser la más susceptible a los efectos del bloqueo de CTLA-4.

El bloqueo de CTLA-4 ocasiona una amplia activación de respuestas inmunitarias que son dependientes de los linfocitos T auxiliares y, por el contrario, la interacción de CTLA-4 en T_{reg} potencia su función supresora. Por lo tanto, al considerar el mecanismo de acción para el bloqueo de CTLA-4, probablemente son factores importantes tanto la potenciación de la actividad de linfocitos T efectores CD4⁺ como la inhibición de la inmunosupresión dependiente de T_{reg}. Un mecanismo podría ser que el bloqueo de CTLA-4 actúa directamente sobre linfocitos CD4⁺ y/o CD8⁺ eliminando los efectos inhibidores de CTLA-4 y potenciando de esta manera las funciones efectoras. Como alternativa o además, la expresión constitutiva de CTLA-4 en T_{reg} sugiere la posibilidad de que el efecto clínico del bloqueo de CTLA-4 pueda estar mediado por la reducción o bloqueo de T_{reg}. En un estudio dirigido a resolver estos mecanismos alternativos, Maker *et al.* (2005) concluyeron que los efectos antitumorales del bloqueo de CTLA-4 se deben a un aumento de la activación de los linfocitos T en lugar de a una inhibición o reducción de T_{reg}. Véanse, también, O'Mahony y Janik (2006) y Rosenberg (2006). Sin embargo, otro estudio para evaluar las contribuciones independientes del bloqueo por CTLA-4 del compartimento de T_{ef} o T_{reg} concluyó que la combinación de la potenciación directa de la función de T_{ef} y la inhibición concomitante de la actividad de T_{reg} mediante el bloqueo de CTLA-4 en ambos tipos celulares es esencial para mediar los efectos terapéuticos completos de los anticuerpos anti-CTLA-4 durante la inmunoterapia del cáncer (Peggs *et al.*, 2009).

Un aspecto del presente estudio evaluó el efecto del isotipo de un anticuerpo anti-CTLA-4 de ratón sobre la actividad antitumoral del anticuerpo en diversos modelos tumorales de ratón. En primer lugar, se generaron cuatro variantes de un anticuerpo de ratón anti-CTLA-4 de ratón correspondientes a los isotipos IgG1, IgG1D265A mutado, IgG2b e IgG2a, y se demostró que se unían de manera equivalente a células CTLA-4⁺ además de exhibir un comportamiento farmacocinético similar en suero de ratón (ejemplo 1). El ensayo de la actividad antitumoral de los cuatro isotipos de anti-CTLA-4 de ratón en un modelo tumoral de adenocarcinoma de colon CT26 reveló que el tratamiento con IgG2a daba como resultado un rechazo completo del tumor en 9 de 10 ratones tratados, mientras que el isotipo IgG2b producía una inhibición del crecimiento tumoral moderada y el isotipo IgG1D265A mutado mostraba una actividad mínima parecida a la de la IgG de ratón de control (ejemplo 2).

Después se evaluaron los efectos de los diferentes isotipos de anti-CTLA-4 sobre poblaciones de subseries de linfocitos T en tumores y ganglios linfáticos en los que drenaban tumores en el modelo de tumor de ratón adenocarcinoma de colon CT26. El tratamiento de ratones con anticuerpos anti-CTLA-4 dio como resultado un aumento en la población de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ en el sitio del tumor, induciéndose los mayores aumentos por los isotipos IgG2a e IgG2b (ejemplo 4), mientras que el isotipo IgG2a produjo una reducción en la población de linfocitos T auxiliares CD4⁺. Se observaron diferencias marcadas entre los grupos de tratamiento con respecto a los efectos sobre T_{reg}. El tratamiento con el isotipo IgG2a redujo de manera espectacular la población de T_{reg} en el sitio del tumor, mientras que IgG2b no mostró cambios e IgG1D265 produjo aumentos en las cantidades de T_{reg}. El aumento en T_{ef} GD8⁺, junto con el aumento en T_{reg} mediado por el anticuerpo anti-CTLA-4 que tenía el isotipo IgG2a, ocasionó una relación elevada entre T_{ef} y T_{reg} en el sitio del tumor, que es indicativa de una potente actividad antitumoral.

En contraposición a los cambios en las subpoblaciones de linfocitos T en el sitio del tumor, todos los isotipos anti-CTLA-4 se comportaron de manera similar en el aumento de las cantidades de T_{reg} en los ganglios linfáticos en los que drenaban tumores (ejemplo 4), lo cual era inesperado en vista de los estudios anteriores (Quezada *et al.*, 2006; Maker *et al.*, 2005; Rosenberg, 2006). Por lo tanto, el resultado sorprendente fue la demostración de la pérdida de T_{reg} selectivamente en el sitio del tumor. Se demostró que este resultado inesperado no era una peculiaridad del modelo de tumor CT26, ya que también se demostró el mismo patrón en el modelo de tumor de ratón adenocarcinoma de colon MC38 (ejemplos 5 y 6) y el modelo de tumor inmunogénico fibrosarcoma Sa1N (ejemplos 7 y 8). En estos dos modelos de tumor, el isotipo IgG2a produjo el efecto inhibidor más pronunciado sobre el crecimiento tumoral, mientras que mediaba un aumento notable en el porcentaje de linfocitos CD8⁺ y una reducción espectacular concomitante en el nivel de T_{reg}. También se observó el mismo fenómeno con otros anticuerpos, incluyendo anticuerpos agonistas anti-GITR, OX40 e ICOS (ejemplos 10-16), pero no con anticuerpos anti-PD-1 (ejemplo 17). La base molecular de este efecto diferencial de ciertos anticuerpos IgG2a en la mediación de la reducción de T_{reg} en el sitio del tumor frente a la inducción de un aumento en las cantidades de T_{reg} en los ganglios linfáticos puede esclarecerse a partir de datos desvelados en el presente documento. Como se describe en el ejemplo 18, varias dianas de linfocitos T, incluyendo ICOS, GITR, OX40 y CD137 además de CTLA-4, no solo tienen una expresión más alta en los linfocitos T del sitio del tumor en comparación con la periferia, sino que también se expresan preferentemente en T_{reg} en comparación con los niveles de expresión en T_{ef} CD8 y CD4. Además, existen pruebas de una mayor presencia de células, por ejemplo, macrófagos, que expresan FcR de activación, particularmente FcγRIV, en el sitio del tumor en comparación con la periferia (Simpson *et al.*, 2013). Se ha demostrado que dichas células juegan un papel principal en la reducción de T_{reg} tumorales infiltrantes después de la terapia con anticuerpo anti-CTLA-4 (Simpson *et al.*, 2013). Por lo tanto, el isotipo IgG2a de ratón de una proteína de

fusión Fc, por ejemplo, anti-CTLA-4, que se une a FcR de activación y media la ADCC, es eficaz para reducir los linfocitos T que expresan preferentemente la diana del anticuerpo, por ejemplo, T_{reg} en el sitio del tumor que expresan de manera diferencial altos niveles de CTLA-4 en comparación con los niveles de expresión en T_{ef} CD8 y CD4 en el sitio del tumor.

Se han demostrado que las diferencias de isotipo en anticuerpos tienen efectos importantes sobre la actividad biológica de anticuerpos (Nimmerjahn y Ravetch, 2005; Nimmerjahn y Ravetch, 2008; Nimmerjahn y Ravetch, 2010). Se demostró que la actividad antitumoral del anticuerpo TA99 dirigido contra el antígeno específico de tumor, proteína relacionada con tirosinasa-1 (Tyrp1; gp75), requería la unión al receptor de activación FcRIV en el modelo de melanoma murino B16 (Nimmerjahn y Ravetch, 2005). Otras investigaciones posteriores han alcanzado conclusiones contradictorias, encontrando Bevaart *et al.* (2006) un papel imprescindible para FcγRI, pero no la implicación de FcγRIII o FcγRIV, y concluyendo Albanesi *et al.* (2012) que FcγRI y FcγRIII contribuían a los efectos terapéuticos de TA99, mientras que FcγRIV no lo hacía. De forma interesante, la actividad antitumoral de anti-CTLA-4 en los modelos de tumor CT26, MC38 y Sa1N descritos en el presente documento (ejemplos 2, 5 y 7) implica la necesidad de receptores de Fc de activación para la actividad antitumoral. Una unión aumentada al receptor de activación y una unión reducida al receptor inhibidor se correlaciona con la actividad antitumoral de los isotipos de anti-CTLA-4, con la siguiente jerarquía: mlgG2a >> mlgG2b >> mlgG1D265A. Esta jerarquía sigue la relación de actividad de la unión de las regiones Fc de inmunoglobulinas a receptores de Fc de activación frente a los receptores de Fc inhibidores (conocida como relación A/I) definida por Nimmerjahn y Ravetch (2005) y determinada para anticuerpos que median la función de ADCC.

En el caso de anti-CTLA-4, se consigue una actividad antitumoral máxima por la reducción o eliminación de T_{reg} en el sitio del tumor y la activación concomitante de T_{ef} (ejemplos 4, 6 y 8). De forma destacable, aunque los linfocitos T activados expresan CTLA-4, estos no se eliminan mientras que los T_{reg}, que se sabe que expresan niveles constitutivos mayores de anti-CTLA-4 (Read *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2000; Birebent *et al.*, 2004), desaparecen del sitio del tumor. Por lo tanto, el isotipo anti-CTLA-4 murino IgG2a puede reducir al máximo la cantidad de T_{reg} en comparación con los otros isotipos, mientras que conserva los T_{ef} activados que median la respuesta antitumoral. Por consiguiente, el isotipo IgG2a puede potenciar la actividad de células efectoras antitumorales mientras que también reduce específicamente una población de células que inhiben la respuesta antitumoral. cada una de estas poblaciones de linfocitos T, que se ve afectada de manera diferencial por el anticuerpo anti-CTLA-4 IgG2a, es fundamental para controlar el crecimiento tumoral. La sensibilidad diferencial de T_{ef} y T_{reg} a la reducción probablemente se debe a los niveles menores de CTLA-4 expresados en la superficie celular de células efectoras (véase el ejemplo 18; véase también Selby *et al.*, 2013).

Este resultado también sugiere que la composición de células en el microentorno tumoral y los receptores de Fc que expresan son responsables de la actividad antitumoral de anti-CTLA-4. La observación de que los T_{reg} localizados específicamente en el sitio del tumor se reducen en número mientras que los que se localizan en el ganglio linfático se activan por todos los isotipos de anti-CTLA-4 demuestra claramente una diferencia específica de tejido en la actividad de los diferentes isotipos de anti-CTLA-4.

Como se ha indicado, anti-CTLA-4-IgG2a y, en un menor grado, anti-CTLA-4-IgG2b, median la eliminación o reducción de T_{reg} en el sitio del tumor, lo cual es coherente con su capacidad de unirse a FcγR de activación. Esto ocurre con la activación y expansión concomitante de T_{ef} CD8⁺ (y linfocitos T CD8⁺), que probablemente están mediados por la inhibición de interacciones CTLA-4-B7. Sin embargo, los datos desvelados en el presente documento no descartan que la activación de T_{ef} sea únicamente una consecuencia de la reducción de T_{reg}. Por lo tanto, cuando se compara con los otros isotipos, el isotipo IgG2a murino de anti-CTLA-4 es capaz de reducir de manera potente la cantidad de T_{reg}, mientras que conserva los T_{ef} activados que median la respuesta antitumoral. De hecho, el descubrimiento de una secreción aumentada de citocinas efectoras (IFNγ, TNFα e IL-13, y quizás IL-10 (Emmerich *et al.*, 2012; Mumm *et al.*, 2011) en el sitio del tumor es coherente con una pérdida de supresión de T_{reg} y un aumento de efectores CD8 activados.

También debe destacarse la ausencia de actividad antitumoral de los isotipos IgG1 e IgG1-D265A en el tratamiento terapéutico de modelos MC38 y CT26. La inhibición de las interacciones CTLA-4-B7 con IgG1 anti-CTLA-4 o IgG1D265A anti-CTLA-4 conduce a la activación y expansión de T_{reg} en la periferia, mientras que el bloqueo de T_{ef} solo (es decir, en ausencia de eliminación de T_{reg}) es insuficiente para promover una respuesta antitumoral detectable. Además, el bloqueo de CTLA-4 en T_{reg}, aunque ha demostrado disminuir la función de T_{reg} (Quezada *et al.*, 2006; Onishi *et al.*, 2008) tampoco aumenta apreciablemente la actividad antitumoral. Por el contrario, en un modelo de melanoma B16, usando terapia con GVAX anti-CTLA-4 (9H10 de hámster anti-CTLA-4 de ratón), y la reconstitución de ratones receptores irradiados con subseries de linfocitos T que expresan CTLA-4 humano o de ratón, se requirió la expresión de CTLA-4 de ratón tanto en T_{ef} como en T_{reg} para una actividad antitumoral completa (Peggs *et al.*, 2009). Sin embargo, a diferencia de los estudios descritos en el presente documento, el bloqueo anti-CTLA-4 dirigido a T_{ef} solo produjo efectos antitumorales parciales en este modelo.

Efectos de Isotipo de Proteínas de Fusión Fc Distintas de Anticuerpos Anti-CTLA-4 sobre la Eficacia Antitumoral

Después de la demostración de que ciertos isotipos anti-CTLA-4, especialmente el isotipo IgG2a de ratón y, en un

menor grado, IgG2b de ratón, median la eliminación o reducción de T_{reg} en el sitio del tumor, lo cual es coherente con la capacidad de las regiones Fc de unirse a Fc γ R de activación y se correlaciona con la eficacia antitumoral (ejemplos 1-7), se investigaron el efecto del isotipo sobre la actividad antitumoral de anticuerpos adicionales y otras proteínas de fusión Fc.

La actividad antitumoral de diferentes isotipos anti-GITR se evaluó en modelos de ratón de carcinoma de colon singénico MC38 y sarcoma Sa1N (ejemplos 10-12). De forma similar a los resultados obtenidos con anti-CTLA-4, se demostró que los isotipos anti-GITR IgG1 y IgG1D265A esencialmente no tienen actividad antitumoral, mientras que los isotipos IgG2a de ratón e IgG2b de rata (equivalentes a IgG2a de ratón en la unión a FcR de activación) indujeron la mayor inhibición del crecimiento tumoral (ejemplo 11). Los isotipos anti-GITR mG2a, mG2b y rG2b tuvieron poco efecto, o indujeron pequeños aumentos en las poblaciones de T_{reg} en la periferia mientras que indujeron una reducción de T_{reg} significativa en el entorno tumoral, que se correlaciona con la inhibición del crecimiento tumoral (ejemplos 11 y 12). Por el contrario, el isotipo mIgG2a produjo un aumento en el porcentaje de linfocitos CD8⁺ en el sitio del tumor, mientras que mIgG1 e IgG2b de rata no produjeron, o solo produjeron un aumento marginal, en el porcentaje de linfocitos CD8⁺. Ninguno de los isotipos tuvo un impacto importante sobre el nivel de linfocitos CD8⁺ en la periferia. recientemente se han presentado datos similares por Bulliard *et al.* (2013).

En general, se obtuvieron datos similares con isotipos anti-OX40 ensayados en modelos de ratón de tumor singénico CT26 (ejemplo 14), e isotipos anti-ICOS ensayados en modelos de tumor Sa1N y MC38 (ejemplos 15 y 16). Sin embargo, la evaluación de isotipos anti-PD-1 en un modelo de tumor MC38 mostró que mientras que el isotipo anti-PD-1 IgG2a mostraba alguna actividad antitumoral, esta era menor que la actividad presentada por los isotipos anti-IgG1 o IgG1D265A (ejemplo 17). Estos resultados, en los que el isotipo anti-PD-1 IgG2a no potenciaba la actividad antitumoral con respecto a los isotipos IgG1 e IgG1D265A, contrastaron mucho con los resultados obtenidos con anticuerpos IgG2a anti-CTLA-4, GITR, OX40 e ICOS. Además, el isotipo IgG2a anti-PD-1 produjo una reducción en el porcentaje de linfocitos CD8⁺ y un aumento en el porcentaje de T_{reg} en el sitio del tumor en contraste con los isotipos IgG1 e IgG1D265A, que indujo pequeños aumentos en linfocitos CD8⁺ en el sitio del tumor e indujo aumentos más pequeños, con respecto al isotipo IgG2a, en el porcentaje de T_{reg} (ejemplo 17).

Un estudio de los niveles de expresión de diferentes receptores en subseries de linfocitos T en el sitio del tumor y la periferia ayuda a esclarecer los mecanismos subyacentes. Los datos muestran que ciertos receptores de linfocitos T, incluyendo ICOS, GITR, CTLA-4, OX40, CD137, CTLA-4 y TIGIT se expresan a niveles relativamente altos en T_{reg} en el sitio del tumor en comparación con los niveles de expresión en T_{ef} CD8 y CD4 en el sitio del tumor. Estos receptores también se expresan a mayores niveles en los subtipos de linfocitos T en el sitio del tumor en comparación con los niveles de expresión en los mismos tipos de linfocitos T en la periferia. Por el contrario, otros receptores, incluyendo PD-1, LAG-3 y TIM-3 se expresan a niveles mayores en T_{ef} CD8 y/o CD4 en el sitio del tumor en comparación con los niveles de expresión en T_{ef} en el sitio del tumor. CD27 muestra niveles de expresión bastante constantes en diferentes tipos celulares en el sitio del tumor y en la periferia.

Por lo tanto, el isotipo IgG2a de ratón de una proteína de fusión Fc, por ejemplo, anti-CTLA-4, que se une a FcR de activación y media la ADCC, es eficaz para reducir los linfocitos T que expresan preferentemente la diana del anticuerpo, por ejemplo, T_{reg} en el sitio del tumor que expresan de manera diferencial altos niveles de CTLA-4 en comparación con los niveles de expresión en T_{ef} CD8 y CD4 en el sitio del tumor.

Debe mencionarse que el mecanismo de reducción de T_{reg} para potenciar la eficacia antitumoral de una proteína de fusión Fc tal como un anticuerpo es operativa tanto para anticuerpos agonistas que se unen a receptores coestimuladores como para anticuerpos antagonistas que se unen a receptores coinhibidores. Los datos indican que cualquier proteína expresada en la superficie de un linfocito T, independientemente de su función, puede servir como diana para la unión a una región de fusión Fc que presenta una fuerte unión a FcR de activación, por ejemplo, IgG2a en ratones o IgG1 en seres humanos, para inducir la reducción mediada por ADCC de la célula diana. En el caso de una proteína de fusión Fc antitumoral, por ejemplo, un anticuerpo antitumoral, es deseable que la proteína diana se exprese de manera diferencial en T_{reg} en el sitio del tumor a un nivel mayor que en T_{ef} en el sitio del tumor, de tal manera que haya una reducción neta selectiva de T_{reg} en el sitio del tumor y una estimulación concomitante de la respuesta inmunitaria. También es deseable que la proteína diana se exprese diferencialmente en T_{reg} en el sitio del tumor a un nivel mayor que en otros linfocitos T en la periferia de manera que el componente de reducción de T_{reg} de la estimulación de la respuesta inmunitaria esté limitado en gran medida al sitio del tumor. Las proteínas de fusión Fc que se dirigen a ICOS, GITR, CTLA-4, OX40, CD137, CTLA-4 y TIGIT son, por lo tanto, buenos candidatos para potenciar su eficacia anti-tumoral al modificar la región Fc como se ha descrito en el presente documento para potenciar la unión de la región Fc a un FcR de activación. Una proteína de fusión Fc anti-CTLA-4, por ejemplo, un anticuerpo anti-CTLA-4, que se une específicamente a CTLA-4 pero no bloquea su actividad coinhibidora es un buen candidato para obtener por ingeniería genética una eficacia antitumoral aumentada a través de la selección, diseño o modificación de la región Fc para aumentar la unión de dicha región Fc a un receptor de Fc de activación (FcR). Dicha proteína de fusión Fc potenciada puede presentar una alta eficacia anti-tumoral sin algunos de los efectos adversos de estimular la respuesta inmunitaria en la periferia.

Por el contrario, es poco probable que las proteínas de fusión Fc que se dirigen a PD-1, LAG-3, TIM-3 y CD27 sean buenos candidatos para potenciar su eficacia anti-tumoral por los métodos desvelados descritos, ya que estos

receptores tienen una expresión más alta en T_{ef} que en T_{reg} en el sitio del tumor. Los datos obtenidos con anti-PD-1 en el ejemplo 17 justifican esta visión.

Métodos para Potenciar la Eficacia Antitumoral de Proteínas de Fusión Fc Inmunomoduladoras

Los datos desvelados en el presente documento tienen implicaciones para la actividad de anticuerpos anti-CTLA-4 y otras proteínas de fusión Fc que se unen a dianas inmunomoduladoras en linfocitos T incluyendo, pero sin limitación, ligandos de receptores y receptores coestimuladores y coinhibidores, en el tratamiento de pacientes con cáncer. Estos datos también sugieren un posible diseño de anticuerpos anti-inmunorreguladores de mayor potencia.

Ipilimumab, un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 humano, se ha aprobado para el tratamiento de melanoma metastásico y está en ensayo clínico en otros cánceres (Hoos *et al.*, 2010; Hodi *et al.*, 2010; Pardoll, 2012a). Ipilimumab tiene un isotipo IgG1 humano, que es el que mejor se une a la mayoría de los receptores Fc humanos (tabla 1; Bruhns *et al.*, 2009) y se considera equivalente a IgG2a murino con respecto a los tipos de receptores Fc de activación a los que se une. Como IgG1 se une al receptor de activación CD16 (FcγRIIIa) expresado por linfocitos NK humanos y monocitos, ipilimumab puede mediar la ADCC. El ipilimumab de isotipo IgG1 inicialmente se aisló directamente a partir de un hibridoma, pero posteriormente se clonó y se expresó en células de ovario de hámster chino (CHO). Independientemente de la consideración de que un isotipo que media la ADCC y/o la CDC podría ser indeseable en un anticuerpo que se dirige a un receptor en linfocitos T que pretende regular positivamente una respuesta inmunitaria, se conservó el isotipo IgG1 del anticuerpo, en parte, porque potenciaba la respuesta a la vacuna en mono cinomolgo y se consideró funcional. Se ha demostrado que ipilimumab aumenta las cantidades de linfocitos T activados en la sangre, como se demuestra, por ejemplo, por un aumento significativo en la expresión de HLA-DR en la superficie de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ después del tratamiento así como por aumentos en el recuento absoluto de linfocitos (Ku *et al.*, 2010; Attia *et al.*, 2005; Maker *et al.*, 2005; Berman *et al.*, 2009; Hamid *et al.*, 2009), lo que indica que la reducción de linfocitos T no tiene lugar en la periferia en el hombre. Ipilimumab demostró niveles únicamente moderados de ADCC de linfocitos T activados usando PBMC activadas con IL-2 como células efectoras (no publicado); sin embargo, no se ensayó el uso de T_{reg} como dianas. Se han observado cambios minoritarios en la frecuencia de T_{reg} periféricos en la sangre de pacientes tratados con ipilimumab (Maker *et al.*, 2005), pero se dispone de poca información del efecto de ipilimumab sobre T_{reg} intratumorales. Sin embargo, se ha descrito una correlación positiva entre una alta relación entre CD8⁺ y T_{reg} y necrosis tumoral en biopsias de lesiones de melanoma metastásico de pacientes tratados con ipilimumab (Hodi *et al.*, 2008). Además, el tejido tumoral de pacientes con cáncer de vejiga tratados con ipilimumab tuvo menores porcentajes de linfocitos T CD4⁺ Foxp3⁺ que los tumores de pacientes con cáncer de vejiga no tratados (Liakou *et al.*, 2008). Estos resultados son coherentes con los datos desvelados en el presente documento de que ipilimumab media en la reducción de T_{reg} en el sitio del tumor.

Por el contrario, tremelimumab es un isotipo IgG2, que no se une eficazmente a los receptores de Fc, excepto por la variante de FcγRIIIa H131 (Bruhns *et al.*, 2009). Aunque tremelimumab tendría la capacidad de potenciar respuestas de linfocitos T mediante el bloqueo de las interacciones inhibitoras entre CTLA-4 y B7, los datos desvelados en el presente documento sugieren que tremelimumab puede estar limitado en la mediación de la reducción de T_{reg} en el tumor y, basándose en esto, es de esperar que presente una actividad antitumoral reducida en comparación con ipilimumab. Ha sido difícil comparar directamente la actividad clínica de estos dos anticuerpos ya que los regímenes de dosificación para cada uno han sido diferentes (véase, por ejemplo, Ascierto *et al.*, 2011). Tremelimumab, al igual que ipilimumab, tiene actividad antitumoral demostrable (Ribas, 2010). De forma interesante, los estudios sobre el mecanismo de acción de tremelimumab muestran, en un número limitado de muestras analizadas por inmunohistoquímica, que se producen aumentos en linfocitos T CD8 infiltrantes en el tumor como resultado de la terapia, aunque no hay ningún cambio en el número de células Foxp3⁺ en el tumor después de la terapia (Comin-Anduix *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011). Como alternativa, La inhibición de la función de T_{reg} puede realizarse mediante el bloqueo de la interacción CTLA-4/B7.

Basándose en los datos experimentales desvelados en el presente documento en relación con el mecanismo de acción de anticuerpos dirigidos a dianas en linfocitos T, incluyendo anticuerpos anti-CTLA-4, anti-GITR, anti-OX40 y anti-ICOS, y los efectos de isotipo sobre la actividad de esos anticuerpos, la presente divulgación proporciona un método para potenciar, optimizar o maximizar la eficacia antitumoral de una proteína de fusión Fc que se une específicamente a una diana inmunomoduladora en un linfocito T en un sujeto que padece un cáncer o una enfermedad causada por un agente infeccioso, donde el método comprende modificar la región Fc de la proteína de fusión Fc para aumentar la unión de dicha región Fc a un receptor de Fc de activación (FcR). Se ha demostrado que dicha unión potenciada del anticuerpo a un FcR de activación, con ciertas dianas, ocasiona la reducción de T_{reg} en el entorno tumoral y una mayor actividad antitumoral del anticuerpo. En casos preferidos, la diana es un receptor o ligando inmunomodulador y la unión de la proteína de fusión Fc altera la actividad de la diana, potenciando de esta manera una respuesta inmunitaria endógena contra células del cáncer.

Diversos aspectos de la invención desvelada de han ejemplificado usando anticuerpos anti-CTLA-4, anti-OX40 y anti-ICOS. Sin embargo, los métodos desvelados en el presente documento no están limitados a anticuerpos o al establecimiento de receptores inmunorreguladores como dianas. En su lugar, la invención es aplicable a una amplia serie de proteínas de fusión Fc que se unen a diversas dianas expresadas en la superficie de linfocitos T. Por lo tanto, en determinados casos, la proteína de fusión Fc comprende una región Fc unida operativamente a una

proteína de unión tal como, por ejemplo: un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, incluyendo un fragmento variable monocatenario (scFv), scFv divalentes o bivalentes (di-scFv o bi-scFv), un diacuerpo, un triacuerpo trivalente o tetracuerpo tetravalente, un minicuerpo o una CDR aislada (véase Hollinger y Hudson, 2005; Olafsen y Wu, 2010, si se desean detalles adicionales); una adnectina; un aficuerpo; una aflina; una región de unión a ligando de un receptor; una molécula de adhesión celular; un ligando de receptor; una enzima; una citocina; o una quimiocina. El uso de proteínas de fusión Fc, tales como derivados más pequeños del fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, que se eliminan más rápidamente de la circulación que los anticuerpos intactos, puede ayudar a mitigar la toxicidad potencial de una respuesta inmunitaria hiperactiva y/o permitir la rápida eliminación del fármaco inductor. En determinados casos, la proteína de fusión Fc comprende una región Fc unida operativamente a un ligando de receptor. En casos preferidos, la proteína de fusión Fc es un anticuerpo.

En ciertos aspectos de los presentes métodos, el anticuerpo es de un isotipo IgG. En otros aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otros aspectos, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En ciertos casos preferidos, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo IgG humano. En otros casos preferidos, la unión del anticuerpo IgG humano a un FcR de activación está potenciada. El FcR de activación puede ser un receptor Fc γ 1, Fc γ 2a o Fc γ 3a. En determinados aspectos, una unión potenciada del anticuerpo IgG humano al receptor Fc γ 1, Fc γ 2a o Fc γ 3a media en una reducción de T_{reg} en el sitio del tumor.

En ciertos casos de los presentes métodos, una unión potenciada del anticuerpo IgG humano a un receptor Fc γ 1, Fc γ 2a o Fc γ 3a (a) no media en una reducción de, o (b) media en un aumento en, linfocitos T efectores (T_{ef}) en un sitio de un tumor. En ciertos casos preferidos, la diana se expresa en T_{reg} en el sitio del tumor a un nivel mayor que en T_{ef} en un sitio de tumor. En otros casos, la diana se expresa en T_{reg} en el sitio del tumor a un nivel mayor que en T_{ef} o T_{ef} en la periferia.

Por otra parte, la proteína de fusión Fc empleada en los métodos que se divulgan en el presente documento puede unirse a una diana inmunomoduladora coestimuladora o coinhibidora en un linfocito T. La proteína de fusión Fc usada para unirse específicamente a una diana coestimuladora es una proteína de fusión Fc agonista. Por ejemplo, se usa una proteína de fusión Fc agonista para establecer como diana un inmunomodulador coestimulador tal como GITR, CD134 (OX40), ICOS, CD137 (4-1BB), CD27, CD28 o HVEM en un linfocito T. La unión de una proteína de fusión Fc agonista a un inmunomodulador coestimulador tiene como resultado la regulación positiva de una respuesta inmunitaria, en particular, una respuesta de linfocitos T. En ciertos casos de los presentes métodos, la proteína de fusión Fc es un anticuerpo agonista que aumenta la actividad de una diana inmunorreguladora coestimuladora en un linfocito T. En casos preferidos, la diana inmunorreguladora coestimuladora es GITR, OX40, ICOS o CD137.

Por el contrario, la proteína de fusión Fc usada para unirse específicamente a una diana coinhibidora es una proteína de fusión Fc inhibidora o antagonista. Por ejemplo, puede usarse una proteína de fusión Fc inhibidora para establecer como diana un inmunomodulador coinhibidor tal como, pero sin limitación, CTLA-4, PD-1, PD-L1, BTLA, TIM-3, LAG-3, A2aR, KLRG-1, CD244, CD160 o el receptor VISTA en un linfocito T. En ciertos casos de los presentes métodos para mejorar la eficacia antitumoral de una proteína de fusión Fc, la proteína de fusión Fc es un anticuerpo antagonista seleccionado de un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-BTLA, un anticuerpo anti-receptor VISTA, un anticuerpo anti-A2aR, un anticuerpo anti-KLRG-1, un anticuerpo anti-CD244, un anticuerpo anti-CD160 y un anticuerpo anti-TIGIT. En casos preferidos, la proteína de fusión Fc es un anticuerpo antagonista que bloquea la actividad de una diana inmunorreguladora coinhibidora en un linfocito T. En casos preferidos, la diana inmunorreguladora coinhibidora es CTLA o TIGIT. La unión de una proteína de fusión Fc antagonista a un inmunomodulador coinhibidor tiene como resultado la regulación positiva de una respuesta inmunitaria, en particular, una respuesta de linfocitos T.

En ciertos casos preferidos, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CTLA-4. En otros casos preferidos, el anticuerpo anti-CTLA-4 es ipilimumab o tremelimumab, o variantes de estos anticuerpos modificados para potenciar la unión de la región Fc a un FcR de activación. En otros casos, el anticuerpo es un anticuerpo anti-PD-1. En cualquiera de los métodos de la divulgación, el sujeto es preferentemente un ser humano.

Aunque aún no se ha producido un anticuerpo que se dirige específicamente a T_{reg}, muchos de los anticuerpos para puntos de control inmunitarios en ensayo clínico pueden potenciar la inmunidad antitumoral por mecanismos que implican el bloqueo de la actividad inmunosupresora de T_{reg} (Pardoll, 2012b). Tal como se demuestra en el presente documento, el isotipo IgG2a del anticuerpo de ratón anti-CTLA-4, un anticuerpo para puntos de control inmunitarios, media, sorprendente e inesperadamente, en una reducción de T_{reg} selectivamente en el sitio del tumor mientras que media de manera concomitante en un aumento en T_{reg} en ganglios linfáticos en los que drenan tumores y en un aumento en T_{ef} CD8⁺ intratumorales (ejemplos 4, 6 y 8). Aunque los T_{reg} pueden establecerse como dianas por proteínas de fusión Fc inmunomoduladoras, en ciertos aspectos de la invención divulgada, el linfocito establecido como diana es un tipo diferente de célula supresora distinto de un T_{reg}. De forma análoga, aunque las proteínas de fusión Fc de la divulgación pueden dirigirse a inmunomoduladores coinhibidores tales como CTLA-4, en ciertos aspectos de la divulgación, el inmunomodulador establecido como diana es un inmunomodulador coestimulador tal como GITR, OX40, CD137 o ICOS. Por consiguiente, en determinados casos, la proteína de fusión Fc, por ejemplo, un anticuerpo agonista o antagonista, se une a una diana inmunomoduladora, siendo esta una diana coestimuladora

o coinhibidora, expresada en una población de células supresoras y media en la reducción o eliminación de esa población de células. En casos preferidos, la unión de la proteína de fusión Fc a la diana inmunomoduladora expresada en una población de células protectoras potencia la actividad de, o no tiene ningún efecto perjudicial sobre, la población de células protectoras que expresan la diana inmunomoduladora. En determinados casos, la diana en un T_{reg} u otro linfocito T inmunosupresor al que se une la proteína de fusión Fc no es una diana inmunomoduladora.

En ensayos clínicos de fármacos inmunoterapéuticos que se dirigen a puntos de control inmunitarios, se han observado respuestas clínicas duraderas, incluso en pacientes pretratados intensamente, en múltiples tipos de tumores, incluyendo una proporción sustancial de pacientes con melanoma (MEL), carcinoma de células renales (CCR), cáncer de pulmón no microcítico escamoso (CPNM) y CPNM no escamoso y en diversos sitios de metástasis incluyendo hígado, pulmón, ganglio linfático y hueso (véase, por ejemplo, Pardoll, 2012b; Topalian *et al.*, 2012; Brahmer *et al.*, 2012; Mellman *et al.*, 2011; Flies *et al.*, 2011). En determinadas realizaciones de la presente invención, el cáncer contra el cual se potencia la eficacia de una proteína de fusión Fc se selecciona entre cáncer de riñón o del uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, cánceres inducidos ambientalmente entre los que se incluyen los inducidos por amianto, malignidades hematológicas entre las que se incluyen, por ejemplo, mieloma múltiple, linfoma de linfocitos B, linfoma de Hodgkin/linfoma mediastínico primario de linfocitos B, linfomas no Hodgkin, linfoma mieloide agudo, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica crónica, linfoma folicular, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma de Burkitt, linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico de precursores B, linfoma de células del manto, leucemia linfoblástica aguda, micosis fungoide, linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de linfocitos T y linfoma linfoblástico de precursores T, y cualquier combinación de dichos cánceres. La presente invención también es aplicable para el tratamiento de cánceres metastásicos. En determinadas realizaciones preferidas, el cáncer se selecciona de MEL, RCC, CPNM escamoso, CPNM no escamoso, cáncer colorrectal (CRC), cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y carcinomas del esófago, ovario, tracto gastrointestinal y mama, cáncer de ovario, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma pancreático y una malignidad hematológica. En otras realizaciones preferidas, el cáncer es MEL. En otras realizaciones preferidas, el cáncer es CCR. En otras realizaciones preferidas más, el cáncer es CPNM escamoso. En otras realizaciones preferidas adicionales, el cáncer es CPNM no escamoso.

Los resultados desvelados en el presente documento indican claramente que la actividad clínica de proteínas de fusión Fc que se dirigen a dianas inmunomoduladoras en linfocitos T puede mejorarse para uso en pacientes humanos. Se dispone de varias estrategias para aumentar las funciones efectoras de ADCC y CDC de las proteínas de fusión Fc para el tratamiento de cánceres y, particularmente, para aumentar la unión de anticuerpos IgG1 a FcγRIIIa para alotipos tanto V como F (véase, por ejemplo, Natsume *et al.*, 2009). De hecho, es de esperar que la obtención de anticuerpos terapéuticos por ingeniería genética con la intención de mejorar la unión específica a FcγRIIIa y potenciar de esta manera la ADCC juegue un papel clave en el desarrollo de anticuerpos terapéuticos de próxima generación con mejor eficacia clínica (Natsume *et al.*, 2009; Albanesi *et al.*, 2012). Ahora bien, aunque la importancia de funciones efectoras tales como ADCC, ADCP y CDC para la eficacia clínica de proteínas de fusión Fc terapéuticas ahora está bien reconocida, hasta ahora se creía que dichas funciones efectoras eran indeseables en estrategias para regular positivamente una respuesta de linfocitos T usando proteínas de fusión Fc que se unen a dianas inmunomoduladoras en linfocitos T (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.682.736).

Un enfoque para obtener por ingeniería genética proteínas de fusión Fc terapéuticas humanas es introducir en la región Fc de IgG1 una o más mutaciones que potencian la unión a un FcγR de activación (Nimmerjahn y Ravetch, 2012). Por ejemplo, Se ha demostrado que el triple mutante de *m* IgG1 (S298A/E333A/I334A) presenta mayor unión a FcγRIIIa y actividad ADCC (Shields *et al.*, 2001). Se han identificado otras variantes de IgG1 con unión fuertemente potenciada a FcγRIIIa, incluyendo variantes con mutaciones S239D/I332E y S239D/I332E/A330L que mostraron el mayor aumento en afinidad por FcγRIIIa, una reducción en la unión a FcγRIIb y una fuerte actividad citotóxica en monos cinomolgo (Lazar *et al.*, 2006). La introducción de las mutaciones triples en anticuerpos tales como alemtuzumab (específico de CD52), trastuzumab (específico de HER2/neu), rituximab (específico de CD20) y cetuximab (específico de EGFR) se tradujo en una actividad ADCC muy aumentada *in vitro*, y la variante S239D/I332E mostró una mayor capacidad de reducir los linfocitos B en monos (Lazar *et al.*, 2006). Además, Se han identificado mutantes de IgG1 que contienen mutaciones L235V, F243L, R292P, Y300L y P396L que presentaban unión potenciada a FcγRIIIa y actividad ADCC potenciada concomitantemente en ratones transgénicos que expresan FcγRIIIa humano en modelos de malignidades de linfocitos B y cáncer de mama (Stavenhagen *et al.*, 2007; Nordstrom *et al.*, 2011).

Las regiones Fc también pueden mutarse para aumentar la afinidad de IgG por el receptor Fc neonatal, FcRn, que prolonga la semivida *in vivo* de anticuerpos y ocasiona una mayor actividad antitumoral. Por ejemplo, la introducción de mutaciones M428L/N434S en las regiones Fc de bevacizumab (específico de VEGF) y cetuximab (específico de EGFR) aumentó la semivida de anticuerpos en monos y mejoró las respuestas antitumorales en ratones (Zalevsky *et al.*, 2010).

La interacción de anticuerpos con FcγR también puede potenciarse modificando el resto de glicano unido a cada fragmento Fc en el resto N297. En particular, la ausencia de restos de ramificación de fucosa potencia fuertemente la ADCC a través de una unión mejorada de IgG a FcγIIIA de activación sin alterar la unión al antígeno o la CDC (Natsume *et al.*, 2009). Existen pruebas convincentes de que los anticuerpos específicos de tumor afucosilados se traducen en una mayor actividad terapéutica en modelos de ratón *in vivo* (Nimmerjahn y Ravetch, 2005; Mossner *et al.*, 2010; véase el ejemplo 13).

La modificación de la glucosilación de anticuerpos puede realizarse, por ejemplo, mediante la expresión del anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glucosilación alterada. En la técnica se han descrito células con la maquinaria de glucosilación alterada y se pueden usar como células hospedadoras en las que expresar anticuerpos recombinantes de la presente divulgación para producir de este modo un anticuerpo con glucosilación alterada. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen del gen de la fucosiltransferasa, FUT8 (α -(1,6) fucosiltransferasa; véase la Publicación de Estados Unidos n.º 20040110704; Yamane-Ohnuki *et al.*, 2004), de tal forma que los anticuerpos expresados en estas células carecen de fucosa en sus carbohidratos. Como otro ejemplo, el documento EP 1176195 también describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado así como líneas celulares que tienen una actividad pequeña o nula para añadir fucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo, por ejemplo, la línea celular de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). La publicación PCX WO 03/035835 describe una variante de línea celular de CHO, Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa a los hidratos de carbono enlazados a Asn(297), que también da como resultado una hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields, *et al.*, 2002). También pueden producirse anticuerpos con un perfil de glucosilación modificado en huevos de gallina, como se describe en la Publicación PCX n.º WO 2006/089231. Como alternativa, pueden producirse anticuerpos con un perfil de glucosilación modificado en células vegetales, tales como *Lemna* (véase, por ejemplo, la Publicación de Estados Unidos n.º 2012/0276086. La Publicación PCX n.º 99/54342 describe líneas celulares modificadas por ingeniería genética para expresar glucosiltransferasas modificadoras de glucoproteínas (por ejemplo la beta(1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas por ingeniería genética presentan estructuras GlcNAc de bisección aumentadas que dan como resultado una actividad de CCDA aumentada de los anticuerpos (véase también, Umaña *et al.*, 1999). Como alternativa, los restos fucosilados del anticuerpo pueden escindirse usando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la enzima alfa-L-fucosidasa retira restos de fucosilo de anticuerpos (Xarentino *et al.*, 1975).

La unión del componente C1q de la cascada del complemento a la región Fc de anticuerpos unidos a células también afecta a la intensidad de la posterior activación del complemento, y varios enfoques han tenido éxito en la potenciación de la CDC al potenciar la unión de la región Fc a C1q. Las estrategias usadas incluyen la obtención por ingeniería genética de mutaciones de aminoácidos en la región Fc o bisagra, o barajado de secuencias de IgG1 e IgG3 dentro de una región constante de cadena pesada (Natsume *et al.*, 2009).

Los datos *in vivo* desvelados en el presente documento indican que cuando diversas proteínas de fusión Fc (anticuerpos) que se dirigen a receptores inmunomoduladores en linfocitos T y potencian una respuesta de linfocitos T se modifican para aumentar la unión de IgG1 a FcγRIIIa, se obtiene una mayor actividad antitumoral. Puede emplearse cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento para aumentar la unión de IgG1 a FcγRIIIa. En un caso de los presentes métodos, la proteína de fusión Fc no es un isotipo IgG1 y la modificación de la región Fc convierte la proteína de fusión Fc en un isotipo IgG1. A modo de ejemplo, la eficacia antitumoral de tremelimumab, un anticuerpo IgG2 anti-CTLA-4, puede potenciarse por un método que comprende modificar la región Fc de estos anticuerpos para generar un isotipo IgG1 que presenta una mayor unión de la región Fc modificada a FcγRIIIa. Basándose en los datos desvelados en el presente documento, dicha modificación media la reducción de T_{reg} en el sitio del tumor y un aumento concomitante en CTL CD8⁺, dando como resultado una mayor eficacia anti-tumoral.

En otro caso, la selección, diseño o modificación de la región Fc da como resultado la hipofucosilación o no fucosilación de la región Fc. En otro caso adicional, la selección, diseño o modificación de la región Fc comprende al menos una sustitución de aminoácidos que tiene como resultado una mayor unión de la región Fc a un receptor FcR de activación. Por lo tanto, por ejemplo, ciertos casos del presente método comprenden seleccionar, diseñar o modificar la región Fc para que incluya mutaciones de aminoácidos seleccionadas de mutaciones S298A/E333A/I334A, S239D/I332E, S239D/I332E/A330L, L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L y M428L/N434S.

A modo de ejemplo, la eficacia antitumoral de los isotipos IgG1 de tremelimumab, que puede potenciarse por el cambio de isotipo como se ha descrito anteriormente, puede potenciarse adicionalmente por un método que comprende modificar la región Fc de manera que se introduzca al menos una sustitución amino que ocasiona una mayor unión de la región Fc a FcγRIIIa, y/o modificar la región Fc para generar una región Fc hipofucosilada o no

fucosilada que presenta una mayor unión a FcγRIIIa.

Proteínas de fusión Fc anti-inmunomodulador

5 Son proteínas de fusión Fc de la presente divulgación proteínas de unión que comprenden una región Fc que se une específicamente y con alta afinidad a una diana en un linfocito T. En casos preferidos, la proteína de fusión Fc se une a una diana inmunomoduladora que se expresa a alto nivel en T_{reg} en el entorno tumoral con respecto al nivel de expresión en T_{reg} en la periferia y en T_{ef}. En determinados casos, la proteína de fusión Fc anti-inmunomodulador es una proteína de unión anti-CTLA-4, es decir, se une específicamente a CTLA-4 humano. En casos preferidos, la
10 proteína de unión anti-CTLA-4 es un anticuerpo bloqueante. En otros casos determinados, la proteína de fusión Fc de inmunomodulador es una proteína de unión anti-GITR, anti-OX40 o anti-ICOS, es decir, se une específicamente a GITR, OX40 o ICOS. En casos preferidos, la proteína de unión anti-GITR, anti-OX40 o ICOS es un anticuerpo agonista.

15 En la patente de Estados Unidos n.º 5,977,318 se describen anticuerpos monoclonales que reconocen y se unen al dominio extracelular de CTLA-4. Pueden generarse anticuerpos monoclonales de esta divulgación usando diversos métodos, por ejemplo, usando ratones transgénicos o transcrómicos que llevan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón, o usando tecnologías de presentación *in vitro* tales como presentación en fagos o en levaduras (véase, por ejemplo, Bradbury *et al.*, 2011). Los ratones transgénicos y transcrómicos
20 incluyen ratones denominados en el presente documento HUMAB MOUSE® (Lonberg *et al.*, 1994) y KM MOUSE® (WO 02/43478), respectivamente. La producción de anticuerpos humanos anti-CTLA-4 humano a modo de ejemplo de esta divulgación se describe en detalle en las Patentes de Estados Unidos n.º 6,984,720 y 7,605,238. El anticuerpo IgG1 humano anti-CTLA-4 identificado como 10D1 en estos pacientes también se conoce como ipilimumab (también conocido anteriormente como MDX-010 y BMS-734016), que se comercializa como YERVOY®.
25 En la Patente de Estados Unidos n.º 6.682.736 se describen otros anticuerpos humanos anti-CTLA-4 a modo de ejemplo de esta divulgación, entre los que se incluyen tremelimumab (anteriormente ticilimumab; CP-675.206), un anticuerpo IgG2 humano anti-CTLA-4 humano.

30 Las proteínas de fusión Fc anti-GITR que pueden potenciarse por el método desvelado en el presente documento incluyen los anticuerpos desvelados en las Publicaciones PCT n.º WO 2006/105021 y WO2011/028683, y en la Publicación japonesa n.º 2008278814.

35 Las proteínas de fusión Fc anti-ICOS que pueden potenciarse por el método desvelado en el presente documento incluyen los anticuerpos desvelados en las Patentes de Estados Unidos n.º 7.030.225, 7.932.358, 6.803.039 y 7.722.872 y en la Publicación de Estados Unidos n.º 2013/0142783.

40 Las proteínas de fusión Fc anti-OX40 que pueden potenciarse por el método desvelado en el presente documento incluyen los anticuerpos desvelados en las Publicaciones PCT n.º WO 95/12673, WO 99/42585, WO 03/106498, WO 2007/062245, WO 2009/079335, WO 2010/096418, WO 2012/027328, WO 2013/028231, WO 2013/008171 y WO 2013/038191.

45 En el presente documento se desvelan métodos para mejorar la eficacia antitumoral de una proteína de fusión Fc, que comprenden modificar la región Fc de la proteína de fusión Fc para aumentar la unión de dicha región Fc a un receptor de Fc de activación. También se desvelan en el presente documento proteínas de fusión Fc que se unen específicamente a un receptor inmunomodulador coinhibidor o coestimulador en un linfocito T en un sujeto que
50 padece cáncer o una enfermedad causada por un agente infeccioso y bloquea la actividad del receptor coinhibidor o mejora la actividad del receptor coestimulador, potenciando de esta manera una respuesta inmunitaria endógena contra células cancerosas o el agente infeccioso, donde la capacidad del anticuerpo de potenciar una respuesta inmunitaria endógena se ha mejorado usando los métodos desvelados en el presente documento. En casos preferidos, la proteína de fusión Fc que presenta una mayor capacidad de potenciar una respuesta inmunitaria es un anticuerpo (un "anticuerpo mejorado"). En determinados casos, este anticuerpo es un isotipo IgG. En otros casos determinados, el anticuerpo mejorado es un anticuerpo monoclonal. En casos adicionales, el anticuerpo mejorado es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.

55 En ciertos aspectos de esta divulgación, la proteína de fusión Fc mejorada es un anticuerpo IgG humano. En ciertos casos de este anticuerpo IgG humano, está mejorada la unión a un receptor FcγI, FcγIIa o FcγIIIa. En otros casos, dicha unión mejorada al receptor FcγI, FcγIIa o FcγIIIa da como resultado una mayor ADCC. En ciertos casos preferidos, la unión mejorada de la Fc modificada al receptor FcγI, FcγIIa o FcγIIIa media en una reducción de T_{reg} en el sitio del tumor. Esta reducción de T_{reg} puede medirse por ADCC o un mecanismo diferente que reduce
60 diferencialmente T_{reg} en el sitio del tumor pero no en la periferia.

65 En ciertos casos de la proteína de fusión Fc de la presente invención, la unión mejorada del anticuerpo IgG humano a un receptor FcγI, FcγIIa o FcγIIIa media en una reducción de T_{reg} en un sitio de tumor. En otros casos, la unión mejorada del anticuerpo IgG humano a un receptor FcγI, FcγIIa o FcγIIIa (a) no media en una reducción de o (b) media en un aumento de T_{ef} en un sitio de tumor. En casos preferidos, la diana se expresa en T_{reg} en un sitio de tumor a un nivel mayor que en T_{ef} en el sitio del tumor. En casos adicionales, la diana se expresa en T_{reg} en un sitio

de tumor a un nivel mayor que en T_{ef} o T_{ef} en la periferia. En otros casos determinados, la proteína de fusión Fc es un anticuerpo antagonista que bloquea la actividad de una diana inmunorreguladora coinhibidora en un linfocito T. En casos adicionales, la diana inmunorreguladora coinhibidora es CTLA o TIGIT.

5 En otros aspectos determinados de esta divulgación, la proteína de fusión Fc mejorada es un anticuerpo agonista que aumenta la actividad de una diana inmunorreguladora coestimuladora en un linfocito T. En casos adicionales, la diana inmunorreguladora coestimuladora es GITR, OX40, ICOS, CD137. En otros casos, el anticuerpo mejorado es un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-GITR, un anticuerpo anti-OX40, un anticuerpo anti-receptor ICOS, un anticuerpo anti-KLRG-1, un anticuerpo anti-CD244, un anticuerpo anti-CD160 o un anticuerpo anti-TIGIT.

10 En ciertos casos preferidos, el anticuerpo mejorado es un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-GITR, un anticuerpo anti-OX40 o un anticuerpo anti-receptor ICOS. el anticuerpo anti-CTLA-4 puede ser, por ejemplo, una variante mejorada de ipilimumab o una variante mejorada de tremelimumab. En determinados casos, dichas variantes mejoradas son variantes afucosiladas o hipofucosiladas de ipilimumab o tremelimumab. En otros casos, dichas variantes mejoradas de ipilimumab o tremelimumab comprenden mutaciones de aminoácidos seleccionadas de mutaciones S298A/E333A/I334A, S239D/I332E, S239D/I332E/A330L, L235V/F243L/R292P/Y300L/ P396L y M428L/N434S.

20 En otros aspectos de esta divulgación, la proteína de fusión Fc mejorada es un anticuerpo antagonista que aumenta la actividad de una diana inmunorreguladora coinhibidora en un linfocito T. En determinados casos, el anticuerpo se selecciona de un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-BTLA, un anticuerpo anti-receptor VISTA, un anticuerpo anti-A2aR, un anticuerpo anti-KLRG-1, un anticuerpo anti-CD244, un anticuerpo anti-CD160 y un anticuerpo anti-TIGIT. En casos preferidos, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CTLA-4 o un anticuerpo anti-TIGIT.

25 En otros aspectos determinados de la proteína de fusión Fc mejorada de la presente invención, el sujeto padece un cáncer seleccionado de cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer renal, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, tumores sólidos de la infancia, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o del uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, cánceres inducidos ambientalmente entre los que se incluyen los inducidos por amianto, malignidades hematológicas entre las que se incluyen, por ejemplo, mieloma múltiple, linfoma de linfocitos B, linfoma de Hodgkin/linfoma mediastínico primario de linfocitos B, linfomas no Hodgkin, linfoma mieloide agudo, leucemia mielógena crónica, leucemia linfóide crónica, linfoma folicular, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma de Burkitt, linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico de precursores B, linfoma de células del manto, leucemia linfoblástica aguda, micosis fungoide, linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de linfocitos T y linfoma linfoblástico de precursores T, y cualquier combinación de dichos cánceres. La presente invención también es aplicable para el tratamiento de cánceres metastásicos. En realizaciones preferidas, el cáncer se selecciona de MEL, RCC, CPNM escamoso, CPNM no escamoso, CRC, CRPC, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, carcinomas de esófago, ovario, tracto gastrointestinal y mama, cáncer de ovario, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, carcinoma pancreático y una malignidad hematológica.

Moléculas de Ácido Nucleico que Codifican Anticuerpos de la Invención

50 Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican cualquiera de las proteínas de fusión Fc de la divulgación que se unen a dianas, por ejemplo, receptores inmunomoduladores o ligandos, en linfocitos T. En realizaciones preferidas, estas moléculas de ácido nucleico aisladas codifican anticuerpos que se dirigen y bloquean receptores inmunomoduladores inhibidores. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. El ácido nucleico puede ser, por ejemplo, ADN o ARN, y puede contener o no secuencias intrónicas. En ciertas realizaciones, el ADN es ADN genómico, ADNc o ADN sintético, es decir, ADN sintetizado en un laboratorio, por ejemplo, por la reacción en cadena de la polimerasa o por síntesis química. En realizaciones preferidas, el ácido nucleico es un ADNc.

60 Los ácidos nucleicos de la invención pueden obtenerse usando técnicas de biología molecular convencionales. En el presente documento se desvela un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de las proteínas de fusión Fc desveladas en el presente documento. También se desvela en el presente documento un vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico aislado. También se desvela en el presente documento una célula hospedadora que comprende cualquiera de los vectores de expresión desvelados. Dicha célula hospedadora puede usarse para producir cualquiera de las proteínas de fusión Fc descritas en el presente documento usando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el cultivo de las células hospedadoras durante un periodo de tiempo

suficiente para permitir la expresión de la proteína de fusión Fc en las células hospedadoras o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedadoras. La proteína de fusión Fc puede recuperarse del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales que son bien conocidos en la técnica.

5

Composiciones farmacéuticas

Las proteínas de fusión Fc de la presente invención pueden constituirse en una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene la proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Una composición farmacéutica de la invención puede incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables, antioxidantes, vehículos acuosos y no acuosos y/o adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes.

Las pautas posológicas se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima, por ejemplo, una respuesta terapéutica o efectos adversos mínimos. Normalmente, la dosificación de un anticuerpo mejorado de la divulgación necesaria para conseguir un cierto nivel de eficacia anticancerosa es menor que para el anticuerpo no modificado. Además, dicha dosificación inferior normalmente produce una menor incidencia o gravedad de efectos adversos. Para la administración de un anticuerpo de la divulgación que se une específicamente a una diana en un linfocito T, la dosis varía de aproximadamente 0,00001 a aproximadamente 100 mg/kg, normalmente de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 20 mg/kg y, más normalmente, de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10 mg/kg, del peso corporal del sujeto. Preferentemente, la dosificación está dentro del intervalo de 0,01-10 mg/kg de peso corporal. Por ejemplo, las dosis pueden ser 0,01, 0,05, 0,1, 0,3, 1, 3 o 10 mg/kg de peso corporal y, más preferentemente, 0,1, 0,3, 1 o 3 mg/kg de peso corporal. El programa de dosificación normalmente está diseñado para conseguir exposiciones que ocasionan la ocupación sostenida del receptor basándose en las propiedades farmacocinéticas típicas de un anticuerpo. Un régimen de tratamiento a modo de ejemplo conlleva la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses.

Los niveles reales de dosificación de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular, sin que sean indebidamente tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de diversos factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, estado de salud general e historia médica previa del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Un experto habitual en la materia podría determinar las dosis apropiadas basándose en factores tales como las dimensiones del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición o vía de administración particular seleccionadas. Una composición de la presente invención puede administrarse por una o más vías de administración usando uno o más de diversos métodos bien conocidos en la técnica.

En ciertas realizaciones, la dosis de la proteína de fusión Fc es una dosis fija-plana que es fija independientemente de las dimensiones o peso del paciente. Por ejemplo, la proteína de fusión Fc puede administrarse a una dosis fija de 5, 20, 35, 75, 200, 350, 750 o 1500 mg, independientemente del peso del paciente. Como se usa en el presente documento, Las expresiones "dosis fija", "dosis plana" y "dosis fija-plana" se usan indistintamente y se refieren a una dosis que se administra a un paciente independientemente del peso o área de superficie corporal del paciente. La dosis fija o plana, por lo tanto, no se proporciona como una dosis en mg/kg, sino, más bien, como una cantidad absoluta de la proteína de fusión Fc (por ejemplo, un anticuerpo anti-CTLA-4). Como apreciarán los expertos en la materia, la dosis, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados.

Usos terapéuticos y métodos de la invención

Las proteínas de fusión Fc, composiciones y métodos de la presente divulgación tienen numerosas utilidades terapéuticas, entre las que se incluyen el tratamiento de cánceres y enfermedades infecciosas.

Inmunoterapia de cánceres

En el presente documento se desvela un método para potenciar una respuesta inmunitaria endógena en un sujeto que padece un cáncer para tratar de esta manera al sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz cualquiera de las proteínas de fusión Fc descritas en el presente documento,

donde la región Fc de la proteína de fusión Fc se ha seleccionado, diseñado o modificado para mejorar la unión de dicha región Fc a un receptor de Fc de activación. En los métodos que se divulgan en el presente documento, la región Fc no está necesariamente modificada; por ejemplo, la región Fc apropiada puede seleccionarse o diseñarse para unirse a FcR de activación. De forma análoga, la unión al FcR no aumenta necesariamente, pero puede seleccionarse o diseñarse para que sea elevada. En determinados casos, la proteína de fusión Fc es un anticuerpo. En casos preferidos, el anticuerpo es un isotipo IgG. En otros casos determinados, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En casos adicionales, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En otros casos adicionales, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo IgG humano. En ciertos aspectos preferidos de los presentes métodos, la unión del anticuerpo IgG humano a un receptor Fcγ1, Fcγ2a o Fcγ3 está mejorada. Preferentemente, la unión mejorada del anticuerpo IgG humano al receptor Fcγ1, Fcγ2a o Fcγ3 tiene como resultado una mayor ADCC. En determinados casos, el anticuerpo es un anticuerpo antagonista que bloquea la actividad de una diana inmunorreguladora coinhibidora en un linfocito T. En casos preferidos, la diana inmunorreguladora coinhibidora es CTLA o TIGIT. En los presentes métodos inmunoterapéuticos pueden emplearse proteínas de fusión Fc que se unen a una amplia diversidad de dianas localizadas en linfocitos T, por ejemplo, dianas tanto coestimuladoras como coinhibidoras en linfocitos T, preferentemente T_{reg} u otras células supresoras inmunitarias.

En determinados casos, la proteína de fusión Fc es un anticuerpo antagonista, por ejemplo, un anticuerpo anti-CTLA-4 o un anticuerpo anti-TIGIT. En ciertos casos preferidos, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CTLA-4. En otros casos preferidos, el anticuerpo anti-CTLA-4 es ipilimumab o tremelimumab. En casos aún más preferidos, el anticuerpo anti-CTLA-4 es un anticuerpo en el que la región Fc de la proteína de fusión Fc se ha seleccionado, diseñado o modificado para mejorar la unión de la región Fc a un receptor de Fc de activación, por ejemplo, una variante mejorada de ipilimumab o tremelimumab. En determinados casos, dichas variantes mejoradas son variantes afucosiladas o hipofucosiladas de ipilimumab o tremelimumab. En otros casos, dichas variantes mejoradas de ipilimumab o tremelimumab comprenden mutaciones de aminoácidos seleccionadas de mutaciones S298A/E333A/I334A, S239D/I332E, S239D/I332E/A330L, L235V/F243L/R292P/Y300L/ P396L y M428L/N434S.

En otros casos, el anticuerpo es un anticuerpo agonista que aumenta la actividad de una diana inmunorreguladora coestimuladora en un linfocito T. En casos preferidos, la diana inmunorreguladora coestimuladora es GITR, OX40, ICOS o CD137. En casos adicionales, el anticuerpo anti-GITR, OX40, ICOS o CD137 es una variante afucosilada o hipofucosilada. En casos adicionales, el anticuerpo anti-GITR, OX40, ICOS o CD137 es una variante mejorada que comprende una o más mutaciones de aminoácidos seleccionadas de mutaciones S298A/E333A/I334A, S239D/I332E, S239D/I332E/A330L, L235V/F243L/R292P/Y300L/ P396L y M428L/N434S.

En casos preferidos de los presentes métodos inmunoterapéuticos, el sujeto es un ser humano.

Los ejemplos de otros cánceres que pueden tratarse usando los métodos inmunoterapéuticos de la divulgación incluyen cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer renal, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, una malignidad hematológica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o del uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, cánceres inducidos ambientalmente entre los que se incluyen los inducidos por amianto, cánceres metastásicos y cualquier combinación de dichos cánceres. En realizaciones preferidas, el cáncer se selecciona de MEL, RCC, CPNM escamoso, CPNM no escamoso, CRC, CRPC, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y carcinomas del esófago, ovario, tracto gastrointestinal y mama. Los presentes métodos también son aplicables para el tratamiento de cánceres metastásicos.

Las proteínas de fusión Fc de la divulgación pueden combinarse con un agente inmunogénico, tal como células cancerosas, antígenos tumorales purificados (incluyendo proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidratos), células y células transfectadas con genes que codifican citocinas inmunoestimuladoras (He *et al.*, 2004; Mellman *et al.*, 2011). Los ejemplos no limitantes de vacunas tumorales que se pueden usar incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar la citocina GM-CSF.

En ciertos casos de estos métodos para tratar a un paciente con cáncer, la proteína de fusión Fc se administra al sujeto como una monoterapia, mientras que en otros casos, la estimulación o bloqueo de las dianas inmunomoduladoras puede combinarse eficazmente con tratamientos convencionales para cánceres, incluyendo regímenes quimioterapéuticos, radiación, cirugía, privación de hormonas e inhibidores de la angiogénesis. La proteína de fusión Fc puede unirse a un agente antineoplásico (como un inmunoconjugado) o puede administrarse por separado del agente. En el último caso (administración separada), el anticuerpo se puede administrar antes,

después o simultáneamente con el agente o puede coadministrarse con otros agentes terapéuticos conocidos. Los fármacos quimioterapéuticos incluyen, entre otros, doxorubicina (ADRIAMYCIN®), cisplatino, carboplatino, sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucilo (LEUKERAN®), ciclofosfamida (CYTOXAN®; NEOSAR®), lenalidomida (REVLIMID®), bortezomib (VELCADE®), dexametasona, mitoxantrona, etopósido, citarabina, bendamustina (TREANDA®), rituximab (RITUXAN®), ifosfamida, vincristina (ONCOVIN®), fludarabina (FLUDARA®), talidomida (THALOMID®), alemtuzumab (CAMPATH®), ofatumumab (ARZERRA®), everolimus (AFINITOR®, ZORTRESS®) y carfilzomib (KYPROLIS™). La coadministración de agentes anticancerosos que actúan a través de mecanismos diferentes puede ayudar al desarrollo de resistencia a fármacos o cambios en la antigenicidad de células tumorales.

En otras realizaciones, el paciente puede tratarse adicionalmente con un agente que modula, por ejemplo, mejora o inhibe, la expresión o actividad de un FcγR, por ejemplo, mediante el tratamiento del sujeto con una citocina. Las citocinas preferidas para la administración durante el tratamiento con la proteína de fusión Fc incluyen el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón-γ (IFN-γ) y factor de necrosis tumoral (TNF).

Un aspecto de esta invención es el uso de cualquier proteína de fusión Fc de la divulgación para la preparación de un medicamento para la inmunoterapia de un sujeto que padece cáncer. Los usos de cualquier proteína de fusión Fc de la divulgación para la preparación de medicamentos son ampliamente aplicables al intervalo completo de cánceres desvelados en el presente documento. También se desvela en el presente documento una proteína de fusión Fc de la invención para uso en cualquier método de tratamiento empleando una proteína de fusión Fc descrita en el presente documento.

Tratamiento de enfermedades infecciosas

Otros métodos desvelados en el presente documento se usan para tratar a pacientes que han estado expuestos a toxinas o patógenos particulares. Por consiguiente, otro aspecto de la divulgación proporciona un método de tratamiento de una enfermedad infecciosa en un sujeto, por ejemplo, mediante la potenciación de una respuesta inmunitaria endógena en un sujeto que padece una enfermedad infecciosa, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión Fc de la divulgación, donde la región Fc de la proteína de fusión Fc se ha seleccionado, diseñado o modificado para mejorar la unión de dicha región Fc a un receptor de Fc de activación.

En ciertos casos preferidos, la proteína de fusión Fc es un anticuerpo. Los ejemplos de enfermedades infecciosas para las que puede ser particularmente útil este enfoque terapéutico incluyen enfermedades causadas por patógenos para los que actualmente no hay una vacuna eficaz, o patógenos para los que las vacunas convencionales no son completamente eficaces. Estos incluyen, pero sin limitación, VIH, Hepatitis (A, B, y C), Gripe, Herpes, Giardia, Malaria, Leishmania, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. En ciertos casos preferidos, el patógeno es un patógeno viral. Los enfoques inmunoterapéuticos descritos en el presente documento son particularmente útiles contra infecciones establecidas por agentes tales como el VIH que presentan antígenos alterados durante el transcurso de las infecciones.

De forma similar a su aplicación a los tumores analizados anteriormente, los enfoques inmunoterapéuticos descritos en el presente documento pueden usarse en solitario o como un adyuvante, en combinación con vacunas, para estimular la respuesta inmunitaria a patógenos, toxinas y auto-antígenos. Estos enfoques pueden combinarse con otras formas de inmunoterapia tales como tratamiento con citocinas (por ejemplo, administración de interferones, GM-CSF, G-CSF o IL-2).

Biomarcadores potenciales para inmunoterapia anti-CTLA-4

Los datos desvelados en el presente documento también sugieren posibles biomarcadores para predecir la idoneidad de pacientes candidatos para la inmunoterapia con un anticuerpo anti-CTLA-4 y/o predecir la eficacia antitumoral de dicho anticuerpo. Por ejemplo, la observación de que el isotipo IgG1 para anti-CTLA-4 media en la reducción de T_{reg} sugiere que los polimorfismos de FCRG3A (CD 16)¹ pueden estar relacionados con la actividad de ipilimumab como se ha observado para la actividad de rituximab (Weng y Levy, 2003; Cartron *et al.*, 2004) y trastuzumab (HEKCEPTIN®) Musolino *et al.*, 2008; Tamura *et al.*, 2011). Si se requiere la unión a FcγRIIIa para la actividad de ipilimumab, sería de esperar que los individuos con variantes FcγRIIIa V158 homocigotas, que se unen a IgG1 con mayor afinidad que la variante F158, mostraran mejor supervivencia y/o respuesta (Cartron *et al.*, 2004). Además, si se requiere la unión a FcγRIIa para la actividad de ipilimumab, sería de esperar que los individuos con variantes FcγRIIa H131, que se unen a IgG1 con mayor afinidad que la variante R131, mostraran mejor supervivencia y/o respuesta (Weng y Levy, 2003).

Los presentes datos también sugieren que anti-CTLA-4 funcione mejor en tumores que contienen un número aumentado de T_{reg} en el sitio del tumor. Es probable que la presencia de T_{reg} sea la consecuencia de una respuesta inmunitaria en curso a antígenos tumorales. De hecho, la respuesta a ipilimumab se ha asociado con la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor (Hamid *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2012). La terapia con ipilimumab también es más eficaz en pacientes con respuestas preexistentes a antígenos tumorales, tales como en el caso de NY-ESO-1 (Yuan *et al.*,

2011). Por otra parte, La eliminación de T_{reg} puede depender de la presencia de tipos celulares específicos en el microentorno tumoral. Los presentes datos indican que se requieren células similares a los macrófagos u otras células del linaje mieloide presentes en el tumor, tales como monocitos, macrófagos o linfocitos NK que portan los receptores Fcγ relevantes, para el efecto antitumoral de anti-CTLA-4.

Por consiguiente, en el presente documento se desvela un método para predecir la idoneidad de pacientes candidatos para la inmunoterapia con una proteína de fusión Fc tal como un anticuerpo anti-CTLA-4 y/o predecir la eficacia antitumoral de dicho anticuerpo, que comprende examinar la presencia de células similares a macrófagos u otras células del linaje mieloide en el tumor.

También se desvela en el presente documento un método para inmunoterapia de un sujeto que padece cáncer, comprendiendo dicho método: (a) seleccionar un sujeto que es un candidato adecuado para inmunoterapia, comprendiendo la selección (i) evaluar la presencia de células similares a macrófagos u otras células de linaje mieloide en una muestra de tejido de ensayo y (ii) seleccionar el sujeto como un candidato adecuado basándose en la presencia de células similares a macrófagos u otras células de linaje mieloide en una muestra de tejido de ensayo; y (b) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión Fc inmunomoduladora al sujeto seleccionado. En ciertos casos preferidos, la proteína de fusión Fc inmunomoduladora es un anticuerpo anti-CTLA-4, anti-TIGIT, anti-GITR, anti-OX40, anti-CD137 o un anticuerpo anti-ICOS.

Kits

También se encuentran dentro del alcance de la presente divulgación kits que comprenden cualquier proteína de fusión Fc o composición de la misma de esta divulgación e instrucciones de uso. Por consiguiente, en el presente documento se desvela un kit para el tratamiento de un cáncer o una enfermedad causada por un agente infeccioso en un sujeto, comprendiendo el kit (a) una o más dosis de cualquier proteína de fusión Fc de la divulgación que presenta una mayor capacidad de potenciar una respuesta inmunitaria endógena contra células del cáncer o el agente infeccioso en el sujeto y (b) instrucciones para usar la proteína de fusión Fc en cualquiera de los métodos terapéuticos descritos en el presente documento. Por ejemplo, en ciertos casos, la proteína de fusión Fc en el kit es una proteína de fusión Fc antagonista que bloquea la actividad de una diana inmunorreguladora coinhibidora en un linfocito T. En casos adicionales, la diana inmunorreguladora coinhibidora es CTLA o TIGIT. En otros casos, la proteína de fusión Fc antagonista es un anticuerpo. En casos adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CTLA-4 o anti-TIGIT. En casos adicionales, el anticuerpo anti-CTLA-4 es una variante mejorada de ipilimumab o tremelimumab.

En otros casos determinados, la proteína de fusión Fc es una proteína agonista que aumenta la actividad de una diana inmunorreguladora coestimuladora en un linfocito T. En casos adicionales, la diana inmunorreguladora coestimuladora es GITR, OX40, ICOS o CD137. En otros casos, la proteína de fusión Fc agonista es un anticuerpo. En casos adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo anti-GITR, OX40, ICOS o CD137.

El kit puede comprender además uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, para el tratamiento de un cáncer, dichos uno o más agentes adicionales pueden ser un reactivo inmunosupresor, un agente quimioterapéutico o un agente radiotóxico, o una o más proteínas de fusión Fc adicionales que se dirigen a diferentes antígenos.

Los kits incluyen normalmente una etiqueta que indica el uso pretendido del contenido del kit y las instrucciones de uso. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o grabado suministrado en o con el kit, o que de otro modo acompaña al kit. En ciertos casos de un kit farmacéutico, la proteína de fusión Fc puede envasarse junto con otros fármacos terapéuticos en una forma de dosificación unitaria.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben considerarse limitantes.

Ejemplo 1

Generación de diferentes isotipos de anticuerpo anti-mCTLA-4

Para determinar la potencia relativa de diferentes isotipos de anti-CTLA-4 en la actividad antitumoral, se generaron cuatro variantes isotópicas del anticuerpo de ratón anti-CTLA-4 de ratón, 9D9, y se purificaron a partir de transfectantes CHO o del hibridoma parental.

Estas variantes anti-CTLA-4 incluían el isotipo IgG1 que contenía una mutación D265A (IgG1-D265A), que es un mutante que no se une a FcγR (Clynes *et al.*, 2000), IgG1, IgG2b (isotipo original de 9D9, derivado de un hibridoma) e IgG2a. El hibridoma 9D9 (suministrado amablemente por 1. Allison, Universidad de Texas, MD Anderson, Houston, Texas) es un anticuerpo de ratón anti-CTLA-4 de ratón obtenido por inmunización de ratones transgénicos para CTLA-4 humano con CTLA-4 de ratón (Peggs *et al.*, 2009). 9D9 bloquea la unión de CTLA-4-Ig murino a células positivas para B7-1 (datos no mostrados).

Para generar isotipos 9D9, se preparó ARN total a partir de células de hibridoma 9D9 usando el kit RNeasy Mini (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos). Se preparó ADNc por el protocolo 5'-RACE usando el kit de amplificación de ADNc SMARTer RACE y el kit de PCR Advantage 2 (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, Estados Unidos). Se amplificaron regiones variables usando un cebador 3' de región constante específico de ratón, emparejado con la mezcla de cebadores universal 5' RACE. Los productos de la PCR que contenían la región V se clonaron en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y se utilizaron para transformar la cepa de *E. coli* TOP 10 (Invitrogen). Se prepararon muestras para Templiphi (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ, Estados Unidos) y se sometieron a secuenciación de ADN (Sequetech, Mountain View, CA, Estados Unidos).

Para la expresión de anticuerpos recombinantes (isotipos IgG2a de ratón, IgG1 de ratón e IgG1-D265A de ratón), las regiones variables de 9D9 se amplificaron por PCR para introducir sitios de clonación y se clonaron en vectores de expresión UCOE (EMD Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos) que contenían la secuencia señal de osteonectina y la región constante deseada. Se linealizaron vectores de cadena pesada y ligera y se introdujeron en células CHO-S (Invitrogen) por cotransfección. Se seleccionaron grupos y/o clones estables. Para IgG2a de ratón, el alotipo BALB/c, se usó la secuencia de IgG2a^a (haplotipo Igh-1^a).

Se recogieron sobrenadantes de cultivo de hibridoma 9D9 o transfectantes de células CHO para la producción de anticuerpos. Los anticuerpos se purificaron usando Proteína A o Proteína G por métodos convencionales y se dializaron en PBS. Todos los anticuerpos carecían de endotoxina (< 0,05 EU/mg) y mostraron tener <5 % de agregados, según se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño/HPLC. Cada uno de los isotipos CTLA-4 se evaluó con respecto a la unión a células que expresaban constitutivamente CTLA-4 (58α-β-CTLA-4/CD3ζ) por citometría de flujo. 58α-β-CTLA-4/CD3ζ es un hibridoma de linfocitos T murino que expresa CTLA-4 fusionado a CD3ζ y es análogo a una construcción similar para CTLA-4 humano (Keler *et al.*, 2003). Se tiñeron células (1x 10⁵ por pocillo) en tampón FACS (DPBS 1x [CellGro], azida de sodio al 0,02 %, FBS al 2 % [Hyclone] y EDTA 1 mM) con diluciones seriadas de anticuerpos comenzando a 20 µg/ml y se incubaron durante 30 min a 4 °C. Las células se lavaron y se añadió anticuerpo secundario (IgG de burro anti-ratón R-PE [Jackson ImmunoLabs]) y se incubaron durante 30 min a 4 °C. Después, las células se lavaron y se resuspendieron en tampón FACS y se analizaron en un citómetro de flujo BD FACS Canto.

Como se muestra en la figura 1, cada una de las variantes de isotipo anti-CTLA-4 se une de manera equivalente a células que expresan constitutivamente CTLA-4 de ratón. Los anticuerpos mIgG1, mIgG2a y mIgG2b marcados son anticuerpos de control de isotipo disponibles en el mercado.

Los procedimientos generales descritos anteriormente también se usaron para construir diferentes variantes isotípicas de anticuerpos agonistas que se unen a receptores GITR, OX40 e ICOS de ratón y un anticuerpo antagonista que se une a PD-1 de ratón.

Análisis farmacocinético

Para la caracterización de la farmacocinética de los anticuerpos anti-CTLA-4, en nueve ratones C57BL/6 hembra se inyectaron por vía intraperitoneal 10 mg/kg de cada isotipo de anti-CTLA-4 (IgG1, IgG1-D265A, IgG2a o IgG2b). Se tomaron muestras de sangre a 1, 6, 24, 48, 72, 120, 168, 336 y 504 h y los sueros se analizaron por ELISA. Se usó ELISA quimioluminiscente para medir los niveles en suero de anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4. Como anticuerpo de captura se usó CTLA-4-Ig de ratón recombinante con un conjugado con HRP de anticuerpo policlonal IgG de cabra anti-ratón (específico para la cadena ligera). Los patrones, controles y muestras se diluyeron 100 veces con 1 % de BSA/PBS/0,05 % de Tween 20. Las concentraciones de anticuerpos anti-CTLA-4 en muestras de suero de ratón se calcularon a partir de la intensidad de fluorescencia medida mediante el lector de placas M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) usando una curva de calibración logística de 5 parámetros (5-PL) generada a partir de calibradores de anticuerpo anti-CTLA-4.

Como se muestra en la tabla 2 y en la figura 2, la exposición sistémica de los cuatro isotipos fue bastante similar, aunque las áreas bajo la curva de concentración frente al tiempo (AUC) de IgG1-D265A (185 µM·h) e IgG2b (170 µM·h) fueron ligeramente mayores que las de IgG1 (119 µM·h) e IgG2a (125 µM·h). Las semividas terminales de los anticuerpos también fueron similares (156-174 h), aunque hubo una decadencia terminal acelerada que se observó solo para IgG2a desde la semana 2 a la semana 3; esto se debe supuestamente a la formación de anticuerpo anti-fármaco como consecuencia de las diferencias alótípicas entre la región constante Balb/c IgG2a^a y la de los ratones C57BL/6 ensayados en este estudio (Schreier *et al.*, 1981). Por lo tanto, las diferencias en eficacia antitumoral de los isotipos anti-CTLA-4 no puede explicarse por diferencias en la exposición al fármaco.

Tabla 2. Resumen de parámetros farmacocinéticos de isotipos de anti-CTLA4 después de una sola inyección intraperitoneal a 10 mg/kg en ratones C57BL/6 no portadores de tumor

Parámetros PK	IgG1	IgG1-D265A	IgG2a	IgG2b
C _{máx} (µM)	0,56	0,92	0,71	0,96

T _{máx} (h)	6	6	6	6
AUC0-504h (μM·h)	119	185	125	170
T _{1/2} (h)	156	171	164*	174

En el caso de IgG2a, se observó una decadencia terminal desde 336 h a 504 h, supuestamente debido a la formación de anticuerpo anti-fármaco (véase más adelante). Debe tenerse en cuenta que el alotipo IgG2a procede de ratones BALB/c. De la estimación de T_{1/2} se excluyó el punto de tiempo de 504 h.

Afinidades de unión

- Cada uno de los isotipos de anti-CTLA-4 se caracterizó con respecto a la unión a formas solubles de FcγRI, FcγRIIB, FcγRIII y FcγRIV, y FcRn, por resonancia de plasmón superficial. Se determinó que las afinidades de los diferentes isotipos de anti-CTLA-4 con respecto a FcγR eran como se ha descrito previamente (Nimmerjahn y Ravetch, 2005). Los FcγR se adquirieron en R&D Systems con la excepción de FcγRI. Para expresión de FcγRI, el dominio extracelular se amplificó por PCR y se clonó en un vector de expresión UCOE (EMD Millipore, Estados Unidos) en fase con una secuencia señal de osteonectina y una etiqueta 6xHis C-terminal y codón de terminación. Se transfectoron células CHO-S (Invitrogen) usando Amara Nucleofector II (Lonza Group, AG) y se seleccionaron y expandieron grupos y clones estables, y se recogieron los sobrenadantes posteriores para su purificación. Las proteínas recombinantes solubles se purificaron usando técnicas convencionales mediante cromatografía de afinidad por metal de níquel inmovilizado (IMAC Life Technologies Corporation) en columnas de resina cargada con níquel.
- Las interacciones FcγR se determinaron recubriendo los anticuerpos directamente en una microtarjeta CM5 a una densidad de aproximadamente 1500 UR y haciendo fluir 8 concentraciones de mFcR sobre los anticuerpos inmovilizados hasta que se alcanzó el equilibrio. La unidad de respuesta en equilibrio (UR) se representó como una función de la concentración de FcR usando GraphPad Prism y se obtuvo la K_D. Como alternativa, los FcR marcados con 6xHis se capturaron (hasta aproximadamente 200 UR) en una superficie CM5 recubierta de anticuerpo anti-His y haciendo fluir 8 concentraciones del anticuerpo sobre la superficie con FcγR capturados. La K_D de equilibrio obtenida por este enfoque fue aproximadamente 4 veces menor debido a la ausencia de unión multivalente presente cuando los anticuerpos se aplican directamente como un recubrimiento sobre la superficie. La interacción de FcRn se caracterizó aplicando un recubrimiento de 500 UR de FcRn de ratón en una microtarjeta CM5 y haciendo fluir 8 concentraciones de anticuerpos sobre la superficie recubierta con FcRn a pH 6,0, en ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico 50 mM, tampón de proceso NaCl 150 mM. La superficie unida al anticuerpo se regeneró usando tampón Tris pH 8,0. Las afinidades de unión se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Afinidades de unión de isotipos anti-CTLA-4 a proteínas FcγR murinas evaluadas por resonancia de plasmón superficial.

Anticuerpo	Afinidad K _D (nM)				
	FcγRIII	FcγRIV	FcγRIIB	FcγRI	FcRn
9D9-IgG1	1878	NB	479	NB	22,4
9D9-IgG1-D256A	NB	NB	NB	NB	24,6
9D9-IgG2a	1497	29,45	1414	32,67	13,46
9D9-IgG2b	2445	56,26	748,4	NB	19,67
NB = sin unión.					

Ejemplo 2

Actividad antitumoral de isotipos de variantes de anti-CTLA-4 en modelo tumoral de adenocarcinoma de colon murino CT26

- Se han usado muchos anticuerpos diferentes para demostrar la actividad de anticuerpos anti-CTLA-4, incluyendo anticuerpos de hámster anti-CTLA-4, 9H10 (Krummel y Allison, 1995) y 4F10 (Walunas *et al.*, 1994), y el anticuerpo de ratón anti-CTLA-4 de ratón, 9D9 (Peggs *et al.*, 2009). Para determinar la potencia relativa de diferentes isotipos de anti-CTLA-4 en la actividad antitumoral, tres de las cuatro variantes isotópicas del anticuerpo anti-CTLA-4 9D9 generadas (anti-CTLA-4-γ 1D265A, anti-CTLA-4-γ2b y anti-CTLA-4-γ2a, que se unen igualmente bien a células CTLA-4⁺ como se describe en el ejemplo 1) se ensayaron junto con un isotipo IgG1 de ratón con respecto a la actividad anti-tumoral en un modelo de adenocarcinoma de colon CT26 singénico. El anticuerpo de control usado

para los estudios es un anticuerpo recombinante humano anti-toxina diftérica con un isotipo IgG1 de ratón.

Diez ratones BALB/c se inyectaron por vía subcutánea con 1×10^6 células tumorales CT26 el día 0. El tratamiento se inició el día 7 después de la implantación. Se midieron los tumores, se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento para tener volúmenes tumorales medios comparables ($45\text{--}50 \text{ mm}^3/2$) y después se trataron por vía intraperitoneal (IP) con el anticuerpo designado ($200 \mu\text{g}/\text{dosis}$) y de nuevo los días 10, 14 y 17. Los volúmenes tumorales se midieron dos veces por semana. Como se muestra en la figura 3, El anti-CTLA-4 9D9-IgG2a produjo un rechazo tumoral en 9 de 10 ratones tratados, mientras que 9D9-IgG2b mostró una inhibición moderada del crecimiento tumoral, estando nueve de diez ratones tratados libres de tumores después de hasta 50 días. Sorprendentemente, el isotipo de anti-CTLA-4 IgG1D265A mostró poca actividad y fue comparable a la IgG de control (figura 3).

Ejemplo 3

15 *Efectos de isotipos de anti-CTLA-4 en subseries de linfocitos T intratumorales CT26 y poblaciones de linfocitos T periféricas*

Análisis de tinción de linfocitos

Para medir el efecto de diferentes isotipos de anti-CTLA-4 en poblaciones de linfocitos T, se tiñeron linfocitos T aislados de ratones tratados con diferentes de anticuerpos para comprobar la presencia de marcadores CD8, CD4, CD45 y Foxp3. Se sacrificaron todos los ratones y se recogieron los tumores y los ganglios linfáticos a los que drenaban para el análisis el día 15 después de la implantación del tumor. Se prepararon suspensiones de una sola célula disociando el tumor y los ganglios linfáticos con la parte posterior de una jeringa en una placa de 24 pocillos. Las suspensiones celulares se pasaron a través de filtros de $70 \mu\text{m}$, se dejaron sedimentar, se resuspendieron y se sometieron a recuento. Las células después se cultivaron en placas de 96 pocillos con 1×10^6 células por pocillo para la tinción. Las células se trataron con 24G.2 (BioXcell), que bloquea la unión de Fc a FcγRIIB y FcγRIII, y posteriormente se tiñeron con anticuerpos contra CD8 (clon 53-6.7; Biolegend), CD4 (clon GK1.5; Biolegend) y CD45 (clon 30-F11; Biolegend) o anticuerpos contra GD11c (clon N418; eBioscience), CD45, CD8, GD11b (clon M1/70 Biolegend) y Gr-1 (clon Rb6-8C5; eBioscience). Para la tinción intracelular, las muestras se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con anticuerpos contra Foxp3 (clon FJK-16s; eBioscience), Ki67 (clon SolA15; eBioscience) y CTLA-4 (clon 4F10; BD Pharmingen). Después, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACS Canto (BD). Este procedimiento general de citometría de flujo también se usó para determinar los efectos de diferentes proteínas de fusión Fc en poblaciones de diferentes linfocitos T como se describe en los siguientes ejemplos.

CD45 es una proteína transmembrana de tipo I que se expresa a altos niveles en diversas formas en todas las células hematopoyéticas diferenciadas excepto eritrocitos y células plasmáticas. CD8, un co-receptor para el receptor de linfocitos T (TCR), se expresa predominantemente en la superficie de linfocitos T citotóxicos, aunque también puede encontrarse en linfocitos NK, timocitos corticales y células dendríticas, mientras que CD4 es una glicoproteína que se encuentra predominantemente en linfocitos T auxiliares, pero también en la superficie de otras células inmunitarias tales como monocitos, macrófagos y células dendríticas. Foxp3, un factor de represión de la transcripción de la familia de factores de transcripción forkhead o de hélice alada, sirve como marcador específico de T_{reg} que previamente se habían estado identificando por marcadores no específicos tales como CD25 o CD45RB (una isoforma de CD45, con empalme del exón 5, que codifica el determinante B). Se ha observado que Foxp3 se expresa en todos los T_{reg} CD4^+ que tienen actividad reguladora, pero la tinción para este marcador requiere la fijación y permeabilización de las células.

Efectos del isotipo de anti-CTLA-4 en poblaciones de linfocitos T

Como CTLA-4 se expresa por, y tiene un papel funcional, tanto en linfocitos T_{eff} /linfocitos T de memoria activados como en subseries T_{reg} , se supervisaron múltiples poblaciones celulares de diferentes localizaciones. Los datos previos demostraron que el bloqueo de anticuerpos anti-CTLA-4 tiene como resultado la expansión de T_{reg} en los ganglios linfáticos (GL) de ratones tratados (Quezada *et al.*, 2006). El efecto del isotipo de anticuerpo para CTLA-4 sobre la expansión de T_{reg} periféricos se evaluó en ratones portadores del tumor adenocarcinoma de colon CT26 analizando subseries de linfocitos T en el tumor y ganglios linfáticos drenantes del tumor de los ratones el día 16 después del tratamiento con anticuerpo. Los análisis estadísticos se realizaron usando GraphPad Prism. Las barras de error representan el error típico de la media calculado usando Prism. Los ensayos estadísticos usados eran ensayos *t* de datos no apareados y análisis de varianza de 1 vía. Los valores de *P* de $< 0,05$, $0,01$ y $0,001$ se anotaron como *, ** y ***, respectivamente, en cada figura.

Todos los anticuerpos aumentaron las cantidades de T_{reg} en el bazo o en otros sitios en la periferia, tales como GL o sangre para obtener gráficos de FACS representativos). Adicionalmente, los T_{reg} en animales tratados con anti-CTLA-4 también tienen mayor expresión de Ki-67, un marcador de la proliferación, lo que sugiere que el bloqueo de CTLA-4 está eliminando una señal inhibidora, independientemente del isotipo de anticuerpo. Se obtuvieron resultados similares en un análisis de GL de ratones no portadores de tumores tratados con cada uno de los isotipos

anti-CTLA-4 (datos no mostrados).

Como cabía esperar, el tratamiento de ratones con anticuerpos anti-CTLA-4 dio como resultado un aumento en el porcentaje de linfocitos CD45⁺ en el sitio del tumor que eran CD8⁺, estando los mayores aumentos inducidos por los isotipos 2a y 2b y estando inducido un ligero aumento por el grupo G1D265A (figura 4A). Las cantidades totales de linfocitos T CD8⁺ en el tumor fueron coherentes con los cambios en porcentaje (datos no mostrados).

El análisis del porcentaje de linfocitos CD4⁺ intratumorales reveló que anti-CTLA-4 con un isotipo 2a daba como resultado una reducción de linfocitos T CD4⁺ (figura 4B).

Cuando se analizaron T_{reg} en linfocitos T intratumorales por tinción para Foxp3 y CD4, se observaron profundas diferencias en cada uno de los grupos de tratamiento (figura 4C). El tratamiento con anti-CTLA-4 del isotipo 2a dio como resultado una disminución espectacular en la cantidad de T_{reg} en el tumor, mientras que 2b no mostró cambios e IgG1D265 produjo aumentos en las cantidades de T_{reg}.

Los cambios en las cantidades de linfocitos T efectores (T_{ef}) y T_{reg} mediados por cada uno de estos isotipos de anti-CTLA-4 ocasionan diferencias espectaculares en la relación intratumoral entre linfocitos T CD8⁺ y T_{reg} así como en la relación entre T_{ef} CD4⁺ y T_{reg} (figuras 5A y B). El isotipo anti-CTLA-IgG2a mostró la máxima relación entre T_{ef} y T_{reg}. Una alta relación entre linfocitos T CD8⁺ y T_{reg} se considera un reflejo de una potente actividad antitumoral.

A diferencia de lo que ocurrió con el análisis de linfocitos T intratumorales, la evaluación de subseries de linfocitos T en la periferia mostró pocas diferencias entre los isotipos. Todos los anticuerpos mejoraban las cantidades de T_{reg} en los ganglios linfáticos drenantes del tumor (figura 6). Estos datos son coherentes con observaciones previas que indican que anti-CTLA-4 ocasiona una expansión de T_{reg} en los GL de ratones tratados con anti-CTLA-4 (Quezada *et al.*, 2006) y coherentes, en general, con conclusiones previas que establecen que los efectos antitumorales del bloqueo de CTLA-4 no se deben a la reducción de T_{reg} periféricas (Maker *et al.*, 2005; Rosenberg, 2006). También se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos CD4⁺ que expresaban ICOS en animales tratados con todos los isotipos de CTLA-4 (datos no mostrados), lo que sugiere que la mayor activación de T_{ef} no depende del isotipo de anticuerpo. En conjunto, estos datos demuestran que la pérdida de T_{reg} se restringe al sitio del tumor.

Ejemplo 4

Actividad antitumoral de isotipos de variantes de anti-CTLA-4 en modelo tumoral de adenocarcinoma de colon murino MC38

Además del modelo tumoral CT26 descrito en el ejemplo 3, se evaluó la actividad antitumoral de diferentes isotipos de anti-CTLA-4 en un modelo tumoral de adenocarcinoma de colon MC38. Se inyectaron ratones C57BL/6 por vía subcutánea con 2 x 10⁶ células tumorales MC38 cada uno. Después de 7 días, se determinaron los volúmenes tumorales y los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento de manera que tuvieran volúmenes tumorales medios comparables (44,7-49,2 mm³/2). Se administraron anticuerpos anti-CTLA-4 de cuatro isotipos diferentes (IgG1, IgG1D265A, IgG2a e IgG2b), formulados en PBS, IP los días 7, 10 y 14 a 200 µg por dosis en un volumen de 200 µl. Los volúmenes tumorales se registraron tres veces por semana.

Las figuras 7B y C muestran que los tumores tratados con anti-CTLA-4 IgG1 e IgG1D265A crecían rápidamente a tasas similares comparables a la tasa de crecimiento de tumores tratados con un control de IgG1 de ratón (figura 7A). Por el contrario, el tratamiento de ratones con el anticuerpo anti-CTLA-4 IgG2a (figura 7D) redujo de manera espectacular la tasa de crecimiento tumoral a niveles que se aproximan a la inhibición completa. El anticuerpo anti-CTLA-4 IgG2b también inhibía significativamente el crecimiento tumoral (figura 7E), aunque en un menor grado que el isotipo IgG2a.

Los cambios en las medias de los volúmenes tumorales y en las medianas de los volúmenes tumorales de los ratones de los grupos tratados con los diferentes isotipos de anti-CTLA-4 se representan en las figuras 8A y B. Estos gráficos confirman los datos de ratones individuales mostrados en la figura 7 y revelan claramente que el isotipo IgG2a del anticuerpo anti-CTLA-4 presenta el efecto inhibitor más potente sobre el crecimiento de tumores MC38, seguido del efecto del isotipo IgG2b. Los isotipos IgG1 e IgG1D265A muestran una inhibición pequeña o nula del crecimiento tumoral, similar al control de IgG1 de ratón. El porcentaje de inhibición media del crecimiento tumoral efectuada por los cuatro isotipos anti-CTLA-4 en diferentes puntos de tiempo después de la implantación del tumor se muestra en la tabla 4.

En conjunto, los datos de las figuras 7 y 8 y de la tabla 4 demuestran que el IgG1 y los isotipos anti-CTLA-4 IgG1 mutado de ratón no presentan actividad antitumoral en comparación con un control de isotipo IgG de ratón en este modelo tumoral MC38 estadiado (terapéutico). Por el contrario, es evidente una actividad antitumoral significativa con los isotipos IgG2a e IgG2b, consiguiendo el primero una inhibición prácticamente completa del crecimiento tumoral, y siendo mucho más potente que el último.

Tabla 4. Porcentaje medio de inhibición del crecimiento tumoral de MC38 después de la implantación del tumor

Día	% Medio de Inhibición del Crecimiento Tumoral			
	Anti-CTLA-4-mIgG1	Anti-CTLA-4-mIgG1D265A	Anti-CTLA-4-mIgG2a	Anti-CTLA-4-mIgG2b
y	8,2	2,0	-0,1	-1,0
9	7,3	-13,6	-17,7	-18,5
11	3,8	-8,5	14,9	11,5
14	-8,1	-15,6	59,8	31,3
16	-7,5	-3,6	75,5	50,9
18	-7,8	0,8	85,4	50,6
21	-17,3	-8,9	92,6	47,0

Ejemplo 5**5 Efectos de isotipos de anti-CTLA-4 en subseries de linfocitos T intratumorales MC38**

Se analizaron subseries de linfocitos T en linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) MC38 procedentes de ratones tratados con los diferentes isotipos anti-CTLA-4. Los isotipos IgG2a e IgG1D265A mutado causaron un aumento marginal del porcentaje de linfocitos CD4⁺ en comparación con el control de isotipo IgG1 de ratón (figura 9A). Sin embargo, cuando se analizó el nivel de linfocitos CD8⁺, el tratamiento con el anticuerpo anti-CTLA-4 IgG2a ocasionó un aumento significativo (de aproximadamente 2,5 veces) en el porcentaje de linfocitos CD8⁺ en comparación tanto con el isotipo IgG1 de ratón como con el anti-CTLA-4 IgG1 mutado (figura 9B). El anticuerpo anti-CTLA-4 IgG2a también indujo una reducción de aproximadamente 5 veces en el nivel de T_{reg} en comparación tanto con el isotipo IgG1 como con el anti-CTLA-4 IgG1 mutado (figura 9C).

Los efectos combinados del aumento en T_{ef} CD8⁺ y la reducción en T_{reg} mediados por el isotipo anti-CTLA-4 IgG2a se tradujeron en una relación entre T_{ef} y T_{reg} (figura 10A) que era mucho (más de 8 veces) más alta que las relaciones entre T_{ef} y T_{reg} resultantes del tratamiento con el isotipo IgG1 o el anticuerpo anti-CTLA-4 IgG1D265A (figura 10A). Como ocurre en el modelo de adenocarcinoma de colon CT26, esta alta relación entre T_{ef} y T_{reg} refleja una actividad antitumoral sólida. La relación entre T_{ef} CD4⁺ y T_{reg} resultante del tratamiento con el anticuerpo IgG2a también fue aproximadamente 5 veces mayor que las relaciones entre T_{ef} y T_{reg} inducidas por el isotipo o anticuerpo IgG1D265A (figura 10B).

Ejemplo 6**Actividad antitumoral de isotipos de variantes de anti-CTLA-4 en un modelo tumoral de fibrosarcoma murino Sa1N inmunogénico**

También se evaluó la actividad antitumoral de anti-CTLA-4 en un modelo tumoral de fibrosarcoma Sa1N inmunogénico. Se inyectaron ratones A/J por vía subcutánea con 2 x 10⁶ células tumorales Sa1N. Después de 7 días, se determinaron los volúmenes tumorales y los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento de manera que tuvieran volúmenes tumorales medios comparables (132,4-146,5 mm³/2). Los anticuerpos anti-CTLA-4 (9D9) que tenían los isotipos IgG1, IgG1D265A mutado e IgG2a se formularon en PBS y se administraron IP los días 7, 11 y 14 a 200 µg por dosis en un volumen de 200 µl. Los volúmenes tumorales se registraron dos veces por semana.

Como se muestra en la figura 11, el tratamiento de los ratones con el anticuerpo anti-CTLA-4 IgG2a inhibía significativamente el crecimiento tumoral (figura 11B), mientras que los tumores tratados con IgG1D265A (figura 11C) continuaron creciendo rápidamente, de forma comparable al crecimiento no inhibido de los tumores tratados con el control de isotipo IgG1 (figura 11A). Los cambios en las medias de los volúmenes tumorales y medianas de los volúmenes tumorales de los ratones de grupos tratados con los diferentes isotipos anti-CTLA-4 y el control, mostrados en las figuras 12A y B, confirman el efecto inhibidor pronunciado del anticuerpo IgG2a sobre el crecimiento tumoral, en comparación con la ausencia relativa de inhibición del crecimiento tumoral presentada por el isotipo IgG1D265A y el control IgG1 de ratón. En la tabla 5 se muestra una comparación del porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral efectuada por los isotipos IgG2a e IgG1D265A mutado a diversos puntos de tiempo después de la implantación del tumor.

Tabla 5. Porcentaje medio de inhibición del crecimiento tumoral de Sa1N después de la implantación del tumor

Día	% Medio de inhibición del crecimiento tumoral	
	Anti-CTLA-4-mIgG1D265A	Anti-CTLA-4-mIgG2a
7	9,8	3,1
10	2,1	8,2
13	-20,0	30,2
17	-18,8	65,3

En conjunto, los datos de las figuras 11 y 12 y de la tabla 5 demuestran que el isotipo IgG2a del anticuerpo anti-CTLA-4 presenta una potente actividad antitumoral en este modelo tumoral Sa1N estadificado (terapéutico), en contraposición al anticuerpo anti-CTLA-4 IgG1 mutado que carece de actividad antitumoral, similar a un control de isotipo IgG1.

Ejemplo 7

Efectos de isotipos de anti-CTLA-4 en subseries de linfocitos T intratumorales Sa1N

Se analizaron subseries de linfocitos T en TIL de tumor Sa1N procedentes de ratones tratados con los isotipos anti-CTLA-4 IgG2a e IgG1 mutado, junto con control de isotipo IgG1.

Ninguno de los anticuerpos ensayados produjo ningún cambio significativo en el porcentaje de linfocitos CD4⁺ (figura 13A). Por el contrario, el tratamiento con anti-CTLA-4 que tenía el isotipo 2a produjo un notable aumento en el porcentaje de linfocitos CD8⁺ (figura 13B) y una reducción concomitante significativa en el nivel de T_{reg} (figura 13C).

El aumento en T_{ef} CD8⁺ y la reducción en T_{reg} mediados por el isotipo anti-CTLA-4 IgG2a se tradujeron en una relación entre T_{ef} y T_{reg} (figura 14A) que era significativamente mayor (al menos aproximadamente 6 veces mayor) que las relaciones entre T_{ef} y T_{reg} resultantes del tratamiento con el isotipo IgG1 o el anticuerpo anti-CTLA-4 IgG1D265A (figura 14A). De forma coherente con los modelos tumorales CT26 y MC38, esta alta relación entre T_{ef} y T_{reg} es indicativa de una actividad antitumoral sólida. La relación entre T_{ef} CD4⁺ y T_{reg} resultante del tratamiento con el anticuerpo IgG2a también fue mayor que las relaciones entre T_{ef} y T_{reg} inducidas por el control de isotipo o anticuerpo anti-CTLA-4 IgG1D265A (figura 14B). Sin embargo, como el anticuerpo IgG2a no producía un aumento de linfocitos CD4⁺ en comparación con el control IgG1 o IgG1D265A, el aumento en la relación entre T_{ef} y T_{reg} no era tan pronunciado como para la relación entre CD8⁺ T_{ef} y T_{reg}.

Como previamente se había demostrado que los anticuerpos contra CTLA-4 (hámster; Leach *et al.*, 1996) y 9D9 (isotipo 2b (datos propios no publicados)) eran eficaces en el fibrosarcoma Sa1N como monoterapia incluso con una alta carga tumoral, era de esperar que la activación de T_{ef} pudiera ser únicamente responsable del efecto antitumoral de la terapia de anticuerpos anti-CTLA-4 en tumores altamente inmunogénicos. Sin embargo, los datos anteriores indican que la actividad de anti-CTLA-4 en el modelo Sa1N está mediada, al menos en parte, por la capacidad de ciertos isotipos, en particular el isotipo IgG2a, de reducir la cantidad de T_{reg} en el sitio del tumor. Un aumento concomitante en T_{ef} CD8⁺ produce un notable aumento en la relación entre T_{ef} y T_{reg}. No obstante, los datos preliminares (no mostrados) también sugieren que en ratones portadores de una baja carga de un tumor inmunogénico, por ejemplo, un tumor Sa1N singénico, la activación de una respuesta antitumoral por anticuerpos anti-CTLA-4, independientemente del isotipo, puede estar mediada únicamente por el bloqueo de CTLA-4. En esta situación, la activación de T_{ef} solos puede ser suficiente para eliminar tumores sin ninguna reducción concomitante en las cantidades de T_{reg}.

Ejemplo 8

Efecto del tratamiento con anti-CTLA-4 sobre células supresoras de origen mieloide

Además de los linfocitos T, se analizaron células supresoras de origen mieloide (MDSC), definidas por la expresión de los marcadores de superficie CD11b y Gr-1, en tumores y bazos de ratones portadores de tumores MC38 tratados con anticuerpo anti-CTLA-4. Se implantaron células de tumor de colon MC38 (2 x 10⁶) por vía subcutánea en ratones C57BL/6. El día 7 después de la implantación, los ratones portadores de tumores se distribuyeron aleatoriamente y recibieron 3 dosis de anticuerpo por inyección intraperitoneal (10 mg/kg) cada 3 días. El día 15 después de la implantación, se recogieron los tumores, se disociaron manualmente en suspensiones de una sola célula y se evaluaron los niveles de citocinas intratumorales mediante matrices de citocinas basadas en microesferas (FlowCytomix; Ebioscience, San Diego, CA).

La figura 15 muestra la evaluación de cantidades de MDSC (CD11b⁺Gr-1⁺) entre células CD45⁺ (figura 15A), así como los niveles de interleucina 1-alfa (IL-1 α) (figura 15B). Los datos son representativos de (A) dos experimentos independientes con ≥ 3 ratones por grupo o (B) tres experimentos independientes con ≥ 5 ratones/grupo/experimento. No se observaron cambios en las MDSC esplénicas para ninguno de los isotipos anti-CTLA-4 (datos no mostrados). Por el contrario, sin embargo, habían aumentado sustancialmente las cantidades de MDSC en tumores de ratones tratados con el isotipo IgG2a (figura 15A).

Ejemplo 9

Expresión de citocinas antitumorales en respuesta a un tratamiento anti-CTLA-4

Para determinar si la disminución en T_{reg} infiltrantes de tumor y el aumento concomitante en las cantidades de linfocitos CD8 efectoras estaban asociados con cambios en la función de linfocitos T, se midieron los niveles de citocinas presentes dentro del microentorno tumoral en cada uno de los grupos de tratamiento en ratones portadores de tumores MC38. Se recogieron tumores en 1 ml de medio completo de linfocitos T (RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal (FBS) inactivado con calor al 10 %, penicilina/estreptomicina y β -mercaptoetanol (Life Technologies, Grand Island, NY) en placas de 24 pocillos y se disociaron manualmente en suspensiones de una sola célula. Las células y los desechos se centrifugaron y los sobrenadantes se recogieron y se congelaron para permitir el procesamiento por lotes de las muestras. Tras la descongelación, se evaluaron 25 μ l de sobrenadante de cada muestra con respecto a las concentraciones intratumorales de IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-27, IP-10, GM-CSF, TNF- α e IFN- γ por duplicado usando una matriz de citocinas basada en microesferas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (FlowCytomix; eBioscience, San Diego, CA). El tratamiento con anti-CTLA-4-IgG2a tuvo como resultado los aumentos más pronunciados en los niveles intratumorales tanto de linfocitos T auxiliares (T_H)1 como de citocinas T_H2, con un aumento significativo de IFN- γ , TNF- α , IL-13 e IL-10 en comparación con cada una de las otras variantes de isotipo (figura 16). De forma interesante, los niveles de IL-1 α también fueron tanto específica como significativamente mayores en tumores de ratones que se habían tratado con CTLA-4-IgG2a (figura 15B) en comparación con todos los demás isotipos. Esta regulación positiva era única para el tratamiento con la variante IgG2a y no estaba asociada simplemente con la destrucción y regresión tumoral ya que este aumento en IL-1 α no se observó con ratones portadores de tumores MC38 tratados con la combinación de anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTLA-4-IgG2b, que conduce a una eficacia antitumoral y expansión de T_{ef} similares (datos no mostrados).

EJEMPLO DE REFERENCIA 10 Generación de diferentes isotipos de anticuerpo Anti-mGITR

GITR (receptor de factor de necrosis tumoral (TNF) inducido por glucocorticoides), una proteína transmembrana de tipo I con homología con otros miembros de la familia de receptores del TNF tales como OX40, CD27 y 4-1BB (Nocentini y Riccardi, 2005). En los seres humanos, GITR se expresa normalmente a bajos niveles en linfocitos T CD4⁺Foxp3⁻ y CD8⁺, pero se expresa de manera constitutiva a altos niveles en T_{reg} CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. La expresión aumenta en las 3 subpoblaciones después de la activación de linfocitos T (Cohen *et al.*, 2010). Los datos de los presentes inventores muestran que, en ratones, GITR se expresa constitutivamente a altos niveles en todas las subseries de linfocitos T (véase el ejemplo 18).

DTA-1 es un anticuerpo agonista de rata anti-GITR de ratón (Shimizu *et al.*, 2002; eBioscience, San Diego, CA). Se ha demostrado que este anticuerpo IgG2b modula tanto los T_{reg} como los T_{ef} durante el tratamiento del melanoma B16. Además, La expresión de GITR tanto por T_{ef} como por T_{reg} era necesaria para conseguir los efectos completos de DTA-1. Cohen *et al.* (2010) han sugerido que aunque la unión a GITR de DTA-1 no anula globalmente la actividad supresora de T_{reg}, afecta negativamente a la infiltración tumoral de T_{reg} y ocasiona una pérdida de expresión Foxp3 dentro de los T_{reg} intratumorales, lo que implica una anulación localizada de la supresión. El resultado neto es una relación aumentada intratumoral T_{ef}:T_{reg} y una mayor activación y función de T_{ef} dentro del tumor.

DTA-1 bloquea la interacción entre GITR y el ligando de GITR (GITRL) y el anticuerpo solubles es eficaz para promover una respuesta celular *in vitro*. También es eficaz en diversos modelos tumorales en la inhibición del crecimiento tumoral (véase, por ejemplo, Turk *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2010). Tal como se describe en el ejemplo 1 para 9D9, se generaron cuatro variantes isotópicas de DTA-1, es decir, mlgG1, mlgG1-D265A, mlgG2a y rlgG2b (el isotipo de rata original, que es equivalente a IgG2a de ratón).

EJEMPLO DE REFERENCIA 11

Actividad antitumoral de isotipos de variantes de anti-GITR en modelo tumoral MC38

Experimento MC38 n.º 1

La actividad antitumoral de los diferentes isotipos anti-GITR (DTA-1) se evaluó en un tumor de adenocarcinoma de colon singénico MC38 estadificado como se describe en el ejemplo 4. Se inyectaron ratones C57BL/6 por vía subcutánea con 2×10^6 células tumorales MC38 cada uno. Después de 7 días, los ratones se distribuyeron aleatoriamente en 5 grupos de tratamiento y se administraron anticuerpos de ensayo IP los días 7, 10 y 14 a 200 μ g

por dosis en un volumen de 200 µl como se indica a continuación: Grupo 1: control de IgG1 de ratón (IgG); Grupo 2: Ac IgG2a de ratón anti-CTLA-4 (9D9-m2a); Grupo 3: Ac IgG2b de rata anti-GITR (DTA-r2b); Grupo 4: Ac IgG1 de ratón anti-GITR (DTA-mg1); y Grupo 5: Ac IgG2a de ratón anti-GITR (DTA-m2a). Los tumores y bazo se recogieron el día 15. (El análisis biofísico (por SEC) demostró que con la excepción del anticuerpo DTA-r2b, todos los anticuerpos monoclonales DTA-1 modificados dos veces por ingeniería genética presentaban una alta agregación, lo cual posteriormente promovió la repetición de este experimento como experimento de MC38 n.º 2 descrito más adelante.)

La figura 17B muestra que los tumores tratados con IgG1 anti-GITR crecían a una tasa comparable a la de los tumores tratados con el control de IgG1 de ratón (figura 17A), sin que ninguno de los 10 tumores estuviera libre de tumores (ST) al final de la supervisión de los ratones. Sin embargo, de forma similar al patrón observado con los anticuerpos anti-CTLA-4 IgG2a e IgG2b, DTA-r2b (figura 17C) y DTA-m2a (figura 17D) redujeron significativamente la tasa de crecimiento tumoral, siendo 3 y 2 de los 10 ratones, respectivamente ST.

Los cambios en las medias de los volúmenes tumorales y en las medianas de los volúmenes tumorales de los ratones de los grupos tratados con los diferentes isotipos de anti-GITR se representan en las figuras 18A y B. Estos gráficos confirman los datos de ratones individuales mostrados en la figura 17 que indican que el isotipo IgG2b del anticuerpo anti-GITR presenta el efecto inhibitor más potente sobre el crecimiento de tumores MC38, siendo el isotipo IgG2a ligeramente menos potente. El isotipo IgG1 muestra una inhibición pequeña del crecimiento tumoral, siendo la media y mediana de los volúmenes tumorales similares a las de los ratones tratados con el control de IgG de ratón.

Efectos de isotipos de anti-GITR sobre subseries de linfocitos T de MC38 en TIL y bazo

Se compararon las poblaciones de subseries de linfocitos T en TIL de MC38 y bazo de ratones tratados con los diferentes isotipos de anti-GITR. En el bazo, DTA-m2a y DTA-r2b causaron una ligera reducción en el nivel de linfocitos CD8⁺ mientras que 9D9-m2a y DTA-m1 no alteraron los niveles de linfocitos T CD8⁺ (figura 19A). Ninguna de las variantes de isotipo ensayadas tenía un efecto significativo sobre el porcentaje de linfocitos CD4⁺ o CD4⁺Foxp3⁺ en el bazo (figuras 19B y C).

En los TIL, 9D9-m2a produjo un aumento de al menos 2 veces en el porcentaje de linfocitos CD8⁺ en comparación con el control de IgG1 de ratón (figura 19D), coherente con los resultados del ejemplo 5. DTA-m2a tuvo un efecto menos pronunciado, aumentando el porcentaje de linfocitos CD8⁺ aproximadamente un 50 %, mientras que DTA-m1 y DTA-r2b no produjeron, o solo produjeron un aumento marginal, en el porcentaje de linfocitos CD8⁺ en comparación con el control de isotipo de IgG1 de ratón (figura 19D). 9D9-m2a produjo un pequeño aumento en el porcentaje de linfocitos CD4⁺ en comparación con el control de isotipo IgG1 de ratón, mientras que DTA-m1 no produjo ningún cambio en CD4⁺ (figura 19E).

Por el contrario, tanto DTA-m2a como DTA-r2b redujeron los porcentajes de CD4⁺ en un 40-50 % en comparación con los dos isotipos IgG1 de ratón (figura 19E).

Los niveles más espectaculares se observaron con los niveles de T_{reg} CD4⁺Foxp3⁺ entre los TIL. Mientras que DTA-m1 no tuvo ningún efecto sobre esta población de linfocitos T, 9D9-m2a y DTA-m2a indujeron una reducción de aproximadamente 6 veces en el nivel de T_{reg} CD4⁺Foxp3⁺ en comparación con el isotipo IgG1 y DTA-m1 (figura 19F).

Los datos confirman el efecto observado en el ejemplo 5 para el isotipo anti-CTLA-4 IgG2a y demuestran que la variante IgG2a de anti-GITR reduce de manera similar el nivel de T_{reg} específicamente en el entorno tumoral. Por lo tanto, de forma similar al isotipo anti-CTLA-4 IgG2a, el isotipo anti-GITR IgG2a también induce un aumento en los T_{ef} CD8⁺ y un aumento de los T_{reg} en el sitio del tumor que se traduce en una relación elevada entre T_{ef} y T_{reg} que es indicativa de una actividad antitumoral sólida. DTA-r2b también indujo una reducción significativa en el nivel de T_{reg} CD4⁺Foxp3⁺ en comparación con el control de IgG1, aunque no una reducción tan pronunciada como la inducida por 9D9-m2a y DTA-m2a, coherente con la menor unión de la región Fc de IgG2b de rata a FcγR de activación murinos. Estos datos muestran que el anticuerpo anti-GITR agonista se comporta de manera similar al anticuerpo anti-CTLA-4 antagonista al requerir la implicación de FcγR de activación para la actividad de reducción.

La medición por citometría de flujo del nivel de expresión de GITR en diferentes subseries de linfocitos T en bazo y TIL de MC38 mostró que GITR tenía una alta expresión en T_{reg} en el sitio del tumor, siendo ese nivel de expresión mayor que en T_{reg} en la periferia de T_{ef} CD8⁺ en el sitio del tumor, que, a su vez, mostraron una mayor expresión que T_{ef} CD8⁺ o CD4⁺ en la periferia (véase el ejemplo 18). El menor nivel relativo de expresión de GITR se observó en T_{ef} CD4⁺ en el sitio del tumor. Estos datos sugieren un mecanismo por el que la actividad de reducción de linfocitos T ayuda a estimular una respuesta de linfocitos T y, por lo tanto, mejorar la eficacia antitumoral de una proteína de fusión Fc si la diana de la proteína de fusión Fc tiene una alta expresión en T_{reg} en el sitio del tumor con respecto a la expresión de la diana en T_{ef} en el sitio del tumor, y la proteína de fusión Fc se une a un FcR de activación que media en la reducción de la célula diana.

Experimento de MC38 n.º 2

- Debido a la agregación encontrada con las variantes de DTA-1 (excepto la forma original obtenida en el mercado de DTA-r2b), se modificó por ingeniería genética dos veces una nueva serie de variantes isotópicas para obtener anticuerpo DTA-1 que no forman agregados. La agregación observada se rastreó hasta un aminoácido extra que se había incorporado involuntariamente en la cadena ligera de las variantes isotópicas obtenidas por ingeniería genética, y el problema se alivió retirando este aminoácido extraño. Los anticuerpos modificados por ingeniería genética dos veces se usaron en este experimento n.º 2. La actividad antitumoral de los isotipos de anti-GITR (DTA-1; serie GITR.7) modificados dos veces por ingeniería genética se evaluó usando un modelo de MC38 estadificado.
- En ratones C57BL/6 se implantaron por vía subcutánea 2×10^6 células MC38 por ratón. Después de 7 días, los ratones se distribuyeron en 7 grupos de tratamiento para tener volúmenes tumorales medios comparables de aproximadamente $148 \text{ mm}^3/2$, y se administraron anticuerpos de ensayo IP los días 7, 10 y 14 a $200 \mu\text{g}$ por dosis (excepto en el caso del control de mIgG que se administró a una dosis de $200 \mu\text{g}$) como se indica a continuación: Grupo 1: control de IgG1 de ratón (mIgG o "isotipo"); Grupo 2: IgG1Ab de ratón anti-GITR (mGITR.7.mgl); Grupo 3: Isotipo IgG1D265A de ratón anti-GITR (mGITR.7.mgl-D265A); Grupo 4: Ac IgG2a de ratón anti-GITR (mGITR.7.mg2a); Grupo 5: Ac IgG2b de ratón anti-GITR (mGITR.7.mg2b); Grupo 6: Ac IgG2b de rata anti-GITR (mGITR.7.r2b o DTA-1-rG2b); y Grupo 7: Ac IgG2a de ratón anti-CTLA-4 (9D9-mg2a). Los tumores y bazo se recogieron el día 15.
- Las figuras 20B y C muestran que los tumores tratados con anti-GITR IgG1 e IgG1-D265A crecían a una tasa comparable a la tasa de tumores tratados con un control de IgG1 de ratón (figura 20A). En cualquier caso, ninguno de los 9 ratones eran ST al minar de la supervisión de los ratones 35 días después de la implantación. Sin embargo, de forma similar a los resultados que se muestran en el experimento de MC38 n.º 1, mGITR.7.mg2a (figura 20D) indujo la mayor inhibición del crecimiento tumoral, siendo 2 de los 9 ratones ST. Los anticuerpos anti-GITR-2b de ratón y rata también redujeron significativamente la tasa de crecimiento tumoral en grados similares (figuras 20E y F), aunque el anticuerpo 2b de rata produjo 1 ratón ST mientras que el anticuerpo 2b no produjo ningún ratón ST 35 días después de la implantación.

- En las figuras 21A y B se muestran cambios en las medias de volúmenes tumorales y medianas de volúmenes tumorales. Las tendencias son similares a las observadas en el experimento 1 de MC38 con la excepción de que, de forma similar a los datos obtenidos con anticuerpos anti-CTLA-4, el isotipo anti-GITR IgG2a es el inhibidor más potente del crecimiento tumoral de MC38, mientras que el isotipo IgG2b presenta una potencia significativa, pero menor, para inhibir el crecimiento del tumor. Los isotipos IgG1 e IgG1-D265A mostraron una inhibición de bajo nivel del crecimiento tumoral en comparación con el control de IgG de ratón.

Efectos de isotipos anti-GITR sobre poblaciones de T_{reg} en el modelo de tumor MC38

- Los efectos de los diferentes isotipos de anti-GITR sobre las poblaciones de T_{reg} en TIL y bazo de los ratones tratados se muestran en la figura 22. Como se observa en el experimento n.º 1, ninguna de las variantes de isotipo ensayadas tenía un efecto muy grande sobre el porcentaje de $T_{\text{reg}} \text{ CD4}^+ \text{ Foxp3}^+$ en el bazo: el efecto más fuerte fue un aumento menor del 40 % inducido por tratamiento con el isotipo anti-GITR IgG2b de rata, mientras que el isotipo anti-GITR IgG2b de ratón redujo marginalmente el porcentaje de $T_{\text{reg}} \text{ CD4}^+ \text{ Foxp3}^+$. Los otros isotipos anti-GITR ensayados y el anticuerpo anti-CTLA-4 IgG2a aumentaron marginalmente el porcentaje de T_{reg} (figura 22A).
- Por el contrario, en los TIL, con la excepción del isotipo IgG1, que no produjo ningún cambio en comparación con el control de isotipo, todos los anticuerpos ensayados indujeron reducciones significativas en el porcentaje de T_{reg} . El anticuerpo anti-CTLA-4 9D9-mG2a causa una reducción de aproximadamente 4 veces en el nivel de $T_{\text{reg}} \text{ CD4}^+ \text{ Foxp3}^+$ en comparación con el isotipo IgG1; los isotipos 2a y 2b de ratón anti-GITR y el isotipo 2b de rata redujeron, todos ellos, el nivel de T_{reg} aproximadamente 2 veces, y el mutante IgG1-D265A produjo una reducción ligeramente menor (figura 22B). Estos datos confirman los efectos observados en el experimento n.º 1 que demuestran que los isotipos de anti-GITR mG2a, mG2b y rG2b inducen una reducción significativa de T_{reg} en el entorno tumoral, que se correlaciona con la inhibición del crecimiento tumoral.

- Los datos obtenidos en el experimento de MC38 n.º 2 son considerablemente coherentes con los obtenidos en el experimento n.º 1, lo que sugiere que la agregación de los anticuerpos no interfería de manera indebida con las actividades de los anticuerpos. Posiblemente, los anticuerpos agregados se eliminan rápidamente en los ratones y, por lo tanto, es posible que la agregación de anticuerpos no sea un problema significativo en los presentes ensayos *in vivo*.

*EJEMPLO DE REFERENCIA 12**Actividad antitumoral de isotipos de variantes de anti-GITR en un modelo tumoral Sa1N estadificado*

- También se evaluó la actividad antitumoral de anti-GITR en un modelo de sarcoma Sa1N en ratones A/J. Se inyectaron ratones por vía subcutánea con 2×10^6 células Sa1N por implante. Después de 7 días, se determinaron los volúmenes tumorales y los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento de manera que

tuvieran volúmenes tumorales medios comparables (aproximadamente $75 \text{ mm}^3/2$). Se administraron anticuerpos anti-GITR (DTA-1) obtenidos por ingeniería genética para que tuvieran diferentes isotipos como se describe en el ejemplo 11, experimento de MC38 n.º 1, IP los días 7, 10 y 12 a $200 \mu\text{g}$ por dosis.

- 5 Los efectos sobre el crecimiento tumoral se muestran en la figura 23. El tratamiento con el anticuerpo anti-GITR IgG2a inhibió completamente el crecimiento tumoral y los 10 ratones fueron ST aproximadamente el día 20 después de la implantación (figura 23B), y el isotipo IgG2b de rata tuvo un efecto similar con 9 de 10 ratones SF aproximadamente el día 20 (figura 23C). Los isotipos IgG1 (figura 23D) e IgG1D265A (figura 23E) inhibieron tumores en alguna medida en comparación con el crecimiento no inhibido de los tumores tratados con control de isotipo IgG1 (figura 23A), pero esta inhibición fue mucho menor que la observada con los isotipos mlgG2a y rlgG2b. Los cambios en las medias de volúmenes tumorales medios y medianas de volúmenes tumorales medios, mostrados en las figuras 24A y B, confirman el efecto inhibitor prácticamente completo de los anticuerpos mlgG2a y rlgG2b sobre el crecimiento tumoral, en comparación con una inhibición mucho menor del crecimiento tumoral presentado por los isotipos mlgG1 y mlgG1-D265A.

15 En conjunto, los datos de las figuras 23 y 24 confirman los datos obtenidos con el modelo de tumor MC38 (ejemplo 11) que muestran que los isotipos mlgG2a y rlgG2b de anti-GITR presentan una actividad antitumoral potente en contraste con los isotipos mlgG1 (y mlgG1-D265A) que presentan una actividad antitumoral mucho menor.

20 *Efectos de isotipos de anti-GITR sobre poblaciones de T_{reg} en el modelo de tumor Sa1N*

Los efectos de los diferentes isotipos de anti-GITR sobre las poblaciones de T_{reg} en TIL y bazos de Sa1N de los ratones tratados se muestran en la figura 25. Todas las variantes de isotipo de anti-GITR ensayadas indujeron aumentos relativamente pequeños de aproximadamente un 20-40 % en el nivel de T_{reg} $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+$ en el bazo. El máximo aumento se indujo por tratamiento con el isotipo de anti-GITR IgG2a de ratón, que produjo el mismo aumento que el tratamiento con los anticuerpos anti-CTLA-4 IgG2b e IgG1-D265A (figura 25A). Estos últimos isotipos de anti-CTLA-4 se usaron como controles positivos en este estudio de GITR ya que se había observado previamente reducción de T_{reg} con el isotipo IgG2b.

30 En contraste con el efecto de T_{reg} en la periferia, los isotipos de anti-GITR m2a y r2b,

así como los isotipos de anti-CTLA-4 2b redujeron, todos ellos, el nivel de T_{reg} en el sitio del tumor al menos 3,5 veces (figura 25B). Tanto el isotipo anti-GITR IgG1 como el mutante IgG1-D265A indujeron reducciones menores de aproximadamente un 35 % en el porcentaje de T_{reg} , mientras que el mutante anti-CTLA-4 IgG1-D265A no produjo ningún cambio en el porcentaje de T_{reg} en TIL (figura 25B). Por lo tanto, como se observó en el modelo tumoral MC38, los isotipos anti-GITR mG2a y rG2b inducen una reducción significativa de T_{reg} en el entorno tumoral, mucho más que los anticuerpos IgG1 e IgG1-D265A, que se correlaciona con la inhibición del crecimiento tumoral.

40 **Ejemplo 13**

Efecto de la afucosilación sobre la actividad antitumoral de isotipos de variantes de anti-CTLA-4 en modelo tumoral MC38

Se evaluó la actividad antitumoral de isotipos de anti-CTLA-4 no fucosilados (NF) (9D9) en el modelo tumoral MC38. Estas variantes no fucosiladas se generaron usando una línea celular CHO que carecía de fucosiltransferasa para las transfecciones. Se inyectaron en ratones C57BL/6, por vía subcutánea, 2×10^6 células tumorales MC38 por implante y, después de 11 días, los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento que tenían un volumen tumoral medio de aproximadamente $230 \text{ mm}^3/2$. Se administraron anticuerpos anti-CTLA-4 de cuatro isotipos diferentes (IgG1D265A, IgG2a, IgG2a-NF, IgG2b e IgG2b-NF), IP los días 11, 13 y 15 a $200 \mu\text{g}$ por dosis en un volumen de $200 \mu\text{l}$.

Como se ha observado previamente (véase el ejemplo 4), el mutante IgG1D265A (figuras 26B) tuvo un efecto mínimo sobre la inhibición del crecimiento de tumores en comparación con el control de IgG1 de ratón (figura 26A), mientras que el isotipo IgG2b inhibió notablemente el crecimiento tumoral (figura 27C), aunque en una menor medida que el IgG2a (figura 26E) que reducía de manera potente la tasa de crecimiento tumoral dando como resultado 10 de 12 ratones ST. La afucosilación del isotipo IgG2b potenció de manera espectacular su actividad inhibidora de tumor (figura 26D), dando como resultado 10 de 12 ratones SF, de forma similar a la actividad observada con el isotipo IgG2a. Estos datos confirman que la afucosilación, que se sabe que aumenta la unión de la región Fc a FcR de activación, puede usarse para aumentar la reducción de T_{reg} en el sitio del tumor y mejorar la eficacia anti-tumoral de proteínas de fusión Fc que se dirigen a T_{reg} . El isotipo IgG2a no fucosilado presentó una inhibición similar del crecimiento tumoral (figura 26F) a la del isotipo IgG2a normal (figura 26E). El isotipo IgG2a es tan potente en la inhibición del crecimiento tumoral que no se observa ninguna mejora con la variante IgG2a-NF.

Los cambios en las medias y en los volúmenes tumorales en los grupos tratados de ratones se muestran en las figuras 27A y B, que confirman los datos de ratones individuales en la figura 26 e ilustran la alta potencia de los isotipos IgG2b-NF, IgG2a e IgG2a-NF en comparación con los isotipos IgG1D265A e IgG1.

EJEMPLO DE REFERENCIA 14

Actividad antitumoral de isotipos de variantes de anti-OX40 en modelo tumoral CT26 murino

Para determinar la potencia antitumoral relativa de diferentes isotipos de un anticuerpo anti-OX40 agonista, se obtuvieron por ingeniería genética tres variantes isotípicas de anticuerpo anti-OX40 OX86 (Al-Shamkhani *et al.*, 1996): anti-OX40 IgG1 de rata (OX40-rg1), anti-OX40-IgG1 de ratón (OX40-mg1) y anti-OX40 IgG2a de ratón (OX40-mg2a). Estas variantes de isotipo se ensayaron junto con un control de isotipo IgG1 de ratón (un anticuerpo anti-toxina diftérica humano recombinante con un isotipo IgG1 de ratón) con respecto a la actividad antitumoral en un

modelo de ratón de carcinoma de colon CT26. Se inyectaron ratones BALB/c por vía subcutánea con 1×10^6 células tumorales CT26. Los ratones se trataron IP con los anticuerpos, formulados en PBS, los días 3, 7 y 10 a 200 µg por dosis en un volumen de 200 µl. Los volúmenes tumorales se midieron dos veces por semana.

Como se muestra en la figura 28, el isotipo IgG1 de rata de anti-OX40 presentó un nivel moderado de inhibición del crecimiento tumoral (figura 28B) en comparación con IgG de control (figura 28A) siendo 3 de 10 ratones tratados con OX40-rg1 ST después de hasta 35 días, mientras que el isotipo OX40-mg1 presentó una inhibición del crecimiento tumoral significativa siendo 6 de 10 ratones tratados con OX40-mg1 ST (figura 28C). Sin embargo, como se observa con anticuerpos anti-CTLA y anti-GITR, el isotipo OX40-m2a presentó la actividad antitumoral más potente siendo 8 de 10 ratones tratados con OX40-mg2a ST (figura 28D). Estos datos demostraron que el isotipo anti-mOX40 (OX40-mg2a) que se une preferentemente a receptores de Fc de activación presenta una eficacia antitumoral superior con respecto a variantes de isotipo (OX40-rg1 y OX40-mg1) que se unen preferentemente al receptor de Fc murino, FcRIIb, en el modelo de tumor CT26. Se observaron datos similares en ratones C57BL/6 inoculados por vía subcutánea con 2×10^6 células de carcinoma de colon MC38 (datos no mostrados).

El experimento se repitió usando un modelo estadificado (terapéutico) mediante la implantación de 1×10^6 células tumorales CT26 en BALB/c. Después de 7 días, se determinaron los volúmenes tumorales y los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento de manera que tuvieran volúmenes tumorales medios comparables (45-50 mm³/2). Se Administraron anticuerpos (OX40-mG1, OX40-mG1D265A, OX40-mG1 y un control de isotipo IgG1 de ratón) por vía intraperitoneal los días 7, 10 y 14 a 200 µg por dosis y los volúmenes tumorales se midieron por veces por semana,

Los resultados, mostrados en la figura 29, son coherentes con los mostrados en la figura 28 con la excepción de que se observaron niveles algo menores de inhibición tumoral cuando los tumores se habían dejado crecer durante un periodo de tiempo mayor antes de la administración de los anticuerpos. Por lo tanto, como se ha visto previamente, el isotipo OX40-mg1 presentó un nivel moderado de inhibición del crecimiento tumoral (figura 29C) en comparación con una IgG de control (figura 29A) siendo 2 de 8 ratones ST después de hasta 42 días, y el isotipo OX40-m2a mostró una actividad antitumoral más fuerte siendo 4 de 8 ratones ST (figura 28D). Estos datos reafirman el descubrimiento de que las variantes de isotipo anti-OX40 que se unen preferentemente a receptores Fc de ratón de activación inhiben de manera más potente el crecimiento tumoral que los isotipos que se unen preferentemente al receptor de Fc inhibidor murino. Los datos demuestran además que el agonismo mediado por anticuerpo de OX40 de ratón depende del entrecruzamiento mediado por FcR ya que el anticuerpo anti-mOX40 reformateado como una variante que no puede unirse a receptores de Fc (OX40-g 1D265A) no presentaba actividad antitumoral (figura 29B) en comparación con el control de isotipo IgG (figura 29A).

EJEMPLO DE REFERENCIA 15

Actividad antitumoral dependiente de isotipo de proteínas de fusión Fc dirigidas a ICOS en el modelo tumoral Sa1N

El anticuerpo anti-ICOS de ratón 17G9 es un anticuerpo monoclonal agonista IgG2b de rata que bloquea la unión entre ICOS y B7h y se sabe que potencia respuestas de linfocitos T, incluyendo la proliferación de linfocitos T y la producción de citocinas (McAdam *et al.*, 2000). El ligando de ICOS (ICOSL) se une específicamente a ICOS y actúa como una señal coestimuladora para la proliferación de linfocitos T y la secreción de citocinas. Se generaron proteínas de fusión de ICOSL que contenían el dominio extracelular de ICOSL murino fusionado a Fc IgG1 murina (ICOSL-mulG1) o a Fc IgG1 humana (ICOSL-hlgG1). ICOSL-hlgG1 y el anticuerpo 17G9 preferentemente interaccionan con FcR de activación de ratón mientras que ICOSL-mlgG1 preferentemente interacciona con el FcR inhibidor de ratón.

La potencia antitumoral de diferentes isotipos de proteínas de fusión Fc que se unen específicamente a ICOS se investigó en un modelo de sarcoma Sa1N. Se inyectaron ratones A/J por vía subcutánea con 2×10^6 células tumorales Sa1N. El día 7 después de la implantación, los ratones portadores de tumores se distribuyeron aleatoriamente y se dosificaron con 10 mg/kg de proteína de fusión Fc por inyección IP tres veces, una vez cada tres días (Q3D x 3).

Los resultados se muestran en la figura 30. ICOSL-mlgG1 no presentó una actividad antitumoral significativa (figura

30B) en comparación con IgG1 de ratón de control (figura 30A). Por el contrario, tanto ICOSL-hlgG1 (que se había demostrado previamente que presentaba eficacia antitumoral; véase Ara *et al.*, 2003) como 17G9 presentaron una fuerte actividad antitumoral, teniendo cada uno 6 de 10 ratones ST (figuras 30C y D). Por lo tanto, la actividad antitumoral pronunciada en este modelo de tumor SaN1 se correlaciona con la capacidad de la parte Fc de la proteína de fusión Fc de unirse a FcR de activación de ratón.

EJEMPLO DE REFERENCIA 16

Efectos de anticuerpo anti-ICOS agonista sobre poblaciones de T_{reg} en el modelo de tumor MC38

Se implantaron células de tumor de colon MC38 (2×10^6 células por implante) por vía subcutánea en ratones C57BL/6. El día 7 después de la implantación, los ratones portadores de tumores se distribuyeron aleatoriamente y se dosificaron con 10 mg/kg del anticuerpo IgG2b de rata, 17G9 o anticuerpo de control IgG1 de ratón, por inyección IP Q3D x 3. El día 15 después de la implantación, se recogieron los tumores, se disociaron en suspensiones de una sola célula y se tiñeron para citometría de flujo (véase el ejemplo 3).

Como se muestra en las figuras 31A y B, el tratamiento con 17G9 ocasiona reducciones de linfocitos reguladores Foxp3⁺ en el sitio del tumor de tumores MC38, expresadas como un porcentaje de linfocitos CD4⁺ o como un porcentaje de linfocitos totales CD45⁺.

EJEMPLO DE REFERENCIA 17

Actividad antitumoral de isotipos de variantes de anti-PD-1 en modelo tumoral MC38

Experimento n.º 1

La actividad antitumoral de diferentes isotipos de anticuerpo anti-PD-1 de ratón 4H2 se evaluó en un tumor de colon MC38 estadificado como se ha descrito previamente (ejemplo 4). 4H2 es un anticuerpo quimérico anti-mPD-1 de rata-ratón construido a partir de un anticuerpo IgG2a de rata anti-PD-1 de ratón en el que la parte Fc se reemplazó con una parte Fc de un isotipo IgG1 de ratón (documento WO 2006/121168). Bloquea la unión de mPD-L1 y la unión de mPD-L2 a mPD-1, estimula la respuesta de linfocitos T y presenta actividad anti-tumoral.

Se inyectaron ratones C57BL/6 por vía subcutánea con 2×10^6 células tumorales MC38 cada uno. Después de 7 días, los ratones se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos de tratamiento y se administraron anticuerpos de ensayo IP a 200 µg por dosis en un volumen de 200 µl como se indica a continuación: Grupo 1: control de IgG1 de ratón (IgG); Grupo 2: IgG1 anti-PD-1; Grupo 3: IgG1D265A anti-PD-1; Grupo 4: IgG2a anti-PD-1.

Como se muestra en la figura 32, los 3 isotipos de anti-PD-1 mostraron bajos niveles de actividad antitumoral, produciendo el tratamiento con IgG1 2 ratones ST de 11 (figura 32B), y produciendo también el tratamiento con IgG1D265A 2 ratones ST de 11 aunque este isotipo parecía tener una actividad antitumoral algo mayor en general (figura 32C). El tratamiento con el isotipo IgG2a no produjo ningún ratón ST de los 11 (figura 32D) pero en general mostró una actividad antitumoral ligeramente mayor que el control de IgG1 de ratón (figura 32A). Por lo tanto, mientras que el isotipo anti-PD-1 IgG2a presentó algo de actividad antitumoral, esta era menor que la presentada por los isotipos anti-PD-1 IgG1 o IgG1D265A. De manera clara, a diferencia de los resultados obtenidos con los anticuerpos anti-CTLA-4, GITR, OX40 e ICOS IgG2a, el isotipo anti-PD-1 IgG2a no potenciaba la actividad antitumoral con respecto a los isotipos G1 y G1D265A.

Los cambios en las medias de los volúmenes tumorales y en las medianas de los volúmenes tumorales de los ratones de los grupos tratados con los diferentes isotipos de anti-PD-1 se muestran en las figuras 33A y B. Estos gráficos confirman los datos de ratones individuales mostrados en la figura 32 que revelan claramente que el isotipo IgG1D265A presenta el efecto inhibitor más potente sobre el crecimiento de tumores MC38.

Efectos de isotipos de anti-PD-1 sobre subseries de linfocitos T de MC38 en TIL

Se compararon los porcentajes de subseries que se infiltraban en el tumor MC38 en ratones tratados con los diferentes isotipos de anti-PD-1. La figura 34A muestra que mientras que los isotipos 4H2-G1 y G1D265A inducían un pequeño aumento de aproximadamente un 20 % y un 50 %, respectivamente, en el porcentaje de linfocitos CD8⁺ en comparación con el control de IgG1 de ratón, el isotipo IgG2a causaba una reducción de aproximadamente un 50 % en el porcentaje de linfocitos CD8⁺. Estos 3 isotipos 4H2 no causaban prácticamente ningún cambio en el porcentaje de linfocitos CD4⁺ en comparación con el control de isotipo IgG1 de ratón de la figura 34B, e inducían pequeños aumentos en el porcentaje de T_{reg} CD4⁺FoxP3⁺, causando el isotipo IgG2a el aumento más significativo (figura 34C). Estos resultados divergen de los obtenidos con los isotipos correspondientes de anticuerpos anti-CTLA-4, GITR, OX40 e ICOS.

La medición por citometría de flujo del nivel de expresión de PD-1 en diferentes subseries de linfocitos T en TIL de MC38 mostró que tenía la máxima expresión en T_{ef} CD8⁺, con niveles de expresión progresivamente menores en

T_{reg} y T_{ef} $CD4^+$ (véase el ejemplo 18).

Experimento n.º 2

- 5 Se repitieron los ensayos anteriores de actividad antitumoral de los diferentes isotipos de anti-PD-1 en el modelo tumoral MC38 se repitieron con la excepción del experimento de supervisión inmunológica. Las tendencias en los resultados, mostrados en las figuras 34 y 35, son similares a las del experimento n.º 1 pero están acentuadas y muestran más claramente las diferencias entre los diferentes isotipos en la inhibición del crecimiento tumoral. Los tratamientos con anti-PD-1 IgG1 (figura 34B) e IgG1D265A (figura 34C) produjeron 5 y 6 ratones ST, respectivamente, de 10, mientras que el tratamiento con el isotipo IgG2a produjo 2 ratones ST de 10 (figura 34D), en comparación con el control de IgG1 de ratón que no produjo ningún ratón ST de 10 (figura 32A). Las diferencias en los resultados entre los experimentos n.º 1 y n.º 2 se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Actividad antitumoral de isotipos de anti-PD-1 en los experimentos n.º 1 y n.º 2

Tratamiento	experimento n.º 1	experimento n.º 2
	N.º de Ratones Sin Tumor	N.º de Ratones Sin Tumor
mIgG	0/11	0/10
IgG1 Anti-PD-1	2/11	5/10
IgG1Anti-PD-1	2/11	6/10
IgG2a Anti-PD-1	0/11	2/10

Los cambios en las medias de volúmenes tumorales medios y medianas de volúmenes tumorales medios, mostrados en las figuras 35A y B, también confirman claramente que el isotipo IgG1D265A presenta el efecto inhibitor más potente sobre el crecimiento tumoral de MC38, seguido del isotipo IgG1, presentando el isotipo IgG2a una actividad antitumoral mucho menor.

Ejemplo 18

Análisis de expresión de receptores en linfocitos T en el tumor y bazo de 15 ratones portadores de tumores

- 25 Tanto los T_{reg} como los linfocitos T convencionales (T_{conv}) en el microentorno tumoral expresan una amplia serie de receptores coestimuladores y coinhibidores. Sin embargo, la implicación de los receptores en T_{reg} puede tener efectos espectacularmente diferentes sobre la función celular en comparación con la implicación de la misma diana en T_{conv} . Por ejemplo, los anticuerpos agonistas contra OX40 20 potencian la activación de T_{conv} mientras que inhiben la función de T_{reg} . Además, el nivel de expresión de cada receptor puede variar sustancialmente entre diferentes subseries de linfocitos T y en el mismo tipo de linfocito T en el microentorno tumoral o en la periferia.

Tabla 7. Reactivos usados para el análisis de citometría de flujo de la expresión de receptores de linfocitos T

Marcador	Fluorocromo	Clon	Concentración de Tinción (µg/ml)
CD4	700	GK1.5	0,001
Thy1.2	BV510	53-2,1	0,001
Foxp3	GFP	n/a	
Vivo/Muerto	APC/780	n/a	
CD27	PerCP/710	LG.7F9	0,002
CD137	PE	17B5	0,002
GITR	PE/Cy7	DTA-1	0,002
OX-40	BV421	OX-86	0,002
ICOS	APC	C398.4A	0,002

Se determinaron los niveles de expresión relativa de diversos receptores coestimuladores y coinhibidores en T_{reg} y T_{conv} en sitios de tumor y en el bazo. Para medir los niveles de expresión de CD27, CD137, GITR, OX40 e ICOS, 9 ratones hembra Foxp3-GFP criados internamente (fondo C57BL/6, JAX n.º: 006772) se inyectaron por vía subcutánea con 1×10^6 células MC38 en 100 μ l de PBS en el costado derecho. Los ratones se sacrificaron 14 días después de la implantación del tumor MC38. Se recogieron los bazo y los tumores y se prensaron a través de coladores de 100- μ m para generar suspensiones de una sola célula. Se lisaron glóbulos rojos en muestras de bazo usando tampón de lisis ACK (KHCO₃ 10 mM, EDTA 1 mM, NH₄Cl 150 mM, pH 7,3). Se contaron las células y se tiñeron 2×10^6 células vivas de cada muestra en tampón de tinción FACS (PBS + 2 % FBS, 2 mM EDTA) durante 30 min a 4 °C usando los anticuerpos indicados en la tabla 7. Las células se lavaron dos veces con tampón de tinción FACS y se analizaron inmediatamente por citometría de flujo.

En un experimento paralelo, se midieron los niveles de expresión de CD27, GITR, OX40, ICOS, CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3 y TIGIT después de la implantación subcutánea de 2×10^6 células de sarcoma Sa1N en ratones A/J. El día 7 después de la implantación, los ratones portadores de tumores se distribuyeron aleatoriamente y se dosificaron con 10 mg/kg de anticuerpo por inyección IP, Q3D x 3. El día 15 después de la implantación, se recogieron los tumores, se disociaron en suspensiones de una sola célula y se tiñeron para citometría de flujo. Los datos de este experimento de Sa1N confirman y complementan los datos obtenidos a partir del análisis del tumor MC38.

Los niveles relativos de expresión determinada a partir de estos dos experimentos se resumen en la tabla 8. Para los receptores coestimuladores ICOS, OX40 y CD137, la expresión en T_{reg} fue mayor que en T_{conv} y la expresión en T_{reg} en el tumor fue mayor que en T_{reg} en el bazo, pero la expresión de GITR y CD27 fue aproximadamente tan alta como en T_{ef} CD8 y en T_{reg} tanto en tumor como en el bazo. Además, la expresión del receptor fue generalmente mayor en linfocitos T_{reg} en el tumor en comparación con los del bazo. Para los receptores coinhibidores, la expresión en diferentes subseries de linfocitos T en el tumor fue generalmente mayor que en los mismos tipos de células en el bazo. Con la excepción de CTLA-4, la expresión de los receptores coinhibidores fue mayor en T_{ef} CD8 que en linfocitos T_{reg} o CD4. La expresión de TIGIT fue muy baja o indetectable en todas las subseries de linfocitos T.

Tabla 8. Niveles de expresión relativa de receptores en linfocitos T en tumor frente a bazo

Tabla 6. Niveles de expresión relativa de receptores en linfocitos T en tumor frente a bazo						
Receptor	Receptores Coestimuladores					
	Tumor			Periferia (Bazo)		
	T _{reg}	CD8 ⁺	CD4 ⁺	T _{reg}	CD8 ⁺	CD4 ⁺
ICOS	+++	+	+	+	-	+/-
GITR	++++	+++	+	+++	++	++
OX40	++	-	+	+	-	-
CD27	+++	+++	+	+++	+++	+++
CD137	+++	+	-	+	-	-
	Receptores Coestimuladores					
CTLA-4	+++	+	+	+	-	-
PD-1	+	++	+/-	-	+/-	-
LAG-3	+	++	+	-	-	-
TIM-3	+	+++	-	-	-	-

TIGIT	+/-	-	-	-	-	-
-------	-----	---	---	---	---	---

REFERENCIAS

- 5 Albanesi M *et al.* (2012) Cutting Edge: FcγRIII (CD16) and FcγRI (CD64) are responsible for anti-glycoprotein 75 monoclonal antibody TA99 therapy for experimental metastatic B16 melanoma. *J Immunol* 189(12): 5513-7.
- Al-Shamkhani A *et al.* (1996) OX40 is differentially expressed on activated rat and mouse T cells and is the sole receptor for the OX40 ligand. *Eur J Immunol* 26: 1695-9.
- 10 Ara G *et al.* (2003) Potent activity of soluble B7RP-1-Fc in therapy of murine tumors in syngeneic hosts. *Int J Cancer* 103(4): 501-7.
- Ascierto PA *et al.* (2011) Anti-CTLA4 monoclonal antibodies: the past and the future in clinical application. *J Transl Med* 9: 196.
- 15 Attia P *et al.* (2005) Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *J Clin Oncol* 23(25): 6043-53.
- 20 Baitsch L *et al.* (2012) Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization. *PLoS One* 7(2): e30852.
- Berman DM *et al.* (2009) Association of peripheral blood absolute lymphocyte count (ALC) and clinical activity in patients (pts) with advanced melanoma treated with ipilimumab [abstr] *J Clin Oncol* 27(suppl): 15s.3020.
- 25 Berger R *et al.* (2008) Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 14: 3044-51.
- Bevaart L *et al.* (2006) The high-affinity IgG receptor, FcγRI, plays a central role in antibody therapy of experimental melanoma. *Cancer Res* 66: 1261-4.
- 30 Birebent B *et al.* (2004) Suppressive properties of human CD4+ CD25+ regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression. *Eur J Immunol* 34: 3485-96.
- Bour-Jordan H *et al.* (2011) Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family. *Immunol Rev* 241(1): 180-205.
- 35 Bradbury ARM *et al.* (2011) Beyond natural antibodies: the power of *in vitro* display technologies. *Nat Biotechnol* 29(3): 245-54.
- 40 Brahmer J *et al.* (2012) Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366(26): 2455-65.
- Bruhns P *et al.* (2009) Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 113: 3716-25.
- 45 Bulliard Y *et al.* (2013) Activating Fcγ receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies. *J Exp Med* 210(9): 1685-93.
- Cartron G *et al.* (2004) From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* 104(9): 2635-42.
- 50 Clynes RA *et al.* (2000) Inhibitory Fc receptors modulate *in vivo* cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000;6:443-46.
- 55 Cohen AD *et al.* (2010) Agonist anti-GITR monoclonal antibody induces melanoma tumor immunity in mice by altering regulatory T cell stability and intra-tumor accumulation. *PLoS One* 5(5): e10436.
- Comin-Anduix B *et al.* (2008) Detailed analysis of immunologic effects of the cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4-blocking monoclonal antibody tremelimumab in peripheral blood of patients with melanoma. *J Transl Med* 6: 22.
- 60 Corse E y Allison JP (2012) Cutting edge: CTLA-4 on effector T cells inhibits in trans. *J Immunol* 189: 1123-27.

Coyle AJ y Gutierrez-Ramos JC (2001) The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol* 2(3): 203-9.

5 Crowe JS *et al.* (1992) Humanized monoclonal antibody CAMPATH-1H: myeloma cell expression of genomic constructs, nucleotide sequence of cDNA constructs and comparison of effector mechanisms of myeloma and Chinese hamster ovary cell-derived material. *Clin Exp Immunol* 87: 105-10.

10 Dall'Ozzo S *et al.* (2004) Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res* 64: 4664-9.

15 Driessens *et al.* (2009) Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunol Rev* 229(1): 126-44.

20 Emmerich I *et al.* (2012) IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8(+) T cells without de novo infiltration from secondary lymphoid organs. *Cancer Res* 72: 3570-81.

25 Publicación europea n.º EP1176195, titulada "Method for controlling the activity of immunologically functional molecule" ("método para controlar la actividad de moléculas inmunológicamente funcionales"), publicada el 30 de enero de 2002 por Hanai N *et al.*

30 Flies DB *et al.* (2011) Blockade of the B7-H1/PD-1 Pathway for Cancer Immunotherapy. *Yale J Biol Med* 84: 409-21.

35 Gennari R *et al.* (2004) Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin Cancer Res* 10: 5650-5.

40 Hamid O *et al.* (2009) Association of baseline and on-study tumor biopsy markers with clinical activity in patients (pts) with advanced melanoma treated with ipilimumab [abstr] *J Clin Oncol* 27(suppl): 15s.9008.

45 Hamid O *et al.* (2011) A prospective phase II trial exploring the association between tumor microenvironment biomarkers and clinical activity of ipilimumab in advanced melanoma. *J Transl Med* 9: 204.

50 Harding FA *et al.* (1992) CD28-mediated signaling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T cell clones. *Nature* 356: 607-10.

55 Harris NL y Ronchese F (1999) The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunol Cell Biol* 77(4): 304-11.

60 He YF *et al.* (2004) Blocking programmed death-1 ligand-PD-1 interactions by local gene therapy results in enhancement of antitumor effect of secondary lymphoid tissue chemokine. *J Immunol* 173: 4919-28.

65 Hodi FS *et al.* (2008) Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 3005-10.

70 Hodi FS *et al.* (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363:711-23.

75 Hollinger y Hudson (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotech* 23(9): 1126-36.

80 Hoos A *et al.* (2010) Development of ipilimumab: contribution to a new paradigm for cancer immunotherapy. *Semin Oncol* 37: 533-46.

85 Huang RR *et al.* (2011) CTLA4 blockade induces frequent tumor infiltration by activated lymphocytes regardless of clinical responses in humans. *Clin Cancer Res* 17(12): 4101-9.

90 Hurwitz AA *et al.* (1996) Specific blockade of CTLA-4/B7 interactions results in exacerbated clinical and histologic disease in an actively-induced model of experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 73: 57-62.

95 Idusogie EE *et al.* (2000) Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J Immunol* 164: 4178-84.

100 Ji RR *et al.* (2102) An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother* 61: 1019-31.

105 Keler T *et al.* (2003) Activity and safety of CTLA-4 blockade combined with vaccines in cynomolgus macaques. *J Immunol* 171: 6251-59.

- Krummel MF y Allison JP (1995) CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 182: 459-65.
- 5 Ku GY *et al.* (2010) Single-institution experience with ipilimumab in advanced melanoma patients in the compassionate use setting: lymphocyte count after 2 doses correlates with survival. *Cancer* 116: 1767-75.
- Lazar GA *et al.* (2006) Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4005-10.
- 10 Leach DR *et al.* (1996) Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271(5256): 1734-6.
- Lenschow DJ *et al.* (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14: 233-58.
- 15 Liakou CI *et al.* (2008) CTLA-4 blockade increases IFN γ -producing CD4⁺ICOS⁺ cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 14987-92.
- Lonberg N *et al.* (1994) Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. *Nature* 368 (6474): 856-9.
- 20 Louis E *et al.* (2004) Association between polymorphism in IgG Fc receptor IIIa coding gene and biological response to infliximab in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 19: 511-9.
- 25 Maker AV *et al.* (2005) Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade. *J Immunol* 175(11): 7746-54.
- McAdam AJ *et al.* (2000) Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4⁺ T cells. *J Immunol* 165: 5035-40.
- 30 Mellman I *et al.* (2011) Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480: 480-9.
- Miescher S *et al.* (2004) A single recombinant anti-RhD IgG prevents RhD immunization: association of RhD-positive red blood cell clearance rate with polymorphisms in the Fc γ RIIA and Fc γ RIIIA genes. *Blood* 103: 4028-35.
- 35 Mitsui J *et al.* (2010) Two distinct mechanisms of augmented antitumor activity by modulation of immunostimulatory/inhibitory signals. *Clin Cancer Res* 16: 2781-91.
- Mossner E *et al.* (2010) Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* 115: 4393-402.
- 40 Musolino A *et al.* (2008) Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 26(11): 1789-96.
- 45 Mumm JB *et al.* (2011) IL-10 elicits IFN γ -dependent tumor immune surveillance. *Cancer Cell* 20: 781-96.
- Natsume A *et al.* (2009) Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC. *Drug Des Devel Ther* 3: 7-16.
- 50 Nimmerjahn F y Ravetch JV (2005) Divergent immunoglobulin G subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 310: 1510-2.
- Nimmerjahn F y Ravetch JV (2008) Fc γ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8(1): 34-47.
- 55 Nimmerjahn F y Ravetch JV (2010) Antibody-mediated modulation of immune responses. *Immunol Rev* 236: 265-75.
- 60 Nocentini G y Riccardi C (2005) GITR: a multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Eur J Immunol* 35: 1016-22.
- Nordstrom JL *et al.* (2011) Anti-tumor activity and toxico-kinetics analysis of MGAH22, an anti-HER2 monoclonal antibody with enhanced Fc γ receptor binding properties. *Breast Cancer Res* 13: R123.
- 65 Olafsen y Wu (2010) Antibody vectors for imaging. *Semin Nucl Med* 40(3):167-81.

- O'Mahony y Janik (2006) Comment on "Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade." *J Immunol* 176(9): 5136.
- 5 Onishi Y *et al.* (2008) Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells *in vitro* and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 10113-18.
- Pardoll DM (2012a) Immunology beats cancer: a blueprint for successful translation. *Nat Immunol* 13(12): 1129-32.
- 10 Pardoll DM (2012b) The blockage of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12: 252-64.
- Publicación PCT n.º WO 99/54342, titulada "Glycosylation engineering of antibodies for improving antibody-dependent cellular cytotoxicity" ("obtención de glicosilación de anticuerpos por ingeniería genética para mejorar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos"), publicada el 28 de octubre de 1999 por Umaña P *et al.*
- 15 Publicación PCT n.º WO 02/43478, titulada "Transgenic transchromosomal rodents for making human antibodies" ("roedores transcromosómicos transgénicos para fabricar anticuerpos humanos"), publicada el 6 de junio de 2002 por Medarex, Inc. y Kirin Beer Kabushiki Kaisha.
- 20 Publicación PCT n.º WO 03/035835, titulada "Glycoprotein compositions" ("composiciones de glicoproteína"), publicada el 1 de mayo de 2003 por Genentech, Inc.
- Publicación PCT n.º WO 2006/089231, titulada "Monoclonal antibodies against prostate specific membrane antigen (PSMA) lacking in fucosyl residues" ("Anticuerpos monoclonales contra antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) que carece de restos de fucosilo"), publicada el 24 de agosto de 2006 por Medarex, Inc.
- 25 Publicación PCT n.º WO 2006/121168, titulada "Human monoclonal antibodies to Programmed Death 1 (PD-1) and methods for treating cancer using anti-PD-1 antibodies alone or in combination with other immunotherapeutics" ("Anticuerpos monoclonales humanos contra muerte programada-1 (PD-1) y métodos para tratar cánceres usando anticuerpos anti-PD-1 solos o en combinación con otros agentes inmunoterapéuticos"), publicada el 16 de noviembre de 2006 por ONO Pharmaceutical Co., Ltd. y Medarex, Inc.
- 30 Publicación PCT n.º WO 2009/101611, titulada "Monoclonal antibodies for tumor treatment" ("Anticuerpos monoclonales para el tratamiento de tumores"), publicada el 20 de agosto de 2009 por Curetech Ltd.
- 35 Peggs KS *et al.* (2006) Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer. *Curr Opin Immunol* 16: 206-13.
- 40 Peggs KS *et al.* (2008) Cell intrinsic mechanisms of T-cell inhibition and application to cancer therapy. *Immunol Rev* 224: 141-65.
- Peggs KS *et al.* (2009) Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J Exp Med* 206(8): 1717-25.
- 45 Perrin PJ *et al.* (1996) CTLA-4 blockade enhances clinical disease and cytokine production during experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 157: 1333-36.
- Quezada SA *et al.* (2006) CTLA4 blockade and GM-CSF combination immunotherapy alters the intratumor balance of effector and regulatory T cells. *J Clin Invest* 116(7): 1935-45.
- 50 Qureshi OS *et al.* (2011) Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332: 600-03.
- 55 Read S *et al.* (2000) Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192(2): 295-302.
- Ribas A *et al.* (2007) Tremelimumab (CP-675,206), a cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 blocking monoclonal antibody in clinical development for patients with cancer. *Oncologist* 12: 873-83.
- 60 Ribas A (2010) Clinical development of the anti-CTLA-4 antibody tremelimumab. *Semin Oncol* 37(5): 450-4.
- Rosenberg SA (2006) Response to comment on "Analysis of the cellular mechanism of antitumor responses and autoimmunity in patients treated with CTLA-4 blockade." *J Immunol* 176(9): 5136.
- 65 Rudd CE, Taylor A, Schneider H (2009) CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction.

Immunol Rev 229: 12-26.

Salomon B y Bluestone JA (2001) Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 19:225-52.

Schreier PH *et al.* (1981) Multiple differences between the nucleic acid sequences of the IgG2aa and IgG2ab alleles of the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 4495-99.

Schwartz RH (2003) T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21: 305-34.

Selby MJ *et al.* (2013) Anti-CTLA-4 antibodies of IgG2a isotype enhance antitumor activity through reduction of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunol Res* 1: 32-42.

Shields RL *et al.* (2001) High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγR. *J Biol Chem* 276: 6591-6604.

Shields RL *et al.* (2002) Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 277: 26733-40.

Shimizu J *et al.* (2002) Stimulation of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3: 135-42.

Simpson TR *et al.* (2013) Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med* 210: 1695-710.

Stavenhagen JB *et al.* (2007) Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells *in vitro* and controls tumor expansion *in vivo* via low-affinity activating Fcγ receptors. *Cancer Res* 67: 8882-90.

Takahashi T *et al.* (2000) Immunologic self-tolerance maintained by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192: 303-10.

Tamura K *et al.* (2011) FcγR2A and 3A polymorphisms predict clinical outcome of trastuzumab in both neoadjuvant and metastatic settings in patients with HER2-positive breast cancer. *Ann Oncol* 22(6): 1302-7.

Tarentino AL *et al.* (1975) The isolation and structure of the core oligosaccharide sequences of IgM. *Biochem* 14: 5516-23.

Tivol EA *et al.* (1995) Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3: 541-47.

Topalian SL *et al.* (2012) Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366(26): 2443-54.

Turk MJ *et al.* (2004) Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J Exp Med* 200:771-82.

Umaña P *et al.* (1999) Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat Biotech* 17:176-80.

Patente de Estados Unidos n.º 5.977.318, titulada "CTLA4 receptor and uses thereof" ("receptor de CTLA4 y usos del mismo"), expedida el 2 de noviembre de 1999 a Linsley PS *et al.*

Patente de Estados Unidos n.º 6.682.736, titulada "Human monoclonal antibodies to CTLA-4" ("Anticuerpos monoclonales humanos para CTLA-4") expedida el 27 de enero de 2004 a Hanson DC *et al.*

Patente de Estados Unidos n.º 6.984.720, titulada "Human CTLA-4 antibodies" ("Anticuerpos para CTLA-4 humanos"), expedida el 10 de enero de 2006 a Korman AJ *et al.*

Patente de Estados Unidos n.º 7.605.238, titulada "Human CTLA-4 antibodies and their uses" ("Anticuerpos para CTLA-4 humanos y sus usos"), expedida el 20 de octubre de 2009 a Korman AJ *et al.*

Publicación de Estados Unidos n.º 2004/0110704, titulada "Cells of which genome is modified" ("Células cuyo genoma está modificado"), publicada el 10 de junio de 2004 por Yamane N *et al.*

Publicación de Estados Unidos n.º 2012/0276086, titulada "Monoclonal antibodies against CD30 lacking in fucosyl and xylosyl residues" ("Anticuerpos monoclonales contra CD30 que carecen de restos fucosilo y xilosilo"),

publicado el 1 de noviembre de 2012, por Black AN *et al.*

van der Merwe PA *et al.* (1997) CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med* 185: 393-403.

Walunas TL *et al.* (1994) CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1(5): 405-13.

Wang CI *et al.* (2012) Cutting edge: cell-extrinsic immune regulation by CTLA-4 expressed on conventional T cells. *J Immunol* 189: 1118-22.

Waterhouse P *et al.* (1995) Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in *Ctla-4*. *Science* 270: 985-8.

Weber J (2010) Immune checkpoint proteins: a new therapeutic paradigm for cancer-preclinical background: CTLA-4 and PD-1 blockade. *Semin Oncol* 37(5): 430-9.

Weng WK y Levy R (2003) Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphism independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 21: 3940-7.

Wing K *et al.* (2008) CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322: 271-5.

Yamane-Ohnuki N *et al.* (2004) Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnol Bioeng* 87: 614-22.

Yuan J *et al.* (2011) Integrated NY-ESO-1 antibody and CD8+ T-cell responses correlate with clinical benefit in advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:16723-28.

Zalevsky J *et al.* (2010) Enhanced antibody half-life improves *in vivo* activity. *Nat Biotechnol* 28: 157-9.

REIVINDICACIONES

1. Ipilimumab afucosilado para uso en el tratamiento de cánceres.

5

FIG. 1

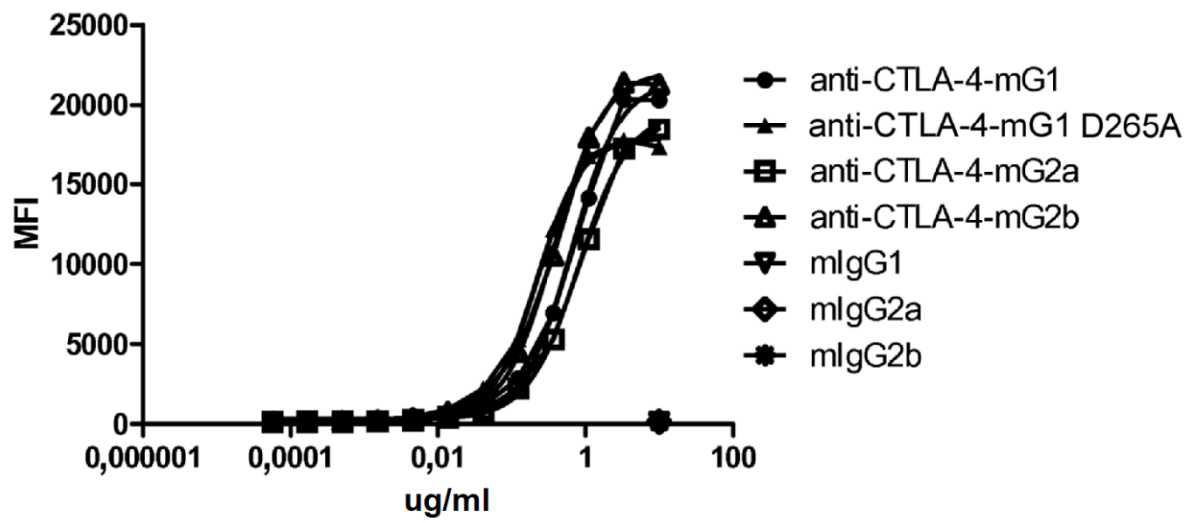
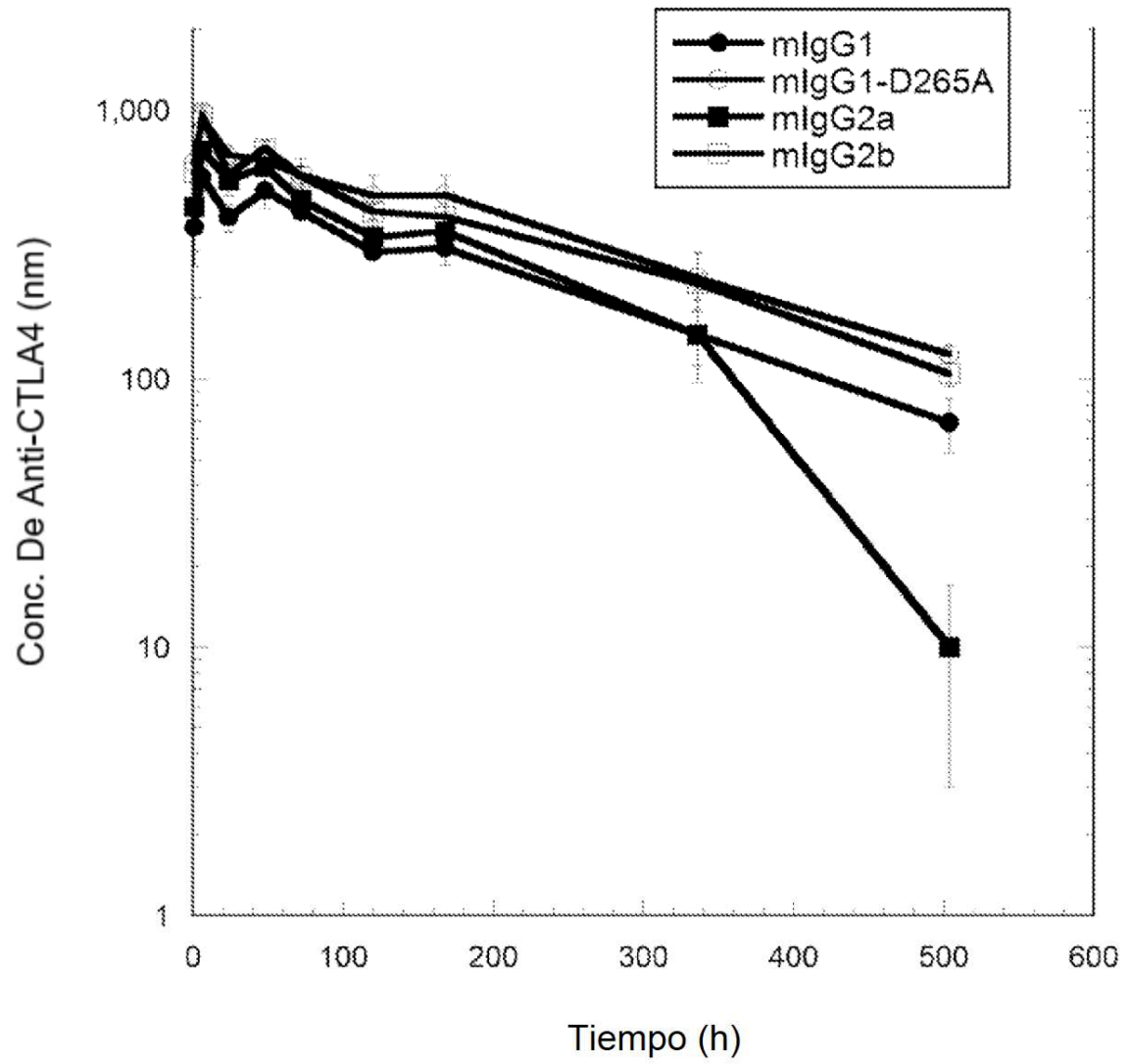
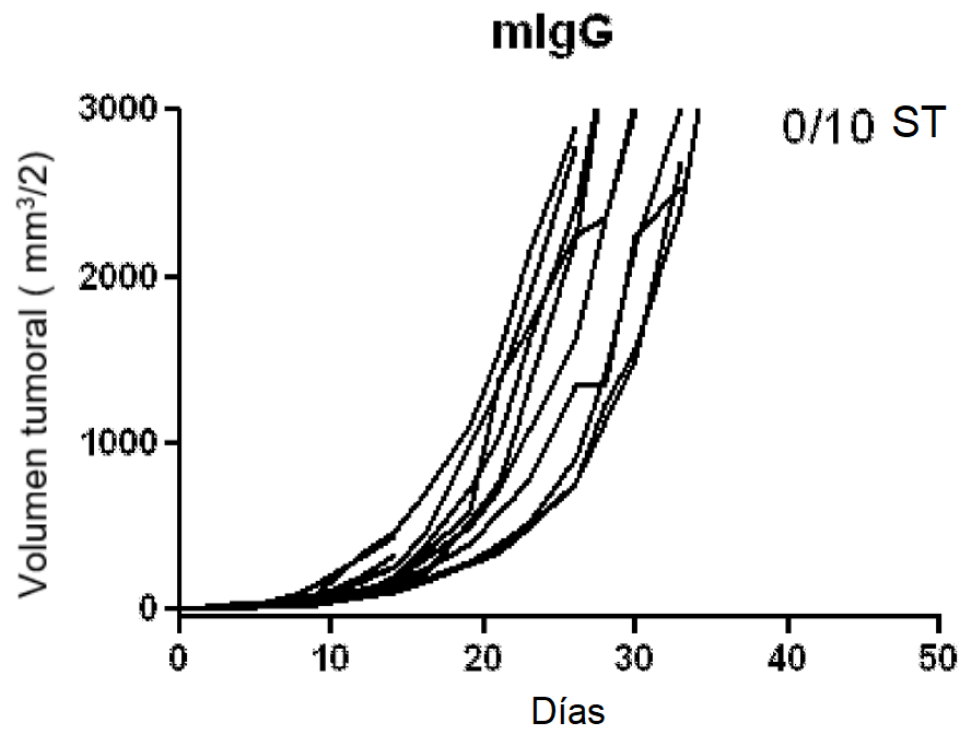


FIG. 2

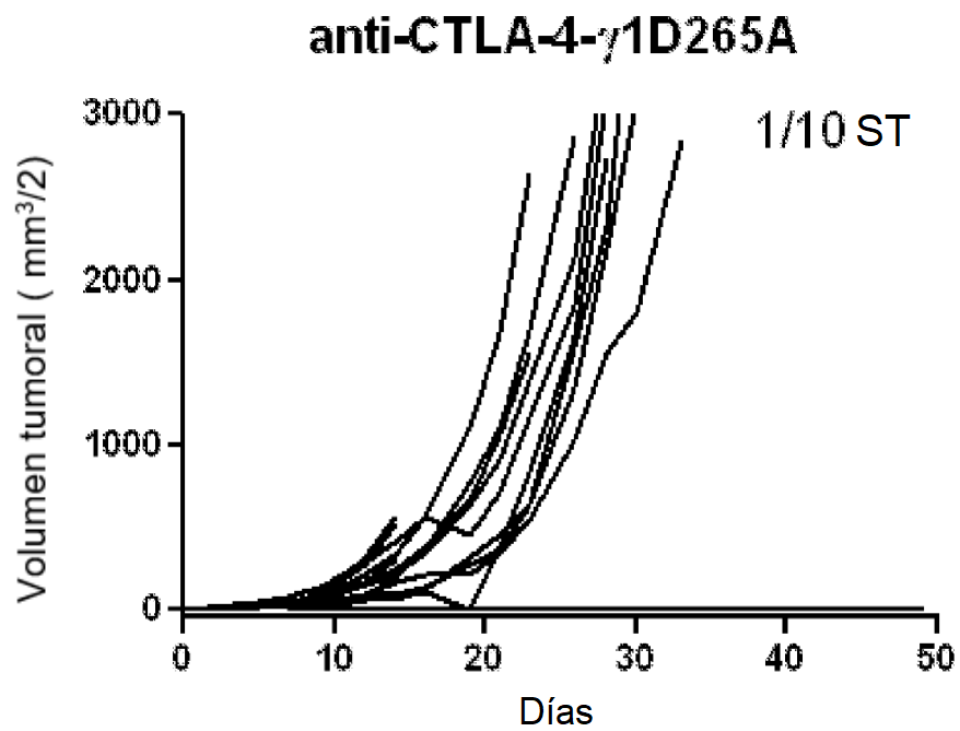


FIGS. 3A y B

A.

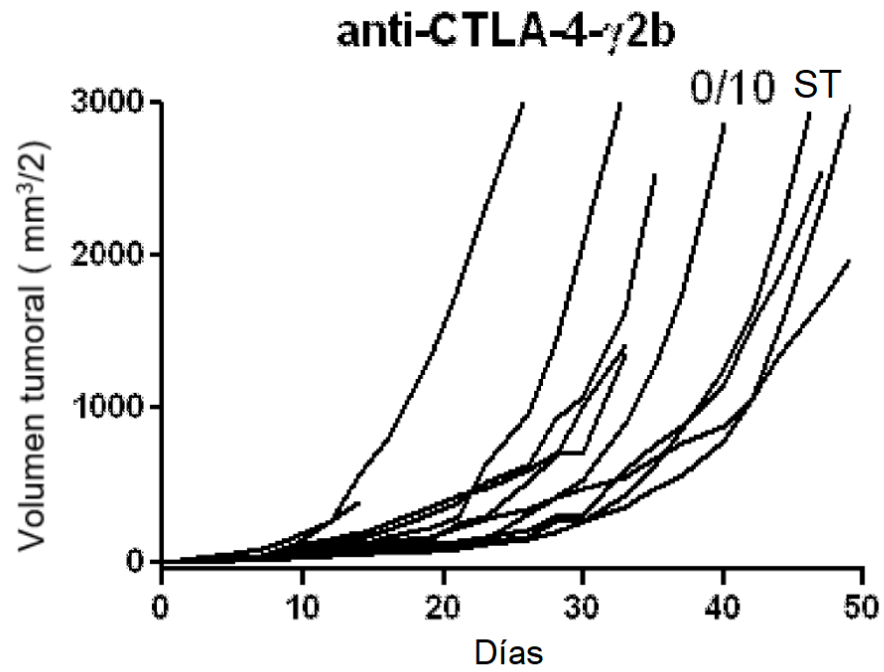


B.

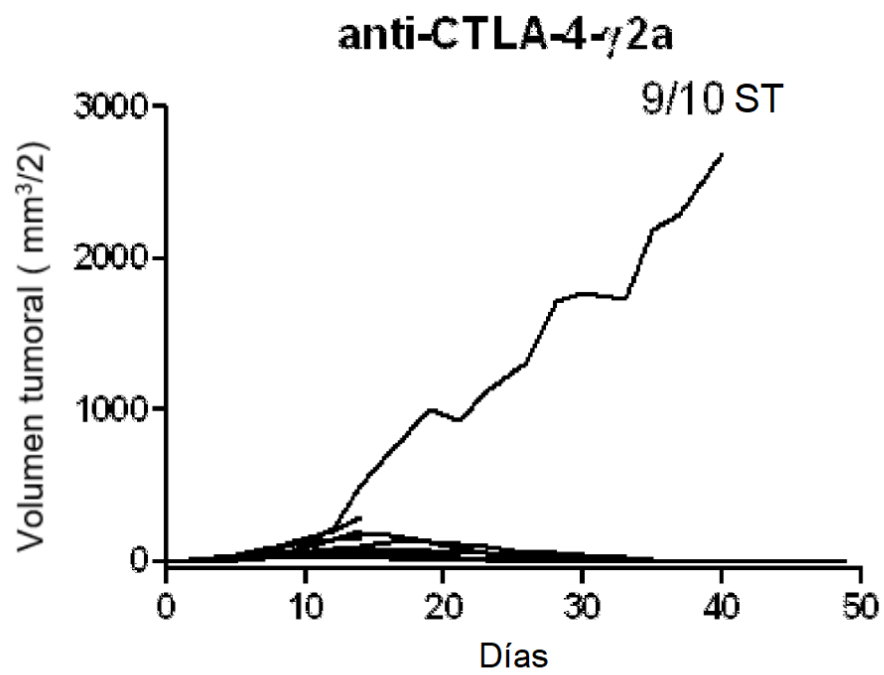


FIGS. 3C y D

C.

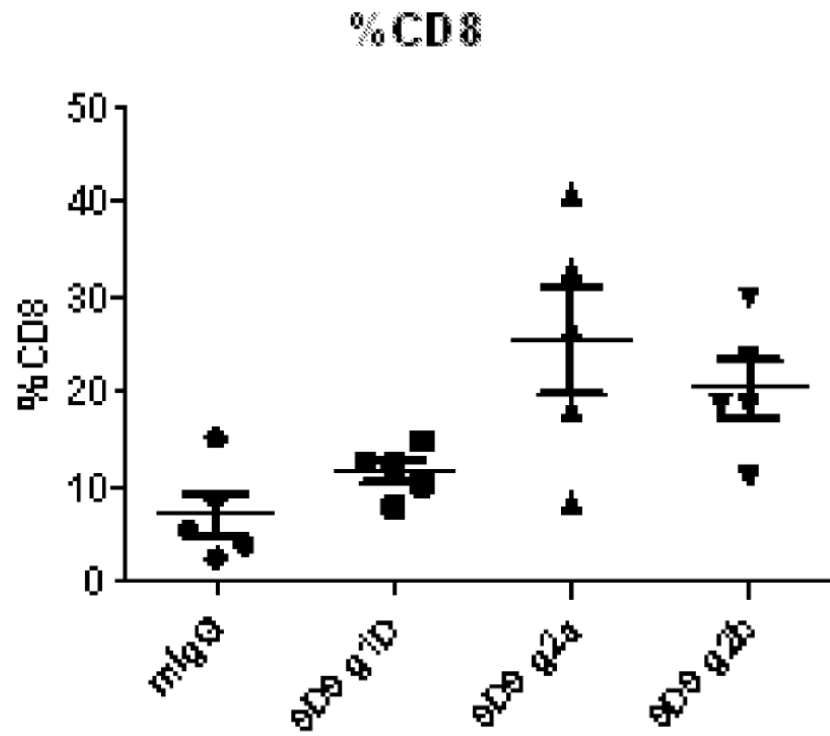


D.



FIGS. 4A y B

A.



B.

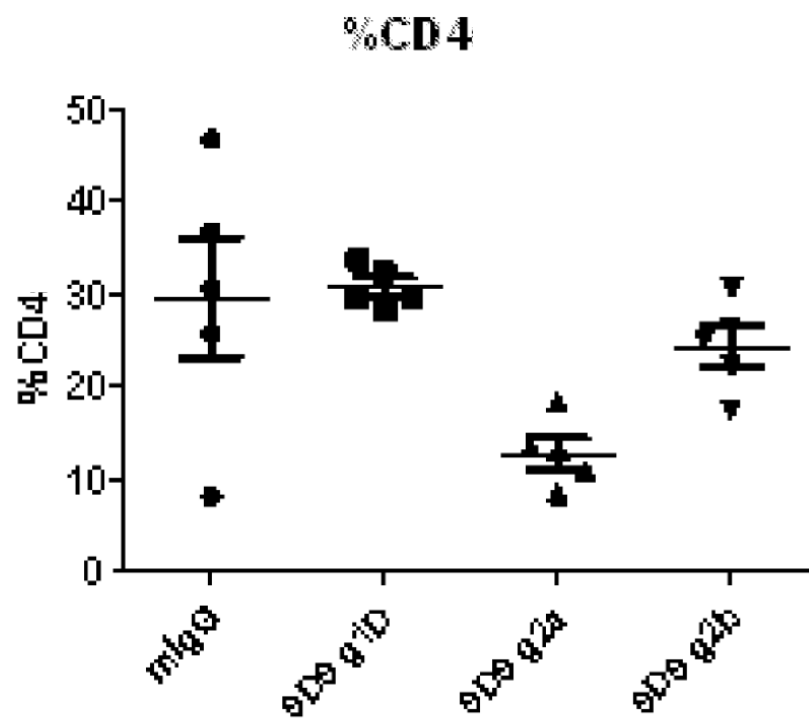
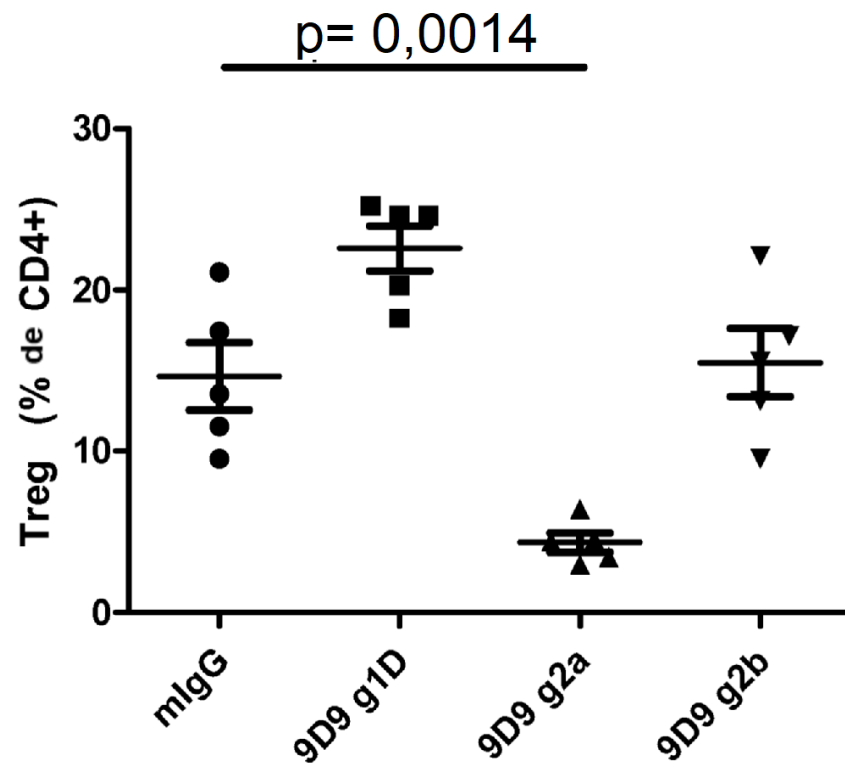


FIG. 4C

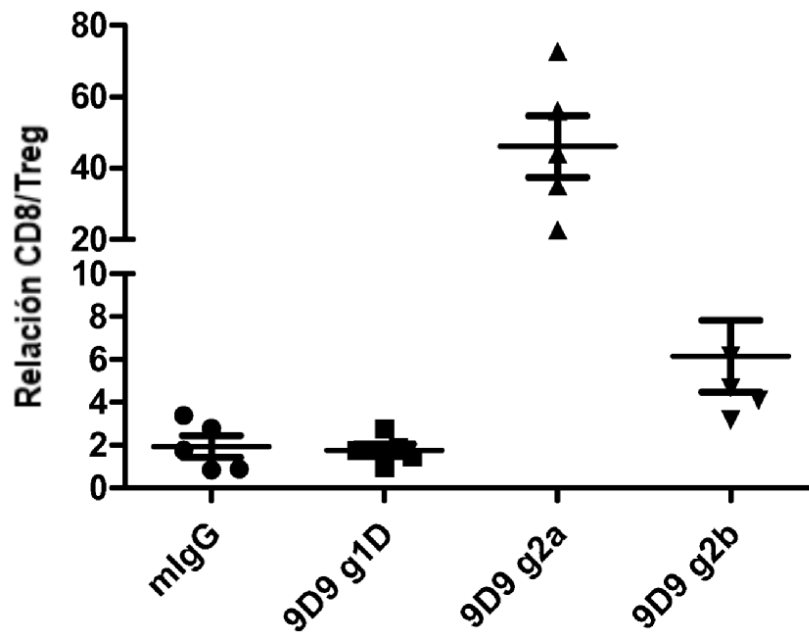
C.



FIGS. 5A y B

A.

Relación CD8/Treg



B.

Relación CD4/Treg

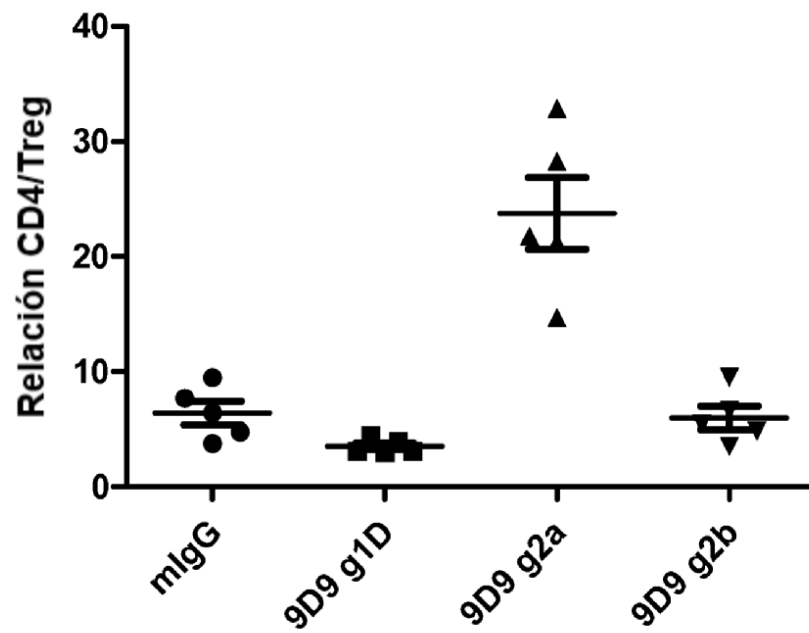
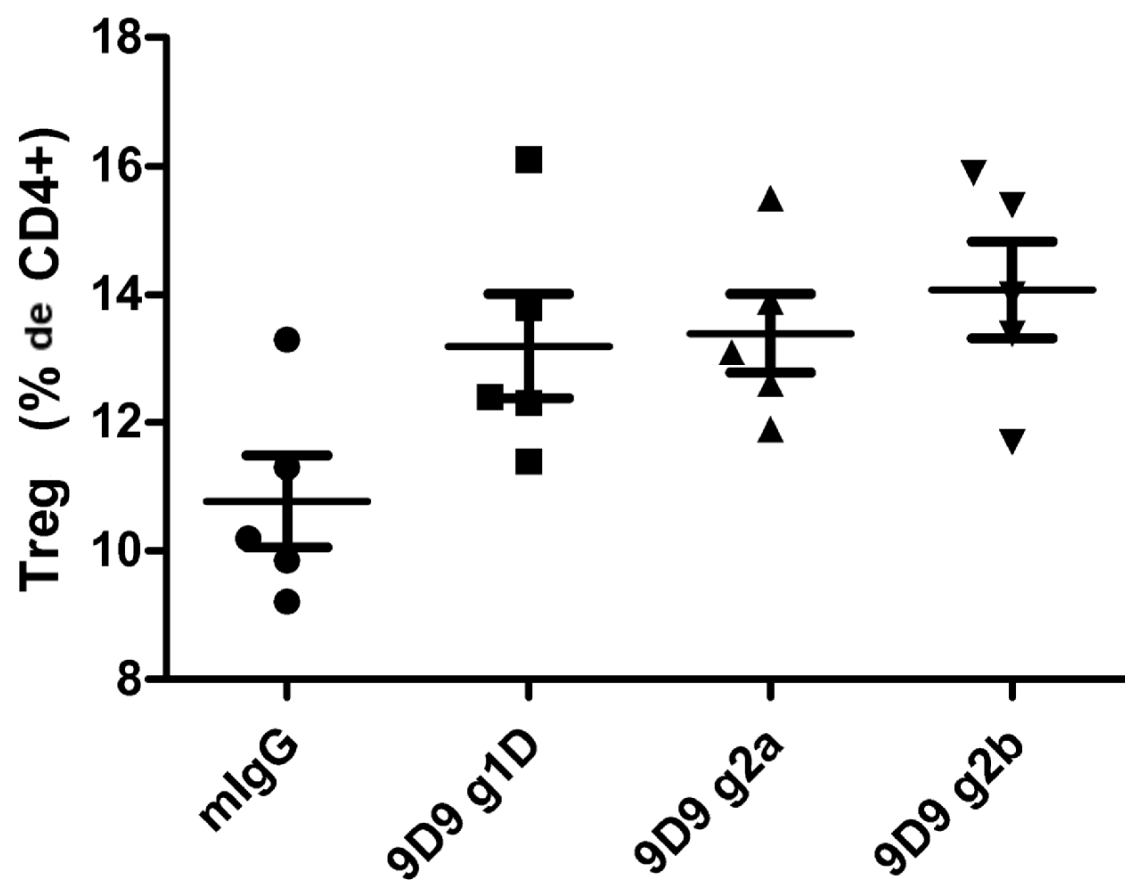


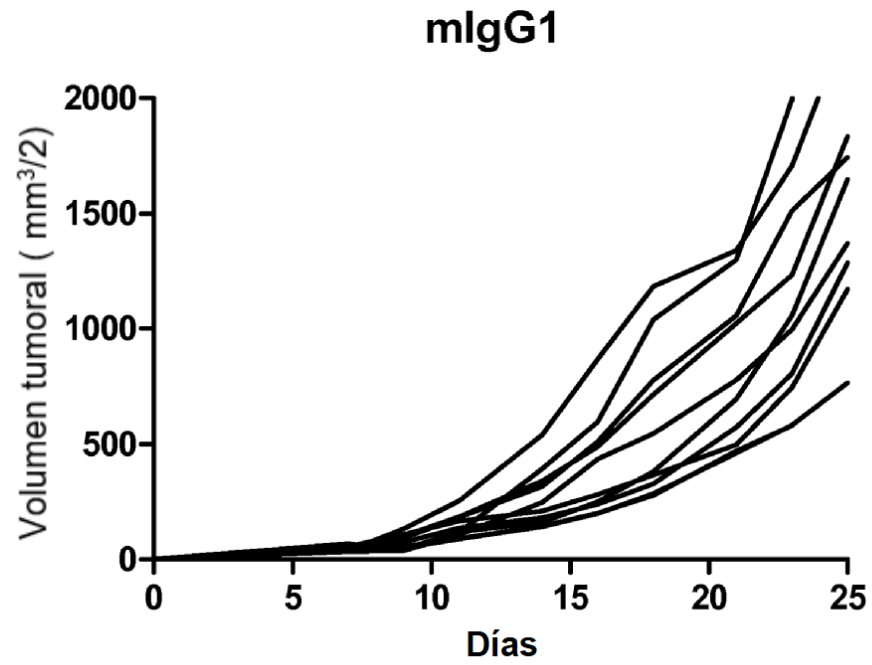
FIG. 6

% de CD4 en Treg de GL

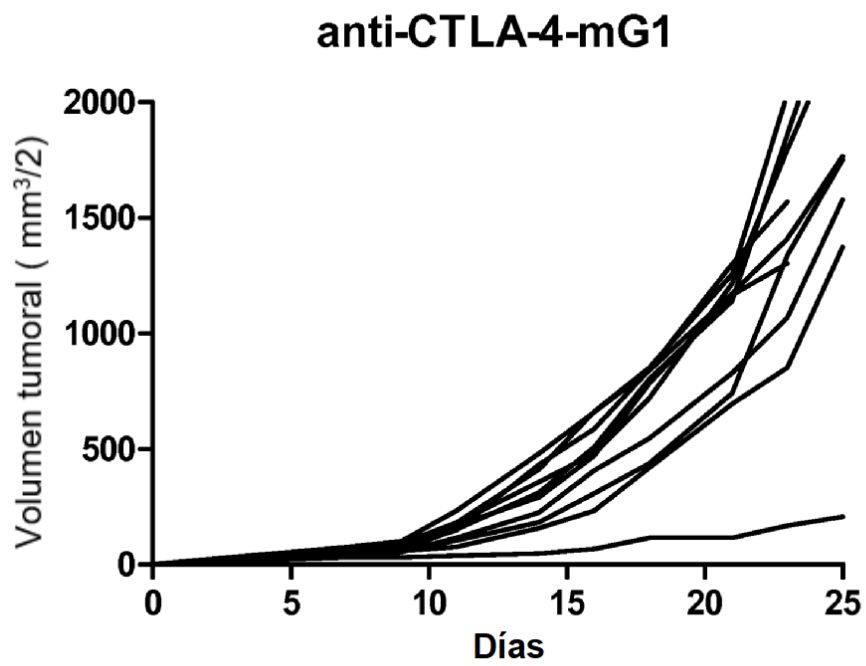


FIGS. 7A y B

A.



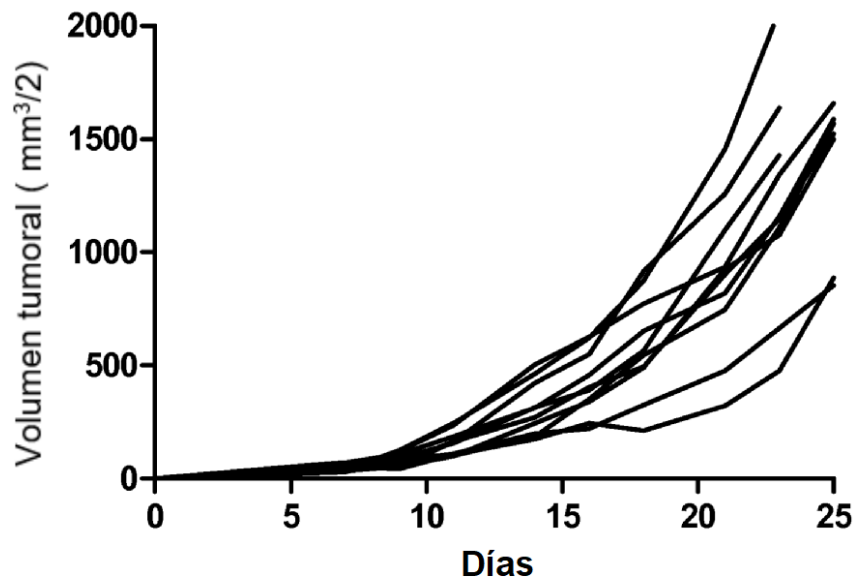
B.



FIGS. 7C y D

C.

D265A anti-CTLA-4-mG1



D.

anti-CTLA-4-mG2a

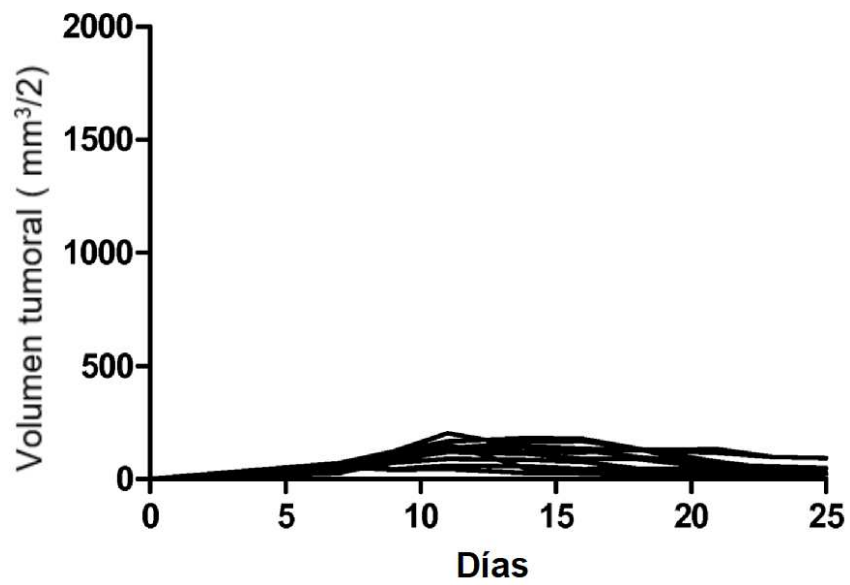
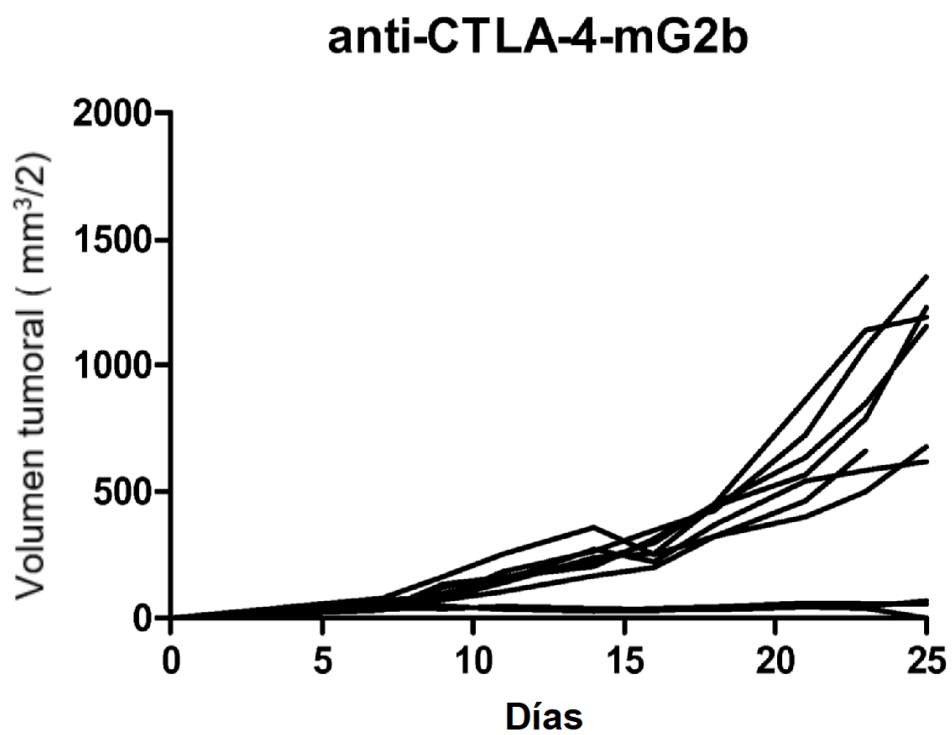


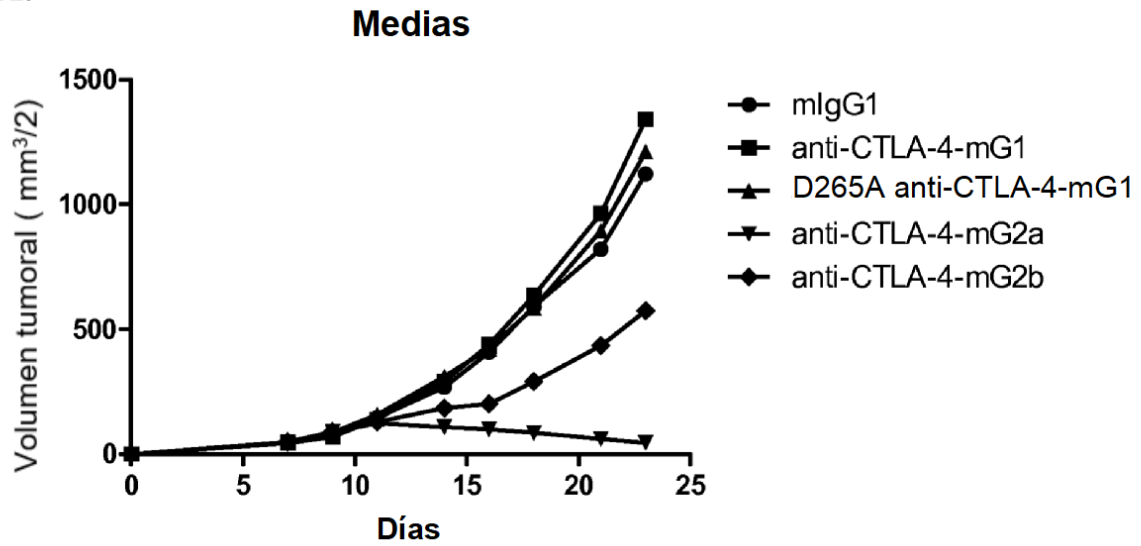
FIG. 7E

E.

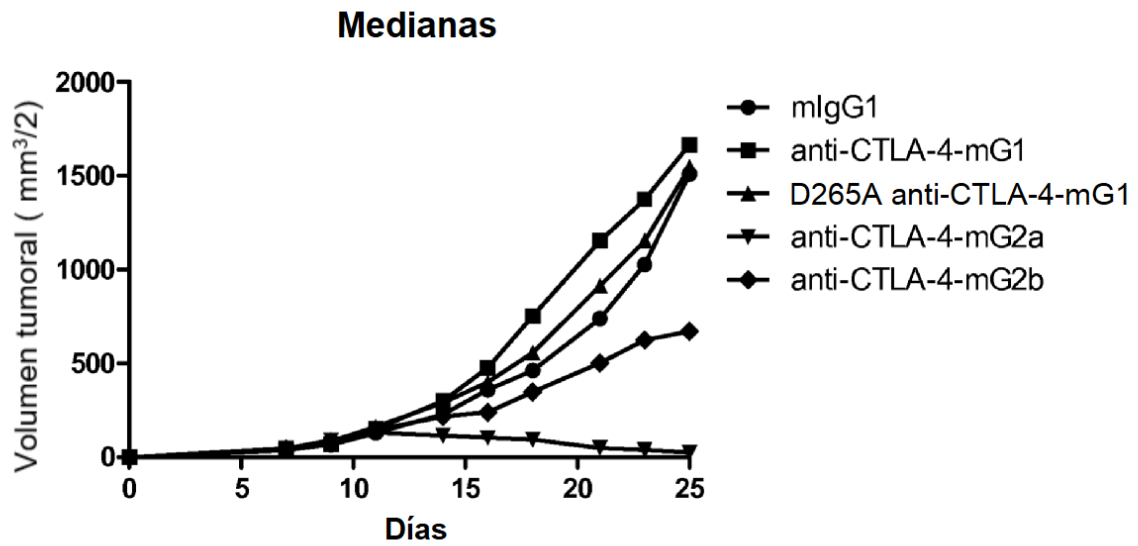


FIGS. 8A y B

A.

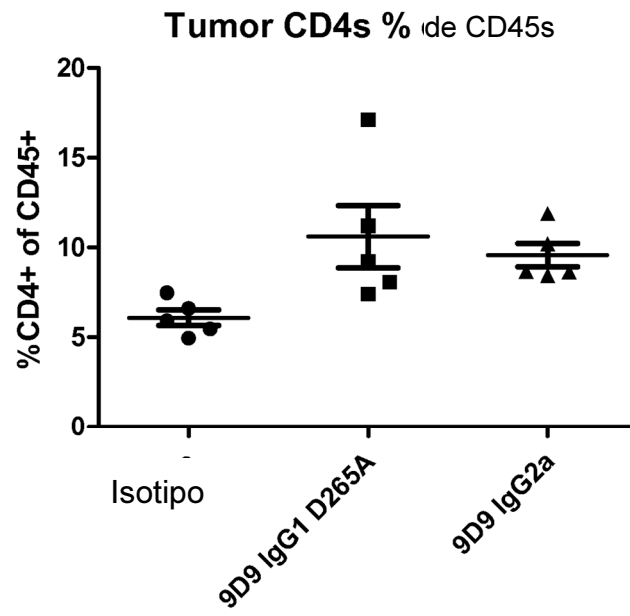


B.



FIGS. 9A y B

A.



B.

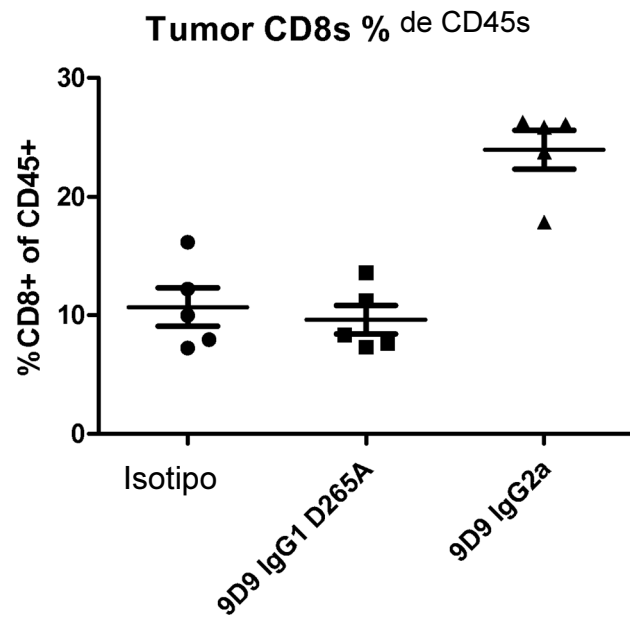
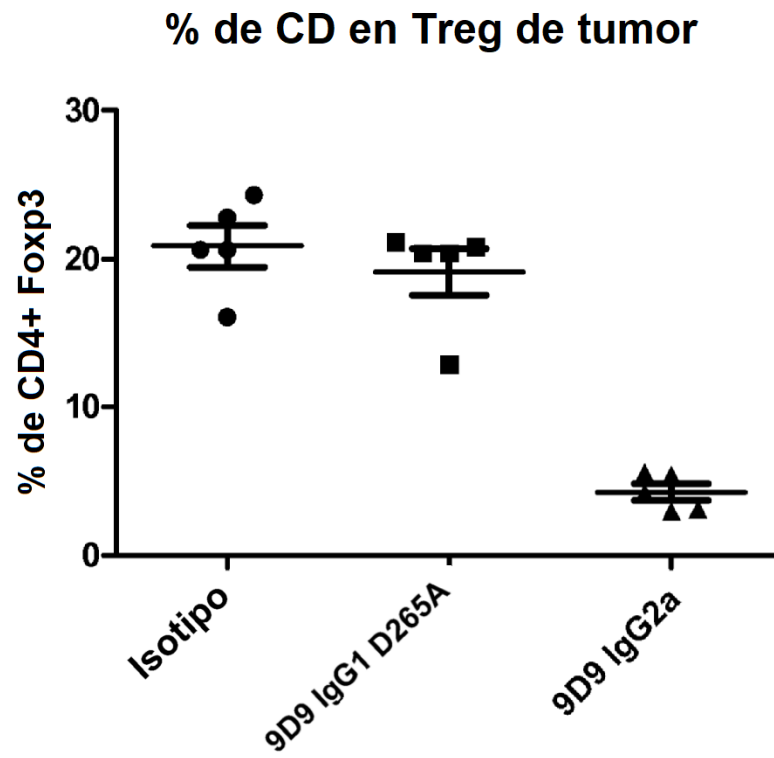


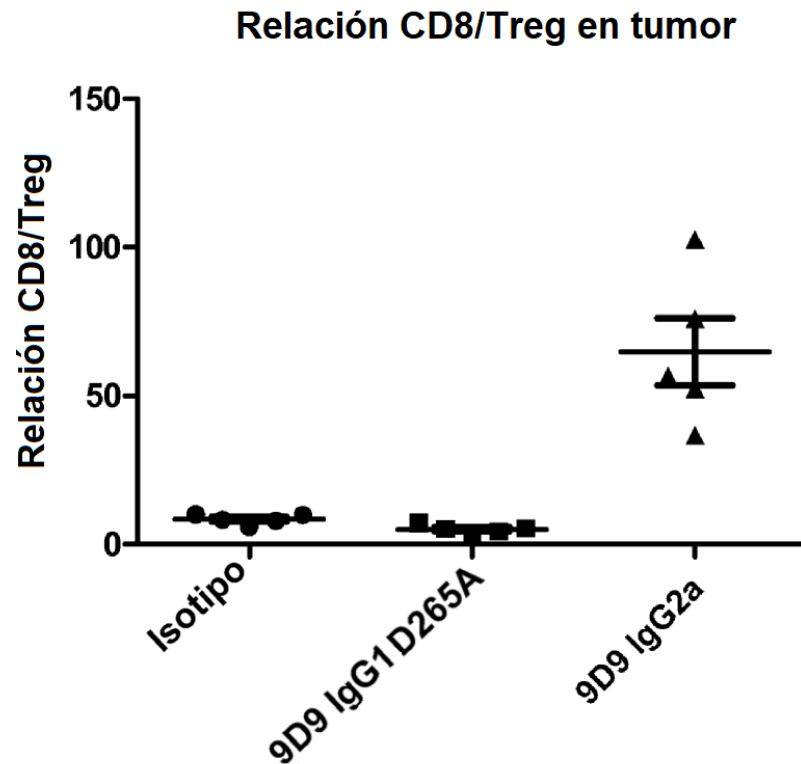
FIG. 9C

C.

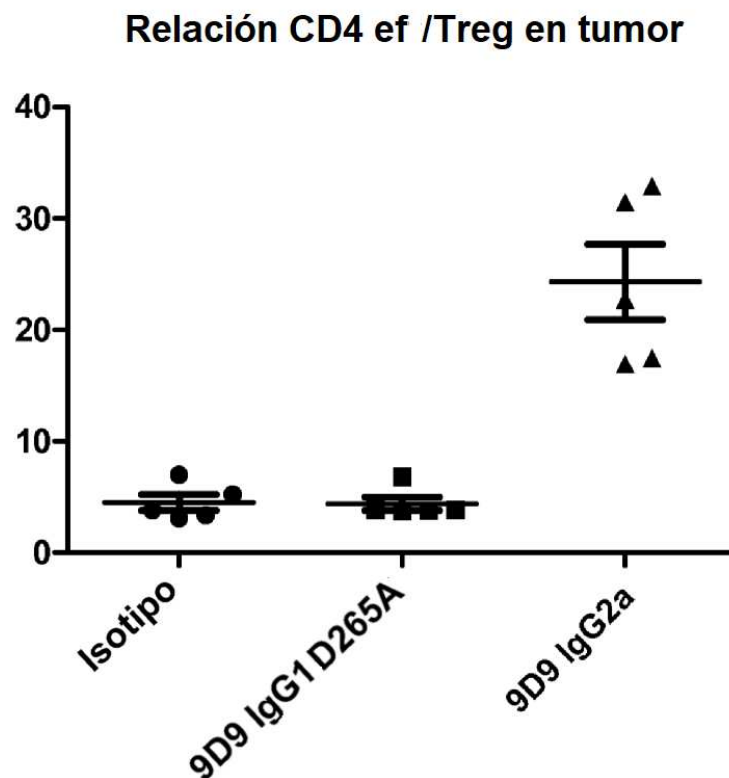


FIGS. 10A y B

A.

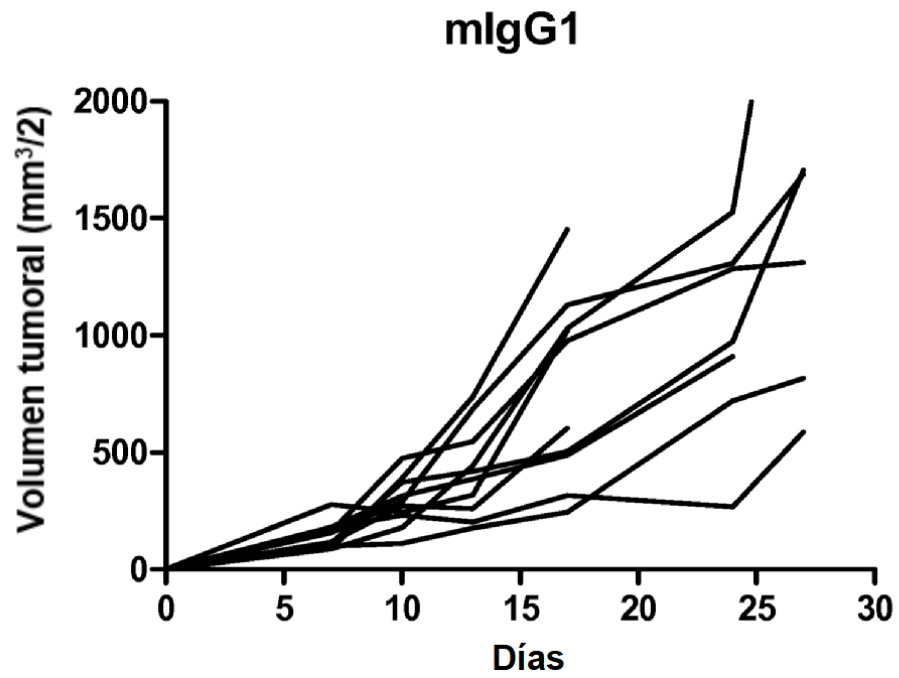


B.



FIGS. 11A y B

A.



B.

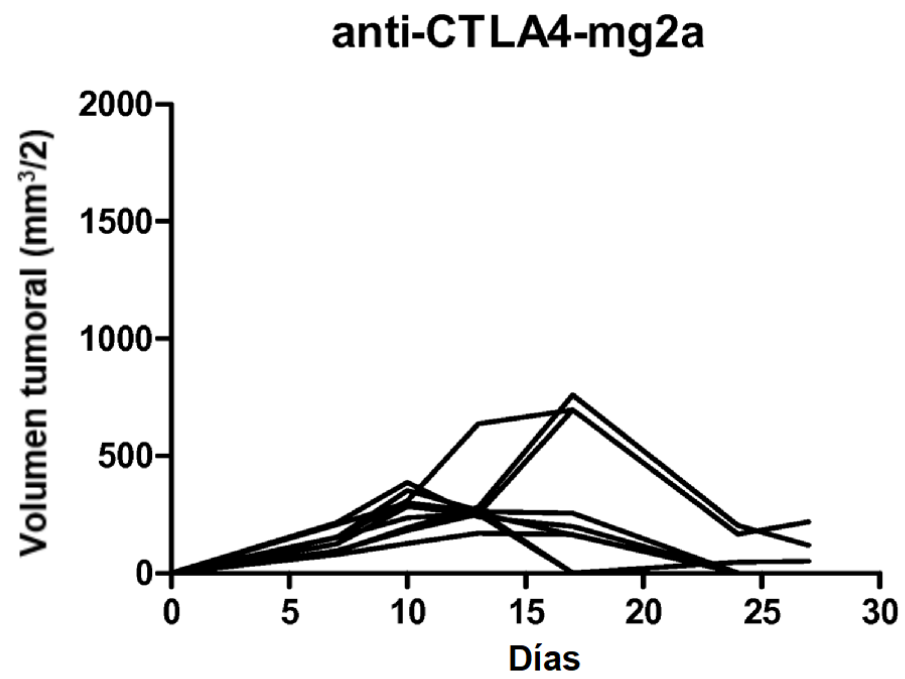
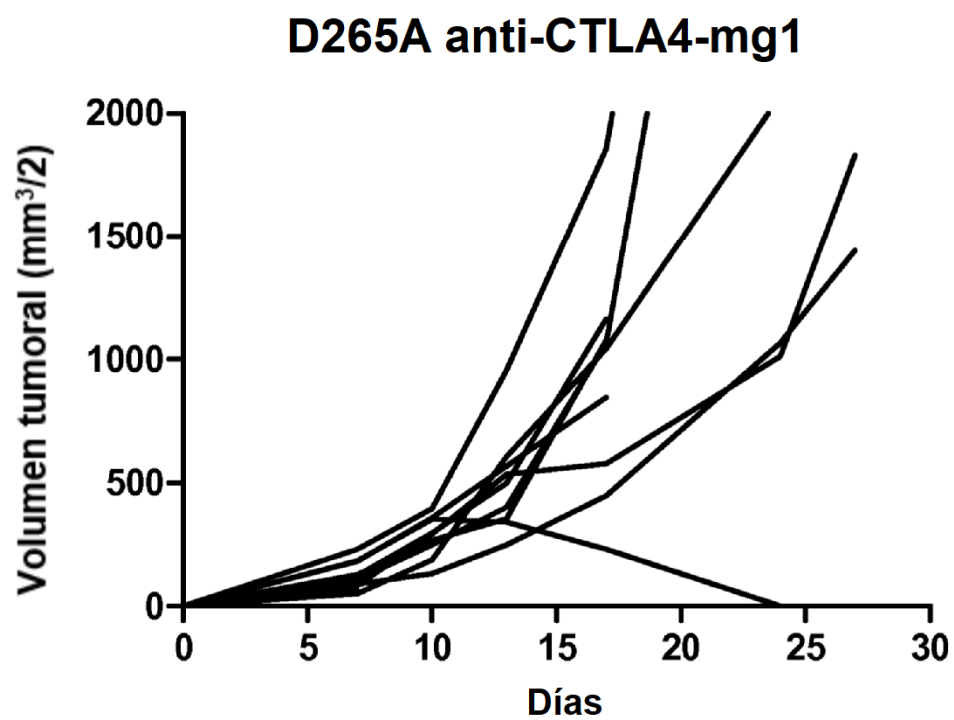


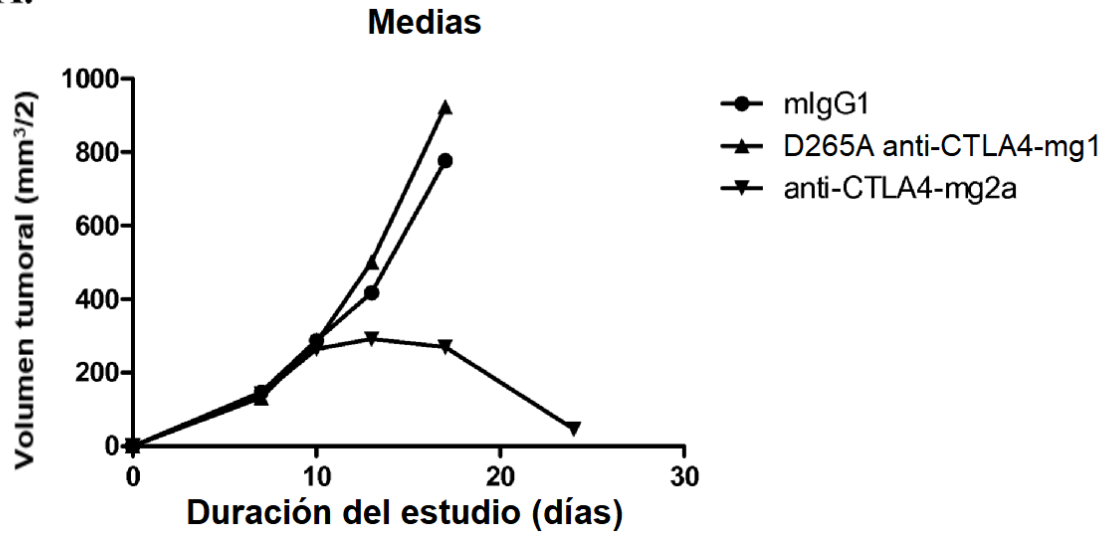
FIG. 11C

C.

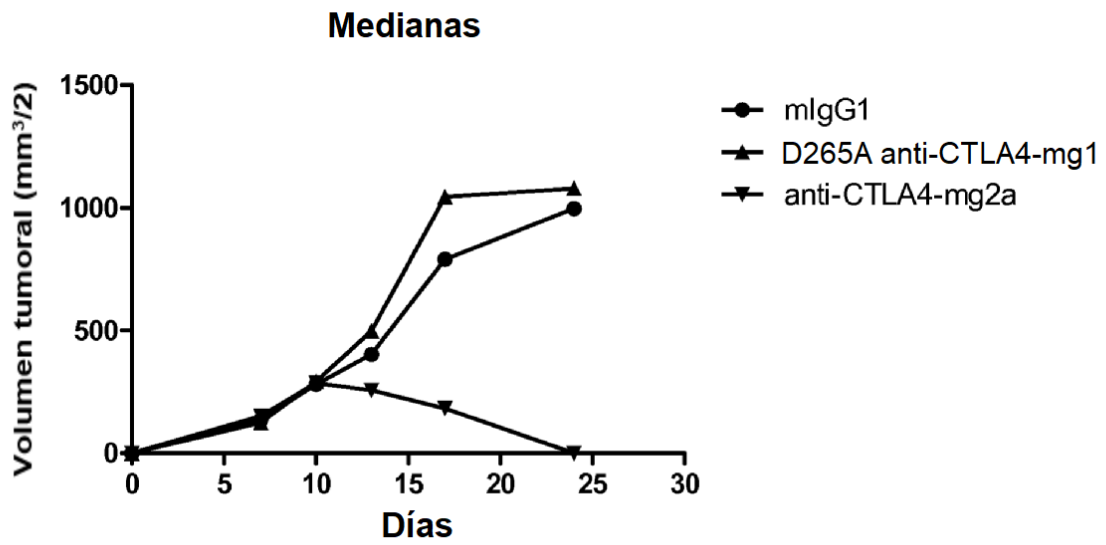


FIGS. 12A y B

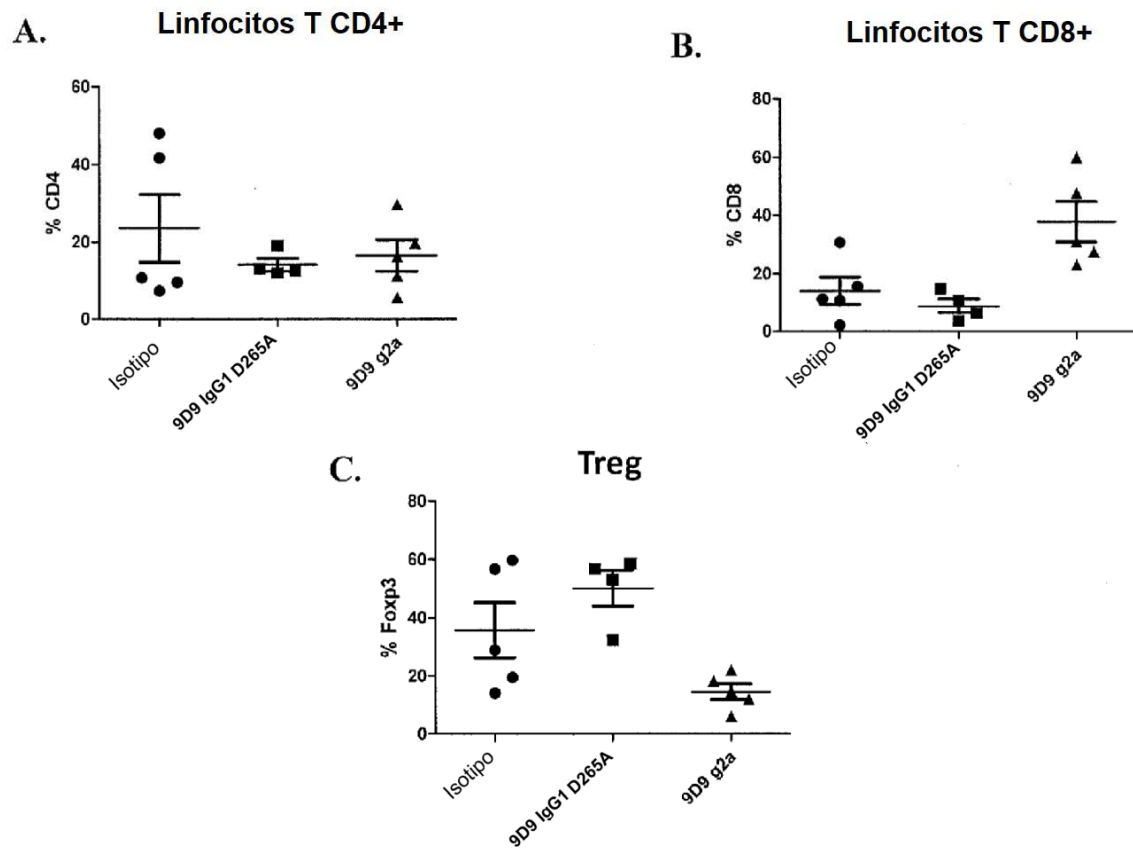
A.



B.



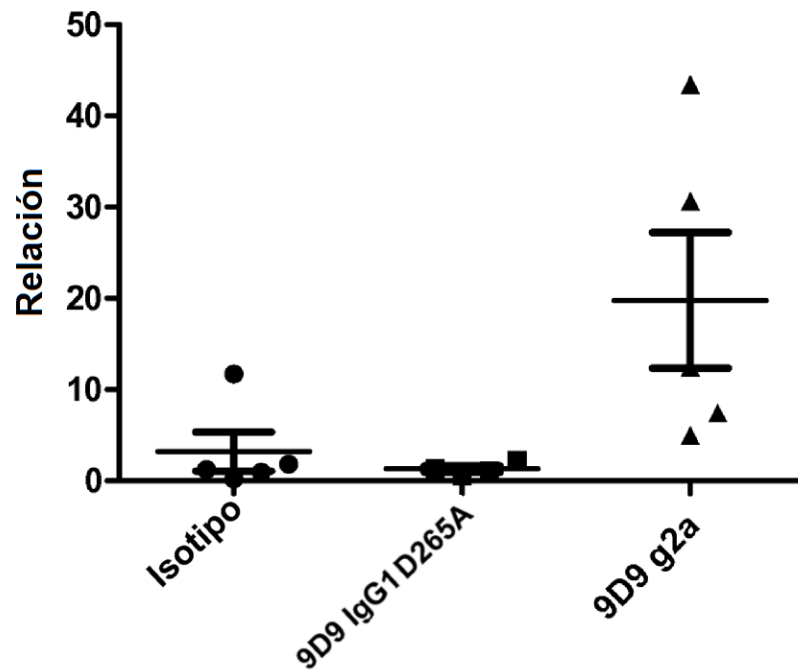
FIGS. 13A-C



FIGS. 14A Y B

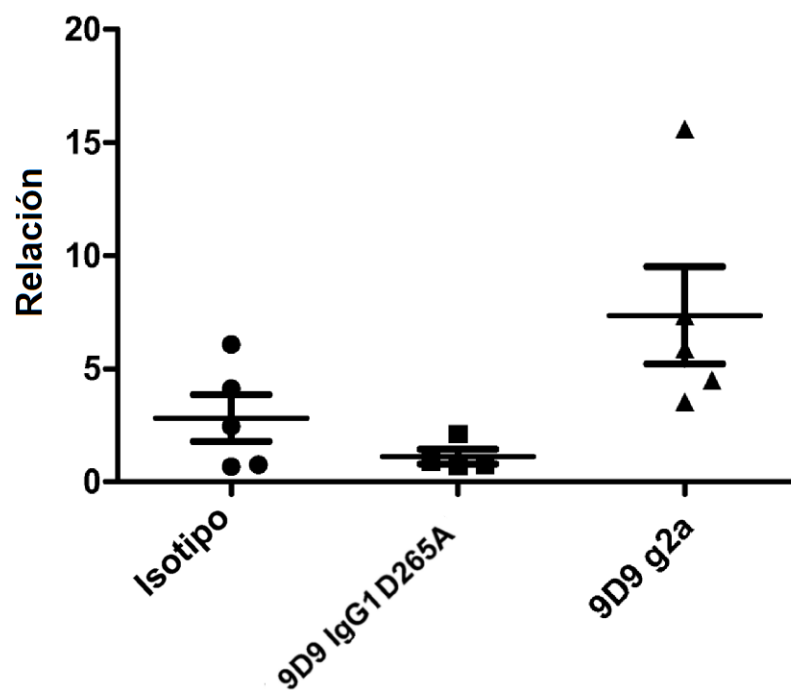
A.

Relación CD8/Treg

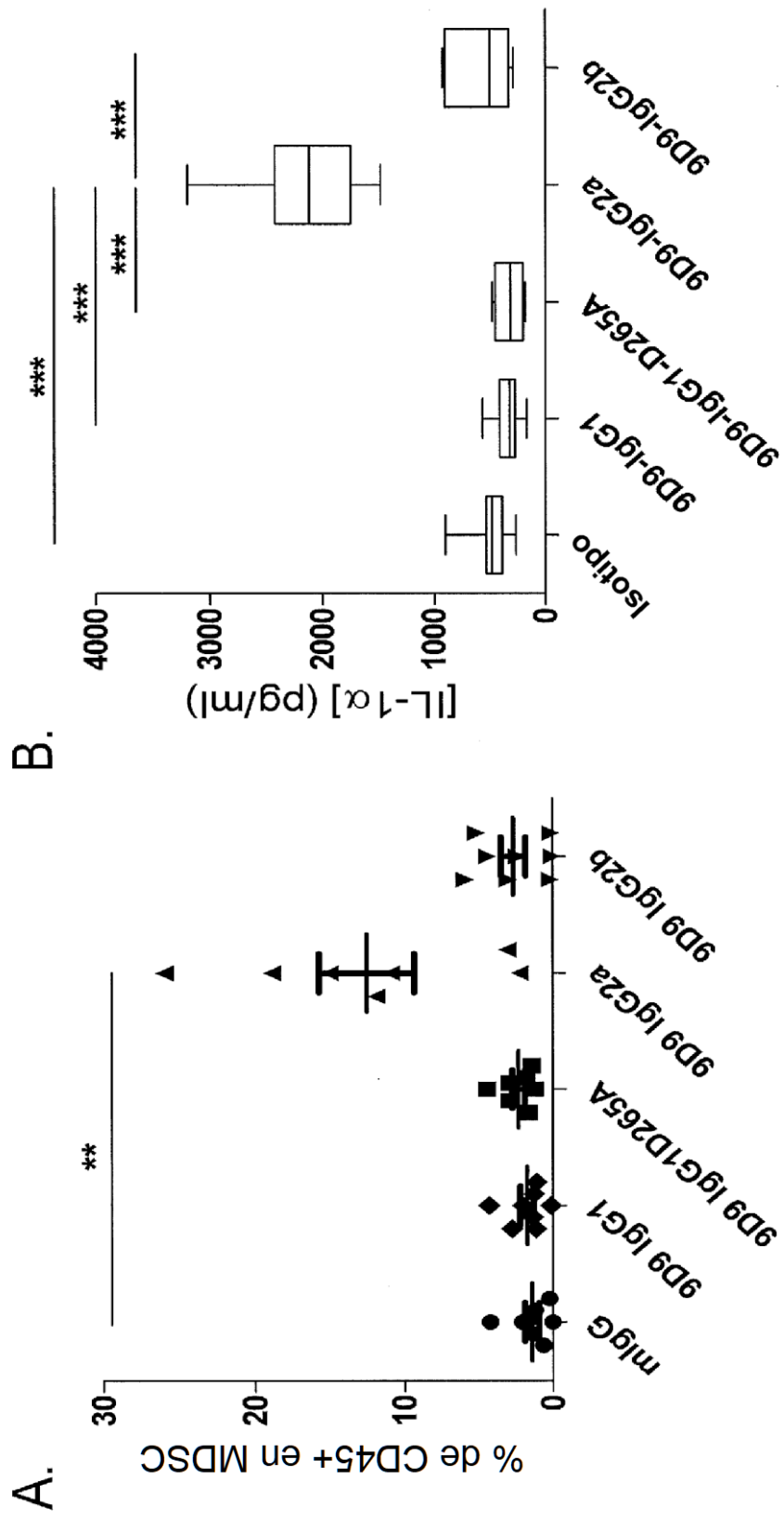


B.

Relación CD4/Treg

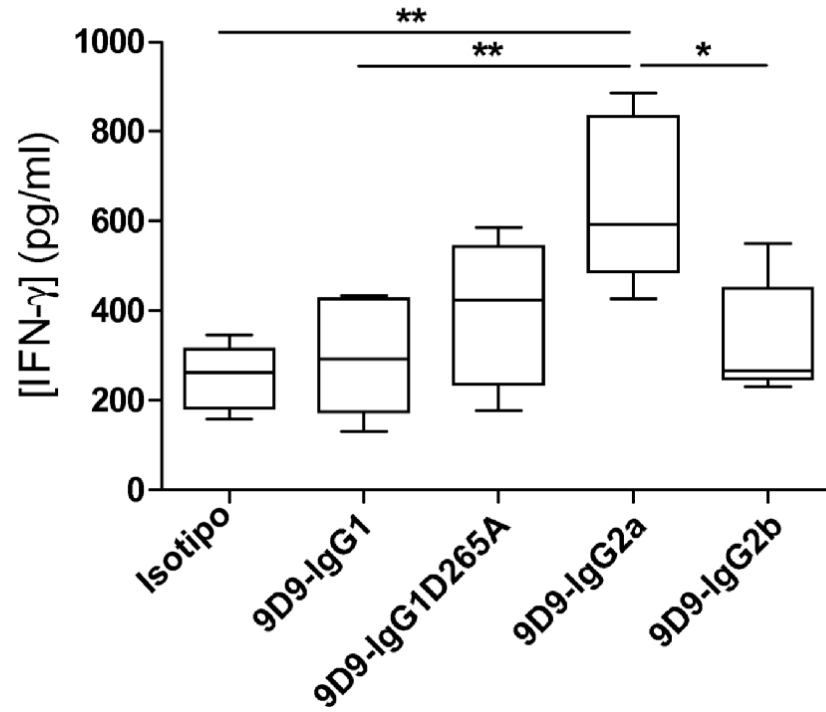


FIGS. 15A y B

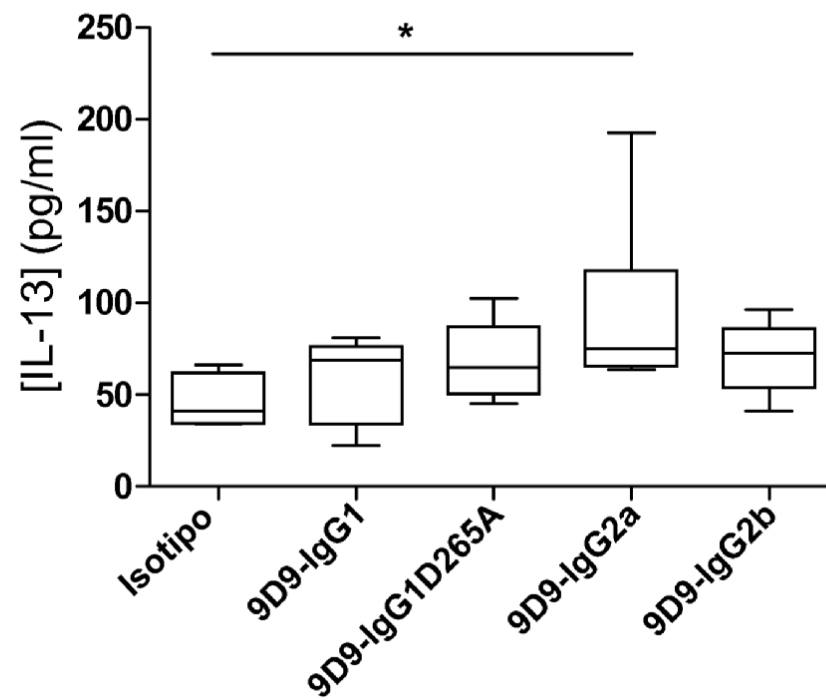


FIGS. 16A y B

A.

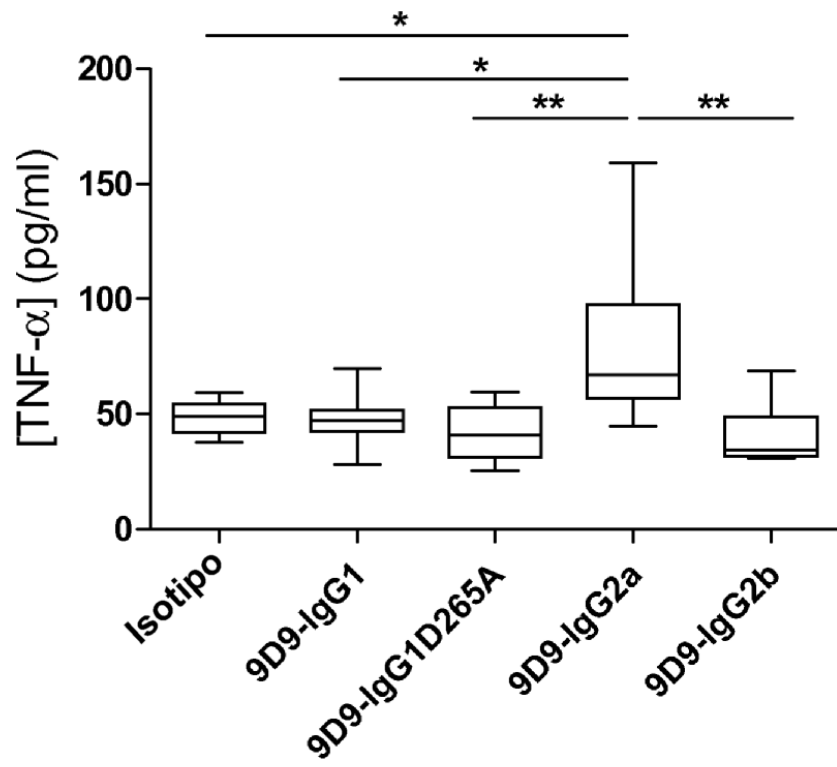


B.

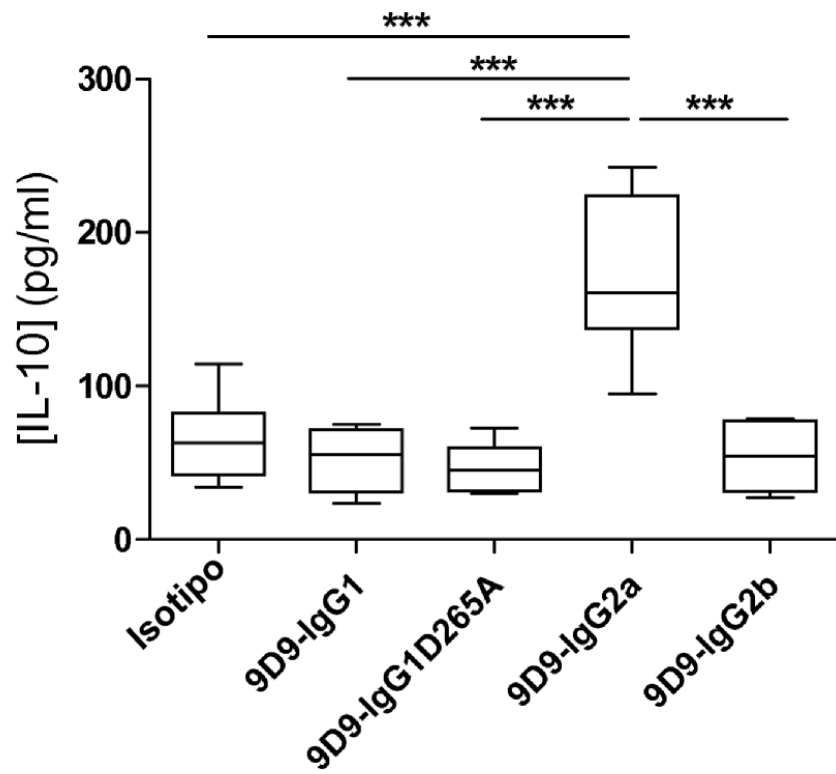


FIGS. 16C y D

C.

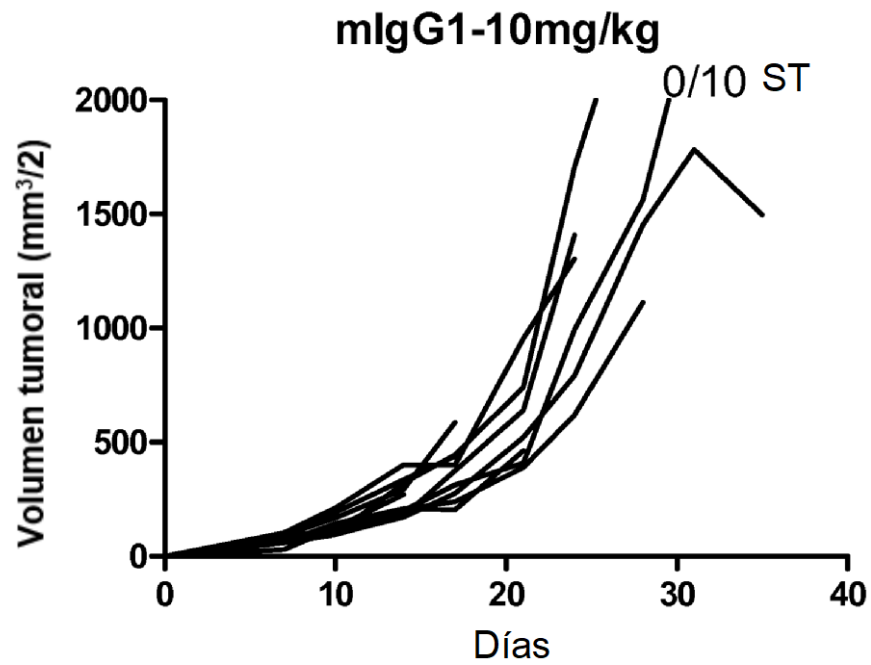


D.

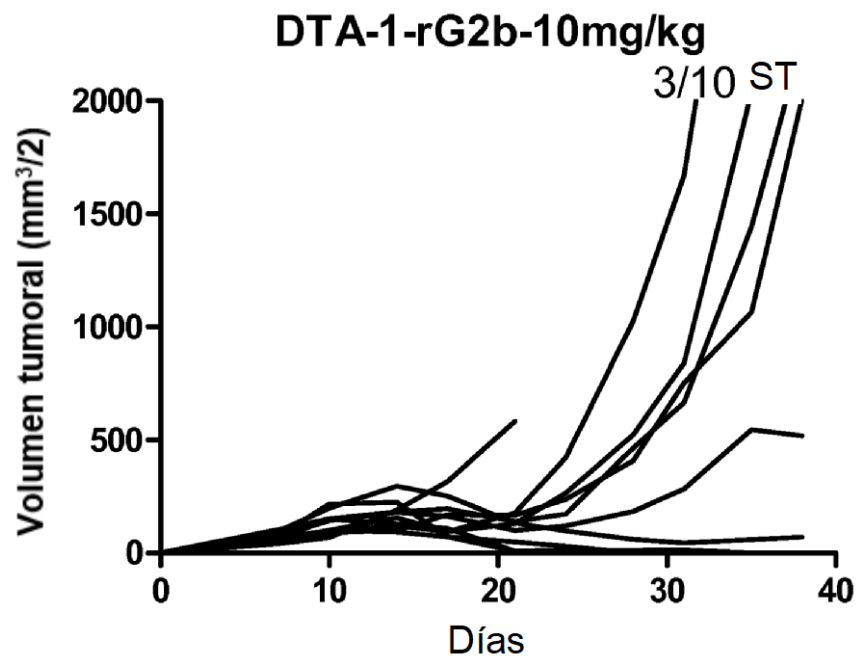


FIGS. 17A y B

A.

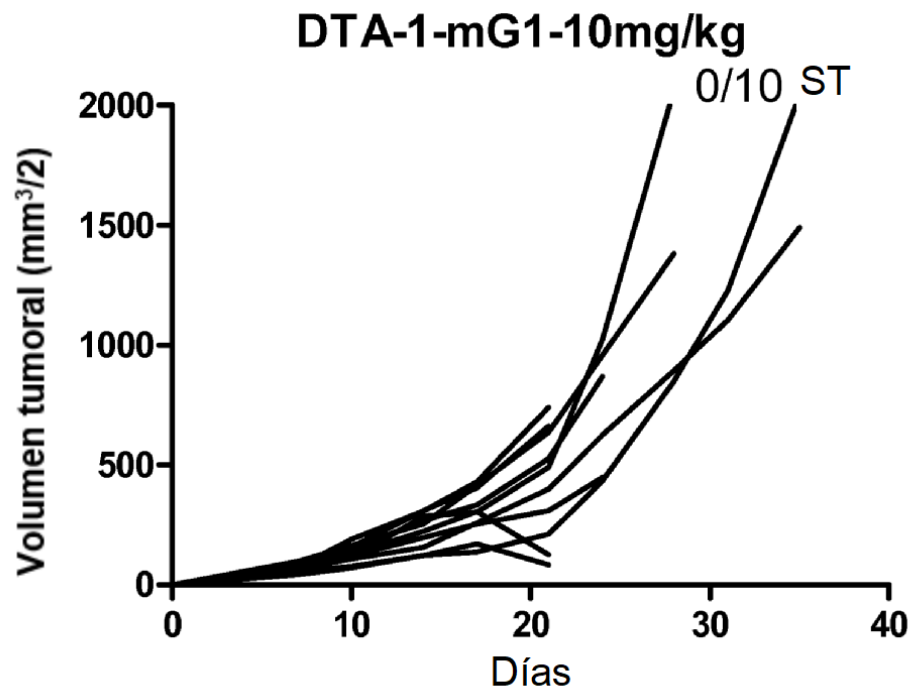


B.

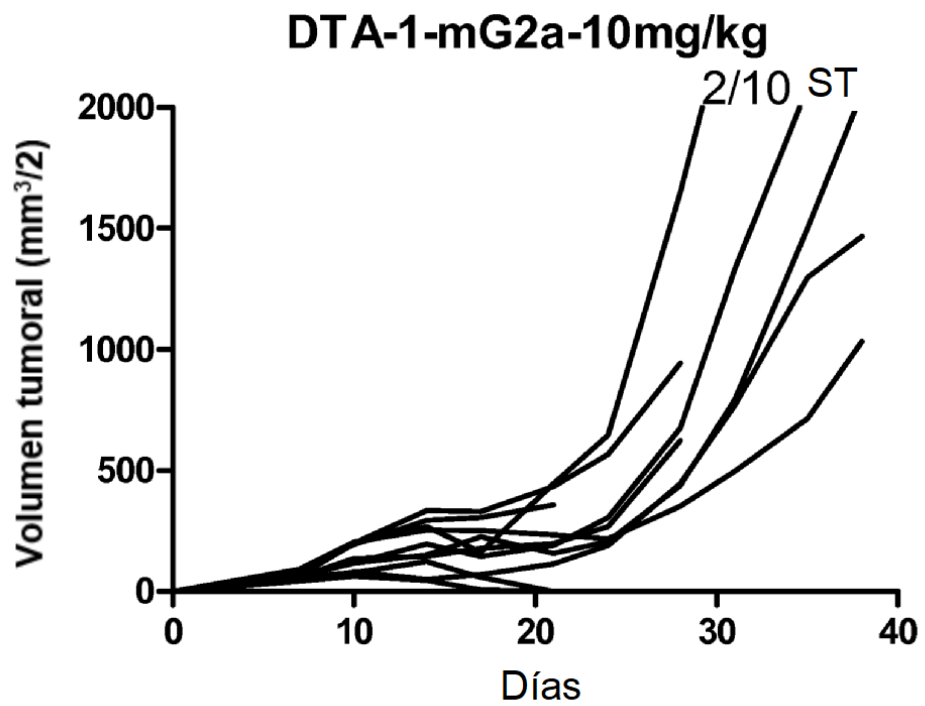


FIGS. 17C y D

C.



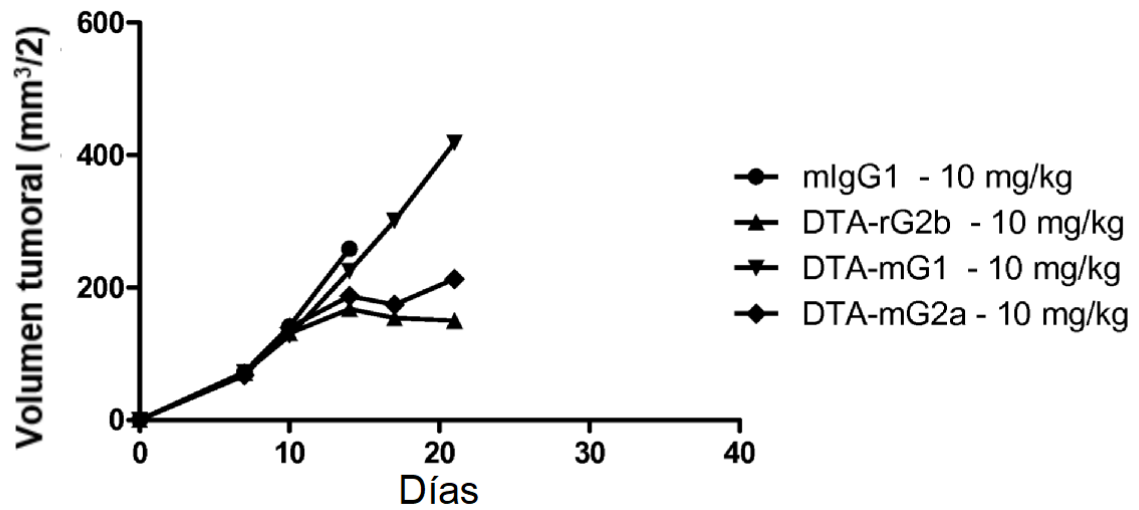
D.



FIGS. 18A y B

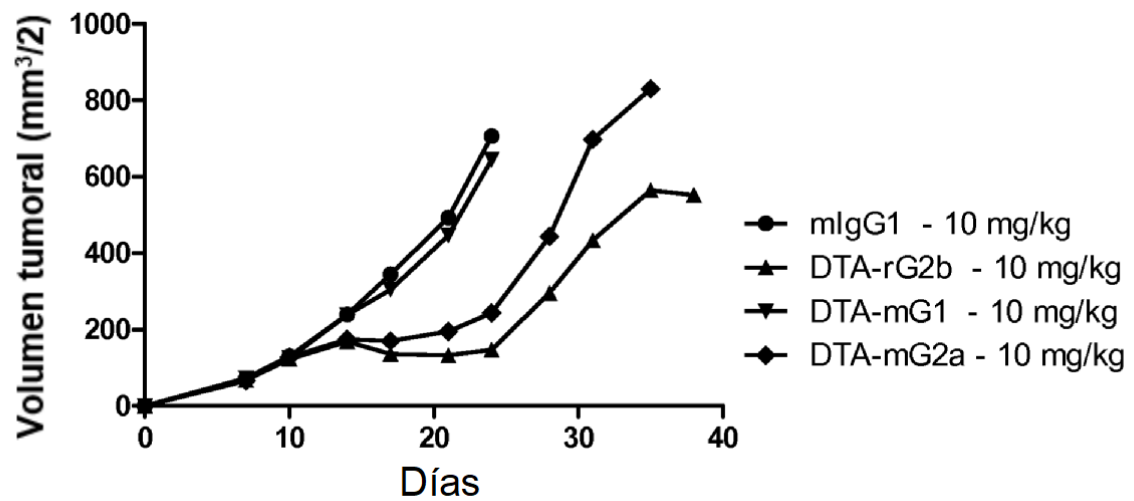
A.

Medias 10 mg/kg



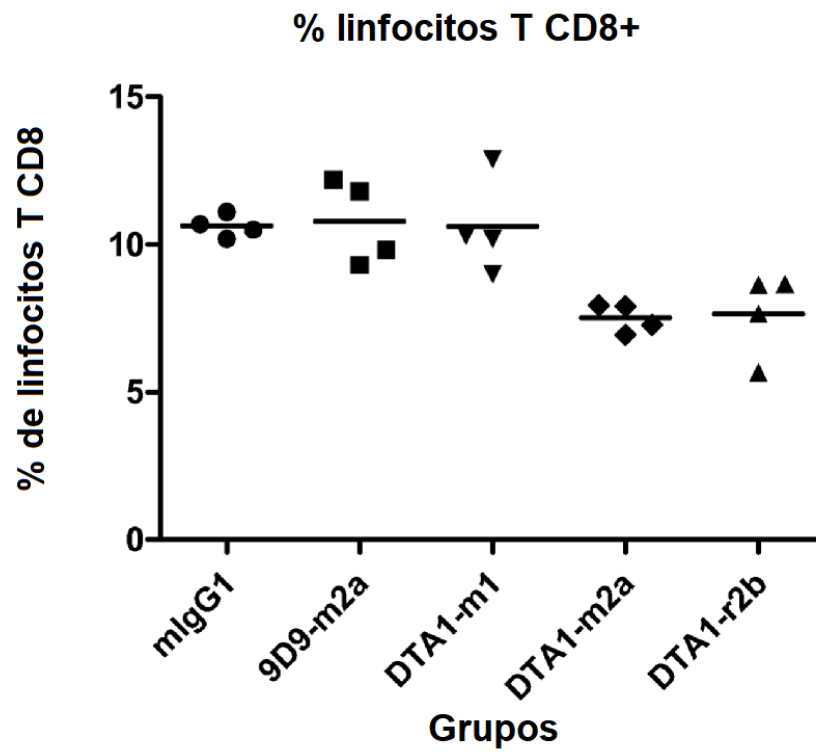
B.

Medianas 10 mg/kg

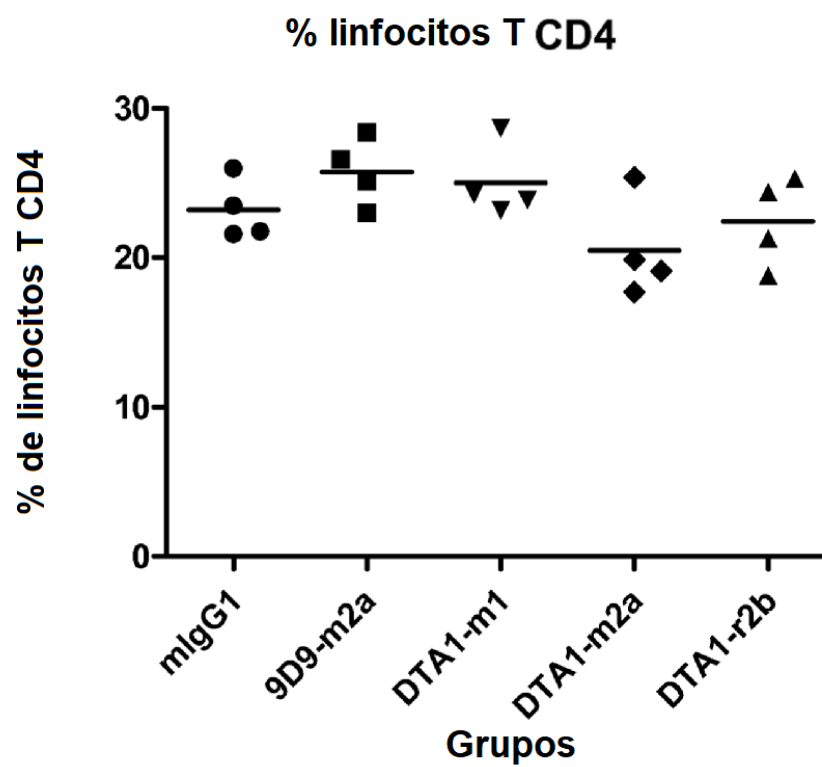


FIGS. 19A y B

A.



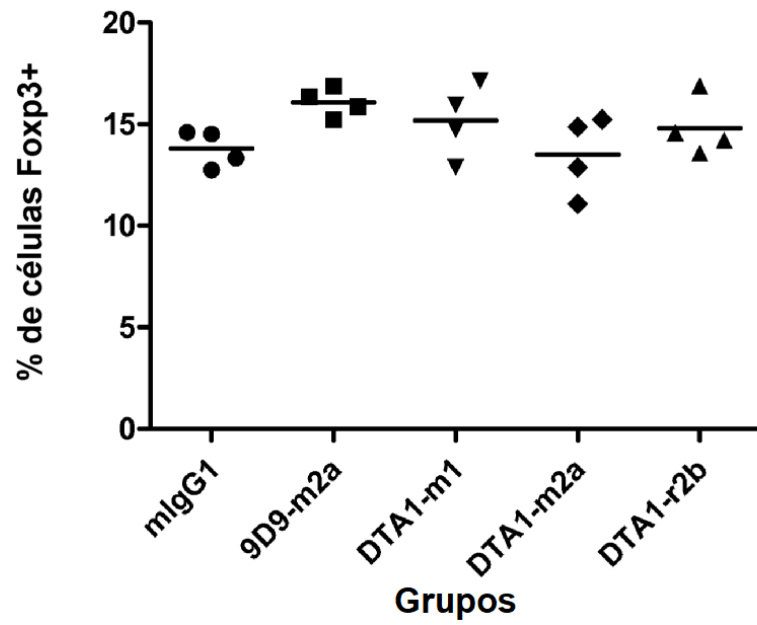
B.



FIGS. 19C Y D

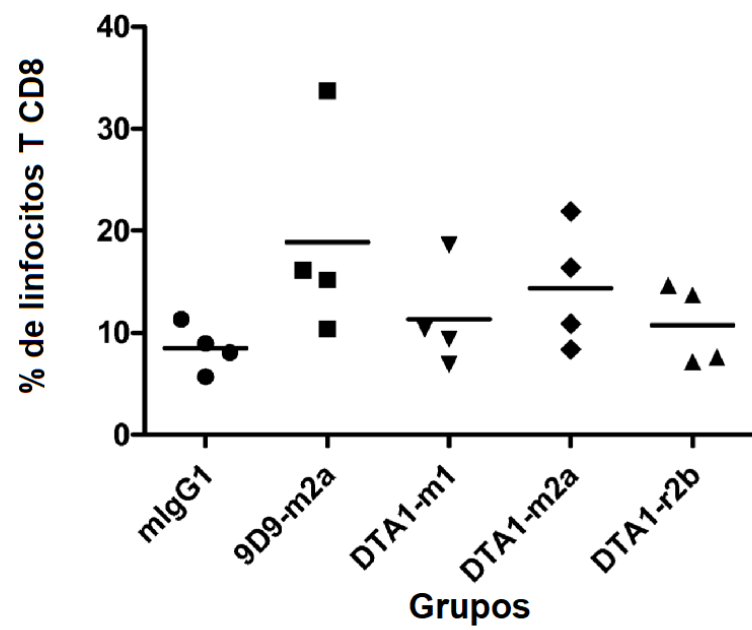
C.

% de células Foxp3+ en población de linfocitos T CD4



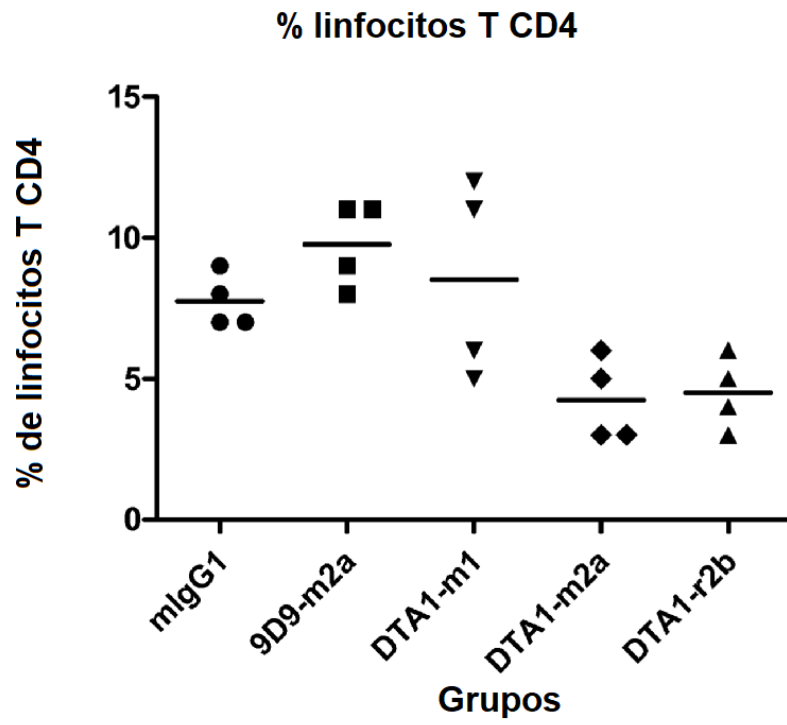
D.

% linfocitos T CD8+

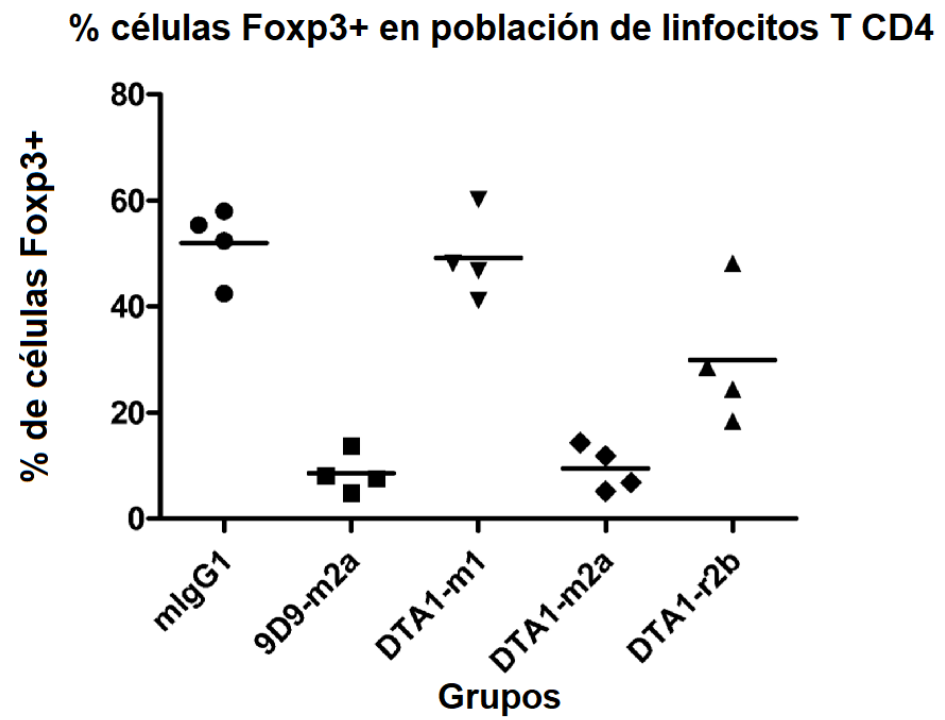


FIGS. 19E y F

E.

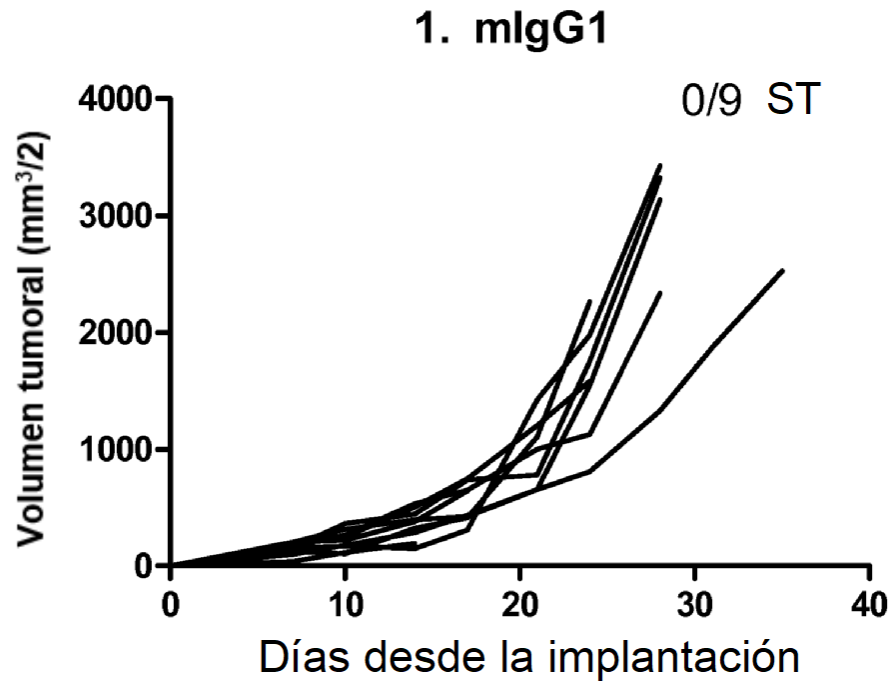


F.

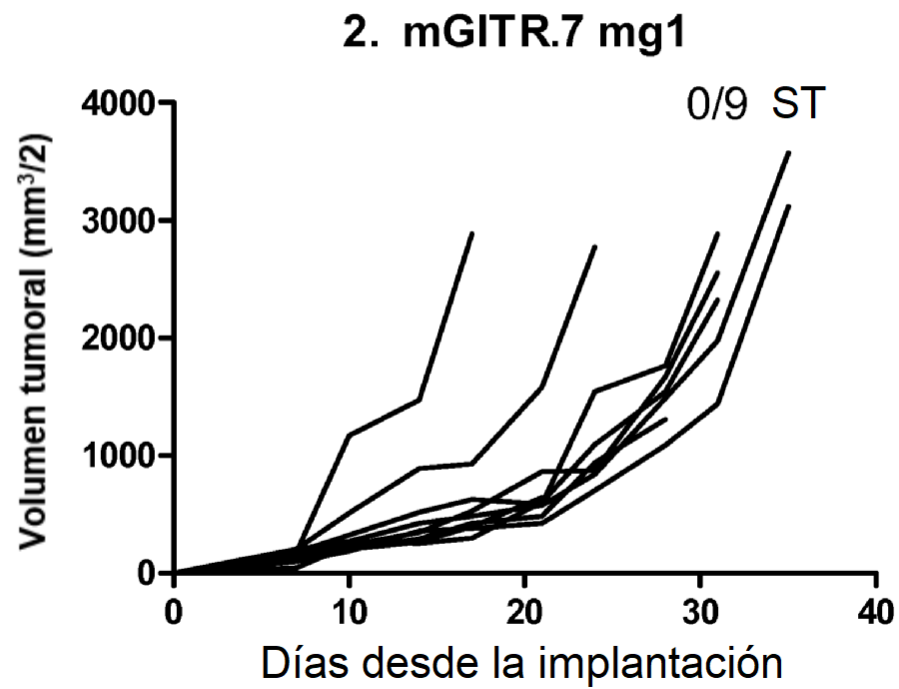


FIGS. 20A y B

A.

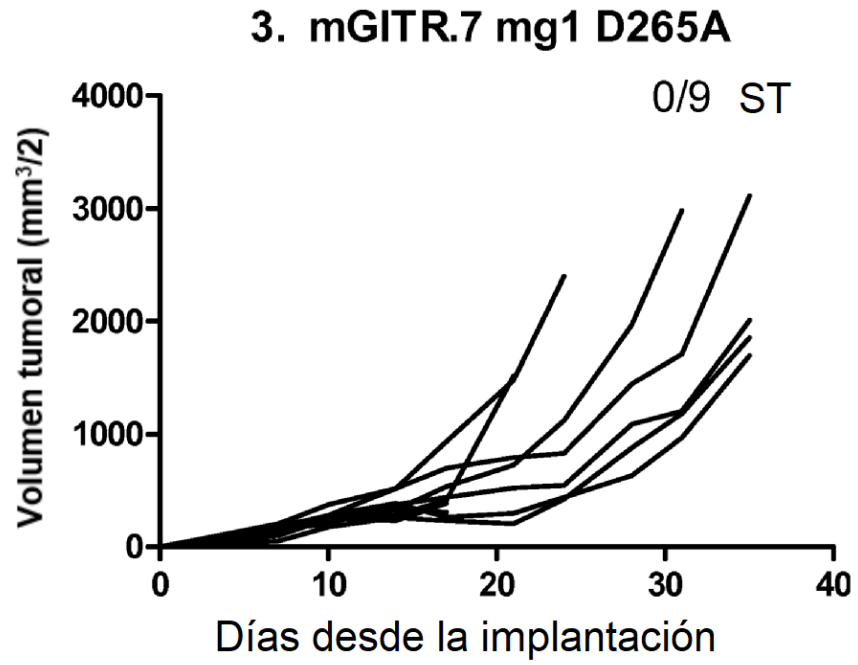


B.

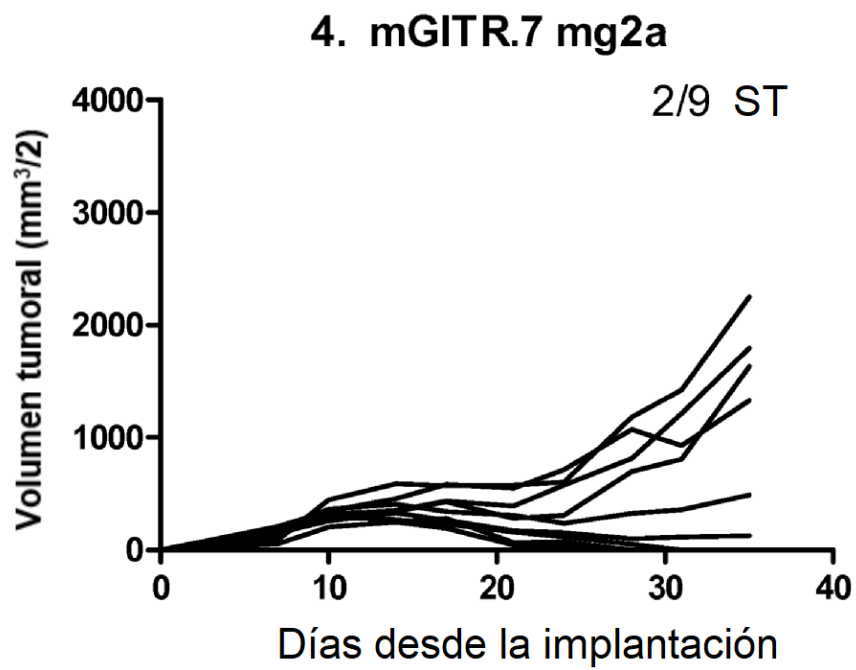


FIGS. 20C y D

C.



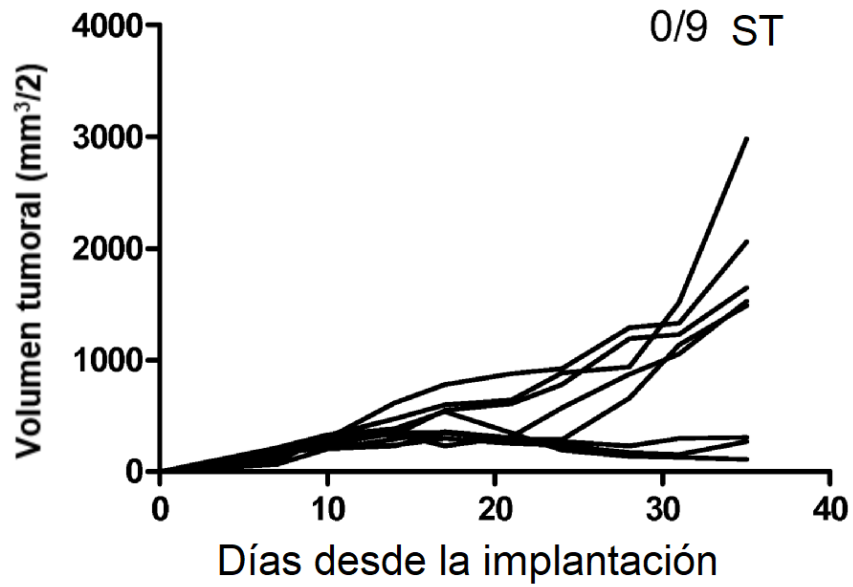
D.



FIGS. 20E y F

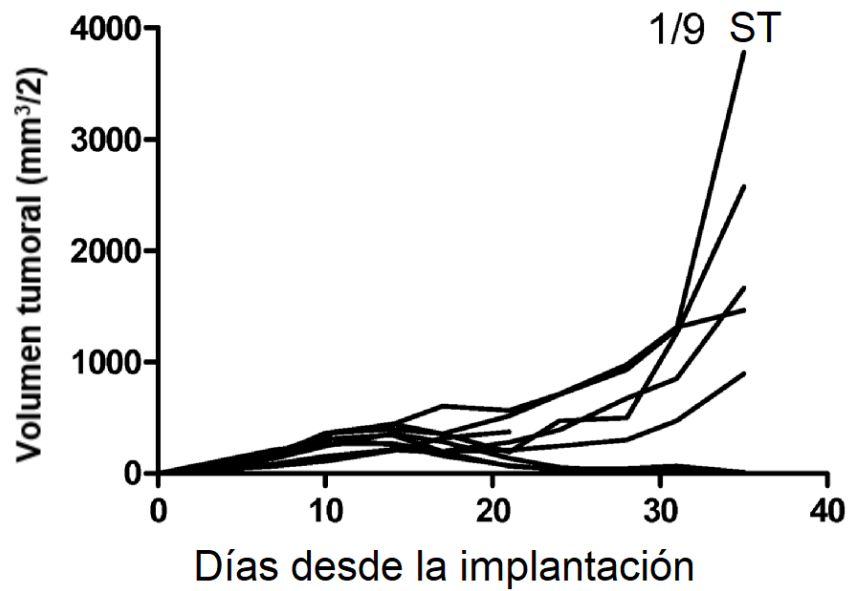
E.

5. mGfTR.7 mg2b



F.

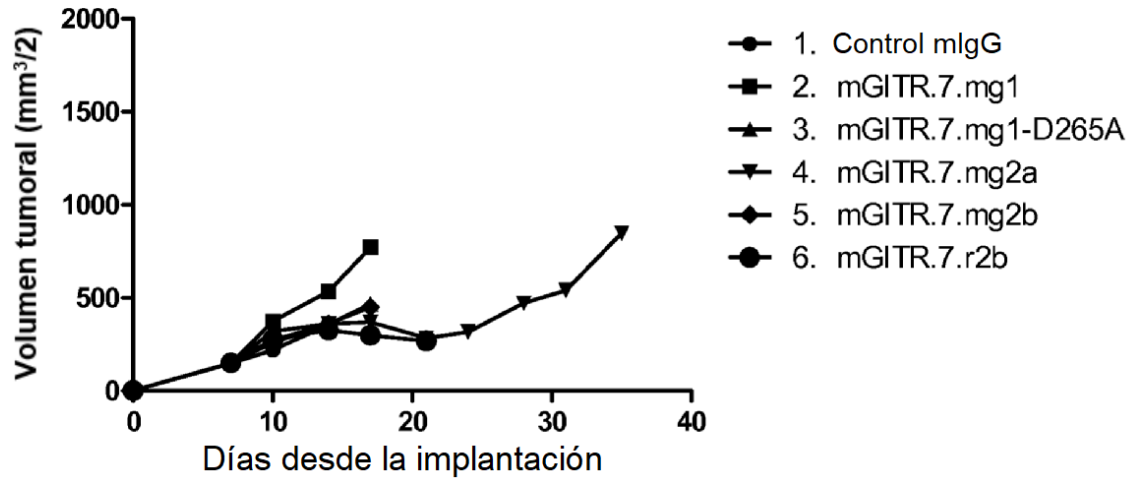
6. mGfTR.7 rg2b



FIGS. 21A y B

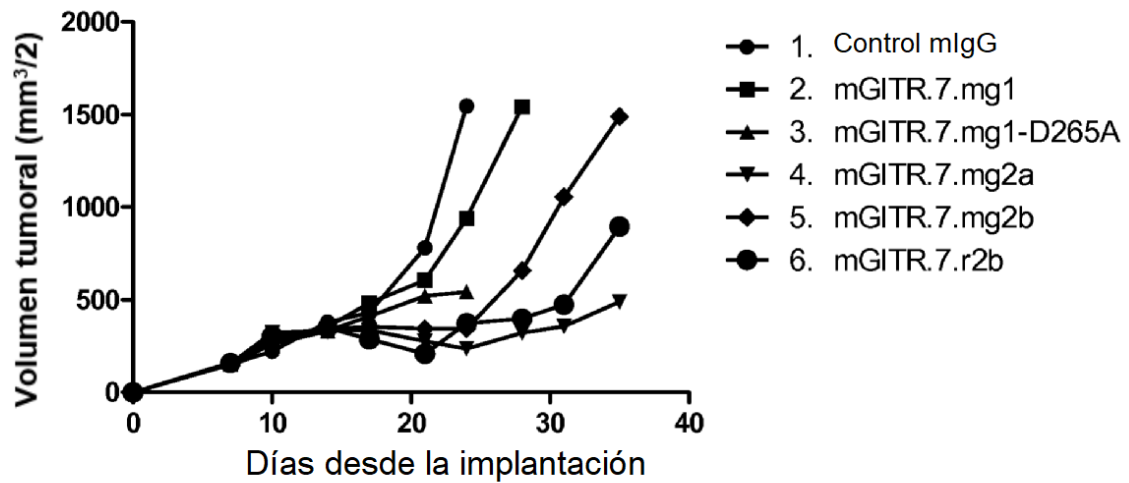
A.

Medias

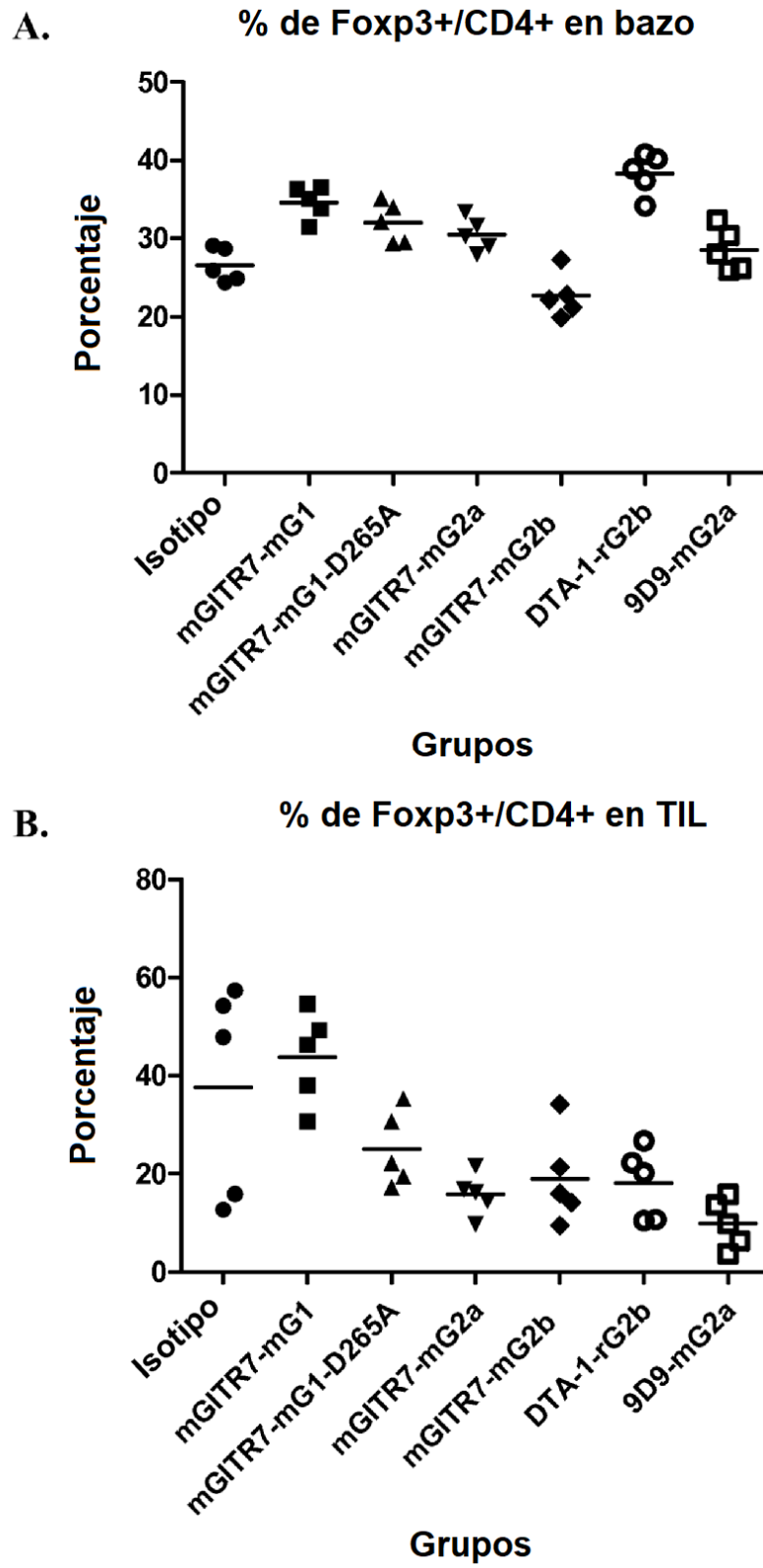


B.

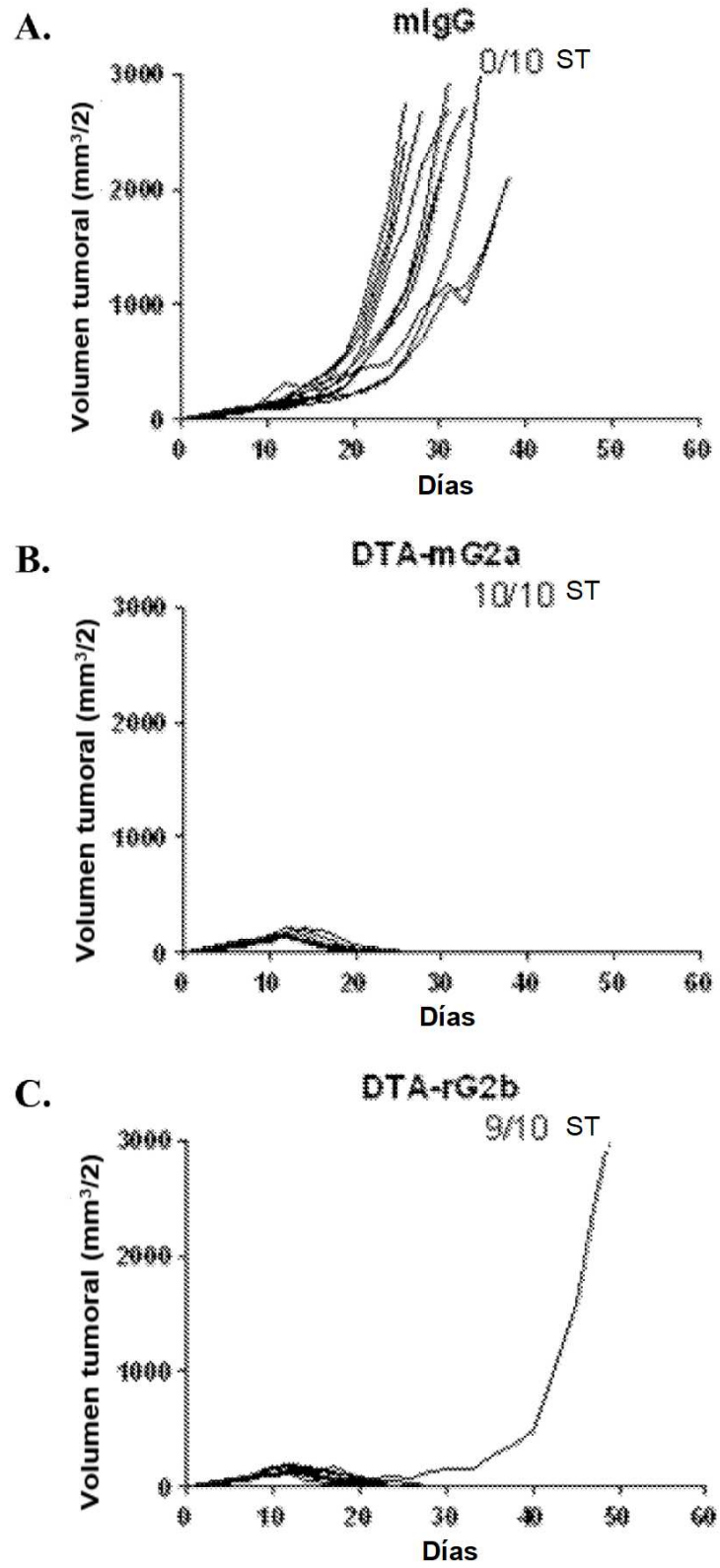
Medianas



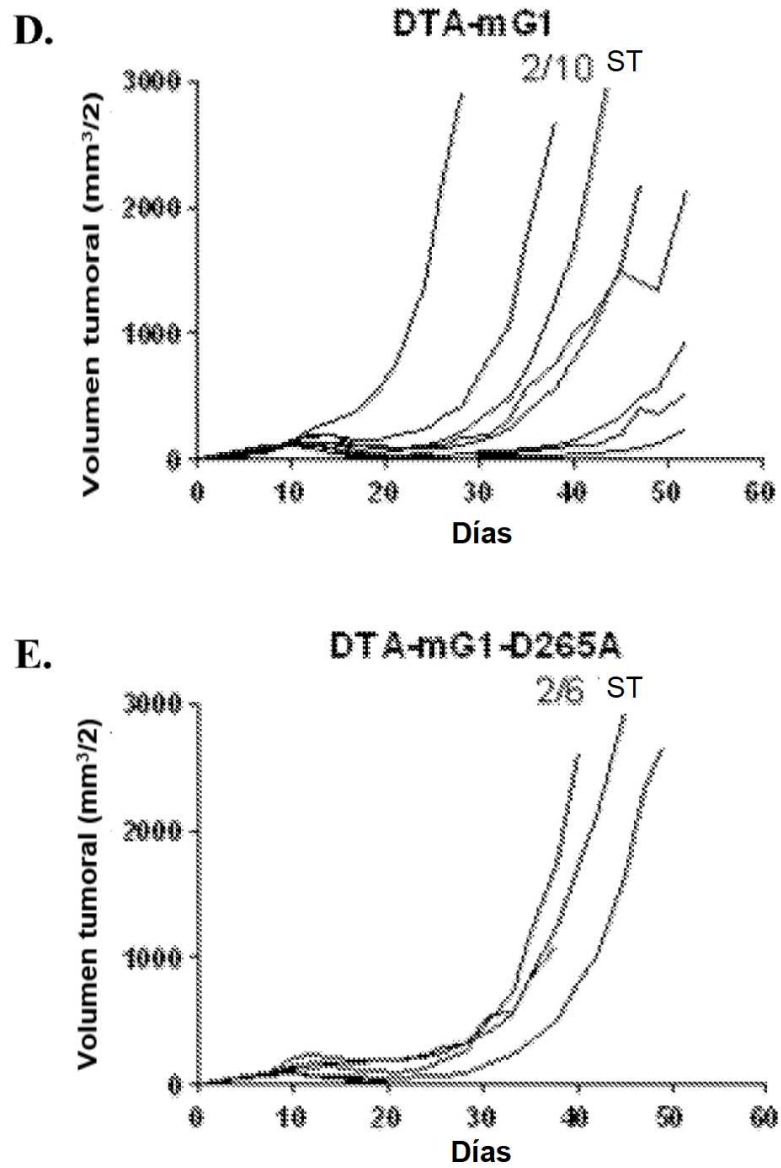
FIGS. 22A y B



FIGS. 23A-C

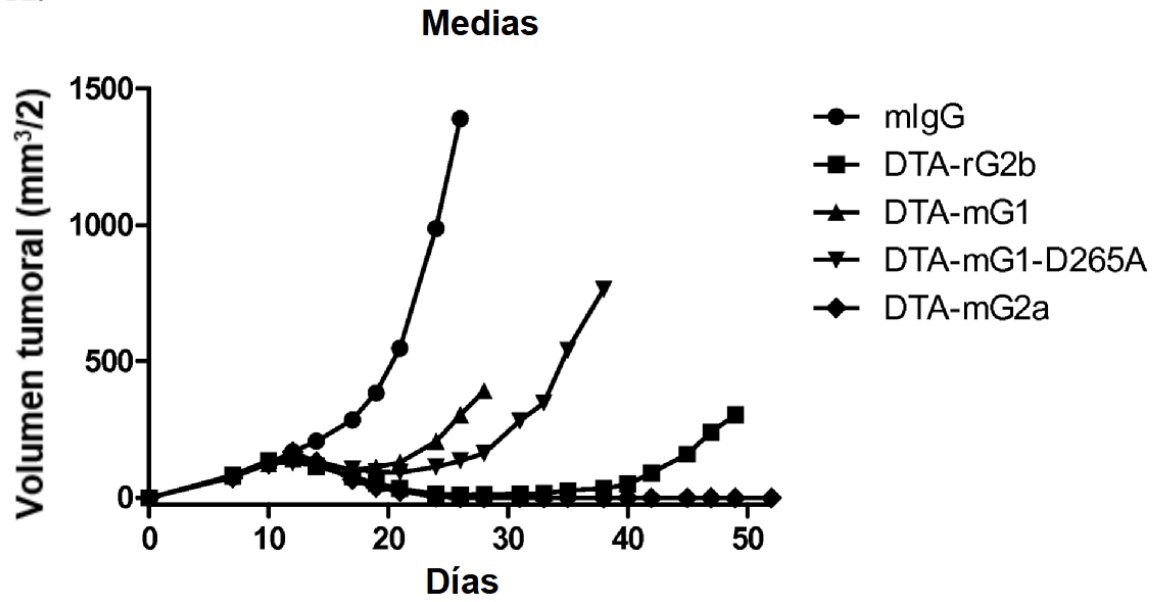


FIGS. 23D y E

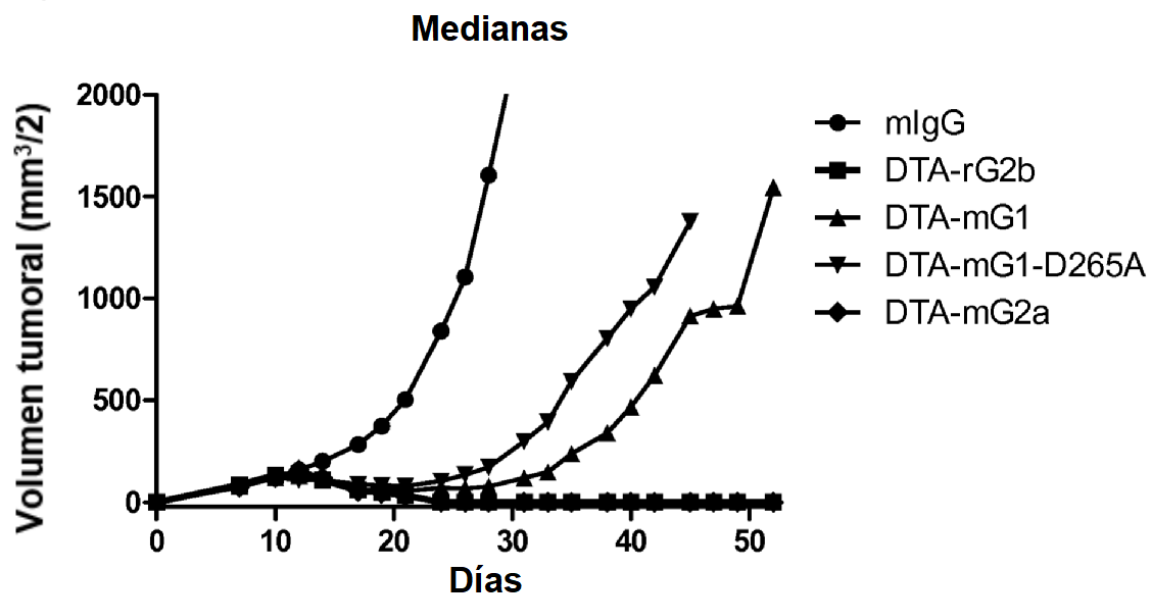


FIGS. 24A y B

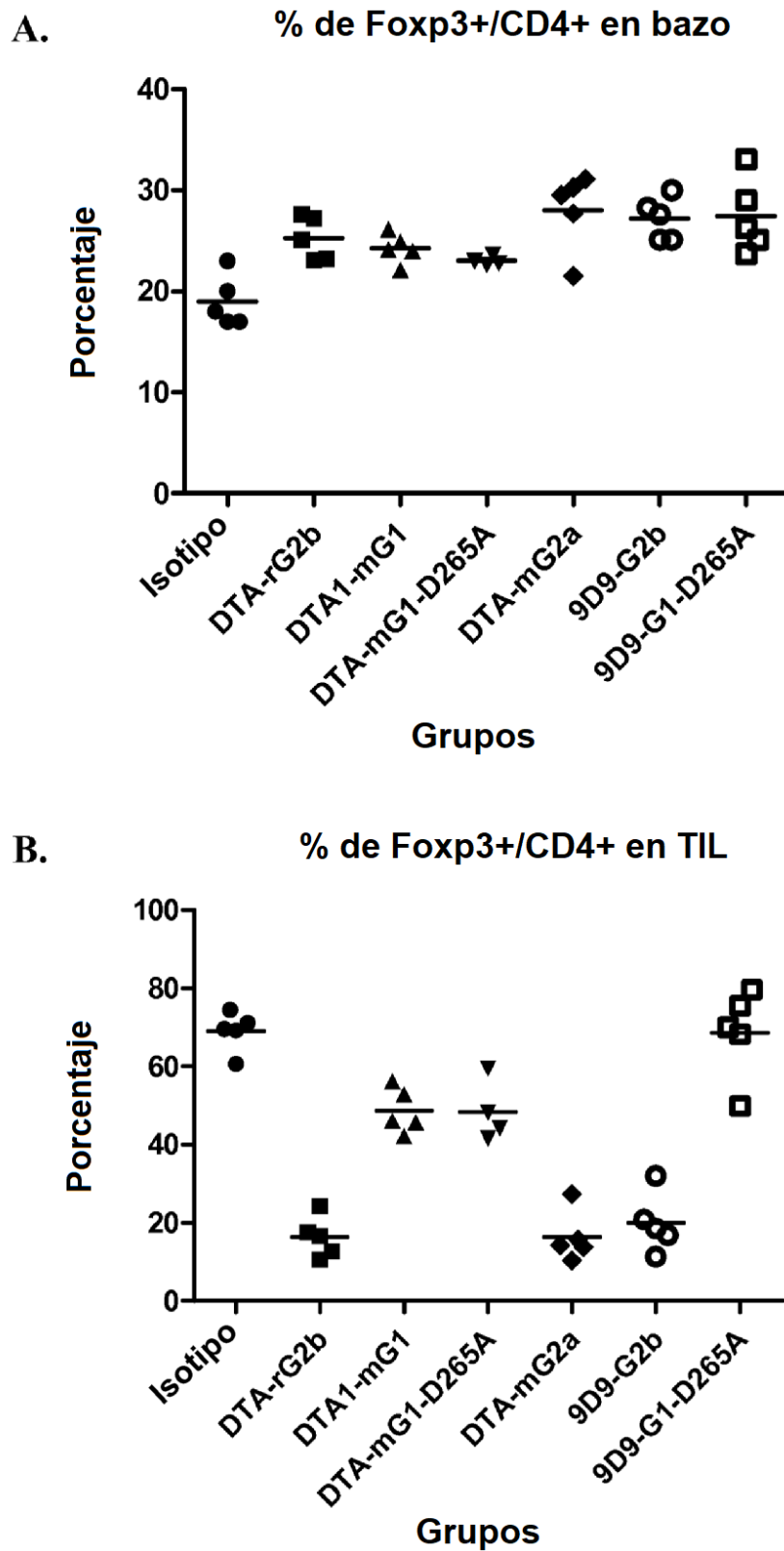
A.



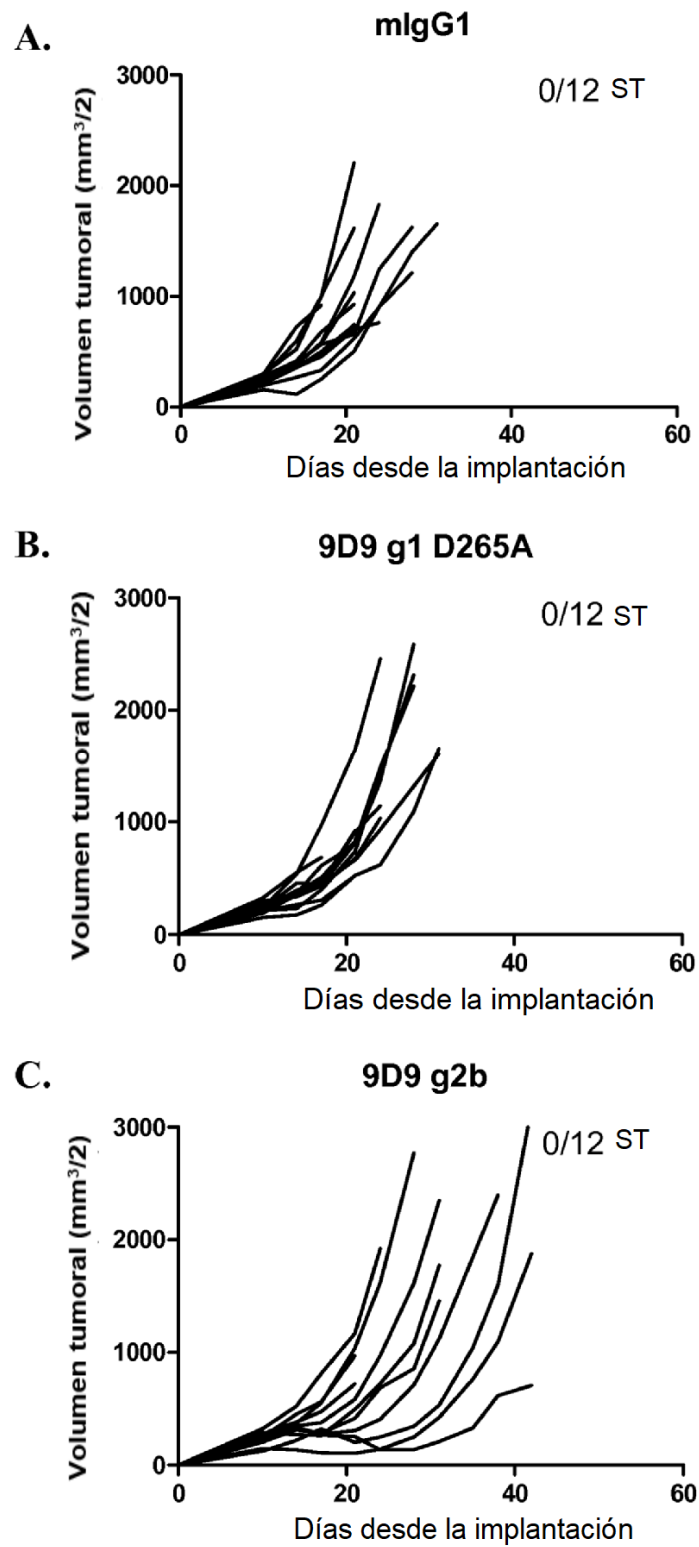
B.



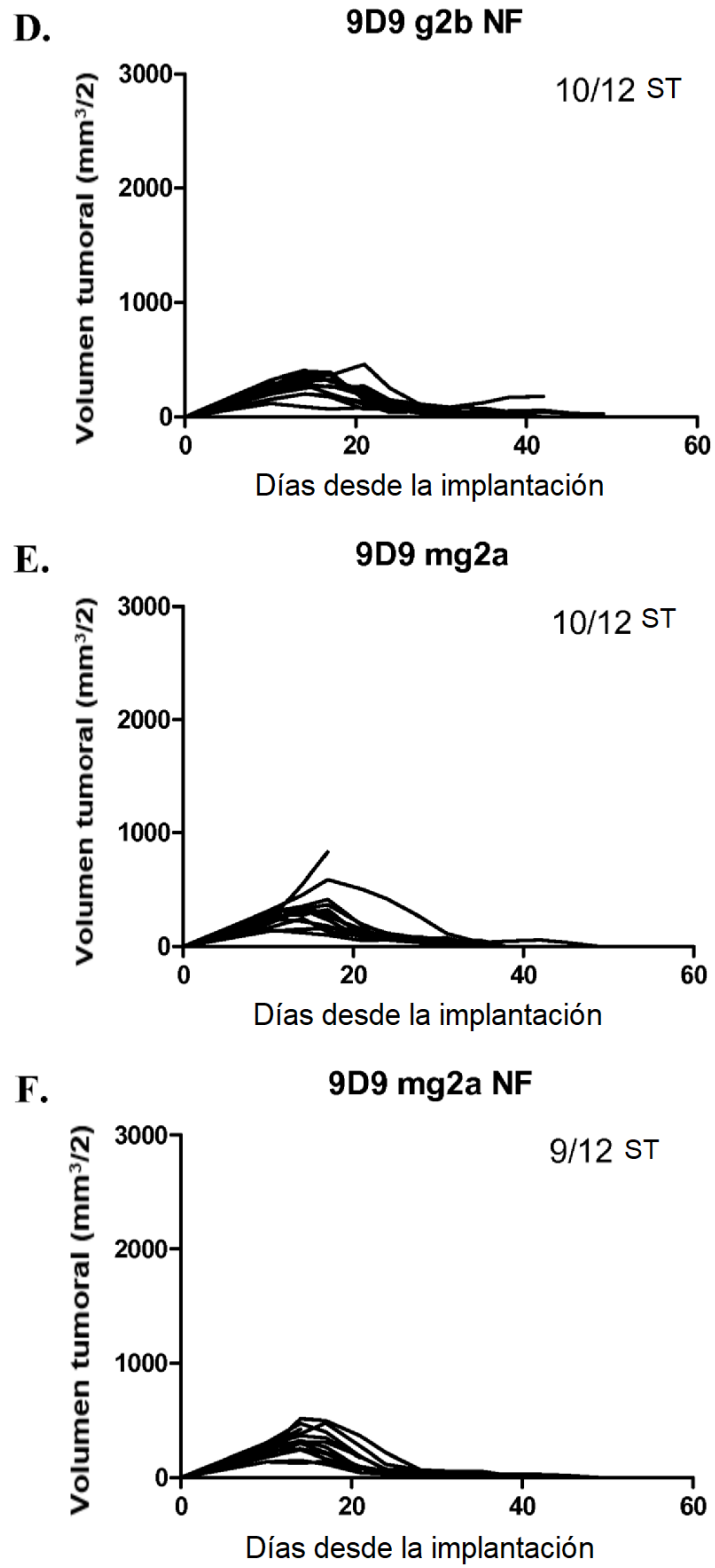
FIGS. 25A y B



FIGS. 26A-C

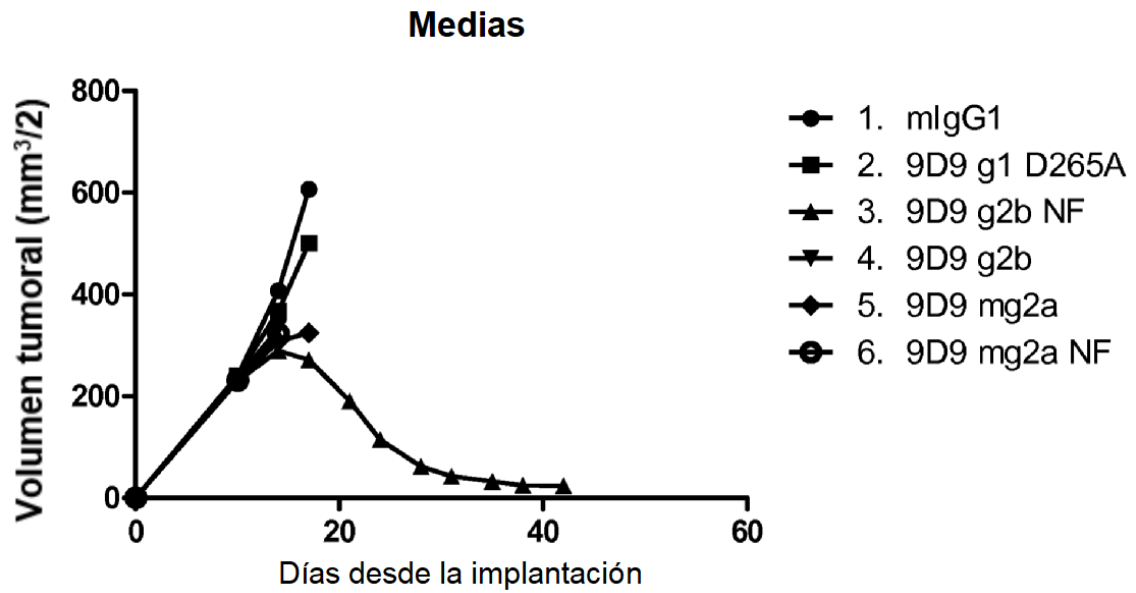


FIGS. 26D-F

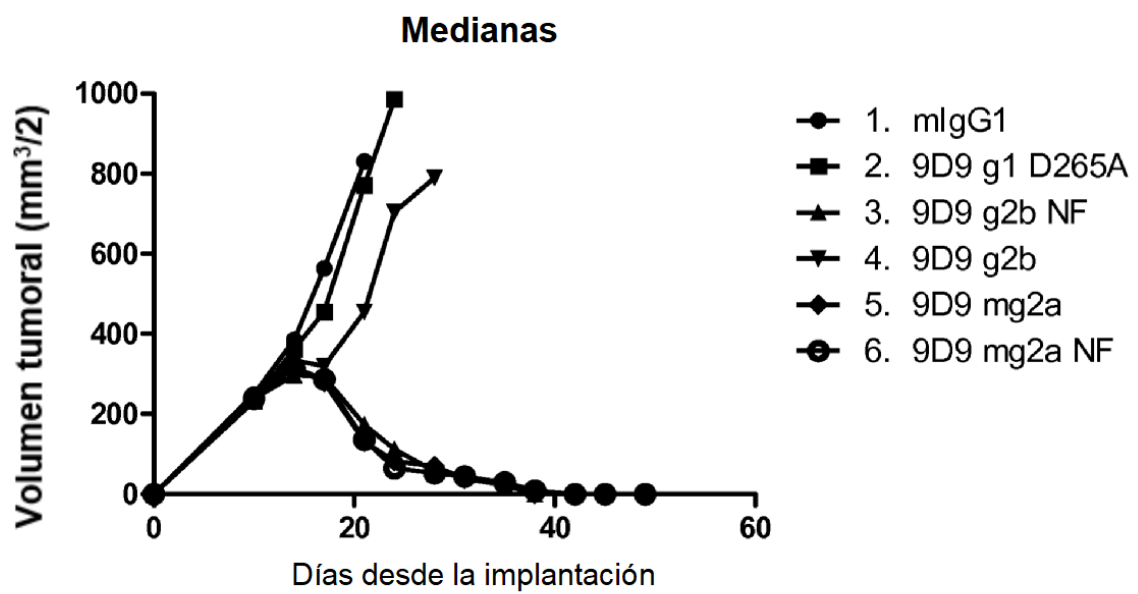


FIGS. 27A y B

A.

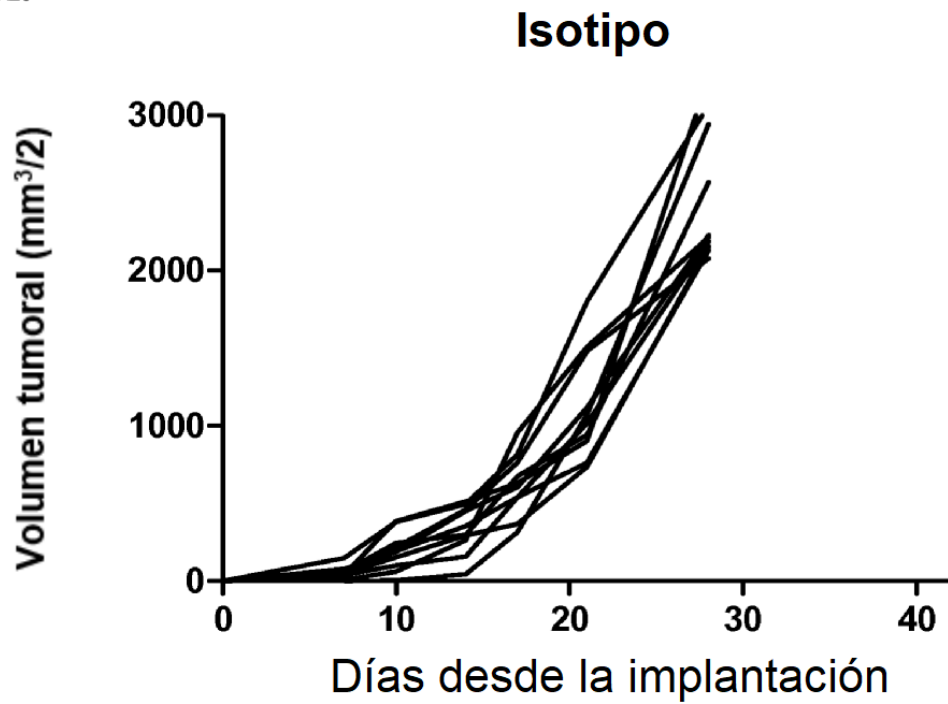


B.

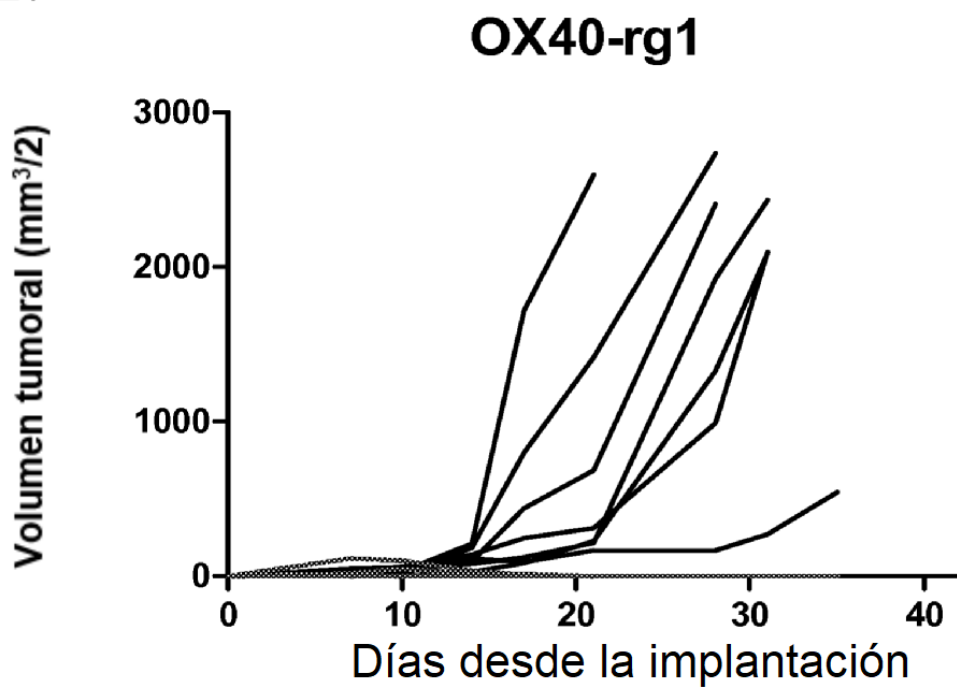


FIGS. 28A y B

A.

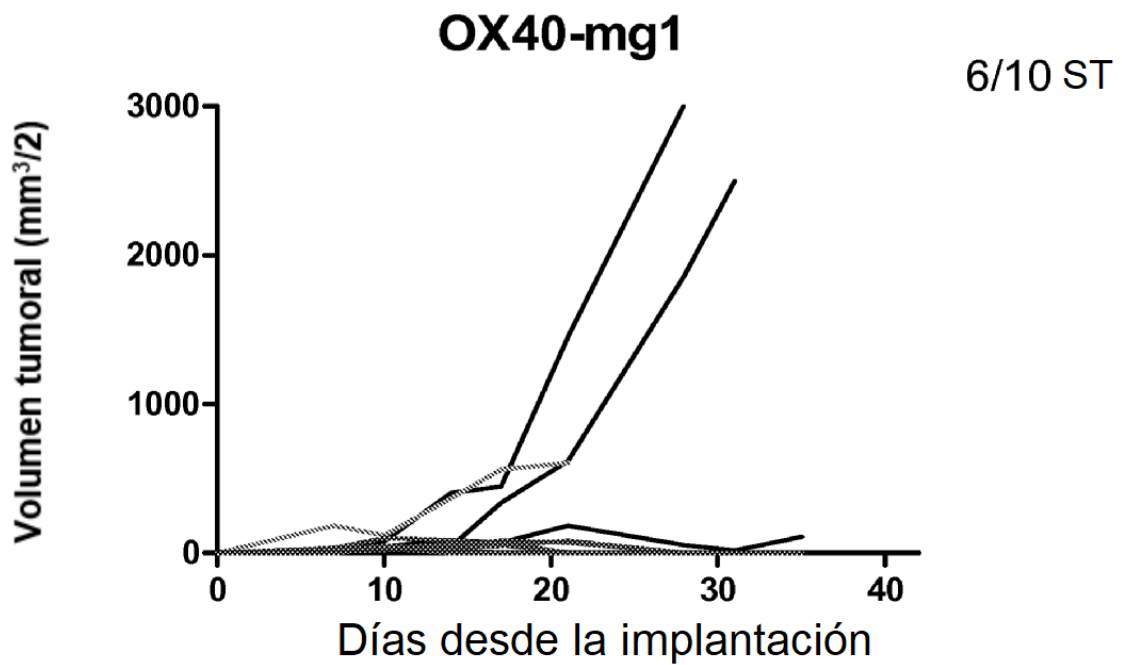


B.

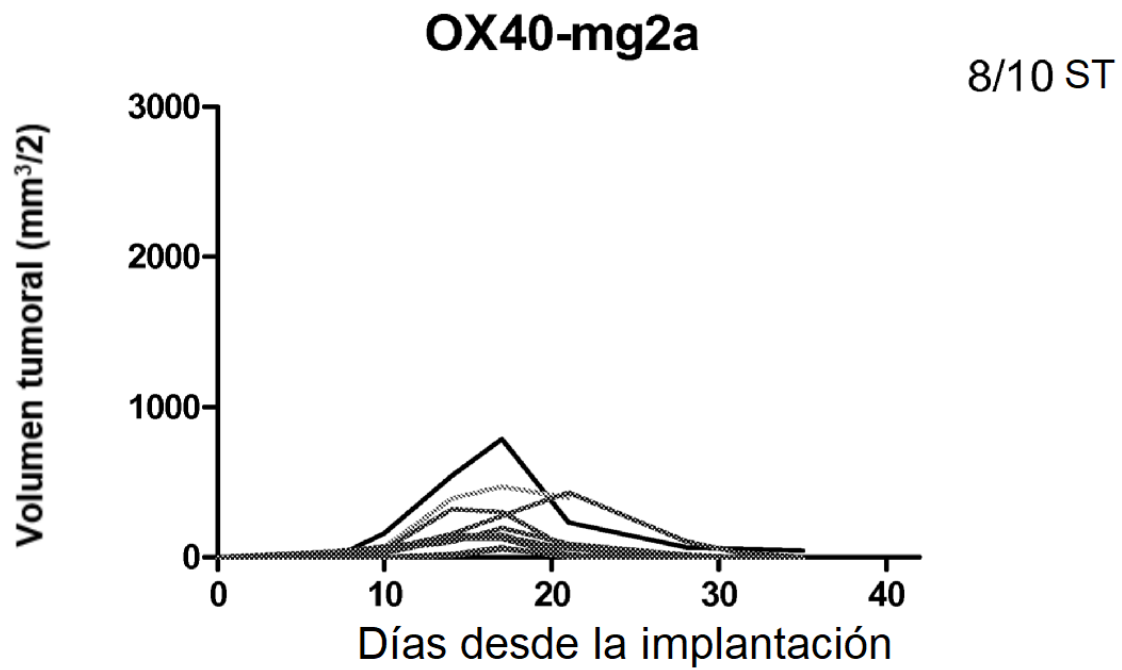


FIGS. 28C y D

C.



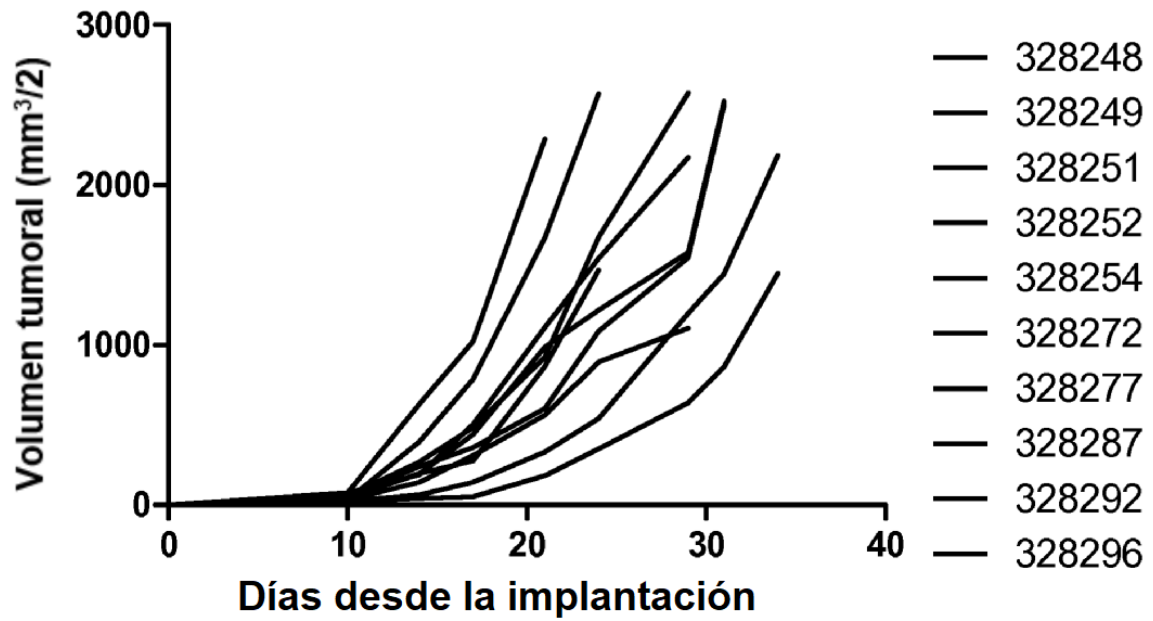
D.



FIGS. 29A y B

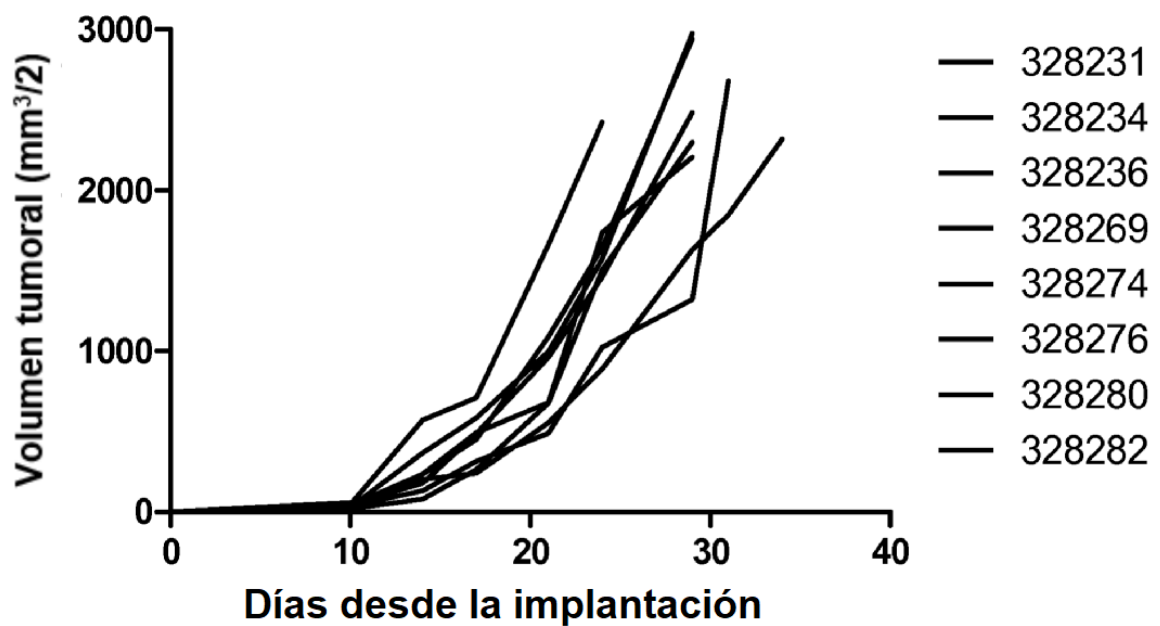
A.

Isotipo



B.

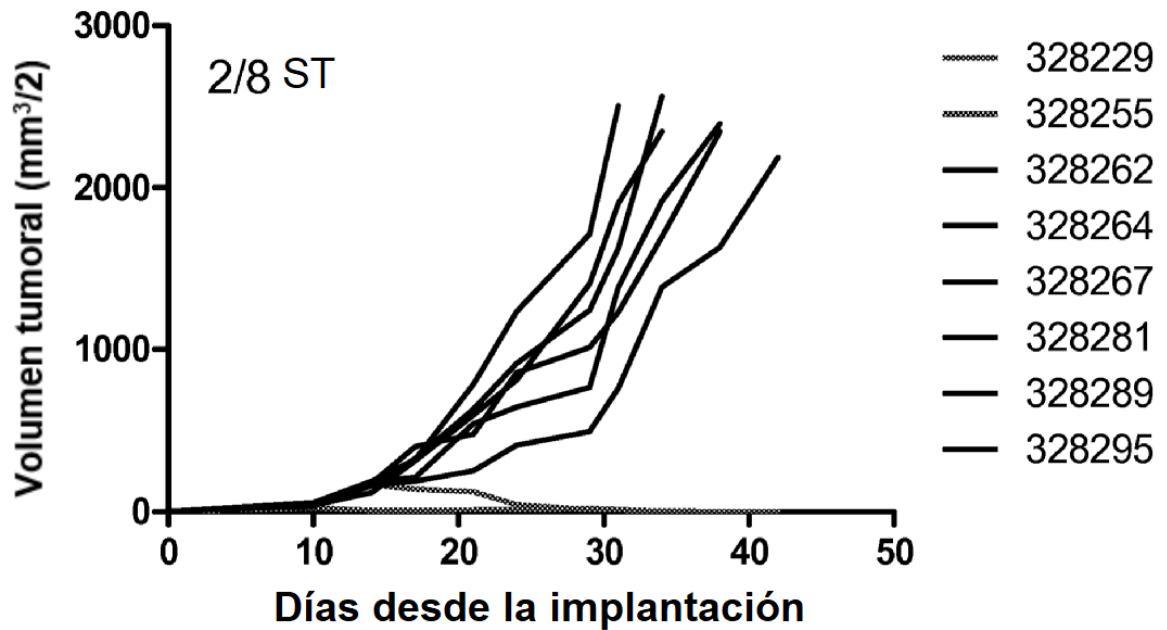
OX-40-g1D265A



FIGS. 29C y D

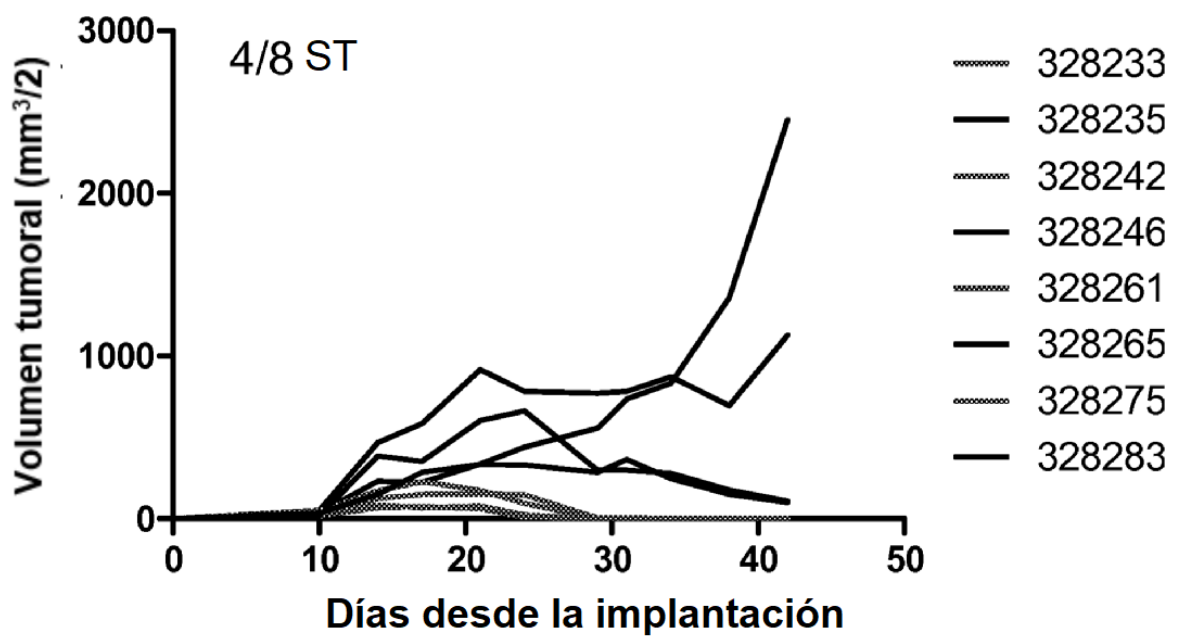
C.

OX-40-g1



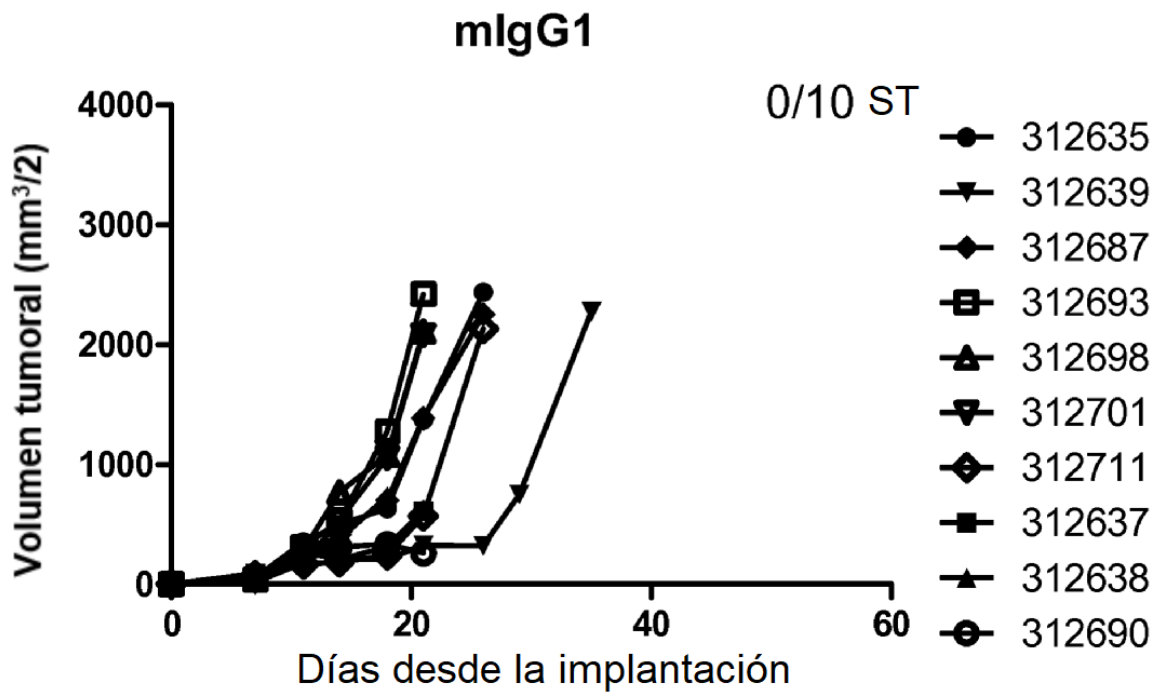
D.

OX-40-g2a

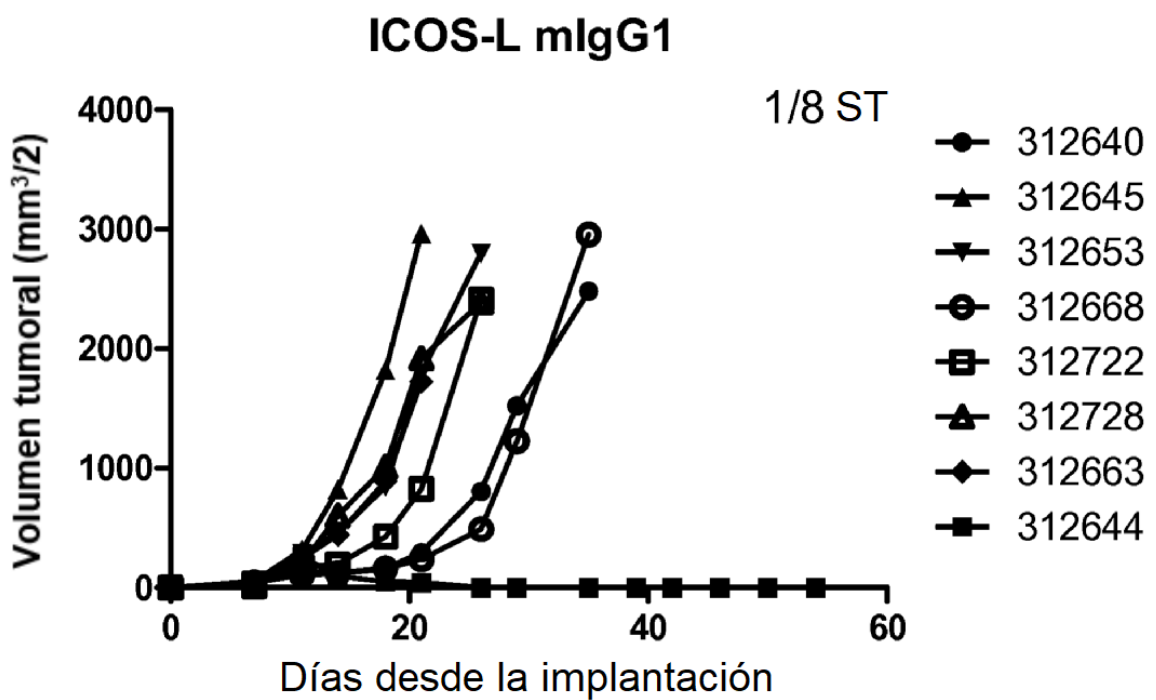


FIGS. 30A Y B

A.

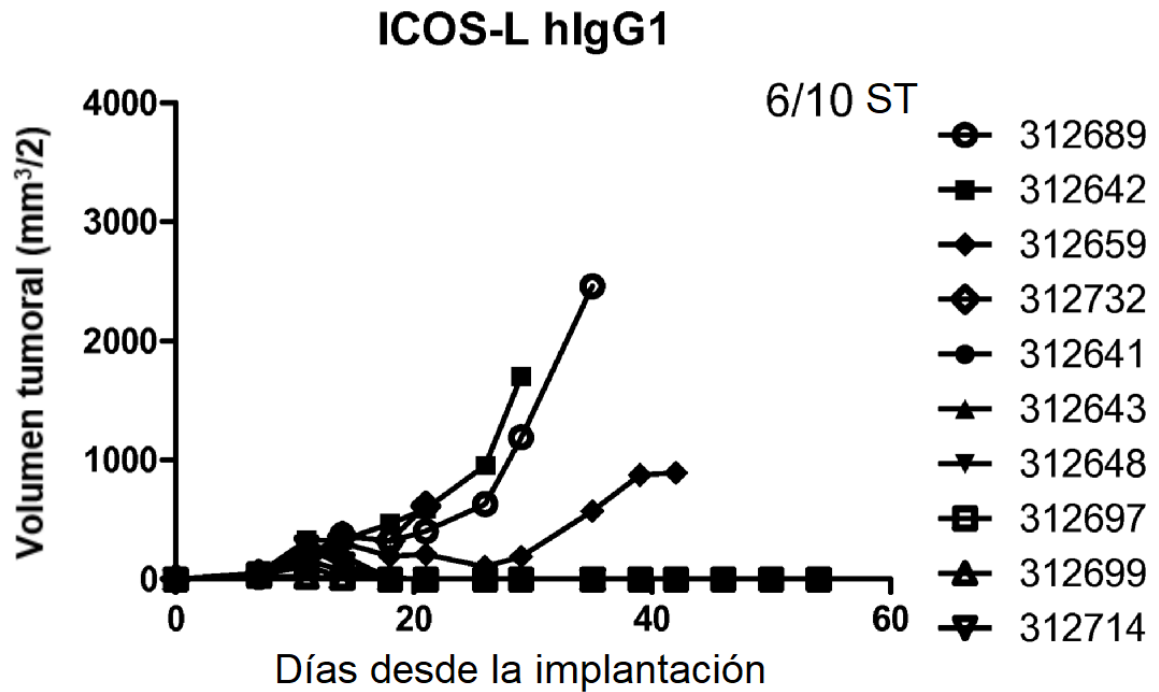


B.

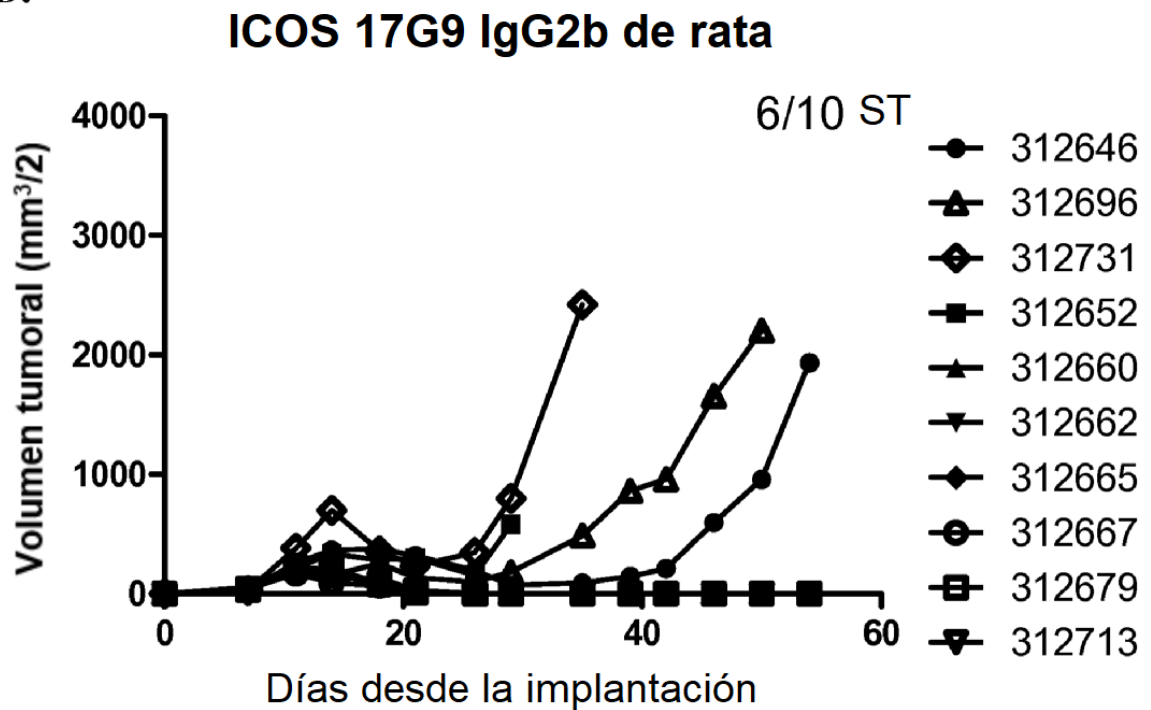


FIGS. 30C y D

C.

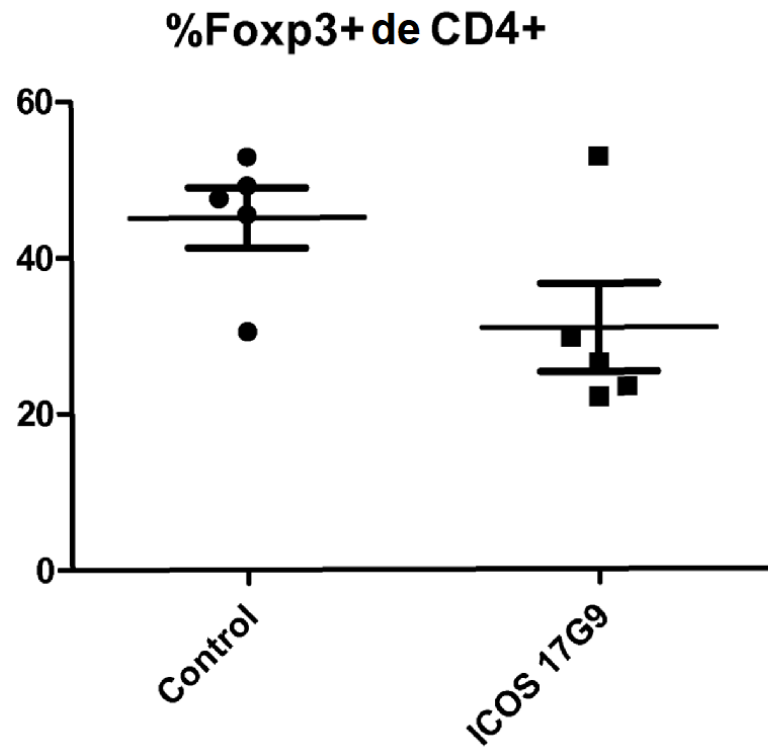


D.

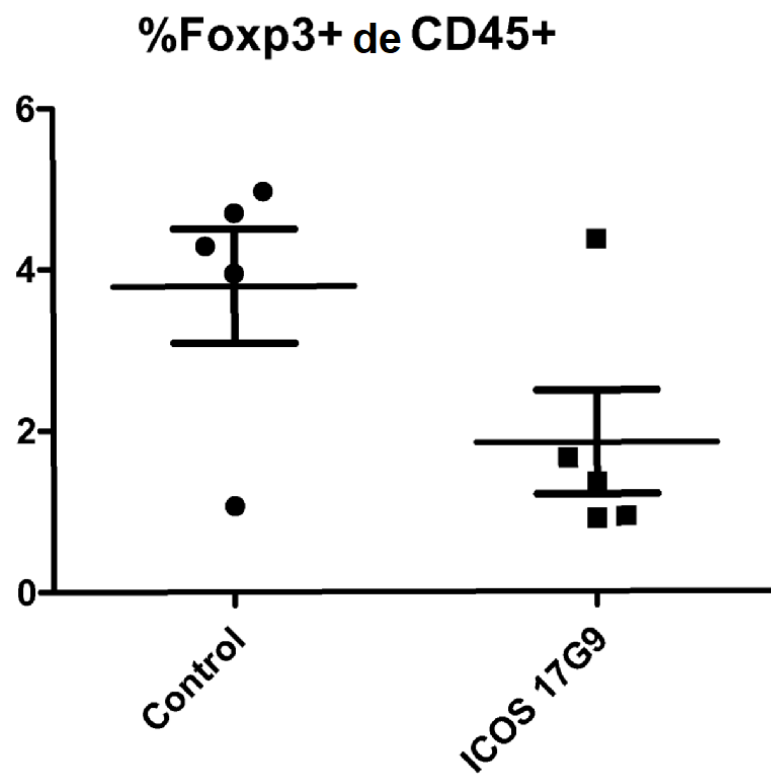


FIGS. 31A y B

A.

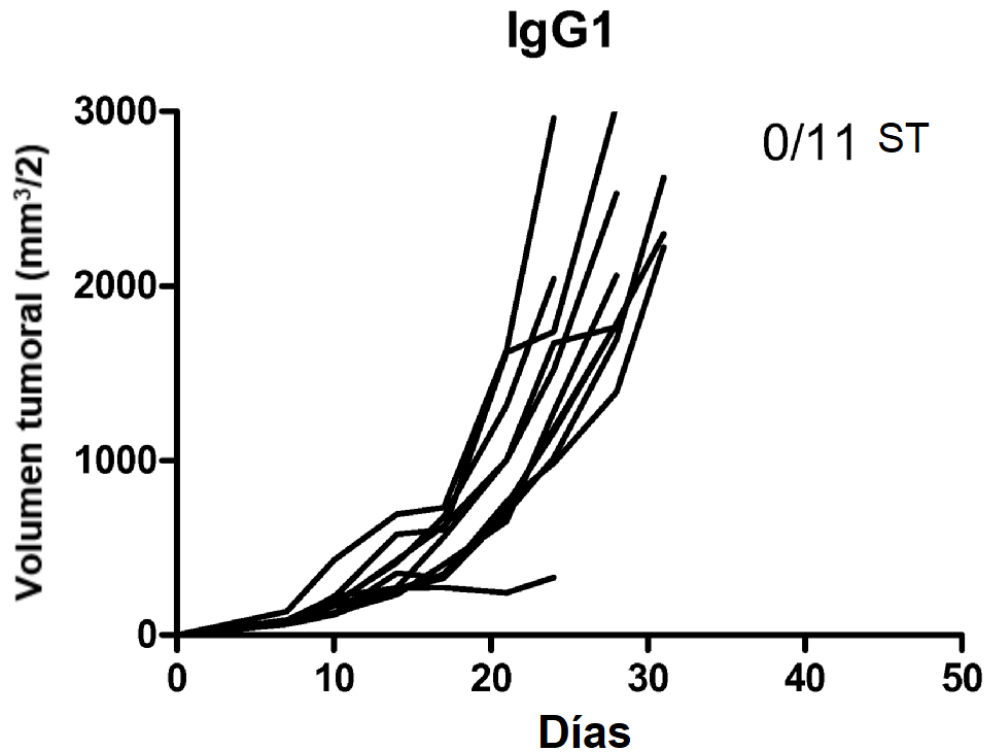


B.

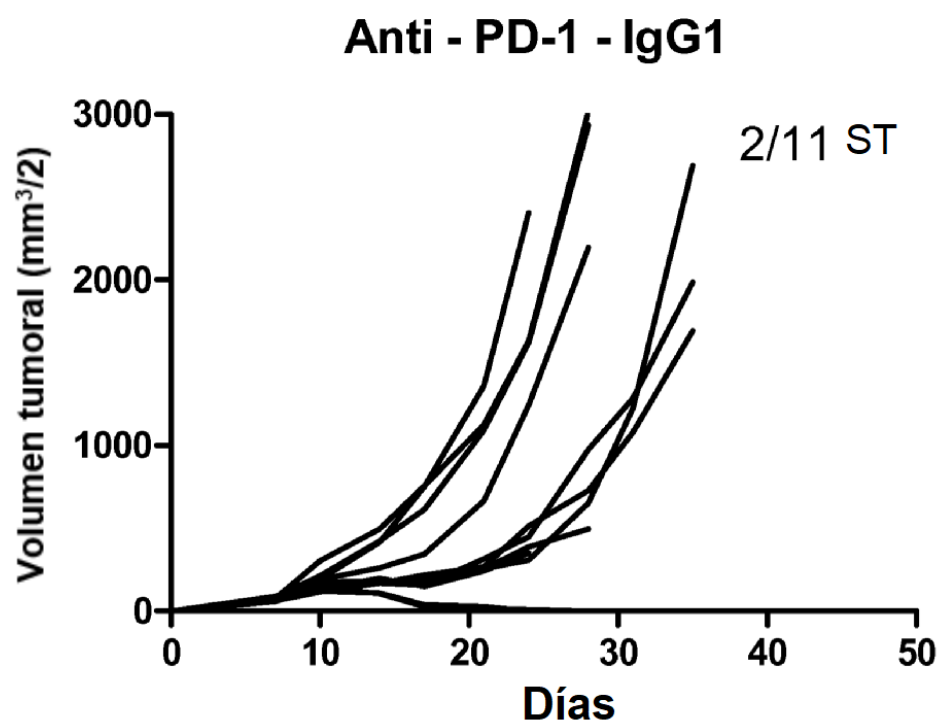


FIGS. 32A y B

A.



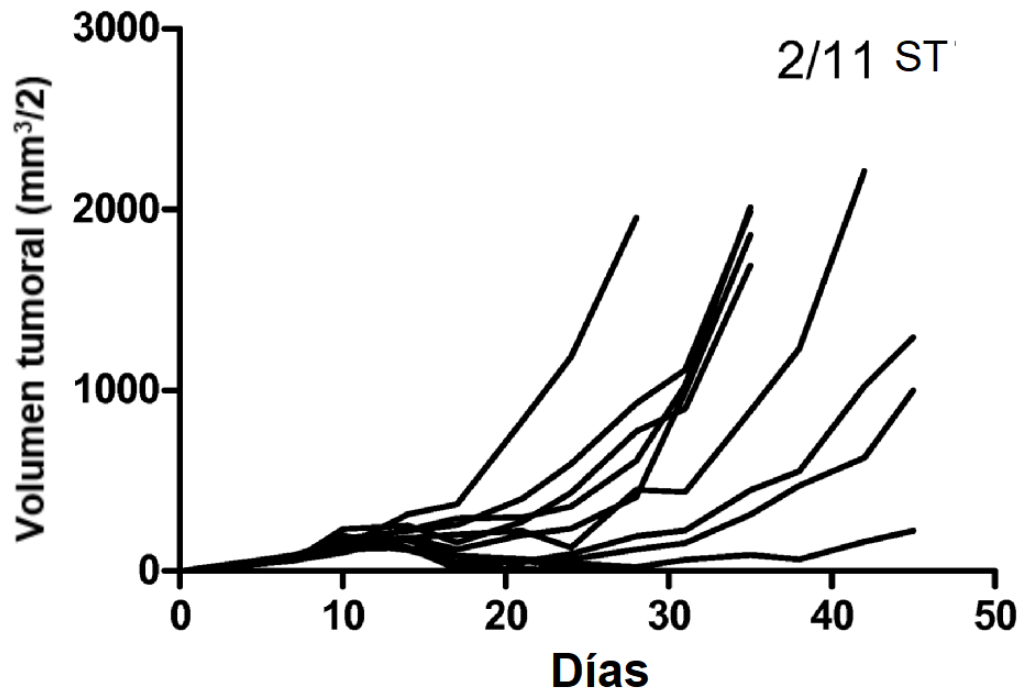
B.



FIGS. 32C y D

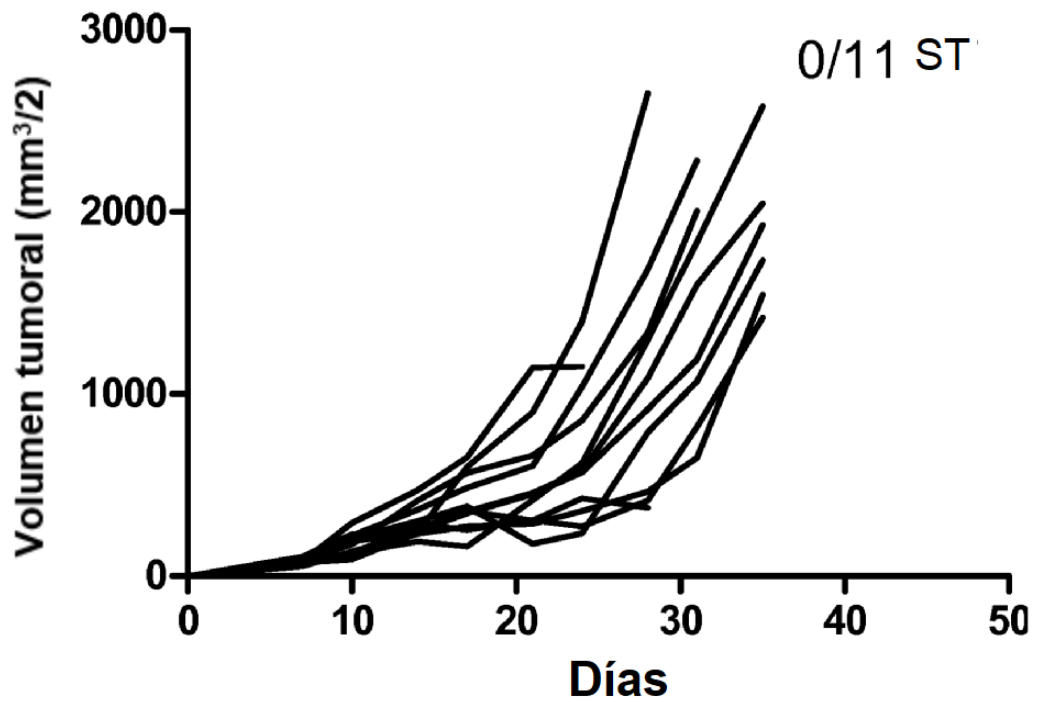
C.

Anti - PD-1 - IgG1 D265A



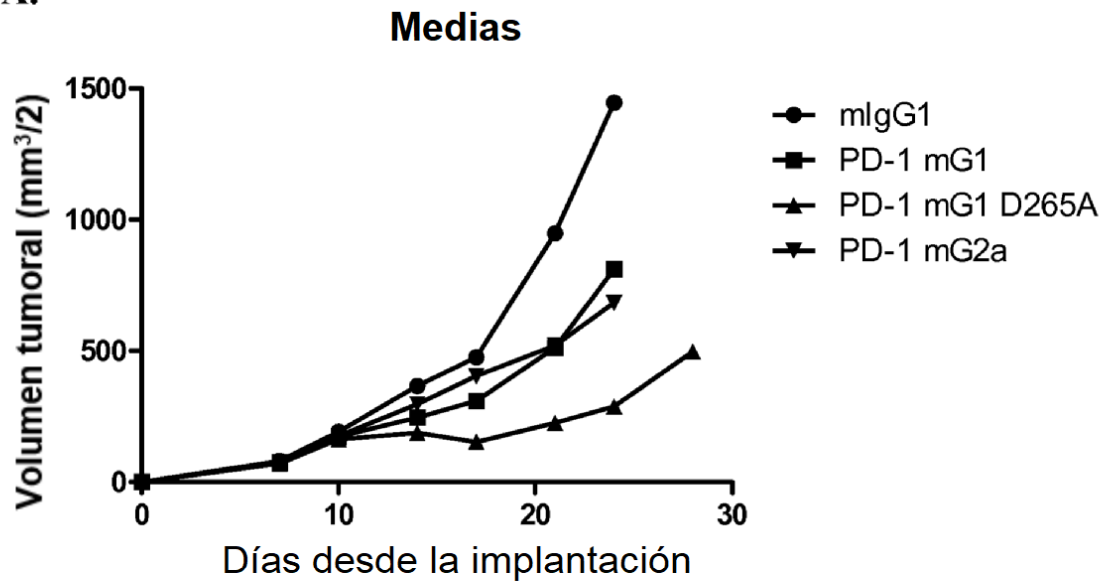
D.

Anti - PD-1 - IgG2a

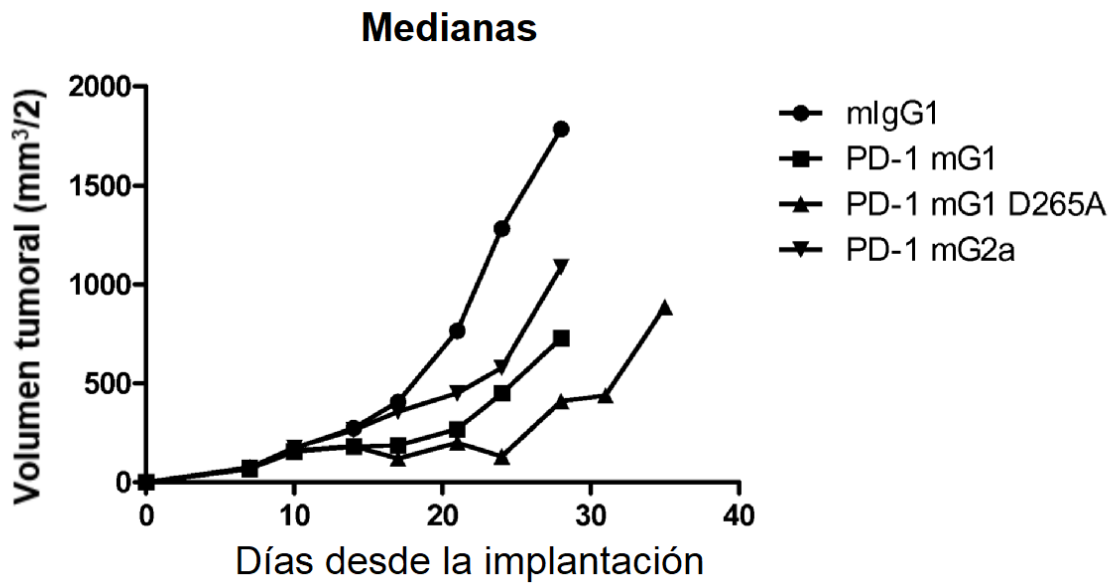


FIGS. 33A y B

A.



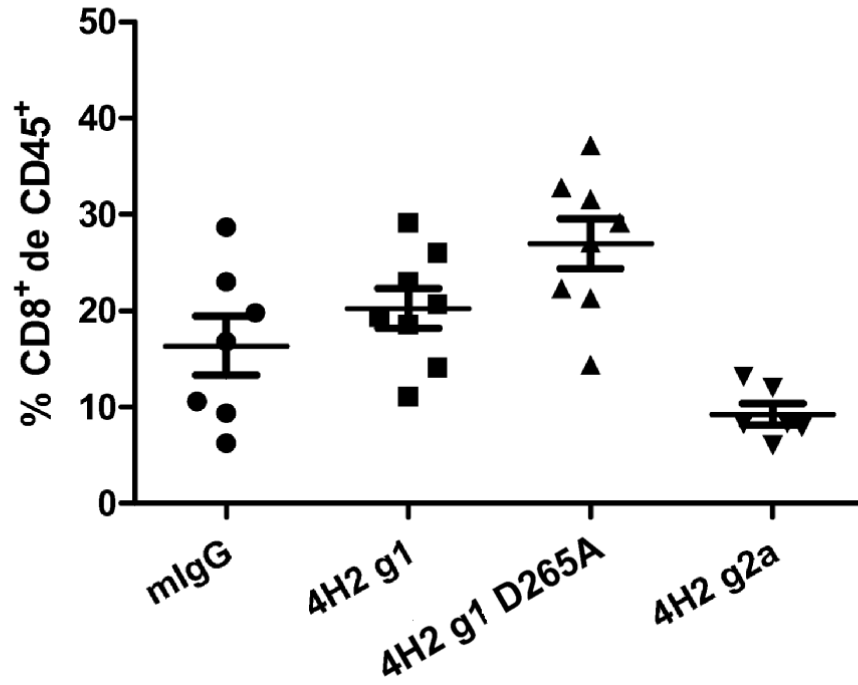
B.



FIGS. 34A y B

A.

Linfocitos T CD8



B.

Linfocitos T CD4 efectores

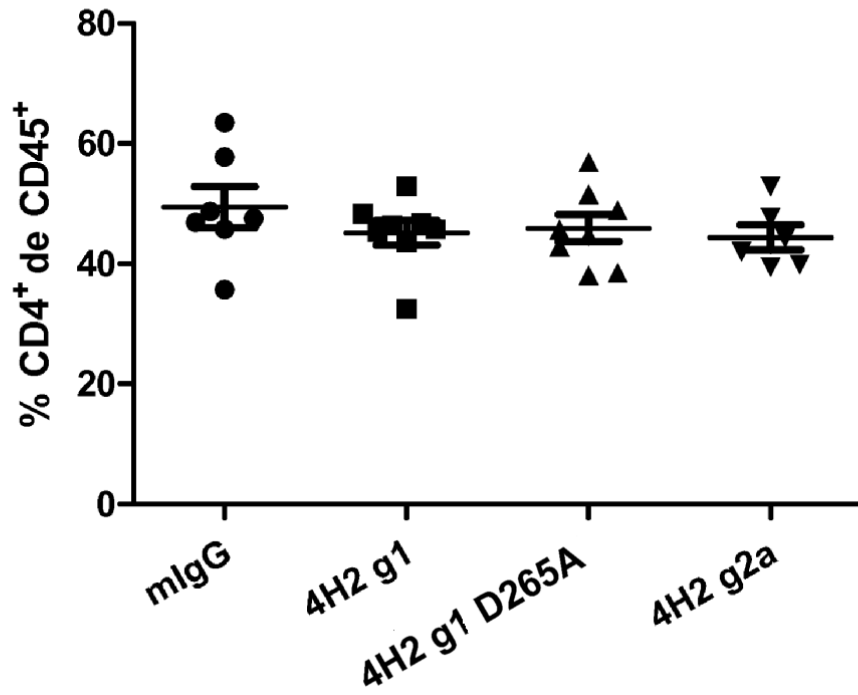
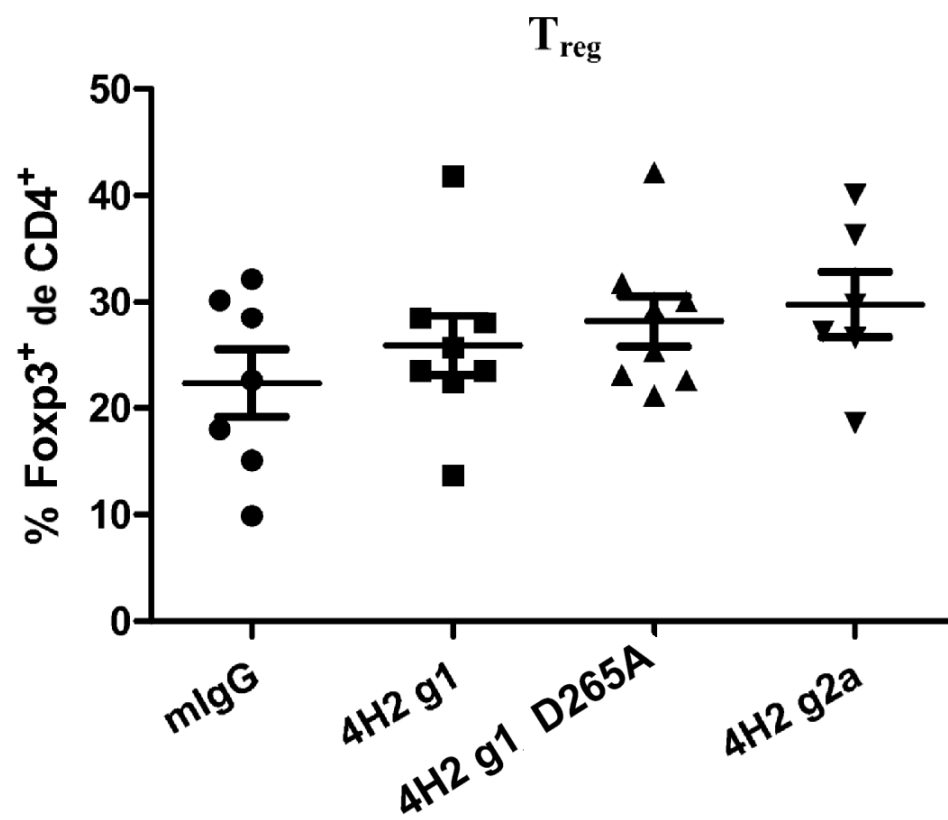


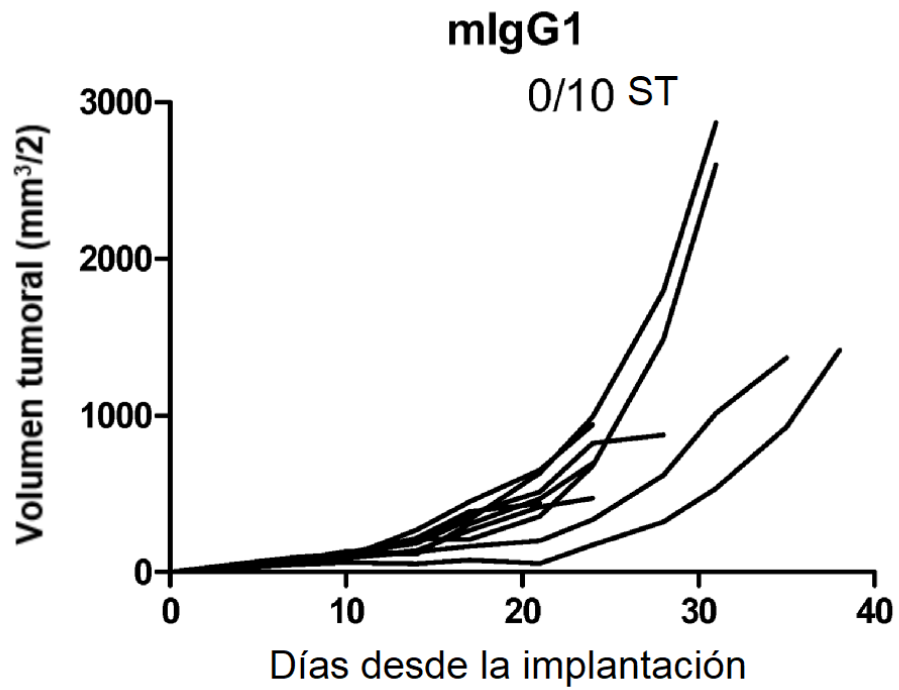
FIG. 34C

C.

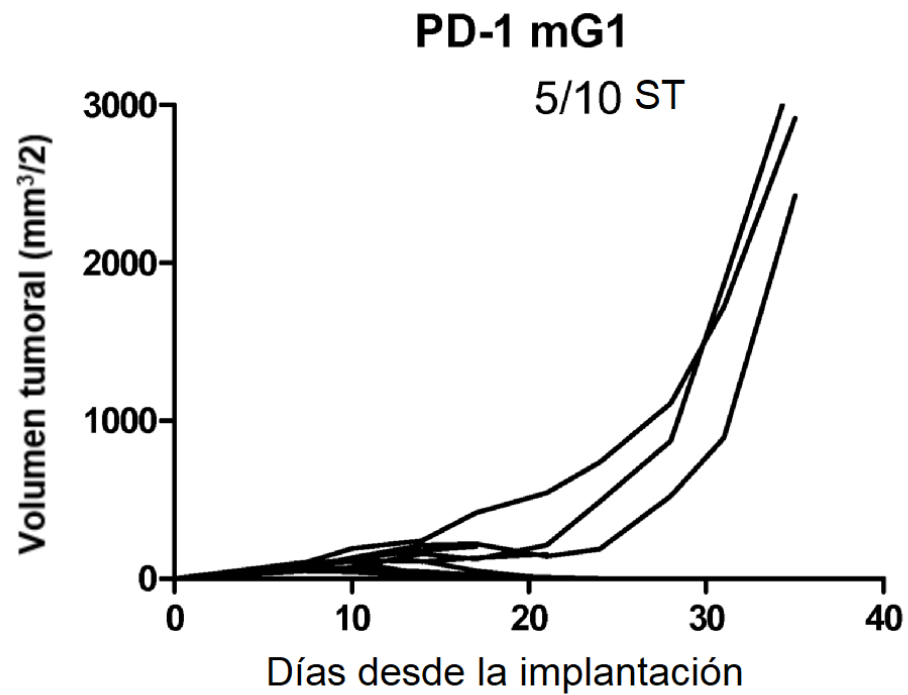


FIGS. 35A y B

A.

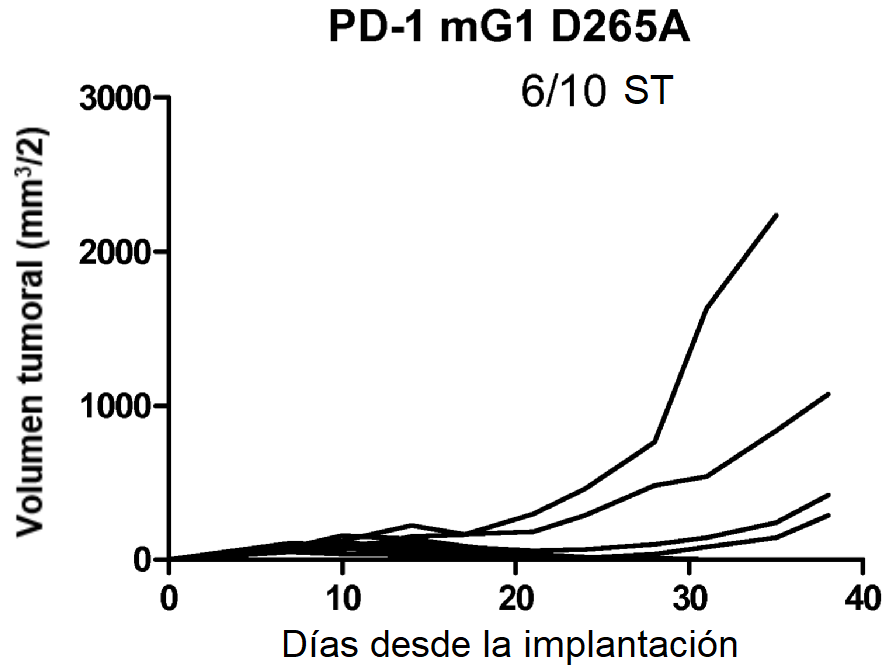


B.

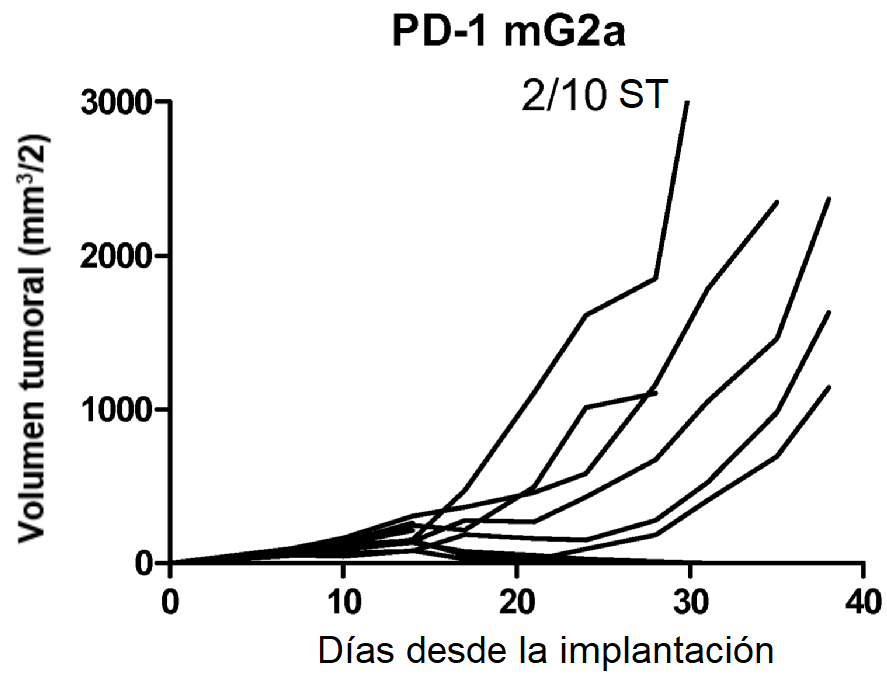


FIGS. 35C y D

C.

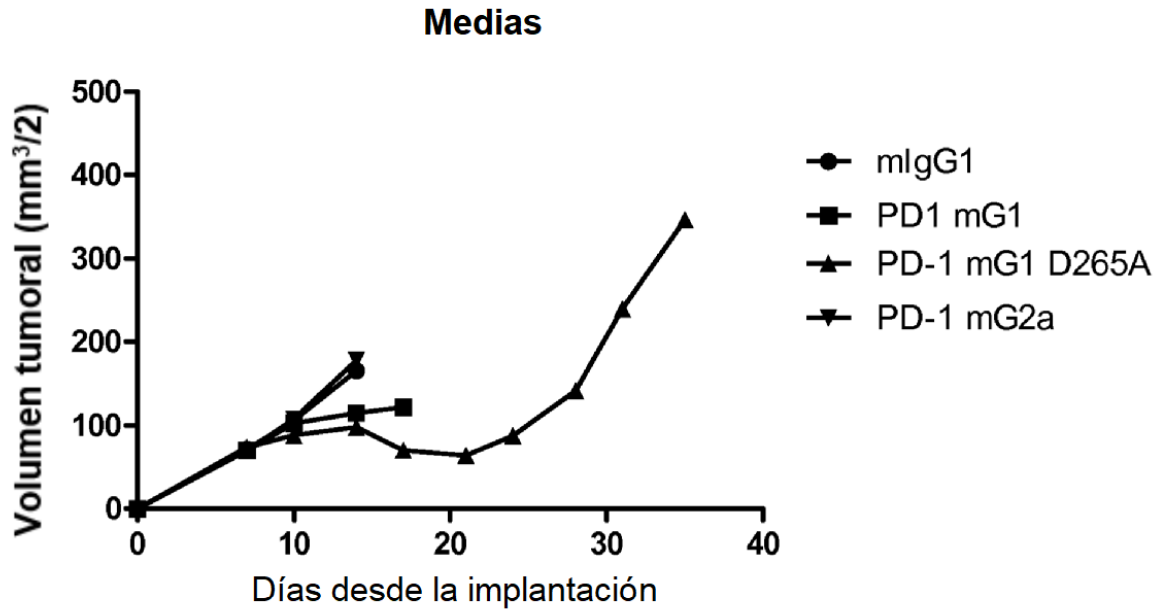


D.



FIGS. 36A y B

A.



B.

