



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 308 857**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 14/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99965991 .5**
96 Fecha de presentación : **03.12.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1137436**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.10.2001**

54 Título: **Estimulación de células T contra autoantígenos mediante el uso de agentes bloqueadores de CTLA-4.**

30 Prioridad: **03.12.1998 US 110761 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

73 Titular/es:
**The Regents of the University of California
Office of Technology Licensing, Suite 510
2150 Shattuck Avenue
Berkeley, California 94720-1620, US**

72 Inventor/es: **Allison, James, P.;**
Hurwitz, Arthur, A. y
Vanelsas, Andrea

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 308 857 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

Estimulación de células T contra autoantígenos mediante el uso de agentes bloqueadores de CTLA-4.

5 **Introducción**

La puesta en práctica de la inmunoterapia es un objetivo altamente deseado en el tratamiento de enfermedades de seres humanos. Promete una especificidad de acción que rara vez se encuentra con el uso de fármacos convencionales. La base de la inmunoterapia es la manipulación de la respuesta inmune, particularmente las respuestas de las células T. Las células T poseen complejos y sutiles sistemas para el control de sus interacciones, utilizando numerosos receptores y factores solubles para el proceso. El efecto que puede tener cualquier señal particular sobre la respuesta inmune puede variar según los factores, receptores y contrarceptores que intervienen.

La activación total de las células T requiere no sólo una señal específica de antígeno, a través del receptor de antígeno de la célula T (TCR), sino también otras señales a través de moléculas de superficie coestimuladoras tales como CD28. Los ligandos para CD28 son las proteínas B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), que se expresan en células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas, células B activadas o monocitos. La estimulación de células T por el antígeno en ausencia de dichas señales coestimuladoras puede dar por resultado una estimulación de células T no productiva o tolerancia a células T. La falta de expresión de B7 por las células tumorales, por ejemplo, es un factor que puede contribuir a su falla en la generación de de respuestas inmunes productivas.

Las vías para regular hacia abajo las respuestas son tan importantes como las requeridas para la activación. La educación tímica conducente a la tolerancia periférica a células T es un mecanismo para la prevención de una respuesta inmune contra un antígeno particular. También se conocen otros mecanismos, tales como la secreción de citoquinas supresoras. Más recientemente, se identificó CTLA-4 como un segundo contrarceptor de células T para B7, y ahora se ha demostrado que juega un papel esencial en la atenuación de las respuestas de células T. Thompson y Allison, *Immunity* 7:445-450 (1997).

Los tumores no inmunogénicos o poco inmunogénicos presentan desafíos especiales. Los antígenos ausentes o inefectivos por alteración o los antígenos virales impiden la activación de una respuesta de células T específica de antígeno, lo cual permite que el tumor crezca sin impedimentos. Las estrategias para montar una respuesta inmune citotóxica contra estos tipos de células tumores también se complican debido a la tolerancia inmune natural del organismo contra los antígenos propios que están presentes en células normales y tumorales. En consecuencia, puede ser necesario superar la tolerancia inmune a fin de montar una respuesta efectiva de células T citotóxicas. Sin embargo, hasta la fecha aún resta lograr un método seguro y efectivo para romper la tolerancia inmune y estimular las células T autorreactivas.

Sería ventajoso si, en el tratamiento de infecciones y tumores, se pudiera activar una fuerte respuesta inmune celular mediante la manipulación de receptores que intervienen en la coestimulación. Otra ventaja se lograría si se pudiera romper la tolerancia inmune para un autoantígeno deseado.

El uso de proteína B7 para mediar la inmunidad antitumor se describe en Chen *et al.* (1992) *Cell* 71:1093-1102 y Townsend y Allison (1993) *Science* 259:368. Schwartz (1992) *Cell* 71:1065 revisa el papel de CD28, CTLA-4 y B7 en la producción de IL-2 y la inmunoterapia. Harding *et al.* (1994) *Nature* 356:607-609 demostraron que las señales mediadas por CD28 coestimula las células T murinas e impide la inducción de anergia en los clones de células T.

CTLA-4 es una molécula de superficie de las células T que se identificó originalmente por análisis diferencial de una biblioteca cDNA murina de células T, Brunet *et al.* (1987) *Nature* 328:267-270. El papel de CTLA-4 como segunda receptor para B7 es analizado por Linsley *et al.* (1991) *J. Exp. Med.* 174:561-569. Freeman *et al.* (1993) *Science* 262:907-909 estudia CTLA-4 en ratones deficientes en B7. Los ligandos para CTLA-4 se describen en Lenschow *et al.* (1993) *P.N.A.S.* 90:11054-11058.

Linsley *et al.* (1992) *Science* 257:792-795 describen la inmunosupresión *in vivo* por una forma soluble de CTLA-4. Lenschow *et al.* (1992) *Science* 257:789-792 analiza la supervivencia a largo plazo de injertos de islotes pancreáticos inducida por CTLA-4. Se ha sugerido en Walunas *et al.* (1994) *Immunity* 1:405-413, que CTLA-4 puede actuar como regulador negativo de la activación de células T. Thompson y Allison, *Immunity* 7:445-450 (1997) revisa los datos acumulados que sugieren que CTLA-4 sirve para atenuar las respuestas de células T.

60 **Sumario de la invención**

La invención se refiere a composiciones para estimular células T a responder a autoantígenos a través de un bloqueo de las señales CTLA-4. Los agentes bloqueadores de CTLA-4 se combinan con preparaciones de autoantígenos y opcionalmente otros agentes estimuladores de respuesta inmune en estrategias de coestimulación para romper la tolerancia inmune y estimular un aumento de la respuesta de las células T contra el autoantígeno. Este aumento de la respuesta es útil para el tratamiento de tumores no inmunogénicos y poco inmunogénicos, así como otras condiciones médicas que requieren ablación selectiva de tejidos.

La invención provee el uso de un anticuerpo anti-CTLA-4 o su fragmento y una preparación de autoantígeno para la fabricación de un medicamento para tratar metástasis establecidas.

En una forma de realización de la invención, se combina un agente bloqueador de CTLA-4 con una preparación de autoantígeno que comprende una vacuna de células tumorales para el tumor de interés. En una forma de realización particularmente preferida, la vacuna de células tumorales comprende células tumorales irradiadas transducidas para expresar citoquinas tales como factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), a fin de mejorar el cebado cruzado de células T por las células presentadoras de antígeno (APC). Alternativamente el autoantígeno purificado o una mezcla de autoantígenos se pueden combinar con agentes bloqueadores de CTLA-4, ya sea solos o en combinación con otros agente estimulantes de respuesta inmune tales como coadyuvantes o células dendríticas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A es un gráfico que ilustra el crecimiento *in vivo* de la línea de células tumorales V51Blim10 en presencia o ausencia de anticuerpos dirigidos contra CTLA-4 o CD28. La Figura 1B es un gráfico que ilustra el tamaño promedio de tumor en ratones inyectados con 2×10^6 células V51Blim10 y anticuerpos. La Figure 1C es un gráfico que ilustra el tamaño del crecimiento de tumores individuales en ratones inyectados con células V51Blim10.

La Figura 2 es un gráfico que muestra el crecimiento *in vivo* de tumores B7-51BLim10 en presencia o ausencia de anticuerpos dirigidos contra CTLA-4 o CD28. La Figura 3 muestra el rechazo de células de carcinoma de colon de tipo salvaje por parte de ratones tratados previamente con células V51BLim10 y anticuerpo anti-CTLA-4.

La Figura 4 muestra el crecimiento de tumores establecidos después del tratamiento con anticuerpo anti-CTLA-4.

La Figura 5 muestra el crecimiento de fibrosarcoma SAIN murino en ausencia o presencia de anticuerpos anti-CTLA-4.

Las Figuras 6A a 6E ilustran el efecto coadyuvante de anticuerpos anti-CTLA-4 en la respuesta de células T a antígenos peptídicos.

Las Figuras 7A a 7F ilustran el efecto del bloqueo de CTLA-4 sobre el cambio de clase.

La Figura 8 muestra el efecto de retrasar el bloqueo de CTLA-4 sobre un fibrosarcoma.

La Figura 9 muestra el efecto de tratar un carcinoma de mama con anti-CTLA-4 solo, células transducidas GM-CSF solas o una de sus combinaciones.

Las Figuras 10A y 10B demuestran el efecto del bloqueo retrasado de CTLA-4 sobre un carcinoma renal.

La Figura 11 muestra el efecto del tratamiento por bloqueo de CTLA-4 solo o en combinación con inmunización con células tumorales irradiadas B 16 sobre tumores B16.

La Figura 12 muestra el efecto de combinar el bloqueo de CTLA-4 con células irradiadas B16 y/o tratamiento con citoquinas.

Las Figuras 13A y 13B muestran el efecto del tratamiento por bloqueo de CTLA-4 solo o en combinación con células irradiadas B16-BL6 transducidas con GM-CSF en tumores B16-BL6.

La Figura 14 demuestra producción de IFN γ por parte de células T específicas para B 16 inducidas *in vivo*.

La Figura 15 muestra la tasa de supervivencia de ratones portadores de metástasis de pulmón B 16-F 10 cuando son tratados con bloqueo de CTLA-4 y vacuna F 10/GM.

La Figura 16A muestra que ratones TRAMP tratados con vacunas TRAMP-C y anti-CTLA-4 tienen menor incidencia de tumores que los animales tratados con control.

La Figura 16B muestra la incidencia de tumores como función de la edad en el momento del tratamiento, lo cual demuestra una significativa reducción de la incidencia de tumores en ratones tratados a 14 semanas de edad, pero no en ratones tratados a 16 semanas de edad.

La Figura 17A demuestra la reducción de severidad de lesiones prostáticas en ratones TRAMP tratados con vacunas TRAMP-C y anti-CTLA-4.

La Figura 17B muestra que los ratones TRAMP tratados con GMTRAMP-C1/C2 y anti-CTLA-4 tenían una reducción del grado de tumor cuando se trataron a las 14 semanas de edad, pero no cuando se trataban a las 16 semanas.

La Figura 18 muestra la producción de IFN- γ tras la estimulación peptídico *in vivo*.

ES 2 308 857 T3

La Figura 19 muestra el crecimiento de tumor de melanoma B16 en ratones inmunizados con péptido con y sin bloqueo de CTLA-4.

Referencias de base de datos para secuencias de nucleótidos y aminoácidos

5 La secuencia completa de cADN de CTLA-4 humano tiene el número de acceso de Genbank L15006. La región de los aminoácidos 1-37 es el péptido guía; 38-161 es el dominio símil V extracelular; 162-187 es el dominio extracelular; y 188-223 es el dominio citoplasmático. Se han informado variantes de la secuencia de nucleótidos, incluso una transición G a A en la posición 49, una transición C a T en la posición 272, y una transición A a G en la posición 439.
10 La secuencia completa de ADN de CTLA-4 murino tiene el número de acceso EMBL X05719 (Brunet *et al.* (1987) Nature 328:267-270). La región de los aminoácidos 1-35 es el péptido guía.

15 La secuencia completa de ADN de B7-1 humano (CD80) tiene el número de acceso Genbank X60958; el número de acceso para la secuencia murina es X60958; el número de acceso para la secuencia de rata es U05593. La secuencia completa de cADN de B7-2 humano (CD86) tiene el número de acceso Genbank L25259; el número de acceso para la secuencia murina es L25606.

20 Los genes codificadores de CD28 han sido extensamente caracterizados. La secuencia de mRNA de pollo tiene el número de acceso Genbank X67915. La secuencia de mRNA de rata tiene el número de acceso Genbank X55288. La secuencia de mRNA humana tiene el número de acceso Genbank J02988. La secuencia de mRNA de ratón tiene el número de acceso Genbank M34536.

Descripción detallada de la invención

25 La invención se refiere a composiciones para estimular una respuesta de células T a autoantígenos. Se emplean agentes bloqueadores de CTLA-4 a saber un anticuerpo anti-CLA-4 o su fragmento, en las estrategias de coestimulación para activar las células T autorreactivas existentes y/o las células T no expuestas T para que respondan a autoantígenos, para reducir selectivamente la tolerancia inmune. Una preparación de autoantígeno se administra con los agentes bloqueadores objeto para ayudar a estimular una respuesta periférica autorreactiva de células T. Las prepara-
30 raciones de autoantígeno preferidas incluyen proteína purificada, lisados de células tumorales, o vacunas tumorales que comprende células tumorales irradiadas. De particular interés son las vacunas de tumores transducidos con genes de interés, tales como genes codificadores de citoquinas que estimulan las células presentadoras de antígeno, por ejemplo factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), o factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF). Otras estrategias adicionales y alternativas de coestimulación se describen con mayor detalle en la presente. El objeto de la invención es útil para el tratamiento
35 tumores poco inmunogénicos y no inmunogénicos, así como técnicas de ablación de tejidos en general.

40 La terapia libera células T de las señales inhibitorias mediadas por CTLA-4. Se cree que la intervención de CTLA-4 regula hacia abajo las respuestas de células T al elevar el umbral de las señales necesarias para la efectiva activación de células T, o también puede jugar un papel importante en la terminación de respuestas de células T en marcha. La respuesta de células T al antígeno y las señales coestimuladoras de CD28 se regulan así hacia arriba en presencia de agentes bloqueadores de CTLA-4. Cuando se emplea en una estrategia adecuada de coestimulación, el bloqueo de CTLA-4 estimula las células T autorreactivas de baja avidéz y/o las células T no expuestas para responder al autoantígeno. Los métodos objeto no promueven una proliferación generalizada de células T no estimuladas.

45 De acuerdo con la invención, un agente bloqueador CTLA-4 objeto, es decir un anticuerpo anti-CLA-4 o su fragmento, se usa para la fabricación de un medicamento para tratar metástasis establecidas.

50 Los medicamentos son útiles cuando hay una respuesta mediada por células T inadecuada ante un estímulo antigénico.

55 Las situaciones caracterizadas por una respuesta deficiente de células T huésped al antígeno incluyen los tumores. La administración de los bloqueadores CTLA-4 objeto a dichos huéspedes cambia específicamente el fenotipo de las células T activadas, lo cual da por resultado un incremento de la respuesta a la activación mediada por antígeno. El tratamiento de primates, más particularmente seres humanos es de interés, pero otros mamíferos también se pueden beneficiar del tratamiento, particularmente animales domésticos tales como equinos, bovinos, ovinos, felinos, caninos, murinos, lagomorfos, y similares.

60 La formulación se administra en una dosis efectiva para incrementar la respuesta de las células T a la estimulación antigénica. La respuesta de las células T activadas es afectada por el tratamiento objeto en mayor grado que las células T en reposo. La determinación de la respuesta de células T varía con la condición que se trata. Las medidas útiles de actividad de células T son la proliferación, la liberación de citoquinas, por ejemplo IL-2, IFNg, TNFa; la expresión en células T de marcadores tales como CD25 y CD69; y otras medidas de actividad de células T conocidas en la técnica.

65 *Selección y preparación de agentes bloqueadores de CTLA-4*

Los agentes bloqueadores de CTLA-4 son moléculas que se fijan específicamente al dominio extracelular de la proteína CTLA-4, y bloquean la fijación de CTLA-4 a sus cotrarreceptores, por ejemplo CD80, CD86, etc. Usualmente

ES 2 308 857 T3

la afinidad de unión por el agente bloqueador será de al menos aproximadamente 100 μ M. El agente bloqueador será sustancialmente no reactivo con moléculas relacionadas a CTLA-4, tales como CD28 y otros miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas. Moléculas tales como CD80 y CD86 en consecuencia están excluidas como agente bloqueadores. Además, los agentes bloqueadores no activan las señales CTLA-4. Convenientemente, esto se logra mediante el uso de moléculas fijadoras monovalentes o bivalentes. Los expertos en la técnica comprenderán que los siguientes análisis sobre reactividad cruzada y competencia entre diferentes moléculas pretende referirse a moléculas que tienen el mismo origen de especie, por ejemplo CTLA-4 humano fija CD80 y 86 humano, etc.

Los candidatos a agentes bloqueadores son analizados en cuanto a su actividad para cubrir estos criterios. Los ensayos para determinar la afinidad y especificidad de fijación son conocidos en la técnica, incluso ensayos competitivos y no competitivos. Los ensayos de interés incluyen ELISA, RIA, citometría de flujo, etc. Los ensayos de fijación pueden usar proteína CTLA-4 purificada o semipurificada, o alternativamente puede usar células T que expresan CTLA-4, por ejemplo células transfectadas con una contracción de expresión para CTLA-4; células T que ha sido estimuladas por enlaces cruzados de CD3 y CD28; la adición de células alogénicas irradiadas, etc. Como ejemplo de un ensayo de fijación, se fija proteína CTLA-4 purificada a un soporte insoluble, por ejemplo una placa de microtitulación, perlas magnéticas, etc. El candidato de agente bloqueador y CD80 o CD86 soluble rotulado se agregan a las células, y los componentes no fijados se eliminan por lavado. La capacidad del agente bloqueador para competir con CD80 y CD86 por la fijación a CTLA-4 se determina por cuantificación de CD80 o CD86 fijado rotulado. La confirmación de que el agente bloqueador no forma enlaces cruzados con CD28 se puede lograr con un ensayo similar, al sustituir CD28 por CTLA-4. Las moléculas adecuadas tendrán al menos aproximadamente 10^7 menos fijación a CD28 que a CTLA-4, más usualmente al menos aproximadamente 10^4 menos fijación.

En general, una molécula fijadora soluble monovalente o bivalente no activa la señal CTLA-4. Se puede usar un ensayo funcional que detecta la activación de células T para la confirmación. Por ejemplo, se puede estimular una población de células T con células alogénicas irradiadas que expresan CD80 o CD86, en presencia o ausencia del candidato a agente bloqueador. Un agente que bloquea la señal CTLA-4 causará un incremento de la activación de células T, medida por la proliferación y la progresión del ciclo celular, la liberación de IL-2, la regulación hacia arriba de CD25 y CD69, etc. Los expertos en la técnica comprenderán que la expresión en la superficie de una célula, el empaquetamiento en un liposoma, la adherencia a una partícula o cavidad, etc. Incrementarán la valencia efectiva de una molécula.

Los agentes bloqueadores son anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales; intactos o truncados, por ejemplo F(ab'), Fab, Fv; xenogénicos, alogénicos, singénicos o sus formas modificadas, por ejemplo humanizados, quiméricos, etc.

El agente bloqueador en consecuencia es un anticuerpo o su fragmento. En general, la afinidad será de al menos aproximadamente 10^{-6} , más usualmente de aproximadamente 10^{-8} M, es decir las afinidades normalmente observadas con anticuerpos monoclonales específicos.

Un número de ensayos de búsqueda están disponibles para los agentes bloqueadores. Los componentes de tales ensayos generalmente incluyen la proteína CTLA-4; y opcionalmente un agente activador de CTLA-4, por ejemplo CD80, CD86, etc. La mezcla de ensayo también comprende un candidato de agente farmacológico. En general se ejecuta una pluralidad de mezclas de ensayo en paralelo con diferentes concentraciones de agente, a fin de obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Generalmente, una de estas concentraciones sirve como control negativo, es decir con concentración cero o por debajo del nivel de detección.

Convenientemente, en estos ensayos una o más de las moléculas se unen a un rótulo, en donde el rótulo puede proveer en forma directa o indirecta una señal detectable. Diversos rótulos incluyen radioisótopos, fluorescentes, quimioluminiscentes, enzimas, moléculas fijadoras específicas, partículas, por ejemplo partículas magnéticas, y similares. Las moléculas de fijación específicas incluyen pares tales como biotina y estreptavidina, digoxina y antidigoxina, etc. Para los miembros de fijación específicos, el miembro complementario normalmente se rotula con una molécula que provee la detección, de acuerdo con procedimientos conocidos.

Un ensayo de barrido de interés está dirigido a agentes que interfieren con la activación de CTLA-4 por sus contrarreceptores. La cuantificación de la activación se puede lograr por numerosos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la inhibición de la activación de células T se puede determinar por la cuantificación de la proliferación celular, la liberación de citoquinas, etc.

Otros ensayos de interés están dirigidos a agentes que bloquean la fijación de CTLA-4 a sus contrarreceptores. La mezcla de ensayo comprende al menos una porción del contrarreceptor natural, o un oligopéptido que comparte suficiente similitud de secuencia para proveer una fijación específica, y el candidato de agente farmacológico. El oligopéptido puede tener cualquier longitud adecuada a las condiciones y requerimientos del ensayo, usualmente al menos aproximadamente 8 aa de longitud y hasta la proteína de longitud total o de fusión correspondiente. El CTLA-4 se puede fijar a un sustrato insoluble. El sustrato se puede preparar en una amplia variedad de materiales y formas, por ejemplo placa de microtitulación, micropérlas, tira reactiva, partícula de resina, etc. El sustrato se elige para minimizar el fondo y maximizar la relación entre señal y ruido. La fijación se puede cuantificar por diversos métodos conocidos en la técnica. Después de un periodo de incubación suficiente para permitir que la fijación alcance el equilibrio, se lava el soporte insoluble, y se cuantifica el rótulo remanente. Los agentes que interfieren con la fijación disminuyen el rótulo detectado.

5 Diversos otros reactivos se pueden incluir en el ensayo de barrido. Estos incluyen reactivos tales como sales, proteínas neutras, por ejemplo albúmina, detergentes, etc., que se pueden usar para facilitar la fijación óptima de proteína-ADN y/o reducir las interacciones no específicas o de fondo. También se pueden usar reactivos que de otro modo mejoran la eficiencia del ensayo, tales como inhibidores de proteasa, inhibidores de nucleasa, agentes antimicrobianos, etc.

10 Los anticuerpos adecuados para el uso como agentes bloqueadores se obtienen al inmunizar un animal huésped con péptidos que comprenden la totalidad o una porción de la proteína CTLA-4. Los animales huésped adecuados incluyen ratón, rata, oveja, cabra, hámster, conejo, etc. El origen del inmunógeno proteico puede ser de ratón, humano, rata, mono, etc. El animal huésped en general es de una especie diferente que el inmunógeno, se usa CTLA-4 murino para inmunizar hámsteres, CTLA-4 humano para inmunizar ratones, etc. El CTLA-4 humano y murino contiene extensiones altamente conservadas en el dominio extracelular (Harper *et al.* (1991) *J. Immunol.* 147:1037-1044). Los péptidos derivados de dichas regiones altamente conservadas se pueden usar como inmunógenos para generar anticuerpos con enlaces cruzados específicos.

15 El inmunógeno puede comprender la proteína completa, o fragmentos y sus derivados. Los inmunógenos preferidos comprenden la totalidad o una parte del dominio extracelular de CTLA-4 humano (residuos de aminoácido 38-161), en donde dichos residuos contienen las modificaciones posteriores a la traducción tales como glucosilación, que se encuentra en CTLA-4 nativo. Los inmunógenos que comprenden el dominio extracelular son producidos de diversas formas conocidas en la técnica, por ejemplo la expresión de genes clonados mediante el uso de métodos convencionales recombinantes, aislamiento de células T, poblaciones celulares seleccionadas que expresan niveles elevados de CTLA-4, etc.

20 Cuando se desea la expresión de una proteína recombinante o modificada, se usa un vector que codifica la porción deseada de CTLA-4. En general, se diseña un vector de expresión de manera tal que el dominio extracelular de la molécula de CTLA-4 esté en la superficie de una célula transfectada o alternativamente el dominio extracelular es secretado de la célula. Cuando el dominio extracelular se secreta, la secuencia codificadora para el dominio extracelular será fusionada, en marco, con secuencias que permiten la secreción, incluso un péptido señal. Los péptidos señal pueden ser exógenos o nativos. Una proteína de fusión de interés para la inmunización se une al dominio CTLA-4 extracelular de la región constante de una inmunoglobulina. Por ejemplo, se puede usar una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de CTLA-4 murino unido al dominio de la región bisagra de Cg 1 humano (bisagra -CH2-CH3) para inmunizar hámsteres.

25 Cuando se quiere expresar CTLA-4 en la superficie de la célula, la secuencia codificadora para el dominio extracelular se puede fusionar en marco con secuencias codificadoras de un péptido que se ancla en el dominio extracelular dentro de la membrana y una secuencia señal. Dichas secuencias de anclaje incluyen un dominio extracelular CTLA-4 nativo, o dominios extracelulares provenientes de otras proteínas de superficie celular, por ejemplo CD4, CDB, sIg, etc. Las células murinas transfectadas con el gen CTLA-4 humano se pueden usar para inmunizar ratones y generar anticuerpos específicos para la proteína CTLA-4 humana.

30 Los anticuerpos monoclonales son producidos mediante técnicas convencionales. En general, el bazo y los ganglios linfáticos de un animal huésped inmunizado proveen una fuente de células plasmáticas. Las células plasmáticas se immortalizan por fusión con células de mieloma para producir células de hibridoma. El sobrenadante del cultivo de hibridomas individuales se analiza mediante técnicas estándar para identificar los que producen anticuerpos con la especificidad deseada. Los animales adecuados para la producción de anticuerpos monoclonales contra la proteína humana incluyen ratón, rata, hámster, etc. Para generar anticuerpos contra la proteína murina, el animal en general es un hámster, cobayo, conejo, etc. El anticuerpo se puede purificar del sobrenadante de las células de hibridoma o líquido ascítico por técnicas convencionales, por ejemplo cromatografía por afinidad mediante el uso de CTLA-4 fijado a un soporte insoluble, proteína A sefarosa, etc.

35 El anticuerpo puede ser producido como cadena única, en lugar de la estructura multimérica normal. Los anticuerpos de cadena única se describen en Jost *et al.* (1994) *J.B.C.* 269:26267-73, y otros. Las secuencias de ADN codificadoras de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena liviana están ligadas a un espaciador que codifica al menos aproximadamente 4 aminoácidos de pequeños aminoácidos neutros, incluso glicina y/o serina. La proteína codificada por esta fusión permite el ensamblado de una región variable funcional que retiene la especificidad y la afinidad del anticuerpo original.

40 Para uso *in vivo*, particularmente para inyección en humanos, es deseable reducir la antigenicidad del agente bloqueador. Una respuesta inmune de un receptor contra el agente bloqueador potencialmente reduce el periodo de eficacia de la terapia. Los métodos para humanizar anticuerpos son conocidos en la técnica. El anticuerpo humanizado puede ser el producto de un que tiene genes de región constante de inmunoglobulina humana (ver por ejemplo las solicitudes de patente internacional WO 90/10077 y WO 90/04036). Alternativamente, el anticuerpo de interés puede ser obtenido por ingeniería mediante técnicas de ADN recombinante para sustituir el CH1, CH2, CH3, los dominios de bisagra, y/o el dominio de marco con la correspondiente secuencia humana (ver WO 92/02190).

45 El uso de cADN de Ig para la construcción de genes de inmunoglobulina quimérica genes es conocido en la técnica (Liu *et al.* (1987) *P.N.A.S.* 84:3439 y (1987) *J. Immunol.* 139:3521). Se aísla mRNA de un hibridoma u otra célula productora de anticuerpo y se usa para producir cADN. El cADN de interés se puede amplificar por reacción en

cadena de polimerasa mediante cebadores específicos (patentes de los Estados Unidos N.º 4.683.195 y 4.683.202). Alternativamente, se prepara una biblioteca y se analiza para aislar la secuencia de interés. La secuencia de ADN codificadora de la región variable del anticuerpo luego se fusiona con las secuencias de la región constante. Las secuencias de los genes de las regiones constantes humanas se encuentran en Kabat *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, publicación de N.I.H. n.º 91-3242. Los genes de la región C humana están fácilmente disponibles de clones conocidos. La elección de isotipo estará guiada por las funciones efectoras deseadas, tales como fijación de complemento, o actividad en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Los isotipos preferidos son IgG1, IgG3 e IgG4. Se puede usar cualquiera de las regiones constantes de las cadenas livianas humanas, kappa o lambda. El anticuerpo quimérico humanizado luego se expresa mediante métodos convencionales.

Se pueden preparar fragmentos de anticuerpo, tales como Fv, F(ab')₂ y Fab por escisión de la proteína intacta, por ejemplo por escisión con proteasa o química. Alternativamente se diseña un gen truncado. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una porción del fragmento F(ab') incluiría las secuencias de ADN que codifican el dominio CH1 y la región bisagra de la cadena H, seguido del codón de detención de la traducción, para dar la molécula truncada.

Las secuencias de consenso de las regiones H y L J se pueden usar para diseñar oligonucleótidos para usarlos como cebadores para introducir sitios de restricción útiles en la región J para la posterior unión de los segmentos de la región V a los segmentos de la región C humana. El cADN can de la región C se puede modificar mediante mutagénesis dirigida a sitio para ubicar un sitio de restricción en la posición análoga de la secuencia humana.

Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, YAC, epitomas derivados de EBV, y similares. Un vector conveniente es el que codifica una secuencia humana funcionalmente completa de inmunoglobulina CH o CL, con adecuados sitios de restricción obtenidos por ingeniería de manera tal que se puede insertar y expresar fácilmente cualquier secuencia VH o VL. En dichos vectores, usualmente se produce el empalme entre el sitio donante del empalme en la región J insertada y el sitio aceptor del empalme que precede a la región C humana, y también en las regiones de empalme que ocurren dentro de los exones CH humanos. La poliadenilación y la terminación de transcripción ocurren en sitios cromosómicos nativos corriente debajo de las regiones codificadoras. El anticuerpo quimérico obtenido se puede unir a cualquier promotor fuerte, incluso LTR retrovirales, por ejemplo promotor temprano SV-40, (Okayama *et al.* (1983) Mol. Cell. Bio. 3:280), LTR de virus de sarcoma de Rous (Gorman *et al.* (1982) P.N.A.S. 79:6777), y LTR de virus de molones murino (Grosschedl *et al.* (1985) Cell 41:885); promotores nativos de Ig, etc.

Agentes estimuladores de la respuesta inmune

El agente bloqueador CTLA-4 se puede usar solo o en combinación con un agente estimulador de respuesta inmune. Tal como se usa en la presente, un "agente estimulador de respuesta inmune" se refiere a cualquier agente que estimula en forma directa o indirecta una respuesta inmune en combinación con un agente bloqueador CTLA-4. Por ejemplo, los agentes estimulantes de inmune respuesta incluyen citoquinas así como diversos antígenos que incluyen antígenos específicos de tumor y antígenos derivados de patógenos. Además, los agentes estimulantes de inmune respuesta incluyen células tumorales transducidas por citoquinas, por ejemplo células tumorales transducidas con GM-CSF, así como células tumorales que han sido irradiadas y/o tratadas con un agente quimioterápico *ex vivo* o *in vivo*. Tal como se demuestra en los ejemplos provistos en la presente, los agentes estimulantes de inmune respuesta pueden tener significativo efecto sobre el tratamiento de tumores cuando se usan en combinación con un agente bloqueador CTLA-4.

En algunas instancias, los restos celulares provenientes de células tumorales muertas o moribundas proveen una estimulación de respuesta inmune que se puede combinar *in vivo* o *ex vivo* con un agente bloqueador CTLA-4. El uso de agentes quimioterápicos es un ejemplo de producción de un agente estimulante de respuesta inmune por medios indirectos. El uso de una fuente para irradiar células tumorales *ex vivo* o *in vivo* también constituye un método que produce indirectamente agentes estimulantes de inmune respuesta, al igual que la reducción quirúrgica o la citorreducción, la ablación androgénica (en cáncer de próstata) y la ablación con estrógenos (en cáncer de mama).

La base para el uso de agentes quimioterápicos y similares con agentes bloqueadores de CTLA-4 es la siguiente. Tal como se indica en los ejemplos, el bloqueo de CTLA-4 trabaja bien con tumores establecidos y aumenta la inmunogenicidad de las células tumorales irradiadas. Esto sugiere que el bloqueo CTLA-4 se puede combinar con métodos más convencionales de tratamiento de cáncer para producir un efecto sinérgico. Por ejemplo, el bloqueo CTLA-4 se puede iniciar poco después del tratamiento con un agente quimioterápico. La dosis de agentes quimioterápicos se ajusta a un nivel que destruye una cantidad razonable de masa tumoral y genera restos que actúan como agente para estimular una respuesta inmune por las células T como consecuencia del bloqueo CTLA-4. Esto permite dar el agente quimioterápico en niveles muy inferiores a los ahora usados para obtener la máxima destrucción de las células tumorales, dado que la respuesta inmune facilitada por CTLA-4 elimina la masa tumoral residual. Esto minimiza los efectos secundarios a menudo molestos, incluso inmunosupresión, asociados con la aplicación convencional de la quimioterapia. Consideraciones similares se aplican a la radioterapia y las terapias de ablación. En cáncer de próstata, por ejemplo, la ablación por andrógenos puede ser seguida de reducción quirúrgica y bloqueo CTLA-4. La dosis de agente quimioterápico o radiación usada en conjunción con un agente bloqueador CTLA-4 de preferencia es inferior a la mitad, con mayor preferencia entre el 2-20%, y con aún mayor preferencia es de entre 5-10% de la dosis utilizada generalmente.

5 Cuando el agente bloqueador CTLA-4 es distinto de un anticuerpo contra el dominio extracelular de CTLA-4 o su fragmento, por ejemplo el fragmento Fab', dichos agentes bloqueadores se pueden usar independientemente, es decir sin un agente estimulador de respuesta inmune. Sin embargo, los agentes bloqueadores de CTLA-4, especialmente los que consisten de un anticuerpo contra la porción extracelular de CTLA-4, de preferencia se usan en combinación con uno o más agentes estimuladores de respuesta inmune. Los agentes bloqueadores de CTLA-4 también se pueden usar en conjunción con tratamiento por radiación y/o quimioterápico que indirectamente produce agentes estimuladores de respuesta inmune. Dicho uso combinado puede incluir el uso simultáneo o en secuencia de agente bloqueador de CTLA-4 y agente estimulador de respuesta inmune y puede ocurrir en diferentes sitios. Por ejemplo, el agente bloqueador de CTLA-4 se puede administrar en un sitio lejano de un tumor después de que el tumor ha sido irradiado directamente. Alternativamente, se puede usar un agente quimioterápico para tratar células tumorales en forma local o sistémica seguido del uso de un agente bloqueador de CTLA-4.

15 El tratamiento objeto se puede realizar en combinación con la administración de citoquinas que estimulan las células presentadoras de antígeno, por ejemplo factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), interleuquina 3 (IL-3), interleuquina 12 (IL-12), etc. Se pueden usar proteínas adicionales y/o citoquinas conocidas por incrementar la proliferación y secreción de células T, tales como IL-1, IL-2, B7, anti-CD3 y anti-CD28 en forma simultánea o en secuencia con los agentes bloqueadores, a fin de aumentar la respuesta inmune.

20 *Antígenos de tumor*

Las células tumorales cuyo crecimiento se puede reducir por la administración de los agentes bloqueadores objeto incluyen carcinomas por ejemplo adenocarcinomas, que pueden tener un sitio de tumor primario en mama, ovario, endometrio, cérvix, colon, pulmón, páncreas, esófago, próstata, intestino delgado, recto, útero o estómago; y carcinomas de células pavimentosas, las cuales pueden tener un sitio primario en pulmones, cavidad oral, lengua, laringe, esófago, piel, vejiga, cérvix, párpados, conjuntiva, vagina, etc. Otras clases de tumores que se pueden tratar incluyen sarcomas, por ejemplo sarcomas miogénicos; neuromas; melanomas; leucemias, ciertos linfomas, tumores de células trofoblásticas y germinales; tumores neuroendocrinos y neuroectodérmicos.

30 Los tumores de interés incluyen los que presenten antígenos específicos de tumor. Dichos antígenos pueden estar presentes en un contexto hormonal, expresarse exclusivamente en las células tumorales, o pueden ser una forma mutada de un autoantígeno normal, no alterado. El antígeno específico de tumor se puede administrar con los agentes bloqueadores objeto para incrementar la respuesta de células T huésped contra las células tumorales. Dichas preparaciones de antígeno pueden comprender proteína purificado, o lisados de células tumorales.

35 Los ejemplos de antígenos de tumor son citoqueratinas, particularmente citoqueratina 8, 18 y 19, como antígeno de carcinomas. El antígeno de membrana epitelial (EMA), el antígeno embrionario humano (HEA-125); los glóbulos de grasa de leche humana, MBr1, MBr8, Ber-EP4, 17-1A, C26 y T16 son también antígenos de carcinoma conocidos. La desmina y la actina específica de músculos son antígenos de sarcomas miogénicos. La fosfatasa alcalina placentaria, la gonadotropina coriónica humana beta, y la alfa-fetoproteína son antígenos de tumores de células trofoblásticas y germinales. El antígeno prostático específico es un antígeno de los carcinomas de próstata, antígeno carcinoembrionario de adenocarcinomas de colon. HMB-45 es un antígeno de melanomas. En cáncer cervical, se pudieron codificar antígenos útiles mediante virus de papiloma humano. La cromagranina-A y la sinaptofisina son antígenos de tumores neuroendocrinos y neuroectodérmicos. De particular interés son los tumores agresivos que forman masas tumorales sólidas con áreas de necrosis. La lisis de dichas células necróticas es una fuente rica de antígenos para las células presentadoras de antígeno.

50 La terapia objeto se puede combinar con la transfección de células tumorales o linfocitos infiltrantes de tumor con genes que codifican diversas citoquinas o receptores de superficie celular (ver Ogasawara *et al.* (1993) *Cancer Res.* 53:3561-8; y Townsend *et al.* (1993) *Science* 259:368-370). Por ejemplo, se demostró que la transfección de células tumorales con cADN que codifica CD80 conduce al rechazo de células tumorales transfectadas, y puede inducir inmunidad a una posterior exposición a células tumorales originales no transfectadas (Townsend *et al.* (1994) *Cancer Res.* 54:6477-6483). La terapia objeto aumenta este efecto.

55 Las células T huésped específicas de tumor se pueden combinar *ex vivo* con los agentes bloqueadores objeto y antígenos o células tumorales y reinfundir en el paciente. Cuando se administran a un huésped, las células estimuladas inducen una reacción tumoricida que resulta en regresión del tumor. Las células huésped se pueden aislar de diversas fuentes, tales como ganglios linfáticos, por ejemplo inguinales, mesentéricos, superficiales distales, auxiliares, etc.; médula ósea; bazo o sangre periférica, así como del tumor, por ejemplo linfocitos infiltrantes de tumor. Las células pueden ser alogénicas o, de preferencia, autólogas. Para la estimulación *ex vivo*, las células huésped se extraen asépticamente y se suspenden en cualquier medio adecuado, como es conocido en la técnica. Las células son estimuladas por cualquiera de diversos protocolos, particularmente combinaciones de B7, anti-CD28, etc., en combinación con los agentes bloqueadores. Las células estimuladas se reintroducen en el huésped por inyección, por ejemplo intravenosa, intraperitoneal, etc. En diversas formulaciones farmacéuticas, incluyendo aditivos tales como aglutinantes, rellenos, portadores, conservantes, agentes estabilizantes, emulsionantes y buffer. Los diluyentes y excipientes adecuados son agua, solución salina, glucosa y similares.

Autoantígenos

De particular interés son los tumores poco inmunogénicos y no inmunogénicos, los cuales representan desafíos especiales debido a su incapacidad para proporcionar adecuada estimulación antigénica para provocar una respuesta inmune. En estos casos, un autoantígeno común al tejido normal y canceroso puede ser el blanco, o alternativamente productos génicos normales con distribución celular altamente restringida. En este aspecto de la invención, se administra una preparación de autoantígeno en combinación con los agentes bloqueadores de CTLA-4 para ayudar a estimular una respuesta autorreactiva a células T periféricas contra las células que expresan el autoantígeno o producto génico.

La preparación de autoantígeno puede comprender una mezcla de antígenos, tales como lisados tumorales o vacunas de células tumorales irradiadas, así como antígeno purificado que comprende un autoantígeno específico de interés (por ejemplo, proteína, hidrato de carbono y similares) o una mezcla de autoantígenos. Un antígeno "purificado" que comprende una proteína se distingue de la proteína natural en al menos una o más características. Por ejemplo, la proteína se puede aislar o purificar de algunas o todas las proteínas y compuestos con los cuales se asocia normalmente en el huésped de tipo salvaje, y en consecuencia puede ser sustancialmente puro. Por ejemplo, una proteína purificada no está acompañada por al menos parte del material con el cual normalmente se asocia en su estado natural, de preferencia que constituye al menos aproximadamente 0,5%, con mayor preferencia al menos aproximadamente 5% en peso del total de proteínas en determinada muestra. Una proteína sustancialmente pura comprende al menos aproximadamente 75% en peso de la proteína total, con al menos aproximadamente 80% de preferencia, y al menos aproximadamente 90% de particular preferencia.

De preferencia, el autoantígeno es un autoantígeno específico de tejido. Los autoantígenos que se pueden usar en la terapia objeto incluyen tirosinasa, trp1, trp2, melanA/MART 1, gp 100 y otras proteínas que intervienen en la síntesis de melanina; antígeno específico prostático (PSA), fosfatasa ácida prostática (PAP), antígeno de membrana específico de próstata (PMSA), antígeno de células prostáticas (PSCA), productos génicos de próstata u otro gen específico de próstata; Her2/neu u otros productos génicos específicos de mama. Otros autoantígenos que sirven como blancos para las respuestas inmunes generados por la terapia objeto se pueden identificar por métodos bien conocidos en la técnica, tales como clonación de expresión, a fin de permitir la inmunización contra antígenos definidos de distribución conocida y proveer una respuesta inmune más focalizada. Alternativamente, la preparación del antígeno puede comprender autoantígeno o antígenos modificados o un antígeno xenogénico (por ejemplo, la correspondiente versión murina de un antígeno humano de interés) a fin de asistir en la ruptura de la tolerancia inmune al autoantígeno.

Los agentes estimuladores de respuesta inmune antes reseñados también se pueden incorporar en la terapia objeto para aumentar la respuesta al autoantígeno. En una forma de realización preferida, por ejemplo, la preparación de antígeno comprende vacunas contra el tumor que comprenden células tumorales irradiadas transducidas con genes de interés, tales como genes que codifican las citoquinas que estimulan las células presentadoras de antígeno, por ejemplo factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), o factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Las terapias más convencionales tales como quimioterapia, radioterapia o ablación con andrógenos también se pueden emplear para inducir suficiente muerte de células tumorales para lograr cierta imprimación de las células T reactivas de tumor, tal como se analizó con anterioridad. De modo similar, también se pueden usar estrategias alternativas de coestimulación tales como células dendríticas pulsadas con péptidos o ARN para proveer inmunización en el contexto de un potente APC, o anticuerpos anti-CD40 para mejorar la expresión de ligandos coestimuladores en las APC.

El tratamiento provee un método para romper la tolerancia inmune y montar una respuesta citotóxica efectiva y controlada contra un autoantígeno o antígeno deseado. Esta terapia inmunológica hallará particular uso con tumores tales como melanoma, cáncer de mama, cáncer testicular, cáncer de ovario, cáncer de próstata y similares, en donde la pérdida o modificación de parte o todo el tejido normal es un efecto secundario aceptable, o incluso deseable. Alternativamente, se puede usar el tratamiento para mejorar o efectuar la ablación del antígeno de un tejido seleccionado, como medida preventiva contra el desarrollo de cáncer o por otras causas médicas. Un método inmunológico de ablación tisular selectiva ofrece considerables ventajas sobre métodos quirúrgicos más invasivos.

La administración de los agentes bloqueadores objeto puede estar contraindicada para ciertos linfomas. En particular, los linfomas de células T pueden no tener beneficio del aumento de la activación. El antígeno CD80 se expresa fuertemente en las células de Reed-Sternberg en la enfermedad de Hodgkin, las cuales frecuentemente están rodeadas por células T que expresan CD28 (Delabie *et al.* (1993) Blood 82:2845-52). Se ha sugerido que la función celular accesoria de las células de Reed-Sternberg conduce a la activación de las células T, y contribuye al síndrome de Hodgkin.

Muchas terapias de cáncer convencionales, tales como quimioterapia y terapia de radiación, reducen severamente las poblaciones de linfocitos. Si bien la terapia objeto puede aliviar esta inmunosupresión en cierto grado, un curso preferido de tratamiento combinado usará dichas terapias linfotóxicas antes o después de la terapia objeto.

Coadyuvantes

Los coadyuvantes potencian la respuesta inmune a un antígeno. Los agentes bloqueadores de CTLA-4 se usan como coadyuvantes para incrementar la activación de células T, y aumentar el cambio de clase de las células productoras de anticuerpo, por lo que se incrementa la concentración de anticuerpos de clase IgG producidos en respuesta al inmunógeno. Los agentes bloqueadores se combinan con un inmunógeno en un medio fisiológicamente aceptable,

de acuerdo con técnicas convencionales para emplear coadyuvantes. El inmunógeno se puede combinar en una única formulación con el agente bloqueador o se puede administrar por separado. Los inmunógenos incluyen polisacáridos, proteínas, fragmentos de proteínas, haptenos, etc. De particular interés es el uso con inmunógenos peptídicos. Los inmunógenos peptídicos pueden incluir antígenos tumorales y antígenos virales o sus fragmentos, tal como se describió con anterioridad.

El uso de los agentes bloqueadores objeto en conjunción con la inmunización genética también es de interés. Se inyecta ADN de vector de expresión que codifica un vector que codifica un péptido o antígeno proteico de interés en el animal huésped, en general en el músculo o la piel. Los productos génicos se glucosilan correctamente, se pliegan y son expresados por la célula huésped. El método es ventajoso cuando los antígenos son difíciles de obtener con la pureza deseada, la cantidad o la forma glucosilada correcta o cuando sólo se conocen las secuencias génicas. Generalmente, se inyecta ADN en los músculos o se provee recubierto en micropartículas de oro en la piel mediante un dispositivo de bombardeo de partículas, una "pistola génica". La inmunización génica ha demostrado la inducción de una respuesta inmune específica humoral pero también una respuesta inmune celular de reacción más amplia en modelos animales de cáncer, micoplasma, TB, malaria, y muchas infecciones virales que incluyen gripe y HIV. Ver, por ejemplo, Mor *et al.* (1995) *J Immunol* 155: 2039-46; Xu y Liew (1995) *Immunology* 84:173-6; y Davis *et al.*, (1994) *Vaccine* 12:1503-9.

Administración y formulación

Se pueden emplear diversos métodos para la administración. La formulación de agentes bloqueadores de CTLA-4 se puede inyectar por vía intravascular, subcutánea, peritoneal, etc. Las dosis de la formulación terapéutica varían ampliamente, según la naturaleza de la enfermedad, la frecuencia de administración, la forma de administración, el objeto de la administración, la depuración del agente del huésped, y similares. La dosis administrada variará según factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente particular, el modo y la vía de administración, la edad, la salud y el peso del receptor, la naturaleza y la extensión de los síntomas, los tratamientos concurrentes, la frecuencia de tratamiento y el efecto deseado. La dosis se puede administrar con tan poca frecuencia como semanalmente o quincenalmente, o fraccionar en dosis más pequeñas y administrar diariamente, dos veces por semana, etc. A fin de mantener un nivel de dosis efectivo. En general, una dosis diaria de ingrediente activo puede ser de aproximadamente 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal. Las formas de dosificación adecuadas para la administración interna en general contiene de aproximadamente 0,1 mg a 500 mg de ingrediente activo por unidad. El ingrediente activo puede variar de 0,5 a 95% en peso sobre la base del peso total de la composición.

En algunos casos puede ser deseable limitar el periodo de tratamiento debido a la excesiva proliferación de células T. Las limitaciones se determinarán empíricamente, según la respuesta del paciente a la terapia, la cantidad de células T en el paciente, el tipo de antígeno dirigido por la terapia objeto, etc. La cantidad de células T puede ser monitoreada en un paciente por métodos conocidos en la técnica, incluso la tinción con anticuerpos específicos para células T y citometría de flujo.

Los bloqueadores de CTLA-4 se preparan como formulaciones en una dosis efectiva en medios farmacéuticamente aceptables, por ejemplo solución salina normal, aceites vegetales, aceite mineral, PBS, etc. Las preparaciones terapéuticas pueden incluir líquidos fisiológicamente tolerables, portadores de gel o sólidos, diluyentes, coadyuvantes y excipientes. Los aditivos pueden incluir agentes bactericidas, aditivos que mantienen la isotonicidad, por ejemplo NaCl, manitol; y estabilidad química, por ejemplo buffer y conservantes, o similares. Los bloqueadores de CTLA-4 se pueden administrar como cóctel, o como agente único. Para la administración parenteral, el agente bloqueador se puede formular como solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. También se pueden usar liposomas o vehículos no acuosos, tales como aceites fijos. La formulación se esteriliza por técnicas conocidas en la técnica.

El efecto funcional del bloqueo de CTLA-4 también se puede inducir por la administración de otros agentes que simular el cambio de las señales intracelulares observado con la invención objeto. Por ejemplo, es sabido que quininas citoplasmáticas específicas pueden ser activadas en respuesta a la fijación de receptores extracelulares. Los agentes que bloquean la actividad de quinasa tendrían un efecto fisiológico similar al bloqueo de la fijación del receptor. De manera similar, los agentes que incrementan las concentraciones de AMPcíclico, GTP y los niveles intracelulares de calcio pueden producir efectos fisiológicos que son análogos a los observados la fijación extracelular de receptor.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no de limitación. Sólo el Ejemplo 10 contiene un ejemplo de tratamiento de metástasis establecida.

Parte experimental

Ejemplo 1

Generación de anticuerpos monoclonales reactivos con CTLA-4 murino

a) *Preparación de un inmunógeno murino CTLA-4*

Se obtuvo una proteína de fusión que comprende las porciones extracelulares del gen murino de CTLA-4 y la región constante de IgG1 humana, denominada mCTLA4-Hg1, de los Dr. P. Lane y K. Karjalainen (Basel Institute for

Immunology, Basilea, Suiza). Se construyó un vector de expresión capaz de expresar la proteína mCTLA4-Hg 1 tal como se describió [Lane, *et al.* Immunol. 80:56 (1993)]. Brevemente, se generaron las secuencias codificadoras de las porciones extracelulares de la molécula de CTLA-4 murino mediante PCR. El siguiente par de cebadores se usó para amplificar estas secuencias de CTLA-4 a partir de un plásmido que contiene secuencias de CTLA-4 de ratón: 5'-TTACTCTACTCCCTGAGG AGCTCAGCACATTTGCC-3' (SEQ ID NO:1) y 5'-TATACTTACCAGAATCCG GG CATGGTTCTGGATCA-3' (SEQ ID NO:2). Las secuencias amplificadas CTLA-4 luego se insertaron en un vector de expresión que permite la inserción de un gene de interés corriente arriba de las secuencias que codifican los dominios de la bisagra, CH2 y CH3 de la proteína humana IgG1 [Traunecker, *et al.* Trends Biotech. 9:109 (1991)]. Cada cebador contenía sitios de restricción apropiados para subclonar en el vector de expresión de IgG1 humana, junto con un sitio donante de empalme 3' dentro del cebador 3' para empalmarse en los exones de la Ig humana correctamente. El plásmido que contiene las secuencias codificadoras de la proteína de fusión mCTLA4-Hgl se denominó pH β -APr-1-neo-mCTLA4-Hgl. La secuencia de aminoácidos de la proteína mCTLA4-Hgl está listada en SEQ ID NO:3.

Para expresar la proteína mCTLA4-Hgl, se transfectó el vector de expresión pH β -APr-1-neo-mCTLA4-Hgl en la línea de plasmacitoma murino, J558L (J558L es idéntico a la línea celular J558 disponible de ATCC [ATCC TIB 6]) mediante la técnica estándar de fusión de protoplasto. Las células J558L se cultivaron con 5×10^4 células/ml. Las células J558L transfectadas luego se seleccionaron en presencia de medio que contiene xantina (Sigma) y ácido mifofenólico (Calbiochem, LaJolla, CA) (medio selectivo). El medio selectivo se aplicó 24 h después de la transfección y se analizaron los clones positivos (es decir los clones que crecieron en el medio selectivo) dos semanas más tarde. Los clones que secretaban la proteína de fusión se identificaron mediante un ELISA para IgG1 humana. Se detectó un clon buen secretor y se designó clon n.º 15. Las células del clon n.º 15 se rotularon metabólicamente con [³⁵S] metionina y las proteínas secretadas se inmunoprecipitaron con proteína A y las proteínas precipitadas se resolvieron en un SDS de gel de poliacrilamida. Se halló que la proteína mCTLA4-Hgl migra en los geles de SDS-PAGE como un monómero de aproximadamente 60.000 MW en condiciones reductoras y como dímero en condiciones no reductoras.

Se obtuvieron preparaciones purificadas de proteína mCTLA4-Hg 1 cromatografía por afinidad de sobrenadantes de cultivo de células del clon n.º 15 en una columna de proteína A-Sefarosa (Zymed, South San Francisco, CA). Brevemente, se cultivaron células J558 que expresan la proteína mCTLA4-Hgl en IMDM suplementado con 5% de FCS, glutamina, 2ME y antibióticos. Los sobrenadantes de cultivo se recolectaron de las células y se centrifugaron a 1500 x g para extraer cualquier remanente de células y el sobrenadante clarificado se filtró por un tamaño de poro de 0,4 micrómetros. El sobrenadante filtrado se ajustó a pH 8,5 mediante 1 N de NaOH; el sobrenadante luego se pasó por una columna de 2 ml (volumen empaquetado) de proteína A-Sefarosa a una velocidad de flujo de 2 ml/min. Cabe destacar que la línea celular J558 produce una inmunoglobulina adicional (es decir además de la proteína de fusión CTLA4-Ig murina) que se fija a la proteína G; en consecuencia, no se recomienda el uso de resinas de proteína G para la purificación de la proteína mCTLA4-Hgl de células J558 transfectadas.

La columna de proteína A se lavó con 20 a 30 volúmenes de columna de PBS y la proteína de fusión se eluyó con 50 mM de dietilamina (pH 11,0). Se juntaron fracciones de dos mililitros en tubos que contenían 0,2 ml de 1M de Tris-HCl para neutralizar el pH de la muestra. Se determinó la absorbancia a 280 nm y se usó para evaluar la concentración de proteína de cada fracción. Las fracciones que contenían proteína se combinaron y se dializaron durante la noche contra 2 a 3 cambios de PBS (1 litro por cambio). Se confirmó la presencia de proteína mCTLA4-Hgl por SDS-PAGE, que mostró una banda de aproximadamente 40 kD (el peso molecular previsto de la proteína de fusión). Además, se analizó la proteína purificada mCTLA4-Hgl en un ELISA usando un anticuerpo antihumano de IgG1 (HP6058; el hibridoma HP6058 (ATCC CRL 1786) se usó como fuente de anticuerpos HP6058).

b) Inmunización de hámsteres

Para inmunizar hámsteres con la proteína de fusión murina CTLA-4, se usó proteína purificada mCTLA4-Hgl (en adelante referida como CTLA-4Ig) para recubrir células bacterianas muertas por calor de *Staphylococcus aureus* (StaphA) (Calbiochem, LaJolla, CA). Hámsteres Golden Sirian de seis semanas de edad (Harlan Sprague Dawley, Indianápolis, IN) se inyectaron en la pata con 50PI (volumen empaquetado) de bacterias StaphA muertas por calor recubiertas con aproximadamente 100 μ g de CTLA-4Ig suspendidas en 0,2 ml de PBS. Las células StaphA se recubrieron como sigue.

Las células StaphA se prepararon de acuerdo con el protocolo del fabricante a una concentración de 10% p/v en solución salina (0,9% de NaCl). Un ml de la suspensión de células bacterianas se centrifugó a 1.400 x g para sedimentar las bacterias y se extrajo el sobrenadante. Se agregó 1 ml de solución que contiene aproximadamente 100 μ g de CTLA-4Ig purificada en PBS al sedimento y la mezcla se incubó a 37°C durante 2 horas con agitación. Las bacterias luego se sedimentaron por centrifugación tal como se describió con anterioridad; el sedimento se lavó dos veces con 1 ml de PBS/lavado. Las células bacterianas recubiertas con CTLA-4Ig luego se resuspendieron en aproximadamente 200 μ l de PBS; se inyectaron 50 μ l de esta preparación en cada almohadilla de la pata.

Se aplicó un total de cinco inyecciones por hámster. El día del refuerzo final y anterior a la inyección, se obtuvo aproximadamente 100 μ l de suero por sangrado intraocular realizado en la oficina del personal de cuidado de animales de laboratorio (Univ. de Calif, Berkeley). Este suero se analizó en comparación con el suero obtenido por la metodología idéntica anterior a la primera inyección.

ES 2 308 857 T3

Se utilizó un ELISA de fijación de CTLA-4Ig para demostrar la presencia de anticuerpo que reconoce la proteína de fusión CTLA- 4Ig en el sangrado posinmunización. El ELISA fijador de CTLA-4Ig se condujo como sigue. Se usó proteína de fusión CTLA-4Ig o proteína de fusión CD4Ig para recubrir las cavidades de placas de ELISA de base plana modificadas de 96 cavidades (Corning, Corning, NY).

CD4Ig es una proteína de fusión que consiste del dominio extracelular de CD4 murino y los dominios de bisagra, CH2 y CH3 de IgG1 humana [Trauneker *et al.*, *supra.*]; se usó la proteína CD4Ig como control negativo en los ensayos por ELISA. La proteína de fusión CD4Ig se preparó a partir de células transfectadas J558 y se purificó por cromatografía por afinidad en proteína A Sefarose tal como se describió para la proteína de fusión mCTLA4-H μ l (es decir CTLA-4Ig) en la sección (a) anterior.

Se colocaron 50 microlitros de las proteínas de fusión a una concentración de 1 μ g/ml en 0,4% de gelatina en PBS en las cavidades. Las placas se incubaron a 37°C durante 2-3 horas para permitir que las proteínas se absorbieran; las placas luego se lavaron tres veces con 150 μ l de 0,9% de NaCl que contiene 0,05% de Tween-20. Entonces se bloqueó el resto de los sitios de fijación de la proteína en las cavidades con 0,4% de gelatina en PBS (buffer de bloqueo) durante 30 min a 37°C; después de la etapa de bloqueo se lavaron las placas dos veces con 0,9% de NaCl que contiene 0,05% de Tween-20. Se añadieron 50 microlitros de la solución que contiene anticuerpos anti-CTLA-4 (es decir suero de los hámsteres inmunizados, anticuerpos purificados o sobrenadantes de cultivo) en cavidades por triplicado y las placas se incubaron durante 2-3 horas a 37°C. Para evaluar la cantidad de anticuerpos anti-CTLA-4 presentes en el suero de hámsteres inmunizados, se analizó el sangrado inicial posterior a la inmunización usando diluciones que variaban entre 1:1000 y 1:100 (diluido en PBS que contiene 0,4% de gelatina).

Las cavidades luego se lavaron tres veces usando 150 μ l de 0,9% de NaCl que contiene 0,05% Tween-20. Se agregaron 50 microlitros de una solución que contiene suero de cabra antihámster IgG policlonal conjugado con peroxidasa de rábano (CalTag, South San Francisco, CA) en una concentración de 1 μ g/ml en buffer de bloqueo a las cavidades y las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C. Las placas luego se lavaron cuatro veces con 0,9% de NaCl que contiene 0,05% de Tween-20. Se añadió una solución que contiene 0,55 mg/ml de ABTS ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) en buffer citrato [0,1 M de ácido cítrico (pH 4,35)] y las placas se incubaron durante aproximadamente 20 min a 37°C. Luego se leyeron las placas a 405 nm con un lector de placa BioTech (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) para evaluar la absorbancia del producto de reacción verde.

Los resultados de ELISA de fijación de CTLA-4Ig demostraron la presencia de anticuerpo que reconocía la proteína de fusión CTLA- 4Ig en el sangrado posterior a la inmunización con diluciones de suero 1000 veces superiores a la dilución detectada de fondo en el sangrado previo a la inmunización.

c) Aislamiento de líneas de hibridoma que secretan anticuerpos anti-CTLA-4 murinos

Tres días después de la inyección final, se extrajeron los ganglios linfáticos de drenaje de los hámsteres. Se aislaron los linfocitos de los ganglios linfáticos poplíteos que drenan las patas traseras. Se prepararon suspensiones celulares de los ganglios linfáticos aislados como sigue. Los ganglios extraídos se colocaron en una placa de cultivo de tejidos (Falcon Plastics, Mountain View, CA) que contiene medio RPMI (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) suplementado con 10% de FCS (BioWhittaker, Walkersville, MD). Los linfocitos se liberaron de los ganglios mediante molienda suave de los ganglios con portaobjetos de vidrio helados; se contó la suspensión de linfocitos mediante un hemocitómetro.

Los linfocitos aislados de los hámsteres inmunizados se fusionaron a la contrapartida celular de fusión, P3X3.Ag8.653 (ATCC CRL 1580). Las células P3X3.Ag8.653 se dividieron 1:20 cada 3 días antes de la fusión en IMDM (Univ. of Calif., San Francisco Tissue Culture Facility) que contiene 20% FCS (suero fetal bovino) (BioWhittaker, Walkersville, MD), 50 PM 2-ME, 50 PM de gentamicina.

La fusión con la línea de mieloma usó una técnica estándar de fusión de polietilenglicol [McKearn *et al.*, Immunol. Rev. 47:91 (1979)]. Brevemente, se prepararon suspensiones de células de linfocitos estériles en medio sin suero Iscove's Modified Dulbecco's (IMDM). Los linfocitos se lavaron dos veces con IMDM y se ajustaron a una densidad de 12,5 x 10⁶ células/ml.

Las células P3X3.Ag8.653 (cultivadas tal como se describió con anterioridad) se lavaron dos veces con IMDM sin suero [estas células se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 r.p.m. en una centrifuga TJ-6 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) a 25°C para sedimentar las células] y se ajustó la densidad celular de P3X3.Ag8.653 a 5 x 10⁶ células/ml.

Se mezclaron cuatro mililitros de la suspensión de células linfocitos con 1 ml de las células lavadas P3X3.Ag8.653 en placas de cultivo de tejido de 60 mm (Falcon). Los discos de cultivo de tejido se colocaron en portadores de placas de microtitulación (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) y se centrifugaron a 250 x g (1200 r.p.m.; centrifuga TJ-6) durante 5 minutos para generar una monocapa adherente de células en la parte inferior del disco. El sobrenadante se aspiró de los discos y los discos se inundaron suavemente con 1 ml de 50% de polietilenglicol (PEG 1500, Boehringer Mannheim) en IMDM; la solución de PEG se preparó al calentar 4 ml de PEG 1500 y 4 ml de IMDM por separado en baño de agua a 60°C y luego se combinaron por aspiración de PEG en una pipeta seguido de IMDM y se mezcló bien. Después de 30 segundos a temperatura ambiente, los discos se inundaron con 5 ml de IMDM sin suero.

ES 2 308 857 T3

Después del lavado final el día de la fusión, las células se dejaron en el disco de 60 mm con 5 ml de medio IMDM que contiene FCS durante 12 horas a 37°C con 5% de CO₂. El día siguiente, las células fusionadas se diluyeron en 100 ml de IMDM que contiene 20% de FCS y 1 X de medio HAT (Boehringer Mannheim, NJ) y se plaquearon 100 μ l por cavidad en placas de base plana de 96 cavidades. Después de 5 y 9 días, se añadieron 50 μ l de medio adicional a cada cavidad. Luego se extrajeron, 50 μ l de medio y se añadió medio fresco con intervalos de 3 días. Una vez que las cantidades de células estaban en el rango de 1000-5000 por cavidad, los sobrenadantes de hibridoma se analizaron para la reactividad a CTLA-4Ig y para la falta de reactividad a CD4Ig por ELISA tal como se describe en la sección (b) anterior. Los sobrenadantes de hibridoma se usaron sin diluir en ELISA (50 μ l/cavidad).

Los hibridomas de las cavidades positivas se clonaron repetidas veces por dilución limitante en presencia de capas de alimentación de timocitos de ratón irradiados. Se seleccionó una línea de hibridoma que secreta un anticuerpo monoclonal, denominado anticuerpo 9H 10, según los siguientes criterios: 1) reactividad contra CTLA-4Ig pero no CD4Ig en ELISA; 2) la capacidad de bloquear CTLA-4Ig fijado a transfectantes B7; 3) la capacidad para teñir células T activadas pero no las células T recién aisladas; y 4) la capacidad para teñir un transfectante CTLA- 4 pero no los transfectantes control.

La capacidad del anticuerpo 9H10 para bloquear la fijación de CTLA4Ig a transfectantes B7 se demostró como sigue. Aproximadamente 10 μ l de mAb 9H 10 se incubó a 22°C durante 30 min con 1 μ g de proteína de fusión CTLA-4Ig en un volumen final de 50 μ l de una solución que comprende PBS. A esta mezcla se añadió 2 x 10⁵ células B7-EL-4, suspendidas en 10 μ l de PBS helado que contiene 1% de suero bovino y 0,05% de azida sódica. Las células B7-EL-4 son la línea celular de timoma EL4 derivada de C57BL/6 transfectada con un vector de expresión codificado por la proteína de superficie B7 murina, tal como se describe en Townsend *et al.* Cancer Res. 54:6477-83 (1994).

La mezcla obtenida luego se incubó sobre hielo durante 30 minutos, seguido de dos lavados con 4 ml/lavado de PBS que contiene 1% suero bovino y 0,05% azida sódica. Las células luego se tiñeron con IgG antihumano conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Caltag, South San Francisco, CA). Como control negativo para este experimento, se incubó la proteína de fusión CTLA-4Ig con un IgG control de hámster o la línea celular original de EL-4. Las células se analizaron en FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA); se usó el programa LYSIS II (Becton Dickinson) como portal electrónico de las poblaciones relevantes. En la mayoría de los experimentos se recolectaron 10.000 eventos de portales vivos para el análisis. Los resultados mostraron que el anticuerpo 9H 10 bloquea la fijación de CTLA-4 a las células B7-EL-4.

La capacidad del anticuerpo 9H10 para teñir las células T activadas pero no las células T recién aisladas se demostró como sigue. Se generaron esplenocitos frescos y activados. Se cosecharon y picaron los bazos de ratones BALB/c de 4 a 6 semanas, y se trataron las suspensiones con solución hemolítica de Gey para extraer las células rojas sanguíneas, una técnica estándar en el arte [Mishell y Shiigi, Selected Methods in Celular Immunology, W.H. Freeman y Co., San Francisco (1980) pp. 23-24]. Las células se cultivaron en RPMI que contiene 10% de suero fetal bovino, con anticuerpo soluble anti-CD-3 a 10 μ g/ml agregado para activar una porción de la población celular. La otra porción de los esplenocitos no se trató con anti-CD3 y representa los frescos (pero no los esplenocitos activados). Las dos poblaciones celulares luego se tiñeron con 1) una combinación de 9H10 conjugado con FITC (el anticuerpo anti-CTLA-4; 5 μ g de anticuerpo) y Thil.2 conjugado con PE o 2) una combinación de Ig de hámster conjugado con FITC y Thil.2 conjugado con PE. Los datos se analizaron en un FACScan y se obtuvieron los portales para células Thil.2 positivas para analizar sólo la población celular T relevante. Los resultados de este experimento demostraron que el anticuerpo 9H10 tiñe células T activada (es decir que expresan CTLA-4) pero no las recién aisladas.

La capacidad del anticuerpo 9H10 para teñir un transfectante CTLA-4 pero no los transfectantes control se demostró como sigue. Una línea original CHO (ovario de hámster chino, células CHO-K1) (ATCC CCL 61) se transfectó con pSRIneo.CTLA-4. pSRIneo.CTLA-4 contiene todo el cADN de 1,9 kb que codifica la proteína murina CTLA-4 [Brunet *et al.*, Nature 328:267 (1987)] insertada en el vector de expresión pSRIneo. Las células transfectadas con el vector pSRIneo.CTLA expresan la proteína murina CTLA-4 en la superficie celular.

Las células originales (es decir, células CHO-K1) y las células transfectadas se tiñeron con 1) una combinación de FITC conjugado con 9H 10 (el anticuerpo anti-CTLA-4; 5 μ g de anticuerpo) y PE conjugado con Thil.2 o 2) una combinación de Ig de hámster conjugado con FITC y PE conjugado con Thil.2. Los datos se analizaron electrónicamente para células Thil.2 positivas para analizar sólo la población celular T relevante. Los resultados de este experimento demostraron que el anticuerpo 9H 10 tiñe CTLA-4 transfectantes pero no los transfectantes control.

Los resultados anteriores demostraron que el anticuerpo monoclonal 9H 10 reacciona específicamente con la proteína CTLA- 4 murina.

Ejemplo 2

Los anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 causan rechazo de tumores V51BLim 10 en ratones

El anticuerpo monoclonal CTLA-4 antimurino, 9H10, se usó para tratar ratones que recibieron inyecciones de una línea celular de carcinoma de colon. La inyección de mAb 9H10 junto con células tumorales V51BLim 10 dio por resultado el completo rechazo de las células tumorales en los animales de experimentación. En contraste, los

ES 2 308 857 T3

ratones inyectados con un mAb anti-CD28 y células V51BLim 10 o ratones inyectados con células V51BLim10 solas desarrollaron tumores que exhibieron un incremento constante del tamaño promedio de tumor durante un periodo de cuatro semanas.

5 a) Generación de la línea celular v51BLim10

La línea celular V51BLim10 se generó por transfección del vector de expresión SR1neo en la línea celular 51BLim10. La línea celular 51BLim es una línea celular de carcinoma de colon que provee un modelo animal exacto para metástasis de cáncer de colon en humanos. Bresalier, *et al.*, Cancer Res. 47:1398 (1987).

10 La línea celular V51BLim10 usada en el presente experimento se generó como sigue. La línea celular de cáncer de colon murino 51B establecida por Corbett *et al.*, Cancer Res. 35:2434-9 (1975) fue inyectada en la pared cecal de ratones BALB/c; se halló que los tumores colónicos obtenidos hacían metástasis espontáneamente en el hígado en una minoría de los ratones inyectados. Bresalier *et al.*, Cancer Res. 47:1398 (1987). Las líneas celulares que
15 tenían actividad metastático en progresivo incremento fueron desarrolladas al recolectar las células de las metástasis originales, las cuales luego se usaron para la sucesiva reinyección en el ciego de otros ratones. Estas líneas celulares se denominaron 51BLim-1 a 51BLim-5 en donde el número que sigue al guión se refiere a la cantidad de ciclos de metástasis.

20 Un derivado metastático 51B obtenido del Dr. Warren de la Universidad de California San Francisco fue designada 51BLim 10; la línea celular 51BLim 10 corresponde a la línea celular 51BLim5 descrita por Bresalier, *et al.*, Cancer Res. 47:1398 (1987).

El vector de expresión SR1neo fue transfectado a la línea celular 51BLim-10 para generar la célula V51BLim10 tal como se describe [Townsend *et al.* Cancer Res. 54:6477-83 (1994)]. El vector de expresión SR1neo (obtenido de L. Lanier en ADNX Research Institute of Molecular and Cellular Biology, Palo Alto, CA) permite la expresión de un gene de interés bajo el control de transcripción de HTLV-1 LTR. El vector de expresión SR1neo también contiene el gen neo bajo el control de transcripción del promotor/mejorador SV40. La presencia del gen neo permite seleccionar células que contienen el vector SR1neo.

30 El vector de expresión SR1neo fue transfectado en células 51BLim-10 por electroporación con un electroporador BTX T 800 (BTX, Inc., San Diego, CA). Se aplicaron cinco pulsos de 99 μ s cada uno a 450 o 600 V. La electroporación se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 750 μ l de una solución que comprende 270 mM de sacarosa, 7 mM de NaPO₄ (pH 7.4), 1 mM de MgCl₂, 5 x 10⁶ células 51BLim-10 y 50 μ g del vector de expresión SR1neo. Después
35 de la electroporación, las células se cultivaron durante 24 horas en medio completo [Eagle's MEM (Univ. of Calif. at San Francisco Cell Culture Facility, San Francisco, CA) suplementado con 10% de FCS (Sigma), aminoácidos no esenciales, solución MEM de vitamina, L-glutamina, piruvato de sodio, gentamicina (todos de Irvine Scientific, Santa Ana, CA) y 7,5% de bicarbonato de sodio (Sigma)] a 37°C. Se usó medio de selección [medio completo que contiene 1 mg/ml de Geneticina (G418 de sulfato, GIBCO, Grand Island, NY)]. Después de 14 días de cultivo en el medio de
40 selección, se juntaron las células resistentes a fármacos y se usaron en posteriores experimentos como la población policlonal referida como V51BLim10.

Las células tumorales V51BLim10 se mantuvieron en Eagle MEM (Univ. of Calif. at San Francisco Cell Culture Facility, San Francisco, CA) suplementado con 10% FCS (Sigma), aminoácidos no esenciales, solución de vitamina
45 MEM, L-glutamina, piruvato de sodio, gentamicina, penicilina-estreptomocina (todos de Irvine Scientific, Santa Ana, CA) y 1 mg/ml de Geneticina. Los cultivos celulares se establecieron de alícuotas congeladas de pocos pasajes (es decir menos de 10 pasajes) y se mantuvieron en cultivo durante no más de 30 días antes del uso.

Se halló que las células V51BLim10 y las células originales 51BLim10 exhiben tasas de crecimiento similares *in vitro* e *in vivo*. La expresión del gen de resistencia a neomicina en las células V51BLim10 y una variedad de otras líneas celulares de tumor no tuvo ningún efecto sobre la tumorigenicidad o la tasa de crecimiento de los tumores
50 provenientes de las células inyectadas.

55 b) Inyección de ratones con células tumorales V51BLim10 y anticuerpos monoclonales

Las células tumorales V51BLim10 fueron cosechadas de las placas de cultivo de tejido con tripsina-EDTA (Sigma), se lavaron tres veces en medio sin suero (Eagle's MEM) y se suspendieron en una concentración de 2 x 10⁷ células/ml.

Los ratones usados en este experimento eran ratones hembra BALB/c de 6-8 semanas (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Grupos de cinco ratones fueron anestesiados por inhalación de metoxiflurano, se marcaron las orejas para la identificación, y se inyectaron con 200 μ l de suspensión de células tumorales V51BLim10 (4 x 10⁶) por
60 vía subcutánea en el flanco izquierdo. Los grupos tratados recibieron 100 μ g inyecciones intraperitoneales de mAb antiCTLA-4 9H10 antes descrito, o alternativamente el mAb anti-CD28, 37, 51, el mismo día, y otras inyecciones de 50 μ g i.p. los días 3 y 6 posteriores a la inyección de las células tumorales (designadas por las flechas oscuras en la
65 Figura 1). El anti-CD28 monoclonal, 37,51, está dirigido contra la proteína murina CD28 [Gross *et al.*, J. Immunol. 149:380 (1992)] y sirvió como control negativo.

Se monitorearon los ratones respecto del crecimiento subcutáneo del tumor y se midieron los diámetros bisectrices de los tumores en desarrollo con calibres. Todos los ratones no tratados, o tratados con anticuerpo anti-CD28 desarrollaron tumores de crecimiento progresivo y requirieron eutanasia 35 días después de la inoculación. En contraste, todos los ratones tratados con anticuerpo anti-CTLA-4 rechazaron completamente sus tumores después de un corto periodo de crecimiento limitado. Tal como se muestra en la Figura 1A, el área promedio de tumor en mm² (mostrado a lo largo del eje x) disminuyó gradualmente a partir de aproximadamente el día 14 posterior a la inyección del tumor (mostrado a lo largo del eje y), disminuyendo a cero aproximadamente el día 24. El tratamiento con anti-CTLA-4 era menos efectivo con menores dosis de tumor. La Figura 1B muestra el tamaño promedio de tamaño de tumor en ratones inyectados con 2×10^6 células tumorales y tratados tal como se describió antes con anticuerpo anti-CTLA-4 o un anticuerpo irrelevante de hámster. El tratamiento con anticuerpo anti-CTLA-4 continuó teniendo un efecto notable sobre el crecimiento del tumor, pero un ratón desarrolló un tumor rápidamente, y otro mucho más tarde. La Figura 1C ilustra el crecimiento individual de los tumores en ratones inyectados con 2×10^6 de células V51BLim10. Tres de los ratones se mantuvieron sin tumores más de 80 días. Es obvio que el bloqueo de CTLA-4 mejora significativamente el rechazo de las células tumorales B7 negativas.

15 c) *Inyección de ratones con células tumorales B7-51BLim10 y anticuerpos monoclonales*

Células 51BLim10 fueron transfectadas tal como se describió antes, con un plásmido que contiene el gen de B7-1 murino, y se clonaron por dilución limitante. Las células tumorales B7-51BLim10 se cosecharon de placas de cultivo de tejidos con tripsina-EDTA (Sigma), se lavaron tres veces en medio sin suero (Eagle's MEM) y se suspendieron en una concentración de 2×10^7 .

Los ratones usados en este experimento eran ratones hembra BALB/c de 6-8 semanas (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Grupos de cinco ratones fueron anestesiados por inhalación de metoxiflurano, se marcaron las orejas para la identificación, y se inyectaron con 100 μ l de suspensión de células tumorales B7-51BLim10 (4×10^6) por vía subcutánea en el flanco izquierdo. Los grupos tratados recibieron 100 μ g inyecciones intraperitoneales de mAb anti-CTLA-4 9H10 antes descrito, o alternativamente el mAb anti-CD28, 37,51. Se aplicaron inyecciones de 100, 50 y 50 μ g los días 0, 3 y 6, respectivamente (los días de inyección están designados por las flechas oscuras en la Figura 2). El anti-CD28 monoclonal, 37,51, está dirigido contra la proteína murina CD28 [Gross *et al.*, J. Immunol. 149:380 (1992)] y sirvió como control negativo.

Se monitorearon los ratones respecto del crecimiento subcutáneo del tumor y se midieron los diámetros bisectrices de los tumores en desarrollo con calibres. Los datos de este experimento se muestran en la Figura 2. El tratamiento con anticuerpo anti-CTLA-4 inhibió el crecimiento tumoral de B7-51BLim10 comparado con los grupos anti-CD28 y control. Todos los ratones no tratados, o tratados con anticuerpo anti-CD28 desarrollaron tumores de crecimiento progresivo durante 5 a 10 días y luego finalmente mostraron regresión en ocho de los diez ratones aproximadamente el día 23 posterior a la inyección. Los dos tumores pequeños que no mostraron regresión permanecieron estáticos durante más de 90 días. En contraste, 3 de los 5 ratones tratados con anticuerpo anti-CTLA-4 desarrollaron tumores muy pequeños, y todos mostraron regresión completa al día 17.

40 d) *Rechazo inducido por anti-CTLA-4 de células tumorales V51BLim10 que resulta en protección contra posterior exposición a células de carcinoma de colon de tipo salvaje*

Cinco ratones tratados con anti-CTLA-4 que habían rechazado completamente las células tumorales V51BLim10 fueron expuestos nuevamente 70 días después con 4×10^6 células tumorales 51BLim10 de tipo salvaje inyectadas por vía subcutánea en el flanco opuesto. También se inyectaron cinco ratones no expuestos como controles. Se midieron los diámetros de tumor y se informaron tal como se describe. El rechazo previo al tumor resultó en significativa protección contra la exposición secundaria, comparado con controles no expuestos. Todos los ratones control desarrollaron tumores de crecimiento progresivo, desarrollaron cargas tumorales masivas, y fueron sacrificados el día 35 posterior a la inoculación. 3 de los 5 ratones previamente inmunizados se mantuvieron libres de tumor 70 días después de la exposición. Sólo uno de los ratones previamente inmunizados tenía un tumor detectable el día 14, y el crecimiento de este tumor era muy lento. Por último, otros dos tumores se desarrollaron en los ratones inmunizados 42 días después de la exposición. Los datos se muestran en la Figura 3. Estos resultados demuestran que el rechazo de tumor mediado por bloqueo CTLA-4 resulta en memoria inmunológica.

55 e) *El tratamiento anti-CTLA-4 reduce el crecimiento de tumores establecidos*

Grupos de ratones fueron inyectados s.c. con 2×10^6 células tumorales 51BLim10. Animales control (n = 10) fueron inyectados i.p. con 100 μ g de anticuerpo de irrelevante hámster los días 0, 3, 6 y 9, tal como se indica con las flechas que apuntan hacia arriba en la Figura 4. Un grupo de tratamiento anti-CTLA-4 recibió inyecciones i.p. los mismos días. El otro grupo tratado de ratones (n = 5) recibieron inyecciones i.p. de anticuerpo anti-CTLA-4 a partir del día 7 y luego los días 10, 13 y 16 (flechas hacia abajo). Los datos se muestran en la Figura 4. Los ratones tratados con anticuerpo anti-CTLA-4 en cualquier punto temporal tenían significativa reducción del crecimiento del tumor comparado con controles no tratados. El retraso del tratamiento parecía ser más efectivo, con 2 de 5 ratones que permanecían libres de tumor más de treinta días después de la inoculación.

ES 2 308 857 T3

f) El tratamiento anti-CTLA-4 reduce el crecimiento del fibrosarcoma murino SAIN

Los efectos de tratamiento con anti-CTLA-4 no se limitaron a las líneas celulares de carcinoma. Se obtuvieron resultados similares obtenidos con una línea celular de fibrosarcoma de crecimiento rápido de ratones A/JCr. Grupos de ratones fueron inyectados s.c. en el flanco con una suspensión de 1×10^6 células de fibrosarcoma SA1N. Los grupos tratados fueron inyectados i.p. con $100 \mu\text{g}$ de anti-CTLA-4 o anticuerpo irrelevante de hámster control los días 0, 3 y 6, tal como se indica con las flechas en la Figura 5. Todos los animales control fueron sacrificados el día 30. Dos de cinco animales tratados con anti-CTLA-4 se mantenían libres de tumor al día 55. Los datos se muestran en la Figura 5.

Ejemplo 3

Los anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 actúan como coadyuvante

a) Preparación de inmunógeno

Se obtuvo DNP-KLH de Calbiochem (San Diego, CA) y se suspendió en agua desionizada a 1 mg/ml , 100 ng/ml o $10 \mu\text{g/ml}$. Se añadió un ml de coadyuvante completo de Freund (Difco, MI) a cada 1 ml de las preparaciones de DNP-KLH. Estos luego fueron emulsionados en dos jeringas de 5 ml conectadas con un conector de dos extremos por pasaje rápido por el cierre luer, tal como se describe en Current Protocols in Immunology, Colligan *et al.*, eds., sección 2.4.

30 minutos antes de la inyección del inmunógeno, se inyectaron ratones C57B1/6 de 4-6 semanas en el peritoneo mediante una jeringa de calibre 23 con $200 \mu\text{g}$ de anticuerpo control de hámster no específico o con $200 \mu\text{g}$ de anticuerpo anti-CTLA-4 9H10 (ambos en $200 \mu\text{l}$ de volumen total). Los ratones luego se inyectaron por vía subcutánea con una jeringa de calibre 21 en dos sitios del lomo, con $200 \mu\text{l}$ del inmunógeno en la forma antes descrita, para dar una dosis de $100 \mu\text{g}$, 10 ng o 1 pg/ratón , respectivamente. Después de tres días se repitieron las inyecciones de anticuerpo.

Diez días después del primer tratamiento se sacrificaron los animales. Se obtuvo sangre por punción cardíaca y se pasó a tubos de Eppendorf. Estas muestras se dejaron coagular a 4°C durante la noche, y luego se centrifugaron para obtener el suero.

Los sueros se analizaron para anticuerpos específicos de isotipo que reconocen DNP usando un ELISA de isotipo estándar tal como se describe en Current Protocols in Immunology (*supra.*) sección 2.1. Brevemente, DNP se plaqueó a 100 ng/ml en un volumen de $50 \mu\text{l}$ en cada cavidad de una placa de ELISA de 96 cavidades Corning modificada de base redonda. Las cavidades se bloquearon usando buffer tal como se describe. Se agregaron diluciones seriadas al tercio de cada suero, a partir de 1:100, en cada cavidad. Estas se incubaron durante una hora a 25°C , y se lavaron con buffer de lavado. Se detectaron isotipos mediante el uso de agentes detectores de anticuerpos murinos específicos a $1 \mu\text{g/ml}$ en $50 \mu\text{l}$ de buffer de bloqueo incubados durante una hora. Los anticuerpos de isotipo se biotinilaron y la detección se logró al incubar con avidina-peroxidasa de rábano, lavar y agregar sustrato de peroxidasa (ABTS, Sigma, Mo.). Se añadió buffer de detención, y se leyó la absorbancia de cada cavidad con un lector de ELISA a una longitud de onda de 490-498 nm dentro de los 5-8 min de detener la reacción.

Los resultados se muestran en las Figuras 6A a 6E. Cada uno de los paneles ilustra la concentración de un isotipo diferente en la muestra del suero. El eje y muestra la lectura de D.O., en donde un incremento de D.O. indica aumento de la concentración de anticuerpos en el suero que tiene dicho isotipo. El eje x muestra la cantidad de antígeno inyectado, $100 \mu\text{g}$, 10 ng o 1 pg por animal, respectivamente. Se puede ver que el anticuerpo anti-CTLA-4 aumenta el cambio de clase a IgG1, IgG2a e IgG2b con mayores dosis de antígeno.

El análisis de la función de las células T se realizó como sigue. Se aislaron células de ganglio linfático y se estimularon *in vitro* durante 72 horas con KLH. Se extrajeron los ganglios linfáticos axilar, inguinal, mesentérico, braquial, cervical y poplíteo a un disco que contiene RPMI-completo (10% FCS (Hyclone, Montana), 2 mM de glutamina, $50 \mu\text{M}$ de b-mercaptoetanol, $50 \mu\text{g/ml}$ de gentamicina). Los ganglios linfáticos se picaron para obtener suspensiones de células aisladas, se filtraron por una malla tejida para eliminar partículas, y se contaron mediante un hemocitómetro. Las células se plaquearon en $150 \mu\text{l}$ de RPMI-completo en placas de cúmulo de 96 cavidades de base redonda a 5×10^5 , $2,5 \times 10^5$, o $1,25 \times 10^5$ células/cavidad. Se añadieron soluciones de KLH en RPMI completo hasta concentraciones finales de 100, 10, 1 o $0 \mu\text{g/ml}$ y las placas se incubaron a 37°C durante 64 horas incubadores humidificadas con 5% de CO_2 . Después de 64 horas, se añadió $20 \mu\text{l}$ de RPMI completo que contiene $1 \mu\text{Ci}$ de 3H-timidina a cada cavidad, y las placas se incubaron otras ocho horas. En este momento, los cultivos se cosecharon en filtros de fibra de vidrio mediante un cosechador Inotech de 96 cavidades. Los filtros se secaron y se contaron con un contador Packard Matrix. Cada condición se realizó por triplicado, y los datos representan la media de valores por triplicado.

Los resultados se muestran en las Figuras 7A a 7B. La hilera superior muestra una cantidad constante de células (5×10^5 células), con concentraciones variables de antígeno (mostrado en el eje x). El eje y muestra la incorporación de 3H-timidina, una medida de proliferación celular. El panel inferior muestra una concentración constante de antígeno ($10 \mu\text{g/ml}$), con cantidades variables de células (mostrado en el eje x). Los datos indican que el bloqueo CTLA-4 regula fuertemente hacia arriba la respuesta de células T a las mayores dosis de antígeno.

Los resultados anteriores demuestran que el tratamiento objeto con agentes bloqueadores de CTLA-4 incrementa la respuesta de las células T a la estimulación antigénica. El crecimiento de las células tumorales *in vivo* está muy disminuido en presencia de los agentes bloqueadores objeto. Los efectos se observan respecto de tumores de tipo salvaje no manipulados. Los agentes bloqueadores de CTLA-4 no sólo representan un nuevo enfoque a la terapia tumoral, sino que al extraer señales inhibitorias potencialmente competentes, puede ser un adjunto particularmente útil para otros abordajes terapéuticos en los que interviene la vía coestimuladora. El cambio de clase de las células productoras de inmunoglobulina, una medida de la ayuda de las células T, está muy aumentado. La respuesta de células T a la inmunización con antígenos peptídicos también está muy aumentada por el tratamiento con los agentes objeto.

Ejemplo 4

Generación de anticuerpos dirigidos contra proteínas CTLA-4 humanas

Los anticuerpos antihumanos CTLA-4 son generados como sigue.

a) Proteínas CTLA-4 humanas para la inmunización de animales huéspedes

Los inmunógenos que comprenden las proteínas humanas CTLA-4 contienen la totalidad o una porción del dominio extracelular de la proteína CTLA-4 humana. El dominio extracelular de la proteína CTLA-4 humana comprende los residuos de aminoácidos 38-161, según está listado en las referencias de la base de datos.

El inmunógeno CTLA-4 humano comprende toda la proteína CTLA-4 humana o una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de CTLA-4 humano y una contrapartida de fusión. El inmunógeno comprende toda la proteína CTLA-4 humana insertada en la membrana de una célula; se usa la célula que expresa CTLA-4 humano en la superficie para inmunizar un animal huésped.

Los inmunógenos que comprenden porciones de la proteína CTLA-4 humana son generados mediante el uso de PCR para amplificar secuencias de ADN codificadoras de la proteína CTLA-4 humana a partir de mRNA proveniente de células H38, una línea de leucemia asociada a HTLV II (R. Gallo, National Cancer Institute). El mRNA se transcribe de reversa para generar el cADN de la primera cadena. Luego se amplifica el cADN. Estas secuencias se ligan a secuencias que codifican una contrapartida de fusión, tal como se describe en Linsley *et al.* [J. Exp. Med. 174:561 (1991)]. El vector de expresión codifica una proteína de fusión denominada CTLA4Ig, la cual comprende (desde el terminal amino a la terminal carboxi) el péptido señal de oncostatina M, el dominio extracelular de CTLA-4 humano y los dominios H, CH2 y CH3 de IgG1 humana. El péptido señal de oncostatina M se usa en lugar del péptido señal natural CTLA-4 humano. Los residuos de cisteína hallados en el dominio de bisagra de tipo salvaje de la molécula de IgG1 humana se mutaron a serinas en la construcción del vector que codifica la proteína CTLA41 g (Linsley *et al.*, *supra*).

b) Inmunización de animales huéspedes con proteínas CTLA-4 humanas

Para inmunizar animales con inmunógenos que comprenden proteínas CTLA-4 humanas se emplean animales huésped no humanos. El inmunógeno que comprende una proteína de fusión CTLA-4/IgG humana (por ejemplo, CTLA4Ig), se usa para recubrir células bacterianas destruidas por calor de *Staphylococcus A* (StaphA) tal como se describe en el Ejemplo 1b. Ratones BALB/c de seis semanas fueron inyectados en la almohadilla del pie con 50 μ l (volumen empaquetado) de bacterias muertas por calor StaphA recubiertas con aproximadamente 100 μ g de CTLA-4Ig suspendidas en 0,2 ml de PBS.

Se da un total de cinco inyecciones por ratón. El día del refuerzo final y antes de la inyección, se obtuvieron aproximadamente 100 μ l de suero por sangrado intraocular tal como se describe en el Ejemplo 1b. El suero se analizó junto con suero obtenido por la metodología idéntica antes de la primera inyección (es decir suero preinmune).

Se utilizó un ELISA de fijación de CTLA-4Ig humano para demostrar la presencia de anticuerpo que reconoce la proteína de fusión CTLA-4Ig humana en el sangrado posterior a la inmunización. El ELISA de fijación de CTLA-4Ig humano fue conducido tal como se describió con anterioridad en el Ejemplo 1b con la excepción de que las placas de ELISA estaban recubiertas con proteína CTLA-4 humana.

Se obtuvieron suero y ganglios linfáticos de los ratones inmunizados que contienen anticuerpo que reconoce la proteína de fusión CTLA-4Ig humana en el sangrado posterior a la inmunización con diluciones de suero 1000 veces superiores a la dilución a la cual se podía detectar el fondo. Se prepararon linfocitos de los ganglios linfáticos drenados en los ratones inmunizados y luego se usaron para la generación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína CTLA-4 humana tal como se describió antes en el Ejemplo 1c.

Los inmunógenos que comprenden células transformadas que expresan la proteína CTLA-4 humana en la superficie celular se prepararon como sigue. Se usaron vectores de expresión codificadores de toda la proteína CTLA-4

ES 2 308 857 T3

humana para transfectar la línea celular de linfoma murino EL4 (ATCC TIB 39). Las células transfectadas EL4 fueron inyectadas en ratones a razón de 1×10^6 a 1×10^7 células transfectadas/inyección. Las células transfectadas se inyectaron en una solución que comprende PBS. Los ratones se pueden inyectar por vía i.p. o en la almohadilla plantal de la pata trasera. Cuando se dan inyecciones i.p., se administra un total de aproximadamente 4 inyecciones. Cuando se usa la almohadilla plantal como sitio de inyección, se administra un total de aproximadamente 5 inyecciones. Se junta el suero de los animales inmunizados y se analiza la presencia de anticuerpos dirigidos contra la proteína CTLA-4 humana mediante un ELISA tal como se describe en el Ejemplo 1b, con la excepción de que las placas están recubiertas por proteínas CTLA-4 humanas.

10 c) Aislamiento de líneas de hibridoma secretoras de anticuerpos antihumanos CTLA-4

Se aislaron linfocitos de ganglios linfáticos drenados o los bazos de animales inmunizados con el inmunógeno CTLA-4 humano y se fusionaron a células P3X3.Ag8.653 para generar líneas celulares de hibridoma mediante el protocolo de fusión PEG descrito en el Ejemplo 1c. Los sobrenadantes de los cultivos de las cavidades que contienen 1000-5000 células/cavidad se analizaron en cuanto a su reactividad a CTLA-4 humana y a la falta de reactividad contra una proteína distinta de CTLA-4 tal como CD4 humano mediante un ensayo ELISA.

Los hibridomas provenientes de cavidades positivas se clonaron repetidas veces por dilución limitante tal como se describe en el Ejemplo 1c. Las líneas de hibridoma secretoras de anticuerpos monoclonales que son reactivas contra proteínas CTLA-4 humanas, pero no contra proteínas humanas irrelevantes (por ejemplo, CD4 humano), y que tienen la capacidad para teñir transfectantes de células CTLA-4 humanas, pero no los controles de transfectantes se seleccionan para la producción de anticuerpos monoclonales antihumanos CTLA-4.

25 Ejemplo 5

Estimulación ex vivo de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL)

30 Las células huésped son estimuladas *ex vivo*, lo cual les permite diferenciarse a células efectoras inmunes específicas de tumor. Las células luego son reintroducidas en el mismo huésped para mediar los efectos terapéuticos anticáncer.

35 a) Aislamiento de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL)

Los linfocitos infiltrantes de tumor se obtienen mediante técnicas estándar. Tumores sólidos (recién resacados o crioconservados) se dispersan en suspensiones de células únicas por digestión enzimática durante la noche [por ejemplo, agitación durante la noche a temperatura ambiente en medio RPMI 1640 que contiene 0,01% de hialuronidasa tipo V, 0,002% de ADNsa tipo I, 0,1% de colagenasa tipo IV (Sigma, St. Louis), y antibióticos]. Las suspensiones de tumor luego se pasan por gradientes de Ficoll-Hypaque (medio de separación de linfocitos, Organon Teknika Corp., Durham, NC). Las interfaces de gradiente que contienen células tumorales viables y células mononucleares se lavan, se ajustan a una concentración total de células de $2,5$ a $5,0 \times 10^5$ células/ml y se cultivan en medio completo. El medio completo comprende RPMI 1640 con 10% suero humano de tipo compatible inactivado por calor, penicilina 50 IU/ml y estreptomycin 50 μ g/ml (Biofluids, Rockville, MD), gentamicina 50 μ g/ml (GIBCO Laboratories, Chagrin Falls, OH), anfotericina 250 ng/ml (Fungizone, Squibb, Flow Laboratories, McLean, VA), HEPES buffer 10 mM (Biofluids), y L-glutamina 2 mM (MA Bioproducts, Walkersville, MD). Se agrega medio condicionado proveniente de cultivos de células killer activadas por linfoquinas (LAK) alogénicas o autólogas de 3 a 4 días (ver más adelante) a una concentración final de 20% (v/v). Se añade IL-2 recombinante a una concentración final de 1000 U/ml.

Los cultivos se mantienen a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Los cultivos se alimentan semanalmente con cosechas, sedimentación y resuspensión de las células hasta $2,5 \times 10^6$ células/ml en medio fresco. Durante un periodo inicial (por ejemplo, 2 a 3 semanas) de cultivo, los linfocitos proliferan selectivamente, mientras que las células tumorales remanentes generalmente desaparecen por completo.

Para preparar cultivos celulares LAK, se obtuvieron linfocitos de sangre periférica (PBL) de pacientes o donantes normales. Después del pasaje por gradientes de Ficoll-Hypaque, se cultivaron las células hasta una concentración de 1×10^6 /ml en medio RPMI 1640 con 2% de suero humano, antibióticos, glutamo, y buffer HEPES. Se agregó IL-2 recombinante hasta 1000 U/ml. Los cultivos se mantienen durante 3 a 7 días en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37°.

65 b) Estimulación *ex vivo* de TIL

Se incuban 4×10^6 células en 2 ml de medio de cultivo que contiene el mAb anti-CTLA-4 en una cavidad de placas de 24 cavidades a 37°C en atmósfera de 5% CO₂ durante 2 días. El medio de cultivo comprende medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 1 μ M de

ES 2 308 857 T3

piruvato de sodio, 2 mM de L-glutamina recién preparada, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina, 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de fungizona (todos de GIBCO, Grand Island, NY) y 5×10^{-5} M de 2-ME (Sigma). Las células se cosecharon y se lavaron.

5 Las células estimuladas inicialmente se cultivaron luego hasta $3 \times 10^5/\text{cavidad}$ en 2 ml de medio de cultivo con IL-2 humana recombinante (disponible de Chiron Corp., Emeryville, CA; actividad específica de 6 a 8×10^6 U/mg de proteína; unidades equivalentes a 2-3 U Internacionales). Después de 3 días de incubación en IL-2, las células se recolectaron, se lavaron, se contaron para determinar el grado de proliferación, y se resuspendieron en un medio adecuado para la administración intravenosa (i.v.) (por ejemplo soluciones fisiológicas salinas con buffer). Se realizaron
10 cultivos bacterianos para determinar la existencia de contaminación bacteriana antes de la reinfusión de las células activadas.

Después de haber resuspendido las TIL activadas en un medio adecuado para la inyección, se realizó acceso IV en el huésped y se infundió la suspensión celular. Opcionalmente, se trata el huésped con agentes para promover la
15 función *in vivo* y la supervivencia de las células estimuladas (por ejemplo IL-2). De modo alternativo, se administran agentes bloqueadores de CTLA-4 en combinación con los TIL activados a fin de mejorar la estimulación de las células autorreactivas *in vivo*.

20 Ejemplo 6

Efectividad contra tumores establecidos

SA1 es un fibrosarcoma. Tal como se muestra en la Figura 8, el bloqueo de CTLA-4 mediante 10 μg de anticuerpo
25 anti-CTLA-4 por dosis es efectivo incluso cuando se retrasa 7 o 14 días después de la implantación del tumor. Esto indica que el bloqueo de CTLA-4 puede ser efectivo para el tratamiento de tumores establecidos.

Ejemplo 7

30 *Sinergismo con agente estimulador de respuesta inmune*

SM1 es un carcinoma de mama que es poco inmunogénico. Es resistente al rechazo por transfección con B7. Sin embargo, se ha obtenido cierta inhibición de crecimiento mediante el uso de B7 e IFN γ . En el experimento mostrado en
35 la Figura 9, los ratones recibieron implantes subcutáneos de células tumorales SM 1 no modificadas, y los tratamientos indicados en los días 0, 3 y 6. Tal como se muestra, el tratamiento con anti-CTLA-4 (10 $^{\circ}$ $\mu\text{g}/\text{dosis}$) por sí mismo no tuvo efecto sobre el crecimiento del tumor. La inmunización de un sitio contralateral con células transducidas GM-CSF irradiadas tampoco tuvo efecto. Sin embargo, la combinación de los dos dio por resultado el rechazo completo de 4 de 5 ratones. Esto demuestra claramente que el bloqueo de CTLA-4 puede producir sinergismo con GMCSF, y
40 probablemente otras linfoquinas, para obtener el rechazo del tumor.

Ejemplo 8

45 *Bloqueo retrasado de CTLA-4*

RENCA es un tumor poco inmunogénico de crecimiento lento. Tal como se muestra en las Figuras 10 A y B, el bloqueo de CTLA-4 (100 μg de anticuerpo anti-CTLA-4 por dosis) sólo es poco efectivo cuando se inicia en el
50 momento de la implantación del tumor. Sin embargo, es bastante efectivo si se inicia 9 días después de la implantación del tumor. Esto sugiere que la generación de restos tumorales a partir de una masa de tumor relativamente grande es importante como agente para estimular una respuesta inmune para obtener rechazo efectivo. Esto sugiere que el bloqueo de CTLA-4 se podría usar en el momento o poco después de la irradiación o la quimioterapia.

55 Ejemplo 9

El bloque de CTLA-4 mejora la inmunogenicidad de fragmentos de tumor

B16-BL6 fue derivado originalmente de la línea celular de melanoma murino espontáneo B16-F0, por selección *in*
60 *vitro* de características invasivas (Hart, Am. J. Path. 97, n.º 3:587-600 (1979)). Tanto la línea original como su variante expresan niveles bajos de H-2Kb y Db, y son negativos cuando se tiñen para MHC de clase II. La vacunación con B16-BL6 irradiado no protege contra exposiciones posteriores con células B16-BL6 vivas, y la expresión de B7.1 tampoco da por resultado un cambio significativo del crecimiento tumoral *in vivo* (Chen *et al.*, J. Exp. Med. 179:523-532 (1994), resultados no publicados del autor). En consecuencia, se puede considerar que B16-BL6 son poco inmunogénicos. Los
65 autores han investigado medios para atacar este tumor mediante el bloqueo de CTLA-4.

En el experimento mostrado en la Figura 11, los ratones recibieron implantes subcutáneos de células tumorales no modificadas y los tratamientos indicados los días 0, 3 y 6. El bloqueo de CTLA-4 por sí mismo (100 μg de 9H10/dosis)

no tuvo efecto alguno, ni la inmunización con células irradiadas B16 células en un sitio contralateral. Sin embargo, el tratamiento con ambos mostró una pequeña pero significativa y reproducible inhibición del crecimiento del, aunque no se obtuvo ninguna cura.

5 Este abordaje también se usó en condiciones de inmunización protectora. En el experimento mostrado en la Figura 12, los ratones fueron inmunizados con células irradiadas B 16 con y sin bloqueo CTLA-4 (100 μ g 9H10/dosis) y con y sin microesferas de gelatina que contienen citoquina (que contiene 50 ng de γ -interferón y 50 ng de GM-CSF). Los ratones fueron nuevamente expuestos a células tumorales vivas, no modificadas dos semanas más tarde. Los ratones inmunizados con células irradiadas con bloqueo CTLA-4 mostraron significativo deterioro del crecimiento del tumor, comparado con los ratones que recibieron solamente células irradiadas. El mejor efecto protector se obtuvo con microesferas que contienen citoquinas junto con bloqueo de CTLA-4.

10 En conjunto, estos datos indican que el bloqueo de CTLA-4 puede mejorar las estrategias de inmunización mediante el empleo de inmunización activa con células tumorales modificadas o fragmentos de tumor, y que puede tener un efecto sinérgico con citoquinas.

Ejemplo 10

20 *El Bloqueo de CTLA-4 combinado con vacunas contra tumor se puede usar para estimular células T autorreactivas y erradicar los tumores poco inmunogénicos*

En este estudio se demostró que la combinación de bloqueo de CTLA-4 y vacunas productoras de GM-CSF era terapéuticamente efectiva contra el melanoma altamente tumorigénico y poco inmunogénico B16-BL6, en un mecanismo que depende de células CD8+ y NK1.1+, pero independiente de las células T CD4+. Los ratones curados de tumores subcutáneos preestablecidos B 16-BL6 resisten la exposición a B16-BL6 o el B16-F0 de la línea progenitora después de 4 meses. Además, las metástasis pulmonares inducidos por B16-F10 puede ser erradicados mediante el tratamiento de combinación, y las lesiones metastásicas de estos ratones muestran extensa infiltración de linfocitos.

30 Es importante destacar que en ambos modelos de melanoma, subcutáneo y metastático, los ratones sobrevivientes desarrollaron despigmentación de la piel y el pelo, lo cual indica que concurrentemente se indujo autoinmunidad dirigida contra las células pigmentadas. Dado que los animales en los cuales se eliminó CD4 también desarrollaron despigmentación, es muy probable que este fenómeno autoinmune sea inducido por linfocitos T citotóxicos (CTL) dirigidos contra antígenos de pigmentación. Este modelo es muy adecuado para estudiar la significancia de los CTL autorreactivos en respuestas antitumorales, así como para investigar el papel de CTLA-4 en la tolerancia periférica en un contexto relevante para la inmunoterapia de cáncer.

40 *Materiales y métodos*

Ratones: se mantuvieron ratones hembras C57BL/6 (obtenidos de Charles River Laboratories/NCI) de acuerdo con las reglamentaciones del Instituto, que se usaron para los experimentos de tumor cuando tenían 8-12 semanas de edad. Todas las inyecciones subcutáneas se aplicaron después de la inhalación del anestésico metoxiflurano.

45 *Anticuerpos:* la generación y purificación del anticuerpo de hámster antimurino CTLA-4 9H10 se describen en el Ejemplo 1 anterior. De modo similar, se prepararon GK1.5 (anti-CD4), 2,43 (CD8), PK136 (NK1.1), 116,3 (Lit2,1, IgG de rata, obtenidos de B. Fowlkes) en el laboratorio de los autores como ascitis o purificados del sobrenadante mediante el uso de procedimientos estándar. Las IgG murina e IgG de hámster fueron adquiridas de Jackson Immuno Research Labs (West Grove, PA), la IgG de rata era de Sigma (St. Louis, MO). Se usaron RM4,4-PE (CD4), anti-CD8b2-PE y DX5 (Pharmlingen, San Diego, CA) para confirmar las eliminaciones de las poblaciones relevantes.

55 *Líneas celulares y transducción del gen de GM-CSF:* se cultivó B 16-BL6, B16-F10 (obtenido del Dr. I. Fidler, MD Anderson Cancer Center, Houston TX), B 16-F0 (ATCC), y DC2.4 (Shen *et al.*, J. Immunol. 158, n.º 6:2723 (1997)) en DMEM suplementado con 1 U/ml de penicilina, 1 μ g/ml de estreptomycin, 50 μ g/ml de gentamicina, 2 μ M de L-glutamina y 8% de suero fetal bovino (en adelante referido como DMEM completo). Las líneas celulares tumorales derivadas de C57B1/6 EL4 (timoma) y MC38 (carcinoma colorectal, obtenidas del Dr. N. Restifo) se mantuvieron en RPMI, suplementado con antibióticos, L-glutamina, 20 μ M β -mercaptoetanol, y 8% de FCS. Se obtuvieron B16-BL6 y B16-F10 productoras de GM-CSF por transducción retroviral tal como es conocido en la técnica (ver Dranoff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3539-43 (1993). La producción de GM-CSF mediante líneas cortas (F10) o clones (BL6) fue analizada mediante ELISA en emparejado, mediante el uso de anticuerpos disponible en el comercio contra GM-CSF murino (Pharmlingen). Los clones BL6/GM-E, /GM-18 (productores de 5 ó 20 ng de mGM-CSF/10⁶ células/24 h), y la línea corta F10/GM (30-40 ng/10⁶/24 h) fueron cultivadas mediante DMEM completo. La producción de GM-CSF fue confirmada de rutina *in vitro* durante el curso de de experimentos de vacunación. La irradiación de las vacunas antes de la inyección mejoró la producción de GM-CSF ~1,5-2 veces.

Experimentos de exposición subcutánea y tratamiento: los ratones fueron afeitados en el lomo y expuestos por vía subcutánea (s.c.) con 10^4 células B 16-BL6 en PBS. En el mismo día o más tarde, según se indica, se inició el tratamiento mediante la inyección de 10^6 células irradiadas (16.000 Rad) productoras de GM-CSF (en PBS) s.c. en el flanco izquierdo, y se repitió 3 y 6 días más tarde, según se indica. La vacuna consiste en una mezcla 1:1 de BL6/GM-E y BL6/GM-18. El tratamiento con 9H10 o IgG control de hámster se inició simultáneamente o tres días más tarde, con resultados similares. Los anticuerpos se suministraron por vía intraperitoneal (i.p.) hasta $100 \mu\text{g}$ en PBS, usualmente seguido de dos inyecciones de $50 \mu\text{g}$ cada 3 días. El crecimiento del tumor se controló dos o tres veces por semana mediante la medición de diámetros perpendiculares. De conformidad con las reglamentaciones del instituto, los ratones fueron sacrificados cuando los tumores mostraron ulceración severa o alcanzaron un tamaño de 300 mm^2 . La eliminación de células T o NK se llevó a cabo por inyección de los anticuerpos relevantes ($500 \mu\text{g}$ i.p.) 7, 6, y 5 días antes de la exposición, y se mantuvieron mediante inyecciones repetidas cada diez días durante el experimento. Se confirmaron las eliminaciones en ganglios linfáticos y bazo, 1 día antes de la exposición por citometría de flujo mediante el uso de anticuerpos no formadores de bloques cruzados. De rutina, se detectaron $< 1\%$ de células CD4+, células T CD8+ o células NK1.1+ en ganglios linfáticos (después de la eliminación de CD4 o CD8) o bazo (eliminación de NK1.1) en los respectivos ratones, mientras que el tratamiento de ratones con anticuerpos de control (IgG murino, IgG de rata, o 116,3) demostraron perfiles linfocitarios no modificados, en comparación con ratones no tratados.

Tratamiento de metástasis pulmonar: A fin de establecer metástasis pulmonares, se inyectaron ratones i.v. con 5×10^4 o 10^5 células B 16-F10. El tratamiento mediante células irradiadas F10/GM y anticuerpos se inició después de 24 horas, según en mismo protocolo que se reseñó para el tratamiento de tumores subcutáneos. Después de 25 días, se cosecharon los pulmones de cada grupo de tratamiento y se contaron las metástasis de superficie mediante el uso de un microscopio de disección. Los cortes de pulmón incluidos en parafina se tiñeron con hematoxilina-eosina mediante el uso de procedimientos estándar. Para los experimentos de supervivencia se inyectaron células 5×10^4 células B16-F10 i.v. y se inició el tratamiento al día siguiente.

Ensayo de generación de cultivos de CTL y liberación de IFN γ : Se cosecharon los bazo de ratones que rechazaron B16-BL6 y se reestimularon *in vitro* con B16-BL6/B7.1 o una mezcla de B16-F0 y la línea de células dendríticas DC2,4 después de cocultivo durante la noche. Se picaron 5×10^6 células de bazo con 10^5 células estimuladoras irradiadas (16.000 rad) y se añadió IL2 humana recombinante hasta una concentración final de 30 IU/ml. Después de 7 días, se juntaron las células y se purificaron mediante centrifugación por gradiente con Histopaque. Se estimularon las células vivas ($2,5 \times 10^5$ por cavidad) mediante células blanco (5×10^4 por cavidad) en placas de 96 cavidades de base redonda durante 24 horas, después de lo cual se cosechó el sobrenadante y se analizó la presencia de IFN γ mediante ELISA de emparejado.

Resultados

El bloqueo de CTLA-4 junto con vacunas celulares productoras de GM-CSF causa el rechazo de tumores establecidos por B16BL6. Partiendo de la hipótesis de que la presentación de antígenos asociados con tumor podría ser limitante, se combinó el bloqueo de CTLA-4 con células de B 16-BL6 irradiadas productoras de GM-CSF como fuente óptima de antígeno. Ratones C57BL/6 fueron expuestos a 10^4 células B16-BL6 por vía subcutánea y luego tratados a partir del mismo día o 4-12 días más tarde. Se presenta un experimento representativo en la Figura 13A. Como era de esperar, la inyección de anticuerpo 9H 10 bloqueador de CTLA-4 o IgG control de hámster no indujo rechazo de tumores preestablecidos de B16-BL6. Cuando se combinó con IgG control de hámster, la vacunación con células de B 16-BL6 irradiadas productoras de GM-CSF mostró escaso o ningún efecto sobre el crecimiento de tumores ya establecidos. Sin embargo, la combinación de vacuna productora de GM-CSF y de bloqueo de CTLA-4 indujo el rechazo de todos los tumores inyectados el mismo día o 4 días después. Uno de cinco ratones portadores de un tumor de 8 días de células B16-BL6 rechazó un pequeño tumor palpable después del tratamiento de combinación que incluye bloqueo de CTLA-4. No se halló efecto significativo sobre los tumores establecidos 12 días antes. Con la combinación de todos los experimentos, se logró una tasa de éxitos global de los tratamientos de combinación del 80% (68 de 85 ratones se curaron de tumores de células B 16-BL6 de entre 0 y 4 días). Estos resultados corroboran el hallazgo del Ejemplo 7, de que el bloqueo de CTLA-4 y las vacunas productoras de GM-CSF actúan en forma sinérgica para causar el rechazo de tumores poco inmunogénicos.

Al disminuir la cantidad de vacunaciones, los autores hallaron que una dosis única de vacuna productora de GM-CSF administrada el mismo día que la exposición al tumor era suficiente para erradicar los tumores en todos los ratones, cuando se combinaba con bloqueo de CTLA-4 (Figura 13B). De modo similar, una dosis única de anti-CTLA-4 posterior a tres vacunaciones con células productoras de CSF era suficiente para inducir el rechazo de B16-BL6 (no mostrado). Se halló que la producción de GM-CSF por la vacuna era esencial para el efecto sinérgico, dado que la vacunación con células B 16-BL6 irradiadas no transducidas en combinación con anticuerpos anti-CTLA-4 no era efectiva (datos no mostrados).

La combinación de bloqueo de CTLA-4 y vacunas productoras de GM-CSF induce la resistencia efectiva contra la exposición de B16-B L6. Para determinar si los ratones curados de la exposición inicial de B 16-BL6 había desarrollado resistencia contra la nueva exposición, los ratones sobrevivientes fueron sometidos a una nueva exposición de 2×10^4 B16-BL6 en el flanco izquierdo 128 días después de la exposición primaria. Además, se analizó la resistencia a la línea celular original de melanoma B 16-F0 mediante la inyección de 2×10^4 al flanco derecho. Ratones control

no expuestos de edad comparable desarrollaron ambos tumores y fueron sacrificados dentro de los 30 días. Todos los ratones curados de una exposición primaria con B16-BL6, con independencia del bloqueo de CTLA4, rechazaron B 16-F0, mientras que 7 de 9 que recibieron la vacuna de BL6/GM más anti-CTLA4 también rechazaron B16-BL6 (Tabla I siguiente).

TABLA I

El rechazo de B16-BL6 establecido previamente mediante anti-CTLA-4 y vacuna BL6/GM induce resistencia a la nueva exposición con B16-BL6 y B 16-F0 original

Exposición primaria (10^4 B16-B16) tratado con	Incidencia de tumores con exposición secundaria (día 128 después de la primaria)	
	B16-BL6 ¹	B16-F0 ²
vacunación con anti-CTLA-4+BL6/GM ³	2/9 ⁴	0/9
IgG de hámster + vacunación con BL6/GM	2/2	0/2
Control	5/5	5/5

- 1) 2×10^4 células B16-BL6 inyectadas s.c. en flanco izquierdo.
- 2) 2×10^4 células B16-F0 inyectadas s.c. en flanco derecho.
- 3) Ratones sobrevivientes a la exposición primaria con B 16-BL6 después de inyección de 9H 10 y de vacuna BL6/GM los días 0, 3, y 6.
- 4) Fracción de sobrevivientes que desarrollaron la segunda exposición

Dentro de este experimento, los dos ratones que habían rechazado la exposición primaria después de la vacunación BL6/GM sola no pudieron rechazar una segunda exposición a B16-BL6 (Tabla I). En contraste, 7 de 9 ratones que recibieron vacuna BL6/GM más anti-CTLA-4 también rechazaron B16-BL6. En dos experimentos de reexposición, 20 de 24 ratones curados de B16-BL6 por el tratamiento de combinación eran inmunes a la exposición secundaria con B16-BL6, y 11 ratones eran resistentes a la reexposición con B16-F0. Sólo 4 de 8 ratones curados tras la vacunación con células productoras de GM-CSF solo eran resistentes a la reexposición. Si bien no se halló resistencia a la reexposición con B16-BL6 en el 100% de los ratones, el hecho de que todos los ratones rechazaron B16-F0 sugiere que los ratones que sobrevivieron a una exposición primaria con B16-BL6 habían montado una memoria adecuada contra antígeno(s) compartido(s) por la línea original y si variante más invasiva.

CD8+ y NK1. Se requieren células I+ para el tratamiento de combinación de B16-B L6. A fin de evaluar si las células T y NK intervienen en el rechazo de B 16-BL6, se eliminaron las células CD4+, CD8+, o NK 1.1 + antes de la exposición a B16-BL6. El tratamiento se inició el mismo día que la implantación de tumor, según el esquema general de tres inyecciones simultáneas de vacuna y anti-CTLA-4. La eliminación de células CD8+ células anuló el efecto del tratamiento (Tabla II). Los ratones carentes de células NK1.1+ eran también en gran medida incapaces de rechazar su tumor (8/10). Observamos que los ratones portadores de tumor y carentes de NK habían desarrollado múltiples tumores en el sitio de la exposición, lo cual sugiere que las células NK podrían intervenir en la primera línea de defensa contra la exposición a B16-BL6 de MHC clase I^o al reducir la carga de tumor inicialmente inyectada.

ES 2 308 857 T3

TABLA II

Compromiso de subconjuntos de linfocitos en el rechazo de B16-BL6 por cotratamiento con anti-CTLA-4 y vacuna BL6/GM

5

10

15

20

25

30

35

Eliminación ¹	Tumor de B16-BL6 ²	Comentarios
CD4	2/10 ³	despigmentación ⁴ (4/8 sobrevivientes)
CD8	9/10	–
CD4 + CD8	5/5	–
NK1.1	8/10	múltiples tumores desarrollados en el sitio de inyección, sin despigmentación
Control de IgG murino	5/10	despigmentación (3/5 sobrevivientes)
Control de IgG de rata	4/10	despigmentación (4/6 sobrevivientes)
Sin eliminación	5/10	despigmentación (3/5 sobrevivientes)
Sin eliminación, sin tratamiento ⁵	10/10	–

40

45

50

55

60

1) La eliminación de subconjuntos de linfocitos se logró al inyectar anticuerpos eliminadores GK 1,5 (anti-CD4), 2,43 (CDB), PK136 (NK 1,1) o anticuerpos control los días -8, -7, -6 y cada 7 (GK 1,5) a 10 días siguientes. La eliminación se verificó el día -1. Los resultados se compilaron de dos experimentos.

2) La exposición de B 16-BL6 vivo el día 0 fue seguida de vacunación con anti-CTLA-4 y BL6/GM los días 0, 3, y 6.

3) Fracción de ratones incapaces de rechazar la exposición a B16-BL6.

4) Despigmentación observada como efecto secundario del tratamiento (ver el texto).

5) Los ratones no sometidos a eliminación se dejaron sin tratamiento después de la exposición.

65

Sorprendentemente, no se requirieron células T CD4+ para el rechazo del tumor. De hecho, el 80% de los ratones rechazó el tumor, en condiciones subóptimas, en donde el 50-60% de los grupos control rechazó B16-BL6 (Tabla II). La eliminación de las células CD4+ y CD8+ abolió el efecto terapéutico. En apariencia, las células T CD8+ y las células NK1.1+ son necesarias para el rechazo de B16-BL6 mediante el bloqueo de CTLA-4 y las vacunas productoras de GM-CSF. La activación de las células T CD8+ que intervienen en el rechazo de melanoma B16-BL6 no parece ser dependiente de la contribución de CD4.

La actividad de CTL contra B16-B L6 está fuertemente mejorada con el bloqueo de CTLA-4 *in vivo*. Para determinar si los CTL reactivos de tumor eran inducidos por la terapia de combinación, se inmunizaron ratones con BL6/GM más anti-CTLA-4 o IgG control, y se expusieron a B 16-BL6 después de 4 semanas. Diez días después de la exposición se juntaron los bazos de cuatro ratones de cada grupo y se reestimularon con B16-BL6/B7.1, o una mezcla de B16-F10 y una línea de células dendríticas inmortalizada DC2.4. Después de una ronda de reestimulación *in vitro*, se estudió la liberación específica de IFN γ respecto de diferentes variantes de B 16 y dos líneas de células tumorales no relacionadas que expresan el haplotipo H-2^b, el timoma EL4 y el carcinoma colorrectal MC38. Tal como se muestra en la Figura 14, las células T provenientes de ratones vacunados con BL6/GM en presencia de IgG control de hámster produjeron niveles muy bajos de producción detectable de IFN γ en este ensayo, mientras que las células T provenientes de ratones tratados con anti-CTLA-4 *in vivo* tenían secreción muy incrementada de IFN γ específica para B16.

Estos resultados indican que el bloqueo de CTLA-4 durante la vacunación con BL6/GM mejora específicamente la reactividad para un antígeno (o antígenos) expresados por B16 y sus variantes. Además, se halló que todos los cultivos de esplenocitos establecidos de ratones que eran sobrevivientes a largo plazo (3-10 meses) después del tratamiento de combinación reaccionaban específicamente con B16 y sus variantes, según se analizó por liberación de IFN γ después de una ronda de reestimulación *in vitro* (datos no mostrados). El rechazo exitoso de B16-BL6 coincide con la generación de actividad de células T específica de tumor.

Supresión de metástasis pulmonares de B16-F 10 y cura a largo plazo por tratamiento de combinación. A fin de evaluar si anti-CTLA-4 combinado con vacunación sería efectivo contra enfermedad metastática, se inyectaron 10⁵ células B16-F10 (seleccionadas de metástasis exclusivamente a los pulmones; Fidler, Cancer Res. 35:218-234 (1975)) por vía intravenosa y se inició el tratamiento un día después. El día 25, se sacrificaron los ratones y se contaron las metástasis en la superficie de los pulmones. El tratamiento con anti-CTLA-4 solo no mostró efecto apreciable sobre el recuento de las metástasis pulmonares, comparado con la IgG de control (Tabla III siguiente). La inmunización con F10/GM redujo la cantidad de metástasis en unos pocos ratones y en combinación con anti-CTLA4 suprimió aún más la colonización pulmonar e inhibió por completo las metástasis pulmonares en dos de los cinco ratones de muestra.

TABLA III

Cantidad reducida de metástasis pulmonares de B16-F10 tras el tratamiento en combinación con anti-CTLA-4 y vacuna F10/GM

Tratamiento de metástasis pulmonares: ¹	Recuento de metástasis pulmonar: ²
IgG de control de hámster	>200, >200, >200, 25, 16
Anti-CTLA-4	>200, >200, >200, >200, >200
IgG de hámster + vacuna F10/GM	>200, >200, 35, 49, 4
Anti-CTLA-4 + vacuna F10/GM	87, 28, 6, 0, 0

1) Las metástasis pulmonares inducidas por B16-F10 (10⁵, i.v.) fueron tratadas con IgG de hámster, 9H10, y vacuna F10/GM en combinación con cualquier de los anticuerpos los días 1, 4, y 7 posteriores a la exposición.

2) Las metástasis en la superficie pulmonar se contaron con microscopio de disección. Los recuentos se muestran para cada ratón individual, todos los recuentos superiores a 200 se calificaron como >200.

El análisis histológico de estas muestras de pulmón demostró que el bloqueo de CTLA-4 en combinación con vacunación con F 10/GM se asociaba con infiltración de células mononucleares en todas las metástasis teñidas y observada en 3 de los 5 pulmones portadores de tumores (los dos conjuntos remanentes de pulmones se hallaron libres de tumores). El tratamiento con anti-CTLA-4 o con vacunación con F10/GM solos no causó infiltración linfocitaria en los tumores pulmonares o el tejido circundante. Se observaron escasas células polimorfonucleares en las metástasis más pequeñas de vacunados con F10/GM en presencia de IgG de control, pero ningún infiltrado extenso en las lesiones más grandes de cualquiera de los grupos control.

La eliminación de metástasis pulmonares por tratamiento de combinación fue confirmada en un experimento de supervivencia (Figura 15). Ratones expuestos con 5×10^4 células B16-F10, y tratados con IgG control de hámster sucumbieron todos (10/10) por insuficiencia pulmonar debido a la enfermedad metastásica extensa al día 75 posterior a la inyección. El anti-CTLA-4 prolongó por sí mismo la supervivencia, al igual que la vacunación con F10/GM. Sin embargo, 13 de 13 ratones que recibieron el tratamiento de combinación sobrevivieron al día 80, y parecían curados (Figura 15). En consecuencia, el bloqueo de CTLA-4 *in vivo* es terapéuticamente efectivo contra la enfermedad diseminada.

Ratones sobrevivientes de tumores subcutáneos B16-BL6 o metástasis pulmonares B16-F10 desarrollan despigmentación de piel y pelo. Dentro de las 4 a 8 semanas posteriores a la exposición, 56% (38 de 68 ratones curados) de los ratones sobrevivientes desarrollaron despigmentación de la piel y el pelo, comenzando en los sitios de vacunación (flanco izquierdo) y de exposición (lomo). Además, se observó despigmentación en el sitio de vacunación en una proporción similar de ratones sobrevivientes a metástasis pulmonares de B16-F10. El rechazo de un tumor B16-BL6 establecido 8 días antes del inicio del tratamiento indujo rápida y progresiva despigmentación que apareció dentro de los 25 días posteriores a la exposición y se diseminó a sitios distantes, lo cual indica que la respuesta antitumoral relativamente fuerte dio por resultado una rápida manifestación de despigmentación progresiva. La despigmentación ocurrió en ratones que recibieron tratamiento de combinación en un contexto preventivo, pero con frecuencia reducida. Es interesante destacar que la despigmentación no dependía de la presencia de células T CD4+, dado que 4 de 8 ratones en los que se había eliminado CD4 y que rechazaron el tumor también desarrollaron despigmentación progresiva (Tabla II, no mostrado). En algunos casos, se halló que los ratones portadores de tumor (moribundos a pesar del tratamiento con anti-CTLA4 y BL6/GM) desarrollaron pequeñas zonas de despigmentación del pelo en el sitio de crecimiento progresivo del tumor. Nunca se observó despigmentación en los ratones tratados con vacunación de BL6/GM-CSF sin bloqueo de CTLA-4, o en cualquiera de los demás grupos de tratamiento. Estos hallazgos sugieren que el bloqueo CTLA-4 permite la activación de células linfoides autorreactivas que intervienen específicamente en el rechazo de un tumor derivado del linaje melanocítico, y también puede mediar el rechazo de células que contienen pigmento normal en la piel y los folículos pilosos que expresan antígenos de pigmentación.

Los datos anteriores demuestran que el tratamiento de combinación del melanoma B16-BL6 altamente tumorigénico y escasamente inmunogénico da por resultado un índice de curación global del 80%, y que el mejoramiento de la activación de las células T en etapas tempranas de crecimiento tumoral *in vivo* podría inducir el rechazo de la exposición primaria y secundaria con B16-BL6, en forma dependiente de CD8+ CTL. Además, se suprimió el sobrecrecimiento de metástasis pulmonar de B16-F10 previamente establecida después de un programa de terapia de combinación similar. En particular, las metástasis pulmonares podrían ser consideradas una fuente pobre de antígeno para la inducción de respuestas antitumorales. La provisión de antígeno subcutáneo y de bloqueo de CTLA-4 era suficiente para suprimir el sobrecrecimiento de metástasis pulmonar y curar todos los ratones en las condiciones estudiadas, además de destacar la validez de este enfoque terapéutico.

Sin pretender quedar ligado por la teoría, es probable que se pueda atribuir la potencia de la combinación de la vacuna y el anticuerpo anti-CTLA-4 al aumento de la imprimación cruzada de las células T por las APC del huésped debido a la vacuna, junto con la altamente potenciada respuesta de las células T como resultado de la remoción de los efectos inhibidores de CTLA-4 por bloqueo del anticuerpo. Esto causa un mejoramiento sinérgico de la respuesta de las células T hasta un nivel capaz de eliminar la masa preexistente de las células tumorales. Esto podría ocurrir como consecuencia de la activación de una mayor cantidad de células T no expuestas debido a la disminución del umbral de activación, o a una respuesta más sostenida debido a la remoción temporaria de las señales que intervienen en la terminación de la respuesta. El rechazo es acompañado por memoria de largo plazo, tal como indica el hecho de que los ratones curados rechazaron la reexposición en ausencia de tratamiento cuatro meses después del tratamiento inicial.

Tras la erradicación de tumores B16-B16, el 56% de los ratones sobrevivientes desarrolló despigmentación que comenzó en los sitios de vacunación y exposición y se diseminó a sitios distantes. La pérdida de color del pelo indica que se desarrolló autoinmunidad sistémica y progresiva respecto de las células portadoras de pigmento. Para los pacientes con melanoma humano se ha documentado una buena correlación entre despigmentación autoinmune y mejoramiento de la respuesta clínica. Richards *et al.*, J. Clin. Oncol. 10: 1338-43 (1992).

En la presente invención, se desarrollaron a la vez despigmentación y rechazo de tumor sin introducir secuencias proteicas extrañas, lo cual indica que el bloqueo de CTLA-4 permite la (re)activación de células efectoras inmunes transformadas en tolerantes o ignorantes en el reconocimiento de autoantígenos. El tratamiento objeto provee una cura exitosa a largo plazo para este modelo de tumor, dado que todos los ratones tratados con éxito en este experimento han sobrevivido ahora más de 18 meses, sin efectos adversos fácilmente observables además de la despigmentación.

Ejemplo 11

Bloqueo de CTLA-4 en un modelo de tumor primario de próstata

Tal como se demostró en los ejemplos anteriores, la administración de anticuerpo anti-CTLA-4s es suficiente para inducir el rechazo de tumores recién implantados y, en algunos casos, bien establecidos en varios sistemas tumorales murinos trasplantables. La efectividad del bloqueo de CTLA-4 en estos sistemas parece ser dependiente de la inmu-

nogenicidad inherente del tumor. Si bien el bloqueo de CTLA-4 no es por sí solo efectivo en el tratamiento de tumores trasplantables poco inmunogénicos tales como el carcinoma de mama SMI 23 o el melanoma B16, ser puede lograr la erradicación de estos tumores cuando se administra anti-CTLA-4 junto con una vacuna celular para tumor irradiado que expresa GM-CSF. Tal como se mostró por primera vez en el Ejemplo 10, en el caso del melanoma B16, el rechazo de tumor normalmente es acompañado de una despigmentación progresiva similar al vitíligo que acompaña a la inmunoterapia en muchos pacientes con melanoma humano. Este resultado sugiere que en los ratones, como en el hombre, la respuesta antimelanoma está al menos en parte dirigida a los antígenos específicos de melanocitos normales.

Debido a la potencia del bloqueo de CTLA-4 combinado con vacunas celulares en modelos de tumor trasplantables poco inmunogénicos, este estudio examinó la efectividad de esta estrategia en el tratamiento de cáncer prostático primario en ratones TRAMP (adenocarcinoma de próstata en ratón transgénico). En estos ratones, la expresión transgénica del antígeno SV40 T está bajo el control de la transcripción del promotor de probasina de rata que dirige la expresión del oncogén contra epitelio prostático en una forma regulada por andrógenos. La patogenia de la neoplasia en ratones TRAMP refleja la del hombre. Cuando la expresión transgénica comienza en la pubertad, los ratones TRAMP machos desarrollan hiperplasia (a los 5-8 semanas de edad), neoplasia franca (8-12 semanas) y por último adenocarcinoma invasivo con metástasis en los pulmones, ganglios linfáticos y huesos (15-20 semanas). Gingrich *et al.*, Prost Cancer and Prost Dis 6:1-6 (1999).

Tal como se muestra en la presente, el bloqueo de CTLA-4 en combinación con vacunas celulares de tumores irradiados fue efectivo en la reducción de a incidencia de tumores y la severidad de las lesiones prostáticas. Además, hubo significativa acumulación de células inflamatorias en las próstatas de algunos ratones TRAMP vacunados. Por último, la respuesta antitumor está dirigida en parte a antígenos expresados por la próstata normal, dado que la inmunización de ratones no transgénicos con vacunas de células tumorales que expresan GM-CSF en condiciones de bloqueo de CTLA-4 da por resultado marcada prostatitis. Este estudio demostró la efectividad de este régimen inmunoterapéutico en cáncer primario, e indica que los tumores prostáticos expresan antígenos específicos de tejido que pueden proporcionar objetivos de la inmunoterapia.

Métodos

Ratones: Todos los procedimientos en animales fueron realizados de acuerdo con las patas de NIH según protocolos aprobados por la Comisión para atención y uso de animales de la Universidad de California. Los ratones TRAMP fueron criados en la colonia de los autores con antecedentes puros C57BL/6. Para estos experimentos, los ratones TRAMP fueron retrocruzados una vez con ratones FVB/N y analizados respecto de la presencia del transgén mediante PCR, tal como se describió previamente (Greenberg, *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3439-43 (1995)).

Los ratones fueron vacunados por vía subcutánea con 1×10^6 células, cada una de ellas de TRAMP-C 1 y TRAMP-C2 irradiados (12.000 rads) o sus derivados transducidos por GM-CSF, GMTRAMP-C1/C2. A fin de maximizar la exposición antigénica, este tratamiento se repitió otras dos veces, separadas por tres días. Incluso días después de la iniciación de la vacunación, los ratones se inyectaron por vía intraperitoneal con 100 μ g de anti-CTLA-4 (clon 9H10, Ejemplo 1) o con IgG de hámster purificado (Jackson Immunoresearch Corp., West Grove, PA). Dosis adicionales de anticuerpo se administraron 3 y 6 días después del primer tratamiento. Se hizo el seguimiento de los ratones respecto de morbilidad y se sacrificaron cuando la carga de tumor superaba aproximadamente los 50 mm de diámetro o la respiración animal era extenuante. Los ratones se sacrificaron a la edad indicada y se microdisecó el complejo prostático bajo estereomicroscopio. La incidencia de tumores se evaluó inicialmente en la necropsia y se confirmó por examen histopatológico.

Análisis histopatológicos: El complejo prostático se microdisecó en lóbulos individuales y se fijó en 10% de formol neutral con buffer. Los tejidos se procesaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina para los análisis histopatológicos de rutina. Los tejidos de TRAMP fueron examinados con microscopio óptico y calificados mediante los siguientes criterios: al epitelio normal se le asignó una calificación de 1,0; los signos tempranos de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) con penachos del epitelio y aumento de la relación núcleo:citoplasma se calificaron como 2,0; la PIN más avanzada con notables estructuras cribiformes y aumento de las figuras mitóticas y/o apoptóticas se calificó como 3,0; la pérdida de espacios interductales y la invasión de las membranas basales por epitelio neoplásico se calificó como 4,0; la pérdida total de lúmenes ductales con evidencia de adenocarcinoma se calificó como 5,0; y las láminas de células tumorales anaplásticas se calificó como 6,0. A fin de generar una calificación para cada animal, se usó la máxima calificación histológica para los lóbulos ventral, dorsal o lateral de la próstata para calcular una media para el grupo de tratamiento. La calificación pico predominante para todos los animales TRAMP era de 4,0, con escasas calificaciones hidrológicas inferiores a 3,0.

Cultivos celulares: Las células TRAMP-C con células tumorales epitelioideas no clonadas de pasaje temprano (10-15 pasajes *in vitro*), derivadas independientemente de un ratón TRAMP. Las células se propagaron en cultivo mediante DMEM (Biowhittaker, Walkersville, MD) suplementado hasta una concentración final de 5% de suero fetal bovino (Biowhittaker), 5% de Nu-Serum (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA), 5 μ g/ml de insulina (Sigma Chemical, St. Louis, MO), y 0,01 μ M de dihidrotestosterona.

A fin de obtener las líneas que expresan GM-CSF, las células se infectaron con un retrovirus que contiene el gen gm-c sf murino derivado del virus LTR de leucemia murina de Maloney, mediante el uso de la línea productora ψ CRIP (presente de Somatix, Inc, Alameda, CA). Los sobrenadantes que contienen retrovirus se agregaron a los

cultivos de TRAMP-C y se incubaron durante la noche en presencia de 8 $\mu\text{g/ml}$ de polibreno (Sigma). La producción de GM-CSF fue analizada por ELISA (Pharmlingen, San Diego, CA). Tanto GMTRAMP-C1 como GMTRAMP-C2 secretaron GM-CSF a 150-200 ng/ml/1x10⁶ células/24 horas. Las células usadas para la inyección fueron liberadas de los discos de cultivo de tejido con tripsina (BioWhittaker) y se lavaron tres veces en solución salina equilibrada de Hank (BioWhittaker). Las células se resuspendieron hasta una densidad de 1x10⁶ células/ml, se irradiaron con 12.000 rads mediante un irradiador de fuente de cesio y se inyectaron por vía subcutánea en un volumen de 0,1 ml.

Resultados

De la incidencia de tumor primario en ratones TRAMP después del tratamiento con vacunas celulares y anti-CTLA-4. Los ratones TRAMP machos fueron vacunados con una combinación de TRAMP-C 1 y TRAMP-C2 irradiados (TRAMP-C 1/C2) o TRAMP-C 1/C2 transducidos para expresar el gen murino gm-c sf (GMTRAMP-C1/C2) a las 14-16 semanas de edad. El tratamiento con anticuerpo comenzó 7 días después de la vacunación. A fin de obtener una indicación temprana de la efectividad de los tratamientos, cuatro ratones de cada grupo fueron sacrificados tres semanas después de comenzar con el tratamiento y examinados respecto de la incidencia de tumor en la necropsia macroscópica y en el nivel microscópico tras la microdissección de los lóbulos prostáticos. Si bien no hubo significativas diferencias en el peso medio de los animales o el tracto urogenital entre los grupos de tratamiento, hubo una notable diferencia en la incidencia de tumores. Con independencia de la vacuna, 11 de 12 ratones (92%) en los grupos de tratamiento que recibieron anticuerpo control tenían tumor detectable. En contraste, sólo 3 de 12 (25%) ratones que recibieron anti-CTLA-4 tuvieron tumor detectable.

A las tres semanas después de tratamiento, los tumores de los ratones tratados con anticuerpo control eran suficientemente grandes para justificar la preocupación sobre la supervivencia de los restantes 150 ratones. En consecuencia, a fin de evaluar la incidencia de tumores y el grado de tumor, los restantes 25 ratones de cada grupo fueron sacrificados 5 semanas más tarde (u ocho semanas después del tratamiento), y se evaluaron los siguientes criterios en la necropsia macroscópica y la microdissección del complejo prostático: peso del animal, peso de la próstata, incidencia de tumores e histopatología de la enfermedad prostática. De modo similar a los análisis a las 3 semanas después del tratamiento, no hubo significativas diferencias de peso de los animales o peso de las próstatas entre cualquiera de los grupos de tratamiento. Sin embargo, hubo diferencias significativas en incidencia de tumores (Figura 16A). Se observó una incidencia de tumor significativamente inferior en ratones tratados con anti-CTLA-4 y la vacuna TRAMP-C1/C2 (43%, $P = 0,05$) o la vacuna GMTRAMP-C1/C2 (33%, $P = 0,009$) respecto de los ratones tratados con anticuerpo control solo (69%).

El tratamiento con anti-CTLA-4 solo no tuvo ningún efecto significativo sobre la incidencia de tumor (64%), ni hubo reducción significativa de incidencias de tumores en ratones que recibieron tratamiento con anticuerpo control y con cualquiera de las vacunas (55% de TRAMP-C1/C2 y 75% de GMTRAMP-C1/C2). En consecuencia, ni el bloqueo de CTLA-4 ni la vacunación sola fueron efectivos para el tratamiento de tumores primarios en ratones TRAMP. No obstante, la combinación de anti-CTLA-4 y cualquiera de las vacunas tuvo un efecto sinérgico sobre la incidencia de tumores. La expresión de GM-CSF por la vacuna puede potenciar la respuesta antitumor, dado que la incidencia de tumores era ligeramente inferior en ratones vacunados con GMTRAMP-C1/C2 (33% de anti-CTLA-4+GMTRAMP-C1/C2 versus 43% de anti-CTLA-4+TRAMP-CUC2).

Dado que cada grupo contenía ratones provenientes de camadas con fechas de nacimiento separadas por dos semanas, se reevaluó la incidencia de los tumores en función de la edad de iniciación del tratamiento. Tal como se muestra en la Figura 16B para ratones vacunados con GMTRAMP-C1/C2, hubo una significativa reducción de la incidencia de tumores en los ratones tratados a las 14 semanas de edad ($p = 0,003$), pero no en el grupo tratado a las 16 semanas de edad ($p = 0,1$). Esto sugiere que la etapa de desarrollo del tumor en el momento de la inmunoterapia de los ratones TRAMP influye sobre la eficacia del tratamiento. La incidencia de tumor en ratones tratados con TRAMP-C1/C2 y anti-CTLA-4 era equivalente en cualquier edad de tratamiento y no era significativamente diferente de los ratones control.

Reducción del grado del tumor en ratones TRAMP tratados con inmunoterapia de combinación. A fin de evaluar la severidad de las lesiones prostáticas en ratones TRAMP, se preparó cada lóbulo individual de la próstata para el análisis histopatológico de rutina. Se usó una escala de calificación para evaluar el grado de transformación o grado de tumor observado en las próstatas de ratones TRAMP, tal como se describió con anterioridad. La calificación histológica pico para los lóbulos prostáticos ventral, dorsal o lateral se determinó para cada animal y se calculó el promedio para el grupo de tratamiento como calificación pico media. Tal como se muestra en la Figura 17A, hubo una significativa reducción de la severidad de las lesiones en ratones tratados con anti-CTLA-4 y cualquiera de las vacunas. Específicamente, los ratones TRAMP tratados con TRAMP-C1/C2 y anti-CTLA-4 tuvieron una calificación significativamente inferior (calificación media de pico 4,6) que los ratones control tratados con Ig (calificación media de pico 5,5, $p = 0,03$). Aún más notable fue el descubrimiento de que los ratones tratados con GMTRAMP-C1/C2 y anti-CTLA-4 tenían un grado de tumor significativamente inferior (calificación media de pico 3,9) que todos los tres grupos de control: control Ig/sin vacuna ($p = 0,0009$), control Ig/GMTRAMP-C1/C2 (calificación media de pico 5,5, $p = 0,0002$), y tratamiento anti-CTLA-4 solo (calificación media de pico 4,8, $p = 0,04$). El tratamiento con cualquiera de las vacunas sin bloqueo de CTLA-4 o con bloqueo de CTLA-4 solo no tenía efecto significativo sobre el grado de tumor. Estos hallazgos demuestran que además de reducir la incidencia de tumores primarios a las 8 semanas después del tratamiento, la vacunación con una vacuna basada en células de tumor en combinación con bloqueo de CTLA-4 reduce la severidad de las lesiones prostáticas en ratones TRAMP.

Tal como se realizó para el análisis de la incidencia de tumores, los datos histológicos se volvieron a analizar para el grado de tumor en función de la edad al momento del tratamiento (Figura 17B). De modo similar a la incidencia de tumor, la máxima significancia estadística residió en ratones tratados a las 14 semanas de edad. Los ratones tratados con GMTRAMP-C1/C2 y anti-CTLA-4 (calificación media de pico = 3,5) tenían menor grado de tumor que los ratones tratados con GMTRAMP-C 1/C2 e Ig control (calificación media de pico = 5,3, $p = 0,0002$) y los ratones tratados con Ig control sola (calificación media de pico = 4,7, $p = 0,0002$). Es interesante destacar que, al ser tratados a las 16 semanas de edad, los ratones TRAMP que recibieron la vacuna GMTRAMP-C 1/C2 y anti-CTLA-4 (calificación media de pico = 4,5) solo tuvieron una calificación media de pico ligeramente inferior a los ratones tratados con GMTRAMP-C 1/C2 e Ig control (calificación media de pico = 5,6, $p = 0,03$).

Quizás la propiedad histológica más destacada de estos análisis haya sido observada en los ratones tratados con GMTRAMP-C1/C2 y anti-CTLA-4, en los cuales hubo una acumulación de células inflamatorias en los espacios interductales. En estos ratones, las células inflamatorias se asociaron estrechamente con la vasculatura hallada en el estroma. En contraste, no hubo acumulación detectable de células inflamatorias en cualquiera de los ratones tratadas con Ig control. En ratones TRAMP tratados con una vacuna que expresa GM-CSF sola, hubo áreas ocasionales en las cuales se detectaron células inflamatorias, pero estos sitios no eran tan extensos como los observados en ratones tratados también con anti-CTLA-4. Las propiedades morfológicas de las células infiltrativas sugieren que la inflamación perivascular comprendía células mieloides, así como células linfoides.

Inducción de prostatitis en ratones no transgénicos por vacunación y bloqueo CTLA-4. La reducción de incidencia y la severidad de tumores junto con los infiltrados inflamatorios de la próstata en ratones TRAMP ocho semanas después de la inmunización eran indicadores de una potente respuesta inmune. El hecho de que la tumorigénesis en estos ratones es impulsada por la expresión específica de próstata de SV40 Tag planteó la posibilidad de que la respuesta antitumoral esté dirigida contra epitopos derivados de este oncogen viral. Los autores consideraron esto poco probable, dado que la expresión TAG no pudo ser detectada en las células tumorales de la vacuna mediante RT-PCR, y las células tumorales lisadas por CTL no eran reactivas contra restringidos por H-2^b de Tag (comunicación personal, S. Tevethian y L. Mylin, Pennsylvania State University).

A fin de determinar si la respuesta inmune generada por el régimen terapéutico se limitaba a antígenos codificados por el oncogén, se vacunaron ratones C57/BL6 no transgénicos y se examinaron las próstatas para buscar evidencias de inflamación 28 días después. No hubo evidencia de inflamación significativa o daño tisular en los lóbulos dorsolateral o ventral de las próstatas de los ratones vacunados solo con la vacuna GMTRAMP-C1/C2. Sin embargo, hubo extensa infiltración de células mononucleares y destrucción de epitelio glandular del tracto reproductivo masculino, incluso de la próstata dorsolateral en ratones vacunados con GMTRAMP-C1/C2 y tratados con anti-CTLA-4. Estos resultados demuestran que la respuesta desencadenada por el régimen de vacunación está dirigido en parte a antígenos expresados por células prostáticas normales.

Los datos anteriores demuestran que el bloqueo de CTLA-4 se puede combinar sinérgicamente con vacunas celulares que expresan citoquinas a fin de producir un régimen de tratamiento efectivo para el tratamiento de tumores primarios. La reducción la incidencia de tumores, así como del grado histológico del tumor indica que la combinación de una vacuna celular junto con anti-CTLA-4 era suficiente para ralentizar la progresión de tumores prostáticos primarios. No es sorprendente que el sistema inmune es incapaz de eliminar completamente los tumores en este modelo agresivo, pero es notable que una respuesta inmune antitumoral pueda tener un impacto significativo sobre la progresión de la enfermedad en una situación en la cual todo el órgano presenta transformación. La capacidad de una vacuna celular en combinación con el bloqueo de CTLA-4 para reducir significativamente la incidencia y la carga de tumores en un modelo TRAMP agresivo subraya la destacada eficacia de este enfoque inmunoterapéutico.

Los ratones TRAMP tratados con la vacuna o con anticuerpo solo no mostraron reducción de la incidencia de tumores o el grado de tumor, mientras que la combinación de ambos dio por resultado una significativa reducción de ambos criterios. Esto sugiere que una fuente adicional de antígeno proveniente de la vacuna celular contribuye a la imprimación de las células T, lo cual es incentivado por el bloqueo de las interacciones con CTLA-4/B7. El hecho de que la incidencia de tumores y el grado de tumor fueran inferiores en ratones que recibieron la vacuna GMTRAMP-C1/C2, respecto de los que recibieron la vacuna TRAMP-C1/C2 sugiere que el efecto es incentivado por el reclutamiento y la activación de las APC por la expresión de GM-CSF.

La vacunación de ratones no transgénicos con la misma estrategia terapéutica que demostró ser efectiva para el tratamiento de ratones TRAMP condujo a prostatitis autoinmune y a la destrucción de parte del epitelio prostático. Este descubrimiento sugiere que el enfoque de la vacunación es capaz de inducir una respuesta autoinmune contra antígenos prostático normales. Estos resultados sostienen aún más el concepto de que la inmunidad tumoral efectiva de hecho está estrechamente ligada a la autoinmunidad.

Más que ser vista como un efecto secundario problemático de la inmunoterapia tumoral, la inducción intencional de la autoinmunidad contra antígenos específicos de tejido definidos puede proporcionar una estrategia práctica para la generación de respuestas antitumorales efectivas. Tal como se demuestra en la presente, el bloqueo de CTLA-4 de la presente invención provee un efectivo tratamiento inmunológico de tumores originados de tejidos no esenciales.

Ejemplo 12

El bloqueo de CTLA-4 induce inmunidad contra péptidos derivados de proteínas específicas de melanoma normales

5 gp100 es una proteína específica de melanocitos identificada como blanco frecuente de células T provenientes de pacientes con melanoma humana. Los trabajos previos demostraron que los ratones no pueden ser inmunizados con péptidos derivados de los péptidos murinos normales, pero dicha inmunidad contra el péptido murino podría ser obtenida si se inmunizaban los ratones con la correspondiente secuencia humana. Esto sugirió que la inmunización con humanos rompió la tolerancia para el ratón, lo cual permite desarrollar la autoinmunidad. Este estudio estuvo
10 dirigido a determinar si el bloqueo de CTLA-4 podría ser efectivo para la inducción de autoinmunidad contra el péptido singénico murino.

Se aislaron células dendríticas (DC) esplénicas de ratones C57BL6 (H-2b) por técnicas convencionales. Las DC luego se incubaron con y sin un péptido fijador de H-2b correspondiente a la secuencia normal de gp100 murino
15 (Mgp100). El día -21, se inmunizaron los ratones con DC pulsadas o no pulsadas con péptido, seguido de inyección de 100 µg de anti-CTLA-4 (MAb 9H10) o anticuerpo control de hámster (MAb 560). Los días -14 y -7, los ratones recibieron refuerzo por inyección de DC apropiados, pero sin ningún tratamiento de anticuerpo. El día 0, los ratones de cada cohorte de tratamiento se separaron en dos grupos para el análisis.

20 Grupo A: células T de ganglio linfático fueron purificadas y examinadas en su capacidad para producir IFN γ en respuesta a la estimulación por células presentadoras de antígeno singénicas pulsadas con Mgp100. Tal como se muestra en la Figura 18, sólo los ratones inmunizados en condiciones de bloqueo de CTLA-4 fabricaron cantidades significativas de IFN γ .

25 Grupo B: se expusieron los ratones a células de melanoma B16 implantadas subcutáneamente en el lomo. Se evaluó el crecimiento del tumor por medición del diámetro en dos dimensiones mediante calibres. Tal como se muestra en la Figura 19, sólo el grupo inmunizado en condiciones de bloqueo de CTLA-4 mostró inhibición de crecimiento del tumor. Aunque finalmente todos los ratones sucumbieron al tumor, este resultado muestra la inducción de una respuesta antitumoral muy efectiva.

30 Los ejemplos anteriores proporcionan contundente apoyo al potencial terapéutico del bloqueo de la señal inhibidora de activación de células T mediada por CTLA-4 como estrategia para mejorar las respuestas antitumorales por inducción de la inmunidad contra autoantígenos específicos de tejido.

35 Si bien la invención precedente ha sido descrita con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo a objeto de claridad de comprensión, será fácilmente aparente para los expertos en la técnica, a la luz de las enseñanzas de la presente invención que se le pueden hacer ciertos cambios y modificaciones sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

40

45

50

55

60

65

ES 2 308 857 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un anticuerpo anti-CTLA-4 o su fragmento y una preparación de autoantígeno para la fabricación de un medicamento para tratar metástasis establecida.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la preparación de autoantígeno comprende células tumorales.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que las células tumorales son células tumorales irradiadas.
- 10 4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además comprende el uso de una citoquina en la fabricación de dicho medicamento.
- 15 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la citoquina se provee como células tumorales transducidas con la citoquina.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que las células tumorales son células irradiadas.
7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la citoquina es GM o GM-CSF.
- 20 8. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende el uso de una vacuna de tumor en la fabricación de dicho medicamento.
- 25 9. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el medicamento es para tratar metástasis en las cuales la pérdida o modificación de parte o la totalidad del tejido normal es aceptable.
- 30 10. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dichas metástasis son metástasis pulmonares de un melanoma.
- 30 11. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho medicamento es para tratar un humano.
- 35 12. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 35 13. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
- 40 14. Un anticuerpo anti-CTLA-4 o su fragmento para ser usado en el tratamiento de metástasis establecidas en combinación simultánea o secuencial con una preparación de autoantígeno.
- 45 15. El anticuerpo o su fragmento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la preparación de autoantígeno comprende células tumorales.
- 45 16. El anticuerpo o su fragmento de acuerdo con la reivindicación 15, en el que las células tumorales son células tumorales irradiadas.
- 50 17. El anticuerpo o su fragmento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, para ser usado en el tratamiento de metástasis establecidas en combinación simultánea o secuencial con una citoquina, además de la preparación de autoantígeno.
- 50 18. El anticuerpo o su fragmento de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la citoquina se proporciona como células tumorales transducidas con la citoquina.
- 55 19. El anticuerpo o su fragmento de acuerdo con la reivindicación 18, en el que las células tumorales son células irradiadas.
- 60 20. El anticuerpo o su fragmento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en el que la citoquina es GM o GM-CSF.
- 60 21. El anticuerpo o su fragmento de acuerdo con la reivindicación 14, para ser usado en combinación simultánea o secuencial con una vacuna de tumor.
- 65 22. El anticuerpo o su fragmento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21, que es para usar en el tratamiento de metástasis en las cuales la pérdida o modificación de parte o la totalidad del tejido normal es aceptable.
- 65 23. El anticuerpo o su fragmento de acuerdo con la reivindicación 22, que es para usar en el tratamiento de metástasis pulmonar de un melanoma.

ES 2 308 857 T3

24. El anticuerpo o su fragmento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 23, que es para usar en el tratamiento de un ser humano.

5 25. El anticuerpo o su fragmento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 24, que es un anticuerpo monoclonal o su fragmento.

26. El anticuerpo o su fragmento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 25, que es un anticuerpo humanizado o su fragmento.

10 27. Una preparación de autoantígeno para usar como agente estimulador de respuesta inmune en el tratamiento de metástasis establecidas en combinación simultánea o en secuencia con un anticuerpo anti-CTLA-4 o su fragmento.

15

20

25

30

35

40

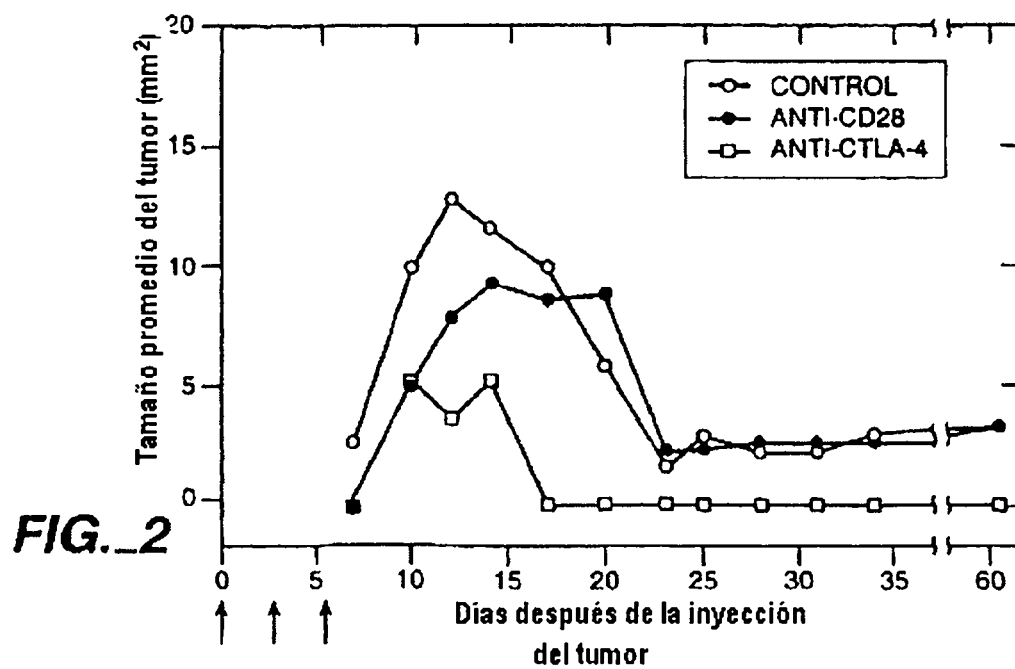
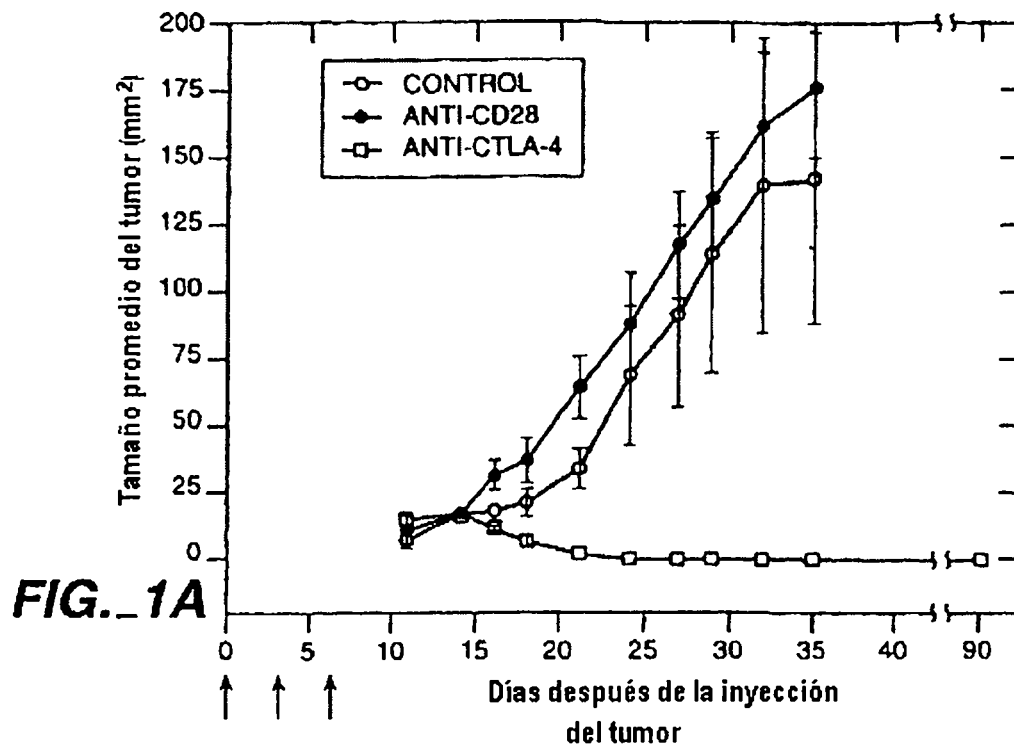
45

50

55

60

65



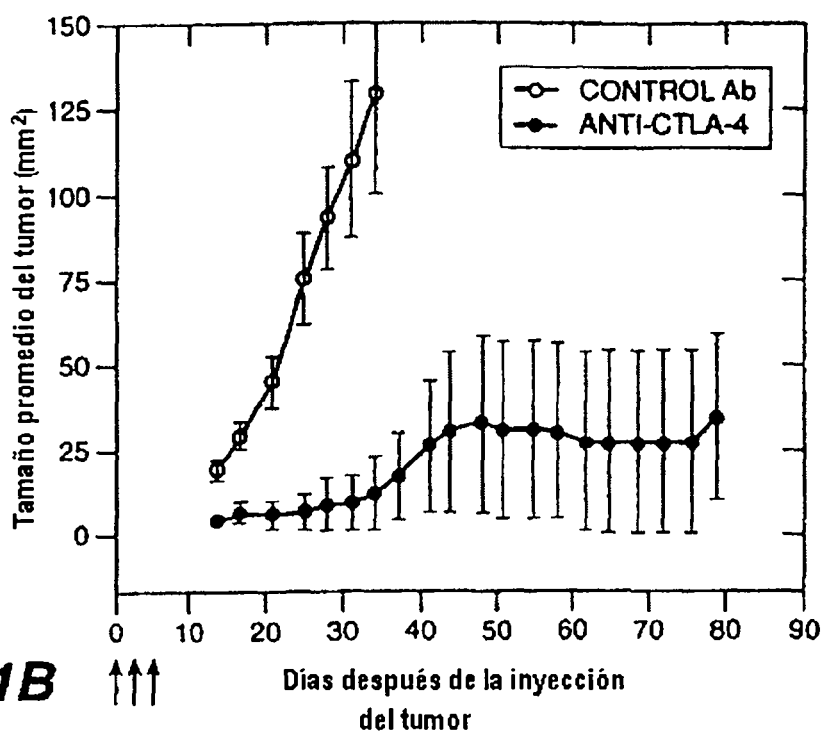


FIG. 1B

↑↑↑

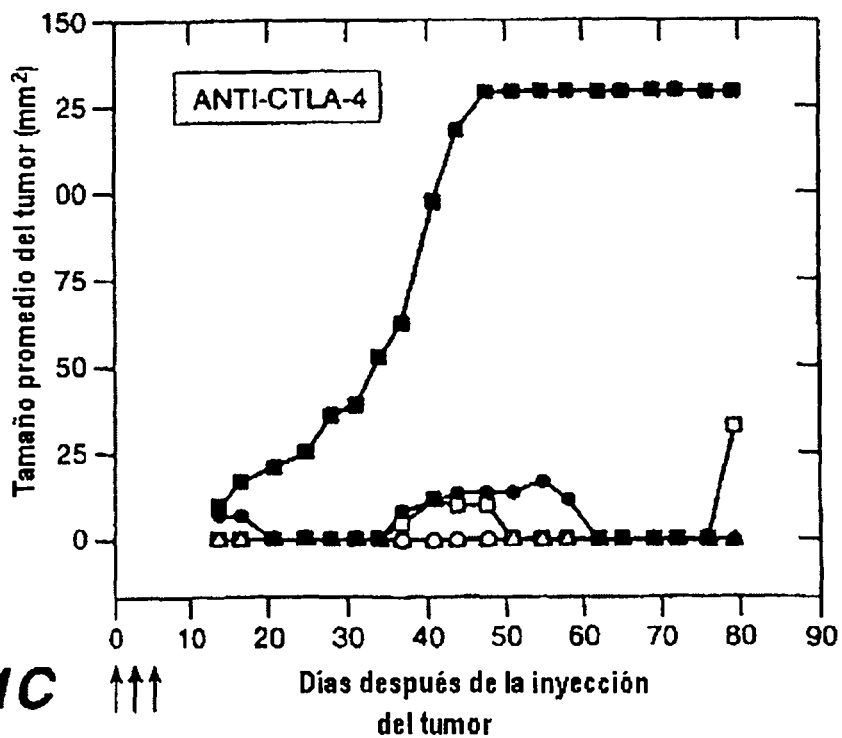
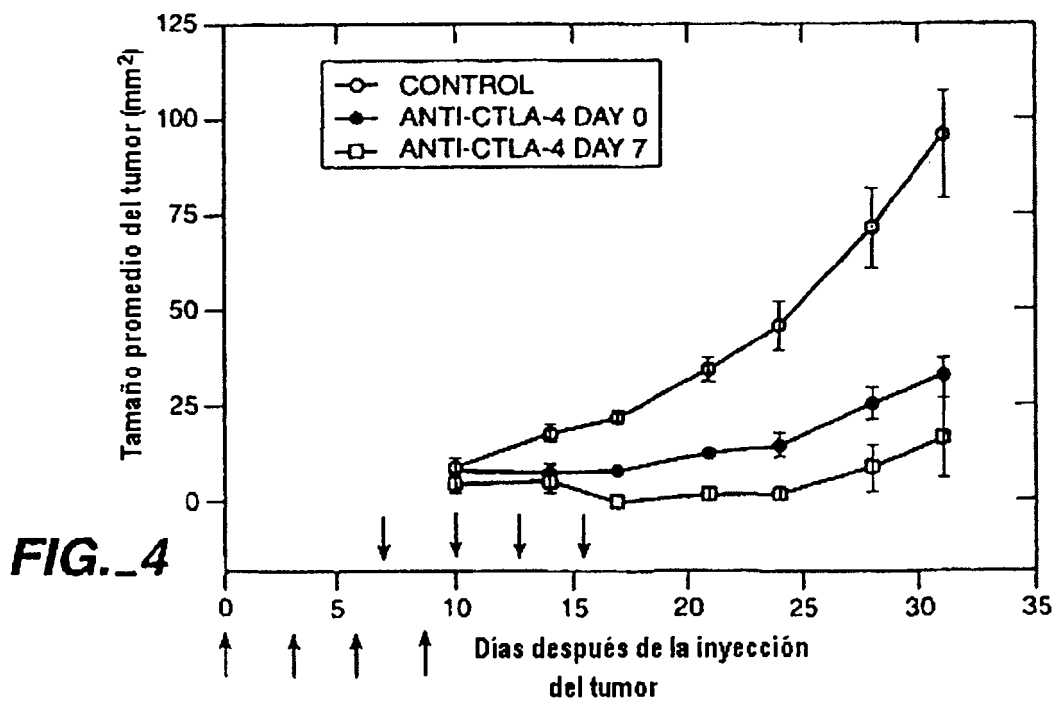
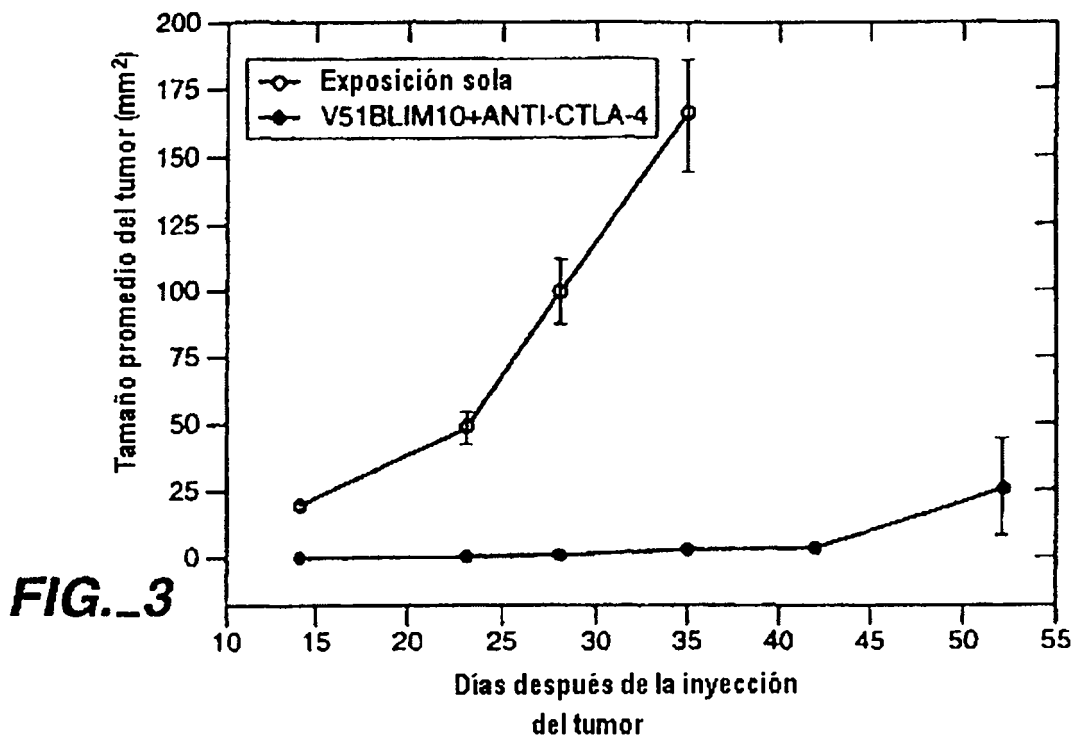


FIG. 1C

↑↑↑



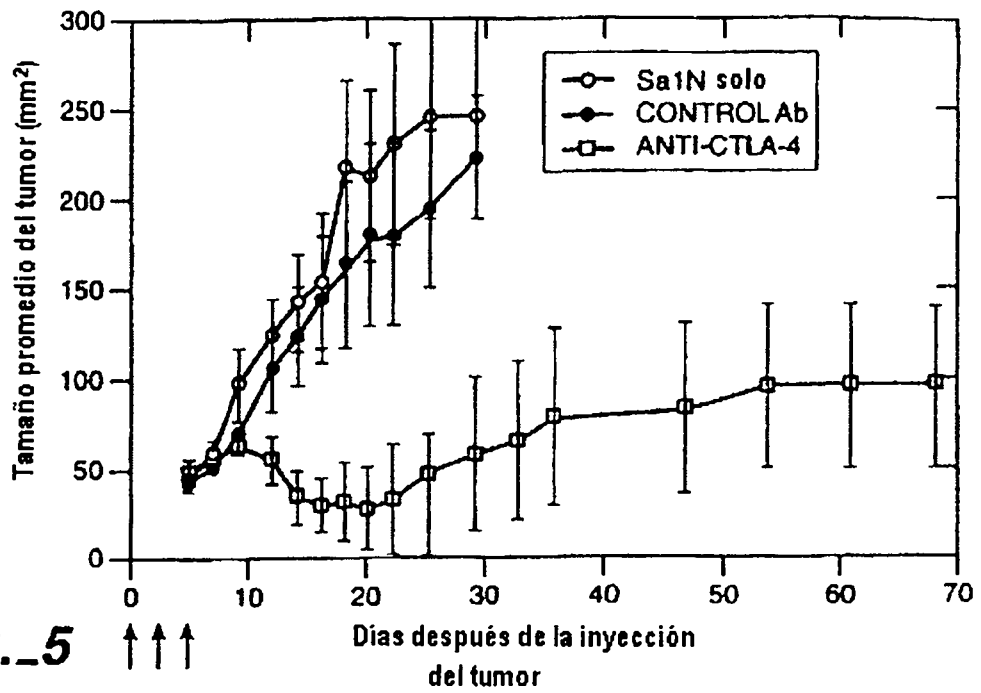


FIG. 5 ↑↑↑

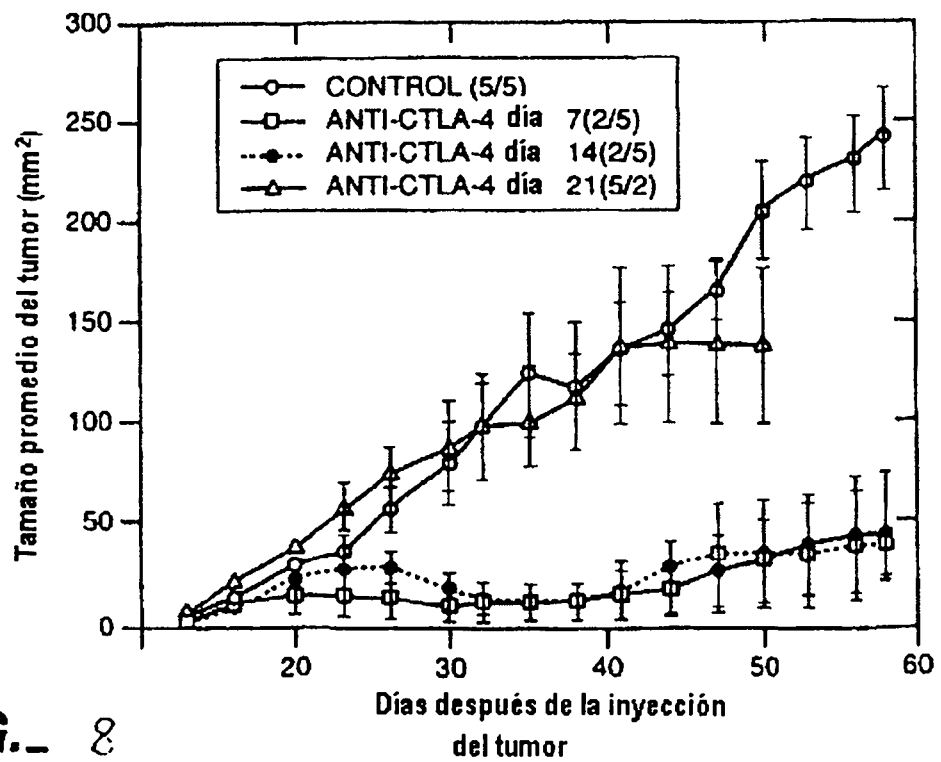


FIG. 6 ⌘

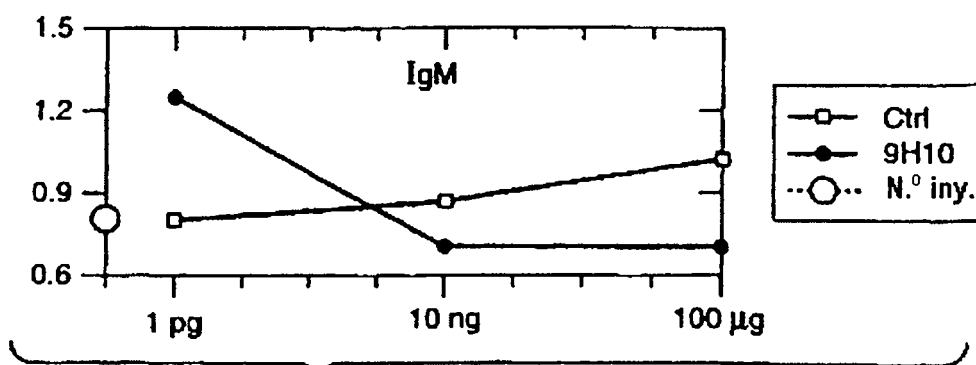


FIG._6A

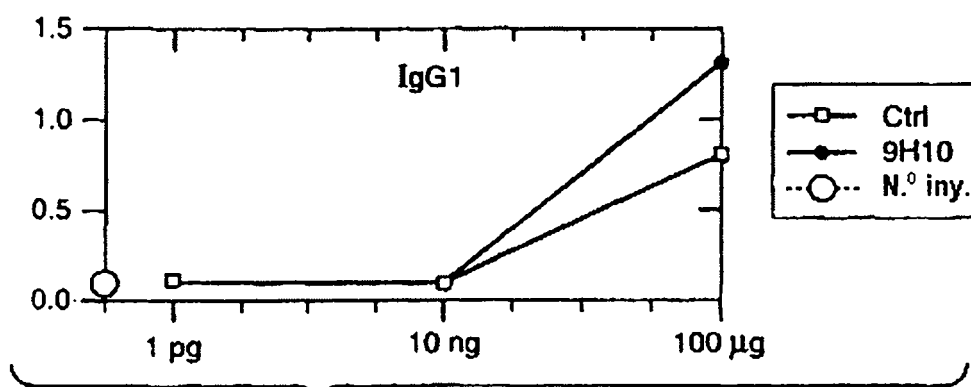


FIG._6B

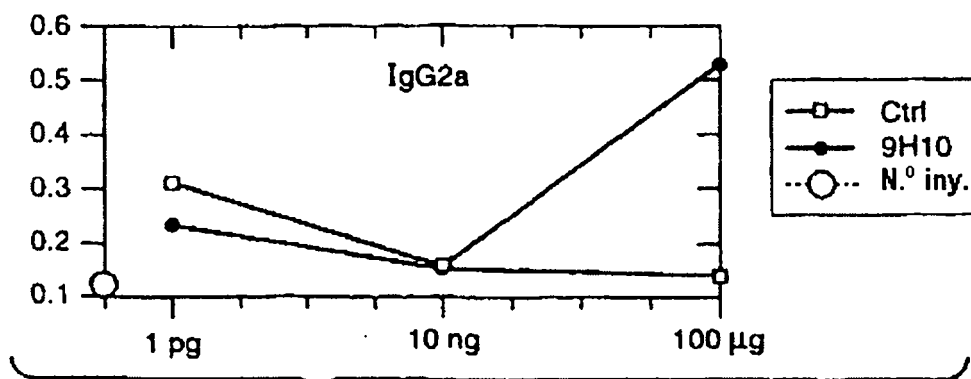


FIG._6C

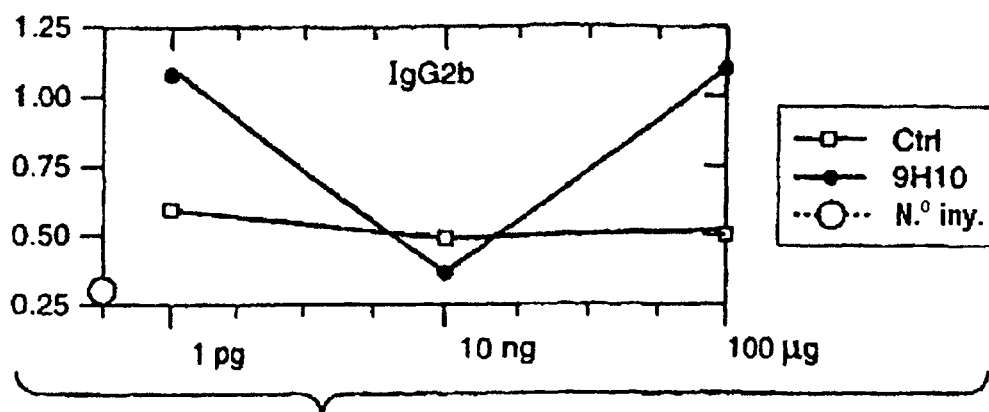


FIG._6D

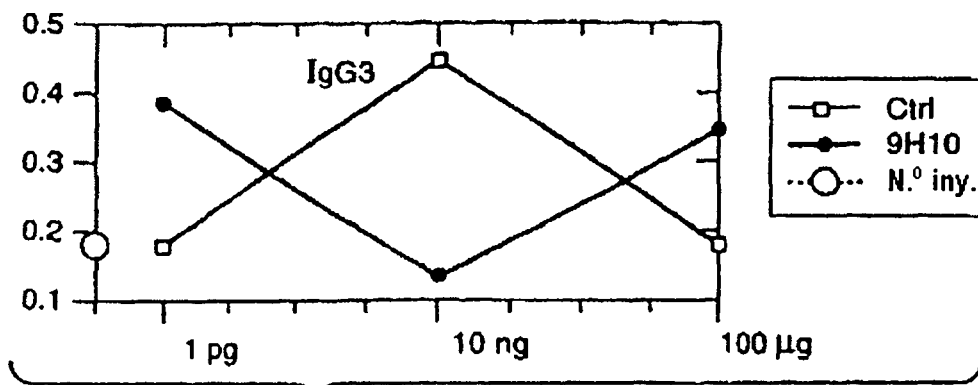


FIG._6E

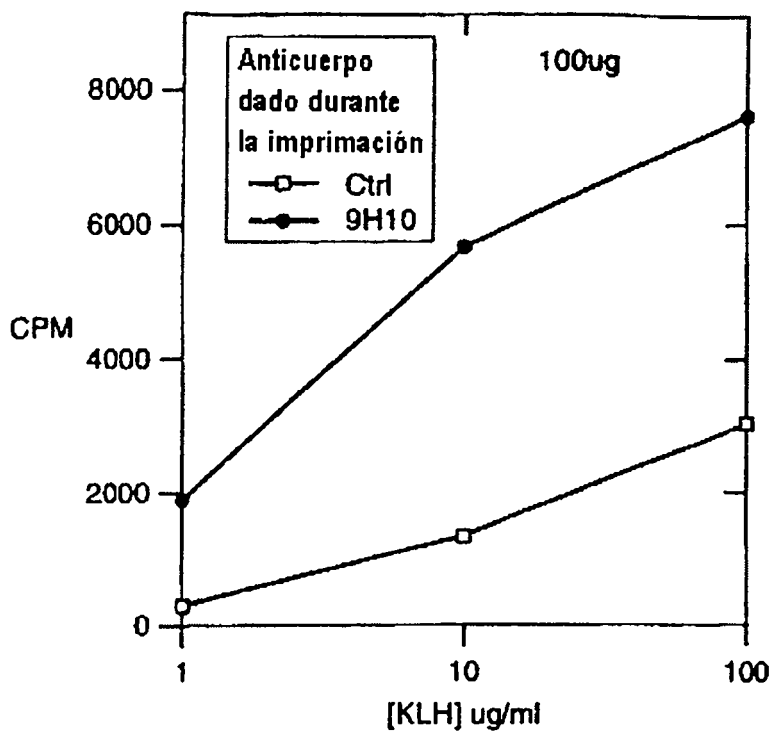


FIG. 7A

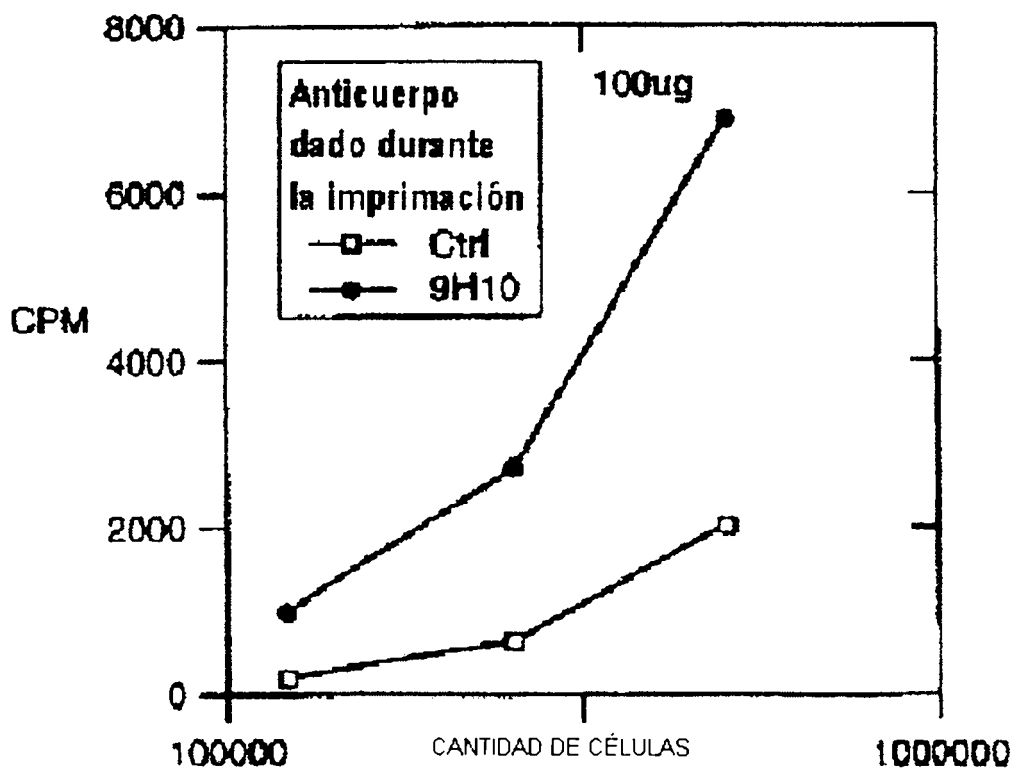


FIG. 7B

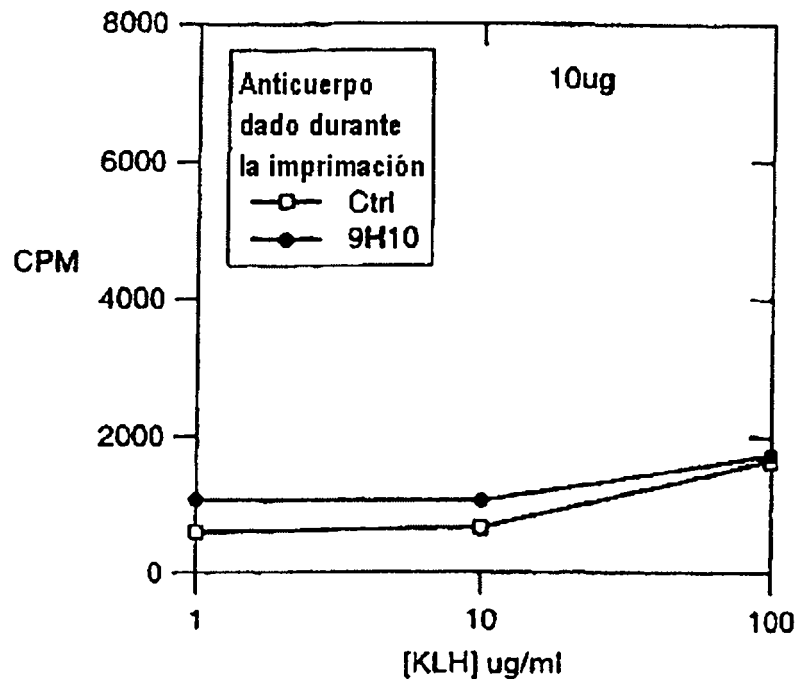


FIG._7C

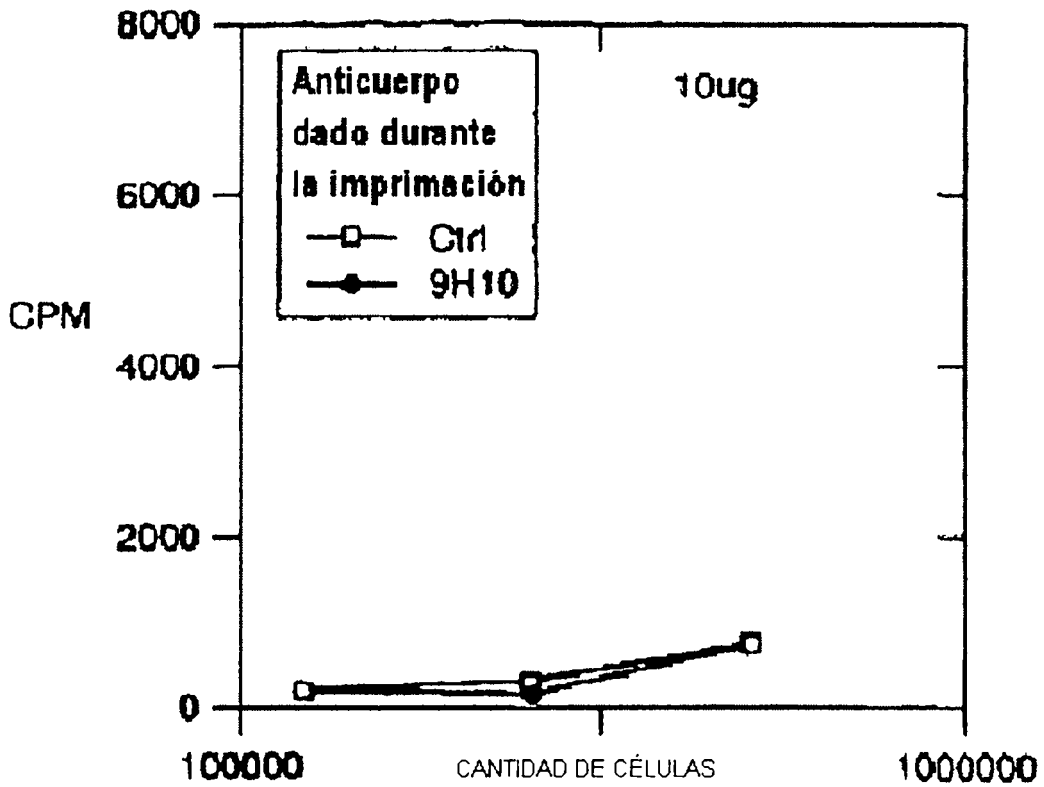


FIG._7D

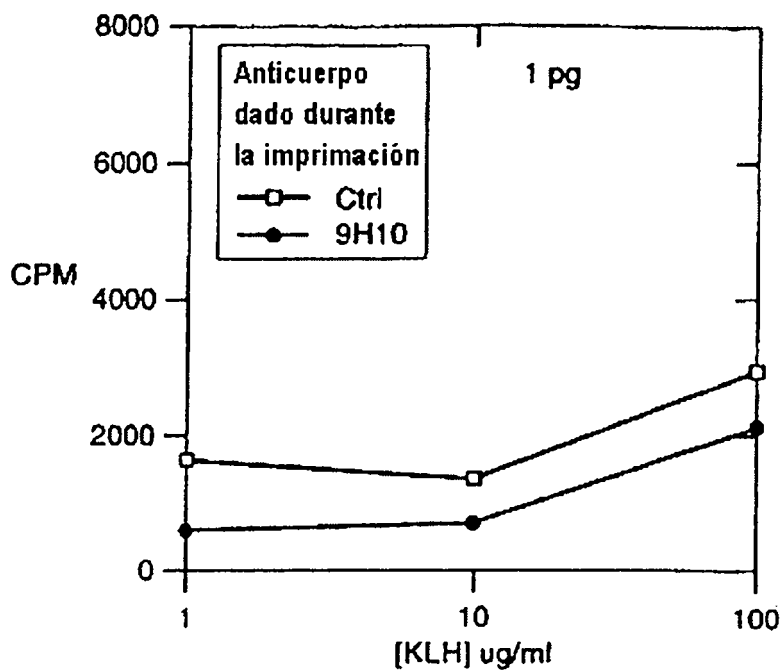


FIG._7E

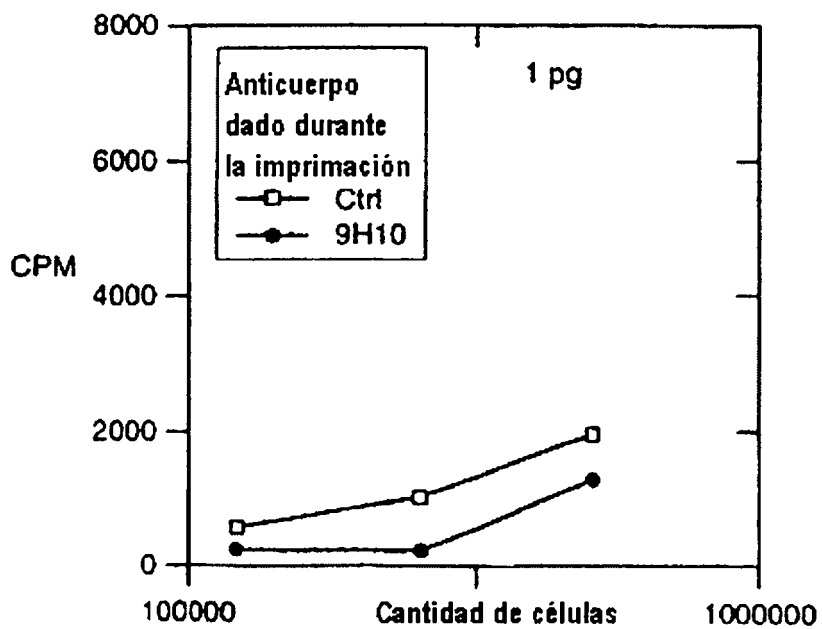


FIG._7F

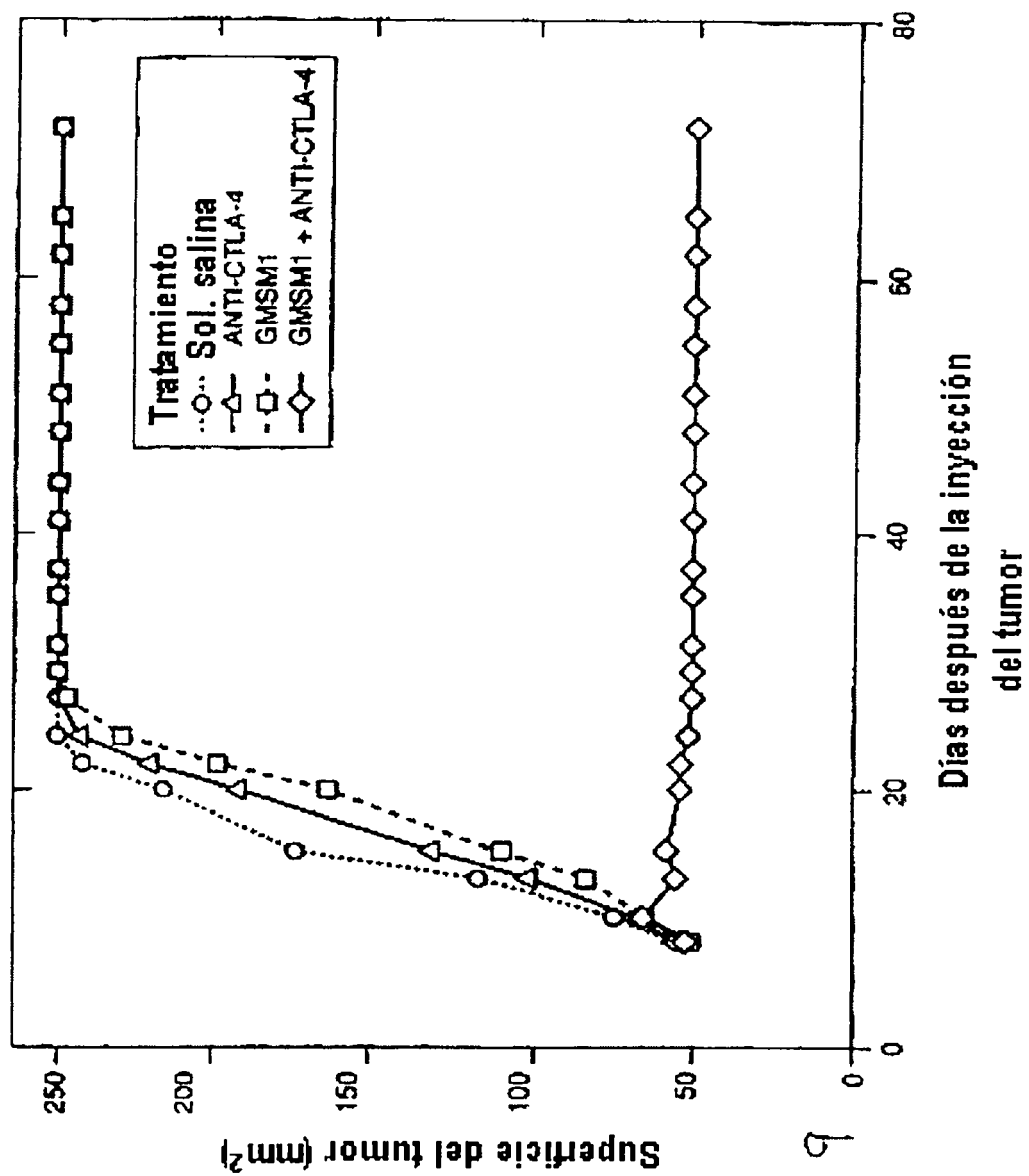


FIG. 9

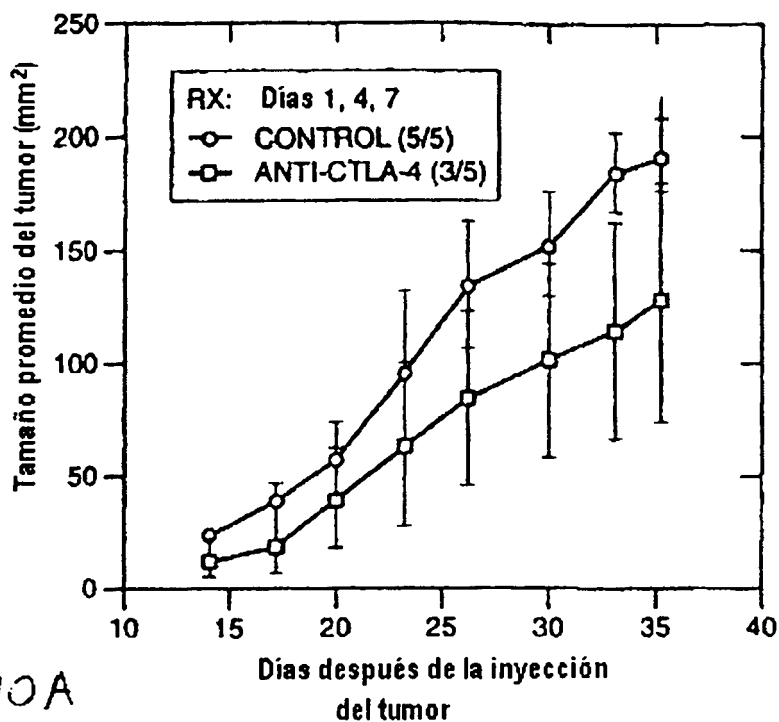


FIG. 10A

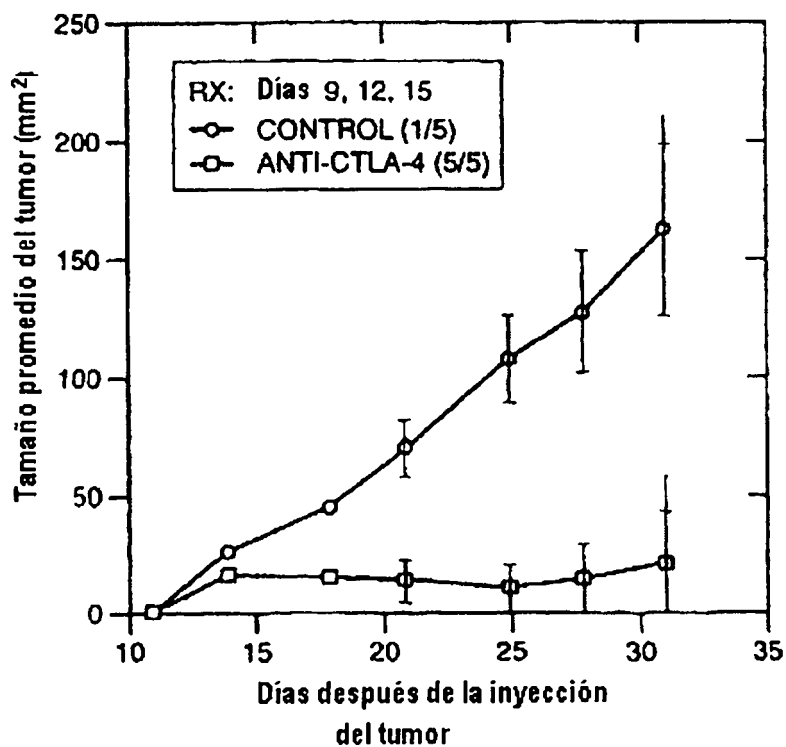


FIG. 10B

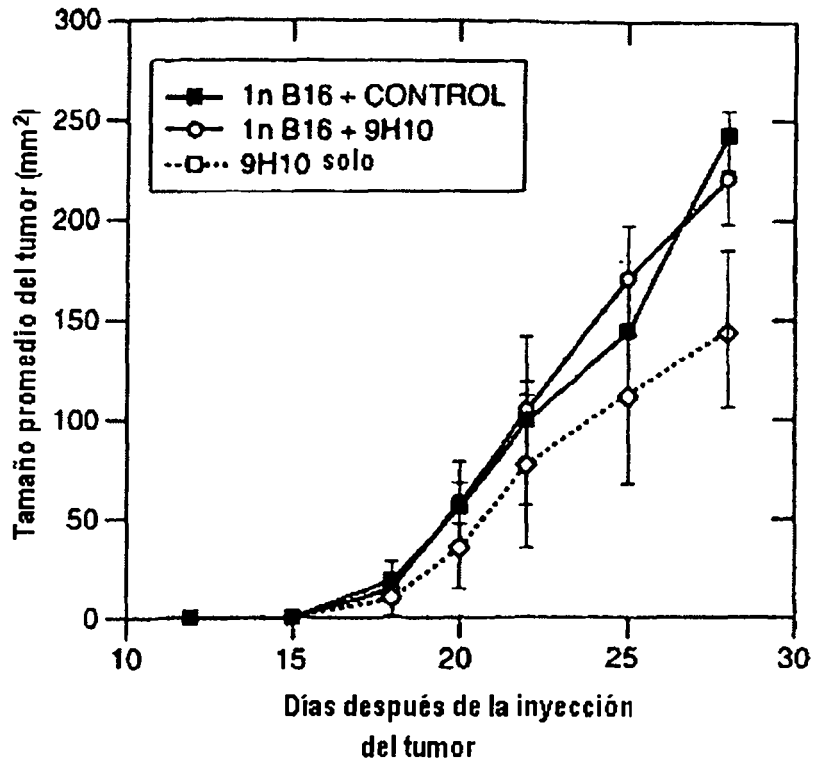


FIG. 11

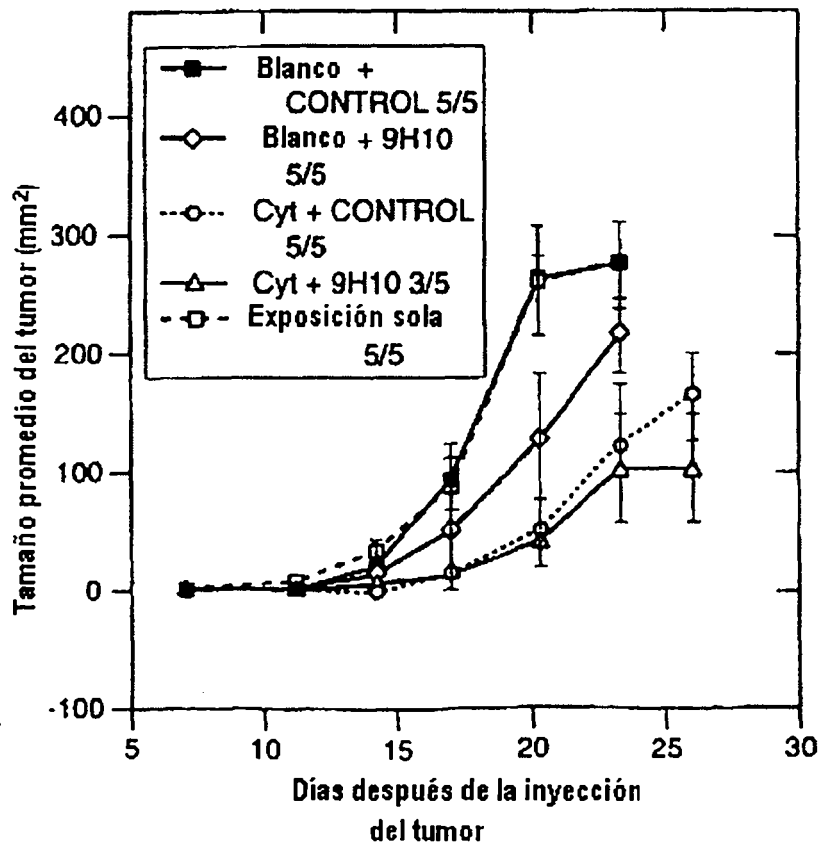


FIG. 12

FIGURA 13A

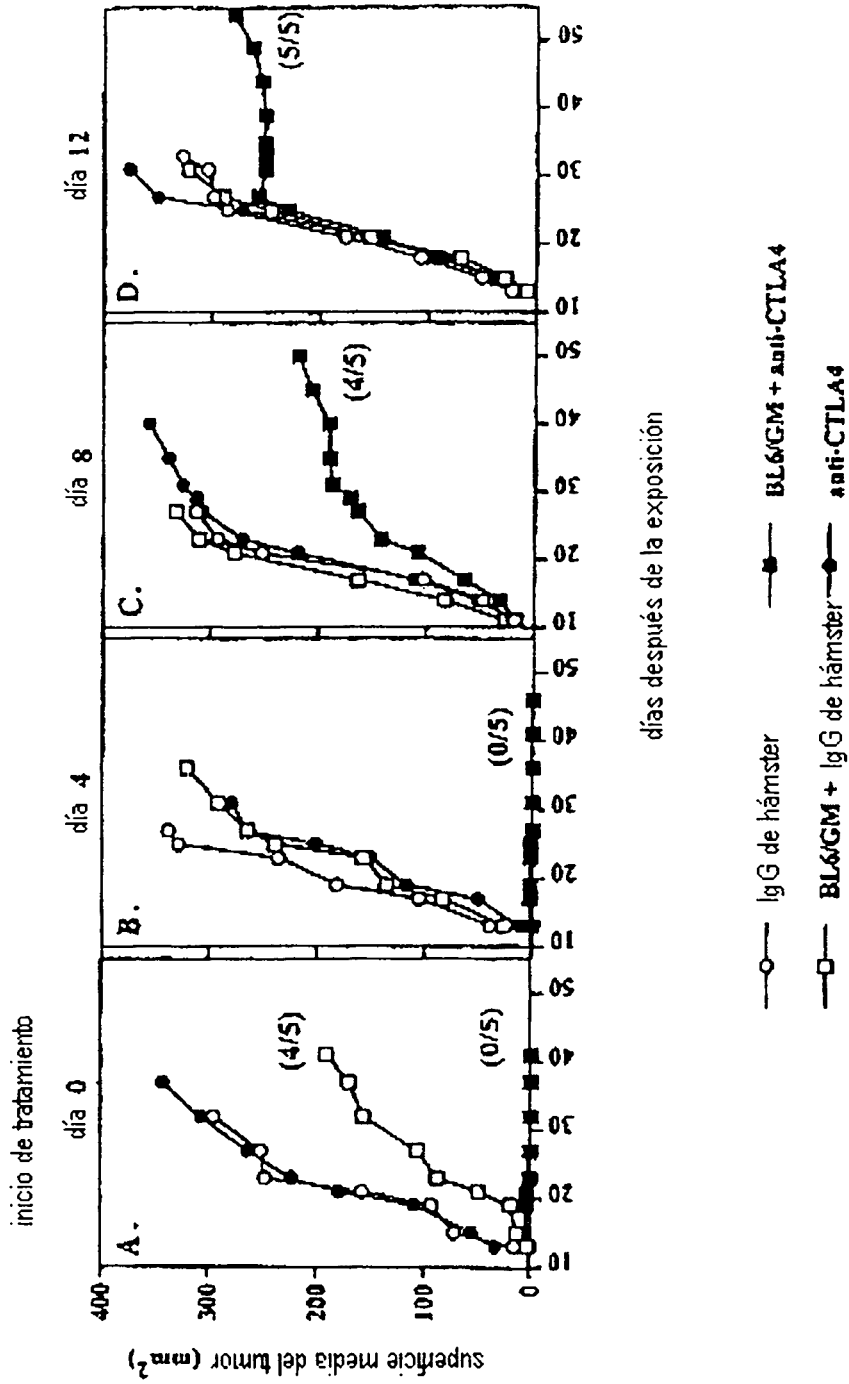


FIGURA 13

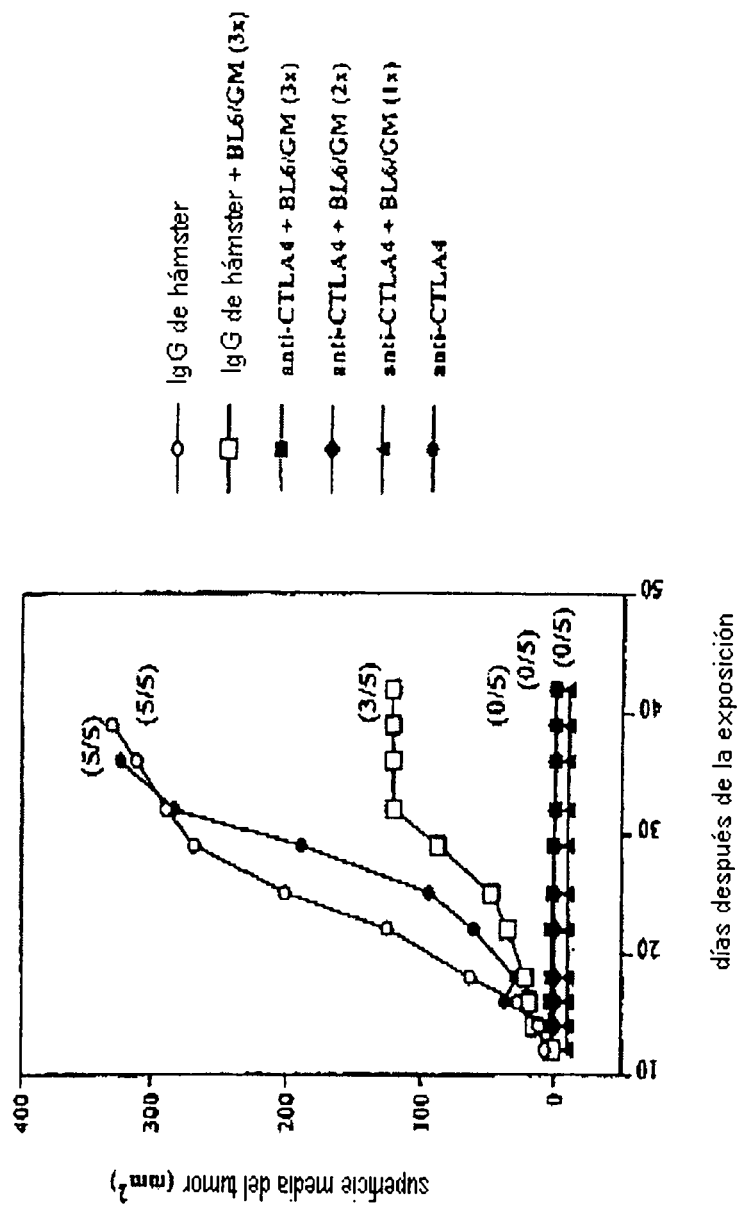


FIGURA 14

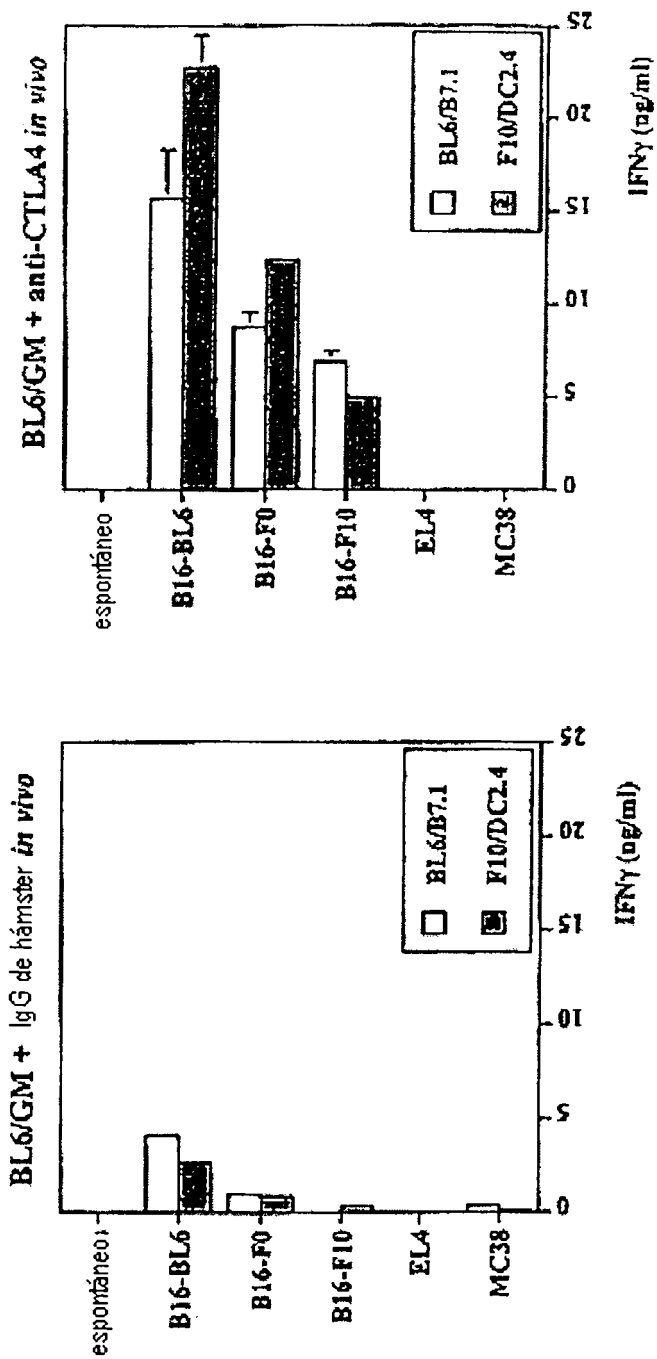
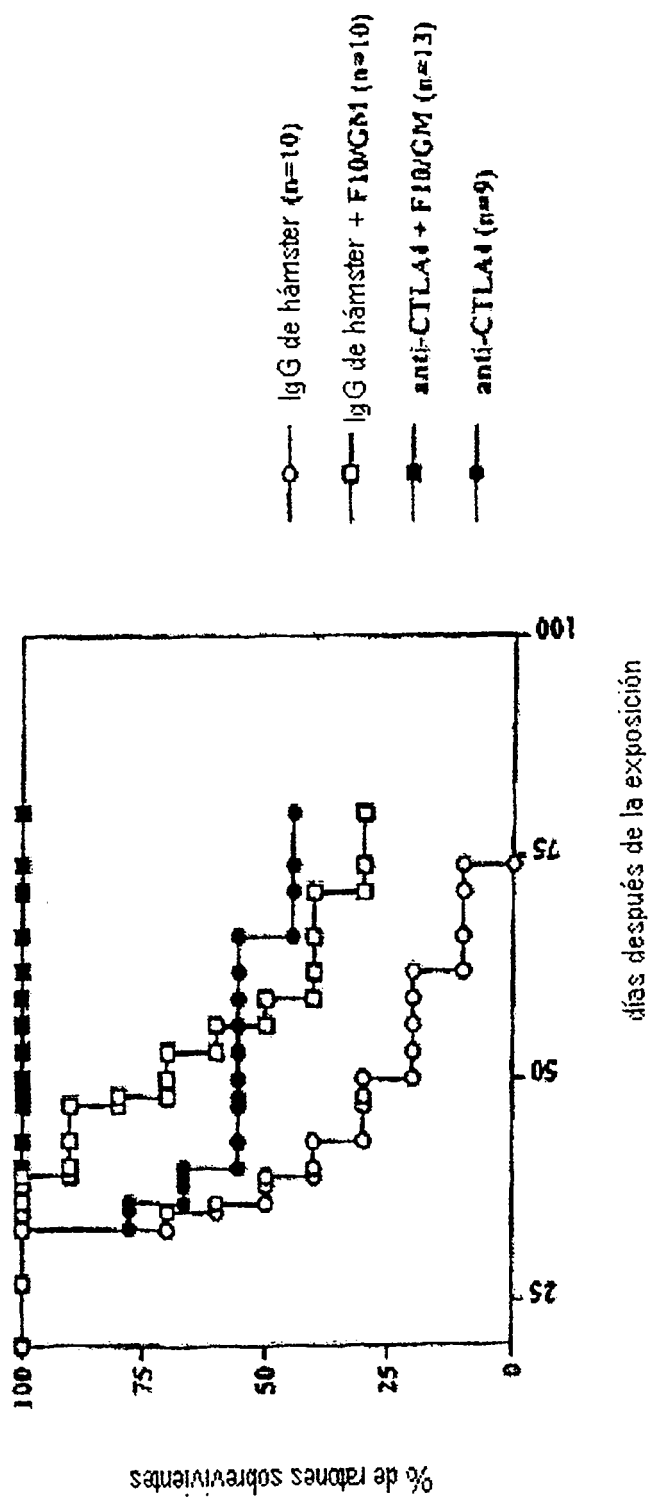


FIGURA 5



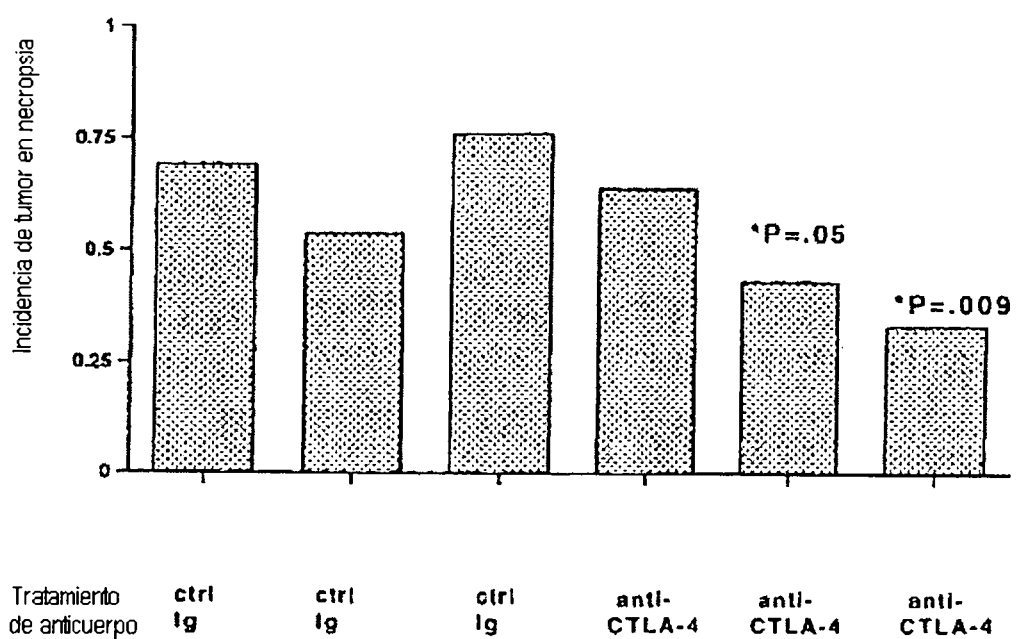


FIGURA 16A

(* χ^2 vs. ctrl Ig/sin vacuna)

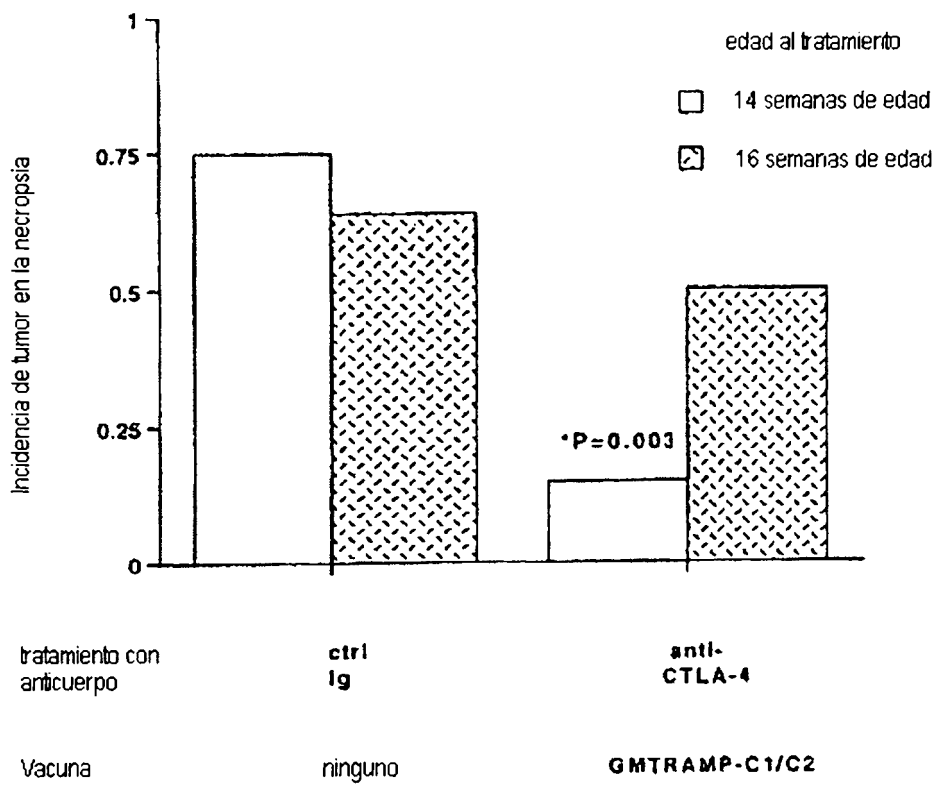


FIGURA 16B

(*= χ^2 vs. ctrl ig/ sin vacuna tratado a la misma edad - 14 semanas)

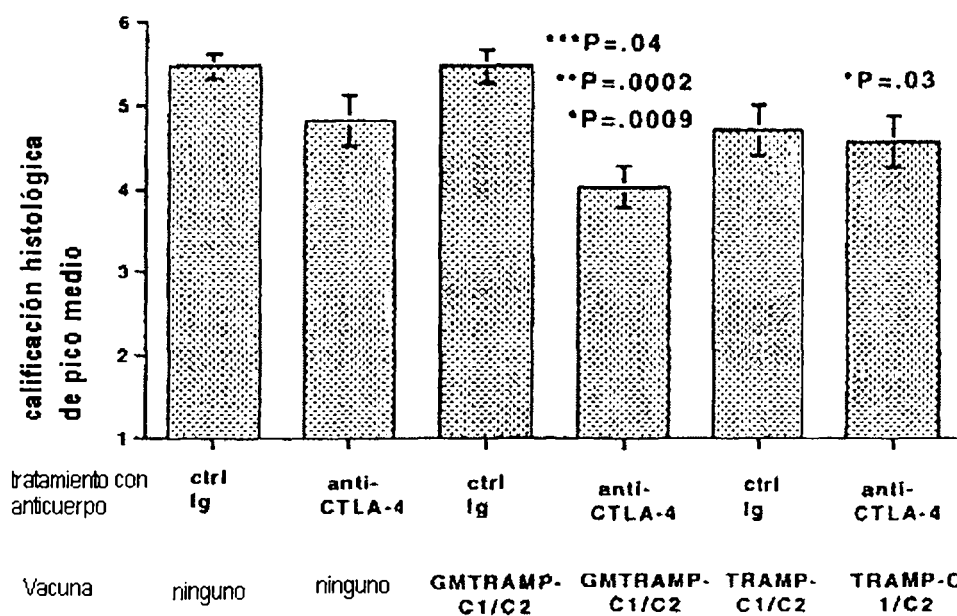


FIGURA 17A

*=vs. ctrl Ig/ sin vacuna
 **=vs. ctrl Ig/GMTRAMP-C1/C2
 ***=vs. anti-CTLA-4/ sin vacuna
 estadísticamente significativo con las pruebas de Fisher, Scheffe, Bonferroni/Dunn

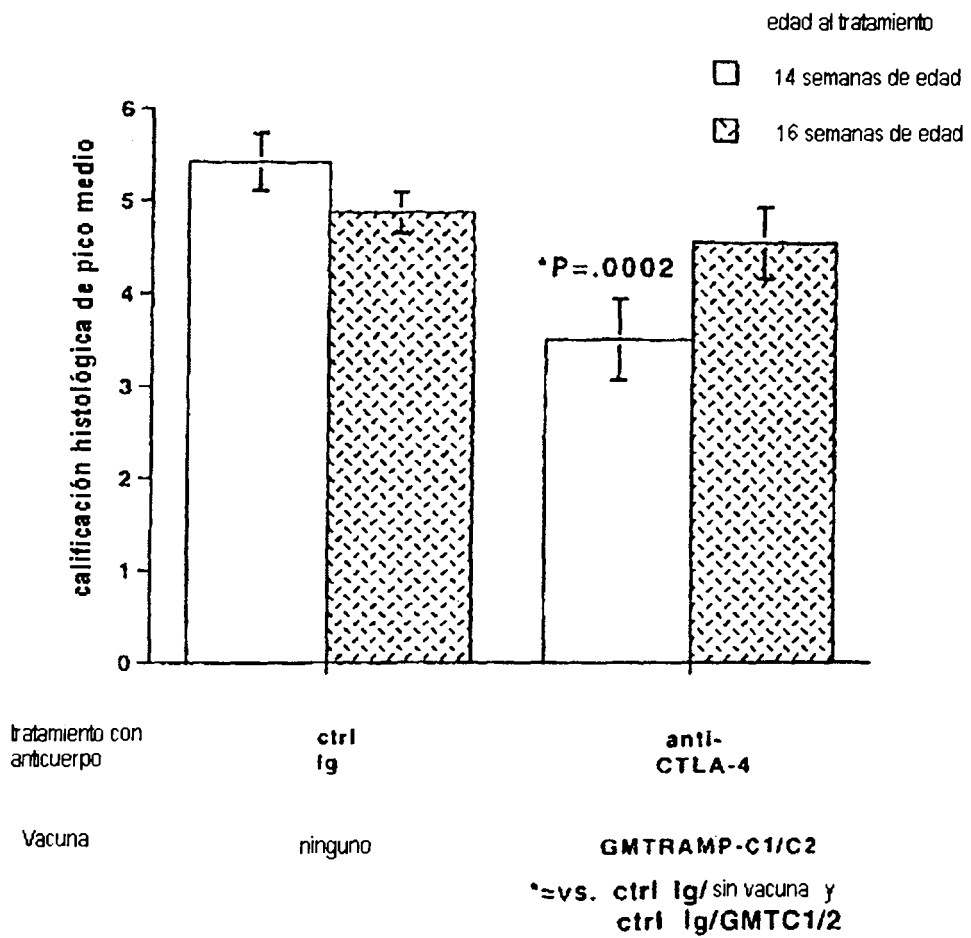


FIGURA 17B

Producción de IFN-gamma tras estimulación de péptido in vitro

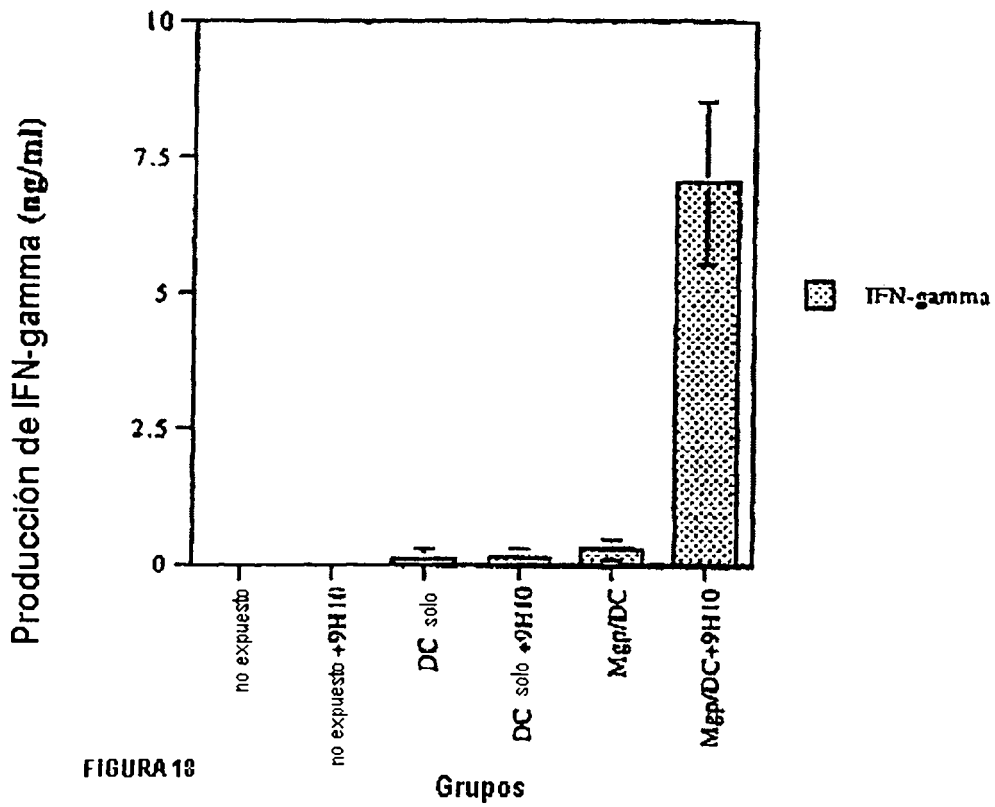


FIGURA 18

Bloqueo de CTLA-4 requerido para retrasar el crecimiento de melanoma B16 en ratones inmunizados

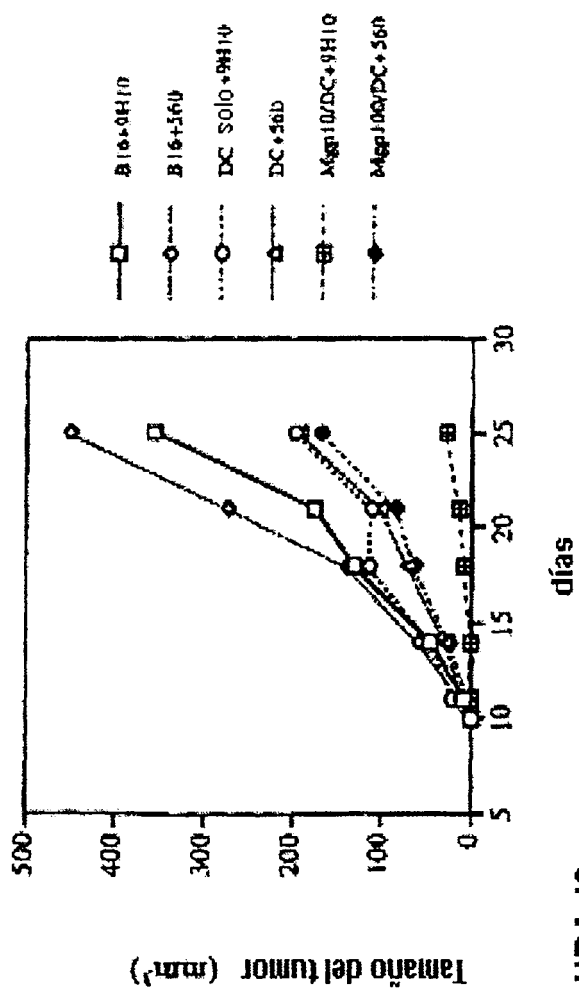


FIGURA 19

ES 2 308 857 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Los Regentes de la Universidad de California
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Estimulación de células T contra autoantígenos mediante agentes bloqueadores de CTLA-4
- 10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2
- (iv) DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: FLEHR HOHBACH TEST ALBRITTON & HERBERT LLP
 - 15 (B) CALLE: 4 Embarcadero Center, Suite 3400
 - (C) CIUDAD: San Francisco
 - (D) ESTADO: California
 - (E) PAÍS: EE. UU.
 - 20 (F) CÓDIGO POSTAL: 94111-4187
- (v) FORMA DE LECTURA EN COMPUTADORA:
- 25 (A) TIPO MEDIO: disco flexible
 - (B) COMPUTADORA: PC compatible con IBM
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.30
- 30 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD PRESENTE:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US
- (viii) INFORMACIÓN PARA APODERADO/AGENTE:
- 35 (A) NOMBRE: Lorenz, Todd A.
 - (B) NÚMERO DE INSCRIPCIÓN: 39.754
 - (C) NÚMERO: FP-68668 REFERENCIA/EXPEDIENTE
- 40 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
- (A) TELÉFONO: (415) 781-1989
 - (B) TELEFAX: (415) 398-3249

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 35 pares de bases
 - 50 (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CADENA: única
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- 55 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:1:
- 60 TTACTCTACT CCCTGAGGAG CTCAGCACAT TTGCC 35

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:2:

- 65 (A) LONGITUD: 35 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: única

ES 2 308 857 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "cebador"

5

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

TATACTTACC AGAATCCGGG CATGGTTCTG GATCA

35

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65