

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 025 112**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2016** **PCT/EP2016/076747**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2017** **WO17077085**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2016** **E 16794556 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2025** **EP 3371219**

54 Título: **Anticuerpos inmunomoduladores**

30 Prioridad:

04.11.2015 GB 201519481

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.06.2025

73 Titular/es:

CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED
(100.00%)

Angel Building 407 St. John Street
London EC1V 4AD, GB

72 Inventor/es:

AL-SHAMKHANI, AYMEN;
CHAN, HAK TAK CLAUDE;
CRAGG, MARK STEVEN;
FRENCH, RUTH ROSEMARY;
GLENNIE, MARTIN JOHN y
WILLOUGHBY, JANE ELIZABETH

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 025 112 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

Anticuerpos inmunomoduladores

Introducción

La presente invención proporciona nuevos anticuerpos específicos para OX40, así como métodos para usar dichos anticuerpos, y usos de los anticuerpos en aplicaciones terapéuticas.

Los anticuerpos monoclonales inmunomoduladores (mAb) constituyen una nueva clase de reactivo clínico diseñado para promover la inmunidad de células T anticancerosas endógena o mediada por vacunas. Ahora se están ensayando un número de mAb inmunomoduladores en ensayos clínicos. Se han observado datos alentadores con respuestas objetivas y beneficios de supervivencia con ipilimumab en melanoma metastásico (Hodi et al., Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N Engl J Med. 363 (2010):711-23). Este denominado bloqueador de puntos de control ahora ha sido aprobado para este melanoma y anti-PD-1/PD-1L también está proporcionando resultados positivos en diversos cánceres, incluyendo pulmón y melanoma (J.R. Brahmer et al, Safety and activity of anti-PD-L 1 antibody in patients with advanced cancer. N Engl J Med, 366 (2012), p. 2455-2465). Sin embargo, también ha habido estudios negativos, y la toxicidad autoinmunitaria es un peligro reconocido, con manifestaciones tales como colitis, tiroiditis e hipofisitis bien documentadas.

La presente invención es un resultado de un estudio centrado en un receptor que pertenece a la superfamilia de receptores de factores de necrosis tumoral (TNFRSF): OX40. Los mAbs anti-OX40 han mostrado ambos una excelente eficacia en investigaciones preclínicas y están en ensayos clínicos tempranos en los que se han tolerado razonablemente bien e indican un potencial terapéutico modesto (Curti et al, Cancer Res. 2013 Dec 15;73(24):7189-98. 74. OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients).

Los datos del laboratorio de los inventores han demostrado el papel crítico para el isotipo en la actividad inmunoestimuladora de los mAbs anti-CD40 de ratón que muestran que el isotipo IgG1 de ratón estimula tanto los brazos humorales como los mediados por células del sistema inmunitario, mientras que el IgG2a de anti-CD40 no lo hace y que esto depende del inhibidor FcγRIIb (White et al, J Immunol. 2011 Aug 15;187(4):1754-63. Interaction with FcγRIIB is critical for the agonistic activity of anti-CD40 monoclonal antibody; también Li et al, Science. 2011 Aug 19;333(6045):1030-4. Inhibitory Fcγ receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies). Además, han demostrado que cuando se considera IgG humana, IgG2 es más activa que IgG1, y que esta actividad es independiente del requisito de FcγR (White et al, Cancer Cell. 2015 Jan 12;27(1):138-48. Conformation of the human immunoglobulin G2 hinge imparts superagonistic properties to immunostimulatory anticancer antibodies). Estas son observaciones clave con importantes implicaciones para el desarrollo del nuevo mAb inmunoestimulador, y a la luz de estos algunos de los mAbs usados en la clínica hasta la fecha (anti-4-1BB, BMS-663513 IgG4 humana, anti-OX40, 9B12, IgG1 de ratón) pueden no ser óptimos y por lo tanto pueden subestimar la actividad clínica potencial de esta clase de reactivo.

En la presente memoria se proporcionan nuevos mAbs que se han seleccionado para aplicación terapéutica basándose en su actividad en ensayos in vitro e in vivo para administrar reactivos que son potentes, pero con efectos secundarios manejables para el tratamiento del cáncer.

Compendio de la invención

En un primer aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal o una porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a las secuencias repetidas en cisteína en los dominios extracelulares 3 o 4 de OX40 que comprende:

CDRs de cadena pesada que tienen las SEQ ID Nos 37-39 y CDRs de cadena ligera que tienen las SEQ ID Nos 40-42;

CDRs de cadena pesada que tienen las SEQ ID Nos 43-45 y CDRs de cadena ligera que tienen las SEQ ID Nos 46-48;

CDRs de cadena pesada que tienen las SEQ ID No 49-51 y CDRs de cadena ligera que tienen las SEQ ID No 52-54; o

CDRs de cadena pesada que tienen las SEQ ID No 55-57 y CDRs de cadena ligera que tienen las SEQ ID No 58-60;

y en donde el anticuerpo es del isotipo IgG1 murino o del isotipo IgG2 humano.

En los aspectos anteriores de la invención, el anticuerpo puede seleccionarse de un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico que contiene una región variable humana, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo

biespecífico o un anticuerpo monocatenario, así como fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

Los antagonistas de OX40 son útiles en el tratamiento de afecciones autoinmunitarias e inflamatorias, en las que es necesario regular una respuesta inmunitaria excesiva. Según un tercer aspecto, se proporciona un anticuerpo como se establece en el segundo aspecto de la invención, para su uso en la inhibición de la señalización de OX40. Por ejemplo, por lo tanto, la enfermedad tratada por la presente invención es una afección autoinmunitaria o inflamatoria, y el anticuerpo anti-OX40 es un antagonista de OX40 u OX40L. Preferiblemente, el antagonista de OX40 tiene una secuencia de CDRH3 como se muestra en SEQ ID No. 51.

Por ejemplo, un anticuerpo antagonista es útil en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias o inflamación.

Los dominios variables de los anticuerpos mencionados anteriormente pueden ser cadenas ligeras lambda o kappa. Preferiblemente, las cadenas ligeras son cadenas ligeras kappa. Las cadenas ligeras pueden ser de cualquier familia kappa o lambda. Familias preferidas incluyen Vk6 y Vk2. Las cadenas pesadas pueden ser de cualquier familia de región variable de cadena pesada; se prefieren Vh2, Vh4, Vh6 y Vh7.

La región constante de uno cualquiera o más anticuerpos es IgG1 de ratón o IgG2 humana. En anticuerpos humanos o humanizados, se prefiere al menos la presencia de una región bisagra de IgG2.

Los anticuerpos pueden ser agonistas o inhibidores. Los anticuerpos agonistas e inhibidores se pueden utilizar de diferentes maneras para el tratamiento de la enfermedad. Para el tratamiento del cáncer, están indicados los anticuerpos agonistas. En realizaciones, por lo tanto, los anticuerpos en los aspectos anteriores de la invención son agonistas. Por ejemplo, la estimulación de la inmunidad de células T antitumorales aumenta la acumulación de células T CD4+ y/o CD8+ en los sitios de un tumor que contienen células cancerosas. Hemos demostrado que los anticuerpos que usan regiones constantes mIgG1 son agonistas más eficaces, incluso cuando el anticuerpo original se aísla como un miembro de otro isotipo de IgG.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 Estimulación in vitro de la proliferación de células T de sangre periférica por anticuerpos anti-OX40 e identificación de los dominios extracelulares reconocidos

A y B: La proliferación de células T se evaluó usando una técnica de dilución de CFSE: las PBMCs de donantes sanos se marcaron con CFSE 2 μ M y la estimulación de la proliferación de CD8 y CD4 en presencia de una concentración subóptima de OKT3 unido a la placa y 5 μ g/ml de anticuerpo anti-OX40 soluble se determinó después de 5-7 días por citometría de flujo.

A: Las figuras de la derecha representan:

El número de veces que el anticuerpo proporcionó > 50% de estimulación sobre el control/número total de experimentos en los que se incluyó el anticuerpo.

El sombreado representa el dominio(s) de hOX40 reconocido por los anticuerpos (véase C)

B: Ejemplo de los resultados de proliferación obtenidos con PBMCs de un donante.

C: Se construyeron y expresaron transitoriamente las formas WT y Δ 1 y Δ 2 de hOX40 en células 293F y se sometieron a ensayo los anticuerpos anti-OX40 para determinar la unión a las tres formas de h4-1BB. El histograma muestra el patrón de unión de SAP25.29.

Figura 2 El efecto de la interacción entre OX40L y OX40 sobre la unión de mAbs anti-OX40 determinado usando un análisis Biacore

Se pasaron secuencialmente OX40L (1) y OX40 (2) marcados con His sobre un chip anti-His Biacore para visualizar la interacción OX40L/OX40. A continuación, se pasaron los mAb anti-OX40 (3) para determinar si su unión se bloqueaba cuando OX40 se unía a OX40L. SAP28-2 que se une al dominio 1 de OX40, y SAP15-3 y SAP28-3 que se unen al dominio 2 se bloquearon por la interacción de OX40 con OX40L. También se bloqueó SAP9 que se une en los dominios 3/4, pero no se bloquearon otros tres mAbs que también se unen a los dominios 3/4, SAP25-29, SAP29-50 y SAP29-23.

Figura 3 Comparación de la unión de anticuerpos anti-hOX40 originales y humanizados usando análisis Biacore.

Las CDRs del anticuerpo original se identificaron y se injertaron en regiones marco variables (FR) humanas apropiadas, unidas a regiones constantes mIgG1. En algunos casos, se retuvo la FR3 de ratón. Los dibujos muestran la estructura de los anticuerpos humanizados: obsérvese que las regiones Fab humanizadas con las

3 CDRs de ratón se combinan con la región Fc de IgG1 de ratón.

A y B: SAP29-23 y SAP25-29 con tres regiones marco (FR) de Fab humano diferentes retuvieron su actividad de unión. Sin embargo, la velocidad de disociación de los anticuerpos humanizados parecía más rápida que la de los anticuerpos originales.

C: SAP29-50 también retuvo la actividad de unión después de la humanización, y la velocidad de disociación parecía comparable con la del mAb original. Sin embargo, el anticuerpo humanizado se produjo con muy bajo rendimiento.

Figura 4 Los anticuerpos anti-OX40 con el isotipo mIgG1 estimulan la proliferación de las células T mientras que aquellos con el isotipo IgG2a son inactivos o incluso inhibidores.

Los ensayos fueron como se describe en la Figura 1.

Figura 5 Comparación de la expresión de mOX40 y hOX40 en células T CD4 y CD8 en ratones knock-in (KI) heterocigotos (+/-) para hOX40.

Expresión de mOX40 y hOX40 en células T CD4 (A) y CD8 (B) después de la activación de los esplenocitos en ratones KI de tipo nativo (WT) y hOX40. C, Expresión de mOX40 y hOX40 en Treg tímicas y esplénicas en ratones KI hOX40.

Figura 6 Comparación del efecto del mAb anti-mOX40 y anti-hOX40 sobre la expansión de células OT1 in vivo.

Se transfirieron esplenocitos de OT1 x ratones hOX40 heterocigotos (+/-) i.v. a receptores WT. 24 h más tarde, los receptores recibieron Ova (0,5 mg) y mAb anti-mOX40 de control (OX86), o mAb anti-hOX40 mIgG1 o mIgG2a. El nivel de células OT-I SIINFEKL+ en la sangre se monitorizó mediante citometría de flujo. A. Transcurso de tiempo de respuestas a anticuerpos representativos. B. Comparación de la respuesta en el día 6 de un intervalo de anticuerpos m1 y m2a. C. Tabla que muestra las respuestas relativas con todos los anticuerpos ensayados hasta ahora. D. Cursos temporales de respuestas a anticuerpos anti-hOX40 humanizados (unidos a regiones constantes de mIgG1).

Figura 7 SAP25-29 fue eficaz en combinación con un anticuerpo anti-PD1 en el modelo de ratón C1498 de leucemia mieloide aguda

Se administró a ratones hOX40 KI o nativos homocigotos 1×10^6 C1498 células i.v., los 150 mg de anti-PD-1, SAP25-29, o una combinación dada los días 7, 10, 12, 14, y 17. Se monitorizó la supervivencia.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entienden comúnmente los expertos en la técnica, tal como en las técnicas de química de péptidos, cultivo celular y presentación en fagos, química y bioquímica de ácidos nucleicos. Las siguientes referencias proporcionan a un experto una definición general de muchos de los términos usados en esta invención: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Tal y como se usa en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen a continuación, a menos que se especifique lo contrario.

Se usan técnicas estándar para biología molecular, métodos genéticos y bioquímicos ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction" (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991)), que se incorporan en la presente memoria por referencia. Estas técnicas son aplicables a la producción de los polinucleótidos y polipéptidos de la invención, y, como tales, pueden considerarse en la preparación y práctica de la invención.

Las técnicas particularmente útiles para realizaciones particulares se discutirán en las secciones que siguen.

Un "anticuerpo" puede seleccionarse de, pero no se limita a, una IgG, IgA o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno seleccionado de un polipéptido de dominio variable único del anticuerpo, dAb, FAb, F(ab')₂, un scFv, un Fv, un dominio V_{HH} (tal como un Nanocuerpo® u otro dominio de inmunoglobulina camelizada) o un Fv unido por disulfuro. En ciertas realizaciones, cualquiera de los tipos de anticuerpos anteriores o fragmentos de los mismos se pueden preparar a partir de una o más especies de mamíferos seleccionadas de,

pero no limitadas a, ratón, rata, conejo, ser humano. Dichos anticuerpos pueden humanizarse para su uso en seres humanos.

En determinadas realizaciones, cualquiera de los tipos de anticuerpos anteriores o fragmentos de los mismos se pueden proporcionar como moléculas heteroconjugadas, biespecíficas, monocatenarias, quiméricas o humanizadas que tienen afinidad por OX40.

En determinadas realizaciones, cualquier anticuerpo/anticuerpos mencionado anteriormente se une a OX40 con un coeficiente de disociación de 100 nM o menos, 75 nM o menos, 50 nM o menos, 25 nM o menos, tal como 10 nM o menos, 5 nM o menos, 1 nM o menos, o en realizaciones 500 pM o menos, 100 pM o menos, 50 pM o menos o 25 pM o menos.

Los anticuerpos pueden ser monoespecíficos, con especificidad estrecha o amplia; o multiespecíficos, tales como biespecíficos, de manera que poseen dos especificidades de epítipo distintas en una única molécula de anticuerpo. Los cócteles de anticuerpos pueden dirigirse a dos o más epítopos específicos. Los cócteles de anticuerpos pueden prepararse mediante la mezcla de uno o más anticuerpos monoclonales. En una realización, un cóctel de anticuerpos contiene dos, tres, cuatro o más anticuerpos monoclonales, cada uno de los cuales agoniza o antagoniza OX40, como se establece en la presente memoria.

En un aspecto, el anticuerpo o anticuerpos de la invención se formulan para administración intravenosa (iv) o intramuscular (im). Los anticuerpos administrados iv deberían extravasarse de la circulación para entrar en el espacio tisular intersticial y unirse a su objetivo cognado.

El anticuerpo, en una realización, es un fragmento de anticuerpo tal como un anticuerpo scFv, dAb o V_{HH}. Los fragmentos de anticuerpo pequeños se extravasan mucho más fácilmente en el tejido, y por esta razón pueden funcionar mejor que IgG u otros anticuerpos más grandes. Sin embargo, los fragmentos más pequeños también se eliminan más rápidamente de la circulación. Debe conseguirse un compromiso entre accesibilidad y eliminación del tejido. Por ejemplo, véase Wang et al., *Clinical pharmacology & Therapeutics*, 84:5, 2008, 548-558. Se han descrito varios conjugados de anticuerpos que tienen una semivida extendida usando una variedad de estrategias, por ejemplo, mediante la conjugación con albúmina (tal como albúmina de suero humano). Véase Kontermann et al., *BioDrugs* April 2009, Volume 23, Issue 2, pp 93-109.

Por "fragmento" se entiende una porción de un polipéptido o una molécula de ácido nucleico. Esta porción contiene, preferiblemente, al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% de la longitud completa de la molécula de ácido nucleico o polipéptido de referencia. Un fragmento puede contener 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 nucleótidos o aminoácidos.

Los términos "aislado", "purificado" o "biológicamente puro" se refieren al material que está libre en grados variables de los componentes que normalmente lo acompañan tal y como se encuentra en su estado nativo. "Aislado" indica un grado de separación de la fuente original o de los alrededores. "Purificar" indica un grado de separación que es mayor que el aislamiento. Una proteína "purificada" o "biológicamente pura" está suficientemente libre de otros materiales de manera que cualquier impureza no afecte materialmente a las propiedades biológicas de la proteína o provoque otras consecuencias adversas. Es decir, un ácido nucleico o péptido de esta invención está purificado si está sustancialmente libre de material celular, material viral, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de DNA recombinante, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. La pureza y homogeneidad se determinan normalmente usando técnicas de química analítica, por ejemplo, electroforesis en gel de poliácridamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. El término "purificado" puede indicar que un ácido nucleico o proteína da lugar esencialmente a una banda en un gel electroforético. Para una proteína que puede someterse a modificaciones, por ejemplo, fosforilación o glicosilación, diferentes modificaciones pueden dar lugar a diferentes proteínas aisladas, que pueden purificarse por separado.

Por "polinucleótido aislado" se entiende un ácido nucleico (por ejemplo, un DNA) que está libre de los genes que, en el genoma natural del organismo del que se deriva la molécula de ácido nucleico de la invención, flanquean el gen. El término incluye por lo tanto, por ejemplo, un DNA recombinante que se incorpora en un vector; en un plásmido o virus que se replica de manera autónoma; o en el DNA genómico de un procariota o eucariota; o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un cDNA o un fragmento genómico o de cDNA producido mediante PCR o digestión con endonucleasas de restricción) independiente de otras secuencias. Además, el término incluye una molécula de RNA que se transcribe a partir de una molécula de DNA, así como un DNA recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica una secuencia polipeptídica adicional.

Por un "polipéptido aislado" se entiende un polipéptido de la invención que se ha separado de los componentes que lo acompañan de forma natural. Normalmente, el polipéptido se aísla cuando está libre de proteínas y moléculas orgánicas de origen natural con las que está asociado de forma natural, al menos en un 60% en peso. Preferiblemente, la preparación es al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 90% y lo más preferiblemente al menos un 99%, en peso, de un polipéptido de la invención. Un polipéptido aislado de la

invención puede obtenerse, por ejemplo, mediante extracción de una fuente natural, mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica dicho polipéptido; o mediante la síntesis química de la proteína. La pureza se puede medir mediante cualquier método apropiado, por ejemplo, cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida, o mediante análisis de HPLC.

Los miembros de TNFRSF son objetivos clave para el mAb inmunomodulador

Los miembros de TNFRSF constituyen el 3% de todas las proteínas de la superficie celular leucocitaria. Son proteínas transmembrana de tipo I que adoptan estructuras alargadas debido a la presencia de múltiples repeticiones ricas en cisteína (CRR) de ~40 aminoácidos dentro de sus regiones extracelulares. Los receptores, que comparten solo el ~25% de identidad dentro de sus regiones extracelulares, interaccionan con diversas proteínas que pertenecen a las superfamilias de TNF e inmunoglobulina (Croft, 2003; Locksley et al., 2001; Watts, 2005). Desempeñan papeles esenciales en la regulación de la respuesta inmunitaria adaptativa y son particularmente importantes para mantener la supervivencia de las células T. Estudios estructurales han demostrado que los ligandos homotriméricos se asocian con tres receptores monoméricos (Jones, 2000; Locksley et al., 2001). Basándose en estos estudios, se propuso la trimerización de receptores mediada por ligandos como un mecanismo de señalización transmembrana. Estudios posteriores, sin embargo, han sugerido que la unión del ligando desencadena cambios conformacionales dentro de receptores ya asociados (Locksley et al., 2001). Nuestros propios estudios que examinan los requisitos oligoméricos para la señalización por los miembros CD30, CD40 y 4-1BB de TNFRSF han mostrado que los ligandos triméricos no desencadenan respuestas óptimas y que los oligómeros de orden superior, posiblemente dos trimeros adyacentes, generan señales transmembrana más eficazmente (Hargreaves and Al-Shamkhani, 2002; Haswell et al., 2001; Rowley and Al-Shamkhani, observaciones no publicadas). El hallazgo de que el ligando Fas trimérico soluble desprendido es menos potente que su forma anclada a la membrana apoya esta idea (Suda et al., 1997). Aunque el uso de ligandos oligoméricos solubles in vivo se ve obstaculizado por su falta de estabilidad y vida media corta, la evaluación de los requisitos oligoméricos para la señalización por los miembros de TNFRSF tiene implicaciones directas para el desarrollo del mAb agonista.

TNFRSF puede dividirse en dos subfamilias basándose en la presencia o ausencia de un dominio de muerte (DD), un módulo proteico que permite el acoplamiento a caspasa 8/10 y la inducción de apoptosis. Los miembros de TNFRSF que carecen de DD son los objetivos de la presente invención. Esta subfamilia interacciona intracelularmente con factores asociados a TNFR (TRAFs) que conducen a la activación de rutas de señalización intracelular que promueven la activación, proliferación y supervivencia de leucocitos (Croft, 2003; Locksley et al., 2001; Watts, 2005). Dos miembros de esta subfamilia (4-1BB y OX40) son prometedores como objetivos para agentes terapéuticos por las siguientes razones:

(1) Los datos preclínicos demuestran el papel crítico de estos receptores en la amplificación de la inmunidad de las células T específicas de antígeno in vivo, incluyendo la inmunidad antitumoral.

(2) La combinación de mAb dirigida a estos dos receptores puede optimizar las respuestas antitumorales debido a su expresión diferencial y función en subconjuntos de células T.

(3) Todavía no se ha tomado ningún enfoque sistemático para diseñar el mAb inmunomodulador que se dirija a estos receptores.

OX40 (CD134)

OX40 se expresa en células T CD4 y CD8 activadas, células T CD4 reguladoras, células T CD4 de memoria y células NKT. La señalización de OX40 es crítica para la supervivencia de las células T CD4 cebadas con antígeno y el desarrollo de la memoria de las células T CD4 (Croft, 2003). Desempeña un papel en la mejora de la supervivencia y la diferenciación de células efectoras de las células T CD8 durante el cebado, y es importante para la expansión de células T durante las respuestas secundarias (Bansal-Pakala et al., 2004; Lee et al., 2006). Se ha demostrado que la señalización de OX40 co-estimula la expansión de células T CD8 de memoria específicas de antígeno humanas, aunque este efecto estaba mediado principalmente de manera indirecta a través de la co-estimulación de células T CD4 auxiliares (Serghides et al., 2005). Los inventores generaron el primer mAb anti-OX40 agonista (Al-Shamkhani et al., 1996) que promovió la inmunidad antitumoral mediante la activación de las células T CD8 (Lee et al., 2004; Song et al., 2007). El mAb OX40 también puede promover la inmunidad antitumoral mediante la inhibición de la función de las células T CD4 reguladoras dentro del propio tumor (Piconese et al., 2008; Valzasina et al., 2005; Vu et al., 2007).

Anticuerpos OX40

OX40 es un receptor encontrado en las células T CD4 y CD8, y está implicado en la activación del mantenimiento de la respuesta de las células T, como se establece en la presente memoria. Por consiguiente, un anticuerpo agonista de OX40 es útil para potenciar una respuesta inmunitaria. Por el contrario, un antagonista de OX40 es útil en la inhibición de una respuesta inmunitaria no deseada o inapropiada, tal como

una respuesta autoinmunitaria o una respuesta inflamatoria.

Se ha encontrado que los anticuerpos activos en promover la activación de células T a través de la agonización del receptor OX40 se unen al dominio 3 o al dominio 4 del receptor.

Aunque los anticuerpos proporcionados en la presente memoria comparten secuencias de CDR de cadena ligera y secuencias de CDR1 y CDR2 de cadena pesada con anticuerpos conocidos, las secuencias de CDR3 de cadena pesada son únicas. Se sabe que CDR3 de cadena pesada retiene la responsabilidad primaria por la especificidad de la unión del antígeno en los anticuerpos. Las secuencias de CDR H3 de la presente invención pueden combinarse con las CDRs L1-L3 y H1-H2 con secuencias primarias diferentes a las establecidas en la presente memoria, siempre que la conformación de la cadena principal de las CDRs siga siendo la misma.

Por lo tanto, la invención proporciona un anticuerpo agonista de OX40 que tiene las secuencias de CDR3 de cadena pesada establecidas en las SEQ ID Nos 45 o 57. Además, se proporciona un anticuerpo antagonista de OX40 que tiene la secuencia de CDR3 de cadena pesada establecida en las SEQ ID Nos 39 o 51.

En una realización adicional, se proporciona un anticuerpo antagonista de OX40 que tiene la secuencia de CDR3 de cadena pesada establecida en las SEQ ID Nos 39 o 51 en el contexto de un isotipo IgG1.

En realizaciones, el anticuerpo de la invención comprende las CDRs de cadena ligera que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID Nos 40, 41 y 42; o las SEQ ID Nos 46, 47 y 48; o las SEQ ID Nos 52, 53 y 54; o las SEQ ID Nos 58, 59 y 60.

En realizaciones, el anticuerpo de la invención comprende las CDRs de cadena pesada que tienen las secuencias establecidas en las SEQ ID Nos 37, 38 y 39; o las SEQ ID Nos 43, 44 y 45; o las SEQ ID Nos 49, 50 y 51; o las SEQ ID Nos 55, 56 y 57.

Por ejemplo, el anticuerpo puede tener las secuencias de las CDRs establecidas en la presente memoria con respecto a los clones SAP9, SAP 25.29, SAP 29.23 o SAP 29.50, en las SEQ ID Nos 19-60.

Los anticuerpos de la invención están preferiblemente humanizados, trasplantando las secuencias de las CDRs establecidas anteriormente en un marco humano. Los marcos humanos pueden seleccionarse según técnicas conocidas en la técnica, como se discute a continuación.

Humanización

Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en donde los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de FR de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana.

Algunas o todas las CDRs de los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden transferirse; por ejemplo, es posible conservar las CDRs aceptoras humanas siempre que se transfiera la CDR H3 del donante. Todos los miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas comparten un pliegue similar para su cadena polipeptídica. Por ejemplo, aunque los anticuerpos son muy diversos en términos de su secuencia primaria, la comparación de secuencias y estructuras cristalográficas ha revelado que, al contrario de lo esperado, cinco de los seis bucles de unión a antígeno de los anticuerpos (H1, H2, L1, L2, L3) adoptan un número limitado de conformaciones de la cadena principal, o estructuras canónicas (Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol., 196: 901; Chothia et al. (1989) Nature, 342: 877). El análisis de las longitudes del bucle y los residuos clave ha permitido por lo tanto la predicción de las conformaciones de la cadena principal de H1, H2, L1, L2 y L3 encontradas en la mayoría de los anticuerpos humanos (Chothia et al. (1992) J. Mol. Biol., 227: 799; Tomlinson et al. (1995) EMBO J., 14: 4628; Williams et al. (1996) J. Mol. Biol., 264: 220).

De manera ventajosa, las CDRs seleccionadas para su uso en combinación con las CDRs H3 de la presente invención tienen la misma conformación de la cadena principal que las de los anticuerpos de la invención

descritos en la presente memoria.

Preferiblemente, los anticuerpos según la invención comprenden una región Fc y son del isotipo IgG1 o IgG2. También pueden usarse los fragmentos de anticuerpos que retienen las propiedades de unión a antígeno de los anticuerpos de longitud completa, como se establece anteriormente. Se ha demostrado que el isotipo IgG2 humano es más eficaz que el IgG1 humano, y se prefiere la retención de la región bisagra de IgG2 (White et al, Cancer Immunol Immunother. 2013 May; 62(5):941-8. FcγRIIB controls the potency of agonistic anti-TNFR mAbs. White et al. J Immunol. 2011 Aug 15; 187(4):1754-63. Interaction with FcγRIIB is critical for the agonistic activity of anti-CD40 monoclonal antibody). Para una variedad de anticuerpos inmunoestimuladores in vivo e in vitro, ya sea estimulando una respuesta de células T (anti-hOX40, -h4-1BB, anti-m4-1BB, -hCD27, -hCD28, -hCD40, -mCD40, -mCTLA4) o una respuesta de células B (anti-hCD40, -mCD40), el isotipo m1 es activo mientras que el m2a es inactivo o menos activo.

Terapia tumoral

Un tumor es una población de células, o masa de tejido que se forma en un sujeto como resultado de la proliferación anormal de células cancerosas malignas. Los tumores pueden ser el resultado de cualquier tipo de cáncer y especialmente sarcomas, cáncer de piel, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de cuello de útero, cáncer de hígado, cáncer de cabeza y cuello, cáncer esofágico, cáncer de páncreas, cáncer renal, cáncer de estómago, mieloma múltiple y cáncer cerebral.

En algunas realizaciones, el cáncer puede ser cáncer pancreático, por ejemplo adenocarcinoma ductal pancreático (PDA).

La terapia tumoral, como se denomina en la presente memoria, incluye terapias que reducen la velocidad del crecimiento tumoral, que ralentiza, pero no necesariamente elimina, el crecimiento tumoral.

La reducción en la velocidad del crecimiento tumoral puede ser, por ejemplo, una reducción en al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200% o más de la velocidad de crecimiento de un tumor. Por ejemplo, la velocidad del crecimiento se puede medir durante 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, o durante períodos más largos de una o más semanas.

En algunas realizaciones, la invención puede dar como resultado la detención del crecimiento tumoral, o la reducción del tamaño tumoral o la eliminación de un tumor.

Las células cancerosas dentro del tumor en el sujeto pueden ser inmunológicamente distintas de las células somáticas normales en el sujeto (por ejemplo, el tumor puede ser inmunogénico; alternatively, incluso si no es inmunogénico, puede presentar determinantes inmunológicos diferentes de las células somáticas). Por ejemplo, las células cancerosas pueden ser capaces de provocar una respuesta inmunitaria sistémica en el sujeto contra uno o más antígenos expresados por las células cancerosas. Los antígenos que provocan la respuesta inmunitaria pueden ser antígenos tumorales o pueden compartirse por células normales.

En realizaciones, el tumor, aunque presenta diferentes determinantes antigénicos, está oculto del sistema inmunitario de un sujeto o de otro modo está poco dirigido por las células T. Por ejemplo, el tumor puede excluir células inmunitarias, reduciendo así su visibilidad inmunológica y/o evitando que el sistema inmunitario actúe atacando al tumor, o las células T específicas del tumor pueden estar insuficientemente activadas para montar una respuesta antitumoral eficaz.

Por consiguiente, el tratamiento del cáncer como se proporciona en la presente memoria da como resultado al menos uno de los siguientes:

(i) promoción de respuestas inmunitarias de células T:

(ii) promoción de la generación de células T de memoria específicas de antígeno;

(iii) promoción de las células T de expansión de una manera dependiente de antígeno;

(iv) promoción de la inmunidad Th1; y/o

(v) promoción de la proliferación o supervivencia de las células T específicas de antígeno incluyendo al menos una de células T CD8+ nativas o no nativas, células CD8+ efectoras, o células de memoria, o células T que opcionalmente pueden ser manipuladas genéticamente que han sido expandidas in vitro y después transferidas a humanos.

Las células T CD8+ que son específicas para células cancerosas dentro del tumor canceroso pueden estar

presentes en el sujeto.

En realizaciones, las células T CD8+ están ausentes del tumor canceroso o están ausentes de regiones del tumor que contienen células cancerosas. En algunas realizaciones, las células cancerosas pueden expresar uno o más antígenos que no se expresan por las células somáticas normales en el sujeto (es decir, antígenos tumorales). Los antígenos tumorales son conocidos en la técnica y pueden provocar respuestas inmunitarias en el sujeto. En particular, los antígenos tumorales pueden provocar respuestas inmunitarias mediadas por las células T contra células cancerosas en el sujeto, es decir, los antígenos tumorales pueden ser reconocidos por las células T CD8+ en el sujeto.

Los antígenos tumorales expresados por células cancerosas en un tumor canceroso pueden incluir, por ejemplo, antígenos de cáncer-testículos (CT) codificados por genes de la línea germinal de cáncer, tales como MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, BAGE-1, RAGE-1, LB33/MUM-1, PRAME, NAG, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1/CT7, MAGE-C2, NY-ESO-1, LAGE-1, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-3, SSX-4, SSX-5, SCP-1 y XAGE y fragmentos inmunogénicos de los mismos (Simpson et al., Nature Rev (2005) 5, 615-625, Gure et al., Clin Cancer Res (2005) 11, 8055-8062; Velazquez et al., Cancer Immun (2007) 7, 1 1 ; Andrade et al., Cancer Immun (2008) 8, 2; Tinguely et al., Cancer Science (2008); Napoletano et al., Am J of Obstet Gyn (2008) 198, 99 e91-97).

Otros antígenos tumorales que pueden expresarse incluyen, por ejemplo, proteínas sobreexpresadas o mutadas y antígenos de diferenciación, particularmente antígenos de diferenciación de melanocitos tales como p53, ras, CEA, MUC1, PMSA, PSA, tirosinasa, Melan-A, MART-1, gp100, gp75, alfa-actinina-4, proteína de fusión Bcr-Abl, Casp-8, beta-catenina, cdc27, cdk4, cdkn2a, coa-1, proteína de fusión dek-can, EF2, proteína de fusión ETV6-AML1, proteína de fusión LDLR-fucosiltransferasa AS, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, Mart2, Mum-2, y 3, neo-PAP, miosina clase I, OS-9, proteína de fusión pml-RAR.alfa, PTPRK, K-ras, N-ras, Triosafofato isomerasa, GnTV, Herv-K-mel, NA-88, SP17, y TRP2-Int2, (MART-1), E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, antígenos del virus de Epstein Barr, EBNA, antígenos E6 y E7 del papilomavirus humano (HPV), TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, alfa-fetoproteína, 13HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27,29/BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68/KP1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/170K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (proteína de unión a Mac-2/proteína asociada a ciclofilina C), TAAL6, TAG72, TLP y TPS y proteínas relacionadas con tirosinasa tales como TRP-1, TRP-2.

Otros antígenos tumorales que pueden expresarse incluyen complejos péptido-MHC fuera del marco generados por los mecanismos de iniciación de la traducción no AUG empleados por células cancerosas "estresadas" (Malarkannan et al. Immunity 1999).

Otros antígenos tumorales que pueden expresarse son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo el documento de Patente WO00/20581; Cancer Vaccines and Immunotherapy (2000) Eds Stern, Beverley and Carroll, Cambridge University Press, Cambridge). Las secuencias de estos antígenos tumorales están fácilmente disponibles en bases de datos públicas pero también se encuentran en los documentos de Patente WO 1992/020356 A1, WO 1994/005304 A1, WO 1994/023031 A1, WO 1995/020974 A1, WO 1995/023874 A1 y WO 1996/026214 A1.

Un sujeto adecuado para el tratamiento como se ha descrito anteriormente puede ser un mamífero, tal como un roedor (por ejemplo, una cobaya, un hámster, una rata, un ratón), murino (por ejemplo, un ratón), canino (por ejemplo, un perro), felino (por ejemplo, un gato), equino (por ejemplo, un caballo), un primate, simio (por ejemplo, un mono o simio), un mono (por ejemplo, tití, babuino), un simio (por ejemplo, gorila, chimpancé, orangután, gibón) o un ser humano.

En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En otras realizaciones, se pueden emplear mamíferos no humanos, especialmente los mamíferos que se usan convencionalmente como modelos para demostrar la eficacia terapéutica en seres humanos (por ejemplo, animales murinos, primates, porcinos, caninos o conejo).

En algunas realizaciones, el sujeto puede tener una enfermedad residual mínima (MRD) después de un tratamiento inicial del cáncer.

Un sujeto con cáncer puede mostrar al menos un signo, síntoma o hallazgo de laboratorio identificable que es suficiente para realizar un diagnóstico de cáncer según los estándares clínicos conocidos en la técnica. Ejemplos de dichos estándares clínicos pueden encontrarse en libros de texto de medicina tales como Harrison's Principles of Internal Medicine, 15th Ed., Fauci AS et al., eds., McGraw-Hill, Nueva York, 2001. En algunos casos, un diagnóstico de un cáncer en un sujeto puede incluir la identificación de un tipo de célula particular (por ejemplo, una célula cancerosa) en una muestra de un fluido corporal o tejido obtenido del sujeto.

Un compuesto anticanceroso puede ser cualquier fármaco o medicamento anticanceroso que tenga actividad contra las células cancerosas. Los compuestos anticancerosos adecuados para su uso en combinación con los anticuerpos como se describen en la presente memoria pueden incluir aspirina, sulindaco, curcumina, agentes alquilantes que incluyen: mostazas nitrogenadas, tales como meclor-etamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán y clorambucilo; nitrosoureas, tales como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU) y semustina (metil-CCNU); tileniminas/metilmelamina, tales como trietilenmelamina (TEM), trietileno, tiofosforamida (tiotepa), hexametilmelamina (HMM, altretamina); sulfonatos de alquilo, tales como busulfán; triazinas, tales como dacarbazina (DTIC); antimetabolitos que incluyen análogos de ácido fólico tales como metotrexato y trimetrexato, análogos de pirimidina tales como 5-fluorouracilo, fluorodesoxiuridina, gemcitabina, arabinósido de citosina (AraC, citarabina), 5-azacitidina, 2,2'-difluorodesoxicidina, análogos de purina tales como 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, azatioprina, 2'-desoxicoformicina (pentostatina), eritrohidroxinoniladenina (EHNA), fosfato de fludarabina y 2-clorodesoxiadenosina (cladribina, 2-CdA); productos naturales que incluyen fármacos antimitóticos tales como paclitaxel, alcaloides de la vinca que incluyen vinblastina (VLB), vincristina y vinorelbina, taxotere, estramustina y fosfato de estramustina; epipodofilotoxinas tales como etopósido y tenipósido; antibióticos, tales como actinomomicina D, daunomicina (rubidomicina), doxorubicina, mitoxantrona, idarubicina, bleomicinas, plicamicina (mitramicina), mitomicina C, y actinomomicina; enzimas tales como L-asparaginasa, citoquinas tales como interferón (IFN)-gamma, factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa, TNF-beta y GM-CSF, factores antiangiogénicos, tales como angiostatina y endostatina, inhibidores de FGF o VEGF, tales como formas solubles de receptores de factores angiogénicos, que incluye los receptores solubles de VGF/VEGF, complejos de coordinación del platino, tales como el cisplatino y el carboplatino, antracenodionas, tales como mitoxantrona, urea sustituida, tales como hidroxiaurea, derivados de metilhidrazina, que incluyen N-metilhidrazina (MIH) y procarbazona, supresores adrenocorticales, tales como el mitotano (o,p'-DDD) y aminoglutetimida; hormonas y antagonistas que incluyen antagonistas de adrenocorticosteroides tales como prednisona y equivalentes, dexametasona y aminoglutetimida; progestina tal como caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxyprogesterona y acetato de megestrol; estrógeno tal como dietilestilbestrol y equivalentes de etinilestradiol; antiestrógenos tales como tamoxifeno; andrógenos que incluyen propionato de testosterona y fluoximesterona/equivalentes; antiandrógenos tales como flutamida, análogos de la hormona liberadora de gonadotropina y leuprolida; antiandrógenos no esteroideos tales como flutamida; inhibidores de quinasa, inhibidores de histona desacetilasa, inhibidores de metilación, inhibidores de proteasoma, anticuerpos monoclonales, oxidantes, antioxidantes, inhibidores de telomerasa, miméticos de BH3, inhibidores de ubiquitina ligasa, inhibidores de stat e inhibidores del receptor de tirosina quinasa tales como mesilato de imatinib (comercializado como Glevac o Glivac) y erlotinib (un inhibidor del receptor de EGF) ahora comercializado como Tarveca; y antivirales tales como fosfato de oseltamivir, anfotericina B y palivizumab.

Aunque es posible administrar anticuerpos anti-OX40 o anti-4-1-BB y compuestos anticancerosos solos, es preferible presentar los compuestos en la misma o en composiciones farmacéuticas separadas, formuladas con componentes farmacéuticamente aceptables según sea apropiado.

Una composición farmacéutica puede comprender, además del anticuerpo y/o un compuesto anticanceroso, uno o más vehículos, adyuvantes, excipientes, diluyentes, rellenos, tampones, estabilizantes, conservantes, lubricantes u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos por los expertos en la técnica. Los materiales adecuados serán estériles y libres de pirógenos, con una isotonicidad y estabilidad adecuadas. Los ejemplos incluyen solución salina estéril (por ejemplo, NaCl al 0,9%), agua, dextrosa, glicerol, etanol o similares o combinaciones de los mismos. Dichos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser mediante bolo, infusión, inyección o cualquier otra vía adecuada, como se discute a continuación. Los materiales adecuados serán estériles y libres de pirógenos, con una isotonicidad y estabilidad adecuadas. Los ejemplos incluyen solución salina estéril (por ejemplo, NaCl al 0,9%), agua, dextrosa, glicerol, etanol o similares o combinaciones de los mismos. La composición puede contener además sustancias auxiliares tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes tamponadores del pH o similares.

Los vehículos, excipientes, etc. adecuados pueden encontrarse en textos farmacéuticos convencionales, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990.

El término "farmacéuticamente aceptable" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del criterio médico razonable, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, ser humano) sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica excesiva u otro problema o complicación, en consonancia con una relación beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación.

En algunas realizaciones, uno o ambos de los anticuerpos pueden proporcionarse en una forma liofilizada para la reconstitución antes de la administración. Por ejemplo, los reactivos liofilizados pueden reconstituirse en agua estéril y mezclarse con solución salina antes de la administración a un sujeto.

Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden

prepararse por cualquier método bien conocido en la técnica farmacéutica. Dichos métodos incluyen la etapa de asociar el principio activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el principio activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto.

5

Las formulaciones pueden estar en forma de líquidos, soluciones, suspensiones, emulsiones, elixires, jarabes, comprimidos, pastillas, gránulos, polvos, cápsulas, sellos, píldoras, ampollas, supositorios, pesarios, pomadas, geles, pastas, cremas, pulverizadores, neblinas, espumas, lociones, aceites, bolos, electuarios o aerosoles.

10

Opcionalmente, se pueden incluir otros agentes terapéuticos o profilácticos en una composición o formulación farmacéutica.

15

El tratamiento puede ser cualquier tratamiento y terapia, ya sea de un ser humano o un animal (por ejemplo, en aplicaciones veterinarias), en el que se logra algún efecto terapéutico deseado, por ejemplo, la inhibición o el retraso del progreso de la afección, e incluye una reducción en la velocidad de progreso, una detención en la velocidad de progreso, mejora de la afección, cura o remisión (ya sea parcial o total) de la afección, prevención, retraso, reducción o detención de uno o más síntomas y/o signos de la afección o prolongación de la supervivencia de un sujeto o paciente más allá de lo esperado en ausencia de tratamiento.

20

También se incluye el tratamiento como medida profiláctica (es decir, profilaxis). Por ejemplo, un sujeto susceptible a o en riesgo de la aparición o reaparición del cáncer puede tratarse como se describe en la presente memoria. Dicho tratamiento puede prevenir o retrasar la aparición o reaparición del cáncer en el sujeto.

25

En particular, el tratamiento puede incluir la inhibición del crecimiento del cáncer, incluyendo la remisión completa del cáncer, y/o la inhibición de la metástasis del cáncer. El crecimiento del cáncer se refiere generalmente a uno cualquiera de varios índices que indican el cambio dentro del cáncer a una forma más desarrollada. Por lo tanto, los índices para medir una inhibición del crecimiento del cáncer incluyen una disminución en la supervivencia de las células cancerosas, una disminución en el volumen o morfología del tumor (por ejemplo, como se determina usando tomografía computarizada (CT), sonografía u otro método de obtención de imágenes), un crecimiento tumoral retardado, una destrucción de la vasculatura tumoral, un rendimiento mejorado en la prueba cutánea de hipersensibilidad retardada, un aumento en la actividad de linfocitos T citolíticos y una disminución en los niveles de antígenos específicos del tumor. La reducción de la supresión inmunitaria en tumores cancerosos en un sujeto puede mejorar la capacidad del sujeto para resistir el crecimiento del cáncer, en particular el crecimiento de un cáncer ya presente en el sujeto y/o disminuir la propensión al crecimiento del cáncer en el sujeto.

35

Los anticuerpos pueden administrarse como se describe en la presente memoria en cantidades terapéuticamente eficaces.

40

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a esa cantidad de un principio activo, o una combinación, material, composición o forma de dosificación que comprende un principio activo, que es eficaz para producir algún efecto terapéutico deseado, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

45

Se apreciará que las dosis apropiadas de los principios activos pueden variar de paciente a paciente. La determinación de la dosificación óptima generalmente implicará el equilibrio del nivel de beneficio terapéutico frente a cualquier riesgo o efectos secundarios perjudiciales de la administración. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen, pero no se limitan a, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del principio activo, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación, y la edad, sexo, peso, afección, salud general e historial médico previo del paciente. La cantidad de principios activos y la vía de administración serán finalmente a criterio del médico, aunque generalmente la dosificación será para conseguir concentraciones del principio activo en un sitio de terapia sin provocar efectos secundarios dañinos o perjudiciales sustanciales.

50

55

En general, una dosis adecuada del principio activo está en el intervalo de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 250 mg por kilogramo de peso corporal del sujeto por día. Cuando el principio activo es una sal, un éster, profármaco o similar, la cantidad administrada se calcula basándose en el compuesto original y por lo tanto el peso real que va a usarse aumenta proporcionalmente.

60

La administración in vivo puede efectuarse en una dosis, de forma continua o intermitente (por ejemplo, en dosis divididas a intervalos apropiados). Los métodos para determinar los medios y la dosificación de administración más eficaces son bien conocidos por los expertos en la técnica y variarán con la formulación usada para la terapia, el propósito de la terapia, la célula objetivo que se está tratando y el sujeto que se está tratando. Pueden llevarse a cabo administraciones únicas o múltiples, siendo seleccionado el nivel y el patrón de dosis por el médico.

65

La administración de compuestos anticancerosos y los anticuerpos de la invención puede ser simultánea, separada o secuencial. Por administración "simultánea", se entiende que los compuestos anticancerosos y los anticuerpos de la invención se administran al sujeto en una sola dosis por la misma vía de administración.

5 Por administración "separada" se entiende que los compuestos anticancerosos y los anticuerpos de la invención se administran al sujeto mediante dos vías de administración diferentes que se producen al mismo tiempo. Esto puede ocurrir, por ejemplo, cuando un agente se administra por infusión o de forma parenteral y el otro se administra de forma oral durante el curso de la infusión o administración parenteral.

10 Por "secuencial" se entiende que los compuestos anticancerosos y los anticuerpos de la invención se administran en diferentes puntos de tiempo, siempre que la actividad del primer agente administrado esté presente y en curso en el sujeto en el momento en que se administra el segundo agente. Por ejemplo, los compuestos anticancerosos pueden administrarse en primer lugar, de manera que se genere una respuesta inmunitaria contra un antígeno tumoral, seguido de la administración del anticuerpo, de manera que se potencie la acción inmunitaria en el sitio del tumor, o viceversa. Preferiblemente, se producirá una dosis secuencial de
15 manera que el segundo de los dos agentes se administre en el plazo de 48 horas, preferiblemente en el plazo de 24 horas, tal como en el plazo de 12, 6, 4, 2 o 1 hora(s) del primer agente.

20 Los mismos principios pueden aplicarse a la administración simultánea, separada o secuencial de los anticuerpos de la invención.

Se pueden administrar múltiples dosis de anticuerpo, por ejemplo, se pueden administrar 2, 3, 4, 5 o más de 5 dosis. Asimismo, pueden administrarse múltiples dosis del compuesto anticanceroso durante un período de tiempo.

25 Se pueden administrar múltiples dosis de los compuestos anticancerosos, por ejemplo, se pueden administrar 2, 3, 4, 5 o más de 5 dosis. La administración de los compuestos anticancerosos puede continuar durante períodos de tiempo sostenidos. Por ejemplo, el tratamiento con los compuestos anticancerosos puede continuarse durante al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 1 mes o al
30 menos 2 meses. El tratamiento con los compuestos anticancerosos puede continuarse durante el tiempo necesario para lograr un rechazo tumoral completo.

Los principios activos o las composiciones farmacéuticas que comprenden los principios activos pueden administrarse a un sujeto mediante cualquier vía de administración conveniente, ya sea sistémica/periféricamente o en el sitio de acción deseado, incluyendo, pero no limitado a, oral (por ejemplo, mediante ingestión); y parenteral, por ejemplo, mediante inyección, incluyendo subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intratecal, intraespinal, intracapsular, subcapsular, intraorbitaria, intraperitoneal, intratraqueal, subcuticular, intraarticular, subaracnoidea e intraesternal; mediante implante de un depósito, por ejemplo, subcutánea o intramuscularmente. Normalmente, la administración será
35 por vía intravenosa, aunque no se excluyen otras vías tales como intraperitoneal, subcutánea, transdérmica, oral, nasal, intramuscular u otras vías convenientes.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los principios activos pueden formularse en formulaciones unitarias de dosificación adecuadas apropiadas para la vía de administración prevista.

45 Las formulaciones adecuadas para la administración oral (por ejemplo, por ingestión) pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, sellos o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del principio activo; como un polvo o gránulos; como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite; como un bolo; como un electuario; o como una pasta.

Un comprimido puede prepararse por medios convencionales, por ejemplo, compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes auxiliares. Los comprimidos por compresión pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada el principio activo en una forma fluida tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con uno o más aglutinantes (por ejemplo povidona, gelatina, goma arábiga, sorbitol, tragacanto, hidroxipropilmetilcelulosa); rellenos o diluyentes (por ejemplo lactosa, celulosa microcristalina, hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo estearato de magnesio, talco, sílice); disgregantes (por ejemplo glicolato de sodio de almidón, povidona reticulada, carboximetilcelulosa de sodio reticulada); agentes tensioactivos o dispersantes o humectantes (por ejemplo laurilsulfato de sodio); y conservantes (por ejemplo p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, ácido sórbico). Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden recubrirse o rayarse opcionalmente y pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del principio activo en los mismos usando, por ejemplo, hidroxipropilmetil celulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado. Los comprimidos pueden estar provistos opcionalmente de un recubrimiento entérico, para proporcionar la liberación en partes del intestino distintas del estómago.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección, incluyendo cutánea, subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica), incluyen soluciones de inyección estériles, acuosas y no acuosas isotónicas, libres de pirógenos que pueden contener antioxidantes, tampones, conservantes, estabilizantes, bacteriostáticos y solutos que vuelven la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes, y liposomas u otros sistemas en micropartículas que están diseñados para dirigir el compuesto a componentes de la sangre o uno o más órganos. Los ejemplos de vehículos isotónicos adecuados para su uso en dichas formulaciones incluyen inyección de cloruro de sodio, solución de Ringer o inyección de lactato de Ringer. Normalmente, la concentración del principio activo en la solución es de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 10 µg/ml, por ejemplo de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 1 µg/ml. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos. Las formulaciones pueden estar en forma de liposomas u otros sistemas en micropartículas que están diseñados para dirigir el principio activo a componentes de la sangre o uno o más órganos.

Las composiciones pueden prepararse en forma de un concentrado para una dilución posterior, o pueden estar en forma de dosis divididas listas para la administración. Alternativamente, los reactivos pueden proporcionarse por separado dentro de un kit, para mezclar antes de la administración a un sujeto humano o animal.

En algunas realizaciones, el tratamiento de un sujeto usando un anticuerpo como se describe en la presente memoria puede comprender además administrar uno o más agentes inmunoterapéuticos al sujeto.

Un agente inmunoterapéutico puede facilitar o mejorar el direccionamiento de las células cancerosas por el sistema inmunitario, en particular las células T, a través del reconocimiento de antígenos expresados por las células cancerosas.

Los agentes adecuados incluyen terapias adoptivas con células T y preparaciones de vacunas contra el cáncer diseñadas para inducir linfocitos T (células T) que reconocen una región localizada de un antígeno o epítipo específico para la célula tumoral.

Una vacuna contra el cáncer es un agente, un agente basado en células, molécula o inmunógeno que estimula o provoca una respuesta inmunitaria endógena en un sujeto o sujeto contra uno o más antígenos tumorales. Las vacunas contra el cáncer adecuadas son conocidas en la técnica y pueden producirse mediante cualquier técnica conveniente.

El uso de antígenos tumorales para generar respuestas inmunitarias está bien establecido en la técnica (véase, por ejemplo; Kakimi K, et al. *Int J Cancer*. 2011 Feb 3; Kawada J, *Int J Cancer*. 2011 Mar 16; Gnjatic S, et al. *Clin Cancer Res*. 2009 Mar 15; 15(6):2130-9; Yuan J, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Dec 23; 105(51):20410-5; Sharma P, et al. *J Immunother*. 2008 Nov-Dec; 31(9):849-57; Wada H, et al. *Int J Cancer*. 2008 Nov 15; 123(10):2362-9; Dieffenbach CS, et al. *Clin Cancer Res*. 2008 May 1; 14(9):2740-8; Bender A, et al. *Cancer Immun*. 2007 Oct 19; 7:16; Odunsi K, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 Jul 31; 104(31):12837-42; Valmori D, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 May 22; 104(21):8947-52; Uenaka A, et al. *Cancer Immun*. 2007 Apr 19; 7:9; Kawabata R, et al. *Int J Cancer*. 2007 May 15; 120(10):2178-84; Jäger E, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Sep 26; 103(39):14453-8; Davis ID *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 Jul 5; 102(27):9734; Chen Q, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 22; 101(25):9363-8; Jäger E, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000 Oct 24; 97(22):12198-203; Carrasco J, et al. *J Immunol*. 2008 Mar 1; 180(5):3585-93; van Baren N, et al. *J Clin Oncol*. 2005 Dec 10; 23(35):9008-21; Kruit WH, et al. *Int J Cancer*. 2005 Nov 20; 117(4):596-604; Marchand M, et al. *Eur J Cancer*. 2003 Jan; 39(1):70-7; Marchand M et al. *Int J Cancer*. 1999 Jan 18; 80(2):219-30; Atanackovic D, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Feb 5; 105(5):1650-5).

Las células cancerosas del sujeto pueden analizarse para identificar un antígeno tumoral expresado por las células cancerosas. Por ejemplo, un método tal y como se describe en la presente memoria puede comprender la etapa de identificar un antígeno tumoral que se muestra mediante una o más células cancerosas en una muestra obtenida del sujeto. Una vacuna contra el cáncer que comprende uno o más epítopos del antígeno tumoral identificado puede administrarse después al sujeto cuyas células cancerosas expresan el antígeno. La vacuna puede inducir o aumentar una respuesta inmunitaria, preferiblemente una respuesta inmunitaria mediada por células T, en el sujeto contra las células cancerosas que expresan el antígeno tumoral identificado.

La vacuna contra el cáncer puede administrarse antes, al mismo tiempo o después de que los anticuerpos se administren al sujeto tal y como se describe en la presente memoria.

La terapia adoptiva con células T implica la administración a un sujeto de células T específicas del tumor a un sujeto. Preferiblemente, las células T se aislaron previamente del sujeto y se expandieron *ex vivo*. Las terapias adoptivas con células T adecuadas son bien conocidas en la técnica (*J. Clin Invest*. 2007 June 1; 117(6):

1466-1476.)

Los agentes inmunoterapéuticos también incluyen otros anticuerpos inmunomoduladores, tales como anticuerpos que se dirigen a puntos de control inmunológicos objetivo. Los ejemplos incluyen anticuerpos específicos para CTLA4, PD1 y PDL1.

En realizaciones, los anticuerpos anti-OX40 de la invención se co-administran con anticuerpos anti-PD1. Hemos demostrado que el anticuerpo anti-OX40 SAP25-29 es sinérgico con anti-PD1 en el tratamiento de AML.

Por lo tanto, la invención proporciona un agonista de OX40 y un anticuerpo inhibidor del punto de control anti-PD1 para su uso en el tratamiento de AML.

Los anticuerpos de la invención también pueden co-administrarse con anticuerpos específicos para CD27, como se proporciona en nuestra Solicitud de Patente Europea EP 2 083 858.

Los agentes inmunoactivos y agentes terapéuticos que pueden co-administrarse con los anticuerpos de la invención incluyen, por lo tanto:

(i) un anticuerpo anti-CD70,

(ii) un anticuerpo anti-B7.1,

(iii) un anticuerpo anti-B7.2,

(iv) un anticuerpo anti-CTLA-4,

(v) un anticuerpo anti-CD28,

(vi) un residuo que agota o bloquea las células T reguladoras,

(vii) una citoquina,

(viii) un agente quimioterapéutico,

(ix) un agente radioterapéutico,

(x) un inmunomodulador,

(xi) un inmunoestimulante,

(xii) un anticuerpo o proteína inmunoestimulante que actúa como un co-estimulante positivo,

(xiii) un anticuerpo o proteína inmunitario que actúa como un co-estimulante negativo,

(xiv) un anticuerpo u otro residuo que bloquea las señales inhibitoras de las células T, y

(xv) un anticuerpo que se une a células tumorales o vasculatura o estroma.

Debe entenderse que la solicitud describe todas las combinaciones de uno cualquiera de los aspectos y realizaciones anteriores descritos anteriormente entre sí, a menos que el contexto exija lo contrario. De manera similar, la solicitud describe todas las combinaciones de las características preferidas y/u opcionales, ya sea individualmente o junto con uno cualquiera de los otros aspectos, a menos que el contexto exija lo contrario.

Identidad

Las moléculas de ácido nucleico útiles en los métodos de la invención incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención o un fragmento del mismo. Dichas moléculas de ácido nucleico no necesitan ser idénticas en un 100% con una secuencia de ácido nucleico endógena, pero normalmente mostrarán una identidad sustancial. Los polinucleótidos que tienen una "identidad sustancial" con una secuencia endógena son normalmente capaces de hibridarse con al menos una cadena de una molécula de ácido nucleico bicatenario. Las moléculas de ácido nucleico útiles en los métodos de la invención incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención o un fragmento del mismo. Dichas moléculas de ácido nucleico no necesitan ser idénticas en un 100% con una secuencia de ácido nucleico endógena, pero normalmente mostrarán una identidad sustancial. Los polinucleótidos que tienen una "identidad sustancial" con una secuencia endógena son normalmente capaces de hibridarse con al menos una cadena de una molécula de ácido nucleico bicatenario. Por "hibridar" se entiende emparejarse para formar una molécula

bicatenaria entre secuencias de polinucleótidos complementarias (por ejemplo, un gen descrito en la presente memoria), o porciones de las mismas, en diversas condiciones de rigurosidad. (Véase, por ejemplo, Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399; Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507).

- 5 Por ejemplo, la concentración de sal rigurosa será normalmente menor de aproximadamente 750 mM de NaCl y 75 mM de citrato de trisodio, preferiblemente menor de aproximadamente 500 mM de NaCl y 50 mM de citrato de trisodio, y más preferiblemente menor de aproximadamente 250 mM de NaCl y 25 mM de citrato de trisodio. La hibridación de baja rigurosidad puede obtenerse en ausencia de disolvente orgánico, por ejemplo, formamida, mientras que la hibridación de alta rigurosidad puede obtenerse en presencia de al menos
- 10 aproximadamente formamida al 35%, y más preferiblemente al menos aproximadamente formamida al 50%. Las condiciones rigurosas de temperatura incluirán normalmente temperaturas de al menos aproximadamente 30°C, más preferiblemente de al menos aproximadamente 37°C, y lo más preferiblemente de al menos aproximadamente 42°C. Los parámetros adicionales variables, tales como tiempo de hibridación, la concentración de detergente, por ejemplo, dodecilsulfato de sodio (SDS), y la inclusión o exclusión de DNA portador, son bien
- 15 conocidos por los expertos en la técnica. Se consiguen diversos niveles de rigurosidad combinando estas diversas condiciones según sea necesario. En una realización preferida, la hibridación se producirá a 30°C en NaCl 750 mM, citrato de trisodio 75 mM y SDS al 1 %. En una realización más preferida, la hibridación se producirá a 37°C en NaCl 500 mM, citrato de trisodio 50 mM, SDS al 1 %, formamida al 35 %, y 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado (ssDNA). En la realización más preferida, la hibridación se producirá a 42°C en NaCl 250
- 20 mM, citrato de trisodio 25 mM, SDS al 1%, formamida al 50% y 200 µg/ml de ssDNA. Variaciones útiles en estas condiciones serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica.

- Para la mayoría de las aplicaciones, las etapas de lavado que siguen a la hibridación también variarán en rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad del lavado pueden definirse por la concentración de sal y por la
- 25 temperatura. Como anteriormente, la rigurosidad del lavado puede aumentarse disminuyendo la concentración de sal o aumentando la temperatura. Por ejemplo, la concentración de sal rigurosa para las etapas de lavado será preferiblemente menor de aproximadamente NaCl 30 mM y citrato de trisodio 3 mM, y lo más preferiblemente menor de aproximadamente NaCl 15 mM y citrato de trisodio 1,5 mM. Las condiciones rigurosas de temperatura para las etapas de lavado incluirán normalmente una temperatura de al menos
- 30 aproximadamente 25°C, más preferiblemente de al menos aproximadamente 42°C, e incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente 68°C. En una realización preferida, las etapas de lavado se producirán a 25°C en NaCl 30 mM, citrato de trisodio 3 mM, y SDS al 0,1%. En una realización más preferida, las etapas de lavado se producirán a 42°C en NaCl 15 mM, citrato de trisodio 1,5 mM y SDS al 0,1 %. En una realización más preferida, las etapas de lavado se producirán a 68°C en NaCl 15 mM, citrato de trisodio 1,5
- 35 mM y SDS al 0,1 %. Variaciones adicionales en estas condiciones serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Las técnicas de hibridación son bien conocidas por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Benton and Davis (*Science* 196:180, 1977); Grunstein and Hogness (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 72:3961, 1975); Ausubel et al. (*Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, Nueva York, 2001); Berger and Kimmel (*Guide to Molecular Cloning Techniques*, 1987, Academic Press, Nueva York); y Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
- 40

- Por "sustancialmente idéntico" se entiende un polipéptido o molécula de ácido nucleico que muestra al menos un 50% de identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia (por ejemplo, una cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en la presente memoria) o secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una
- 45 cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descritas en la presente memoria). Preferiblemente, dicha secuencia es al menos un 60%, más preferiblemente un 80% u 85%, y más preferiblemente un 90%, 95% o incluso un 99% idéntica a nivel de aminoácido o ácido nucleico a la secuencia usada para comparación.

- La identidad de secuencia se mide normalmente usando un software de análisis de secuencia (por ejemplo, Sequence Analysis Software Package del Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wisconsin 53705, BLAST, BESTFIT, GAP, o PILEUP/PRETTYBOX programs). Dicho software empareja secuencias idénticas o similares asignando grados de homología a diversas sustituciones, delecciones y/u otras modificaciones. Las sustituciones conservadoras incluyen
- 50 normalmente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. En un enfoque ejemplar para determinar el grado de identidad, se puede usar un programa BLAST, con una puntuación de probabilidad entre e^{-3} y e^{-100} que indica una secuencia estrechamente relacionada.
- 55

- Se entiende que los intervalos proporcionados en la presente memoria son abreviados para todos los valores dentro del intervalo. Por ejemplo, se entiende que un intervalo de 1 a 50 incluye cualquier número, combinación de números o subintervalo del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50.
- 60

- Modificaciones de las realizaciones anteriores, realizaciones adicionales y modificaciones de las mismas serán evidentes para el experto en la técnica al leer esta divulgación, y como tales, estas están dentro del alcance de
- 65

la presente invención.

Todos los documentos y entradas de bases de datos de secuencias mencionados en esta memoria descriptiva se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad para todos los fines.

La invención se describe adicionalmente a continuación, con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Desarrollo de anticuerpos agonistas de OX40

- Se cribaron veintitrés clones para determinar el efecto sobre la proliferación de PBMC obtenida de varios donantes sanos (Figuras 1A y B).
- Basándose en estos resultados in vitro y en resultados in vivo (Ejemplos 4 y 5 más a continuación), se seleccionaron tres anticuerpos para humanización: SAP29-50, SAP25-29 y SAP29-23.
- Estos anticuerpos parecen unirse a los Dominios 3 y/o 4 de OX40 (Figura 1C).
- SAP9 también se une a los Dominios 3 y/o 4, pero a diferencia de SAP29-50, SAP29-23 y SAP25-29, su unión a OX40 está bloqueada por OX40L (Figura 2).
- SAP 28.2 es el único anticuerpo que se ha encontrado que se une al Dominio 1 (Figura 1C)
- Tanto SAP15.3 como SAP28.3 (no forma parte de la invención) se unen al Dominio 2 (Figura 1C).
- El análisis de la secuencia de la patente BLAST muestra que la secuencia de CDR3 de cadena pesada de los tres anticuerpos humanizados es única (Tabla 1).
- Los tres anticuerpos conservan la actividad de unión una vez humanizados (Figura 3 A, B, y C).

Tabla 1:

Clon	Cadena	Región	Secuencia	Similitud	SEQ ID
SAP28.2	Vh	CDR1	GFSLSYGVH	100%	19
		CDR2	VIWAGGSTNYNSALMS	100%	20
		CDR3	VREDDPY	86%	21
	Vk	CDR1	RASQDISNILN	100%	22
		CDR2	YTSRLHS	100%	23
		CDR3	QQGNTLPF	100%	24
SAP15.3	Vh	CDR1	GFTFSSSYIS	100%	25
		CDR2	WIYAGTGGTSYNQKFTG	94%	26
		CDR3	ARHDYDWFAY	70%	27
	Vk	CDR1	RASSSVSSSYLH	100%	28
		CDR2	STSNLAS	100%	29
		CDR3	QQYSGYPYT	100%	30
SAP28.3	Vh	CDR1	GFSLSSTSGKGV	92%	31
		CDR2	TIWWDDDNRYNPSLKS	100%	32
		CDR3	VQSDWDGAMDY	63%	33
	VI	CDR1	RASSSVSYIH	100%	34
		CDR2	ATSNLAS	100%	35
		CDR3	QQWSSHPT	87%	36
SAP9	Vh	CDR1	GFSLSSTSGLGVT	91%	37

		CDR2	LIYWDDDKRYHPSLKS	94%	38
		CDR3	ARRALGTFDY	70%	39
		CDR1	RASQDISHYLN	100%	40
	Vk	CDR2	YTSRLHS	100%	41
		CDR3	QQGHTLPPT	100%	42
		CDR1	SYIMH	100%	43
SAP25.29	Vh	CDR2	YINPYNDNTKNNEKFKG	88%	44
		CDR3	MDYGDYPYFDY	81%	45
		CDR1	RASQDISNYLN	100%	46
	Vk	CDR2	YTSRLHS	100%	47
		CDR3	QQGNTLPFT	100%	48
		CDR1	DHYMY	100%	49
SAP29.23	Vh	CDR2	TISDGGRRHTYYPDSVKG	88%	50
		CDR3	DLGKALDY	88%	51
		CDR1	RASENIYSNLA	100%	52
	Vk	CDR2	AATNLAD	100%	53
		CDR3	QHFWGTPWT	100%	54
		CDR1	RYIMQ	100%	55
SAP29.50	Vh	CDR2	YINPYNDGTRYNEKFKG	100%	56
		CDR3	FGFGDYLYFDY	54%	57
		CDR1	RASQDIRNYLN	100%	58
	Vk	CDR2	YTSRLHS	100%	59
		CDR3	QQGNTLPYT	100%	60

Ejemplo 2: Los anticuerpos anti-OX40 del isotipo mlgG2a son inhibidores

- 5
- Todos excepto dos de los anticuerpos anti-OX40 originales fueron mlgG1; las dos excepciones fueron SAP9 y SAP29-23.
- 10
- SAP9 y SAP29-23 fueron inhibidores en los ensayos de proliferación de células T in vitro (Figura 4). Sin embargo, se encontró que las variantes de mlgG1 de ambos mAbs fueron estimuladoras.
 - También se observó una diferencia similar en la actividad de las versiones mlgG1 y mlgG2a de los anticuerpos anti-OX40 en modelos in vivo (Ejemplo 5 a continuación).

Ejemplo 3: Ratones knock-in con OX40 humano

- 15
- Se produjeron ratones knock-in (KI) con hOX40 para nosotros por Ozgene.
- 20
- La Figura 5 muestra una comparación de la expresión de mOX40 y hOX40 en células T esplénicas después de la activación con anti-CD3 y anti-CD28. hOX40 se expresa tanto en células CD4 como CD8 a un nivel bajo antes de la activación, mientras que mOX40 no. El patrón de expresión de hOX40 en células CD4 después de la activación fue similar al de mOX40 (Figura 5A). En células CD8, mientras que sólo hay una expresión transitoria/baja de mOX40 después de la activación, la expresión de hOX40 es mayor y más prolongada (Figura 5B).
- 25
- La expresión de hOX40 en células T reguladoras es algo menor que mOX40 (Figura 5C).
 - Ratones KIs con hOX40 heterocigóticos se han cruzado con ratones OT-1 y esplenocitos de estos, que expresan tanto hOX40 como mOX40, usados en experimentos de transferencia adoptiva.

Ejemplo 4: Actividad de anticuerpos anti-hOX40 in vivo

- 5 ▪ En el Ejemplo 2 hemos mostrado que los anticuerpos de nuestro panel anti-hOX40 son agonistas como reactivos mlgG1 y capaces de estimular respuestas de células T CD4 y CD8.
- 10 ▪ En la presente memoria se muestra que estos anticuerpos son también activos en un modelo de transferencia adoptiva de OT-1 anti-OVA in vivo (Figura 6) utilizando células OT-1 que expresan OX40 tanto humano como de ratón.
- 15 ▪ De manera importante, cada uno de los anticuerpos anti-hOX40 indujo un nivel de estimulación de células T anti-OVA que fue comparable con un anticuerpo anti-mOX40, OX86, pero con una expansión inicial ligeramente más lenta de las células OT-1 (Figura 6). Hasta ahora, se ha mostrado que 10 del panel son estimuladores (Figura 6C).
- 20 ▪ Siete de estos clones se unen a los Dominios 3 y/o 4 de OX40, dos se unen al Dominio 2 y uno se une al Dominio 1 (Figura 1A y C).
- 25 ▪ Como se observó in vitro (Ejemplo 1, Figura 4), los anticuerpos anti-OX40 del isotipo m2a, ya sean los anticuerpos originales de las fusiones originales (SAP9 y SAP29-23) o variantes modificadas por ingeniería genética (SAP25-29 y SAP29-50), son inactivos o inhibidores.
- 30 ▪ Los anticuerpos anti-hOX40 SAP25-29 y SAP29-23 humanizados (unidos a regiones constantes de mlgG1) que conservaron su actividad de unión (Figura 3) proporcionaron un nivel similar de estimulación a los anticuerpos originales (Figura 6D).
- 35 ▪ Se demostró que el clon de SAP25-29 era eficaz en combinación con un anticuerpo anti-PD1 en el modelo de ratón C1498 de AML (Figura 7).
- Los anticuerpos anti-hOX40 SAP25-29 y SAP29-23 humanizados (unidos a regiones constantes de mlgG1) que conservaron su actividad de unión (Figura 3) proporcionaron un nivel similar de estimulación a los anticuerpos originales (Figura 6D).
- Se demostró que el clon de SAP25-29 era eficaz en combinación con un anticuerpo anti-PD1 en el modelo de ratón C1498 de AML (Figura 7).

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une específicamente a las secuencias repetidas ricas en cisteína en uno o más de los Dominios extracelulares 3 o 4 de OX40, que comprende:

5

(a) las CDRs de cadena pesada que comprenden las SEQ ID NO: 37-39 y las CDRs de cadena ligera que comprenden las SEQ ID NO: 40-42;

10

(b) las CDRs de cadena pesada que comprenden las SEQ ID NO: 43-45 y las CDRs de cadena ligera que comprenden las SEQ ID NO: 46-48;

(c) las CDRs de cadena pesada que comprenden las SEQ ID NO: 49-51 y las CDRs de cadena ligera que comprenden las SEQ ID NO: 52-54; o

15

(d) las CDRs de cadena pesada que comprenden las SEQ ID NO: 55-57 y las CDRs de cadena ligera que comprenden las SEQ ID NO: 58-60;

y en donde la región Fc del anticuerpo se deriva del isotipo IgG1 de ratón o IgG2 humano.

20

2. El anticuerpo monoclonal aislado según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es del isotipo hIgG2.

3. El anticuerpo monoclonal aislado según la reivindicación 1 que comprende las CDRs de cadena pesada que tienen las SEQ ID NO: 37-39 y las CDRs de cadena ligera que tienen las SEQ ID NO: 40-42.

25

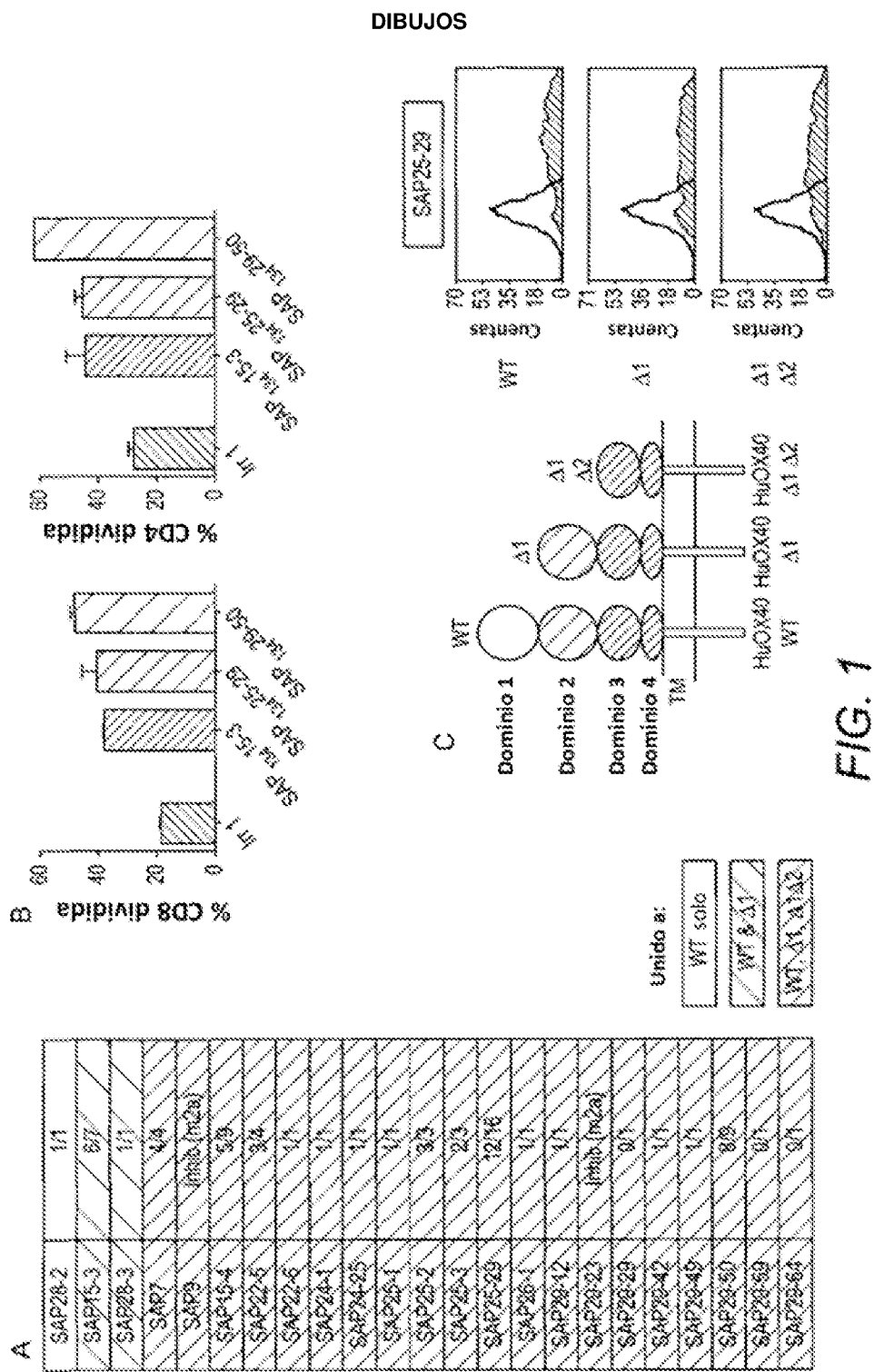


FIG. 1

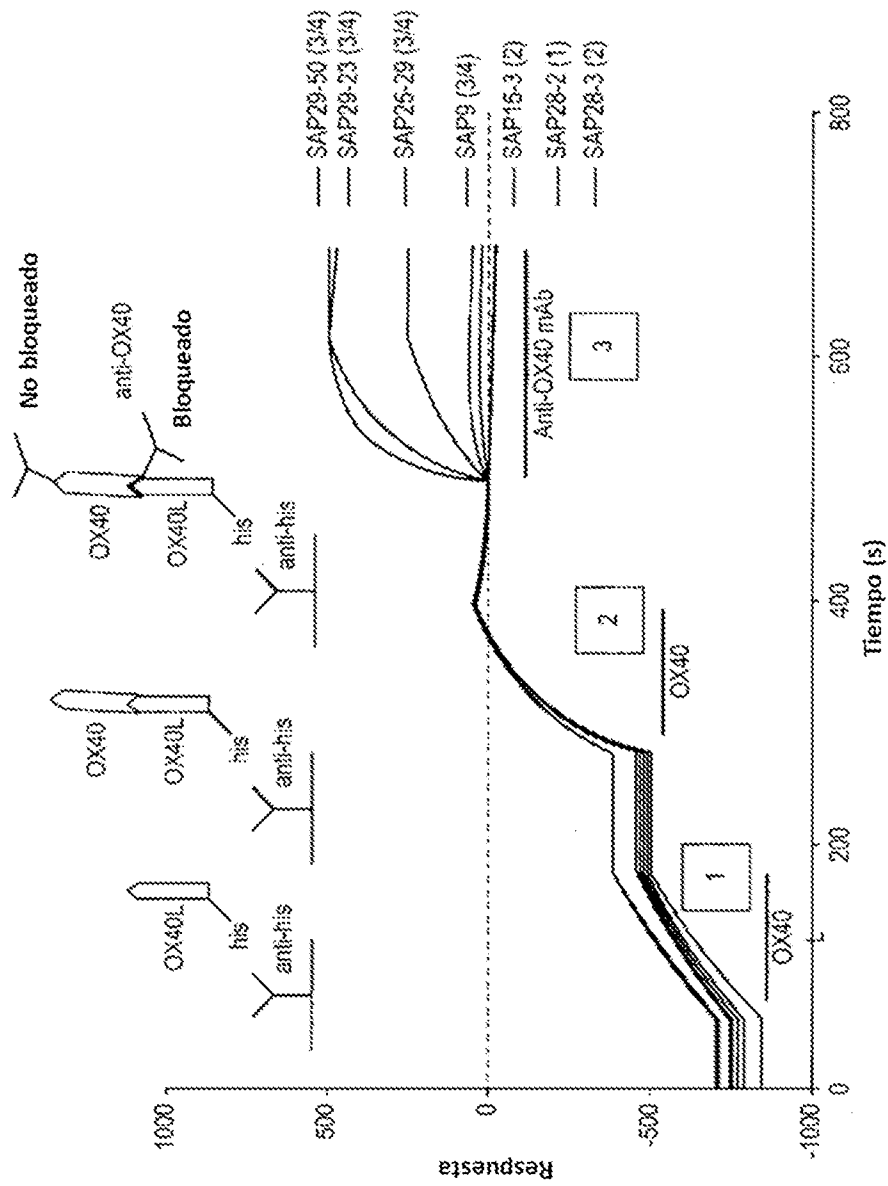


FIG. 2

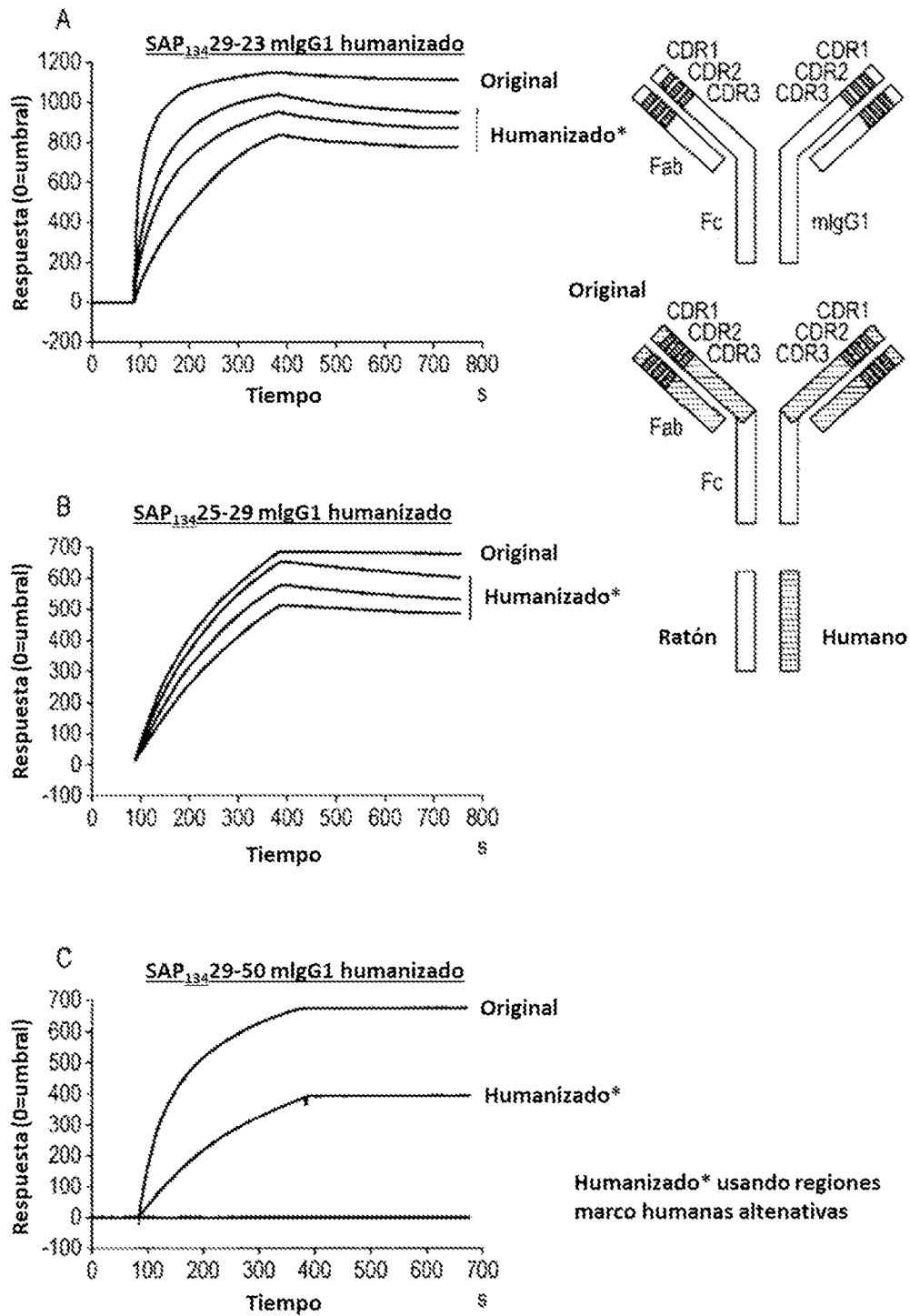


FIG. 3

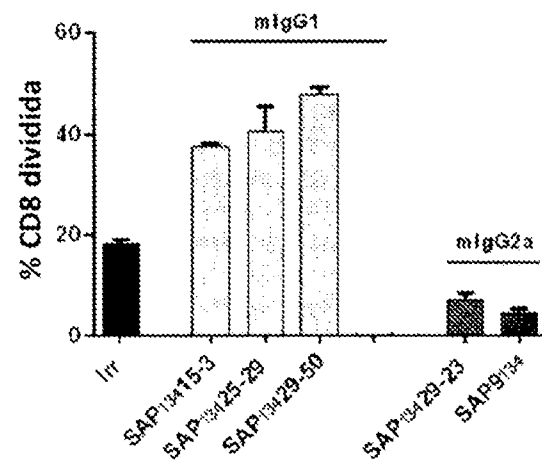


FIG. 4

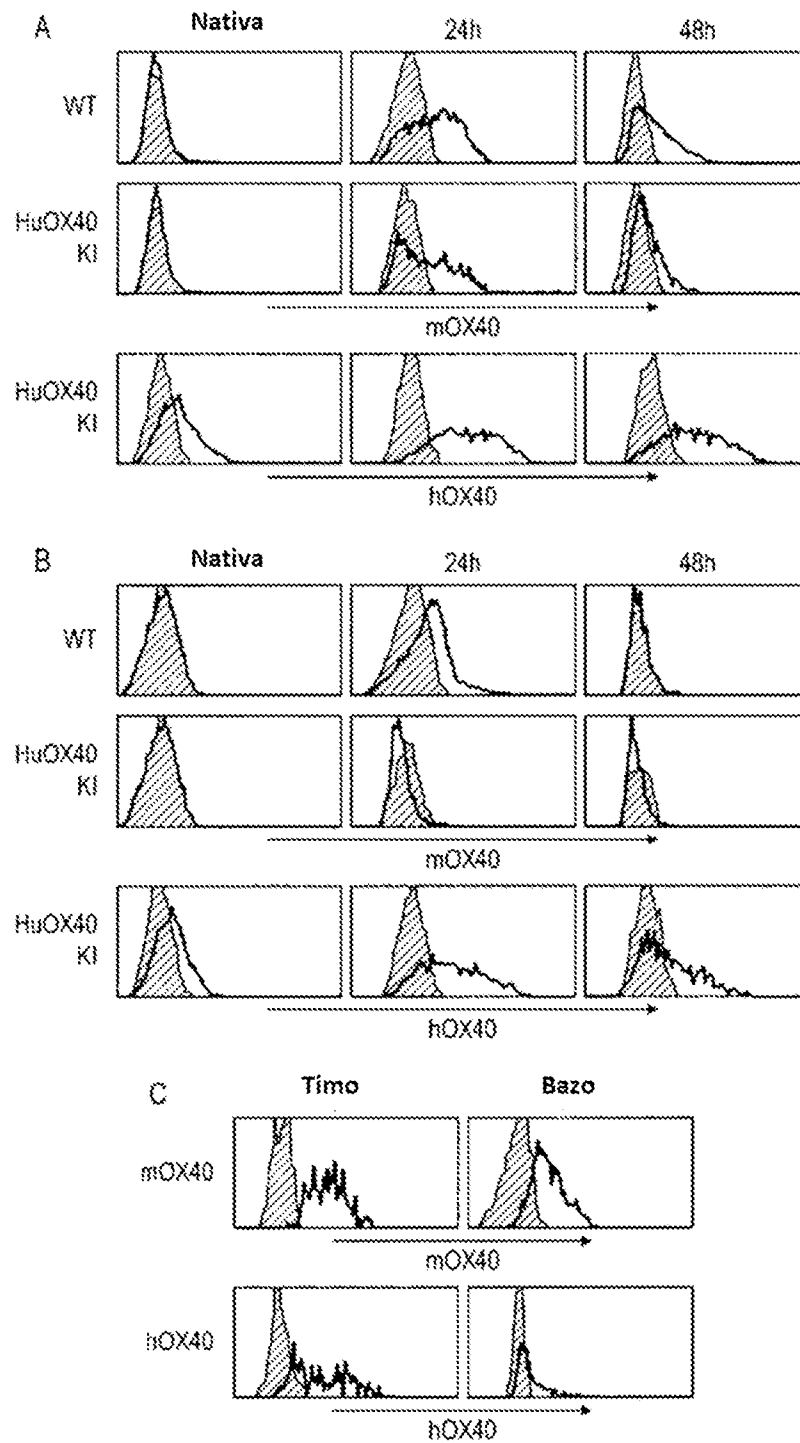


FIG. 5

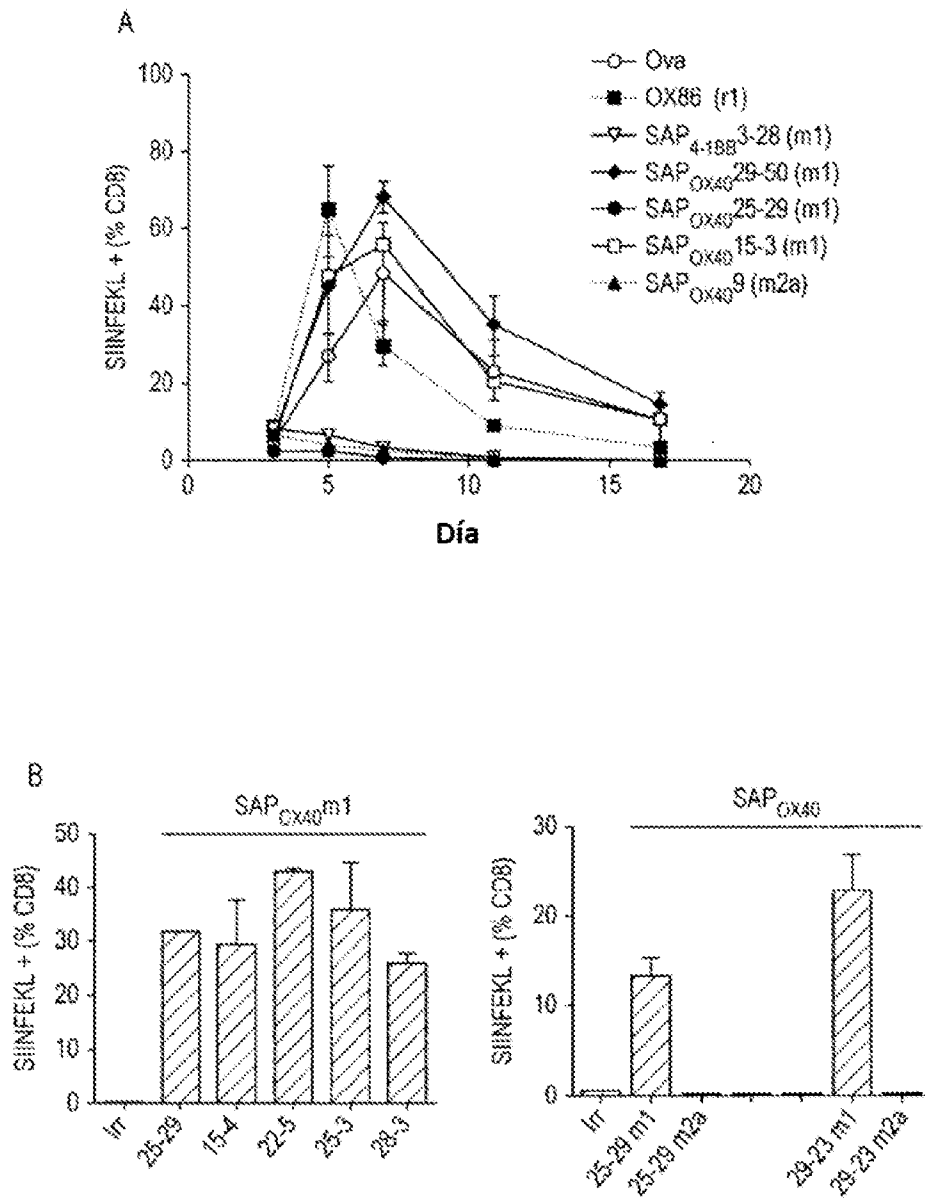


FIG. 6

C

mAb	Estimulador	Inhibidor
SAP _{4-18B} 3-28 m1	-	-
SAP _{OX40} 29-50 m1	+++	
SAP _{OX40} 25-29 m1	++	
SAP _{OX40} 29-50 m2a	-	?/+
SAP _{OX40} 15-3 m1	+++	
SAP _{OX40} 28-2 m1	+	
SAP _{OX40} 15-4 m1	+++	
SAP _{OX40} 22-5 m1	+++	
SAP _{OX40} 25-3 m1	+++	
SAP _{OX40} 28-3 m1	+	
SAP _{OX40} 29-23 m2a	-	?/+
SAP _{OX40} 29-23 m1	+++	
SAP _{OX40} 9 m2a	-	?/+
SAP _{OX40} 9 m1	++	

D

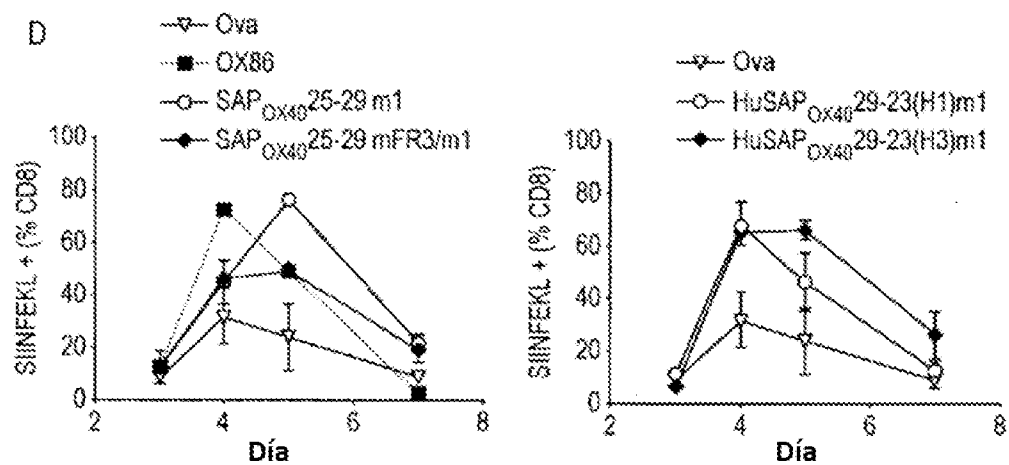


FIG. 6 Continuación

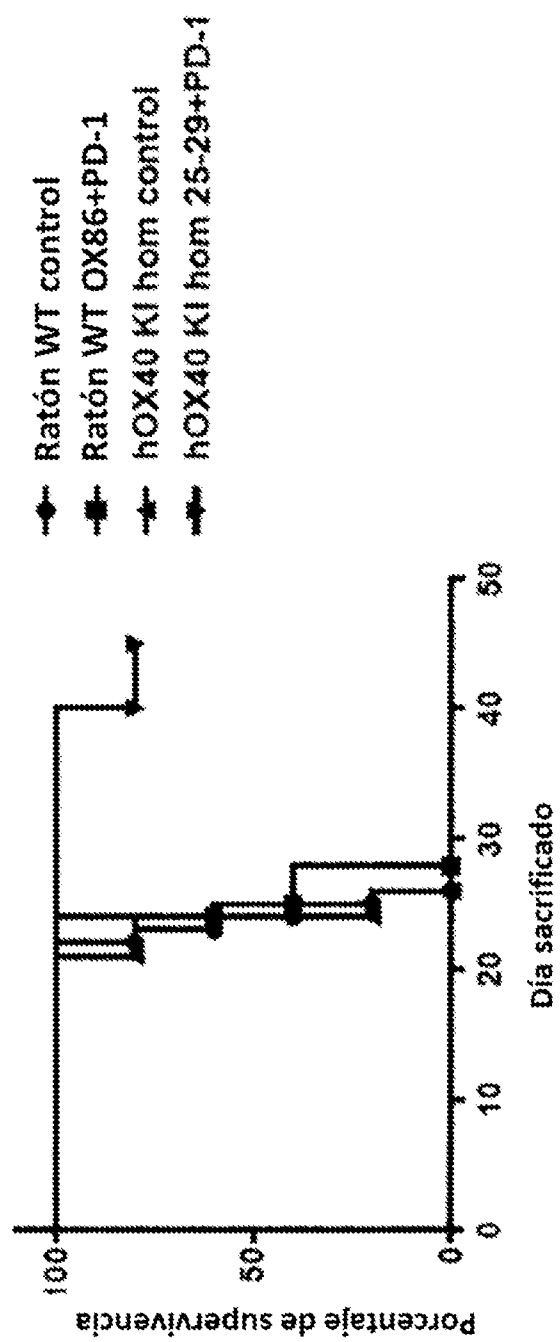


FIG. 7