



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 975 063**

⑯ Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2018** PCT/EP2018/056312

⑯ Fecha y número de publicación internacional: **20.09.2018** WO18167104

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2018** E 18711313 (9)

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2024** EP 3596123

⑮ Título: **Anti-CD25 optimizado para FC para el agotamiento celular específico de tumores**

⑯ Prioridad:

17.03.2017 EP 17161717
06.07.2017 GB 201710879
07.09.2017 GB 201714429

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2024

⑯ Titular/es:

TUSK THERAPEUTICS LTD (50.0%)
6 Falcon Way, Shire Park, Welwyn Garden City
Hertfordshire AL7 1TW, GB y
CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED (50.0%)

⑯ Inventor/es:

GOUBIER, ANNE;
MERCHIERS, PASCAL;
SALIMU, JOSEPHINE;
GOYENECHEA CORZO, BEATRIZ;
MOULDER, KEVIN;
QUEZADA, SERGIO;
PEGGS, KARL;
ARCE VARGAS, FREDERICK y
SOLOMON, ISABELLE

⑯ Agente/Representante:

GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo

ES 2 975 063 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

Anti-CD25 optimizado para FC para el agotamiento celular específico de tumores

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención pertenece al campo de la inmunoterapia del cáncer y se refiere al tratamiento del cáncer, incluyendo el tratamiento de tumores sólidos, en el que el tratamiento implica el uso de un anticuerpo contra CD25.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

La inmunoterapia del cáncer implica el uso del propio sistema inmunitario de un sujeto para tratar o prevenir el cáncer. Las inmunoterapias aprovechan el hecho de que las células cancerosas suelen tener en su superficie moléculas sutilmente diferentes que pueden ser detectadas por el sistema inmunitario. Estas moléculas, o antígenos del cáncer, suelen ser proteínas, pero también incluyen moléculas tales como los hidratos de carbono. Así pues, la inmunoterapia consiste en provocar al sistema inmunitario para que ataque a las células tumorales a través de estos antígenos objetivo. Sin embargo, los tumores malignos, en particular los tumores sólidos, o los cánceres hematológicos pueden escapar a la vigilancia inmunitaria mediante diversos mecanismos tanto intrínsecos a la célula tumoral como mediados por componentes del microentorno tumoral. Entre estos últimos, se han propuesto como factores críticos la infiltración tumoral por células T reguladoras (células Treg o Tregs) y, más concretamente, un equilibrio desfavorable de células T efectoras (Teff) frente a Tregs (es decir, una proporción baja de Teff frente a Treg) (Smyth M et al., 2014, *Immunol Cell Biol.* 92, 473-4).

25 Desde su descubrimiento, se ha descubierto que las Tregs son fundamentales en la mediación de la homeostasis inmunitaria y en la promoción del establecimiento y mantenimiento de la tolerancia periférica. Sin embargo, en el contexto del cáncer su papel es más complejo. Dado que las células cancerosas expresan antígenos tanto propios como asociados al tumor, la presencia de Tregs, que tratan de amortiguar las respuestas de las células efectoras, puede contribuir a la progresión tumoral. La infiltración de Tregs en tumores establecidos representa, por tanto, uno de los principales obstáculos a la eficacia de las respuestas antitumorales y al tratamiento de los cánceres en general.

30 Se cree que los mecanismos de supresión empleados por las Tregs contribuyen significativamente a la limitación o incluso al fracaso de las terapias actuales, en particular las inmunoterapias que se basan en la inducción o potenciación de respuestas antitumorales (Onishi H et al., 2012 *Anticanc. Res.* 32, 997-1003).

35 La depleción de las Tregs como enfoque terapéutico para tratar el cáncer es un enfoque respaldado por estudios que han demostrado la contribución de las Tregs al establecimiento y la progresión tumoral en modelos murinos. Además, la infiltración tumoral por Tregs también se ha asociado a un peor pronóstico en varios cánceres humanos (Shang B et al., 2015, *Sci Rep.* 5:15179). Se ha demostrado que las células Treg contribuyen al establecimiento y la progresión de tumores en modelos murinos y que su ausencia provoca un retraso de la progresión tumoral (Elpek et al., 2007 *J Immunol.* 178(11):6840-8; Golgher et al., 2002; *Eur J Immunol.* 32(11):3267-75, Jones et al., 2002 *Cancer Immun.* 22;2:1; Onizuka et al., 1999 *Cancer Res.* 59(13):3128-33.; Shimizu et al., 1999, *J Immunol.* 163(10):5211-8). En humanos, una alta infiltración tumoral de células Treg y, lo que es más importante, una baja proporción de células T efectoras (Teff) en relación con las células Treg, se asocia con malos resultados en múltiples cánceres humanos (Shang et al., 2015). Por el contrario, una proporción elevada de células Teff/Treg se asocia a respuestas favorables a la inmunoterapia tanto en humanos como en ratones (Hodi et al., 2008, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 105, 3005-3010; Quezada et al., 2006, *J Clin Invest.* 116(7):1935-45. Sin embargo, la depleción de Tregs en tumores es compleja, y los resultados de los estudios en esta área han sido discrepantes.

50 CD25 es uno de los objetivos moleculares potenciales para lograr la depleción de Tregs. El CD25, también conocido como la cadena alfa del receptor de alta afinidad de la interleucina-2 (IL-2Ra), se expresa de forma constitutiva a niveles elevados en las células Treg, y está ausente o se expresa a niveles bajos en las células T efectoras, por lo que es un objetivo prometedor para la depleción de las Treg. La interacción IL-2/CD25 ha sido objeto de varios estudios en modelos murinos, la mayoría de ellos implicando el uso de PC61, un anticuerpo anti-murino CD25 de ratón (Setiady Y et al., 2010. *Eur J Immunol.* 40:780-6), Las actividades funcionales y de unión a CD25 de este anticuerpo se han comparado con las de un panel de anticuerpos monoclonales generados por diferentes autores (Lowenthal J. Wet al., 1985. *J. Immunol.*, 135, 3988-3994; Moreau, J.-L et al., 1987. *Eur. J. Immunol.* 17,929-935; Volk HD et al., 1989 *Clin. exp. Immunol.* 76, 121-5; Dantel J et al., 1991, *Transplantation* 52:110-5). Mientras que los estudios originales demostraron la actividad profiláctica pero no terapéutica de PC61, un estudio reciente demostró que una versión optimizada de Fc de este anticuerpo anti-CD25 conducía a la depleción de Treg intratumoral y ofrece un beneficio terapéutico significativo en varios modelos tumorales murinos (Vargas A et al., 2017, *Immunity* 48(6), 577-586). Los anticuerpos anti-CD25 disponibles, tal como el PC61, bloquean o inhiben la unión de la IL-2 a la CD25, al igual que muchos otros anticuerpos anti-CD25 de ratón, y la mayoría de los divulgados como anticuerpos anti-CD25 humanos; véase por ejemplo los documentos WO2004/045512, WO 2006/108670, WO1993/011238, WO1990/007861 y WO2017/174331. Por ejemplo, Basiliximab y Daclizumab son anticuerpos anti CD25 humanos que inhiben la unión de IL-2 a CD25 y se han desarrollado para reducir la activación de las células T efectoras. El basiliximab es un anticuerpo químico CD25 ratón-humano aprobado actualmente para las enfermedades de injerto contra huésped y el daclizumab es un anticuerpo CD25 humanizado aprobado para el

tratamiento de la esclerosis múltiple. Sin embargo, otros anticuerpos anti-CD25 siguen permitiendo la unión de la IL-2 a CD25, tal como el clon 7D4 (anti-ratón CD25), el clon MA251 (anti-humano CD25) o el 7G7B6 (anti-humano CD25) (Rubin et al, 1985, Hybridoma 4(2) 91-102, Tanaka et al, 1986, Microbiol. Immunol. 30(4), 373-388). 7G7B6 se ha utilizado como anticuerpo de investigación y se ha sugerido como fracción objetivo para dirigir el radionuclido a los linfomas que expresan CD25 (Zhang et al, 2009, Cancer Biother Radiopharm 24(3), 303-309).

Por ejemplo, 7D4 es un anticuerpo IgM anti-ratón CD25 de rata que se ha utilizado ampliamente para detectar células CD25-positivas en presencia o después del tratamiento con PC61 o de anticuerpos con propiedades de unión similares (Onizuka S et al., 1999. Canc Res. 59, 3128 -3133). Muy pocos documentos divulan alguna propiedad funcional del anticuerpo 7D4-IgM, solo o en comparación con el PC61 (Kohm A et al., 2006, J Immunol. 176: 3301-5; Hallett W et al., 2008. Biol Blood Marrow Transplant 14:1088-1099; Fecci P et al., 2006 Clin Cancer Res. 12:4294-4305; McNeill A et al., 2007. Scand J Immunol 65: 63-9; Setiady Y et al., 2010. Eur. J. Immunol. 40: 780-6; Couper K et al., 2007. J Immunol. 178: 4136-4146). De hecho, la técnica anterior no enseña la posibilidad de adaptar o modificar de algún modo el isotipo u otras características estructurales de 7D4 para obtener un anticuerpo mejorado que pueda utilizarse en la terapia del cáncer.

Sin embargo, la capacidad de 7D4-IgM (como tal o como anticuerpo modificado) o de cualquier anti-CD25 humano diseñado o caracterizado por tener características de unión a CD25 similares a las de 7D4 para CD25 de ratón, tal como 7G7B6 o M-A251, no se ha evaluado en detalle con respecto a la depleción optimizada de células Treg dentro de tumores, solo o en combinación con otros anticuerpos u otros compuestos anticancerígenos. Como se ha comentado anteriormente, la infiltración de células Treg en los tumores y, en particular, una proporción baja de células Teff frente a células Treg, puede conducir a un mal resultado clínico. CD25 se ha identificado como un marcador de Treg y, por lo tanto, podría ser un objetivo interesante para los anticuerpos terapéuticos destinados a agotar Treg. Es importante destacar que CD25 es la subunidad alfa del receptor de IL-2 y que la IL-2 es una citoquina clave para las respuestas de la Teff. Los anticuerpos anti-CD25 que se han sometido a ensayos clínicos hasta la fecha, al tiempo que agotan las células Treg, también bloquean la señalización de IL-2 a través de CD25.

John H. Sampson et al, "A pilot study if IL-2R α blocked during lymphopenia depletes regulatory T-cells and correlates with enhance immunity in patients with glioblastoma", PLOS ONE, 7(2):e31046 discute un estudio piloto aleatorizado controlado con placebo para examinar la capacidad de anti-IL-2R α Mab daclizumab para agotar de forma segura y selectiva Tregs en pacientes con glioblastoma tratados con temozolomida linfodepleting (TMZ). El documento WO2014/145907 divulga procedimientos y composiciones para modular células T, en los que la modulación incluye suprimir o inducir células T reguladoras o células T citotóxicas, con anticuerpos anti-CD25.

Los presentes inventores han descubierto ahora que tal bloqueo de la señalización de IL-2 limita las respuestas de Teff y que un anticuerpo anti-CD25 que no bloquea la señalización de IL2 puede agotar eficazmente las células Treg, permitiendo al mismo tiempo que la IL-2 estimule las células Teff, proporcionando anticuerpos que muestran un fuerte efecto anticancerígeno. Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de un procedimiento de tratamiento del cáncer que implique el agotamiento de las Tregs, en particular permitiendo que la IL-2 estimule las células Teff, en particular mediante el uso de anticuerpos anti-CD25 apropiados.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

El objeto cuya protección se solicita es el que se expone en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona usos de anticuerpos anti-CD25 que se caracterizan por elementos estructurales que permiten tanto unir CD25 sin bloquear sustancialmente la señalización de IL-2 a través de CD25, como depletar eficazmente las Tregs, en particular dentro de tumores. Las características estructurales y funcionales de 7D4-IgM (como se ha descrito con respecto a CD25 de ratón) se han modificado para proporcionar anticuerpos que presentan características sorprendentemente mejoradas en términos de uso para depletar Tregs y eficacia contra tumores, solos o en combinación con otros agentes anticancerígenos. También se han caracterizado las características estructurales y funcionales de otros anticuerpos anti-CD25 que no bloquean la señalización de IL2 a través de CD25 y agotan eficazmente las Tregs. Estos hallazgos pueden utilizarse para definir y generar más anticuerpos anti-CD25 humanos que proporcionen efectos comparables contra tumores en sujetos humanos. Las referencias en el presente documento a "anticuerpos anti-CD25" y similares incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos, así como variantes (incluyendo variantes maduradas por afinidad), a menos que el contexto implique lo contrario.

En un primer aspecto de la invención, la presente invención proporciona un anticuerpo IgG1 anti-CD25 humano para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto humano, en el que dicho sujeto tiene un tumor sólido, y en el que dicho anticuerpo inhibe menos de aproximadamente el 25% de la señalización de IL-2 en comparación con la señalización de IL-2 en ausencia del anticuerpo, en el que la señalización de IL2 se mide por los niveles de proteína STAT5 fosforilada en células según se determina mediante un ensayo de fosforilación de STAT5, en el que el ensayo de fosforilación de STAT5 comprende:

- 65 – cultivo de células PMBC en presencia del anticuerpo anti-CD25 a una concentración de 10ug/ml durante 30 minutos y, a continuación, adición de concentraciones variables de IL2 durante 10 minutos

- permeabilización de las células; y
- medición de los niveles de proteína STATS con un anticuerpo marcado con fluorescencia frente a un péptido STAT5 fosforilado mediante citometría de flujo.

5 Las referencias a "no bloquea", "no bloquea", "no bloquea IL-2", "sin bloquear" y terminología similar en el presente documento (con respecto al no bloqueo de la unión de IL-2 a CD25 en presencia del anticuerpo anti-CD25) incluyen realizaciones en las que el anticuerpo anti-CD25 no bloquea la señalización de IL-2 a través de CD25. Más concretamente, en las realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-CD25 utilizado en la invención inhibe menos del 25% de la señalización de IL-2 en comparación con la señalización de IL-2 en ausencia de los anticuerpos, según 10 se determina mediante un ensayo de fosforilación de STAT5.

En una realización, el anticuerpo anti-CD25 se une específicamente a un epítopo de CD25 humano en el que el epítopo comprende uno o más residuos de aminoácidos comprendidos en uno o más de los tramos de aminoácidos seleccionados entre los aminoácidos 150-163 de SEQ ID NO:1 (YQCVQGYRALHRGP), los aminoácidos 166-186 de SEQ ID NO:1 (SVCKMTHGKTRWTQPQLICTG), los aminoácidos 42-56 de SEQ ID NO:1 (KEGTLNLNCECKRGFR) y los aminoácidos 70-88 de SEQ ID NO:1 (NSSHSSWDNQCQCTSSATR). Preferentemente, el epítopo comprende al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once, al menos doce, al menos trece, al menos catorce, al menos quince, al menos dieciséis, al menos diecisiete, al menos dieciocho o más residuos de aminoácidos comprendidos en uno o más de los tramos de aminoácidos seleccionados entre los aminoácidos 150-163 de SEQ ID NO:1 (YQCVQGYRALHRGP), los aminoácidos 166-186 de SEQ ID NO:1 (SVCKMTHGKTRWTQPQLICTG), los aminoácidos 42-56 de SEQ ID NO:1 (KEGTLNLNCECKRGFR) y/o los aminoácidos 70-88 de SEQ ID NO:1 (NSSHSSWDNQCQCTSSATR).

15 En una realización, el anticuerpo anti-CD25 se une específicamente a un epítopo de CD25 humano en el que el epítopo comprende al menos una secuencia seleccionada de: aminoácidos 150-158 de SEQ ID NO:1 (YQCVQGYRA), aminoácidos 176-180 de SEQ ID NO:1 (RWTQP), aminoácidos 42-56 de SEQ ID NO:1 (KEGTLNLNCECKRGFR) y aminoácidos 20 74-84 de SEQ ID NO:1 (SSWDNQCQCTS).

25 En una realización, el anticuerpo anti-CD25 se une específicamente a un epítopo de CD25 humano en el que el epítopo comprende al menos una secuencia seleccionada de: aminoácidos 150-158 de SEQ ID NO:1 (YQCVQGYRA), aminoácidos 166-180 de SEQ ID NO:1 (SVCKMTHGKTRWTQP), aminoácidos 176-186 de SEQ ID NO:1 (RWTQPQLICTG), aminoácidos 42-56 de SEQ ID NO:1 (KEGTLNLNCECKRGFR) y aminoácidos 74-84 de SEQ ID NO:1 (SSWDNQCQCTS).

30 En una realización, el anticuerpo anti-CD25 se une específicamente a un epítopo de CD25 humano en el que el epítopo comprende al menos una secuencia seleccionada de aminoácidos en el que el epítopo comprende al menos una secuencia seleccionada de: aminoácidos 150-158 de SEQ ID NO:1 (YQCVQGYRA), aminoácidos 166-180 de SEQ ID NO:1 (SVCKMTHGKTRWTQP), aminoácidos 176-186 de SEQ ID NO:1 (RWTQPQLICTG), aminoácidos 42-56 de SEQ ID NO:1 (KEGTLNLNCECKRGFR) y aminoácidos 74-84 de SEQ ID NO:1 (SSWDNQCQCTS).

35 En una realización, el anticuerpo anti-CD25 se une específicamente a un epítopo de CD25 humano en el que el epítopo comprende al menos una secuencia seleccionada de: aminoácidos 42-56 de SEQ ID NO:1 (KEGTLNLNCECKRGFR), aminoácidos 70 a 84 de SEQ ID NO: 1 (NSSHSSWDNQCQCTS) y los aminoácidos 150 a 158 de SEQ ID NO: 1 (YQCVQGYRA)

40 En una realización, el anticuerpo anti-CD25 se une a un epítopo que comprende la secuencia de aminoácidos 42-56 de SEQ ID NO:1 (KEGTLNLNCECKRGFR). En una realización, el anticuerpo anti-CD25 se une a un epítopo que comprende la secuencia de aminoácidos 42-56 de SEQ ID NO:1 (KEGTLNLNCECKRGFR) y los aminoácidos 150-160 de SEQ ID NO:1 (YQCVQGYRALH). En otra realización, el anticuerpo anti-CD25 se une a un epítopo que comprende la secuencia de aminoácidos 42-56 de SEQ ID NO:1 (KEGTLNLNCECKRGFR) y los aminoácidos 74-88 de SEQ ID 45 NO:1 (SSWDNQCQCTSSATR). En otra realización, el anticuerpo anti-CD25 se une a un epítopo que comprende la secuencia de aminoácidos 150-163 de SEQ ID NO:1 (YQCVQGYRALHRGP), aminoácidos 166-180 de SEQ ID NO:1 (SVCKMTHGKTRWTQP), aminoácidos 42-56 de SEQ ID NO:1 (KEGTLNLNCECKRGFR) y aminoácidos 74-88 de SEQ ID NO:1 (SSWDNQCQCTSSATR)

50 En una realización, el anticuerpo anti-CD25 se une a un epítopo que comprende la secuencia de aminoácidos 176-180 de SEQ ID NO:1 (RWTQP). En una realización, el anticuerpo anti-CD25 se une a un epítopo que comprende la secuencia de aminoácidos 166-180 de SEQ ID NO:1 (SVCKMTHGKTRWTQP). En una realización, el anticuerpo anti-CD25 se une a un epítopo que comprende la secuencia de aminoácidos 176-186 de SEQ ID NO:1 (RWTQPQLICTG).

55 En una realización, el anticuerpo anti-CD25 se une específicamente a un epítopo que comprende la secuencia de aminoácidos 150-158 de SEQ ID NO:1 (YQCVQGYRA) y el aminoácido 176-180 de SEQ ID NO:1 (RWTQP). En una realización, el anticuerpo anti-CD25 se une específicamente a un epítopo que comprende la secuencia de aminoácidos 150-158 de SEQ ID NO:1 (YQCVQGYRA) y los aminoácidos 176-186 de SEQ ID NO:1 (RWTQPQLICTG). En una realización, el anticuerpo anti-CD25 se une específicamente a un epítopo que comprende la secuencia de aminoácidos 60 150-163 de SEQ ID NO:1 (YQCVQGYRALHRGP) y los aminoácidos 166-180 de SEQ ID NO:1 (SVCKMTHGKTRWTQP).

65 En una realización, el anticuerpo anti-CD25 se une a un epítopo que comprende la secuencia de aminoácidos 74-84 de SEQ ID NO:1 (SSWDNQCQCTSSATR). En una realización, el anticuerpo anti-CD25 se une a un epítopo que comprende la secuencia de aminoácidos 70-84 de SEQ ID NO:1 (NSSHSSWDNQCQCTS).

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que los anticuerpos que se unen a epítopos particulares de CD25, incluyendo aquellos que compiten con 7G7B6 y/o MA251 para unirse a CD25, son útiles en el tratamiento del cáncer, en particular tumores sólidos. Dichos anticuerpos siguen permitiendo la señalización de la IL-2 a través de la CD25 unida por el anticuerpo, y los inventores han descubierto por primera vez que, además de agotar las células Treg, los anticuerpos utilizados en la presente invención permiten que las células Teff ejerzan de forma óptima sus efectos anticancerígenos, al menos en parte al permitir la unión de la IL-2 a, y la señalización a través de, la CD25 expresada en las células Teff.

5 10 Dichos anticuerpos tienen preferentemente una constante de disociación (K_d) para CD25 inferior a 10^{-7} M y/o una constante de disociación para al menos un receptor Fcγ activador inferior a aproximadamente 10^{-6} M. Preferentemente, el anticuerpo tiene una constante de disociación (K_d) para CD25 en el intervalo 10^{-8} o 10^{-9} o 10^{-10} o 10^{-11} o 10^{-12} o 10^{-13} o inferior. Más Preferentemente, el anti-CD25 se caracteriza por otros rasgos relacionados con los receptores Fcγ, en particular un anticuerpo anti-CD25 que se une a FcγRI, FcγRIIc, y/o FcγRIIa con mayor afinidad que la que se une a FcγRIIb:

15 20 25 Dado el uso del anticuerpo anti-CD25 en procedimientos terapéuticos, puede presentar otras características preferidas. El anticuerpo anti-CD25 es preferentemente un anticuerpo monoclonal, en particular un anticuerpo humano, químérico o humanizado. Además, en vista de sus interacciones con células inmunitarias y/u otros componentes del sistema inmunitario para ejercer sus actividades, el anticuerpo anti-CD25 puede provocar además una respuesta CDC, ADCC y/o ADCP mejorada, preferentemente una respuesta ADCC y/o ADCP aumentada, más preferentemente una respuesta ADCC aumentada, en comparación con los anticuerpos clínicos anti-CD25 humanos existentes, Daclizumab y Basiliximab. En algunas realizaciones el anticuerpo anti-CD25 puede provocar una respuesta CDC disminuida, en comparación con los anticuerpos clínicos anti-CD25 humanos existentes, Daclizumab y Basiliximab, más preferentemente el anticuerpo anti-CD25 no provoca una respuesta CDC.

30 35 40 El anticuerpo anti-CD25 utilizado en la presente invención (como se define en general anteriormente y en más detalles en la Descripción Detallada) puede utilizarse en procedimientos de tratamiento de un sujeto humano en los que dicho anticuerpo anti-CD25 se administra a un sujeto. En realizaciones de la invención, el sujeto tiene un tumor sólido (preferentemente en un uso que comprende además el paso de identificar a un sujeto que tiene un tumor sólido). Dichos usos pueden comprender además la administración de otro agente terapéutico a dicho sujeto. En una realización, el agente adicional puede ser un inhibidor del punto de control inmunitario para dicho sujeto, por ejemplo, en forma de un anticuerpo que se une e inhibe una proteína del punto de control inmunitario. Un inhibidor del punto de control inmunitario preferido es un antagonista de PD-1, que puede ser un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1. Más en general, un anticuerpo anti-CD25 puede utilizarse en procedimientos de depleción de células T reguladoras en un tumor sólido en un sujeto que comprenden el paso de administrar dicho anticuerpo anti-CD25 a dicho sujeto.

45 50 55 En otro aspecto, el anticuerpo anti-CD25 utilizado en la invención puede utilizarse en el tratamiento del cáncer en un sujeto humano, en el que dicho sujeto tiene un tumor sólido. Dicho anticuerpo puede administrarse en combinación con otro agente terapéutico, preferentemente otro agente terapéutico contra el cáncer, por ejemplo, con un inhibidor del punto de control inmunitario, preferentemente un antagonista de la vía PD-1/PD-L1, una vacuna contra el cáncer, y/o utilizarse en combinación con terapias de tratamiento estándar como quimioterapia o radioterapia.

60 65 70 En un segundo aspecto de la invención, la presente invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD25 como se ha definido anteriormente de acuerdo con el primer aspecto de la invención con otro compuesto anticancerígeno (preferentemente un inhibidor de punto de control inmunitario u otros compuestos como se indica en la Descripción Detallada) para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto humano, en el que dicho sujeto tiene un tumor sólido y el compuesto anticancerígeno (por ejemplo, un inhibidor del punto de control inmunitario tal como un antagonista de PD-1 o una citoquina como la interleucina 2) puede administrarse simultáneamente, por separado o secuencialmente. La presente divulgación también proporciona un kit para su uso en el tratamiento del cáncer que comprende un anticuerpo anti CD25, tal como se ha definido anteriormente de acuerdo con el primer aspecto de la invención, y un compuesto anticancerígeno (por ejemplo, un inhibidor de puntos de control inmunitarios tal como un antagonista de PD-1).

75 80 85 En un aspecto de la presente divulgación, aunque no forma parte de la invención reivindicada, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CD25 como se ha definido anteriormente en un medio farmacéuticamente aceptable. Dicha composición también puede comprender un compuesto anticancerígeno (por ejemplo, un inhibidor del punto de control inmunitario, tal como un antagonista de PD-1).

90 En un aspecto de la presente divulgación, aunque no forma parte de la invención reivindicada, se proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- (a) una primera fracción de unión a antígeno que se une a CD25; y
- (b) una segunda fracción de unión a antígeno que se une a otro antígeno;

en el que el anticuerpo anti-CD25 no inhibe la unión de la Interleucina-2 (IL-2) a CD25, y preferentemente el anticuerpo biespecífico es un anticuerpo IgG1 que se une al menos a un receptor Fc activador con alta afinidad y agota las células T reguladoras infiltrantes de tumores. Preferentemente, dicha segunda fracción de unión a antígeno se une a un antígeno seleccionado de una proteína de punto de control inmunitario o un antígeno asociado a tumor, o puede ser, o basarse en, un anticuerpo anti-Receptor Fc activador humano (anti-FcgRI, anti-FcgRIIa, anti-FcgRIII), o un anticuerpo antagonista anti-FcγRIIb humano. Como tal, la segunda fracción de unión a antígeno puede unirse a FcRIIb. Puede unirse alternativamente a FcgRI, FcgRIIa y/o FcgRIII con actividad antagonista.

Preferentemente, dicho anticuerpo biespecífico comprende una segunda fracción de unión a antígeno que se une a una proteína de punto de control inmunitario seleccionada del grupo que consiste en PD-1, CTLA-4, BTLA, KIR, LAG3, VISTA, TIGIT, TIM3, PD-L1, B7H3, B7H4, PD-L2, CD80, CD86, HVEM, LLT1, GAL9, GITR, OX40, CD137 e ICOS. Dicha proteína de punto de control inmunitario se expresa preferentemente en una célula tumoral. Preferentemente, la proteína de punto de control inmunitario se selecciona entre PD-1, PD-L1 y CTLA-4. La segunda fracción de unión a antígeno que se une a una proteína de punto de control inmunitario puede estar comprendida en un anticuerpo disponible comercialmente que actúe como inhibidor de punto de control inmunitario, por ejemplo:

- (a) en el caso de PD-1, el anticuerpo anti-PD-1 puede ser Nivolumab o Pembrolizumab;
- (b) En el caso de PD-L1, el anti-PD-L1 es Atezolizumab;
- (c) En el caso de CTLA-4, el anti-CTLA-4 es Ipilimumab.

Dicho anticuerpo biespecífico puede proporcionarse en cualquier formato disponible comercialmente, incluyendo Duobody, BiTE DART, CrossMab, Knobs-in-holes, Triomab, u otro formato molecular apropiado de anticuerpo biespecífico y fragmentos del mismo.

Alternativamente, dicho anticuerpo biespecífico comprende una segunda fracción de unión a antígeno que se une al antígeno asociado al tumor. En esta realización alternativa tales antígenos y anticuerpos correspondientes incluyen, sin limitación, CD22 (Blinatumomab), CD20 (Rituximab, Tositumomab), CD56 (Lorotuzumab), CD66e/CEA (Labetuzumab), CD152/CTLA-4 (Ipilimumab), CD221/IGF1R (MK-0646), CD326/Epcam (Edrecolomab), CD340/HER2 (Trastuzumab, Pertuzumab) y EGFR (Cetuximab, Panitumumab).

En la Descripción Detallada y en los Ejemplos se proporcionan otros objetos de la invención, incluidas otras definiciones de los anticuerpos anti-CD25 humanos utilizados en la invención (y de la divulgación) y de sus usos en procedimientos para tratar el cáncer, en composiciones farmacéuticas, en combinaciones con otros compuestos anticancerígenos, en anticuerpos biespecíficos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona usos de anticuerpos IgG1 anti-CD25 humanos en un procedimiento de tratamiento o prevención del cáncer, en un sujeto, cuando el sujeto tiene un tumor sólido, que comprende el paso de administrar un anticuerpo que se une a CD25 a dicho sujeto, en el que los anticuerpos anti-CD25 se caracterizan por elementos estructurales que permiten tanto unir CD25 sin interferir en la unión de interleucina 2 o la señalización a través de CD25 como depletar eficazmente Tregs, en particular dentro de tumores. El anticuerpo que se une a CD25 como se define en la presente invención puede utilizarse en el tratamiento o prevención del cáncer, específicamente un tumor sólido. En todas las realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-CD25 inhibe menos de aproximadamente el 25% de la señalización de IL-2 en comparación con la señalización de IL-2 en ausencia del anticuerpo, en la que la señalización de IL2 se mide por los niveles de proteína STAT5 fosforilada en las células según lo determinado por el ensayo de fosforilación de STAT5 antes mencionado.

Los presentes inventores han descubierto que la CD25 puede dirigirse utilizando un anticuerpo anti-CD25 que no inhibe (o no inhibe sustancialmente) la unión de la interleucina 2 a la CD25 o la señalización de la IL-2 a través de la CD25 para la depleción de las células T reguladoras en el contexto terapéutico, por ejemplo, en un tumor sólido establecido. Los presentes inventores han descubierto que los anticuerpos anti-CD25 no bloqueantes de IL-2 que tienen un isotipo que potencia su unión a los receptores gamma Fc activadores conducen a una depleción eficaz de las células T reguladoras infiltrantes de tumores al tiempo que permiten una respuesta Teff óptima, un enfoque terapéutico que podría, por ejemplo, asociarse (en combinación con o dentro de anticuerpos biespecíficos) con otros compuestos dirigidos contra el cáncer, tal como los dirigidos contra una proteína de punto de control inmunitario, un antígeno asociado al tumor o un receptor Fcγ inhibidor. Estos hallazgos también hacen posible combinar el uso de un anti-CD25 con interleucina-2 a dosis adecuadas para tratar el cáncer.

CD25 es la cadena alfa del receptor de IL-2, y se encuentra en células T activadas, células T reguladoras, células B activadas, algunas células T NK, algunos timocitos, precursores mieloides y oligodendroцитos. CD25 se asocia con CD122 y CD132 para formar un complejo heterotrimérico que actúa como receptor de alta afinidad para la IL-2. La secuencia consenso de CD25 humana se muestra a continuación en SEQ ID NO:1 (número de acceso Uniprot P01589; el dominio extracelular de CD25 humana madura, correspondiente a los aminoácidos 22-240, está subrayado y se presenta como SEQ ID NO:2):

10	20	30	40	50
MDSYLLMWGL LTFIMPGCQ <u>AELCDDDPPE</u> I ^{PHATFKAMA} YKEGTMLNCE				
60	70	80	90	100
CKRGFRRIKS GSLYMLCTGN S ^H SSHSSWDNQC QCTSSATRNT TKQVTPQPEE				
110	120	130	140	150
<u>Q</u> KERKTTEMQ SPMQPVDQAS LPGHCREPPP WENEATERIY HFVVGQMVYY				
160	170	180	190	200
QCVQGYRALH RGPAESVCKM THGKTRWTQP QLICTGEMET SQFFGEEKPQ				
210	220	230	240	250
ASPEGRPESE TSCLVTTTDF QIOTEMAATM ETSIFTTEYQ VAVAGCVFLL				
260	270			
ISVLLLSGLT WQRRQRKSRR TI				

5 Tal como se utiliza en el presente documento, "un anticuerpo que se une a CD25" se refiere a un anticuerpo capaz de unirse a la subunidad CD25 del receptor de IL-2. Esta subunidad también se conoce como subunidad alfa del receptor de IL-2. Dicho anticuerpo también se denomina en el presente documento "anticuerpo anti-CD25".

10 Un anticuerpo anti-CD25 es un anticuerpo capaz de unirse específicamente a la subunidad CD25 (antígeno) del receptor de IL-2. Por "unión específica", "unirse específicamente" y "unirse específicamente" se entiende que el anticuerpo tiene una constante de disociación (K_d) para el antígeno de interés inferior a aproximadamente 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M o 10^{-13} M. En una realización preferida, la constante de disociación es inferior a 10^{-8} M, por ejemplo, en el intervalo de 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M o 10^{-13} M.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere tanto a moléculas de inmunoglobulina intactas como a fragmentos de las mismas que incluyen el sitio de unión al antígeno, e incluye formas policlonales, monoclonales, modificadas genéticamente y modificadas de otro modo de anticuerpos, incluyendo pero no limitados a anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos heteroconjugados y/o multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, tricuerpos y tetracuerpos) y fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos, como por ejemplo Fab', F(ab')₂, Fab, Fv, rlgG, fusiones de polipéptido-Fc, variantes de cadena única (fragmentos scFv, VHVs, Trans-bodies[®], Affibodies[®], anticuerpos de dominio único de tiburón, diacuerpos de cadena única o en tandem (TandAb[®]), VHVs, Anticalins[®], Nanobodies[®], minicuerpos, BiTE[®], péptidos bicíclicos y otros andamiajes alternativos de proteínas inmunoglobulínicas). En algunas realizaciones, un anticuerpo puede carecer de una modificación covalente (por ejemplo, la unión de un glicano) que tendría si se produjera de forma natural. En algunas realizaciones, un anticuerpo puede contener una modificación covalente (por ejemplo, la unión de un glicano, una fracción detectable, una fracción terapéutica, una fracción catalítica u otro grupo químico que proporcione una mejor estabilidad o administración del anticuerpo, tal como el polietilenglicol). En algunas realizaciones, el anticuerpo puede estar en forma de anticuerpo enmascarado (por ejemplo, Probodies[®]). Un anticuerpo enmascarado puede comprender un péptido bloqueante o "enmascarante" que se une específicamente a la superficie de unión al antígeno del anticuerpo e interfiere con la unión al antígeno del anticuerpo. El péptido máscara está unido al anticuerpo por un enlazador escindible (por ejemplo, por una proteasa). La escisión selectiva del enlazador en el entorno deseado, es decir, en el entorno tumoral, permite que el péptido de enmascaramiento/bloqueo se disocie, permitiendo que se produzca la unión del antígeno en el tumor y limitando así los posibles problemas de toxicidad. "Anticuerpo" también puede referirse a anticuerpos de camélidos (anticuerpos de cadena pesada únicamente) y moléculas similares a los anticuerpos, como las anticalinas (Skerra (2008) FEBS J 275, 2677-83). En algunas realizaciones, un anticuerpo es policlonal u oligoclonal, que se genera como un panel de anticuerpos, cada uno asociado a una única secuencia de anticuerpo y uniéndose más o menos epítopos distintos dentro de un antígeno (tales como diferentes epítopos dentro del dominio extracelular CD25 humano que están asociados a diferentes anticuerpos anti-CD25 humanos de referencia). Los anticuerpos policlonales u oligocloniales pueden suministrarse en una única preparación para usos médicos, tal como se describe en la bibliografía(Kearns JD et al., 2015. Mol Cancer Ther. 14:1625-36).

40 En un aspecto de la invención, el anticuerpo es monoclonal. El anticuerpo puede ser adicional o alternativamente humanizado o humano. En otro aspecto, el anticuerpo es humano, o en cualquier caso un anticuerpo que tiene un formato y características que permiten su uso y administración en sujetos humanos. En un aspecto de la invención, los anticuerpos pueden ser variantes humanizadas de 7G7B6 o MA251 madurados por afinidad. El anticuerpo madurado por afinidad tiene al menos 10% más de afinidad por CD25 y/o las secuencias CDR son al menos 80% idénticas, preferentemente 90% idénticas a las CDR de la secuencia parental (en todas las secuencias). Un anticuerpo madurado por afinidad es un anticuerpo con uno o más aminoácidos alterados en una o más CDR que da lugar a un anticuerpo con afinidad mejorada por CD25 en comparación con la cepa parental que no tiene los aminoácidos alterados.

- Los anticuerpos (Abs) y las inmunoglobulinas (Igs) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Las inmunoglobulinas pueden ser de cualquier clase, tal como IgA, IgD, IgG, IgE o IgM. Las inmunoglobulinas pueden ser de cualquier subclase, tal como IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄. En realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-CD25 es de la subclase IgG1 humana.
- 5 La región Fc de los anticuerpos IgG interactúa con varios receptores Fc_y celulares (Fc_yR) para estimular y regular los mecanismos efectores descendentes. Existen cinco receptores activadores, es decir, Fc_yRI (CD64), Fc_yRIIa (CD32a), Fc_yRIIc (CD32c), Fc_yRIIa (CD16a) y Fc_yRIIb (CD16b), y un receptor inhibidor Fc_yRIIb (CD32b). La comunicación de los anticuerpos IgG con el sistema inmunitario está controlada y mediada por los Fc_yR, que transmiten la información detectada y recopilada por los anticuerpos al sistema inmunitario, proporcionando un enlace entre los sistemas inmunitarios innato y adaptativo, y en particular en el contexto de la bioterapéutica (Hayes J et al., 2016. *J Inflamm Res* 9: 209-219).
- 10 Las subclases de IgG varían en su capacidad para unirse al Fc_yR y esta unión diferencial determina su capacidad para provocar una serie de respuestas funcionales. Por ejemplo, en humanos, Fc_yRIIa es el principal receptor implicado en la activación de la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) y la IgG3 seguida de cerca por la IgG1 muestran las mayores afinidades por este receptor, lo que refleja su capacidad para inducir ADCC de forma potente. Aunque se ha demostrado que las IgG2 se unen débilmente a este receptor, también se ha observado que los anticuerpos anti-CD25 con isotipo IgG2 humano eliminan eficazmente las Tregs.
- 15 20 En una realización preferida de la invención, el anticuerpo se une a Fc_yR con alta afinidad, preferentemente un receptor activador con alta afinidad. Preferentemente, el anticuerpo se une a Fc_yRI y/o Fc_yRIIa y/o Fc_yRIIa con alta afinidad. En una realización particular, el anticuerpo se une al menos a un receptor Fc_y activador con una constante de disociación inferior a aproximadamente 10⁻⁶M, 10⁻⁷M, 10⁻⁸M, 10⁻⁹M o 10⁻¹⁰M.
- 25 30 En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, preferentemente un anticuerpo IgG1 humano, que es capaz de unirse al menos a un receptor activador de Fc. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a uno o más receptores seleccionados de Fc_yRI, Fc_yRIIa, Fc_yRIIc, Fc_yRIIa y Fc_yRIIb. En un aspecto, el anticuerpo es capaz de unirse a Fc_yRIIa. En un aspecto, el anticuerpo es capaz de unirse a Fc_yRIIa y Fc_yRIIa y opcionalmente a Fc_yRI. En un aspecto, el anticuerpo es capaz de unirse a estos receptores con alta afinidad, por ejemplo, con una constante de disociación de menos de aproximadamente 10⁻⁷M, 10⁻⁸M, 10⁻⁹M o 10⁻¹⁰M.
- 35 En un aspecto, el anticuerpo se une a un receptor inhibidor, Fc_yRIIb, con baja afinidad. En un aspecto, el anticuerpo se une a Fc_yRIIb con una constante de disociación superior a aproximadamente 10⁻⁷ M, superior a aproximadamente 10⁻⁶ M o superior a aproximadamente 10⁻⁵ M.
- 40 En una realización preferida de la invención, el anticuerpo anti-CD25 es de la subclase IgG1 y tiene actividad ADCC y/o ADCP, como se discute en el presente documento, en particular con respecto a células de origen humano. Como se ha descrito anteriormente (Nimmerjahn F et al., 2005. *Science*, 310:1510-2), el isotipo mlgG2a (que corresponde al isotipo IgG1 humano) se une a todos los subtipos de Fc_yR con una elevada relación activador-inhibidor (A/I), que es al menos superior a 1. En cambio, otros isotipos (tal como el isotipo rlgG1) se unen con una afinidad similar a un solo Fc_yR activador (Fc_yRIII), así como al Fc_yRIIb inhibidor, lo que da lugar a una relación A/I baja (<1). Esta menor relación A/I puede correlacionarse con una menor depleción de Treg intratumoral y una menor actividad terapéutica antitumoral del isotipo. A pesar del conocido perfil de unión a Fc_yR de los anticuerpos del isotipo IgG2 humano, también se puede conseguir una depleción significativa de Treg con el isotipo IgG2 humano de un anticuerpo anti-CD25. Por lo tanto, en una realización el anticuerpo anti-CD25 es de la subclase IgG2.
- 45 50 En una realización preferida, el anticuerpo anti-CD25 descrito en el presente documento se une a CD25 humano, preferentemente con alta afinidad. Aun preferentemente, el anticuerpo anti-CD25 se une a la región extracelular de CD25 humana, como se ha mostrado anteriormente. En particular, los Ejemplos proporcionan datos experimentales generados con el anticuerpo secretado por el hibridoma 7D4. Como se indica en los Antecedentes de la Invención, este anticuerpo es específico para el CD25 de ratón que, como muestra la comparación del panel de anticuerpos monoclonales (incluyendo el PC61), se une a uno de los tres epítopos dentro del CD25 de ratón que es distinto del sitio de unión de la IL-2 y no bloquea la unión de la IL-2 al CD25. Por ejemplo, se ha demostrado que 7D4 se une a CD25 de ratón en un epítopo que comprende los aminoácidos 184 a 194 (REHHRFLASEE) en [secuencia Uniprot P01590]. Los ensayos con 7D4 y CD25 de ratón en la literatura (por ejemplo, Setiady Y et al., 2010. *Eur. J. Immunol.* 40: 780-6; McNeill A et al., 2007. *Scand J Immunol.* 65:63-9; Teege S et al., 2015, *Sci Rep* 5: 8959), junto con los divulgados en los Ejemplos, incluyendo anticuerpos recombinantes que comprenden el dominio de unión a CD25 de 7D4 o los anticuerpos anti-CD25 humanos no bloqueantes de IL-2 denominados MA-251 y 7G7B6, pueden adaptarse para caracterizar aquellos anticuerpos humanos que reconocen CD25 humano que tienen las mismas características funcionales de 7D4 tanto a nivel de interacción con CD25 (en particular, no bloqueando la unión a IL-2) como con receptores Fc (en particular, uniendo preferentemente uno o más de los receptores Fc_y activadores humanos y agotando eficazmente las Treg), cuando se asocia el isotipo apropiado, como se describe en los Ejemplos.
- 55 60 65 En un aspecto de la invención, los anticuerpos compiten con el anticuerpo 7G7B6 para unirse a CD25 humano; y/o se une al mismo epítopo o epítopos reconocidos por el anticuerpo 7G7B6. 7G7B6 es un anticuerpo monoclonal con

isotipo IgG2a de ratón que reconoce el CD25 humano. 7G7B6 comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia:

EVQLVESGGDLVQPRGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWWRQTPDKRLELVATINGYGDTTYYPDS
 VKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYFCARDRDYGNSSYYALDYWGQGTSVTVSS
 (SEQ ID NO:3),

5

y una región de cadena ligera variable que tiene la secuencia:

QIVLSQSPAIALSASPGERVTMTCRASSSVFMHWLQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVSARFSGS
 GSGTSYSLTITRVEAEDAATYYCQQWSSNPPAFGGGTKEIK
 (SEQ ID NO:4).

10 En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos GFTLDSYGVs (SEQ ID NO:7) como CDR1 variable de cadena pesada; la secuencia de aminoácidos GVTSSGGSAYYADSV (SEQ ID NO:8) como CDR2 variable de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos DRYVYTGGYLYHYGMDL (SEQ ID NO:9) como CDR3 variable de cadena pesada, y comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos RASQSISDYLA (SEQ ID NO:11) como CDR1 variable de cadena ligera; la secuencia de aminoácidos YAASTLPF (SEQ ID NO:12) como CDR2 variable de cadena ligera, la secuencia de 15 aminoácidos QGTYDSSDWYWA (SEQ ID NO:13) como CDR3 variable de cadena ligera. El anticuerpo puede competir con 7G7B6 en la unión a CD25 humano. Preferentemente, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia:

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTLDSYGVsWWRQAPGKGLEWGVTSSGGSAYYADSV
VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYVYTGGYLYHYGMDLWGQGTLVTVSS
 (SEQ ID NO:10),

20

y cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISDYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASTLPFGVPSRFSGS
 GSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQGTYDSSDWYWAFGGGTKVEI
 (SEQ ID NO:14).

25 En otra realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SGFSVDIYDMS (SEQ ID NO:15) como CDR1 variable de cadena pesada; la secuencia de aminoácidos YISSSLGATYYADSV (SEQ ID NO:16) como CDR2 variable de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos ERIYSVYTLDDYYAMDL (SEQ ID NO:17) como CDR3 variable de cadena pesada, y comprenden una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos QASQGITNNLN (SEQ ID NO:19) como CDR1 variable de cadena ligera; la secuencia de aminoácidos YAASTLQS (SEQ ID NO:20) como CDR2 variable de cadena ligera, la secuencia de 30 aminoácidos QQGYTTSNVDNA (SEQ ID NO:21) como CDR3 variable de cadena ligera. El anticuerpo puede competir con 7G7B6 en la unión a CD25 humano. Preferentemente, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSVDIYDMSWWRQAPGKGLEWWYISSSLGATYYADSV
VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERIYSVYTLDDYYAMDLWGQGTLVTVSS
 (SEQ ID NO:18).

35

y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQGITNNLNWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGS
GSGTDFLTISLQPEDVATYYCQQGYTTSNVDNAFGGGTKVEIK
(SEQ ID NO:22).

En una realización, el anticuerpo que puede competir con 7G7B6 para unirse a CD25 humano comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

5 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSSWRQAPGKGLELVSTINGYGDTTYYPDS
VKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRDYGNNSYYALDYWGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO: 23),

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSSWRQAPGKGLELVSTINGYGDTTYYPDS
VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDRDYGNNSYYALDYWGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO: 24)

10 y comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASSSVSFMHWLQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPDRFSGSG
SGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPPAFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:25),
o
QIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASSSVSFMHWLQQKPGQSPRPLIYATSNLASGIPDRFSGS
GSGTDYTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSNPPAFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:26).

15 En un aspecto de la invención, los anticuerpos compiten con el anticuerpo MA251 para unirse a CD25 humano; y/o se unen al mismo epítopo o epítopos reconocidos por el anticuerpo MA251. MA251 es un anticuerpo monoclonal con isotipo de ratón que reconoce el CD25 humano. MA251 comprende una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia:

20 QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTSYGIQWWRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTNYNSAL
MSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARAYGYDGSWLAYWGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO:5)

y una región de cadena ligera variable que tiene la secuencia:

QIVLSQSPAIALSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSPKPWIFATSNLASGVPARFSGS
GSGTSYSLTINRVEAEDADTYCQQWSSNPPTFGGGTKLEIK
(SEQ ID NO:6)

25 En una realización, el anticuerpo que puede competir con MA251 para unirse a CD25 humano comprende una cadena pesada que comprende una región de cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de:

QVQLVESGGVVQPGGSLRLSCAVSGFSLTSYGIQWWRQAPGKGLEWVSVIWAGGSTNYNSA
LMSRFTISKDNSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAYGYDGSWLAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID
NO:27);

30 QVQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGFSLTSYGIQWWRQPPGKGLEWIGVIWAGGSTNYNSAL
MSRVTISKDNSKSQFSLKLSSVTAADTAVYYCARAYGYDGSWLAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID
NO:28);

o

QVQLVESGGVVQPGGLRLSCAVSGFSLTSYGIQWWRQAPGKGLEWSVIWAGGSTNYNSA
 LMSRFTISKDNSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAYGYDGSWLAYWGQGTLTVSS (SEQ ID
 NO:29);

5 y comprende una cadena ligera que comprende una región de cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de:

QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMHWYQQKPGQAPRPLIFATSNLASGIPARFSGSG
 SGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPPTFGGGTLEIK (SEQ ID NO: 30);
 10 QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSYMHWYQQKPGQAPRPLIFATSNLASGIPARFSGSG
 SGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPPTFGGGTLEIK (SEQ ID NO: 31);
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIFATSNASGVPSRSGS
 GSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTLEIK (SEQ ID NO:32);

15 o

QIQLTQSPSSLSASVGDRVITCRASSSVSYMHWYQQKPGKSPKPLIFATSNLASGVPSRSGS
 GSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTLEIK (SEQ ID NO:33).

En una realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25; En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32. En otra realización, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33.

- 5 En un aspecto, los anticuerpos compiten tanto con el anticuerpo 7G7B6 como con el anticuerpo MA251 para unirse a CD25 humano. En un aspecto, los anticuerpos se unen al mismo epítopo o epítopos reconocidos por 7G7B6 y reconocidos por MA251.
- 10 La competencia entre el anticuerpo 7G7B6 o el anticuerpo MA251 y otro anticuerpo puede medirse, por ejemplo, como se expone en los Ejemplos y se conoce en la técnica. En algunas realizaciones, la competencia entre dos anticuerpos, tal como 7G7B6 o MA251 y otro anticuerpo, se determina añadiendo el otro anticuerpo a un ensayo y midiendo la interacción entre el anticuerpo 7G7B6 o MA251 y la CD25 humana. Uno de estos ensayos es un ensayo basado en Octet en el que se determina la unión simultánea del anticuerpo 7G7B6 o MA251, el anticuerpo adicional y la CD25 humana recombinante. Si se detecta la unión de los 2 anticuerpos al CD25 humano recombinante, los anticuerpos no compiten. Alternativamente, uno de estos ensayos es un ensayo inmunoenzimático (ELISA) en el que se detecta la unión de los anticuerpos 7G7B6 o MA251 a la CD25 humana recombinante. Si la señal observada disminuye al añadir el otro anticuerpo (por ejemplo, disminuye al menos 75%), este último anticuerpo es un competidor de los anticuerpos 7G7B6 o MA251. La unión simultánea de los anticuerpos 7G7B6 o MA251 y el anticuerpo adicional a las células humanas que expresan CD25 también puede detectarse mediante citometría de flujo.
- 15 En un aspecto, la invención utiliza un anticuerpo anti-CD25 que se une específicamente a un epítopo de CD25 humano, en el que el epítopo comprende uno o más residuos de aminoácidos de uno o más de los tramos de aminoácidos seleccionados de los aminoácidos 150-163 de SEQ ID NO:1 (YQCVQGYRALHRGP), los aminoácidos 166-186 de SEQ ID NO:1 (SVCKMTHGKTRWTQPQLCTG), los aminoácidos 42-56 de SEQ ID NO:1 (KEGTMNLNCECKRGFR) y los aminoácidos 70-88 de SEQ ID NO:1 (NSSHSSWDNQCQCCTSSATR). Preferentemente, el epítopo comprende al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o más residuos de los tramos de aminoácidos seleccionados. Más preferentemente, el epítopo comprende una secuencia seleccionada de: los aminoácidos 150-158 de SEQ ID NO:1 (YQCVQGYRA), los aminoácidos 176-180 de SEQ ID NO:1 (RWTQP), los aminoácidos 42-56 de SEQ ID NO:1 (KEGTMNLNCECKRGFR) y los aminoácidos 74-84 de SEQ ID NO:1 (SSWDNQCQCCTS) y combinaciones de los mismos. Estos epítopos son distintos del sitio de unión de IL-2 en CD25 humano y los anticuerpos que se unen a dicho epítopo, como se describe en los Ejemplos, no bloquean la unión de IL-2 a CD25.
- 20 En una realización preferida, el uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto humano que tiene un cáncer comprende el paso de administrar un anticuerpo anti-CD25 usado en la invención a un sujeto, en el que dicho sujeto tiene un tumor sólido, y en el que el anticuerpo anti-CD25 es un anticuerpo IgG1 humano que inhibe menos de aproximadamente 25% de la señalización de IL-2 en comparación con la señalización de IL-2 en ausencia del anticuerpo, en el que la señalización de IL2 se mide por los niveles de proteína STAT5 fosforilada en las células según se determina mediante el ensayo de fosforilación de STAT5 antes mencionado, y que se une al menos a un receptor Fcγ activador seleccionado de FcγRI (CD64), FcγRIIc (CD32c) y FcγRIIa (CD16a) con alta afinidad, y agota las células T reguladoras infiltrantes de tumores. Preferentemente, el anticuerpo anti-CD25 tiene una constante de disociación (K_d) para CD25 inferior a 10^{-7} M, preferentemente inferior a 10^{-8} M. Más preferentemente, el anticuerpo anti-CD25 se une a CD25 humano proporcionando efectos sobre la unión de IL-2 y el agotamiento de Treg similares a los de 7D4 sobre CD25 de ratón o de 7G7B6 y MA251 sobre CD25 humano. En otra realización, el anticuerpo anti-CD25 se une a los receptores Fcγ con una relación activador-inhibidor (A/I) superior a 1 y/o se une a FcγRI (CD64), FcγRIIc (CD32c), FcγRIIa (CD16a) y/o FcγRIIa (CD32a) con mayor afinidad que a FcγRIIb (CD32b).
- 25 En una realización preferida, el uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto humano que tiene un cáncer comprende el paso de administrar un anticuerpo anti-CD25 usado en la invención a un sujeto, en el que dicho sujeto tiene un tumor sólido, y en el que el anticuerpo anti-CD25 es un anticuerpo IgG1 humano que inhibe menos de aproximadamente 25% de la señalización de IL-2 en comparación con la señalización de IL-2 en ausencia del anticuerpo, en el que la señalización de IL2 se mide por los niveles de proteína STAT5 fosforilada en las células según se determina mediante el ensayo de fosforilación de STAT5 antes mencionado, y que se une al menos a un receptor Fcγ activador seleccionado de FcγRI (CD64), FcγRIIc (CD32c) y FcγRIIa (CD16a) con alta afinidad, y agota las células T reguladoras infiltrantes de tumores. Preferentemente, el anticuerpo anti-CD25 tiene una constante de disociación (K_d) para CD25 inferior a 10^{-7} M, preferentemente inferior a 10^{-8} M. Más preferentemente, el anticuerpo anti-CD25 se une a CD25 humano proporcionando efectos sobre la unión de IL-2 y el agotamiento de Treg similares a los de 7D4 sobre CD25 de ratón o de 7G7B6 y MA251 sobre CD25 humano. En otra realización, el anticuerpo anti-CD25 se une a los receptores Fcγ con una relación activador-inhibidor (A/I) superior a 1 y/o se une a FcγRI (CD64), FcγRIIc (CD32c), FcγRIIa (CD16a) y/o FcγRIIa (CD32a) con mayor afinidad que a FcγRIIb (CD32b).
- 30 En una realización preferida, el uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto humano que tiene un cáncer comprende el paso de administrar un anticuerpo anti-CD25 usado en la invención a un sujeto, en el que dicho sujeto tiene un tumor sólido, y en el que el anticuerpo anti-CD25 es un anticuerpo IgG1 humano que inhibe menos de aproximadamente 25% de la señalización de IL-2 en comparación con la señalización de IL-2 en ausencia del anticuerpo, en el que la señalización de IL2 se mide por los niveles de proteína STAT5 fosforilada en las células según se determina mediante el ensayo de fosforilación de STAT5 antes mencionado, y que se une al menos a un receptor Fcγ activador seleccionado de FcγRI (CD64), FcγRIIc (CD32c) y FcγRIIa (CD16a) con alta afinidad, y agota las células T reguladoras infiltrantes de tumores. Preferentemente, el anticuerpo anti-CD25 tiene una constante de disociación (K_d) para CD25 inferior a 10^{-7} M, preferentemente inferior a 10^{-8} M. Más preferentemente, el anticuerpo anti-CD25 se une a CD25 humano proporcionando efectos sobre la unión de IL-2 y el agotamiento de Treg similares a los de 7D4 sobre CD25 de ratón o de 7G7B6 y MA251 sobre CD25 humano. En otra realización, el anticuerpo anti-CD25 se une a los receptores Fcγ con una relación activador-inhibidor (A/I) superior a 1 y/o se une a FcγRI (CD64), FcγRIIc (CD32c), FcγRIIa (CD16a) y/o FcγRIIa (CD32a) con mayor afinidad que a FcγRIIb (CD32b).
- 35 En una realización preferida, el uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto humano que tiene un cáncer comprende el paso de administrar un anticuerpo anti-CD25 usado en la invención a un sujeto, en el que dicho sujeto tiene un tumor sólido, y en el que el anticuerpo anti-CD25 es un anticuerpo IgG1 humano que inhibe menos de aproximadamente 25% de la señalización de IL-2 en comparación con la señalización de IL-2 en ausencia del anticuerpo, en el que la señalización de IL2 se mide por los niveles de proteína STAT5 fosforilada en las células según se determina mediante el ensayo de fosforilación de STAT5 antes mencionado, y que se une al menos a un receptor Fcγ activador seleccionado de FcγRI (CD64), FcγRIIc (CD32c) y FcγRIIa (CD16a) con alta afinidad, y agota las células T reguladoras infiltrantes de tumores. Preferentemente, el anticuerpo anti-CD25 tiene una constante de disociación (K_d) para CD25 inferior a 10^{-7} M, preferentemente inferior a 10^{-8} M. Más preferentemente, el anticuerpo anti-CD25 se une a CD25 humano proporcionando efectos sobre la unión de IL-2 y el agotamiento de Treg similares a los de 7D4 sobre CD25 de ratón o de 7G7B6 y MA251 sobre CD25 humano. En otra realización, el anticuerpo anti-CD25 se une a los receptores Fcγ con una relación activador-inhibidor (A/I) superior a 1 y/o se une a FcγRI (CD64), FcγRIIc (CD32c), FcγRIIa (CD16a) y/o FcγRIIa (CD32a) con mayor afinidad que a FcγRIIb (CD32b).
- 40 En una realización preferida, el uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto humano que tiene un cáncer comprende el paso de administrar un anticuerpo anti-CD25 usado en la invención a un sujeto, en el que dicho sujeto tiene un tumor sólido, y en el que el anticuerpo anti-CD25 es un anticuerpo IgG1 humano que inhibe menos de aproximadamente 25% de la señalización de IL-2 en comparación con la señalización de IL-2 en ausencia del anticuerpo, en el que la señalización de IL2 se mide por los niveles de proteína STAT5 fosforilada en las células según se determina mediante el ensayo de fosforilación de STAT5 antes mencionado, y que se une al menos a un receptor Fcγ activador seleccionado de FcγRI (CD64), FcγRIIc (CD32c) y FcγRIIa (CD16a) con alta afinidad, y agota las células T reguladoras infiltrantes de tumores. Preferentemente, el anticuerpo anti-CD25 tiene una constante de disociación (K_d) para CD25 inferior a 10^{-7} M, preferentemente inferior a 10^{-8} M. Más preferentemente, el anticuerpo anti-CD25 se une a CD25 humano proporcionando efectos sobre la unión de IL-2 y el agotamiento de Treg similares a los de 7D4 sobre CD25 de ratón o de 7G7B6 y MA251 sobre CD25 humano. En otra realización, el anticuerpo anti-CD25 se une a los receptores Fcγ con una relación activador-inhibidor (A/I) superior a 1 y/o se une a FcγRI (CD64), FcγRIIc (CD32c), FcγRIIa (CD16a) y/o FcγRIIa (CD32a) con mayor afinidad que a FcγRIIb (CD32b).
- 45 En una realización preferida, el uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto humano que tiene un cáncer comprende el paso de administrar un anticuerpo anti-CD25 usado en la invención a un sujeto, en el que dicho sujeto tiene un tumor sólido, y en el que el anticuerpo anti-CD25 es un anticuerpo IgG1 humano que inhibe menos de aproximadamente 25% de la señalización de IL-2 en comparación con la señalización de IL-2 en ausencia del anticuerpo, en el que la señalización de IL2 se mide por los niveles de proteína STAT5 fosforilada en las células según se determina mediante el ensayo de fosforilación de STAT5 antes mencionado, y que se une al menos a un receptor Fcγ activador seleccionado de FcγRI (CD64), FcγRIIc (CD32c) y FcγRIIa (CD16a) con alta afinidad, y agota las células T reguladoras infiltrantes de tumores. Preferentemente, el anticuerpo anti-CD25 tiene una constante de disociación (K_d) para CD25 inferior a 10^{-7} M, preferentemente inferior a 10^{-8} M. Más preferentemente, el anticuerpo anti-CD25 se une a CD25 humano proporcionando efectos sobre la unión de IL-2 y el agotamiento de Treg similares a los de 7D4 sobre CD25 de ratón o de 7G7B6 y MA251 sobre CD25 humano. En otra realización, el anticuerpo anti-CD25 se une a los receptores Fcγ con una relación activador-inhibidor (A/I) superior a 1 y/o se une a FcγRI (CD64), FcγRIIc (CD32c), FcγRIIa (CD16a) y/o FcγRIIa (CD32a) con mayor afinidad que a FcγRIIb (CD32b).
- 50 El dominio de unión CD25 del anticuerpo 7D4 ha sido clonado y expresado como proteína recombinante en fusión con una región constante apropiada. La secuencia del dominio de unión a CD25 del anticuerpo 7D4, así como su especificidad para epítopos distintos dentro del dominio extracelular de CD25 y/o sus otras actividades funcionales, pueden utilizarse para comparar anticuerpos candidatos anti-CD25 generados y cribados mediante cualquier técnica apropiada (por ejemplo, criando paneles de hibridomas de roedores inmunizados con CD25 o generando bibliotecas de anticuerpos recombinantes y cribando después estos repertorios de anticuerpos con fragmentos de CD25 para caracterizarlos funcionalmente como se describe en el presente documento). Los anticuerpos anti-CD25 que se identifiquen en consecuencia pueden producirse también como anticuerpos recombinantes, en particular como anticuerpos completos o como fragmentos o variantes que se describen en el presente documento.
- 55 Los anticuerpos e inmunoglobulinas nativas son normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena pesada tiene en el extremo amino un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en el extremo amino (V_L) y un dominio constante en el extremo carboxi.
- 60 Las regiones variables son capaces de interactuar con un objetivo antigeníco estructuralmente complementario y se caracterizan por diferencias en la secuencia de aminoácidos de anticuerpos de diferente especificidad antigeníca. Las regiones variables de las cadenas H o L contienen las secuencias de aminoácidos capaces de unirse específicamente

a los objetivos antigenicos. Dentro de estas secuencias hay otras más pequeñas denominadas "hipervariables" por su extrema variabilidad entre anticuerpos de distinta especificidad. Estas regiones hipervariables también se denominan "regiones determinantes de la complementariedad" o regiones "CDR".

5 Estas regiones CDR dan cuenta de la especificidad básica del anticuerpo para una estructura determinante antigenica particular. Las CDR representan tramos no contiguos de aminoácidos dentro de las regiones variables, pero, independientemente de la especie, se ha descubierto que las ubicaciones posicionales de estas secuencias críticas de aminoácidos dentro de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera tienen ubicaciones similares dentro de las secuencias de aminoácidos de las cadenas variables. Las cadenas ligeras y pesadas variables de todos los 10 anticuerpos tienen cada una 3 regiones CDR, cada una no contigua con las otras (denominadas L1, L2, L3, H1, H2, H3) para las respectivas cadenas ligeras (L) y pesadas (H). Las regiones CDR aceptadas se han descrito anteriormente (Kabat et al., 1977. J Biol Chem 252, 6609-6616).

15 Los anticuerpos utilizados en la presente invención pueden funcionar mediante citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) y/o fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCP), así como cualquier otro mecanismo que permita dirigir, bloquear la proliferación y/o agotar las células Treg.

20 La "citotoxicidad dependiente del complemento" (CDC) se refiere a la lisis de células que expresan antígeno por un anticuerpo utilizado en la invención en presencia de complemento.

25 La "citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos" (ADCC) se refiere a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas inespecíficas que expresan receptores Fc (FcRs) (por ejemplo, células Asesinas Naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula objetivo y por lo tanto conducen a la lisis de la célula objetivo.

30 La "fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos" (ADCP) se refiere a una reacción mediada por células en la que los fagocitos (tal como los macrófagos) que expresan receptores Fc (FcR) reconocen el anticuerpo unido en una célula objetivo y, por lo tanto, conducen a la fagocitosis de la célula objetivo.

35 CDC, ADCC y ADCP pueden medirse utilizando ensayos conocidos y disponibles en la técnica (Clynes et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-6), y como se expone en los ejemplos. La región constante de un anticuerpo es importante en su capacidad para fijar el complemento y mediar en la citotoxicidad dependiente de las células y la fagocitosis. Por lo tanto, como se discute en el presente documento, el isotipo de un anticuerpo puede seleccionarse sobre la base de si es deseable que el anticuerpo medie en la citotoxicidad/fagocitosis.

40 Como se discute en el presente documento, en una realización de la invención, se utiliza un anticuerpo anti-CD25 que no inhibe la señalización de interleucina 2 y que conduce al agotamiento de las células Treg. Por ejemplo, puede utilizarse un anticuerpo anti-CD25 que no inhibe la señalización de la interleucina 2 a CD25 y provoque una respuesta CDC fuerte y/o una respuesta ADCC fuerte y/o una respuesta ADCP fuerte. Los procedimientos para aumentar la CDC, la ADCC y/o la ADCP son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la respuesta CDC puede incrementarse con mutaciones en el anticuerpo que aumenten la afinidad de unión de C1q (Idusogie et al. (2001) J Immunol 166, 2571-5).

45 Las referencias en el presente documento a "no inhibe la unión de la Interleucina-2 a CD25" pueden expresarse alternativamente como que el anticuerpo anti-CD25 es un anticuerpo no bloqueante de IL-2 o un anticuerpo "no bloqueante" (con respecto al no bloqueo de la unión de IL-2 a CD25 en presencia del anticuerpo anti-CD25), es decir, el anticuerpo no bloquea la unión de la Interleucina-2 a CD25 y, en particular, no inhibe la señalización de Interleucina-2 en células que expresan CD25. Las referencias a "no bloqueante", "no bloqueante de IL-2", "no bloqueante" o "sin bloqueo" y similares (con respecto al no bloqueo de la unión de IL-2 a CD25 en presencia del anticuerpo anti-CD25) incluyen realizaciones en las que el anticuerpo anti-CD25 utilizado en la invención no bloquea la señalización de IL-2 a través de CD25. Es decir, el anticuerpo anti-CD25 inhibe menos del 25% de la señalización de IL-2 en comparación con la señalización de IL-2 en ausencia de los anticuerpos. Los anticuerpos anti-CD25 no bloqueantes de IL-2 permiten la unión a CD25 sin interferir con la unión de IL-2 a CD25, o sin interferir sustancialmente con la unión de IL-2 a CD25. 50 Las referencias en el presente documento a un anticuerpo no bloqueante de IL-2 pueden expresarse alternativamente como un anticuerpo anti-CD25 que "no inhibe la unión de la Interleucina-2 a CD25" o como un anticuerpo anti-CD25 que "no inhibe la señalización de IL-2". Sin embargo, en todas las realizaciones de la invención, el anticuerpo inhibe menos de aproximadamente 25% de la señalización de IL-2 en comparación con la señalización de IL-2 en ausencia del anticuerpo, en la que la señalización de IL2 se mide por los niveles de proteína STAT5 fosforilada en las células 55 según se determina mediante un ensayo de fosforilación de STAT5, en el que el ensayo de fosforilación de STAT5 comprende:

- 60
- 65 – cultivo de células PMBC en presencia del anticuerpo anti-CD25 a una concentración de 10ug/ml durante 30 minutos y, a continuación, adición de concentraciones variables de IL2 durante 10 minutos
 - permeabilización de las células; y

- medición mediante citometría de flujo de un anticuerpo marcado fluorescentemente con un péptido STAT5 fosforilado. El uso de otros anticuerpos anti-CD25 queda fuera del ámbito de la invención reivindicada.
- 5 Algunos anticuerpos anti-CD25 pueden permitir la unión de IL-2 a CD25, pero aun así bloquear la señalización a través del receptor CD25. Tales anticuerpos anti-CD25 no están dentro del alcance de la presente invención. En cambio, los anticuerpos anti-CD25 no bloqueantes de IL-2 permiten que la unión de IL-2 a CD25 facilite al menos 75% del nivel de señalización a través del receptor CD25 en comparación con la señalización en ausencia del anticuerpo anti-CD25.
- 10 La señalización de IL-2 a través de CD25 puede medirse por procedimientos como se discute en los Ejemplos y como se conoce en la técnica. La comparación de la señalización de IL-2 en presencia y ausencia del agente anticuerpo anti-CD25 puede producirse en las mismas condiciones o en condiciones sustancialmente iguales.
- 15 La señalización de IL-2 puede determinarse midiendo los niveles de proteína STAT5 fosforilada en las células, utilizando un ensayo estándar de fosforilación de Stat-5. Por ejemplo, un ensayo de fosforilación de Stat-5 para medir la señalización de IL-2 puede implicar el cultivo de células PMBC en presencia del anticuerpo anti-CD25 a una concentración de 10ug/ml durante 30 minutos y, a continuación, la adición de concentraciones variables de IL-2 (por ejemplo, 10U/ml o concentraciones variables de 0,25U/ml, 0,74U/ml, 2,22U/ml, 6,66U/ml o 20U/ml) durante 10 minutos. A continuación, las células pueden permeabilizarse y los niveles de proteína STAT5 pueden medirse con un anticuerpo marcado con fluorescencia frente a un péptido STAT5 fosforilado analizado mediante citometría de flujo. El porcentaje de bloqueo de la señalización de IL-2 puede calcularse del siguiente modo: % de bloqueo = $100 \times [(\% \text{ Stat5}^+ \text{ células No grupo Anticuerpo} - \% \text{ Stat5}^+ \text{ células 10ug/ml grupo Anticuerpo}) / (\% \text{ Stat5}^+ \text{ células No grupo Ab})]$
- 20 La ADCC puede aumentarse mediante procedimientos que eliminan la fracción de fucosa del glicano del anticuerpo, tal como la producción del anticuerpo en una línea celular YB2/0, o mediante la introducción de mutaciones específicas en la porción Fc de la IgG1 humana (por ejemplo, S298A/E333A/K334A, S239D/I332E/A330L, G236A/S239D/A330L/I332E) (Lazar et al. (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103, 2005-2010; Smith et al. (2012) Proc Natl Acad Sci USA 109, 6181-6). El ADCP también puede aumentar mediante la introducción de mutaciones específicas en la porción Fc de la IgG1 humana (Richards et al. (2008) Mol Cancer Ther 7, 2517-27).
- 25 30 En una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo se optimiza para provocar una respuesta ADCC, es decir, la respuesta ADCC se potencia, aumenta o mejora en relación con otros anticuerpos anti-CD25, incluyendo aquellos que no inhiben la señalización de interleucina 2 a través de CD25 y, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-CD25 no modificados.
- 35 40 En una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo se optimiza para provocar una respuesta ADCP, es decir, la respuesta ADCP se potencia, aumenta o mejora en relación con otros anticuerpos anti-CD25, incluyendo aquellos que no inhiben la señalización de interleucina 2 a través de CD25 y, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-CD25 no modificados.
- 45 45 Tal como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo químérico" puede referirse a un anticuerpo que tiene secuencias variables derivadas de una inmunoglobulina de una especie, tal como un anticuerpo de rata o ratón, y regiones constantes de inmunoglobulina de otra especie, tal como de un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo químérico puede tener una región constante mejorada para inducir ADCC.
- 50 55 Los anticuerpos utilizados en la invención también pueden ser parcial o totalmente sintéticos, en los que al menos parte de las cadenas polipeptídicas de los anticuerpos se sintetizan y, posiblemente, se optimizan para unirse a su antígeno afín. Dichos anticuerpos pueden ser químéricos o humanizados y pueden tener una estructura totalmente tetramérica, o pueden ser diméricos y comprender sólo una cadena pesada y una cadena ligera.
- 60 65 Los anticuerpos utilizados en la presente invención también pueden ser anticuerpos monoclonales. En el presente documento, el término "anticuerpo monoclonal" no se limita a los anticuerpos producidos mediante la tecnología del hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo derivado de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o fago, y no al procedimiento por el que se produce.
- Un anticuerpo anti-CD25 que presenta las características descritas en el presente documento representa otro objeto de la divulgación. El anticuerpo anti-CD25 puede utilizarse en medicina. La invención proporciona un anticuerpo anti-CD25 que inhibe menos de aproximadamente el 25% de la señalización de IL-2 en comparación con la señalización

de IL-2 en ausencia del anticuerpo, en el que la señalización de IL2 se mide por los niveles de proteína STAT5 fosforilada en las células según se determina mediante el ensayo de fosforilación de STAT5 antes mencionado, para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer en un sujeto humano, en el que el sujeto tiene un tumor sólido. La presente divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-CD25 como se define en el presente documento. Dichas moléculas de ácido nucleico proporcionadas pueden contener secuencias de ácido nucleico optimizadas para codones, y/o pueden incluirse en cassetes de expresión dentro de vectores de ácido nucleico apropiados para la expresión en células huésped tales como, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, de insecto, piscinas, murinas, simiescas o humanas. La presente divulgación también proporciona células huésped que comprenden moléculas de ácido nucleico heterólogas (por ejemplo, vectores de ADN) que expresan el anticuerpo deseado.

La presente divulgación también proporciona procedimientos para preparar un anticuerpo anti-CD25 aislado como se ha definido anteriormente. Tales procedimientos pueden comprender el cultivo de una célula huésped que comprende ácidos nucleicos (por ejemplo, ácidos nucleicos heterólogos que pueden comprender y/o entregarse a la célula huésped a través de vectores). Preferentemente, la célula huésped (y/o las secuencias de ácido nucleico heterólogas) está dispuesta y construida de modo que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno o la variante del mismo se segregan de la célula huésped y se aísla de los sobrenadantes del cultivo celular.

Los anticuerpos utilizados en la presente invención pueden ser monoespecíficos, biespecíficos o multiespecíficos. Los "anticuerpos multiespecíficos" pueden ser específicos para diferentes epítopos de un antígeno o polipéptido objetivo, o pueden contener dominios de unión a antígeno específicos para más de un antígeno o polipéptido objetivo (Kufer et al. (2004) Trends Biotechnol 22, 238-44).

En un aspecto de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoespecífico. Como se comenta más adelante, en un aspecto alternativo el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

Tal como se utiliza en el presente documento, "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a dos epítopos distintos, ya sea en un único antígeno o polipéptido, o en dos antígenos o polipéptidos diferentes.

Los anticuerpos biespecíficos utilizados en la presente invención, como se discute en el presente documento, pueden producirse mediante procedimientos biológicos, tales como la hibridación somática; o procedimientos genéticos, tal como la expresión de una secuencia de ADN no nativa que codifica la estructura de anticuerpo deseada en una línea celular o en un organismo; procedimientos químicos (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo a una o más entidades moleculares tal como otro anticuerpo o fragmento de anticuerpo); o una combinación de los mismos.

Las tecnologías y los productos que permiten producir monoespecíficos o biespecíficos son conocidos en la técnica, como se revisa ampliamente en la bibliografía, también con respecto a formatos alternativos, conjugados anticuerpo-fármaco, procedimientos de diseño de anticuerpos, procedimientos de cribado in vitro, regiones constantes, modificaciones postraduccionales y químicas, característica mejorada para desencadenar la muerte de células cancerosas como la modificación Fc (Tiller K y Tessier P, 2015 Annu Rev Biomed Eng. 17: 191-216; Speiss C et al., 2015. Molecular Immunology 67 95-106; Weiner G, 2015. Nat Rev Cancer, 15: 361-370; Fan G et al., 2015. J Hematol Oncol 8:130). Dicho anticuerpo biespecífico puede proporcionarse en cualquier formato disponible comercialmente, incluyendo Duobody, BiTE DART, CrossMab, Knobs-in-holes, Triomab, u otro formato molecular apropiado y sus fragmentos.

Como se usa en el presente documento, "epítopo" o "determinante antigenético" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une un anticuerpo. Como es bien sabido en la técnica, los epítopos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos (epítopo lineal) como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína (epítopos conformacionales). Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos suelen conservarse al exponerlos a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario suelen perderse al tratarlos con disolventes desnaturizantes. Un epítopo suele incluir al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los procedimientos para determinar la conformación espacial de los epítopos son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols en Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996). Por ejemplo, un anticuerpo utilizado en la invención puede reconocer un epítopo conformacional al que se unen los anticuerpos 7G7B6 o MA251. En una realización, el epítopo conformacional comprende al menos dos secuencias seleccionadas de los aminoácidos 150-158 de SEQ ID NO:1 (YQCVQGYRA), los aminoácidos 176-180 de SEQ ID NO:1 (RWTQP), los aminoácidos 42-56 de SEQ ID NO:1 (KEGTMLNCECKRGFR) y los aminoácidos 74-84 de SEQ ID NO:1 (SSWDNQCQCTS).

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD25 puede incluirse en un agente que comprende además una carga útil conjugada, tal como un agente terapéutico o de diagnóstico, en particular para la terapia o el diagnóstico del cáncer. Pueden utilizarse anticuerpos anti-CD25 conjugados con radionucleidos o toxinas. Ejemplos de radionucleidos comúnmente utilizados son, por ejemplo, ⁹⁰Y, ¹³¹I, y ⁶⁷Cu, entre otros, y ejemplos de toxinas comúnmente utilizadas

son la doxorrubicina y la calicheamicina. En otra realización, el anticuerpo anti-CD25 puede modificarse para tener una semivida alterada. Los procedimientos para conseguir una semivida alterada son conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD25 no está conjugado con otro agente terapéutico o de diagnóstico. En particular, en algunas realizaciones el anticuerpo anti-CD25 no está conjugado con un radionúclido, es decir, en algunas realizaciones el anticuerpo anti-CD25 no está radiomarcado.

5 En realizaciones de la presente invención, el sujeto es un ser humano.

Como se usan en el presente documento, los términos "cáncer", "canceroso" o "maligno" se refieren o describen la 10 condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado.

10 Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, leucemia, blastoma y sarcoma. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen carcinoma de células escamosas, mieloma, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, carcinoma hepatocelular (CHC), linfoma hodgkin, linfoma no hodgkin, leucemia mieloide aguda (LMA), mieloma múltiple, cáncer gastrointestinal (tracto), cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, melanoma, condrosarcoma, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello uterino, cáncer cerebral, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello.

20 En realizaciones de la invención, el cáncer implica un tumor sólido. Ejemplos de tumores sólidos son los sarcomas (incluyendo los cánceres que surgen de células transformadas de origen mesenquimal en tejidos como hueso esponjoso, cartílago, grasa, músculo, vascular, hematopoyético o tejidos conectivos fibrosos), carcinomas (incluyendo los tumores que surgen de células epiteliales), mesotelioma, neuroblastoma, retinoblastoma, etc. Los cánceres que implican tumores sólidos incluyen, sin limitaciones, cáncer cerebral, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de duodeno, cáncer de esófago, cáncer de mama, cáncer de colon y recto, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de boca, sarcoma, cáncer ocular, cáncer de tiroides, cáncer de uretra, cáncer vaginal, cáncer de cuello, linfoma, y similares.

30 En un aspecto, los cánceres implican tumores que expresan CD25, incluyendo, pero sin limitarse a linfomas, como los linfomas de Hodgkin, y leucemias linfocíticas, tal como la leucemia linfocítica crónica (LLC).

35 En un aspecto de la invención, el cáncer se identifica por la presencia de marcadores y antígenos específicos relevantes para el tumor, tales como CD20, HER2, PD-1, PD-L1, SLAM7F, CD47, CD137, CD134, TIM3, CD25, GITR, CD25, EGFR, etc., o es un cáncer que se ha identificado por tener un biomarcador denominado inestabilidad alta de microsatélites (MSI-H) o deficiencia de reparación de emparejamientos erróneos (dMMR). Además, los anticuerpos 40 pueden utilizarse cuando la identificación del marcador, antígeno o biomarcador específico relevante para el tumor se ha utilizado para definir estados precancerosos no invasivos de los cánceres mencionados en un paciente, tales como cáncer in situ, mieloma latente, gammaglobulina monoclonal de significado indeterminado, neoplasia intraepitelial cervical, MALTomas/GALTomas y diversos trastornos linfoproliferativos. Preferentemente, en algunas realizaciones el sujeto a tratar tiene un tumor sólido.

45 En un aspecto de la invención, el cáncer se selecciona de melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, sarcoma y cáncer de colon. En un aspecto preferido de la invención, el cáncer se selecciona de melanoma, ovario, cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer renal. En una realización, el cáncer no es melanoma, cáncer de ovario o cáncer de mama. En un aspecto preferido, el cáncer es sarcoma, colon, melanoma o cáncer colorrectal, o más generalmente cualquier cáncer humano para el que la línea celular 4T1, MCA205, B16, CT26 o MC38 puede representar modelos preclínicos para validar compuestos como útiles para su manejo terapéutico.

50 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "tumor", tal y como se aplica a un sujeto al que se le ha diagnosticado o se sospecha que padece un cáncer, se refiere a una neoplasia maligna o potencialmente maligna o a una masa tisular de cualquier tamaño, e incluye tumores primarios y neoplasias secundarias. Los términos "cáncer", "malignidad", "neoplasia", "tumor" y "carcinoma" también pueden utilizarse indistintamente en el presente documento para referirse a tumores y células tumorales que presentan un crecimiento relativamente anormal, incontrolado y/o 55 autónomo, de modo que muestran un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa del control de la proliferación celular. En general, las células de interés para la detección o el tratamiento incluyen células precancerosas (por ejemplo, benignas), malignas, premetastásicas, metastásicas y no metastásicas. Las enseñanzas de la presente divulgación pueden ser relevantes para todos y cada uno de los tipos de cáncer.

60 Tal como se utiliza en el presente documento, los "tumores sólidos" son un crecimiento o masa anormal de tejido que no suele contener quistes ni zonas líquidas, en particular, tumores y/o metástasis (dondequiera que estén localizados) 65 distintos de la leucemia o los cánceres linfáticos no sólidos. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos. Los distintos tipos de tumores sólidos reciben su nombre del tipo de células que los forman y/o del tejido u órgano en el que se localizan. Ejemplos de tumores sólidos son los sarcomas (incluyendo los cánceres que surgen de células transformadas de origen mesenquimal en tejidos tales como el hueso esponjoso, cartílago, grasa, músculo, vascular,

hematopoyético o tejidos conectivos fibrosos), carcinomas (incluyendo los tumores que surgen de células epiteliales), melanomas, linfomas, mesotelioma, neuroblastoma y retinoblastoma.

5 Los cánceres de acuerdo con la presente invención son aquellos caracterizados por la presencia de un tumor sólido, es decir que el sujeto no tiene un tumor no sólido. En todos los aspectos de la invención que se discuten en el presente documento, se requiere que el cáncer sea un tumor sólido, es decir, que el sujeto tenga un tumor sólido (y no tenga un tumor no sólido).

10 La referencia a "tratar" o "que trata" un cáncer como se usa en el presente documento define el logro de al menos un efecto terapéutico positivo, tal como, por ejemplo, la reducción del número de células cancerosas, la reducción del tamaño del tumor, la reducción de la tasa de infiltración de células cancerosas en órganos periféricos, o la reducción de la tasa de metástasis tumoral o crecimiento tumoral.

15 Los efectos terapéuticos positivos en el cáncer pueden medirse de varias maneras (por ejemplo, Weber (2009) J Nucl Med 50, 1S-10S). A modo de ejemplo, con respecto a la inhibición del crecimiento tumoral, de acuerdo con las normas del Instituto Nacional del Cáncer (NCI), un $T/C \leq 42\%$ es el nivel mínimo de actividad antitumoral. Un $T/C < 10\%$ se considera un alto nivel de actividad antitumoral, siendo $T/C (\%) = \text{Volumen tumoral medio del tratado}/\text{Volumen tumoral medio del control} \times 100$. En algunas realizaciones, el tratamiento conseguido mediante una cantidad terapéuticamente eficaz es cualquiera de las siguientes: supervivencia libre de progresión (SLP), supervivencia libre de enfermedad (SLE) o supervivencia global (SG). La SLP, también denominada "Tiempo hasta la progresión del tumor", indica el tiempo durante y después del tratamiento en que el cáncer no crece, e incluye el tiempo en que los pacientes han experimentado una respuesta completa o una respuesta parcial, así como el tiempo en que los pacientes han experimentado una enfermedad estable. La SSE se refiere al tiempo durante y después del tratamiento que el paciente permanece libre de la enfermedad. La SG se refiere a una prolongación de la esperanza de vida en comparación con individuos o pacientes ingenuos o no tratados.

20 25 La referencia a la "prevención" (o profilaxis) tal y como se utiliza en el presente documento se refiere a retrasar o prevenir la aparición de los síntomas del cáncer. La prevención puede ser absoluta (de forma que no se produzca la enfermedad) o puede ser eficaz sólo en algunos individuos o durante un tiempo limitado.

30 35 En un aspecto preferido de la invención, el sujeto tiene un tumor establecido, es decir, el sujeto ya tiene un tumor, por ejemplo, clasificado como un tumor sólido. De este modo, la invención descrita en el presente documento puede utilizarse cuando el sujeto ya tiene un tumor sólido. Como tal, la invención proporciona una opción terapéutica que puede utilizarse para tratar un tumor existente. En un aspecto de la invención, el sujeto tiene un tumor sólido existente. La invención puede utilizarse como prevención o, preferentemente, como tratamiento en sujetos que ya padecen un tumor sólido. En un aspecto, la invención no se utiliza como preventivo o profiláctico.

40 En un aspecto, la regresión tumoral puede ser mejorada, el crecimiento tumoral puede ser impedido o reducido, y/o el tiempo de supervivencia puede ser mejorado usando la invención como se describe en el presente documento, por ejemplo, comparado con otros tratamientos contra el cáncer (por ejemplo, tratamientos estándar de cuidado para un cáncer dado).

45 En un aspecto de la invención, los procedimientos de tratamiento o prevención del cáncer descritos en el presente documento en los que se utilizan los anticuerpos anti-CD25 comprenden además el paso de identificar a un sujeto que tiene cáncer, preferentemente identificando a un sujeto que tiene un tumor tal como un tumor sólido.

50 55 El régimen de dosificación de una terapia descrita en el presente documento que es eficaz para tratar a un paciente con cáncer puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad y el peso del paciente, y la capacidad de la terapia para provocar una respuesta anticancerosa en el sujeto. La selección de la dosificación adecuada será competencia de un experto en la técnica. Por ejemplo, 0,01, 0,1, 0,3, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 o 50 mg/kg. En algunas realizaciones, dicha cantidad es una cantidad de dosificación unitaria (o una fracción entera de la misma) apropiada para la administración de acuerdo con un régimen de dosificación que se ha determinado que se correlaciona con un resultado deseado o beneficioso cuando se administra a una población relevante (es decir, con un régimen de dosificación terapéutico).

60 65 65 El anticuerpo utilizado de acuerdo con cualquier aspecto de la invención descrito en el presente documento puede estar en forma de una composición farmacéutica que comprende además un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones incluyen, por ejemplo, formulaciones de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras o liposomas. En algunas realizaciones, la forma preferida puede depender del modo de administración previsto y/o de la aplicación terapéutica. Las composiciones farmacéuticas que contienen el anticuerpo pueden administrarse por cualquier procedimiento apropiado conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, por vía oral, mucosa, por inhalación, tópica, bucal, nasal, rectal o parenteral (por ejemplo, intravenosa, infusión, intratumoral, intranodal, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, transdérmica u otros tipos de administración que impliquen la ruptura física de un tejido de un sujeto y la administración de la composición farmacéutica a través de la ruptura en el tejido). Dicha formulación puede, por ejemplo, presentarse en forma de solución inyectable o infusible adecuada para administración intradérmica, intratumoral o subcutánea, o para infusión

intravenosa. La administración puede implicar una dosificación intermitente. Alternativamente, la administración puede implicar una dosificación continua (por ejemplo, perfusión) durante al menos un periodo de tiempo seleccionado, simultáneamente o entre la administración de otros compuestos.

- 5 En algunas realizaciones, el anticuerpo puede prepararse con portadores que lo protejan contra la liberación rápida y/o la degradación, tal como una formulación de liberación controlada, tal como implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables y biocompatibles. Los expertos en la técnica apreciarán, por ejemplo, que la vía de administración (por ejemplo, oral vs. intravenosa vs. subcutánea vs. intratumoral, etc.) puede influir en la cantidad de dosis y/o la cantidad de dosis requerida puede influir en la vía de administración. Por ejemplo, cuando interesan concentraciones particularmente altas de un agente en un lugar o localización particular (por ejemplo, en un tumor), puede ser deseable y/o útil la administración focalizada (por ejemplo, en este ejemplo, la administración intratumoral). Otros factores para tener en cuenta a la hora de optimizar las rutas y/o el programa de dosificación para un régimen terapéutico determinado pueden incluir, por ejemplo, el cáncer concreto que se está tratando (por ejemplo, tipo, estadio, localización, etc.), el estado clínico de un sujeto (por ejemplo, edad, estado general de salud, etc.), la presencia o ausencia de terapia combinada y otros factores conocidos por los médicos.

Por lo general, las composiciones farmacéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse en forma de solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración elevada del fármaco. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el anticuerpo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por filtración. Las formulaciones para administración parenteral incluyen, entre otras, suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pastas y formulaciones implantables de liberación sostenida o biodegradables, como se expone en el presente documento. Las formulaciones inyectables estériles pueden prepararse utilizando un diluyente o disolvente no tóxico aceptable para los padres. Cada composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la presente invención puede incluir agentes de dispersión farmacéuticamente aceptables, agentes humectantes, agentes de suspensión, agentes isotónicos, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, portadores, excipientes, sales o estabilizadores no son tóxicos para los sujetos en las dosis y concentraciones empleadas. Preferentemente, dicha composición puede comprender además un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento del cáncer que sea compatible con un determinado procedimiento y/o lugar de administración, por ejemplo, para administración parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intradérmica o intravenosa), intratumoral o peritumoral.

35 Mientras que una realización del procedimiento de tratamiento o composiciones para uso de acuerdo con la presente invención puede no ser eficaz para lograr un efecto terapéutico positivo en cada sujeto, debe hacerlo en un uso de composiciones farmacéuticas y regímenes de dosificación que sean consistentes con la buena práctica médica y un número estadísticamente significativo de sujetos según lo determinado por cualquier prueba estadística conocida en la técnica tal como la prueba *t* de Student, la prueba χ^2 , la prueba *U* de acuerdo con Mann y Whitney, la prueba Kruskal-Wallis (prueba *H*), la prueba Jonckheere-Terpstra y la prueba Wilcoxon.

Cuando en el presente documento y en lo sucesivo se mencione un tumor, una enfermedad tumoral, un carcinoma o un cáncer, se entenderá también la metástasis en el órgano o tejido original y/o en cualquier otra localización, alternativa o adicionalmente, cualquiera que sea la localización del tumor y/o la metástasis.

45 Como se discute en el presente documento, la presente invención se relaciona con el agotamiento de células T reguladoras (Tregs). Así, en un aspecto de la invención, el anticuerpo anti-CD25 que no inhibe la señalización de la interleucina 2 a través de CD25, también agota o reduce las células T reguladoras infiltrantes de tumores. En un aspecto, la depleción es vía ADCC. En otro aspecto, el agotamiento se realiza mediante ADCP.

50 La divulgación proporciona un procedimiento para agotar las células T reguladoras en un tumor de un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto un anticuerpo anti-CD25 que no inhibe la señalización de interleucina 2 a través de CD25. Las Tregs pueden agotarse en un tumor sólido. Por "agotado" se entiende que el número, proporción o porcentaje de Tregs disminuye en relación con cuando no se administra un anticuerpo anti-CD25 que no inhibe la señalización de interleucina 2 vía CD25. En particular, puede reducirse más del 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 99% de las células T reguladoras infiltrantes de tumores.

60 Como se usa en el presente documento, "células T reguladoras" ("Treg", "células Treg" o "Tregs") se refiere a un linaje de linfocitos T CD4+ especializados en controlar la autoinmunidad, la alergia y la infección. Normalmente, regulan las 65 actividades de las poblaciones de células T, pero también pueden influir en determinados tipos de células del sistema inmunitario innato. Las Tregs suelen identificarse por la expresión de los biomarcadores CD4, CD25 y Foxp3. Las células Treg naturales suelen constituir aproximadamente 5-10% de los linfocitos T CD4+ periféricos. Sin embargo, dentro de un microentorno tumoral (es decir, células Treg infiltrantes del tumor), pueden llegar a constituir hasta el 20-30% de la población total de linfocitos T CD4+.

65 Las células Treg humanas activadas pueden destruir directamente células objetivo tales como las células T efectoras

5 y las APC a través de vías dependientes de perforina o granzima B; las células Treg del antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA4+) inducen la expresión de indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) por las APC, y éstas a su vez suprimen la activación de las células T reduciendo el triptófano; Las células Treg, pueden liberar interleucina-10 (IL-10) y factor de crecimiento transformante (TGFβ) *in vivo*, y así inhibir directamente la activación de las células T y suprimir la función de las APC inhibiendo la expresión de las moléculas MHC, CD80, CD86 e IL-12. Las células Treg también pueden suprimir la inmunidad expresando altos niveles de CTLA4, que puede unirse a CD80 y CD86 en las células presentadoras de antígenos e impedir la activación adecuada de las células T efectoras.

10 En una realización preferida de la presente invención, se aumenta la proporción de células T efectoras con respecto a las células T reguladoras en un tumor sólido. En algunas realizaciones, la proporción de células T efectoras con respecto a las células T reguladoras en un tumor sólido se incrementa a más de 5, 10, 15, 20, 40 u 80.

15 Una célula efectora inmunitaria se refiere a una célula inmunitaria que participa en la fase efectora de una respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias ejemplares incluyen una célula de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (por ejemplo, células B y células T, incluyendo las células T citolíticas (CTL)), células asesinas, células asesinas naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleares, granulocitos, mastocitos y basófilos.

20 Las células efectoras inmunitarias implicadas en la fase efectora de una respuesta inmunitaria expresan receptores Fc específicos y llevan a cabo funciones inmunitarias específicas. Una célula efectora puede inducir citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), por ejemplo, un neutrófilo capaz de inducir ADCC. Por ejemplo, los monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos que expresan Fc_γR participan en la eliminación específica de células objetivo y en la presentación de antígenos a otros componentes del sistema inmunitario, o en la unión a células que presentan antígenos. Una célula efectora también puede fagocitar un antígeno objetivo, una célula objetivo o un microorganismo. Como ya se ha comentado, los anticuerpos utilizados en la presente invención pueden optimizarse para inducir ADCC.

25 En algunas realizaciones, un agente diferente contra el cáncer puede administrarse en combinación con el anticuerpo a través de la misma o diferentes vías de administración y/o de acuerdo con diferentes esquemas. Alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, una o más dosis de un primer agente activo se administran sustancialmente de forma simultánea con, y en algunas realizaciones a través de una ruta común y/o como parte de una composición única con, uno o más agentes activos. Los expertos en la técnica apreciarán además que algunas realizaciones de terapias combinadas proporcionadas de acuerdo con la presente invención consiguen efectos sinérgicos; en algunas de dichas realizaciones, la dosis de uno o más agentes utilizados en la combinación puede ser materialmente diferente (por ejemplo, más baja) y/o puede administrarse por una vía alternativa, que es estándar, preferida o necesaria cuando ese agente se utiliza en un régimen terapéutico diferente (por ejemplo, como monoterapia y/o como parte de una terapia combinada diferente).

30 En algunas realizaciones, cuando se utilizan dos o más agentes activos de acuerdo con la presente invención, dichos agentes pueden administrarse simultánea o secuencialmente. En algunas realizaciones, la administración de un agente está específicamente programada en relación con la administración de otro agente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un primer agente se administra de forma que se observe un efecto particular (o se espere que se observe, por ejemplo, basándose en estudios de población que muestren una correlación entre un régimen de dosificación dado y el efecto particular de interés). En algunas realizaciones, los regímenes de dosificación relativa deseados para los agentes administrados en combinación pueden evaluarse o determinarse empíricamente, por ejemplo, utilizando modelos *ex vivo*, *in vivo* y/o *in vitro*; en algunas realizaciones, dicha evaluación o determinación empírica se realiza *in vivo*, en una población de pacientes (por ejemplo, de modo que se establezca una correlación), o alternativamente en un paciente particular de interés.

35 En otro aspecto de la invención, un anticuerpo anti-CD25 que no inhibe la señalización de interleucina 2 a través de CD25 tiene efectos terapéuticos mejorados cuando se combina con un inhibidor de punto de control inmunitario. Una terapia combinada con un anticuerpo anti-CD25 que no inhibe la señalización de la interleucina 2 a través de CD25 y un inhibidor de puntos de control inmunitarios puede tener efectos sinérgicos en el tratamiento de tumores establecidos. Los datos relativos a PD-1/PD-L1 en los presentes Ejemplos se refieren a la interferencia con la interacción PD-1/PD-L1. De este modo, puede bloquearse la interacción entre el receptor PD-1 y el ligando PD-L1, lo que da lugar al "bloqueo PD-1". En un aspecto, la combinación puede conducir a una mayor regresión tumoral, un mayor impedimento o reducción del crecimiento tumoral, y/o el tiempo de supervivencia puede mejorarse usando la invención como se describe en el presente documento, por ejemplo, en comparación con anticuerpos anti-CD25 o el bloqueo de PD-1/PD-L1 solo (directamente, usando un anticuerpo anti-PD1, o indirectamente, usando un anticuerpo anti-PD-L1). Cuando, dado que el anticuerpo anti-CD25 no inhibe la señalización de la interleucina 2 a través de CD25, una terapia combinada con un anticuerpo anti-CD25 y un inhibidor de puntos de control inmunitarios puede incluir además la administración de interleucina-2 a una dosis adecuada para el tratamiento del cáncer.

40 Tal como se utilizan en el presente documento, "punto de control inmunitario" o "proteína de punto de control inmunitario" se refieren a proteínas pertenecientes a vías inhibitorias en el sistema inmunitario, en particular para la modulación de las respuestas de células T. En condiciones fisiológicas normales, los puntos de control inmunitarios son cruciales para prevenir la autoinmunidad, especialmente durante la respuesta a un patógeno. Las células

cancerosas pueden alterar la regulación de la expresión de las proteínas de los puntos de control inmunitarios para evitar la vigilancia inmunitaria.

Ejemplos de proteínas de punto de control inmunitario incluyen, pero no se limitan a PD-1, CTLA-4, BTLA, KIR, LAG3, TIGIT, CD155, B7H3, B7H4, VISTA y TIM3, y también OX40, GITR, ICOS, 4-1BB y HVEM. Las proteínas de punto de control inmunitario también pueden referirse a proteínas que se unen a otras proteínas de punto de control inmunitario. Tales proteínas incluyen PD-L1, PD-L2, CD80, CD86, HVEM, LLT1 y GAL9.

Los "inhibidores de proteínas de punto de control inmunitario" se refieren a cualquier proteína que pueda interferir con la señalización y/o las interacciones proteína-proteína mediadas por una proteína de punto de control inmunitario. En un aspecto de la invención, la proteína de punto de control inmunitario es PD-1 o PD-L1. En un aspecto preferido de la invención tal como se describe en el presente documento, el inhibidor de puntos de control inmunitarios interfiere con las interacciones PD-1/PD-L1 mediante anticuerpos anti-PD-1 o anti-PD-L1.

Como tal, la presente invención también proporciona ciertos anticuerpos anti-CD25 para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto humano, en el que dicho sujeto tiene un tumor sólido, que comprende administrar el anticuerpo anti-CD25 que inhibe menos de aproximadamente el 25% de la señalización de IL-2 en comparación con la señalización de IL-2 en ausencia del anticuerpo, en el que la señalización de IL2 se mide por los niveles de proteína STAT5 fosforilada en las células según lo determinado por el ensayo de fosforilación de STAT5 antes mencionado, y un agente terapéutico adicional, preferentemente un inhibidor de punto de control, a un sujeto.

La administración del anticuerpo anti-CD25 que no inhibe la señalización de interleucina-2 a CD25 y otro agente terapéutico, tal como el inhibidor de puntos de control inmunitarios, puede ser simultánea, separada o secuencial.

La presente invención proporciona una combinación de un anticuerpo anti-CD25 que inhibe menos de aproximadamente 25% de la señalización de IL-2 en comparación con la señalización de IL-2 en ausencia del anticuerpo, en la que la señalización de IL2 se mide por los niveles de proteína STAT5 fosforilada en las células según se determina mediante el ensayo de fosforilación de STAT5 antes mencionado y un agente terapéutico adicional, preferentemente un inhibidor del punto de control inmunitario, para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto humano, en el que dicho sujeto tiene un tumor sólido, en el que el anticuerpo anti-CD25 y otro agente terapéutico, tal como el inhibidor del punto de control inmunitario, se administran simultáneamente, por separado o secuencialmente. Dicho anticuerpo anti CD25 humano que no inhibe la señalización de interleucina-2 a CD25 y presenta el isotipo IgG1 humano puede utilizarse específicamente en combinación con anticuerpos dirigidos a puntos de control inmunitarios pero que carecen de secuencias que permitan ADCC, ADCP y/o CDC.

En un aspecto alternativo, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD25 que inhibe menos de aproximadamente 25% de la señalización de IL-2 en comparación con la señalización de IL-2 en ausencia del anticuerpo, en el que la señalización de IL2 se mide por los niveles de proteína STAT5 fosforilada en las células según lo determinado por el ensayo de fosforilación de STAT5 antes mencionado para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto humano que tiene un tumor sólido, en el que dicho anticuerpo es para administración en combinación con un agente terapéutico adicional, preferentemente un inhibidor de punto de control inmunitario.

La presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CD25 que no inhibe la señalización de interleucina 2 a través de CD25, y opcionalmente un agente terapéutico adicional, preferentemente un inhibidor de punto de control inmunitario, en un medio farmacéuticamente aceptable. Como se ha comentado anteriormente, el inhibidor del punto de control inmunitario puede ser un inhibidor de PD-1, es decir, un antagonista de PD-1.

PD-1 (Proteína de Muerte Celular Programada 1), también conocida como CD279, es un receptor de superficie celular expresado en células T y células B activadas. Se ha demostrado que la interacción con sus ligandos atenúa las respuestas de las células T tanto *in vitro* como *in vivo*. PD-1 se une a dos ligandos, PD-L1 y PD-L2. PD-1 pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. La señalización de PD-1 requiere la unión a un ligando de PD-1 en las proximidades de un antígeno peptídico presentado por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (Freeman (2008) Proc Natl Acad Sci USA 105, 10275-6). Por lo tanto, las proteínas, los anticuerpos o las moléculas pequeñas que impiden la coligación de PD-1 y TCR en la membrana de las células T son antagonistas de PD-1 útiles.

En una realización, el antagonista del receptor PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a PD-1 y bloquea la unión de PD-L1 a PD-1. El anticuerpo anti-PD-1 puede ser un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo anti-PD-1 puede ser un anticuerpo humano o humanizado. Un anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo capaz de unirse específicamente al receptor PD-1. Los anticuerpos anti-PD-1 conocidos en la técnica incluyen Nivolumab y Pembrolizumab.

Los antagonistas de PD-1 utilizados en la presente invención también incluyen compuestos o agentes que o bien se unen a y/o bloquean un ligando de PD-1 para interferir con o inhibir la unión del ligando al receptor de PD-1, o bien se unen directamente al receptor de PD-1 y lo bloquean sin inducir transducción de señal inhibitoria a través del receptor de PD-1. En particular, los antagonistas de PD-1 incluyen pequeñas moléculas inhibidoras de la vía de señalización

PD-1/PD-L1. Alternativamente, el antagonista del receptor PD-1 puede unirse directamente al receptor PD-1 sin desencadenar la transducción de señales inhibitorias y también se une a un ligando del receptor PD-1 para reducir o inhibir que el ligando desencadene la transducción de señales a través del receptor PD-1. Al reducir el número y/o la cantidad de ligandos que se unen al receptor PD-1 y desencadenan la transducción de una señal inhibitoria, menos células son atenuadas por la señal negativa emitida por la transducción de la señal PD-1 y se puede lograr una respuesta inmunitaria más robusta.

5] En una realización, el antagonista del receptor PD-1 es un anticuerpo anti-PD-L1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a PD-L1 y bloquea la unión de PD-L1 a PD-1. El anticuerpo anti-PD-L1 puede ser un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo anti-PD-L1 puede ser un anticuerpo humano o humanizado, como Atezolizumab (MPDL3280A).

10 La presente invención también proporciona un anticuerpo anti-CD25 que inhibe menos de aproximadamente 25% de la señalización de IL-2 en comparación con la señalización de IL-2 en ausencia del anticuerpo, en el que la señalización de IL2 se mide por los niveles de proteína STAT5 fosforilada en células según se determina mediante un ensayo de fosforilación de STAT5 para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto humano que tiene un tumor sólido, y un anticuerpo que es un agonista de una vía costimuladora activadora de células T para un sujeto. Los anticuerpos agonistas de una vía costimuladora activadora de células T incluyen, sin limitación, anticuerpos agonistas contra ICOS, GITR, OX40, CD40, LIGHT y 4-1 BB.

15 20 Otro uso en el tratamiento del cáncer comprende la administración del anticuerpo anti-CD25 que inhibe menos de aproximadamente 25% de la señalización de IL-2 en comparación con la señalización de IL-2 en ausencia del anticuerpo, en el que la señalización de IL2 se mide por los niveles de proteína STAT5 fosforilada en las células según lo determinado por el ensayo de fosforilación de STAT5 antes mencionado, y un compuesto que disminuye, bloquea, inhibe y/o antagoniza FcγRllb (CD32b). Dicho antagonista de FcγRllb puede ser una pequeña molécula que interfiera en la señalización intracelular inducida por FcγRllb, anticuerpos modificados que no se enganchen al receptor inhibidor de FcγRllb, o un anticuerpo anti-FcγRllb humano (anticuerpo anti-CD32b). Por ejemplo, se han caracterizado anticuerpos antagonistas anti FcγRllb humanos también por sus propiedades antitumorales (Roghanian A et al., 2015, Cancer Cell. 27, 473-488; Rozan C et al., 2013, Mol Cancer Ther. 12:1481-91; el documento WO2015173384; el documento WO2008002933).

25 30 La presente divulgación también proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- 35 (a) una primera fracción de unión a antígeno que se une a CD25;
- (b) una segunda fracción de unión a antígeno que se une a una proteína de punto de control inmunitario, a un antígeno asociado a un tumor, a un anticuerpo antireceptor Fc activador humano (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIII) o a un anticuerpo antagonista FcγRllb antihumano;

40 45 en el que el anticuerpo anti-CD25 no inhibe la unión de la Interleucina-2 (IL-2) a CD25, y preferentemente es un anticuerpo biespecífico IgG1 que se une al menos a un receptor Fc activador con alta afinidad, y agota las células T reguladoras infiltrantes de tumores. En una realización preferida, la segunda fracción de unión a antígeno se une a PD-L1.

50 55 [0139] Tal como se utiliza en el presente documento, "antígeno asociado a tumor" se refiere a antígenos expresados en células tumorales, haciéndolas distinguibles de células no cancerosas adyacentes a ellas, e incluye, sin limitación, CD20, CD38, PD-L1, EGFR, EGFRV3, CEA, TYRP1 y HER2. Se han publicado diversos artículos de revisión que describen antígenos relevantes asociados a tumores y los correspondientes agentes de anticuerpos antitumorales terapéuticamente útiles (véase, por ejemplo, Sliwkowski & Mellman (2013) Science 341, 192-8). Tales antígenos y anticuerpos correspondientes incluyen, sin limitación, CD22 (Blinatumomab), CD20 (Rituximab, Tositumomab), CD56 (Lorotuzumab), CD66e/CEA (Labetuzumab), CD152/CTLA-4 (Ipilimumab), CD221/IGF1R (MK-0646), CD326/Epcam (Edrecolomab), CD340/HER2 (Trastuzumab, Pertuzumab) y EGFR (Cetuximab, Panitumumab).

60 65 El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la divulgación descrita en el presente documento conduce a ADCC o, en un aspecto, ADCC mejorada.

70 El anticuerpo biespecífico puede unirse a un epítopo específico en CD25 que no afecte a la unión de IL-2 a CD25, y a un epítopo específico en la proteína de punto de control inmunitario o antígeno asociado a tumor como se define en el presente documento. La segunda fracción de unión a antígeno puede unirse a PD-L1. La presente divulgación también proporciona un anticuerpo biespecífico que comprende:

- 65 (a) una primera fracción de unión a antígeno que se une a CD25 y que no afecta a la unión de IL-2 a CD25;
- y
- (b) una segunda fracción de unión a antígeno que se une a una proteína de punto de control inmunitario expresada en una célula tumoral.

75 La proteína de punto de control inmunitario expresada en una célula tumoral puede ser PD-L1, VISTA, GAL9, B7H3 o

- 5 B7H4. Aún más preferentemente, el anticuerpo anti-CD25 es un anticuerpo IgG1 que no afecta a la unión de IL-2 a CD25 y que se une a al menos un receptor Fc γ activador con alta afinidad, y destruye las células T reguladoras infiltrantes de tumores. Alternativamente, el anticuerpo anti-CD25 es un anticuerpo IgG2 humano que elimina las células T reguladoras infiltradas por el tumor. El anticuerpo anti-CD25 puede ser un anticuerpo IgG2 humano que se une a al menos un receptor Fc γ activador con alta afinidad, preferentemente Fc γ RIIa.
- 10 Un experto en la materia podría producir un anticuerpo biespecífico utilizando procedimientos conocidos. El anticuerpo biespecífico de acuerdo con la divulgación puede utilizarse en cualquiera de los aspectos de la invención descritos en el presente documento. Preferentemente, la segunda fracción de unión a antígeno dentro del anticuerpo biespecífico de acuerdo con la divulgación se une a PD-1 humana, PD-L1 humana o CTLA-4 humana.
- 15 En un aspecto, el anticuerpo biespecífico puede unirse a CD25 y a receptores inmunomoduladores expresados en altos niveles en Tregs infiltrantes de tumores, por ejemplo, CTLA4, ICOS, GITR, 4-1BB u OX40.
- 20 20 La presente divulgación también proporciona un kit que comprende un anticuerpo anti-CD25 como se describe en el presente documento, y un agente terapéutico adicional, preferentemente un inhibidor del punto de control inmunitario, preferentemente un antagonista de PD-1 (directamente, usando un anticuerpo anti-PD1, o indirectamente, usando un anticuerpo anti-PD-L1) como se discute en el presente documento. El inhibidor del punto de control inmunitario puede ser anti-PD-L1. El kit puede comprender un anticuerpo anti-CD25 como se describe en el presente documento, y un anticuerpo que es un agonista de una vía costimuladora activadora de células T. El kit puede incluir instrucciones de uso.
- 25 Cualquier aspecto de la invención como se describe en el presente documento puede realizarse en combinación con agentes terapéuticos adicionales, en particular terapias adicionales contra el cáncer. En particular, el anticuerpo anti-CD25 y, opcionalmente, el inhibidor del punto de control inmunitario utilizado en la presente invención puede administrarse en combinación con anticuerpos coestimuladores, quimioterapia y/o radioterapia (aplicando irradiación externamente al cuerpo o administrando compuestos radioconjugados), terapia basada en citoquinas, terapia dirigida, terapia con anticuerpos monoclonales, una vacuna o un adyuvante, o cualquier combinación de los mismos.
- 30 30 Una entidad quimioterapéutica como se usa en el presente documento se refiere a una entidad que es destructiva para una célula, es decir, la entidad reduce la viabilidad de la célula. La entidad quimioterapéutica puede ser un fármaco citotóxico. Un agente quimioterapéutico contemplado incluye, sin limitación, agentes alquilantes, antraciclinas, epotilonas, nitrosoureas, etileniminas/metilmelamina, alquilsulfonatos, agentes alquilantes, antimetabolitos, análogos de pirimidina, epipodofilotoxinas, enzimas como L-asparaginasa; modificadores de la respuesta biológica como IFN α , IFN- γ , IL-2, IL-12, G-CSF y GM-CSF; complejos de coordinación de platino, tal como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino, antracenedionas, urea sustituida, tal como hidroxiurea, derivados de la metilhidrazina, incluida la N-metilhidrazina (MIH) y la procarbazina, supresores adrenocorticales, tal como mitotano (o,p'-DDD) y aminoglutetimida hormonas y antagonistas, incluyendo los antagonistas de los adrenocorticosteroides, tal como la prednisona y equivalentes, la dexametasona y la aminoglutetimida; progestágenos, tal como el caproato de hidroxiprogesterona, el acetato de medroxiprogesterona y el acetato de megestrol; estrógenos, tal como el dietilestilbestrol y equivalentes de etinilestradiol; antiestrógenos tal como el tamoxifeno; andrógenos incluyendo el propionato de testosterona y la fluoximesterona/equivalentes; antiandrógenos como la flutamida, los análogos de la hormona liberadora de gonadotropina y la leuprolida; y antiandrógenos no esteroideos como la flutamida.
- 35 40 45 50 55 60 65 La terapia adicional contra el cáncer también puede incluir la administración de una vacuna contra el cáncer. Las "vacunas contra el cáncer", tal y como se utilizan en el presente documento, se refieren a vacunas terapéuticas contra el cáncer administradas a pacientes con cáncer y diseñadas para erradicar las células cancerosas mediante el refuerzo de las respuestas inmunitarias del propio paciente. Las vacunas contra el cáncer incluyen vacunas de células tumorales (autólogas y alogénicas), vacunas de células dendríticas (generadas *ex vivo* y activadas por péptidos), vacunas contra el cáncer basadas en proteínas/péptidos y vacunas genéticas (vacunas basadas en ADN, ARN y virus). Por consiguiente, las vacunas terapéuticas contra el cáncer, en principio, pueden utilizarse para inhibir el crecimiento ulterior de cánceres avanzados y/o tumores recidivantes que son refractarios a las terapias convencionales, tal como la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Las vacunas basadas en células tumorales (autólogas y alogénicas) incluyen las modificadas genéticamente para secretar agentes inmunoestimuladores solubles tales como citoquinas (IL-2, IFN- γ , IL12, GMCSF, FLT3L), anticuerpos Fv de cadena simple contra receptores inmunomoduladores (PD-1, CTLA-4, GITR, ICOS, OX40, 4-1 BB) y/o expresar en su membrana el ligando de receptores inmunoestimuladores tal como el ligando ICOS, el ligando 4-1BB, el ligando GITR y/o el ligando OX40, entre otros. En una realización, la vacuna contra el cáncer puede ser una vacuna antitumoral GVAX.
- "En combinación" puede referirse a la administración de la terapia adicional antes, al mismo tiempo o después de la administración de cualquier aspecto de acuerdo con la presente invención.

La invención se describirá ahora con más detalle mediante los siguientes Ejemplos, que tienen por objeto servir de ayuda a un experto en la técnica para llevar a cabo la invención y no pretenden en modo alguno limitar el alcance de la invención, con referencia a los dibujos.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1 - muestra la caracterización de los anticuerpos 7D4 y PC61 anti-ratón CD25 utilizados en los Ejemplos. El efecto sobre la unión de IL-2 se realizó mediante un ensayo de bloqueo cruzado en formato tándem. Se cargó CD25 de ratón biotinilado en sensores SA. A continuación, los sensores se expusieron a 100 nM de IL-2 de ratón seguida de anticuerpo anti-CD25 de ratón a un tiempo de 150seg. La unión adicional por parte del anticuerpo tras la asociación con IL-2 indica un CD25 anti-ratón que no bloquea la unión a IL-2, mientras que la ausencia de unión adicional indica el bloqueo del ligando. PC-61 mlgG2a muestra interferencia de la interacción IL-2 de ratón - CD25 de ratón, en contraste con la 7D4 (A). La interacción IL-2 de ratón / CD25 de ratón en presencia del anti-CD25 de ratón recombinante 7D4(mlgG1) se evaluó mediante un ensayo estándar de bloqueo cruzado en formato intercalado. 7D4(mlgG1) se cargó en sensores AHQ y los sitios de unión Fc no ocupados en el sensor se bloquearon con un anticuerpo IgG1 humano irrelevante. A continuación, los sensores se expusieron a 100 nM de CD25 de ratón recombinante (R&D Systems; cat. no. 2438-RM- 050) seguido de IL-2 de ratón recombinante (Peprotech; cat. no. 212-12). La unión adicional por la IL-2 de ratón tras la asociación 7D4(mlgG1)-CD25 de ratón indica un epítopo desocupado, con tanto 7D4(mlgG1) como IL-2 de ratón que no compiten por el epítopo dentro de CD25 de ratón ya que la unión es simultánea a CD25 de ratón (B). La unión a CD25 de ratón se determinó utilizando células CHO que expresaban CD25 de ratón para los anticuerpos de unión a CD25 antihumano Daclizumab (DAC), el anticuerpo PC61(mlgG2a) (el anti-CD25 original obtenido del clon PC-61 con IgG2a murina y regiones constantes κ que se asocian con ADCC) y un anticuerpo 7D4(mlgG1) (un anti D25 obtenido del clon 7D4 con IgG1 murina y regiones constantes κ). El IgG anti-CD25 de ratón se une al mCD25 expresado celularmente. Las CHO-mCD25 se alicuotaron en placas de ensayo de 96 pocillos (50000 células/pocillo) y se incubaron con 0,1 mL de solución que contenía anticuerpo (anticuerpo a una concentración de 100nM en PBS + 0,1% de albúmina de suero bovino) a 25°C durante 15 minutos. Las células se lavaron tres veces con PBS helado + 0,1% de albúmina de suero bovino y, a continuación, se marcaron con IgG antihumana de cabra (específica de la cadena γ) R-PE (Southern Biotech, número de catálogo 2040-09) y se analizaron mediante citometría de flujo (se utilizó yoduro de propidio para distinguir las células muertas). No se detectó unión para DAC, mientras que tanto PC61 (mlgG2a) como 7D4(mlgG1) muestran una clara unión a dichas células (C).

Figura 2 - muestra el efecto de los anticuerpos anti-ratón CD25 en la inducción de la expresión de la granzima B por las células T CD4 tras la estimulación con anti-CD3 y anti- CD28. Las células T CD4 positivas totales se aislaron utilizando CD4 MicroBeads de los ganglios linfáticos y el bazo de ratones y se marcaron con colorantes CellTrace™ Violet (ThermoFisher) para medir la proliferación celular. Las células T marcadas (105) se sembraron con células alimentadoras (105 ; fracción CD90.2negativa, utilizando el kit pan T Dynabeads de ratón) en una placa de 96 pocillos. Se añadieron anti-CD3 (clon 145-2C11, BioXcell Cat No. BE0001-1; 1μg/ml) y anti-CD28 (clon 37.51 Cat No. BioXcell BE0015-1; 05μg/ml) a los pocillos (con la excepción de la muestra de control de células T marcadas no estimuladas) para activar las células T CD4 e inducir la proliferación y la producción de Granzima B. A continuación, se añadieron los siguientes anticuerpos (a 25μg/mL) a los pocillos que contenían células T CD4 marcadas y anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (los pocillos que contenían células T marcadas y anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 únicamente se utilizaron como control negativo): PC61(mlgG2a), 7D4(mlgG1), o un anticuerpo neutralizante anti IL-2 de ratón (clon Jes6-1A12, BioXcell 6032988564) utilizado como control positivo, para mostrar el impacto del bloqueo de la interacción entre la IL-2 y su receptor sobre la activación de las células T. A continuación, las muestras de células T marcadas se incubaron durante aproximadamente 84 horas. A continuación, las células se fijaron y permeabilizaron antes de teñirlas con anticuerpo anti-ratón Granzima B (clon GB11, Invitrogen). A continuación, las células se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la expresión de granzima B y diluciones de colorantes violetas CellTrace (BV450). El porcentaje de células T marcadas que proliferan y expresan Granzima B (Gnzb) se muestra en el cuadrante superior izquierdo de cada gráfico específico de tratamiento (Q9), mientras que el porcentaje de células T marcadas que proliferan, pero no expresan Gnzb se muestra en el cuadrante inferior izquierdo de cada gráfico específico de tratamiento (Q12).

Figura 3 - muestra el efecto in vivo de los anticuerpos anti-ratón CD25 que tienen el mismo isotipo (IgG2a de ratón) que bloquean o no bloquean la interacción entre CD25 e IL-2, cuando se administran en presencia o no de anti-ratón PD1 (aPD1; clon RMP1-14), sobre las células inmunitarias. Seis grupos de ratones fueron inyectados subcutáneamente con células tumorales MCA205 ((5×10⁵ 15) en el Día0 y tratados por separado como se indica en los gráficos. En cuatro grupos, se inyecta por vía intraperitoneal el anticuerpo anti-ratón CD25 (aPC61 mlgG2a o a7D4 mlgG2a; 200μg) en el Día5. En tres grupos, se inyecta aPD1 (100μg) por vía intraperitoneal el Día6 y el Día9. Los tumores y los ganglios linfáticos se cosechan en el día 12 y luego se procesan para teñir las células de acuerdo con el tipo deseado y se analizan por citometría de flujo como se indica en cada panel, utilizando los siguientes anticuerpos: anti-CD3 (clon 17A2, Biolegend), anti-CD4 (clon RM4-5, BD biosciences), anti-CD8 (clon 53-6.7, Biolegend) y anti-FoxP3 (clon FJK-16s, eBiosciences). La tinción intranuclear de FoxP3 se realizó utilizando el FoxP3 Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience). Se muestra el porcentaje de células T reguladoras positivas para CD4/positivas para Foxp3 y

5 células T CD4 efectoras positivas para CD4/negativas para FoxP3(CD4 Teff) en LN y TIL, así como la proporción de células T efectoras positivas para CD8/células Treg y células CD4 Teff / Treg. El análisis de datos se realizó en Flowjo versión 10.0.8 (Tree Star Inc.). Los análisis estadísticos se realizaron en Prism 6 (GraphPad Software, Inc.); los valores p se calcularon mediante el análisis de la varianza de Kruskall-Wallis y la prueba post-hoc de Dunn (ns = p > 0,05; **** = p < 0,0001).

10 **Figura 4** - muestra el efecto de los anticuerpos anti-ratón CD25 con el mismo isotipo (IgG2a) que bloquean o no la interacción entre CD25 e IL-2, en presencia o no de anti-ratón PD1 (aPD1; clon RMP1-14) sobre la producción de Granzima B por células T proliferantes in vivo. Se generaron muestras de células utilizando el modelo basado en MCA205 en seis grupos de tratamiento como se indica en la Figura 3. Las células tumorales se tiñeron de acuerdo con el tipo deseado y se analizaron por citometría de flujo como se indica en cada panel, utilizando los siguientes anticuerpos: anti-CD3 (PeCy7, clon 145-2C11, Ebioscience, 25003182), anti-CD4 (V500, clon RM4-5, BD biosciences, 560782), anti-CD8 (BV785, clon 53-6.7, Biolegend, 100750), anti-Granzima B (APC, clon GB11; Invitrogen, grb05) y Ki67 (V450, clon SolA15; eBiosciences, 48569882). La tinción intranuclear de Ki67 y Granzima B se realizó utilizando el FoxP3 Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience, 00-5523-00). Se comparó el porcentaje de células T positivas para Gnzb y el número total de células T positivas para CD4 o positivas para CD8 en proliferación (como lo indica la positividad de Ki67).

15 20 Los análisis estadísticos se realizaron como en la Figura 3 (ns = p > 0,05; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; **** = p < 0,0001).

25 **Figura 5** - muestra el efecto del anti-CD25 de ratón (isotipo IgG2a) que se administra con o sin la combinación con un anti-PD-1 (clon RMP1-14) en la erradicación de tumores establecidos en el modelo de ratón CT26. Tanto el 7D4m2a como el PC61m2a son anticuerpos anti-CD25 de ratón, depletores de Treg, pero no bloqueantes de IL-2 (7D4m2a) o bloqueantes de IL-2 (PC61m2). Se establecieron curvas de crecimiento de ratones individuales para cada grupo de tratamiento a lo largo del tiempo. En cada gráfico se indica el número de supervivientes libres de tumor a los 50 días. Las células CT26 utilizadas para la implantación se recogieron durante la fase logarítmica de crecimiento y se resuspendieron en PBS frío. El día 1 (D1) del estudio, se inyectó a cada ratón por vía subcutánea en el flanco derecho 3×10^5 células (0,1 mL de suspensión celular). El anti-ratón CD25 se inyectó i.p. (10mg/kg) en el Día 6 (cuando se detectaron tumores palpables). El anti-ratón PD1 se inyectó i.p. (100 μ g/inyección) en el Día 7, Día 10, Día 14 y Día 17. Los tumores se calibraron en dos dimensiones dos veces por semana para controlar su crecimiento. El tamaño del tumor, en mm³, se calculó a partir de: Volumen tumoral = $(w^2 \times l)/2$ donde w = anchura y l = longitud, en mm, del tumor. El punto final del estudio fue un volumen tumoral de 4000 mm³ o 50 días, lo que ocurriría primero (los puntos de datos que se detienen en días diferentes y anteriores se deben a la muerte de los ratones; el número de animales supervivientes al final del experimento se indica dentro de cada panel).

30 **Figura 6** muestra las curvas de crecimiento de tumores CT26 de ratones individuales no tratados (PBS, sólo vehículo) o tratados con anticuerpos IgG2a contra CD25 de ratón, ambos depletores de Treg, pero no bloqueadores de IL-2 (7D4m2a) o bloqueadores de IL-2 (PC61m2), y además combinados o no con PD-L1 de ratón clon 10F.9G2 (aPDL1; clon 10F.9G2). El modelo, el régimen y el análisis de los datos son los mismos que para la Figura 5.

35 40 **Figura 7** - muestra el efecto del anti-CD25 de ratón (isotipo IgG2a) que se administra con o sin la combinación con un anti-PD-1 (clon RMP1-14) en la erradicación de tumores establecidos en el modelo de ratón MC38. Los anticuerpos analizados son los descritos en la Figura 5. Se establecieron curvas de crecimiento de ratones individuales para cada grupo de tratamiento a lo largo del tiempo. En cada gráfico se indica el número de supervivientes libres de tumor a los 35 días. Las células de carcinoma de colon MC38 utilizadas para la implantación se cosecharon durante la fase logarítmica de crecimiento y se resuspendieron en PBS frío. A cada ratón se le inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho 5×10^5 células tumorales (0,1 mL de suspensión celular). Los tumores se controlaron a medida que sus volúmenes se acercaban al intervalo objetivo de 100 a 150 mm³. Veintidós días después de la implantación del tumor, el día 1 del estudio, los animales con volúmenes tumorales individuales que oscilaban entre 75 y 126 mm³ se clasificaron en nueve grupos (n = 10) con volúmenes tumorales medios de grupo de aproximadamente 106 mm³. Los tratamientos comenzaron el día 1 en ratones portadores de tumores MC38 establecidos. Los efectos de cada tratamiento se compararon con un grupo de control tratado con vehículo que recibió PBS por vía intraperitoneal (i.p.) el Día 1, Día 2, Día 5, Día 9 y Día 12. Se administró Anti-PD1 i.p. a 100 μ g/animal, dos veces por semana durante dos semanas (biwk \times 2) a partir del día 2. 7D4m2a y PC61m2a se administraron i.p. una vez el Día 1 a 200 μ g/animal. Las mediciones tumorales se realizaron dos veces por semana. El punto final del estudio fue un volumen tumoral de 4000 mm³ o 35 días, lo que ocurriría primero (los puntos de datos que se detienen en días diferentes y anteriores se deben a la muerte de los ratones; en cada panel se indica el número de animales supervivientes al final del experimento).

45 50 **Figura 8** muestra las curvas de crecimiento de tumores MC38 de ratones individuales no tratados (PBS, sólo vehículo), tratados con anticuerpos IgG2a contra CD25 de ratón, ambos depletores de Treg, pero no bloqueadores de IL-2 (7D4m2a) o bloqueadores de IL-2 (PC61m2), y además combinados o no con PD-L1 de ratón clon 10F.9G2 (aPDL1; clon 10F.9G2). El modelo, el régimen y el análisis de datos son los mismos de la figura 7.

55 60 **Figura 9**: Evaluación de la actividad terapéutica de 7D4 mlgG2a, un anticuerpo anti-ratón CD25 no bloqueante de IL-2, depletor de Treg solo (D) y en combinación con un anticuerpo neutralizante de IL-2

(ThermoFisher; JES6-1A12) (E), o un anticuerpo anti-ratón CD25 no depletor bloqueante de IL-2 del isotipo IgG1 de ratón (PC61 IgG1 de ratón) (F), en ratones portadores de tumores de colon singénicos CT26 en ratones BALB/c hembra. La actividad de control de IgG2s de ratón (A), un anticuerpo neutralizante de IL-2 solo (B), y un anticuerpo anti-CD25 bloqueante de IL-2 solo (C) se probaron para comparación.

Figura 10: muestra la secuencia consenso de CD25 humana (código Uniprot P01589), denominada SEQ ID NO:1 en el presente documento. El dominio extracelular de la CD25 madura, correspondiente a los aminoácidos 22-240, aparece subrayado. Se indica la posición de los epítopos de los anticuerpos anti-CD25 no bloqueantes de IL identificados preliminarmente: epítopo 1 (epítopo completo y corto), epítopo 2 (epítopo completo y corto), epítopo 3 y epítopo 4 (epítopo completo y corto). También se identifica la posición del epítopo de basiliximab y daclizumab (indicado como DAC).

Figura 11: Caracterización de la unión de (A) 7D4, (B) PC61 y (C) 2E4 a CD25 expresada en células CHO que expresan CD25 a concentraciones crecientes de anticuerpo y comparación con el control de isotype IgG2a de ratón.

Figura 12: Análisis basado en SPR de anticuerpos purificados (mlgG2a) contra rmCD25 su marcado en el Biacore 2000, (A) 7D4, (B) 2E4.

Figura 13: Análisis de competencia de anticuerpos anti mCD25 contra rmCD25 su marcado en el Octet96. Mostrando la unión por un segundo anticuerpo después de la captura del 7D4 en el sensor y los pasos de asociación del antígeno. Se observa una unión competitiva a mCD25 entre 7D4 y 2E4 (A) pero no entre 7D4 y PC61 (B).

Figura 14: Caracterización de 7D4, PC61 y 2E4 en comparación con el control de isotype IgG2a de ratón o en ausencia de un anticuerpo primario con respecto al bloqueo de la señalización de IL-2 en un ensayo de fosforilación de STAT5 utilizando células T aisladas de esplenocitos C57BL/6. Las células se incubaron con 50µg/ml de anticuerpo seguido de 50U/ml de IL-2. El análisis se restringió al porcentaje de células Treg que fosforilaban STAT5.

Figura 15: Depleción *in vivo* de Treg en ratones balb/c portadores de tumores 4T1 tras dosificación con anticuerpo anti-ratón CD25 (7D4). (A)-(C): % de células no CD4, CD4+ y CD25+FoxP3+, respectivamente, en sangre total el tercer día tras la dosis. (D)-(F): % de células no CD4, CD4+ y CD25+FoxP3+, respectivamente, en el tumor el día 3 tras la dosis. (G)-(I): % de células no CD4, CD4+ y CD25+FoxP3+, respectivamente, en sangre total el día 9 tras la dosis. (J)-(L): % de células no CD4, CD4+ y CD25+FoxP3+, respectivamente, en el tumor el día 9 tras la dosis.

Figura 16: Caracterización de la unión de CD25 antihumano clon 7G7B6 de ratón (B) o químérico (A, C y D) a CD25 expresado en células Karpas 299 (A), células Treg humanas diferenciadas *in vitro* (B), células SU-DHL-1 (C) o células SR-786 (D) a concentraciones crecientes de anticuerpo y comparación con el control de isotype IgG1 humano.

Figura 17: Caracterización de 7G7B6 en comparación con el control de isotype IgG2a de ratón, el control de isotype IgG1 humano, Daclizumab, o en ausencia de un anticuerpo primario con respecto al bloqueo de la señalización de IL-2 en un ensayo de fosforilación de STAT5 utilizando PBMC de origen humano. Las células se incubaron con 10µg/ml de anticuerpo seguido de concentraciones crecientes de IL-2 (como se muestra en las figuras). El análisis se limitó al porcentaje de células positivas para CD3 que fosforilaban STAT5.

Figura 18: Caracterización funcional del químérico 7G7B6 en comparación con el control de isotype IgG1 humano, Daclizumab, o el anticuerpo neutralizante de IL-2 antihumano de ratón disponible comercialmente como control positivo, (clon: AB12-3G4) utilizando células Pan T. Las células se incubaron con 10ug/ml de anticuerpo y luego se activaron con microesferas CD3/CD28 durante 72 horas antes del análisis por citometría de flujo. Los resultados muestran el porcentaje de células T CD4 proliferativas positivas para granzima B.

Figura 19: Caracterización funcional del químérico 7G7B6 en comparación con el control de isotype IgG1 humano con respecto a la matanza de líneas celulares positivas para CD25 en un ensayo ADCC. Células con alta o baja expresión de CD25, células SU-DHL-1 (A) o SR-786 (B) respectivamente, fueron cocultivadas con células NK purificadas en presencia de concentraciones variables de anticuerpos (como se muestra en las Figuras). La lisis de las células objetivo se midió mediante la liberación de calceína en el sobrenadante cuatro horas después de la adición a las células NK. Los datos se normalizaron con respecto a los controles tratados con saponina.

Figura 20: Caracterización funcional del químérico 7G7B6 comparado con el control de isotype IgG1 humano en lo que respecta a la fagocitosis de células Treg diferenciadas *in vitro* en un ensayo ADCP. Las Tregs se cocultivaron con macrófagos diferenciados MCSF en presencia de concentraciones variables de anticuerpos (como se muestra en las Figuras). Se realizó un análisis de citometría de flujo en dos colores con macrófagos teñidos con CD14+ y Tregs etiquetados con colorante eFluor450. Las células objetivo residuales se definieron como células con colorante eFluor450+/CD14-. Se consideró que las células con doble marcaje (colorante eFluor450+/CD14+) representaban la fagocitosis de objetivos por macrófagos. La fagocitosis de las células objetivo se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Fagocitosis} = 100 \times [(\text{porcentaje dual positivo}) / (\text{porcentaje dual positivo} + \text{porcentaje de objetivos residuales})]$$

Figura 21: Caracterización de la unión de MA-251 a CD25 expresado en células Karpas 299 a concentraciones crecientes de anticuerpo y comparación con el control de isotype IgG1 de ratón.

- 5 **Figura 22:** Caracterización de MA-251 comparado con control de isótipo IgG1 de ratón, control de isótipo IgG1 humano, Daclizumab, o en ausencia de un anticuerpo primario. El bloqueo de la señalización de IL-2 en un ensayo de fosforilación de STAT5 se evaluó utilizando PBMC de origen humano. Las células se incubaron con 10 μ g/ml de anticuerpo seguido de concentraciones crecientes de IL-2 (como se muestra en las figuras). El análisis se limitó al porcentaje de células positivas para CD3 que fosforilaban STAT5.
- 10 **Figura 23:** Caracterización de la unión de MA-251 e IL2 a CD25. La interferencia con la unión del ligando IL2 a CD25 se realizó en un sistema Forte Bio Octet Red384 (Pall Forte Bio Corp., EE. UU.) utilizando un ensayo de unión tipo intercalado estándar. El anticuerpo MA251 se cargó en sensores AHQ y los sitios de unión Fc no ocupados en el sensor se bloquearon con un anticuerpo IgG1 humano no relevante. Los sensores se expusieron a 100nM de CD25 humana seguida de 100nM de IL-2 humana. Los datos se procesaron con el software de análisis de datos Forte Bio 7.0. La unión adicional por IL2 humana tras la asociación con el antígeno indica un epítopo desocupado (no competidor), mientras que la ausencia de unión indica el bloqueo del epítopo (competidor).
- 15 **Figura 24:** Análisis de competencia de anticuerpos anti-CD25 en el Octet. Unir el primer Ab al rhCD25 inmovilizado seguido del primer Ab nuevamente (como control) o un segundo Ab. Los mAbs que no son bloqueantes de la señal de IL-2 compiten entre sí o con 7G7B6 y MA251 y no compiten con Daclizumab de investigación o Basiliximab de investigación (Figuras 24 (A) a (N)). (A) a (C) análisis de competencia de 7G7B6; (D)-(F) análisis de competencia de MA251; (G) a (I) y (N) análisis de competencia del Anticuerpo 3; (J) a (M) análisis de competencia del Anticuerpo 1. Los mAbs que son bloqueadores de la señalización de IL-2 (TSK031) compiten con el Daclizumab de investigación y el Basiliximab de investigación y no compiten con 7G7B6 (Figuras 24 (O) a (Q)).
- 20 **Figura 25:** Modelo *in vivo* que muestra la supresión del crecimiento tumoral tras la administración de: vehículo (A) y (C); o anticuerpo 1 (B), (D) y (E).
- 25 **Figura 26:** Determinación de la afinidad mediante análisis basado en SPR de anticuerpos purificados (IgG1) contra rhCD25 su marcado en el Biacore 2000. A) 7g7B6ch, B) MA251ch, C) Anticuerpo 1, D) Anticuerpo 3 y E) Daclizumab (control) o mediante interferometría de bicapa en el instrumento Octet Red 96 (F).
- 30 **Figura 27:** Caracterización de la unión del anticuerpo 1 al CD25 expresado en células Treg humanas diferenciadas *in vitro* (A), células SU-DHL-1 (B) o células SR-786 (C) a concentraciones crecientes de anticuerpo y comparación con el control de isótipo IgG1 humano.
- 35 **Figura 28:** Caracterización de la unión del anticuerpo 1 al CD25 expresado en las células T Pan humanas activadas por microesferas CD3/CD28 (A) y (B), luego se activó en células T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$, a una concentración de anticuerpos creciente y en comparación con el control de isótipo IgG1 humano.
- 40 **Figura 29:** Muestra la unión no competitiva del anticuerpo 1 y la IL-2 (A) y la unión competitiva de un anticuerpo competidor de la IL-2 con la IL-2 (B) mediante interferometría de bicapa en el Octet Red384 utilizando un ensayo de unión en formato de intercalamiento estándar. El anticuerpo anti CD25 humano, Anticuerpo 1, se cargó en sensores AHQ. A continuación, los sensores se expusieron a 100 nM de CD25 humana seguida de IL-2 humana. La unión adicional por IL2 humana tras la asociación con el antígeno indica un epítopo desocupado (no competidor), mientras que la ausencia de unión indica el bloqueo del epítopo (competidor).
- 45 **Figura 30:** Muestra el agrupamiento no competitivo del anticuerpo 1 y el daclizumab al CD25 mediante interferometría de bicapa en el sistema Octet Red384 utilizando un ensayo estándar de unión en formato de intercalamiento estándar. El anticuerpo monoclonal anti CD25 humano de referencia Daclizumab se cargó en sensores AHQ. A continuación, los sensores se expusieron a 100 nM de antígeno CD25 humano seguido del anticuerpo anti-CD25 humano (Anticuerpo 1). La unión adicional por parte del segundo anticuerpo tras la asociación con el antígeno indica un epítopo desocupado (no competidor), mientras que la ausencia de unión indica el bloqueo del epítopo (competidor).
- 50 **Figura 31:** caracterización del anticuerpo 1 en comparación con el control de isótipo IgG1 humano, Daclizumab, o en ausencia de un anticuerpo primario con respecto al bloqueo de la señalización de IL-2 en un ensayo de fosforilación de STAT5 utilizando PBMC de origen humano. Las células se incubaron con 10 μ g/ml de anticuerpo seguido de concentraciones crecientes de IL-2 (como se muestra en las figuras). El análisis se limitó al porcentaje de células positivas para CD3 que fosforilaban STAT5.
- 55 **Figura 32:** Caracterización funcional del Anticuerpo 1 comparado con el control de isótipo IgG1 humano, Daclizumab, o anticuerpo neutralizante de IL-2 antihumano de ratón disponible comercialmente como control positivo, (clon: AB12-3G4) utilizando células Pan T. Las células se incubaron con 10 μ g/ml de anticuerpo y luego se activaron con microesferas CD3/CD28 durante 72 horas antes del análisis por citometría de flujo. Los resultados muestran el porcentaje de células T CD4 (A) o CD8 (B) proliferantes positivas para granzima B.
- 60 **Figura 33:** Caracterización funcional del Anticuerpo 1 en comparación con el control de isótipo IgG1 humano en lo que respecta a la matanza de líneas celulares positivas para CD25 en un ensayo ADCC. Células con alta o baja expresión de CD25, células SU-DHL-1 (A) o SR-786 (B) respectivamente, fueron cocultivadas con células NK purificadas en presencia de concentraciones variables de anticuerpos (como se muestra en las Figuras). La lisis de las células objetivo se midió mediante la liberación de calceína en el sobrenadante cuatro horas después de la adición a las células NK. Los datos se normalizaron con respecto a los controles tratados con saponina.
- 65 **Figura 34:** Caracterización funcional del Anticuerpo 1 en comparación con el control de isótipo IgG1 humano en lo que respecta a la fagocitosis de células Treg diferenciadas *in vitro* en un ensayo ADCP. Las Tregs se

5 cocultivaron con macrófagos diferenciados MCSF en presencia de concentraciones variables de anticuerpos (como se muestra en las Figuras). Se realizó un análisis de citometría de flujo en dos colores con macrófagos teñidos con CD14+ y Tregs etiquetados con colorante eFluor450. Las células objetivo residuales se definieron como células con colorante eFluor450+/CD14-. Se consideró que las células con doble marcaje (colorante eFluor450+/CD14+) representaban la fagocitosis de objetivos por macrófagos. La fagocitosis de las células objetivo se calculó con la siguiente ecuación:

$$10 \% \text{ de Fagocitosis} = 100 \times [(\text{porcentaje dual positivo}) / (\text{porcentaje dual positivo} + \text{porcentaje de objetivos residuales})]$$

15 **Figura 35:** Caracterización de la unión del Anticuerpo 3 al CD25 expresado en células Treg humanas diferenciadas *in vitro* (A), células SU-DHL-1 (B) o células SR-786 (C) a concentraciones crecientes de anticuerpo y comparación con el control de isotipo IgG1 humano

20 **Figura 36:** Caracterización de la unión del Anticuerpo 3 a CD25 expresado en las células T Pan humanas activadas por las microesferas CD3/CD28 (A) y (B) o de mono Cynomolgus (C) y (D), luego se activó en células T CD4+ y CD8+, a una concentración de anticuerpos creciente y en comparación con el control de isotipo IgG1 humano.

25 **Figura 37:** Muestra la unión no competitiva del Anticuerpo 3 y la IL-2 mediante interferometría de bicapa en el Octet Red384 utilizando un ensayo de unión en formato intercalado estándar. El anticuerpo anti CD25 humano, Anticuerpo 3, se cargó en sensores AHQ. A continuación, los sensores se expusieron a 100 nM de CD25 humana seguida de IL-2 humana. La unión adicional por IL2 humana tras la asociación con el antígeno indica un epítopo no ocupado (no competidor).

30 **Figura 38:** Muestra el agrupamiento no competitivo del anticuerpo 3 y el daclizumab al CD25 mediante interferometría de bicapa en el sistema Octet Red384 utilizando un ensayo estándar de unión en formato de intercalamiento estándar. El anticuerpo monoclonal anti CD25 humano de referencia Dacizumab se cargó en sensores AHQ. A continuación, los sensores se expusieron a 100 nM de antígeno CD25 humano seguido del anticuerpo anti-CD25 humano (Anticuerpo 3). La unión adicional por parte del segundo anticuerpo tras la asociación con el antígeno indica un epítopo desocupado (no competidor), mientras que la ausencia de unión indica el bloqueo del epítopo (competidor).

35 **Figura 39:** caracterización del anticuerpo 3 en comparación con el control de isotipo IgG1 humano, Daclizumab, o en ausencia de un anticuerpo primario con respecto al bloqueo de la señalización de IL-2 en un ensayo de fosforilación de STAT5 utilizando PBMC de origen humano. Las células se incubaron con 10 μ g/ml de anticuerpo seguido de concentraciones crecientes de IL-2 (como se muestra en las figuras). El análisis se limitó al porcentaje de células positivas para CD3 que fosforilaban STAT5.

40 **Figura 40:** Caracterización funcional del Anticuerpo 3 comparado con el control de isotipo IgG1 humano, Daclizumab, o anticuerpo neutralizante de IL-2 antihumano de ratón disponible comercialmente como control positivo, (clon: AB12-3G4) utilizando células Pan T. Las células se incubaron con 10 μ g/ml de anticuerpo y luego se activaron con microesferas CD3/CD28 durante 72 horas antes del análisis por citometría de flujo. Los resultados muestran el porcentaje de células T CD4 (A) o CD8 (B) proliferantes positivas para granzima B.

45 **Figura 41:** Caracterización funcional del Anticuerpo 3 en comparación con el control de isotipo IgG1 humano en lo que respecta a la matanza de líneas celulares positivas para CD25 en un ensayo ADCC. Células con alta o baja expresión de CD25, células SU-DHL-1 (A) o SR-786 (B) respectivamente, fueron cocultivadas con células NK purificadas en presencia de concentraciones variables de anticuerpos (como se muestra en las Figuras). La lisis de las células objetivo se midió mediante la liberación de calceína en el sobrenadante cuatro horas después de la adición a las células NK. Los datos se normalizaron con respecto a los controles tratados con saponina.

50 **Figura 42:** Caracterización funcional del Anticuerpo 3 en comparación con el control de isotipo IgG1 humano en lo que respecta a la fagocitosis de células Treg diferenciadas *in vitro* en un ensayo ADCP. Las Tregs se cocultivaron con macrófagos diferenciados MCSF en presencia de concentraciones variables de anticuerpos (como se muestra en las Figuras). Se realizó un análisis de citometría de flujo en dos colores con macrófagos teñidos con CD14+ y Tregs etiquetados con colorante eFluor450. Las células objetivo residuales se definieron como células con colorante eFluor450+/CD14-. Se consideró que las células con doble marcaje (colorante eFluor450+/CD14+) representaban la fagocitosis de objetivos por macrófagos. La fagocitosis de las células objetivo se calculó con la siguiente ecuación:

$$55 \% \text{ de Fagocitosis} = 100 \times [(\text{porcentaje dual positivo}) / (\text{porcentaje dual positivo} + \text{porcentaje de objetivos residuales})]$$

60 **Figura 43:** Caracterización de la unión del anticuerpo 4 al CD25 expresado en células Treg humanas diferenciadas *in vitro* (A), células SU-DHL-1 (B) o células SR-786 (C) a concentraciones crecientes de anticuerpo y comparación con el control de isotipo IgG1 humano.

65 **Figura 44:** Caracterización de la unión del Anticuerpo 4 a células CHO-S no modificadas, (control negativo) (A), o células cyano-CD25-CHO-S (B), a una concentración de anticuerpo de 100nM y comparación con el control de isotipo IgG1 humano.

- 5 **Figura 45:** Muestra la unión no competitiva del Anticuerpo 4 y la IL-2 mediante interferometría de bicapa en el Octet Red384 utilizando un ensayo de unión en formato intercalado estándar. El anticuerpo anti CD25 humano, Anticuerpo 4, se cargó en sensores AHQ. A continuación, los sensores se expusieron a 100 nM de CD25 humana seguida de IL-2 humana. La unión adicional por IL2 humana tras la asociación con el antígeno indica un epítopo no ocupado (no competidor).
- 10 **Figura 46:** Muestra la unión no competitiva del Anticuerpo 4 y el Daclizumab a CD25 mediante interferometría de bicapa en el sistema Octet Red384 utilizando un ensayo de unión en formato intercalado estándar. El anticuerpo monoclonal anti CD25 humano de referencia Daclizumab se cargó en sensores AHQ. A continuación, los sensores se expusieron a 100 nM de antígeno CD25 humano seguido del anticuerpo anti-CD25 humano (Anticuerpo 4). La unión adicional por parte del segundo anticuerpo tras la asociación con el antígeno indica un epítopo desocupado (no competidor), mientras que la ausencia de unión indica el bloqueo del epítopo (competidor).
- 15 **Figura 47:** caracterización del Anticuerpo 4 en comparación con el control de isotipo IgG1 humano, Daclizumab, o en ausencia de un anticuerpo primario con respecto al bloqueo de la señalización de IL-2 en un ensayo de fosforilación de STAT5 utilizando PBMC de origen humano. Las células se incubaron con 10 μ g/ml de anticuerpo seguido de concentraciones crecientes de IL-2 (como se muestra en las figuras). El análisis se limitó al porcentaje de células positivas para CD3 que fosforilaban STAT5.
- 20 **Figura 48:** Caracterización funcional del Anticuerpo 4 comparado con el control de isotipo IgG1 humano, Daclizumab, o anticuerpo neutralizante de IL-2 antihumano de ratón disponible comercialmente como control positivo, (clon: AB12-3G4) utilizando células Pan T. Las células se incubaron con 10 μ g/ml de anticuerpo y luego se activaron con microesferas CD3/CD28 durante 72 horas antes del análisis por citometría de flujo. Los resultados muestran el porcentaje de células T CD4 (A) o CD8 (B) proliferantes positivas para granzima B.
- 25 **Figura 49:** Caracterización funcional del Anticuerpo 4 en comparación con el control de isotipo IgG1 humano en lo que respecta a la matanza de líneas celulares positivas para CD25 en un ensayo ADCC. Células con alta o baja expresión de CD25, células SU-DHL-1 (A) o SR-786 (B) respectivamente, fueron cocultivadas con células NK purificadas en presencia de concentraciones variables de anticuerpos (como se muestra en las Figuras). La lisis de las células objetivo se midió mediante la liberación de calceína en el sobrenadante cuatro horas después de la adición a las células NK. Los datos se normalizaron con respecto a los controles tratados con saponina.
- 30 **Figura 50:** Caracterización funcional del Anticuerpo 4 en comparación con el control de isotipo IgG1 humano en lo que respecta a la inducción de ADCP en un bioensayo reportero. Las células SU-DHL-1 que expresan CD25 se cocultivaron con células T Jurkat modificadas genéticamente para expresar FcγRIIa y un elemento de respuesta NFAT que impulsa la expresión de luciferasa (NFAT-RE-luc2) en presencia de concentraciones variables de anticuerpos (como se muestra en las Figuras).
- 35 **Figura 51:** Caracterización de la unión del anticuerpo 2 al CD25 expresado en células Treg humanas diferenciadas *in vitro* (A), células SU-DHL-1 (B) o células SR-786 (C) a concentraciones crecientes de anticuerpo y comparación con el control de isotipo IgG1 humano.
- 40 **Figura 52:** Caracterización de la unión del Anticuerpo 2 a CD25 expresado en células T Pan humanas activadas por microesferas CD3/CD28 (A) y (B) o de mono Cynomolgus (C) y (D), luego se activó en células T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$, a una concentración de anticuerpos creciente y en comparación con el control de isotipo IgG1 humano.
- 45 **Figura 53:** Muestra la unión no competitiva del anticuerpo 2 y la IL-2 (A) y la unión competitiva de un anticuerpo competidor de la IL-2 con la IL-2 (B) mediante interferometría de bicapa en el Octet Red384 utilizando un ensayo de unión en formato de intercalamiento estándar. El anticuerpo anti CD25 humano, Anticuerpo 2, se cargó en sensores AHQ. A continuación, los sensores se expusieron a 100 nM de CD25 humana seguida de IL-2 humana. La unión adicional por IL2 humana tras la asociación con el antígeno indica un epítopo no ocupado (no competidor).
- 50 **Figura 54:** Muestra el agrupamiento no competitivo del anticuerpo 2 y el daclizumab al CD25 mediante interferometría de bicapa en el sistema Octet Red384 utilizando un ensayo estándar de unión en formato de intercalamiento estándar. El anticuerpo monoclonal anti CD25 humano de referencia Daclizumab se cargó en sensores AHQ. A continuación, los sensores se expusieron a 100 nM de antígeno CD25 humano seguido del anticuerpo anti-CD25 humano (Anticuerpo 2). La unión adicional por parte del segundo anticuerpo tras la asociación con el antígeno indica un epítopo desocupado (no competidor), mientras que la ausencia de unión indica el bloqueo del epítopo (competidor).
- 55 **Figura 55:** Caracterización del Anticuerpo 2 en comparación con el control de isotipo IgG1 humano, Daclizumab, o en ausencia de un anticuerpo primario con respecto al bloqueo de la señalización de IL-2 en un ensayo de fosforilación de STAT5 utilizando PBMC de origen humano. Las células se incubaron con 10 μ g/ml de anticuerpo seguido de concentraciones crecientes de IL-2 (como se muestra en las figuras). El análisis se limitó al porcentaje de células positivas para CD3 que fosforilaban STAT5.
- 60 **Figura 56:** Caracterización funcional del Anticuerpo 2 en comparación con el control de isotipo IgG1 humano en lo que respecta a la matanza de líneas celulares positivas para CD25 en un ensayo ADCC. Células con alta o baja expresión de CD25, células SU-DHL-1 (A) o SR-786 (B) respectivamente, fueron cocultivadas con células NK purificadas en presencia de concentraciones variables de anticuerpos (como se muestra en las Figuras). La lisis de las células objetivo se midió mediante la liberación de calceína en el sobrenadante cuatro horas después de la adición a las células NK. Los datos se normalizaron con respecto a los controles tratados con saponina.

5 horas después de la adición a las células NK. Los datos se normalizaron con respecto a los controles tratados con saponina.

10 **Figura 57:** Caracterización funcional del Anticuerpo 2 en comparación con el control de isotipo IgG1 humano en lo que respecta a la fagocitosis de células Treg diferenciadas *in vitro* en un ensayo ADCP. Las Tregs se cocultivaron con macrófagos diferenciados MCSF en presencia de concentraciones variables de anticuerpos (como se muestra en las Figuras). Se realizó un análisis de citometría de flujo en dos colores con macrófagos teñidos con CD14+ y Tregs etiquetados con colorante eFluor450. Las células objetivo residuales se definieron como células con colorante eFluor450+/CD14-. Se consideró que las células con doble marcaje (colorante eFluor450+/CD14+) representaban la fagocitosis de objetivos por macrófagos. La fagocitosis de las células objetivo se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Fagocitosis} = 100 \times [(\text{porcentaje dual positivo}) / (\text{porcentaje dual positivo} + \text{porcentaje de objetivos residuales})]$$

15 **Figura 58:** Caracterización de la unión del Anticuerpo 5 al CD25 expresado en las células Karpas 299 a concentraciones crecientes del anticuerpo y comparación con el control de isotipo IgG1 humano.

20 **Figura 59:** Caracterización del Anticuerpo 5 con respecto al bloqueo de la señalización de IL-2 en un ensayo de fosforilación de STAT5 utilizando PBMC de origen humano. El anticuerpo antihumano de ratón MA-251 se utilizó como control de no bloqueo, mientras que el Daclizumab clínico High Yield Process (DAC HYP) se utilizó como control de bloqueo en comparación con el control de isotipo IgG1 de ratón, los controles de isotipo IgG1 humano o en ausencia de un anticuerpo primario, respectivamente. Las células se incubaron con 10 μ g/ml de anticuerpo seguido de 10U/ml de IL-2. El análisis se limitó al porcentaje de células positivas para CD3 que fosforilaban STAT5.

25 **Figura 60:** Ensayos de competencia en el Octet. Unión del Anticuerpo 1 a la rhCD25 inmovilizada, seguida del primer Ab de nuevo (Anticuerpo 1 como control) o de un segundo Ab, ya sea un competidor de IL-2, por ejemplo, investigación con Daclizumab y Basiliximab, o un no competidor de IL-2, por ejemplo, 7G7B6). El Anticuerpo 1 no compite con los bloqueantes de la señal IL-2 investigados Basiliximab (A) Daclizumab (B) mientras que sí lo hace con 7G7B6 (no bloqueante IL-2) (C).

30 **Figura 61:** Caracterización del Anticuerpo 5 comparado con un anticuerpo de control silencioso anti-CD25 humano Fc con respecto a la inducción de ADCC en un bioensayo reportero. Las células SR-786 que expresan CD25 se cocultivaron con células T Jurkat modificadas genéticamente para expresar Fc γ RIIIa y un elemento de respuesta NFAT que impulsa la expresión de luciferasa (NFAT-RE-luc2) en presencia de concentraciones variables de anticuerpos (como se muestra en las Figuras).

35 **Figura 62:** Caracterización funcional del Anticuerpo 5 en comparación con el control de isotipo IgG1 humano en lo que respecta a la fagocitosis de células Treg diferenciadas *in vitro* en un ensayo ADCP. Las Tregs se cocultivaron con macrófagos diferenciados MCSF en presencia de concentraciones variables de anticuerpos (como se muestra en las Figuras). Se realizó un análisis de citometría de flujo en dos colores con macrófagos teñidos con CD14+ y Tregs etiquetados con colorante eFluor450. Las células objetivo residuales se definieron como células con colorante eFluor450+/CD14-. Se consideró que las células con doble marcaje (colorante eFluor450+/CD14+) representaban la fagocitosis de objetivos por macrófagos. La fagocitosis de las células objetivo se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Fagocitosis} = 100 \times [(\text{porcentaje dual positivo}) / (\text{porcentaje dual positivo} + \text{porcentaje de objetivos residuales})]$$

45 **Figura 63:** Caracterización del Anticuerpo 6, Anticuerpo 7, Anticuerpo 8 y Anticuerpo 9, uniéndose a CD25 expresado en células Karpas 299 a concentraciones crecientes de anticuerpo y comparando con el control de isotipo IgG1 humano.

50 **Figura 64:** Ensayos de competencia en el Octet. Unión del primer Ab (Anticuerpo 7) al rhCD25 inmovilizado seguido del primer Ab de nuevo (como control) o de un segundo Ab Daclizumab (A) o Basiliximab (B).

55 **Figura 65:** Caracterización del Anticuerpo 7 en comparación con el control de isotipo IgG1 humano, Daclizumab-Hyp, o en ausencia de un anticuerpo primario con respecto al bloqueo de la señalización de IL-2 en un ensayo de fosforilación de STAT5 utilizando PBMC de origen humano. Las células se incubaron con 10 μ g/ml de anticuerpo seguido de 10U/ml de IL-2. El análisis se limitó al porcentaje de células positivas para CD3 que fosforilaban STAT5.

60 **Figura 66:** Caracterización funcional del Anticuerpo 7 comparado con un anticuerpo de control silencioso anti-CD25 humano Fc con respecto a la inducción de ADCC en un bioensayo reportero. Las células SR-786 que expresan CD25 se cocultivaron con células T Jurkat modificadas genéticamente para expresar Fc γ RIIIa y un elemento de respuesta NFAT que impulsa la expresión de luciferasa (NFAT-RE-luc2) en presencia de concentraciones variables de anticuerpos (como se muestra en las Figuras).

65 **Figura 67:** Caracterización funcional del Anticuerpo 7 en comparación con un anticuerpo de control silencioso anti-CD25 Fc humano con respecto a la fagocitosis de células Treg diferenciadas *in vitro* en un ensayo de ADCP. Las Tregs se cocultivaron con macrófagos diferenciados MCSF en presencia de concentraciones variables de anticuerpos (como se muestra en las Figuras). Se realizó un análisis de citometría de flujo en dos colores con macrófagos teñidos con CD14+ y Tregs etiquetados con colorante eFluor450. Las células objetivo residuales se definieron como células con colorante eFluor450+/CD14-. Se consideró que las células

con doble marcaje (colorante eFluor450+/CD14+) representaban la fagocitosis de objetivos por macrófagos. La fagocitosis de las células objetivo se calculó con la siguiente ecuación: %Fagocitosis = $100 \times [(\text{porcentaje doble positivo}) / (\text{porcentaje doble positivo} + \text{porcentaje de objetivos residuales})]$.

5 **Figura 68:** Caracterización del Anticuerpo 10, Anticuerpo 11, Anticuerpo 12, Anticuerpo 12, Anticuerpo 13, Anticuerpo 14, Anticuerpo 15, Anticuerpo 16, Anticuerpo 17, Anticuerpo 18, Anticuerpo 19, Anticuerpo 20 y Anticuerpo 21, uniéndose a CD25 expresado en células Karpas 299 a concentraciones crecientes de anticuerpo y comparando con el control de isótipo IgG1 humano.

10 **Figura 69:** Ensayos de competencia en el Octet. Unión del primer Ab (Anticuerpo 19) al rhCD25 inmovilizado seguido del primer Ab de nuevo (como control) o de un segundo Ab Daclizumab (A) o Basiliximab (B).

15 **Figura 70:** Caracterización del Anticuerpo 10, Anticuerpo 11, Anticuerpo 12, Anticuerpo 12, Anticuerpo 13, Anticuerpo 14, Anticuerpo 15, Anticuerpo 16, Anticuerpo 17, Anticuerpo 18, Anticuerpo 19, Anticuerpo 20 y Anticuerpo 21 en comparación con el control de isótipo IgG1 humano, Daclizumab-Hyp, o en ausencia de un anticuerpo primario con respecto al bloqueo de la señalización de IL-2 en un ensayo de fosforilación de STAT5 utilizando PBMC de origen humano. Las células se incubaron con 10 μ g/ml de anticuerpo seguido de 10U/ml de IL-2. El análisis se limitó al porcentaje de células positivas para CD3 que fosforilaban STAT5.

20 **Figura 71:** Caracterización funcional del Anticuerpo 19 comparado con un anticuerpo de control silencioso anti-CD25 humano Fc con respecto a la inducción de ADCC en un bioensayo reportero. Las células SR-786 que expresan CD25 se cocultivaron con células T Jurkat modificadas genéticamente para expresar Fc γ RIIIa y un elemento de respuesta NFAT que impulsa la expresión de luciferasa (NFAT-RE-luc2) en presencia de concentraciones variables de anticuerpos (como se muestra en las Figuras).

25 **Figura 72:** Caracterización funcional del Anticuerpo 19 en comparación con un anticuerpo de control silencioso anti-CD25 Fc humano con respecto a la fagocitosis de células Treg diferenciadas *in vitro* en un ensayo de ADCP. Las Tregs se cocultivaron con macrófagos diferenciados MCSF en presencia de concentraciones variables de anticuerpos (como se muestra en las Figuras). Se realizó un análisis de citometría de flujo en dos colores con macrófagos teñidos con CD14+ y Tregs etiquetados con colorante eFluor450. Las células objetivo residuales se definieron como células con colorante eFluor450+/CD14-. Se consideró que las células con doble marcaje (colorante eFluor450+/CD14+) representaban la fagocitosis de objetivos por macrófagos. La fagocitosis de las células objetivo se calculó con la siguiente ecuación: %Fagocitosis = $100 \times [(\text{porcentaje dual positivo}) / (\text{porcentaje dual positivo} + \text{porcentaje de objetivos residuales})]$.

30 **Figura 73:** Caracterización funcional del Anticuerpo 19, Anticuerpo 12 y Anticuerpo 20 en comparación con un anticuerpo de control silencioso anti-CD25 Fc humano con respecto a la fagocitosis de células Treg diferenciadas *in vitro* en un ensayo de ADCP. Las Tregs se cocultivaron con macrófagos diferenciados MCSF en presencia de concentraciones variables de anticuerpos (como se muestra en las Figuras). Se realizó un análisis de citometría de flujo en dos colores con macrófagos teñidos con CD14+ y Tregs etiquetados con colorante eFluor450. Las células objetivo residuales se definieron como células con colorante eFluor450+/CD14-. Se consideró que las células con doble marcaje (colorante eFluor450+/CD14+) representaban la fagocitosis de objetivos por macrófagos. La fagocitosis de las células objetivo se calculó con la siguiente ecuación: %Fagocitosis = $100 \times [(\text{porcentaje doble positivo}) / (\text{porcentaje doble positivo} + \text{porcentaje de objetivos residuales})]$.

35 **Figura 74:** Actividad terapéutica del anticuerpo anti-CD25 no bloqueante de IL-2, 7D4 IgG2a de ratón, en combinación con GVAX en un modelo B16BL6 resistente a la inmunoterapia. Se trató a ratones individuales con Gvax solo o en combinación con 7D4.

40 **Figura 75:** Actividad terapéutica de anticuerpos anti-CD25 no bloqueantes de IL-2 (7D4 y 2E4) en comparación con un anticuerpo bloqueante de IL-2 (PC61) en un modelo de tumor CT26 utilizando ratones BALB/c hembra. Los anticuerpos anti-CD25 no bloqueantes 7D4 y 2E4 ejercen una potente actividad terapéutica contra los tumores sólidos. Tanto 7D4 como 2E4 son más potentes que el anticuerpo bloqueante de IL-2, PC61.

45 **Figura 76:** Evaluación de la actividad terapéutica del anticuerpo anti-CD25 no bloqueante de IL-2 7D4 mlgG2a en un modelo MCA205, en inyecciones únicas y repetidas en combinación con anti-ratón PD-L1. * indica ratones vivos al final del experimento.

Ejemplos

55 **Ejemplo 1 - Caracterización y preparación *in vitro* de anticuerpos recombinantes anti-ratón CD25, depletores de Treg que son o bien no bloqueantes de IL-2 o bien bloqueantes de IL-2. Materiales y procedimientos**

Origen de los anticuerpos y su producción recombinante

- 60 La secuencia de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de la rata anti-murina CD25 PC61 se resolvieron a partir del hibridoma PC-61.5.3 (ATCC cat no. TIB-222) por amplificación rápida de los extremos del ADNc (RACE) y luego se clonaron en las regiones constantes de las cadenas IgG2a y κ murinas (o secuencias correspondientes de IgG1 de ratón que se aislaron de los plásmidos comerciales (Invivogen)).
- 65 A continuación, cada cadena de anticuerpo se subclonó en un vector retroviral derivado del virus de la leucemia murina (MLV). Para los experimentos preliminares, se produjeron anticuerpos utilizando células K562 transducidas con

vectores que codificaban tanto las cadenas pesadas como las ligeras. El anticuerpo se purificó a partir de los sobrenadantes utilizando una columna HiTrap MabSelect de proteína G (GE Healthcare), se dializó en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se concentró y se esterilizó por filtración.

- 5 La secuencia de ADN de la cadena variable pesada CD25 anti-ratón reclonada del anticuerpo PC-61.5.3 (ratón IgG2a) codifica para la siguiente secuencia proteica:

METDTLLLWVLLWVPGSTGEVQLQQSGAELVRPGTSVKLSCKVSGDTITAYYIHFVKQRPGQGLEWIG
RIDPEDDSTEYAEKFKKNKATITANTSSNTAHLKYSRLTSEDTATY FCTTDNMGATEFVYWGQGTLTVSS

- 10 La secuencia de ADN de la cadena variable ligera CD25 anti-ratón reclonada del anticuerpo PC-61.5.3 (ratón IgG2a) codifica para la siguiente secuencia proteica:

METDTLLLWVLLWVPGSTGQVVLTQPKSVSASLESTVKLSCKLNSGNIGSYYMHWYQQREGRSPTNLI
YRDDKRPDGAPDRFSGSIDISSNSAFLTINNVQTEDEAMYFCHSYDGRMYIFGGGTLTV

- 15 La secuenciación 7D4-IgM se realizó en el hibridoma 7D4 (ECACC, 88111402). Se extrajo el ARN total o el ARNm y se realizó la transcripción inversa para obtener el ADNc de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo. Las cadenas pesadas y ligeras variables se amplificaron utilizando cebadores directos degenerados que se unían en el péptido señal o en la región marco 1 y un cebador inverso que se unía en la región constante del anticuerpo. Los genes amplificados se clonaron y secuenciaron siguiendo un enfoque estándar. El ADNc se generó mediante transcripción inversa y se añadió una cola homopolimérica al extremo 3' del ADNc. A continuación, se amplificaron los genes de dominio variable de los anticuerpos utilizando cebadores específicos para cada gen, tras lo cual se aplicó un procedimiento estándar de clonación y secuenciación. El ADN se secuenció mediante secuenciación Sanger convencional y los datos se analizaron con el programa informático DNASTAR Lasergene. Las secuencias del péptido señal y del dominio variable se identificaron por comparación con secuencias conocidas de la base de datos IMGT.
- 20

- 25 Los genes que codifican los dominios variable pesado y variable ligero se optimizaron mediante codones para su expresión en una línea celular humana y se sintetizaron con los sitios de restricción NheI y Aval 5' y 3' del gen. Se realizó clonación por digestión de restricción para insertar el gen de dominio pesado variable 7D4 en vectores de expresión separados que contenían dominios constantes IgG1 e IgG2a de ratón. Se realizó una clonación por digestión de restricción para insertar el gen del dominio variable de la luz 7F4 en un vector de expresión que contenía el dominio constante kappa de ratón. Las células HEK293 en suspensión cultivadas en medios libres de suero se cotransfectaron 30 químicamente con el vector de expresión de las cadenas pesada y ligera y se cultivaron durante otros 6 días a 37°C en un entorno con un 5% de CO₂ y con agitación a 140 rpm. Los cultivos se recogieron por centrifugación a 4000 rpm y se clarificaron mediante filtración a través de un filtro de 0,22 μm. El sobrenadante se cargó en una columna de proteína A preequilibrada con PBS pH 7,2, eludida con citrato sódico pH 3,5 y equilibrada con 10% (v/v) de Tris 0,5 M pH 9,0. La solución neutralizada de anticuerpos se intercambió en tampón en PBS pH 7,2 utilizando una columna de desalinización y se concentró según fuera necesario utilizando un concentrador centrífugo con un peso molecular de corte de 30 kDa. La concentración de proteínas se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm y la pureza se determinó mediante SDS-PAGE.
- 35

- 40 La secuencia de ADN de la cadena pesada CD25 anti-ratón reclonada del anticuerpo 7D4 (IgG1 de ratón) codifica para la siguiente secuencia proteica:

EVQLQQSGAALVKPGASVKMSCKASGYSFPDSWTVVKQSHGKSLEWIGDIFPNSGATNFNEKFKGKATLTVDKSTS
TAYMELSRLTSEDSAIYYCTRLDYGYWGQGMVTVSSAKTPPSVYPLAPGSAAGTNNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVT
WNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLLSSVTVPSSWPSQTVTCNVAPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSV
FIFPPKPKDVLMISSLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPILHQDWLNGK
EFKCRVNSAAFPAPIEKTISTKGRPAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNT
QPTIMTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVHLHEGLHNHTEKSLSHSPGK

- 45 La secuencia de ADN de la cadena variable pesada CD25 anti-ratón reclonada del anticuerpo 7D4 (ratón IgG2a) codifica para la siguiente secuencia proteica:

EVQLQQSGAALVKPGASVKMSCKASGYSFPDSWVTWVKQSHGKSLEWIGDIFPNSGATNFNEKFKGKATLTVDKSTS
 TAYMELSRLTSEDSAIYYCTR LDYGYWGQGVMTVSSAKTTAPS VYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLT
 WNSGSLSSGVHTFP AVLQSDLYTLSSSVTTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDK KIEPRGPTIKPCPCKCPAPNL
 LGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSPIVTCVV DVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQ
 DWMGKKEFCKVNNKDLPAPIERTISKPGSVRAPQVYLPPEEMTKQVTL CMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTE
 LNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNVERNSYSCSVVHEGLHNHHTKSF SRTPGK

La secuencia de ADN de la cadena ligera CD25 kappa de ratón para los anticuerpos 7D4 (mlg1) y 7D4(mlg2a) (ratón IgG2a) codifica para la siguiente secuencia proteica:

5 DVVLTQTPPTLSATIGQSVSISCRSSQSLLHSNGNTYLNWLLQRPGQPPQLLIYLASRLESGVPNRFSGSGSGTDF
 10 LKISGVEAEDLGVYYCVQSSHFPNTFGVGT KLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWK
 15 IDG SERQNGVILNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKS FNRNEC

2E4 se generó a partir del hibridoma 2E4 (donación del Dr. Ethan M. Shevach, National Institute of Health). La secuenciación del hibridoma se realizó mediante tecnología propia basada en la secuenciación de próxima generación (NGS) para. Las muestras de ARN se utilizaron para generar una biblioteca de ADNc. Las bibliotecas se secuenciaron en una plataforma Illumina. Se utilizó el ensamblaje de novo para reconstruir el transcriptoma de la muestra a partir de los datos brutos. Las secuencias de dominio variable se identificaron por comparación con secuencias conocidas.

La secuencia de proteína de dominio pesado variable para el anticuerpo CD25 2E4 anti-ratón (IgG1 de ratón) tiene la siguiente secuencia de proteína:

EVQLVESGGGLVQPGRLKLS CAASGFTFSDYGM AWVRQAPTKGLEWVASITNGGLNTYYRDSVKG RFTISRDNAKC
 TLYLQMDSLRSEDTATYYCATGGFSFWGQGTLTVSS

La secuencia de proteína de dominio de luz variable para el CD25 2E4 antiratán (mlg1) tiene la siguiente secuencia de proteína:

20 DIVMTQSPTSMSISVGDRVTMNCKASQNVDSNVDWYQQKTGQSPKLLIYKASNR YTGV PDRFTGSGSGTDFFTIRN
 MQAEDLAVYYCMQSNSYPLTFGSGTKLEIK

Evaluación de la afinidad de los anticuerpos recombinantes por el CD25 de ratón

25 Las mediciones de afinidad de ForteBio se realizaron en un Octet RED384 generalmente como se ha descrito previamente (véase, por ejemplo, Estep P et al., 2013. Mabs. 5(2), 270-8). Brevemente, las mediciones de afinidad de ForteBio se realizaron cargando IgGs en línea en sensores AHQ. Los sensores se equilibraron fuera de línea en tampón de ensayo durante 30 minutos y, a continuación, se monitorizaron en línea durante 60 segundos para establecer la línea de base. Los sensores con IgGs cargadas se expusieron a 100 nM de antígeno durante 3 minutos, y después se transfirieron a tampón de ensayo durante 3 min para la medición de la tasa de desactivación. Todas las 30 cinéticas se analizaron utilizando el modelo de unión 1:1.

Resultados

35 Se han seleccionado dos hibridomas de ratón como anticuerpos de referencia para evaluar las propiedades de unión a CD25 y depleción de Treg de los anti-CD25 de ratón, que son no bloqueantes de IL-2 o bloqueantes de IL-2: 7D4 (isotipo IgM de ratón) y PC61 (isotipo IgG1 de ratón), respectivamente. Las propiedades de unión de la IL-2 descritas en la bibliografía se han confirmado de forma preliminar utilizando los anticuerpos originales no recombinantes y la IL-2 de ratón recombinante (Fig. 1A). Las variantes recombinantes de dichos anticuerpos se han producido para probar anticuerpos en los que el isotipo es más activo y relevante para los estudios funcionales (tal como para la depleción 40 de Treg o los efectos sobre otras células inmunitarias). Además, en el caso del 7D4, se requiere el cambio de isotipo, ya que las propiedades de agregación de los anticuerpos IgM pueden afectar a los resultados de los ensayos. El 7D4(mlgG1) recombinante, como el anticuerpo de isotipo IgM no recombinante original, sigue permitiendo la unión de IL-2 de ratón a CD25 de ratón (Fig. 1B). 7D4(mlgG1) también se une a CD25 de ratón en la superficie celular, de forma similar a PC61(IgG2a) recombinante, mientras que un anticuerpo CD25 anti-humano de referencia no se une (Fig. 45 1C).

5 La secuencia de ADN que codifica para el dominio variable de la cadena pesada 7D4 (así como de PC61) también se ha clonado dentro de un vector que permite expresar el dominio de unión CD25 de ratón con el isotipo IgG2a de ratón (funcionalmente correspondiente a IgG1 humano). De este modo, es posible comparar dos anticuerpos CD25 anti-ratón recombinantes con actividad ADCC optimizada que pueden agotar eficazmente las Treg intratumorales pero que presentan propiedades distintivas con respecto a la unión de IL-2 de ratón a CD25 de ratón. Se ha analizado la afinidad por CD25 de los anticuerpos CD25 anti-ratón recombinantes resultantes. El diferente isotipo (IgG2a de ratón o IgG1 de ratón) no afecta a esta propiedad, ya que la Kd es similar entre los anticuerpos recombinantes basados en 7D4 (alrededor de 1 nM) y comparable a la de PC61(mlgG2a), que se mide como 4,6 nM.

10 Las propiedades funcionales de estos anticuerpos recombinantes también se compararon en un ensayo in vitro para determinar su efecto sobre la producción de Granzima B en respuesta a la estimulación anti-CD3 y anti-CD28 (Fig.2). La Granzima B (Gnzb) es una proteinasa de serina expresada por las células T de memoria y las células NK, así como por las células T CD4 y CD8 activadas, que expresan y secretan Gnzb en gran medida durante las reacciones 15 inmunológicas. Esta enzima es un importante mediador de la muerte celular, la patología tisular y la enfermedad. La estimulación y proliferación in vitro de células T con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 (con >80% de células T CD4 que proliferan y expresan Gnzb) puede verse afectada por citoquinas y anticuerpos. Cuando esta estimulación se realiza en combinación con un anticuerpo neutralizante anti-IL-2, se inhibe la producción de Granzima B, pero no la 20 proliferación: la frecuencia de células que proliferan y producen Gnzb desciende de >80% a <1%, mientras que la frecuencia de células proliferantes sigue siendo >90%. Esto indica que la producción de Granzima B, pero no la proliferación celular, depende de la señalización de IL-2. Se observa un descenso similar en las células T productoras de Granzima B cuando se añade PC61 (mlgG1) a las células T estimuladas. Sin embargo, 7D4 (mlgG1) preserva sobre todo la capacidad de las células T CD4 de responder a la estimulación anti-CD3 y anti-CD28 produciendo Gnzb (>65% de las células siguen produciendo Gnzb y proliferando). Estos resultados confirman que los anticuerpos 25 basados en PC61 bloquean la señalización de IL-2, mientras que 7D4 tiene un efecto mínimo sobre esta señalización y, por lo tanto, puede utilizarse como anticuerpo sustituto para evaluar el potencial terapéutico de un anticuerpo anti CD25 humano, en particular con respecto a la depleción de Treg y las propiedades tumorales específicas, que no afectaría a la señalización de IL-2.

30 **EJEMPLO 2 - Propiedades depletoras de Treg y anticancerígenas de anticuerpos recombinantes anti-ratón CD25, depletores de Treg que son o no bloqueadores de IL-2 o bloqueadores de IL-2. Materiales y procedimiento**

Ratones

35 Los estudios in vivo fueron realizados por Charles River Discovery Services North Carolina (CR Discovery Services). Los ratones BALB/c hembra (BALB/c AnNcr1, Charles River) y los ratones C57BL/6 hembra (C57BL/6Ncr1, Charles River), tenían entre siete y nueve semanas de edad al inicio del estudio. CR Discovery Services cumple específicamente las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio en lo que respecta 40 a la sujeción, cría, procedimientos quirúrgicos, regulación de la alimentación y los fluidos y cuidados veterinarios. El programa de cuidado y uso de animales de CR Discovery Services está acreditado por la Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, que garantiza el cumplimiento de las normas aceptadas para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

45 **Líneas celulares y cultivo de tejidos**

50 Las células tumorales MCA205 (células de fibrosarcoma débilmente inmunógenas inducidas por 3-metilcolantreno; de G. Kroemer, Gustave Roussy Cancer Institute) se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma) suplementado con 10% de suero fetal de ternera (FCS, Sigma), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 2 mM de L-glutamina (todo de Gibco). Las células de carcinoma de colon murino MC38 (CR discovery services) se cultivaron hasta la mitad de la fase logarítmica en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) que contenía un 10% de suero bovino fetal, 2 mM de glutamina, 100 unidades/mL de penicilina G, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina y 25 µg/mL de gentamicina. Las células de carcinoma de colon murino CT26 (CR discovery services) se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía 10% de suero bovino fetal, 2 mM de glutamina, 100 unidades/mL de penicilina G sódica, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina y 25 µg/mL de gentamicina. Todas las células tumorales se cultivaron en frascos de cultivo tisular en una incubadora humidificada a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire. Las células K562 utilizadas para la producción de anticuerpos se cultivaron en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) sin rojo de fenol, suplementado con 10% de FCS sin IgG (Life Technologies).

60 **Experimentos tumorales in vivo**

65 Las células tumorales cultivadas se trapisinizaron (MCA205) o no (MC38 y CT26), se lavaron y resuspendieron en PBS y se inyectaron por vía subcutánea s.c.) en el flanco (5 × 10⁵ células para los modelos MCA205 y MC38 en ratones C57BL/6; 3 × 10⁵ 15 células para los modelos CT26 en ratones BALB/c). Los anticuerpos se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) en los momentos descritos en las leyendas de las figuras. Para los experimentos funcionales, 12 días después de la implantación del tumor se cosecharon los tumores y los ganglios linfáticos drenantes y se

procesaron para su análisis mediante citometría de flujo como se describe (Simpson et al. (2013) *J Exp Med* 210, 1695- 710). Para los experimentos terapéuticos, los tumores se midieron dos veces por semana y los volúmenes se calcularon como el producto de tres diámetros ortogonales.

5 **Citometría de flujo**

La adquisición se realizó con un BD LSR II Fortessa (BD Biosciences). Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-CD3 (clon 145-2C11, ebioscience, 25003182), anti-CD4 (clon RM4-5, BD biosciences, 560782), anti-CD8 (clon 53-6.7, Biolegend, 100750), anti-Granzima B (clon GB11, Invitrogen), anti-FoxP3 (clon FJK-16s, eBiosciences) y Ki67 (clon SolA15, eBiosciences, 48569882). Los ganglios linfáticos (inguinales, axilares y braquiales) y los tumores de los ratones se diseccionaron en RPMI sin suero. Los ganglios linfáticos se dispersaron a través de un filtro de 70 μ m, mientras que los tumores se disgregaron mecánicamente utilizando gentleMACS (Miltenyl Biotech) y se digirieron con una mezcla de 0,33 mg/ml de DNase (Sigma-Aldrich) y 0,27 mg/ml de Liberase TL (Roche) en RPMI libre de suero durante 30 min a 37C. Los tumores se filtraron a través de un filtro de 70 μ m y las suspensiones de células individuales tumorales resultantes se enriquecieron en leucocitos pasándolas a través de un gradiente de Ficoll-paque (GE Healthcare). Los tumores y el LN se lavaron en RPMI completo, se resuspendieron en tampón FACS (500 ml de PBS, 2% de FCS, 2 mM de EDTA) y se colocaron en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Se preparó una mastermix de anticuerpos de superficie a la dilución recomendada por el fabricante: anti-CD3 (clon 145-2C11, ebioscience, 25003182), anti-CD4 (clon RM4-5, BD biosciences, 560782), anti-CD8 (clon 53-6.7, Biolegend, 100750). También se incluyó en la mezcla maestra de superficie un colorante de viabilidad que se puede fijar (eFlour780, eBioscience). Tras la permeabilización durante 20 minutos con el uso de un conjunto de tampones de fijación y permeabilización intracelular (eBioscience), se aplicó un panel de tinción intracelular compuesto por los siguientes anticuerpos utilizados a la dilución recomendada por el fabricante: anti-Granzima B (clon GB11, Invitrogen), anti-FoxP3 (clon FJK-16s, eBiosciences) y Ki67 (clon SolA15, eBiosciences, 48569882).

25 ***Resultados***

El modelo murino de sarcoma MCA205 permite generar ratones en los que se puede evaluar en poco tiempo la respuesta inmunológica y la eficacia global contra un tumor sólido de un panel de compuestos inmunomoduladores. 30 En particular, se probaron los anticuerpos recombinantes anti-CD25 de ratón basados en IgG2a para evaluar los cambios en las subpoblaciones de células T que se presentan como linfocitos infiltrantes del tumor o dentro de los ganglios linfáticos periféricos, así como el crecimiento tumoral y la viabilidad de los ratones expuestos a MCA205. En el estudio se incluye otro anticuerpo (anti-ratón PD1) como control negativo de los efectos inmunológicos sobre las Treg.

35 El análisis inmunológico muestra que el anticuerpo 7D4, cuando se clona en una columna vertebral IgG2a de ratón, muestra una capacidad similar a PC61 (IgG2a de ratón) en el agotamiento de Treg y el posterior aumento de la proporción de Teff a Treg tanto en el tumor como en la periferia, mientras que anti-PD1 es ineficaz ya sea solo o en combinación (Fig. 3). Por lo tanto, cualquier efecto adicional que se mida utilizando 7D4(mlgG2a) como anticuerpo sustituto de un anticuerpo anti CD25 humano no bloqueante de IL-2 no parece estar asociado a cambios en las propiedades de depleción de Treg.

40 Los ratones modelo MCA205 que son tratados con 7D4 muestran también un mayor porcentaje de células Gnzb-positivas, tales como células T positivas para CD4 y positivas para CD8 proliferantes, con respecto no sólo al tratamiento anti-PD1 sino también al bloqueo IL-2 PC61 (mlg2a). En dichos ratones tratados, no sólo 7D4(mlg2a), al igual que PC61 (mlg2a), no afecta a las células Teff, sino que además aumenta la frecuencia de células Teff en comparación con PC61 (mlg2a), lo que sugiere una actividad antitumoral aún mayor de un anticuerpo CD25 anti-human que no bloquearía la interacción IL-2/CD25 (Fig. 4).

45 50 El uso de CD25 antihumano funcionalmente equivalente a 7D4(mlg2a) para la inmunoterapia del cáncer, en particular para tumores sólidos, puede probarse en el modelo murino MCA205, pero también en otros modelos tales como CT26 y MC38(carcinoma de colon) o B16 (melanoma). Ambos anticuerpos IgG2a, CD25 anti-ratón muestran actividad terapéutica contra tumores CT26 establecidos cuando se administran en combinación con anticuerpos anti-PD1. Curiosamente, cuando se utiliza como monoterapia, el anticuerpo no bloqueante de IL-2 7D4(mlg2a) muestra una actividad terapéutica claramente superior a la del anticuerpo basado en PC61 que tiene el mismo isótipo. Al final del experimento, todos los ratones tratados con 7D4(mlg2a) sólo muestran un control del crecimiento tumoral hasta un volumen inferior a 50mm³, mientras que ninguno de los ratones tratados con PC61 (mlg2a) muestra un tumor inferior a 50mm³, con tumores en 8 de cada 10 ratones que incluso alcanzan el punto final de 2000mm³. Esto también queda ilustrado por una diferencia en la supervivencia, ya que todos los ratones tratados con 7D4(mlg2a) seguían vivos el día 50, frente a sólo 2 de cada 10 ratones tratados con PC61(mlg2a). En efecto, si la eficacia de PC61 (mlg2a) resulta ampliamente mejorada por la combinación con anti-PD1, la eficacia de 7D4(mlg2a) no mejora aún más, al menos cuando se utiliza este anticuerpo a esta concentración.

55 60 Dado que estos anticuerpos basados en 7D4 y PC61 muestran una capacidad similar para depletar Treg (ver Fig. 3), tal diferencia en eficacia podría explicarse, al menos en parte, por el menor impacto de 7D4(mlg2a) en la interacción entre IL-2 y su receptor. Esto demuestra que no sólo la ausencia de actividad de bloqueo de los receptores IL-2/IL-2

no es perjudicial para la actividad terapéutica, sino que también podría proporcionar una ventaja terapéutica. Por lo tanto, estos datos apoyan la selección de un anticuerpo dirigido a CD25 que no bloquee los receptores IL-2/IL-2 para su uso en la terapia del cáncer. Estas propiedades ventajosas del anticuerpo 7D4(mlg2a) se confirmaron también cuando se utilizó un PD-L1 anti-ratón en el mismo modelo murino CT26 (Fig.6) o cuando se utilizó el modelo murino MC38 con las mismas combinaciones de anticuerpos (Fig. 7 y Fig. 8).

Estos datos muestran que las propiedades depletoras de Treg y de unión a CD25 de los anticuerpos basados en las propiedades de 7D4 y con el isotipo apropiado pueden explotarse en combinación con otros compuestos anticancerosos, tales como anticuerpos dirigidos contra proteínas de punto de control inmunitario (por ejemplo, contra PD-1 y anti-PD-L1) o contra otros objetivos relevantes para el cáncer. Este enfoque puede llevarse a cabo produciendo y administrando los dos productos como una mezcla novedosa de anticuerpos monoespecíficos o como anticuerpos biespecíficos novedosos. Este enfoque, que implica la construcción de anticuerpos biespecíficos que combinan las dos propiedades de unión a抗原s y el isotipo terapéuticamente relevante (por ejemplo, IgG1 humana), puede validarse utilizando la tecnología Duobody, que permite la asociación eficiente de la cadena pesada y ligera de dos anticuerpos monoespecíficos distintos que se producen por separado y contienen mutaciones puntuales coincidentes en el dominio CH3, permitiendo así el intercambio de Fab dentro de una única proteína heteromérica (Labrijn AF et al., Nat Protoc. 2014, 9:2450-63). Las propiedades funcionales de tales productos Duobody basados en 7D4 (por ejemplo, incluyendo un anti-PD1 o un anti-PD-L1) pueden evaluarse utilizando modelos de interacción y agotamiento celular que se utilizaron para validar anticuerpos basados en 7D4 y combinaciones de anticuerpos como se ha descrito anteriormente.

Estos resultados también indican que las propiedades de unión de 7D4 con respecto a CD25 de ratón, sin interferir con la interacción de IL-2 con su receptor y la señalización de IL-2 en células que expresan CD25, pueden explotarse en CD25 anti-humano en el que el isotipo se selecciona de forma coherente con este mecanismo de acción (por ejemplo, IgG1 humano). De hecho, pueden considerarse otras propiedades para seleccionar candidatos a anticuerpos CD25 anti-humano con propiedades mejoradas con respecto a su preparación, uso y/o administración para el tratamiento del cáncer y, en particular, de tumores sólidos.

Estas propiedades pueden definirse también con respecto a las características de CD25 antihumano conocido, como Humax-TAC, Basiliximab o Daclizumab, todos los cuales tienen K_D en el intervalo nanomolar para CD25 humano, pero todos bloquean la unión de IL-2 humana a CD25 humana (utilizando el clon M-A251 como CD25 anti-humano no bloqueante de IL-2 de referencia potencial que se incluirá en la selección de CD25 antihumano utilizado en la invención).

Estas características pueden ser una o más de las siguientes:

- 35 – Afinidad por CD25 humano monomérico recombinante aislado con una K_D inferior a 25nM, preferentemente inferior a 10nM y aún más preferentemente inferior a 1nM (según lo establecido mediante tecnologías tales como Octet, Kinexa, ELISA u otras);
- 40 – reactividad cruzada para el CD25 monomérico recombinante aislado de Cynomolgous con una K_D inferior a 75nM, preferentemente inferior a 30nM y aún más preferentemente inferior a 3nM (según lo establecido utilizando tecnologías tales como Octet, Kinexa, ELISA u otras);
- 45 – Afinidad por el CD25 humano recombinante monomérico en la superficie de células CHO o MJ con una K_D inferior a 100nM, preferentemente inferior a 10nM y aún más preferentemente inferior a 1nM (según lo establecido mediante tecnologías tales como citometría de flujo, ELISA celular u otras);
- 50 – Afinidad por el CD25 rhesus recombinante monomérico en la superficie de células CHO con una K_D inferior a 300nM, preferentemente inferior a 30nM y aún más preferentemente inferior a 3nM (según lo establecido mediante tecnologías tales como citometría de flujo, ELISA celular u otras);
- 55 – Células Treg humanas que se unen con una KD inferior a 100nM, preferentemente por debajo de 10nM y aún más preferentemente por debajo de 1nM (según lo establecido mediante tecnologías como citometría de flujo, ELISA celular u otras);
- 60 – Las células Treg de Cynomolgus se unen con una KD inferior a 300nM, preferentemente por debajo de 30nM y aún más preferentemente por debajo de 3nM (según lo establecido utilizando tecnologías como citometría de flujo, ELISA basado en células u otras);
- Falta de inhibición de la interacción entre IL-2 recombinante humano y CD25 recombinante humano en el ensayo bioquímico (menos del 25% de la unión de IL-2 a CD25 se bloquea en el cribado descrito en el Ejemplo 1);
- Falta de señalización inducida por IL-2 en ensayos celulares, tal como la fosforilación de STAT5 en células T activadas positivas para CD8 o positivas para CD40 en la línea celular que expresa CD25, o la regulación al alza de la Granzima B tras la activación del ensayo de células T positivas para CD4 (se inhibe menos del 25% de la señal de la línea base, como se describe en el Ejemplo 1); y/o
- Evaluación relevante de la potencia en ensayos celulares, tal como los ensayos ADCC, ADCP y/o CDC en líneas celulares que expresan CD25 humano o células Treg primarias (con una EC50 inferior a 10 nM, preferentemente inferior a 1 nM y aún más preferentemente inferior a 0,1 nM).

65 **Ejemplo 3 - Otros experimentos con modelos de ratón *in vivo* con anticuerpos CD25 anti-ratón no bloqueantes de IL2**

Materiales y procedimientos

5 *Actividad terapéutica de un anticuerpo no bloqueante de IL-2:* Se inyectaron ratones BALB/c hembra obtenidos de Charles River con 3×10^5 células tumorales CT26 en Matrigel al 0% por vía subcutánea en el flanco, n=15 por grupo. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento con base en el peso corporal del día 1. El tratamiento se inició el Día 6 y los ratones se trataron con una inyección de cada anticuerpo (isotipo IgG2a de ratón, anticuerpo neutralizante de IL-2, PC61 mlgG1, un CD25 anti-ratón que bloquea la señalización de IL-2 del isotipo IgG1 de ratón, y 7D4 mlgG2a, un CD25 anti-ratón que no bloquea la señalización de IL-2 del isotipo IgG2a de ratón) a 200 µg/animal. Los animales recibieron tratamientos de monoterapia, con un grupo por anticuerpo, o tratamientos combinados de 7D4 mlgG2a y el anticuerpo neutralizante de IL-2 o 7D4 mlgG2a y el anticuerpo PC61 mlgG1. Los ratones se sacrificaron cuando el volumen tumoral alcanzó los 2000 mm³ o a los 50 días, lo que ocurriera primero.

Actividad terapéutica de un anticuerpo no bloqueante de IL-2 en comparación con el anticuerpo bloqueante

10 Se implantaron 3×10^5 células CT26 por vía subcutánea en el flanco. Se realizó un emparejamiento en el día 0 cuando los tumores alcanzaron entre 30-60mm³ y se inició el tratamiento. En el día 1 y quincenalmente a partir de entonces, se dosificaron 10 mg/kg de tratamiento i.p. Los grupos se trataron con el anticuerpo neutralizante de IL-2 PC61-m2a, el anticuerpo no bloqueante de IL-2 7D4, el anticuerpo no bloqueante de IL-2 2E4 o no se trataron.

Actividad terapéutica de un anticuerpo no bloqueante de IL-2 en combinación con la terapia aPDL1

15 Se inyectaron ratones con 50.000 células tumorales MCA205 por vía subcutánea, n = 10 por grupo o n= 5 como se indica en las figuras. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento. Los animales recibieron tratamientos de monoterapia, de 7D4 mlgG2a o aPD-L1 (clon 10F.9G2), tratamiento combinado de 7D4 mlgG2a con aPD-L1 (clon 10F.9G2) o no se trataron. Los grupos recibieron: a7D4 mlgG2a solo - día 10 (200ug), aPD-L1 rlgG2b (10F.9G2) - días 6, 9 y 12 (200ug), aPD-L1 + a7D4 combo (aPDL-1 los días 6, 9 y 12 y a7D4 el día 10), o aPD-L1 + a7D4 combo (aPDL-1 los días 6, 9 y 12 y a7D4 el día 10), - inyección extra de a7D4 el día 15 + aPD-L1 el día 18 (sólo 5 ratones).

Resultados

20 El anticuerpo depletor anti-CD25 no bloqueador de IL-2 7D4 mlgG2a indujo el rechazo del tumor en los ratones tratados, mientras que los otros anticuerpos no mostraron ningún efecto como monoterapia en comparación con el control de isotipo IgG2a de ratón. La combinación con anticuerpos bloqueantes de IL2, ya sea PC61 mlgG1 o IL2 nAb, anula la actividad terapéutica del anticuerpo no bloqueante de IL-2 7D4 mlgG2a (Figura 13). Esto demuestra que la característica no bloqueante de IL-2 de 7D4 mlgG2a es clave para la actividad terapéutica. También sugiere que la actividad terapéutica de este anticuerpo depende de la respuesta inmunitaria antitumoral mediada por células efectoras T, que dependen de la señalización de IL-2 para una actividad óptima. Estos resultados muestran que la ausencia de actividad bloqueante de IL-2/CD25 es necesaria para una actividad terapéutica óptima del anticuerpo dirigido a CD25 y apoya el uso de un anticuerpo anti-CD25 no bloqueante de IL-2 como el descrito en el presente documento en la terapia del cáncer.

25 Estos resultados muestran además que la ausencia de actividad de bloqueo de IL-2/CD25 no es perjudicial para la actividad terapéutica de los anticuerpos y apoya el uso de un anticuerpo anti-CD25 no bloqueante de IL-2 como se describe en el presente documento en la terapia del cáncer.

30 Estos resultados mostraron además que los anticuerpos no bloqueadores de IL-2, 7D4 y 2E4 son más potentes que el anticuerpo bloqueador de IL-2, PC61. Los anticuerpos anti-CD25 no bloqueantes 7D4 y 2E4 ejercen una potente actividad terapéutica contra los tumores sólidos (Figura 75).

35 Los resultados mostraron que las inyecciones únicas o repetidas del anticuerpo aCD25 7D4 no bloqueante de IL2 tras el inicio del tratamiento con aPDL1 potencian las respuestas antitumorales. Las células Teff activadas tras el tratamiento con aPDL1 se preservan y potencian con el anticuerpo aCD25 (Figura 76).

Ejemplo 4 - Caracterización epítópica de anticuerpos anti-CD25 no bloqueantes de IL-2.**Unión de epítopos**

40 La unión de epítopos de los anticuerpos se realizó en un sistema Forte Bio Octet Red384 (Pall Forte Bio Corporation, Menlo Park, CA) utilizando un ensayo estándar de unión en formato intercalado. Se cargó anticuerpo CD25 PC61 anti-ratón en los sensores AMC y los sitios de unión Fc no ocupados en el sensor se bloquearon con un anticuerpo IgG1 de ratón no relevante. A continuación, los sensores se expusieron a 15 nM de antígeno objetivo seguido del anticuerpo 7D4. Los datos se procesaron con el software de análisis de datos 7.0 de ForteBio. La unión adicional por parte del segundo anticuerpo tras la asociación con el antígeno indica un epítopo desocupado (no competidor), mientras que la ausencia de unión indica el bloqueo del epítopo (competidor).

Mapeo de epítopos de anticuerpos anti-CD25 no bloqueantes de IL-2

5 Se sintetizaron diferentes conjuntos de péptidos lineales, de bucle único, imitadores de β -vueltas, imitadores de puentes disulfuro, puentes disulfuro discontinuos, imitadores de epítopos discontinuos que representaban la secuencia CD25 humana (registro Uniprot no. P01589) utilizando síntesis Fmoc en fase sólida (Pepscan BV, Países Bajos; Timmermann P et al., 2007 J. Mol. Recognit., 20, 283-99; Langedijk JP et al., 2011, Analytical Biochemistry, 417:149-155). La unión de los anticuerpos a cada uno de los péptidos sintetizados se comprobó en un ELISA (Pepscan, Países Bajos). Los arreglos de péptidos se incubaron con solución de anticuerpo primario (toda la noche a 4°C). Tras el lavado, los arreglos de péptidos se incubaron con una dilución 1/1000 de un conjugado de peroxidasa de anticuerpo apropiado (2010-05; Southern Biotech) durante una hora a 25°C. Tras el lavado, se añadieron el sustrato de peroxidasa 2,2'-azino-di-3-etylbenzotiazolina sulfonato (ABTS) y 20 μ l/ml de H₂O₂ al 3%. Al cabo de una hora, se midió el desarrollo del color. El desarrollo del color se cuantificó con un dispositivo de carga acoplada (CCD) - cámara y un sistema de procesamiento de imágenes. Los valores obtenidos de la cámara CCD oscilan entre 0 y 3000 mAU, similares a los de un lector ELISA estándar de placas de 96 pocillos. Los valores obtenidos de la cámara CCD oscilan entre 0 y 3000 mAU, similares a los de un lector ELISA estándar de placas de 96 pocillos. Para verificar la calidad de los péptidos sintetizados, se sintetizó en paralelo un conjunto separado de péptidos de control positivos y negativos y se analizaron con anticuerpos de control irrelevantes.

Resultados

20 Se realizó una unión de epítopos para determinar si los anticuerpos se unen a epítopos que se solapan con los del anticuerpo CD25 de ratón anti-humano no bloqueante de IL-2 disponible comercialmente, 7G7B6. Los anticuerpos se caracterizaron además para determinar los epítopos de los anticuerpos no bloqueantes de IL-2. Se determinó el epítopo del anticuerpo bloqueante anti-CD25 de ratón, PC61, para comparar un control. Los resultados del mapeo de epítopos se muestran en la Tabla 1 para los anticuerpos anti-CD25 humano y en la Tabla 2 para los anticuerpos anti-CD25 ratón:

Tabla 1 - anticuerpos anti-CD25 humanos:

Anticuerpo	Epítopo 1	Epítopo 2	Epítopo 3	Epítopo 4
7G7B6 y anticuerpos 6 a 9	¹⁵⁰ YQCVQGYRALH RGP ₁₆₃	¹⁶⁶ SVCKMTHGKTRW TQP ₁₈₀	⁴² KEGTMLNCECKR GFR ₅₆ *	⁷⁴ SSWDNQCQ CTSSATR ₈₈ *
MA251 y anticuerpos 10 a 21	¹⁵⁰ YQCVQGYRALH RGP ₁₆₃	¹⁶⁶ SVCKMTHGKTRW TQP ₁₈₀	⁴² KEGTMLNCECKR GFR ₅₆ *	⁷⁴ SSWDNQCQ CTSSATR ₈₈ *
Anticuerpo 1				⁷⁰ NSSHSSWDN QCQCTS ₈₄
Anticuerpo 2	¹⁵⁰ YQCVQGYRA ₁₅₈	¹⁷⁶ RWTQPQLICTG ₁₈₆		
Anticuerpo 3			⁴² KEGTMLNCECKR GFR ₅₆ *	
Anticuerpo 4	¹⁵⁰ YQCVQGYRALH ₁₆₀		⁴² KEGTMLNCECKR GFR ₅₆ *	

*epítopo secundario

30 La numeración de la secuencia de aminoácidos (aa) se basa en el CD25 humano tomado de la secuencia publicada con el número de acceso Uniprot P01589.

Tabla 2 - Anticuerpos CD25 anti-ratón:

Anticuerpo	Epítopo
2E4	¹⁴⁶ YECIPGYKA ₁₅₄
7D4	¹⁸⁴ REHHRFLASEE ₁₉₄
PC61	⁴⁷ LNCECKRGFRR ₅₇

La numeración de la secuencia de aminoácidos (aa) se basa en CD25 de ratón tomada de la secuencia publicada bajo el número de acceso Uniprot P01590.

40 El estudio de mapeo de epítopos que se ha realizado utilizando la tecnología Pepscan indica que los anticuerpos

5 antihumanos se unen a CD25 humano en un epítopo que no se solapa con el sitio de unión de IL-2 en CD25. Los anticuerpos antihumanos se unen a un epítopo diferente del basiliximab y el daclizumab. El epítopo para Basiliximab y Daclizumab comprende residuos en la región de aminoácidos 137-143 (de SEQ ID NO: 1), que se solapa con el lado de interacción de CD25 con IL-2 (Binder M et al, Cancer Res 2007 vol 67(8): 3518-23). Los anticuerpos no bloqueantes CD25 anti-ratón, 2E4 y 7D4, reconocen un epítopo diferente al de PC61.

Ejemplo 5: Caracterización de anticuerpos anti-CD25 de ratón

10 **Unión de anticuerpos a células CHO que expresan CD25 de ratón**

15 La unión a las células CHO que expresan CD25 se examinó tiñendo los artículos de prueba (anticuerpos primarios anti-CD25, 7D1, PC61 y 2E4) con anticuerpos de 30mg/ml seguidos de series de dilución semi-log (7-punto) durante 30 minutos en hielo. A continuación, se realizó la tinción con un anticuerpo secundario (Alexa Fluor 647-AffiniPure Fab Fragment Goat Anti-Human IgG (H+L) - (Jackson ImmunoResearch)) a una concentración de 1mg/ml durante 30 minutos en hielo. Todas las muestras se tiñeron por duplicado. Las células vivas se separaron utilizando los parámetros FSC vs SSC mediante citometría de flujo durante la adquisición de la muestra. La intensidad media de fluorescencia (IMF) de las células teñidas se representó en un gráfico XY, graficando la IMF frente al logaritmo de la concentración, y los datos se ajustaron a una curva de regresión no lineal a partir de la cual se calculó la EC50. Los resultados, como se muestra en la Figura 11, confirmaron que los anticuerpos CD25 anti-ratón se unen a las células CHO que expresan CD25 de ratón.

20 **Medidas de afinidad de anticuerpos anti-mCD25.**

25 La afinidad por los anticuerpos CD25 anti-ratón, 7D4, PC61 y 2E4, se determinó midiendo su K_D por SPR en un Biacore 2000 utilizando un chip sensor CM-5 con una temperatura ambiente de experimento de 25°C. El anticuerpo anti-ratón se inmovilizó inicialmente a través de todas las celdas de flujo en un tampón de análisis (pH 7,4, 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0,05% Tween 20) a un RU de entre 16.000-18.000 durante 10 minutos. El ligando (artículos de prueba de anticuerpos) se cargó subsecuentemente hasta un nivel de captura entre 119-163RU. A continuación, se asoció el analito (ratón recombinante CD25 etiquetado his) en tampón de análisis a partir de una dilución 2 veces mayor, comenzando en 800nM con una concentración mínima de 3,13nM durante 6 minutos. La disociación se realizó en tampón de análisis durante 10 minutos. Los pasos de regeneración entre concentraciones de muestras se realizaron en 10 mM de Glicina pH1,7 durante 10 minutos. Durante todo el procedimiento se mantuvo un caudal de 25µl/min. Los datos cinéticos se ajustaron utilizando un software de análisis de analitos bivalentes de modelo global proporcionado por Biacore con sustracción de referencia. El análisis basado en SPR se muestra en la figura 12. Los valores de K_D que se establecieron en este ensayo para los anticuerpos anti-CD25 de ratón son los siguientes: para 7D4, $2,6 \times 10^{-9}$ M; para 2E4 114×10^{-9} M, y para PC61 $3,6 \times 10^{-9}$ M(resultado no mostrado).

30 **Competencia de anticuerpos anti-ratón en el Octet**

35 Las competiciones de anticuerpos se realizaron en un sistema Forte Bio Octet Red96 (Pall Forte Bio Corp., EE. UU.) utilizando un ensayo estándar de unión intercalado. Se cargaron 10nM de anticuerpo CD25 anti-ratón en los sensores AMC durante 900s y se bloquearon los sitios de unión Fc no ocupados en el sensor con un anticuerpo IgG2a de ratón no relevante. Los sensores se expusieron a 15 nM de antígeno objetivo (ratón CD25 etiquetado his) durante 600s seguido de un segundo anticuerpo anti-CD25 (también a 10nM). Los datos se procesaron con el software de análisis de datos Forte Bio 9.0. La unión adicional de un segundo anticuerpo tras la asociación con el antígeno indica un epítopo desocupado, mientras que la ausencia de unión indica el bloqueo del epítopo.

40 La unión competitiva a mCD25 se observa entre 7D4 y 2E4 (Figura 13(A)) pero no entre 7D4 y PC61 (Figura 13(B)).

50 **Señalización in vitro de IL-2 mediante ensayo de fosforilación de STATS:**

55 Las células Pan T se aislaron a partir de esplenocitos utilizando el kit Dynabeads® FlowComp™ Mouse Pan T (CD90.2) de Invitrogen (Cat: 11465D). Se sembraron 200.000 células y se dejaron en reposo durante 2 horas a 37°C. Se añadieron anticuerpos a 50ug/ml y se incubaron con las células durante 30 minutos a 37°C, tras lo cual se estimularon las células con IL2 (50U/ml) durante 10 minutos a 37°C.

60 La fosforilación de STAT5 inducida por IL-2 se detuvo cuando las células se fijaron y permeabilizaron con el eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set (Invitrogen) y se trataron con el BD Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences). A continuación, las células se tiñeron simultáneamente con anticuerpos marcados con fluorocromos superficiales e intracelulares (STAT5-Alexa Fluor 647 clon 47/stat5/pY694 BD Bioscience, CD3-PerCP-Cy5.5 clon 17A2 Biolegend, CD4-PE clon RM4-5 Biolegend, FoxP3-AF488 clon FJK-16s Ebioscience) y las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo Fortessa LSR X20 (BD Bioscience) y se analizaron utilizando el software BD FACSDIVA. Los dobletes se excluyeron utilizando FCS-H frente a FCS-A, y los linfocitos se definieron utilizando los parámetros SSC-A frente a FCS-A. Las células T CD3⁺ se definieron utilizando un gráfico CD3 PerCP-Cy5.5-A frente a FCS-A y se trazó una puerta en un histograma que mostraba el recuento frente a STAT5 Alexa Fluor 647-A para determinar la población de células T STAT5⁺CD3⁺. El porcentaje de bloqueo de la señalización de IL-2 se calculó del

siguiente modo: % de bloqueo = $100 \times [(\% \text{ de células Stat5}^+ \text{ sin grupo Ab} - \% \text{ de células Stat5}^+ 50\mu\text{g/ml grupo Ab}) / (\% \text{ de células Stat5}^+ \text{ sin grupo Ab})]$. También se evaluó un análisis adicional de la fosforilación de STAT5 por diferentes subconjuntos de células T (CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺FoxP3-) seleccionando los subconjuntos respectivos y se analizó como se indicó anteriormente. Los gráficos y el análisis estadístico se realizaron con GraphPad Prism v7 (resultados no mostrados). Los resultados se muestran en la Figura 14.

Resultados:

Los anticuerpos anti-ratón, 7D4 y 2E4, se evaluaron adicionalmente con respecto a su capacidad de unirse a CD25 y de no interferir con la señalización de IL-2 de las células objetivo que expresan CD25. 7D4 y 2E4, no bloqueantes de IL-2, compiten por la unión a CD25, mientras que PC61 (un bloqueante de la señalización de IL-2) no compite con 2E4 o 7D4 para unirse a CD25 (Figura 12).

El ensayo STAT5 confirmó que 7D4 y 2E4 no bloquearon la señalización de IL-2, mientras que la señalización de IL-2 fue bloqueada por el anticuerpo "bloqueante" PC61 (Figura 14)

Ejemplo 6: Agotamiento *in vivo* de Treg

Se implantaron 1×10^5 células 4T1 en 200 μl de medio RPMI 1640 en el tejido de la 2^a almohadilla de grasa torácica de ratones Balb/c. Cuando los tumores alcanzaron 50-100 mm³, los ratones se asignaron al azar y se administró una única dosis plana intraperitoneal de 2 μg , 20 μg o 200 μg de anticuerpo CD25 de ratón (7D4) por ratón. A los días 3 y 9, se aislaron los tejidos tumorales y la sangre total para el inmunofenotipado.

Resultados:

El anticuerpo 7D4 mostró actividad deplectora de Treg tanto en sangre total como en tejido tumoral según el análisis por inmunofenotipado del día 3 y el día 9 tras la dosis (Figura 15).

Ejemplo 7: Caracterización del anticuerpo anti-CD25 7G76B

Unión de anticuerpos anti-CD25 a células humanas que expresan CD25:

El 7G76B se evalúa uniéndose a las líneas celulares humanas de linfoma, Karpas 299, SU-DHL-1 y SR-786 y a las células Tregs diferenciadas in vitro. La unión a las líneas celulares humanas que expresan CD25 (SU-DHL-1 y SR-786) se examinó bloqueando primero las células con Trustain (Biolegend) antes de incubarlas con anticuerpos anti-CD25 titulados en una serie de dilución semilogarítmica a partir de una concentración máxima de 20 $\mu\text{g/ml}$, durante 30 minutos a 4°C antes de lavarlas e incubarlas con anticuerpo anti-IgG humana Fc conjugado con PE (Biolegend). Las células se lavaron de nuevo y se resuspendieron en tampón FACS con DAPI y se adquirieron en el Intellicyt iQue. Las células vivas se separaron utilizando los parámetros FSC vs SSC mediante citometría de flujo durante la adquisición de la muestra. La Intensidad Geo Media de las células teñidas se trazó en un gráfico XY, graficando la Intensidad Media Geo contra el logaritmo de la concentración, y los datos se ajustaron a una curva de regresión no lineal a partir de la cual se calculó la EC50.

La unión a células Karpas 299 que expresan CD25 y Tregs diferenciadas in vitro se examinó tiñendo artículos de prueba (anticuerpos primarios anti-CD25) con anticuerpos de 30 $\mu\text{g/ml}$ seguidos de series de dilución semilogarítmica (7 puntos) durante 30 minutos en hielo. A continuación, se realizó la tinción con un anticuerpo secundario (Alexa Fluor 647-AffiniPure Fab Fragment Goat Anti-Human IgG (H+L) - (Jackson ImmunoResearch)) a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ durante 30 minutos en hielo. Todas las muestras se tiñeron por duplicado. Las células vivas se separaron utilizando los parámetros FSC vs SSC mediante citometría de flujo durante la adquisición de la muestra. La intensidad media de fluorescencia (IMF) de las células teñidas se representó en un gráfico XY, graficando la IMF frente al logaritmo de la concentración, y los datos se ajustaron a una curva de regresión no lineal a partir de la cual se calculó la EC50. Los resultados mostrados en la Figura 16 y la Figura 21, confirmaron que los anticuerpos anti-CD25 se unen a las células que expresan CD25.

Señalización *in vitro* de la IL-2 mediante el ensayo de fosforilación de STAT5:

[0207] El bloqueo de la IL-2 se caracterizó mediante un ensayo de fosforilación de STAT5, en el que se examinó la señalización de la IL-2. Las PBMC previamente congeladas (Stemcell Technologies) se cultivaron en placas de 96 pocillos de fondo U en presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpos anti-CD25 durante 30 minutos antes de añadir IL-2 (Peprotech) a concentraciones variables de 0,1U/ml, 1U/ml o 10U/ml durante 10 minutos en RPMI 1640 (Life Technologies) con un 10% de FBS (Sigma), 2mM de L-Glutamina (Life Technologies) y 10.000 U/ml de Pen-Strep (Sigma). La fosforilación de STAT5 inducida por IL-2 se detuvo cuando las células se fijaron y permeabilizaron con el eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set (Invitrogen) y se trataron con el BD Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences). A continuación, las células se tiñeron simultáneamente con anticuerpos marcados con fluorocromos superficiales e intracelulares (STAT5-Alexa Fluor 647 clon 47/stat5/pY694 BD Bioscience, CD3-PerCP-Cy5.5 clon UCHT1 Biolegend, CD4-BV510 clon SK3 BD Bioscience, CD8-Alexa Fluor 700 clon RPA-T8 Invitrogen,

CD45RA-PE-Cy7 clon HI100 Invitrogen, FoxP3-Alexa Fluor 488 clon 236A/E7 Invitrogen) y las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo Fortessa LSR X20 (BD Bioscience) y se analizaron utilizando el software BD FACSDIVA. Los dobles se excluyeron utilizando FCS-H frente a FCS-A, y los linfocitos se definieron utilizando los parámetros SSC-A frente a FCS-A. Las células T CD3⁺ se definieron utilizando un gráfico CD3 PerCP-Cy5.5-A frente a FCS-A y se trazó una puerta en un histograma que mostraba el recuento frente a STAT5 Alexa Fluor 647-A para determinar la población de células T STAT5⁺CD3⁺. El porcentaje de bloqueo de la señalización de IL-2 se calculó del siguiente modo: % de bloqueo = $100 \times [(\% \text{ células Stat5}^+ \text{ sin grupo Ab} - \% \text{ células Stat5}^+ 10\text{ug/ml grupo Ab}) / (\% \text{ células Stat5}^+ \text{ sin grupo Ab})]$. También se analizó la fosforilación de STAT5 por diferentes subconjuntos de células T (CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺FoxP3⁺, células T ingenuas y de memoria), separando los subconjuntos respectivos y analizándolos como se ha indicado anteriormente. Los gráficos y el análisis estadístico se realizaron con GraphPad Prism v7 (resultados no mostrados). Los resultados se muestran en las figuras 17 y 22.

Ensayo de activación de células T in vitro:

El impacto de la señalización de IL-2 en las respuestas de Teff se caracterizó en un ensayo de activación de células T, en el que se examinaron la proliferación y la regulación intracelular de la granzima B (GrB). Las células Pan T humanas primarias previamente congeladas (Stemcell Technologies) se marcaron con el colorante de proliferación celular eFluor450 (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante, y se añadieron a placas de 96 pocillos de fondo U a razón de 1×10^5 células/pocillo en RPMI 1640 (Life Technologies) con un 10% de FBS (Sigma), 2mM de L-Glutamina (Life Technologies) y 10.000 U/ml de Pen-Strep (Sigma). A continuación, las células se trataron con 10 µg/ml de anticuerpos anti-CD25 o anticuerpos de control, seguidos de activador T humano CD3/CD28 (proporción célula/perla 20:1; Gibco) y se incubaron durante 72 horas en un incubador humidificado a 37 °C y 5% de CO₂. Para evaluar la activación de células T, se tiñeron las células con el colorante de viabilidad que se puede fijar efluor780 de eBioscience (Invitrogen), seguido de anticuerpos marcados con fluorocromos para marcadores de células T de superficie (CD3-PerCP-Cy5.5 clon UCHT1 Biolegend, CD4-BV510 clon SK3 BD Bioscience, CD8-Alexa Fluor 700 clon RPA-T8 Invitrogen, CD45RA-PE-Cy7 clon HI100 Invitrogen, CD25-BUV737 clon 2A3 BD Bioscience) y después se fijaron y permeabilizaron con eleBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set (Invitrogen) antes de la tinción para GrB intracelular y FoxP3 intranuclear (Granzyme B-PE clon GB11 BD Bioscience, FoxP3-APC clon 236A/E7). Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo Fortessa LSR X20 (BD Bioscience) y se analizaron utilizando el software BD FACSDIVA. Los dobles se excluyeron utilizando FCS-H frente a FCS-A, y los linfocitos se definieron utilizando los parámetros SSC-A frente a FCS-A. Los subconjuntos de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ separados de los linfocitos CD3⁺ vivos se evaluaron mediante un gráfico GrB-PE-A frente a la proliferación eFluor450-A. Los resultados se presentaron como porcentaje de células proliferantes GrB positivas de toda la población de células T CD4⁺. Los gráficos y el análisis estadístico se realizaron con GraphPad Prism v7. Los resultados se muestran en la Figura 18.

Ensayo ADCC in vitro:

Se realizaron ensayos de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ensayos ADCC) para la caracterización de anticuerpos anti CD25 humanos utilizando líneas celulares humanas SU-DHL-1, o SR-786 (CD25 positivas) como células objetivo con células NK humanas como fuente de células efectoras. Las células NK se aislaron a partir de PBMC de donantes sanos utilizando el kit de aislamiento negativo de células NK (Stemcell Technologies). Las células NK se cultivaron durante la noche en presencia de y 2 ng/mL de IL-2 (Peprotech). Las células objetivo SU-DHL-1, o SR-786 se cargaron con Calcein-AM (Thermofisher) y se sembraron, 4 réplicas por condición, en presencia de anticuerpos anti-CD25 o isótipo durante 30mins a 37°C 5% de CO₂. Tras la incubación, se añadieron células NK a los pocillos en una proporción objetivo: efector (T:E) de 1:10 (10.000 células objetivo y 100.000 células efectoras) y se incubaron durante 4 horas a 37 °C y 5% de CO₂. La lectura de la fluorescencia de calceína en el sobrenadante se realizó en el lector de placas BMG Fluostar. El porcentaje de lisis específica se calculó en relación con las células objetivo solas (0% de lisis) y con las células objetivo tratadas con saponina al 0,1% (100% de lisis). Los gráficos de los datos brutos se elaboraron con Graphpad Prism v7 para generar curvas dosis-respuesta. El porcentaje de lisis de la célula objetivo se representó en un gráfico XY, graficando el porcentaje normalizado de liberación de Calceína AM frente al logaritmo de la concentración, y los datos se ajustaron a una curva de regresión no lineal a partir de la cual se calculó la EC50. Los resultados se muestran en la Figura 19.

Ensayo ADCP in vitro:

Se realizaron ensayos de fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCP) utilizando Tregs diferenciadas in vitro como células objetivo y macrófagos derivados de monocitos como células efectoras. Las PBMC se aislaron de los conos leucocitarios mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. Los monocitos (células CD14⁺) se aislaron utilizando microesferas CD14 (Miltenyi Biotec). Los monocitos se cultivaron durante 5 días en presencia de 50ng/ml de M-CSF en RPMI 1640 (Life Technologies) con un 10% de FBS (Sigma), 2mM de L-glutamina (Life Technologies) y 10.000 U/ml de Pen-Strep (Sigma), añadiéndose medio fresco con M-CSF a los 3 días. Las células T reguladoras (Treg) se aislaron utilizando el Human Treg Cell Differentiation Kit (R&D Systems). Estas células se incubaron en un incubador humidificado a 37 °C y 5% de CO₂ durante 5 días y se marcaron con colorante eFluor450 (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. En el día 5, los macrófagos y los Treg marcados con colorante eFluor450 se cocultivan durante 4 horas en una proporción de 10 a 1 de efector a objetivo en presencia de

anticuerpos anti-CD25 o controles, como se describe a continuación. Las células objetivo (Treg) se añadieron a razón de 1×10^4 células/pocillo, mientras que las células efectoras (macrófagos) se añadieron a razón de 1×10^5 células/pocillo, para una proporción efector/objetivo de 10 a 1. A continuación, se añadieron los anticuerpos anti-CD25 a una concentración máxima de 1 μ g/ml seguida de una serie logarítmica (7 puntos) por duplicado. Las células y los anticuerpos se incubaron durante 4 horas a 37°C 5% de CO₂. Para evaluar la ADCP, las células se colocaron en hielo, se tiñeron con el marcador de superficie celular CD14 (CD14-PerCP-Cy5.5 clon MfP9 BD Biosciences) y se fijaron con el tampón de fijación eBioscience. Se realizó un análisis de citometría de flujo bicolor utilizando el Fortessa LSR X20. Las células objetivo residuales se definieron como células con colorante eFluor450⁺/CD14⁻. Los macrófagos se definieron como CD14⁺. Se consideró que las células con doble marcaje (colorante eFluor450⁺/CD14⁺) representaban la fagocitosis de objetivos por macrófagos. La fagocitosis de las células objetivo se calculó con la siguiente ecuación: %Fagocitosis = 100 × [(porcentaje doble positivo)/(porcentaje doble positivo + porcentaje de objetivos residuales)]. Los resultados se muestran en la Figura 20.

Estadísticas:

Se utilizó el software Prism (GraphPad) para realizar el ajuste de curvas y determinar los valores EC50 y la actividad máxima.

Los anticuerpos humanos no bloquean la interacción IL2-CD25

La interferencia con la unión del ligando IL2 a CD25 se realizó en un sistema Forte Bio Octet Red384 (Pall Forte Bio Corp., USA) utilizando un ensayo de unión intercalado estándar. El anticuerpo MA251 se cargó en sensores AHQ y los sitios de unión Fc no ocupados en el sensor se bloquearon con un anticuerpo IgG1 humano no relevante. Los sensores se expusieron a 100nM de CD25 humana seguida de 100nM de IL-2 humana. Los datos se procesaron con el software de análisis de datos Forte Bio 7.0. La unión adicional por IL2 humana tras la asociación con el antígeno indica un epítopo desocupado (no competidor), mientras que la ausencia de unión indica el bloqueo del epítopo (competidor).

Resultados:

El anticuerpo 7G7B6, se evaluó adicionalmente con respecto a su habilidad de no interferir con la señalización de IL-2 y su capacidad de matar células objetivo que expresan CD25. En el ensayo STAT5, 7G7B6 no bloqueó la señalización de IL-2 independientemente de las concentraciones de IL-2 probadas, mientras que la señalización de IL-2 fue completamente bloqueada por el anticuerpo de referencia Daclizumab (Figura 17). Daclizumab, que ha demostrado bloquear la interacción de CD25 con IL-2 a través del denominado epítopo "Tac" (Queen C et al, 1989, PNAS. 86(24):10029-10033y Bielekova B, 2013, Neurotherapeutics, 10(1):55-67) se une a un epítopo diferente que el 7G7B6 (Figura 10 y Figura 24B), lo que puede explicar por qué Daclizumab bloquea la señalización de IL-2 y el 7G7B6 no bloquea la señalización de IL-2 en el ensayo de fosforilación de STAT5 (Figura 17). Además, Daclizumab reduce las respuestas efectoras de las células T activadas, probablemente debido a su bloqueo de la señalización de IL-2, mientras que 7G7B6, que no bloquea la señalización de IL-2, no tiene un impacto negativo en las respuestas de las células T (Figura 18). Por último, el anticuerpo químico 7G7B6 mata a las células que expresan CD25, células tumorales o células T reguladoras, mediante ADCC (Figura 19) y ADCP (Figura 20) en comparación con el anticuerpo de isótipo IgG1.

En conclusión, 7G7B6 como anticuerpo químico ha sido caracterizado y demuestra una potente eliminación de células CD25 positivas (Tregs o líneas celulares cancerosas) y no interfiere con la señalización de IL-2 y consecuentemente no inhibe las respuestas efectoras T. 7G7B6 es, por tanto, un anticuerpo depletor de Treg que podría aplicarse para el tratamiento del cáncer, como monoterapia o en combinación.

El anticuerpo MA-251 se evaluó adicionalmente con respecto a su capacidad de no interferir con la señalización de IL-2. El anticuerpo MA251 se evaluó en el ensayo de competición IL2-CD25 Octet. Se observó la unión simultánea de IL2 y MA251 a CD25 (Figura 23), lo que demuestra que el MA251 se une de forma no competitiva. En el ensayo STAT5, MA-251 no bloqueó la señalización de IL-2 independientemente de las concentraciones de IL-2 probadas, mientras que la señalización de IL-2 fue completamente bloqueada por el anticuerpo de referencia Daclizumab (Figura 22). El Daclizumab, que ha demostrado bloquear la interacción de CD25 con IL-2 a través del denominado epítopo "Tac" (Queen C et al, 1989 y Bielekova B, 2013) se une a un epítopo diferente del MA-251 (Figura 10 y Figura 24 (E)), lo que puede explicar por qué el daclizumab bloquea la señalización de IL-2 y el MA-251 no bloquea la señalización de IL-2 en el ensayo de fosforilación de STAT5 (Figura 22).

Ejemplo 8: Ensayo de competición con anticuerpos anti CD25 humano

Las competiciones de anticuerpos se realizaron en un sistema Forte Bio Octet Red96 (Pall Forte Bio Corp., USA) utilizando un ensayo de unión secuencial estándar. Se cargó CD25his humano recombinante 26,8 nM etiquetado en biosensores Ni-NTA durante 200 segundos. Tras el paso de línea base en tampón cinético, los sensores se expusieron a 66,6 nM del primer anticuerpo durante 600s o 1800s, seguido de un segundo anticuerpo anti-CD25 (también a 66,6nM durante 600s o 1800s). Los datos se procesaron con el software de análisis de datos Forte Bio 9.0. La unión

adicional de un segundo anticuerpo indica un epítopo desocupado (no hay competencia por el epítopo), mientras que la ausencia de unión indica el bloqueo del epítopo (competencia por el epítopo).

Resultados

5 Los mAbs no bloqueadores de la señal de IL-2 (Anticuerpo 1 y Anticuerpo 3) compiten entre sí o con 7G7B6 y MA251 mientras que no compiten con Daclizumab de investigación o Basiliximab de investigación (ejemplos (A) a (N), Figura 24). Los bloqueantes de la señalización de IL-2 (es decir, TSK031) compiten con el Daclizumab de investigación y el Basiliximab de investigación y no compiten con 7G7B6 (ejemplos (O) a (Q), Figura 24).

10 **Ejemplo 9: Análisis terapéutico de un anticuerpo no bloqueante**

15 En el día 0, se implantaron en el flanco derecho 1×10^7 células SU-DHL-1 en 200 μ l de RPMI 1640. En el día 12, los ratones con tumores palpables fueron asignados aleatoriamente al tratamiento con vehículo o con el anticuerpo 1 a 2mg/kg, dos veces por semana. En el día 15, los ratones con un tamaño tumoral de 100-200mm³ fueron aleatorizados y dosificados con vehículo, anticuerpo 1 a 2mg/kg, dos veces por semana o una dosis única de anticuerpo 1 a 10mg/kg.

Resultados

20 El anticuerpo 1 impidió el crecimiento en 9/10 ratones con tumores palpables dosificados a 2mg/kg, dos veces por semana (Figura 25 (A)-(B)). En ratones con un tamaño tumoral de 100-200mm³, el anticuerpo 1 también impidió el crecimiento tumoral a dosis de 2mg/kg, dos veces por semana y 10mg/kg dosis única (Figura 25 (C)-(E)).

25 **Ejemplo 10: Medidas de afinidad de anticuerpos CD25 anti-humano**

30 La afinidad por los anticuerpos CD25 anti-humano se determinó midiendo su K_D por SPR en un Biacore 2000 utilizando un chip CM-5 Sensor con una temperatura ambiente de experimento de 25°C. El anticuerpo anti-humano se inmovilizó inicialmente a través de todas las células de flujo en tampón de análisis (pH 7.4, 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% Tween 20) a un RU de entre 12,000-14,000 durante 10 minutos. El ligando (artículos de prueba de anticuerpos) se cargó subsecuentemente hasta un nivel de captura entre 145-190RU. A continuación, el analito (CD25 humano recombinante his etiquetado) se asoció en tampón de análisis a partir de una dilución 2 veces mayor, comenzando en 400nM con una concentración mínima de 3,13nM durante 6 minutos. La disociación se realizó en tampón de análisis durante 10 minutos. Los pasos de regeneración entre concentraciones de muestras se realizaron en 10 mM de Glicina pH1,7 durante 10 minutos. Durante todo el procedimiento se mantuvo un caudal de 25 μ l/min. Los datos cinéticos se ajustaron utilizando un software de análisis de cambio conformacional de reacción global de dos estados proporcionado por Biacore con sustracción de referencia para la Figura 26 (C) y la Figura 26(D). Se utilizó un modelo Langmuir 1:1 con sustracción de referencia para la Figura 26 (A), Figura 26 (B) y Figura 26 (E).

35 Las mediciones de afinidad de ForteBio se realizaron en un Octet RED384 generalmente como se ha descrito previamente (véase, por ejemplo, Estep P et al., 2013. Mabs. 5(2), 270-8).

40 Alternativamente, la afinidad por los anticuerpos anti CD25 humanos se determinó midiendo su K_D por interferometría de bicapa en el sistema Octet Red 96 (Pall Forte Bio Corp., USA). Los sensores se equilibraron fuera de línea en tampón cinético durante 10 minutos y, a continuación, se controlaron en línea durante 60 segundos para establecer la línea de base. 13.32nM de anticuerpo se cargó en el biosensor AHC durante 200s seguido de concentraciones variables del rhCD25his etiquetado (1: 3 diluciones seriadas, de 50nM a 0,54nM) durante 600s y dejar que se disocien en tampón cinético durante 400s. Los datos cinéticos se ajustaron utilizando un software de análisis global 1:1 proporcionado por Pall Forte Bio con sustracción de referencia. Los resultados se muestran en la Figura 26 (F).

45 **50 Resultados:**

55 Los resultados se muestran en la Figura 26. Los valores K_D que se establecieron en este ensayo para los anticuerpos anti-CD25 son los siguientes: para el Anticuerpo 1, $3,2 \times 10^{-9}$ M; para el Anticuerpo 3, $3,8 \times 10^{-9}$ M, y para el Daclizumab $0,61 \times 10^{-9}$ M.

60 **55 Ejemplo 11: Caracterización de los anticuerpos anti-CD25 - Anticuerpo 1 a, Anticuerpo 21**

65 **Unión de anticuerpos anti-CD25 a células que expresan CD25:**

Los candidatos hits se evalúan uniéndose a líneas celulares humanas de linfoma tal como las células Karpas 299, SU-DHL-1 y SR-786, células Tregs diferenciadas in vitro, PBMC humanas o cuyo activadas, la línea celular T de mono Cynomolgus HSC-F y células CHO.

70 La unión a las líneas celulares humanas que expresan CD25 (SU-DHL-1 y SR-786) se examinó bloqueando primero las células con Trustain (Biolegend) antes de la incubación con anticuerpos anti-CD25 titulados en una serie de dilución semilogarítmica a partir de una concentración máxima de 20 μ g/ml, durante 30 minutos a 4°C antes de lavarlas e incubarlas con anticuerpo IgG Fc antihumano conjugado con PE (Biolegend). Las células se lavaron de nuevo y se

resuspendieron en tampón FACS con DAPI y se adquirieron en el Intellicyt iQue. Las células vivas se separaron utilizando los parámetros FSC vs SSC mediante citometría de flujo durante la adquisición de la muestra. La Intensidad Geo Media de las células teñidas se trazó en un gráfico XY, graficando la Intensidad Media Geo contra el logaritmo de la concentración, y los datos se ajustaron a una curva de regresión no lineal a partir de la cual se calculó la EC50.

- 5 La unión a células Karpas 299 que expresan CD25 y Tregs diferenciadas in vitro se examinó tiñendo artículos de prueba (anticuerpos primarios anti-CD25) con anticuerpos de 30mg/ml seguidos de series de dilución semilogarítmica (7 puntos) durante 30 minutos en hielo. A continuación, se realizó la tinción con un anticuerpo secundario (Alexa Fluor 647-AffiniPure Fab Fragment Goat Anti-Human IgG (H+L) o Alexa Fluor 647-AffiniPure F(ab')2 Fragment Rabbit Anti-Human IgG Fcγ Fragment - (Jackson ImmunoResearch)) a una concentración de 1 mg/ml durante 30 minutos en hielo. Todas las muestras se tiñeron por duplicado. Las células vivas se separaron utilizando los parámetros FSC vs SSC mediante citometría de flujo durante la adquisición de la muestra. La intensidad media de fluorescencia (IMF) de las células teñidas se representó en un gráfico XY, graficando la IMF frente al logaritmo de la concentración, y los datos se ajustaron a una curva de regresión no lineal a partir de la cual se calculó la EC50.
- 10 15 La unión a PMBC humanos y de mono Cynomolgus activados que expresan CD25 se examinó tiñendo los artículos de prueba (anticuerpos primarios anti-CD25) con anticuerpos de 20mg/ml seguidos de series de dilución semilogarítmica (7 puntos) durante 30 minutos en hielo. A continuación, se realizó la tinción con un anticuerpo secundario (conejo anti Fcγ humano F(ab')2- (Jackson ImmunoResearch)) a una concentración de 5mg/ml durante 30 minutos en hielo. Todas las muestras se tiñeron por triplicado. Para minimizar la muerte celular inducida por la reticulación mediada por la unión del anticuerpo secundario, las líneas celulares se examinaron en cohortes de tinción de 4 artículos de prueba a la vez. Los linfocitos vivos se separaron mediante citometría de flujo utilizando los parámetros FSC frente a SSC durante la adquisición de la muestra. La intensidad media de fluorescencia (IMF) de los subconjuntos de células T CD4⁺ y CD8⁺ se representó en un gráfico XY, graficando la IMF frente al logaritmo de la concentración, y los datos se ajustaron a una curva de regresión no lineal a partir de la cual se calculó la EC50.
- 20 25 30 35 La unión a la línea de células T de mono Cynomolgus HSC-F que expresa CD25 se examinó tiñendo los artículos de prueba (anticuerpos primarios anti-CD25) con anticuerpos de 20mg/ml seguidos de series de dilución semilogarítmica (7 puntos) durante 30 minutos en hielo. A continuación, se realizó la tinción con un anticuerpo secundario (conejo anti Fcγ humano F(ab')2- (Jackson ImmunoResearch)) a una concentración de 5mg/ml durante 30 minutos en hielo. Todas las muestras se tiñeron por triplicado. Para minimizar la muerte celular inducida por la reticulación mediada por la unión del anticuerpo secundario, las líneas celulares se examinaron en cohortes de tinción de 4 artículos de prueba a la vez. Los linfocitos vivos se separaron mediante citometría de flujo utilizando los parámetros FSC frente a SSC durante la adquisición de la muestra. La intensidad media de fluorescencia (IMF) en células vivas se representó en un gráfico XY, graficando la IMF frente al logaritmo de la concentración, y los datos se ajustaron a una curva de regresión no lineal a partir de la cual se calculó la EC50.

40 También se examinó la unión a células CHO que expresan CD25. Se lavaron aproximadamente 100.000 células que sobreexpresaban el antígeno con tampón de lavado y se incubaron con 100 µl de IgG 100 nM durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron dos veces con tampón de lavado y se incubaron con 100 µl de 1:100 Human-PE durante 15 minutos en hielo. A continuación, las células se lavaron dos veces con tampón de lavado y se analizaron en un analizador FACS Canto II (BD Biosciences.) También se utilizó una línea celular CHO no modificada como control negativo

45 **Señalización in vitro de la IL-2 mediante el ensayo de fosforilación STAT5:**

50 El bloqueo de la IL-2 se caracterizó mediante un ensayo de fosforilación de STAT5, en el que se examinó la señalización de la IL-2. Las PBMC previamente congeladas (Stemcell Technologies) se cultivaron en placas de 96 pocillos de fondo U en presencia de 10 µg/ml de anticuerpos anti-CD25 durante 30 minutos antes de añadir IL-2 (Peprotech) a concentraciones variables de 10U/ml o 0.25U/ml, 0,74U/ml, 2,22U/ml, 6,66U/ml o 20U/ml durante 10 minutos en RPMI 1640 (Life Technologies) con un 10% de FBS (Sigma), 2mM de L-Glutamina (Life Technologies) y 10.000 U/ml de Pen-Strep (Sigma). La fosforilación de STAT5 inducida por IL-2 se detuvo cuando las células se fijaron y permeabilizaron con el eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set (Invitrogen) y se trataron con el BD Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences). A continuación, las células se tiñeron simultáneamente con anticuerpos marcados con fluorocromos superficiales e intracelulares (STAT5-Alexa Fluor 647 clon 47/stat5/pY694 BD Bioscience, CD3-PerCP-Cy5.5 clon UCHT1 Biolegend, CD4-BV510 clon SK3 BD Bioscience, CD8-Alexa Fluor 700 clon RPA-T8 Invitrogen, CD45RA-PE-Cy7 clon HI100 Invitrogen, FoxP3-Alexa Fluor 488 clon 236A/E7 Invitrogen) y las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo Fortessa LSR X20 (BD Bioscience) y se analizaron utilizando el software BD FACSDIVA. Los dobletes se excluyeron utilizando FCS-H frente a FCS-A, y los linfocitos se definieron utilizando los parámetros SSC-A frente a FCS-A. Las células T CD3+ se definieron utilizando un gráfico CD3 PerCP-Cy5.5-A frente a FCS-A y se trazó una puerta en un histograma que mostraba el recuento frente a STAT5 Alexa Fluor 647-A para determinar la población de células T STAT5+CD3+. El porcentaje de bloqueo de la señalización de IL-2 se calculó del siguiente modo: % de bloqueo = 100 × [(% de células Stat5+ sin grupo Ab - % de células Stat5+ 10ug/ml grupo Ab) / (% de células Stat5+ sin grupo Ab)]. También se analizó la fosforilación de STAT5 por diferentes subconjuntos de células T (CD4+, CD8+, CD4+FoxP3+, células T ingenuas y de memoria), separando los

subconjuntos respectivos y analizándolos como se ha indicado anteriormente. Los gráficos y el análisis estadístico se realizaron con GraphPad Prism v7.

5 Ensayo de activación de células T in vitro:

El impacto de la señalización de IL-2 en las respuestas de Teff se caracterizó en un ensayo de activación de células T, en el que se examinaron la proliferación y la regulación intracelular de la granzima B (GrB). Las células Pan T humanas primarias previamente congeladas (Stemcell Technologies) se marcaron con el colorante de proliferación celular eFluor450 (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante, y se añadieron a placas de 96 pocillos de fondo U a razón de 1×10^5 células/pocillo en RPMI 1640 (Life Technologies) con un 10% de FBS (Sigma), 2mM de L-Glutamina (Life Technologies) y 10.000 U/ml de Pen-Strep (Sigma). A continuación, las células se trataron con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpos anti-CD25 o anticuerpos de control, seguidos de activador T humano CD3/CD28 (proporción célula/perla 20:1; Gibco) y se incubaron durante 72 horas en un incubador humidificado a 37 °C y 5% de CO₂. Para evaluar la activación de células T, se tiñeron las células con el colorante de viabilidad que se puede fijar efluor780 de eBioscience (Invitrogen), seguido de anticuerpos marcados con fluorocromos para marcadores de células T de superficie (CD3-PerCP-Cy5.5 clon UCHT1 Biolegend, CD4-BV510 clon SK3 BD Bioscience, CD8-Alexa Fluor 700 clon RPA-T8 Invitrogen, CD45RA-PE-Cy7 clon HI100 Invitrogen, CD25-BUV737 clon 2A3 BD Bioscience) y después se fijaron y permeabilizaron con eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set (Invitrogen) antes de la tinción para GrB intracelular y FoxP3 intranuclear (Granzyme B-PE clon GB11 BD Bioscience, FoxP3-APC clon 236A/E7). Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo Fortessa LSR X20 (BD Bioscience) y se analizaron utilizando el software BD FACSDIVA. Los dobletes se excluyeron utilizando FCS-H frente a FCS-A, y los linfocitos se definieron utilizando los parámetros SSC-A frente a FCS-A. Los subconjuntos de linfocitos T CD4+ y CD8+ separados de los linfocitos CD3+ vivos se evaluaron mediante un gráfico GrB-PE-A frente a la proliferación eFluor450-A. Los resultados se presentaron como porcentaje de células GrB positivas proliferantes de la totalidad de las poblaciones de células T CD4+ o CD8+. Los gráficos y el análisis estadístico se realizaron con GraphPad Prism v7.

6 Ensayo ADCC in vitro:

Se realizaron ensayos de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ensayos ADCC) para la caracterización de anticuerpos anti CD25 humanos utilizando líneas celulares humanas SU-DHL-1, o SR-786 (CD25 positivas) como células objetivo con células NK humanas como fuente de células efectoras. Las células NK se aislaron a partir de PBMC de donantes sanos utilizando el kit de aislamiento negativo de células NK (Stemcell Technologies). Las células NK se cultivaron durante la noche en presencia de y 2 ng/mL de IL-2 (Peprotech). Las células objetivo SU-DHL-1, o SR-786 se cargaron con Calcein-AM (Thermofisher) y se sembraron, 4 réplicas por condición, en presencia de anticuerpos anti-CD25 o isótipo durante 30mins a 37°C 5% de CO₂. Tras la incubación, se añadieron células NK a los pocillos en una proporción objetivo: efector (T:E) de 1:10 (10.000 células objetivo y 100.000 células efectoras) y se incubaron durante 4 horas a 37 °C y 5% de CO₂. La lectura de la fluorescencia de calceína en el sobrenadante se realizó en el lector de placas BMG Fluostar. El porcentaje de lisis específica se calculó en relación con las células objetivo solas (0% de lisis) y con las células objetivo tratadas con saponina al 0,1% (100% de lisis). Los gráficos de los datos brutos se elaboraron con Graphpad Prism v7 para generar curvas dosis-respuesta. El porcentaje de lisis de la célula objetivo se representó en un gráfico XY, graficando el porcentaje normalizado de liberación de Calceína AM frente al logaritmo de la concentración, y los datos se ajustaron a una curva de regresión no lineal a partir de la cual se calculó la EC50.

45 La ADDC también se determinó en un ensayo de sistema reportero de luciferasa. Las células SR786 que expresan CD25, denominadas en este documento células objetivo (T), se incuban durante 20 minutos a 37°C con diferentes concentraciones de mAbs contra CD25 (o IgG de control) en un medio suplementado con FBS bajo en IgG (4% FBS en RPMI). A continuación, se añaden células efectoras ADCC (E) a la mezcla de células y Abs en una proporción E:T de 1:1. Las células efectoras son células Jurkat transfectadas de forma estable con un sistema reportero de luciferasa y que sobreexpresan CD16/FcgammaRIIIA (Promega). Tras una incubación de una noche a 37°C, las células se lisan y la actividad de la luciferasa se mide por la media de la liberación de luminiscencia a partir de la hidrólisis de un sustrato de luciferasa específico, siguiendo las instrucciones del fabricante (protocolo Bio-Glow de Promega).

55 Ensayo ADCP in vitro utilizando macrófagos diferenciados in vitro y células Treg:

Se realizaron ensayos de fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCP) utilizando Tregs diferenciadas in vitro como células objetivo y macrófagos derivados de monocitos como células efectoras. Las PBMC se aislaron de los conos leucocitarios mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. Los monocitos (células CD14+) se aislaron utilizando microesferas CD14 (Miltenyi Biotec). Los monocitos se cultivaron durante 5 días en presencia de 50ng/ml de M-CSF en RPMI 1640 (Life Technologies) con un 10% de FBS (Sigma), 2mM de L-glutamina (Life Technologies) y 10.000 U/ml de Pen-Strep (Sigma), añadiéndose medio fresco con M-CSF a los 3 días. Las células T reguladoras (Treg) se aislaron utilizando el Human Treg Cell Differentiation Kit (R&D Systems). Estas células se incubaron en un incubador humidificado a 37 °C y 5% de CO₂ durante 5 días y se marcaron con colorante eFluor450 (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. En el día 5, los macrófagos y los Treg marcados con colorante eFluor450 se cocultivan durante 4 horas en una proporción de 10 a 1 de efector a objetivo en presencia de anticuerpos anti-CD25 o controles, como se describe a continuación. Las células objetivo (Treg) se añadieron a razón

de 1×10^4 células/pocillo, mientras que las células efectoras (macrófagos) se añadieron a razón de 1×10^5 células/pocillo, para una proporción efector/objetivo de 10 a 1. A continuación, se añadieron los anticuerpos anti-CD25 a una concentración máxima de 1 μ g/ml seguida de una serie logarítmica (7 puntos) por duplicado. Las células y los anticuerpos se incubaron durante 4 horas a 37°C 5% de CO₂. Para evaluar la ADCP, las células se colocaron en hielo, se tiñeron con el marcador de superficie celular CD14 (CD14-PerCP-Cy5.5 clon MfP9 BD Biosciences) y se fijaron con el tampón de fijación eBioscience. Se realizó un análisis de citometría de flujo bicolor utilizando el Fortessa LSR X20. Las células objetivo residuales se definieron como células con colorante eFluor450+/CD14-. Los macrófagos se definieron como CD14+. Se consideró que las células con doble marcaje (colorante eFluor450+/CD14+) representaban la fagocitosis de objetivos por macrófagos. La fagocitosis de las células objetivo se calculó con la siguiente ecuación: %Fagocitosis = 100 × [(porcentaje doble positivo)/(porcentaje doble positivo + porcentaje de objetivos residuales)].

Ensayo ADCP in vitro utilizando el ensayo FcyRIIa-H Reportero

Las células efectoras del bioensayo ADCP (FcyRIIa-H) se obtuvieron de Promega (Cat# G9881/5; Lot# 0000261099). Se sembraron 5.000 células/pocillo de células objetivo SUDHL-1 (25 μ l/pocillo) utilizando una placa de poliestireno blanco de 96 pocillos (Costar; Cat# 3917). Los anticuerpos de prueba se diluyeron en serie utilizando diluciones de 3 veces y se añadieron 25 μ l a las células. Se añadieron 50.000 células efectoras por pocillo en un volumen de 25 μ l para obtener una proporción 10:1 de células efectoras y objetivo. Todas las células objetivo, los anticuerpos y las células efectoras se sembraron utilizando medios de cultivo celular. La placa se incubó durante 18 horas a 37°C. A continuación, se sacaron las placas de la incubadora y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se agregaron 60 μ l de tampón de sustrato del ensayo Bio-Glo Luciferase a cada pocillo, seguido de 30 minutos de incubación y se midió la luminiscencia utilizando el sistema de detección múltiple GloMax (Promega).

25 *Estadísticas:*

Se utilizó el software Prism (GraphPad) para realizar el ajuste de curvas y determinar los valores EC50 y la actividad máxima.

30 Resultados

El Anticuerpo 1, se evaluó con respecto a su capacidad de no interferir con la señalización de IL-2 y su capacidad de matar células objetivo que expresan CD25. Los resultados de la unión a rhCD25, y el análisis de unión competitiva a IL-2 se muestran en las Figuras 27 y 28. El ensayo de unión a ligando, utilizando el Octet mostró que el anticuerpo 1 no afecta a la unión de IL-2 a CD25 (Figura 29). Esto se confirmó en el ensayo STAT5, en el que el anticuerpo 1 no bloqueó la señalización de IL-2 independientemente de las concentraciones de IL-2 ensayadas, mientras que la señalización de IL-2 fue completamente bloqueada por el anticuerpo de referencia Daclizumab (Figura 31). El Daclizumab, que ha demostrado bloquear la interacción de CD25 con IL-2 a través del denominado epítopo "Tac" (Queen C et al, 1989 y Bielekova B, 2013) se une a un epítopo diferente al del anticuerpo 1 (figura 30), lo que puede explicar por qué el daclizumab bloquea la señalización de IL-2 y el anticuerpo 1 no bloquea la señalización de IL-2 en el ensayo de fosforilación de STAT5 (Figura 31). Además, Daclizumab reduce las respuestas efectoras de las células T activadas, probablemente debido a su bloqueo de la señalización de IL-2, mientras que el anticuerpo 1, que no bloquea la señalización de IL-2, no tiene un impacto negativo en las respuestas de las células T (Figura 32). Por último, el Anticuerpo 1 mata a las células que expresan CD25, células tumorales o células T reguladoras, mediante ADCC (Figura 33) y ADCP (Figura 34) en comparación con el anticuerpo de isótipo IgG1.

En conclusión, el Anticuerpo 1 ha sido caracterizado y demuestra una potente destrucción de células CD25 positivas (Tregs o líneas celulares de cáncer) y no interfiere con la señalización de IL-2 y consecuentemente no inhibe las respuestas T efectoras. El Anticuerpo 1 es, por tanto, un anticuerpo depletor de Treg que podría aplicarse para el tratamiento del cáncer, como monoterapia o en combinación.

El Anticuerpo 3 se evaluó con respecto a su capacidad para no interferir con la señalización de IL-2 y su capacidad para matar células objetivo que expresan CD25. Los resultados de la unión a rhCD25, y el análisis de unión competitiva a IL-2 se muestran en las Figuras 35 y 36. El ensayo de unión a ligando, utilizando el Octet mostró que el anticuerpo 3 no afecta a la unión de IL-2 a CD25 (Figura 37). Esto se confirmó en el ensayo STAT5, en el que el anticuerpo 3 no bloqueó la señalización de IL-2 independientemente de las concentraciones de IL-2 ensayadas, mientras que la señalización de IL-2 fue completamente bloqueada por el anticuerpo de referencia Daclizumab (Figura 39). El Daclizumab, que ha demostrado bloquear la interacción de CD25 con IL-2 a través del denominado epítopo "Tac", se une a un epítopo diferente del anticuerpo 3 (Figura 38), lo que puede explicar por qué el Daclizumab bloquea la señalización de IL-2 y el anticuerpo 3 no bloquea la señalización de IL-2 en el ensayo de fosforilación de STAT5 (Figura 39). Además, Daclizumab reduce las respuestas efectoras de las células T activadas, probablemente debido a su bloqueo de la señalización de IL-2, mientras que el Anticuerpo 3, que no bloquea la señalización de IL-2, sólo tiene un impacto mínimo, si es que tiene alguno, en las respuestas de las células T cuando se compara con la condición sin anticuerpo o con el control de isótipo (Figura 40). Por último, el Anticuerpo 3 mata a las células que expresan CD25, células tumorales o células T reguladoras, mediante ADCC (Figura 41) y ADCP (Figura 42) en comparación con el anticuerpo de isótipo IgG1.

En conclusión, el Anticuerpo 3 ha sido caracterizado y demuestra una potente destrucción de células CD25 positivas (Tregs o líneas celulares de cáncer) y no interfiere con la señalización de IL-2 y consecuentemente no inhibe las respuestas T efectoras. El Anticuerpo 3 es, por tanto, un anticuerpo depletor de Treg que podría aplicarse para el tratamiento del cáncer, como monoterapia o en combinación.

El Anticuerpo 4, se evaluó con respecto a su capacidad de no interferir con la señalización de IL-2 y su capacidad de matar células objetivo que expresan CD25. Los resultados de la unión a rhCD25, y el análisis de unión competitiva a IL-2 se muestran en las Figuras 43 y 44. El ensayo de unión a ligando, utilizando el Octet mostró que el anticuerpo 4 no afecta a la unión de IL-2 a CD25 (Figura 45). Esto se confirmó en el ensayo STAT5, en el que el anticuerpo 4 no bloqueó la señalización de IL-2 independientemente de las concentraciones de IL-2 ensayadas, mientras que la señalización de IL-2 fue completamente bloqueada por el anticuerpo de referencia Daclizumab (Figura 47). El Daclizumab, que ha demostrado bloquear la interacción de CD25 con IL-2 a través del denominado epítopo "Tac", se une a un epítopo diferente del anticuerpo 4 (Figura 46), lo que puede explicar por qué el Daclizumab bloquea la señalización de IL-2 y el anticuerpo 4 no bloquea la señalización de IL-2 en el ensayo de fosforilación de STAT5 (Figura 47). Además, Daclizumab reduce las respuestas efectoras de las células T activadas, probablemente debido a su bloqueo de la señalización de IL-2, mientras que el anticuerpo 4, que no bloquea la señalización de IL-2, no tiene un impacto negativo en las respuestas de las células T (Figura 48). Por último, el Anticuerpo 4 mata a las células que expresan CD25, células tumorales o células T reguladoras, mediante ADCC (Figura 49) y ADCP (Figura 50) en comparación con el anticuerpo de isotipo IgG1.

En conclusión, el Anticuerpo 4 ha sido caracterizado y demuestra una potente eliminación de células positivas para CD25 (Tregs o líneas celulares de cáncer) y no interfiere con la señalización de IL-2 y consecuentemente no inhibe las respuestas efectoras T. El Anticuerpo 4 es, por tanto, un anticuerpo depletor de Treg que podría aplicarse para el tratamiento del cáncer, como monoterapia o en combinación.

El Anticuerpo 2 se evaluó con respecto a su capacidad de no interferir con la señalización de IL-2 y su capacidad de matar células objetivo que expresan CD25. Los resultados de la unión a rhCD25, y el análisis de unión competitiva a IL-2 se muestran en las Figuras 51 y 52. El ensayo de unión a ligando, utilizando el Octet mostró que el anticuerpo 2 no afecta a la unión de IL-2 a CD25 (Figura 53). Esto se confirmó en el ensayo STAT5, en el que el anticuerpo 2 no bloqueó la señalización de IL-2 independientemente de las concentraciones de IL-2 ensayadas, mientras que la señalización de IL-2 fue completamente bloqueada por el anticuerpo de referencia Daclizumab (Figura 55). El Daclizumab, que ha demostrado bloquear la interacción de CD25 con IL-2 a través del denominado epítopo "Tac", se une a un epítopo diferente del anticuerpo 2 (Figura 54), lo que puede explicar por qué el Daclizumab bloquea la señalización de IL-2 y el anticuerpo 2 no bloquea la señalización de IL-2 en el ensayo de fosforilación de STAT5 (Figura 55). Por último, el Anticuerpo 2 mata a las células que expresan CD25, células tumorales o células T reguladoras, mediante ADCC (Figura 56) y ADCP (Figura 57) en comparación con el anticuerpo de isotipo IgG1.

En conclusión, el Anticuerpo 2 ha sido caracterizado y demuestra una potente matanza de células positivas para CD25 (Tregs o líneas celulares de cáncer) y no interfiere con la señalización de IL-2 y consecuentemente no inhibe las respuestas T efectoras. El Anticuerpo 2 es, por tanto, un anticuerpo depletor de Treg que podría aplicarse para el tratamiento del cáncer, como monoterapia o en combinación.

El Anticuerpo 5 se caracteriza por comprender una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de:

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTLDSYGVWVRQAPGKGLEWVGVTSSGGSAYYADSVKGRFTISRDNSKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRYVYTGGYLYHYGMDLWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:10)

y una cadena ligera variable que comprende la secuencia:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISDYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASTLPFGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
LQPEDVATYYCQGTYDSSDWYWAFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:14).

[0246] Las secuencias de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3), como se ha indicado anteriormente, y las regiones marco (FR) se definieron según el esquema de numeración de Kabat.

[0247] El Anticuerpo 5 se evaluó con respecto a su capacidad de no interferir con la señalización de IL-2 y su capacidad de matar células objetivo que expresan CD25. Los resultados de la unión a rhCD25, se muestran en las Figuras 58.

El ensayo STAT5 mostró que el Anticuerpo 5 no bloqueó la señalización de IL-2 ensayada, mientras que la señalización de IL-2 fue completamente bloqueada por el anticuerpo Daclizumab (Figura 59). El ensayo de competencia mostró que el Anticuerpo 5 no compite con los bloqueantes de la señal IL-2 Daclizumab o Basiliximab Figura 60 (A) y (B) mientras que sí compite con 7G7B6 (no bloqueante IL-2) (Figura 60(C)). Por último, el Anticuerpo 5 mata las células que expresan CD25, células tumorales o células T reguladoras, mediante ADCC (Figura 61) y ADCP (Figura 61) en comparación con un anticuerpo de control silencioso CD25 Fc anti-humano.

En conclusión, el Anticuerpo 5 ha sido caracterizado y demuestra una potente matanza de células CD25 positivas (Tregs o líneas celulares de cáncer) y no interfiere con la señalización de IL-2 y consecuentemente no inhibe las respuestas T efectoras. El Anticuerpo 5 es, por tanto, un anticuerpo depletor de Treg que podría aplicarse para el tratamiento del cáncer, como monoterapia o en combinación.

Los anticuerpos Anticuerpo 6, Anticuerpo 7, Anticuerpo 8 y Anticuerpo 9 se caracterizan por comprender las siguientes secuencias:

El Anticuerpo 6 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de:

EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEVSTINGYGDTTYYPDSVKGRFTISRDNSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRDYGNSYYALDYWQGTLTVSS (SEQ ID NO:23)

y una cadena ligera variable que comprende la secuencia:

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASSSVFMHWLQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPDRFSGSGGTDYTLTISRL
EPEDFAVYYCQQWSSNPPAFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:25).

El Anticuerpo 7 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de:

EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEVSTINGYGDTTYYPDSVKGRFTISRDNSKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRDYGNSYYALDYWQGTLTVSS (SEQ ID NO:23)

y una cadena ligera variable que comprende la secuencia:

QIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASSSVFMHWLQQKPGQSPRPLIYATSNLASGIPDRFSGSGGTDYTLTISRL
EPEDFAVYYCQQWSSNPPAFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:26).

El Anticuerpo 8 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de:

EVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEVSTINGYGDTTYYPDSVKGRFTISRDNAKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDRDYGNSYYALDYWQGTLTVSS (SEQ ID NO: 24)

y una cadena ligera variable que comprende la secuencia:

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASSSVFMHWLQQKPGQAPRLIYATSNLASGIPDRFSGSGGTDYTLTISRL
EPEDFAVYYCQQWSSNPPAFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:25).

El Anticuerpo 9 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de:

EVQLLESGGLVQPGGLRLSCAASGFTFSSYGMSWRQAPGKGLELVSTINGDTTYYPDSVKGRFTISRDNAKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDRDYGNSYALDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 24)

y una cadena ligera variable que comprende la secuencia:

5 QIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASSSVSFMHWLQQKPGQSPRPLIYATSNLASGIPDRFSGSGSDYTLTISRL
EPEDFAVYYCQWSSNPPAFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:26).

Las secuencias de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3), como se ha indicado anteriormente, y las regiones marco (FR) se definieron según el esquema de numeración de Kabat.

10 Los resultados del mapeo de epítopos indicaron que el Anticuerpo 6, el Anticuerpo 7, el Anticuerpo 8 y el Anticuerpo 9 se unen a CD25 humano en la región comprendida entre los aminoácidos 150 a 163 (YQCVQGYRALHRGP) y los aminoácidos 166 a 180 (SVCKMTHGKTRWTQP) de SEQ ID NO: 1, y se une a secuencias de proteína extracelular CD25 humana con un valor Kd en el intervalo de 10^{-8} M a 10^{-10} M.

15 El Anticuerpo 6, el Anticuerpo 7, el Anticuerpo 8 y el Anticuerpo 9 se evaluaron con respecto a su capacidad para no interferir con la señalización de IL-2 y su capacidad para matar células objetivo que expresan CD25. Los resultados de la unión a rhCD25, se muestran en las Figuras 63. El ensayo STAT5 mostró que los anticuerpos no bloqueaban la señalización de IL-2 ensayada, mientras que la señalización de IL-2 fue completamente bloqueada por el anticuerpo Dacizumab (Figura 65). El ensayo de competencia mostró que el Anticuerpo 7 no compite con los bloqueantes de la señal IL-2 Dacizumab o Basiliximab Figura 64 (A) y (B). Por último, el Anticuerpo 7 mata células que expresan CD25, células tumorales o células T reguladoras, mediante ADCC (Figura 66) y ADCP (Figura 67) en comparación con un anticuerpo de control silencioso CD25 Fc anti-humano.

25 En conclusión, el Anticuerpo 6, Anticuerpo 7, Anticuerpo 8 y Anticuerpo 9 han sido caracterizados y demuestran una potente eliminación de células positivas para CD25 (Tregs o líneas celulares cancerosas) y no interfiere con la señalización de IL-2 y consecuentemente no inhibe las respuestas T efectoras. Los anticuerpos son, por tanto, anticuerpos depletores de Treg que podrían aplicarse para el tratamiento del cáncer, como monoterapia o en combinación.

30 Los anticuerpos Anticuerpo 10, Anticuerpo 11, Anticuerpo 12, Anticuerpo 12, Anticuerpo 13, Anticuerpo 14, Anticuerpo 15, Anticuerpo 16, Anticuerpo 17, Anticuerpo 18, Anticuerpo 19, Anticuerpo 20, Anticuerpo 21, se caracterizan por comprender una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de:

	Proteína VH	Proteína VL
Ab10	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS <u>GFSLT SYG</u> <u>IQWIRQPPGKGLEWIGVIWAGGSTNYNSALMSR</u> VTISKDNSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY <u>CARAY</u> <u>GYDGSWLAY</u> WGQ <u>GT</u> LTVSS (SEQ ID NO:27)	EIVLTQSPATLS <u>LSPGERATLSC</u> RASSSV <u>SYM</u> <u>HWYQQKPGQAPRPLI</u> YATSN <u>LASGI</u> PARFSGS GS <u>GTDF</u> TLT <u>ISSLE</u> PEDFAVYY <u>CQ</u> WSSN <u>PPT</u> FGGGT <u>KLEIK</u> SEQ ID NO:30)

(continuación)

	Proteína VH	Proteína VL
Ab11	<p>QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS<u>GFSLTSYG</u> <u>IQ</u>WIRQPPGKGLEWIG<u>VIWAGGSTNYNSALMSR</u> VTISKDN SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC<u>RAY</u> <u>GYDGSWLAY</u>WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:27)</p>	<p>QIVLTQSPATLSLSPGERATLSC<u>RASSSVSYM</u> <u>HWYQQKPGQAPRPLIF</u><u>ATSNLAS</u>GIPARFSGS GSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC<u>QWSSNPPT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:31)</p>
Ab12	<p>QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS<u>GFSLTSYG</u> <u>IQ</u>WIRQPPGKGLEWIG<u>VIWAGGSTNYNSALMSR</u> VTISKDN SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC<u>RAY</u> <u>GYDGSWLAY</u>WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:27)</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC<u>RASSSVSYM</u> <u>HWYQQKPGKAPKPLIF</u><u>ATSNLAS</u>GVPSRFGS GSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC<u>QWSSNPPT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:32)</p>
Ab13	<p>QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS<u>GFSLTSYG</u> <u>IQ</u>WIRQPPGKGLEWIG<u>VIWAGGSTNYNSALMSR</u> VTISKDN SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC<u>RAY</u> <u>GYDGSWLAY</u>WGQGTLVTVSS SEQ ID NO:27)</p>	<p>QIQLTQSPSSLSASVGDRVITIC<u>RASSSVSYM</u> <u>HWYQQKPGKSPKPLIF</u><u>ATSNLAS</u>GVPSRFGS GSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC<u>QWSSNPPT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:33)</p>
AB14	<p>QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS<u>GFSLTSYG</u> <u>IQ</u>WVRQPPGKGLEWIG<u>VIWAGGSTNYNSALMSR</u> VTISKDN SKS QFSLKLSSVTAADTAVYYC<u>RAY</u> <u>GYDGSWLAY</u>WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:28)</p>	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC<u>RASSSVSYM</u> <u>HWYQQKPGQAPRPLIF</u><u>ATSNLAS</u>GIPARFSGS GSGTDFTLTISLQPEDFATYYC<u>QWSSNPPT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:30)</p>
Ab15	<p>QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS<u>GFSLTSYG</u> <u>IQ</u>WVRQPPGKGLEWIG<u>VIWAGGSTNYNSALMSR</u> VTISKDN SKS QFSLKLSSVTAADTAVYYC<u>RAY</u> <u>GYDGSWLAY</u>WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:28)</p>	<p>QIVLTQSPATLSLSPGERATLSC<u>RASSSVSYM</u> <u>HWYQQKPGQAPRPLIF</u><u>ATSNLAS</u>GIPARFSGS GSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYC<u>QWSSNPPT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:31)</p>
Ab16	<p>QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS<u>GFSLTSYG</u> <u>IQ</u>WVRQPPGKGLEWIG<u>VIWAGGSTNYNSALMSR</u> VTISKDN SKS QFSLKLSSVTAADTAVYYC<u>RAY</u> <u>GYDGSWLAY</u>WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:28)</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC<u>RASSSVSYM</u> <u>HWYQQKPGKAPKPLIF</u><u>ATSNLAS</u>GVPSRFGS GSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC<u>QWSSNPPT</u> FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:32)</p>

(continuación)

	Proteína VH	Proteína VL
Ab17	<p>QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS<u>GFSLTSYG</u> <u>IQ</u>WVRQAPGKGLEW<u>VS</u><u>VIWAGGSTNYNSALMSR</u> VTISKDNsQFSLKLSSVTAADTAVYYC<u>RAY</u> <u>GYDGSWLAY</u>WGQGTsTVSS (SEQ ID NO:28)</p>	QIQLTQSPSSLSASVGDRV s TIC <u>RASSSVSYM</u> HWYQQKPGKSPKPLIF <u>ATSNLAS</u> GVPSRFSGS GSGTDYTLT s SLQPEDFATYYC <u>QWSSNPPT</u> FGGGT s LEIK (SEQ ID NO:33)
Ab18	<p>QVQLVESGGVVQPGGLRLSCAVS<u>GFSLTSYG</u> <u>IQ</u>WVRQAPGKGLEW<u>VS</u><u>VIWAGGSTNYNSALMSR</u> FTISKDNsKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYC<u>RAY</u> <u>GYDGSWLAY</u>WGQGTsTVSS (SEQ ID NO:29)</p>	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASSSVSYM</u> HWYQQKPGQAPRPLIF <u>ATSNLAS</u> GI s PARFSGS GSGTDFTLT s LEPEDFAVYYC s QWSSNPPT FGGGT s LEIK (SEQ ID NO:30)
Ab19	<p>QVQLVESGGVVQPGGLRLSCAVS<u>GFSLTSYG</u> <u>IQ</u>WVRQAPGKGLEW<u>VS</u><u>VIWAGGSTNYNSALMSR</u></p>	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <u>RASSSVSYM</u> HWYQQKPGQAPRPLIF <u>ATSNLAS</u> GI s PARFSGS
	FTISKDN s KSTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>RAY</u> <u>GYDGSWLAY</u> WGQGT s TVSS (SEQ ID NO:29)	GSGTDYTLT s LEPEDFAVYYC <u>QWSSNPPT</u> FGGGT s LEIK (SEQ ID NO:31)
Ab20	<p>QVQLVESGGVVQPGGLRLSCAVS<u>GFSLTSYG</u> <u>IQ</u>WVRQAPGKGLEW<u>VS</u><u>VIWAGGSTNYNSALMSR</u> FTISKDNsKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYC<u>RAY</u> <u>GYDGSWLAY</u>WGQGTsTVSS (SEQ ID NO:29)</p>	DIQMTQSPSSLSASVGDRV s TIC <u>RASSSVSYM</u> HWYQQKPGKAPKPLIF <u>ATSNLA</u> GVPSRFSGS GSGTDYTLT s SLQPEDFATYYC <u>QWSSNPPT</u> FGGGT s LEIK (SEQ ID NO:32)
Ab21	<p>QVQLVESGGVVQPGGLRLSCAVS<u>GFSLTSYG</u> <u>IQ</u>WVRQAPGKGLEW<u>VS</u><u>VIWAGGSTNYNSALMSR</u> FTISKDNsKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYC<u>RAY</u> <u>GYDGSWLAY</u>WGQGTsTVSS (SEQ ID NO:29)</p>	QIQLTQSPSSLSASVGDRV s TIC <u>RASSSVSYM</u> HWYQQKPGKSPKPLIF <u>ATSNLAS</u> GVPSRFSGS GSGTDYTLT s SLQPEDFATYYC <u>QWSSNPPT</u> FGGGT s LEIK (SEQ ID NO:33)

5 Las secuencias de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR; es decir, CDR1, CDR2 y CDR3), como se ha indicado anteriormente, y las regiones marco (FR) se definieron según el esquema de numeración de Kabat.

10 Los resultados del mapeo de epítopos indicaron que el Anticuerpo 10, el Anticuerpo 11, el Anticuerpo 12, el Anticuerpo 12, el Anticuerpo 13, el Anticuerpo 14, el Anticuerpo 15, el Anticuerpo 16, el Anticuerpo 17, el Anticuerpo 18, el Anticuerpo 19, el Anticuerpo 20, el Anticuerpo 21 se unen a CD25 humano en la región de los aminoácidos 150 a 163 (YQCVQGYRALHRGP) y de los aminoácidos 166 a 180 (SVCKMTHGKTRWTQP) de SEQ ID NO: 1, y se une a secuencias de proteína extracelular CD25 humana con un valor Kd en el intervalo de 10⁻⁸ M a 10⁻¹⁰ M.

Los Anticuerpos se evaluaron con respecto a su habilidad de no interferir con la señalización de IL-2 y su capacidad de matar células objetivo que expresan CD25. Los resultados de la unión a rhCD25, se muestran en las Figuras 68.

El ensayo STAT5 mostró que los Anticuerpos no bloquearon la señalización de IL-2 ensayada, mientras que la señalización de IL-2 fue completamente bloqueada por el anticuerpo Daclizumab (Figura 70). El ensayo de competencia mostró que el Anticuerpo 19 no compite con los bloqueantes de la señal IL-2 Daclizumab o Basiliximab Figura 69 (A) y (B). Por último, el Anticuerpo 12, el Anticuerpo 19 y el Anticuerpo 20 eliminan células que expresan CD25, células tumorales o células T reguladoras, mediante ADCC (Figura 71) y ADCP (Figuras 72 y 73) en comparación con un anticuerpo de control silencioso CD25 Fc anti-humano.

En conclusión, el Anticuerpo 10, Anticuerpo 11, Anticuerpo 12, Anticuerpo 12, Anticuerpo 13, Anticuerpo 14, Anticuerpo 15, Anticuerpo 16, Anticuerpo 17, Anticuerpo 18, Anticuerpo 19, Anticuerpo 20, Anticuerpo 21 han sido caracterizados y demuestran una potente eliminación de células positivas para CD25 (Tregs o líneas celulares cancerosas) y no interfiere con la señalización de IL-2 y por consiguiente no inhibe las respuestas efectoras T. Los Anticuerpos son, por tanto, anticuerpos depletores de Treg que podrían aplicarse para el tratamiento del cáncer, tal como monoterapia o en combinación.

15 Ejemplo 12: Análisis terapéutico en combinación con una vacuna contra el cáncer

Se determinó la actividad terapéutica de un anticuerpo anti-CD25 no bloqueante de IL-2, 7D4 IgG2a de ratón, en combinación con GVAX en un modelo de ratones resistentes a la inmunoterapia B16B16. En el día 0, se implantaron 50x 10³ células B16B16 i.d. En el día 5, se dosificaron o no 200µg de anticuerpo anti-CD25 no bloqueante de IL-2 i.p. A los días 6, 9 y 12 los ratones se trataron, o no, con 1×10⁶ células B16B16 irradiadas (150 Gy) adyuvadas con GM-CSF (GVAX). Se controló el crecimiento tumoral y la supervivencia de los ratones hasta el día 33. Los resultados se muestran en la Figura 74.

Se observó un efecto sinérgico con una combinación de GVAX y el anticuerpo anti-CD25 no bloqueante 7D4 en un modelo B16B16. Por lo tanto, la administración de 7D4 con una vacuna contra el cáncer potenció la respuesta antitumoral inducida por la vacuna. Estos resultados demuestran que un anticuerpo depletor anti-CD25 no bloqueante de IL2 puede utilizarse en combinación con vacunas contra el cáncer para el tratamiento del cáncer en humanos. Además, estos datos demuestran que un anticuerpo depletor no bloqueante de IL2 es capaz de potenciar las respuestas inmunitarias inducidas por vacunas, con aplicaciones potencialmente más amplias que el cáncer.

30

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo IgG1 anti-CD25 humano para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto humano, en el que dicho sujeto tiene un tumor sólido, y en el que dicho anticuerpo inhibe menos de aproximadamente 25% de la señalización de IL-2 en comparación con la señalización de IL-2 en ausencia del anticuerpo, en el que la señalización de IL2 se mide por los niveles de proteína STAT5 fosforilada en las células según lo determinado por un ensayo de fosforilación de STAT5, en el que el ensayo de fosforilación de STAT5 comprende:

 - cultivo de células PMBC en presencia del anticuerpo anti-CD25 a una concentración de 10ug/ml durante 30 minutos y, a continuación, adición de concentraciones variables de IL2 durante 10 minutos
 - permeabilizar las células; y
 - medición de los niveles de proteína STAT5 con un anticuerpo marcado con fluorescencia frente a un péptido STAT5 fosforilado mediante citometría de flujo.

2. Un anticuerpo anti-CD25 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-CD25 se une específicamente a un epítopo de CD25 humano, en el que el epítopo comprende al menos una secuencia seleccionada de:

 - (i) la secuencia de aminoácidos 150-158 de SEQ ID NO:1 (YQCVQGYRA);
 - (ii) la secuencia de aminoácidos 176-180 de SEQ ID NO:1 (RWTQP);
 - (iii) la secuencia de aminoácidos 42-56 de SEQ ID NO:1 (KEGMLNCECKRGFR); y
 - (iv) la secuencia de aminoácidos 74-84 de SEQ ID NO:1 (SSWDNQCQCTS).

3. Un anticuerpo anti-CD25 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-CD25 se une específicamente a un epítopo de CD25 humano, en el que el epítopo comprende al menos una secuencia seleccionada de:

 - (i) la secuencia de aminoácidos 166-180 de SEQ ID NO:1 (SVCKMTHGKTRWTQP),
 - (ii) la secuencia de aminoácidos 176-186 de SEQ ID NO:1 (RWTQPQLICTG), y
 - (iii) la secuencia de aminoácidos 70 a 84 de SEQ ID NO: 1 (NSSHHSSWDNQCQCTS).

4. Un anticuerpo anti-CD25 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-CD25 se une específicamente a un epítopo de CD25 humano en el que el epítopo comprende:

 - (i) la secuencia de los aminoácidos 42-56 de SEQ ID NO:1 (KEGMLNCECKRGFR) y los aminoácidos 150-160 de SEQ ID NO:1 (YQCVQGYRALH);
 - (ii) la secuencia de aminoácidos 42-56 de SEQ ID NO:1 (KEGMLNCECKRGFR) y aminoácidos 74-84 de SEQ ID NO:1 (SSWDNQCQCTSATTR);
 - (iii) la secuencia de aminoácidos 150-163 de SEQ ID NO:1 (YQCVQGYRALHRGP), aminoácidos 166-180 de SEQ ID NO:1 (SVCKMTHGKTRWTQP), aminoácidos 42-56 de SEQ ID NO:1 (KEGMLNCECKRGFR) y aminoácidos 74-84 de SEQ ID NO:1 (SSWDNQCQCTSATTR);
 - (iv) la secuencia de los aminoácidos 150-158 de SEQ ID NO:1 (YQCVQGYRA) y los aminoácidos 176-180 de SEQ ID NO:1 (RWTQP);
 - (v) la secuencia de los aminoácidos 150-158 de SEQ ID NO:1 (YQCVQGYRA) y los aminoácidos 176-186 de SEQ ID NO:1 (RWTQPQLICTG); o
 - (vi) la secuencia de aminoácidos 150-163 de SEQ ID NO:1 (YQCVQGYRALHRGP) y aminoácidos 166-180 de SEQ ID NO:1 (SVCKMTHGKTRWTQP).

5. Un anticuerpo anti-CD25 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo anti-CD25 es un anticuerpo anti-CD25 que se une a Fc_YRI, Fc_YRIIc, y/o Fc_YRIIIa con mayor afinidad que la que se une a Fc_YRIIb.

6. Un anticuerpo anti-CD25 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en:

 - (a) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4;
 - (b) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;
 - (c) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14;
 - (d) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22;
 - (e) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25;
 - (f) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26;

- (g) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25;
- (h) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26;
- 5 (i) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30;
- (j) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31;
- 10 (k) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32;
- (l) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 y la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33;
- 15 (m) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 y la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30;
- (n) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 y la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31;
- 20 (o) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 y la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32;
- (p) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28 y la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33;
- 25 (q) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 y la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30;
- (r) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 y la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31;
- (s) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 y la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 32; y
- 30 (t) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29 y la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33.
7. Un anticuerpo anti-CD25 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo anti-CD25:
- 35 (i) es un anticuerpo monoclonal;
- (ii) es un anticuerpo humano, químérico o humanizado; y/o
- (iii) es una variante madurada por afinidad de la misma.
8. Un anticuerpo anti-CD25 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo anti-CD25 provoca una respuesta CDC, ADCC y/o ADCP, preferentemente una respuesta ADCC y/o ADCP, más preferentemente una respuesta ADCC.
- 40 9. Un anticuerpo anti-CD25 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el anticuerpo anti-CD25 es para administración a un sujeto que tiene un tumor establecido.
- 45 10. Un anticuerpo anti-CD25 para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo es para administración en combinación con otro agente terapéutico.
11. Un anticuerpo anti-CD25 para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho agente terapéutico adicional es:
- 50 (i) un inhibidor del punto de control inmunitario, opcionalmente un antagonista de PD-1, más preferentemente un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PDL1; o bien
- (ii) una vacuna contra el cáncer, opcionalmente una vacuna contra el cáncer GVAX.
12. Una combinación de un anticuerpo anti-CD25, como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y un agente terapéutico adicional para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto humano, en el que dicho sujeto tiene un tumor sólido y el anticuerpo anti-CD25 y el agente terapéutico adicional se administran simultáneamente, por separado o secuencialmente.
- 55 13. La combinación de uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el agente terapéutico adicional es:
- 60 (i) un inhibidor de puntos de control inmunitarios, opcionalmente un antagonista de PD-1; o
- (ii) una vacuna contra el cáncer, opcionalmente una vacuna contra el cáncer GVAX.

FIGURA 1

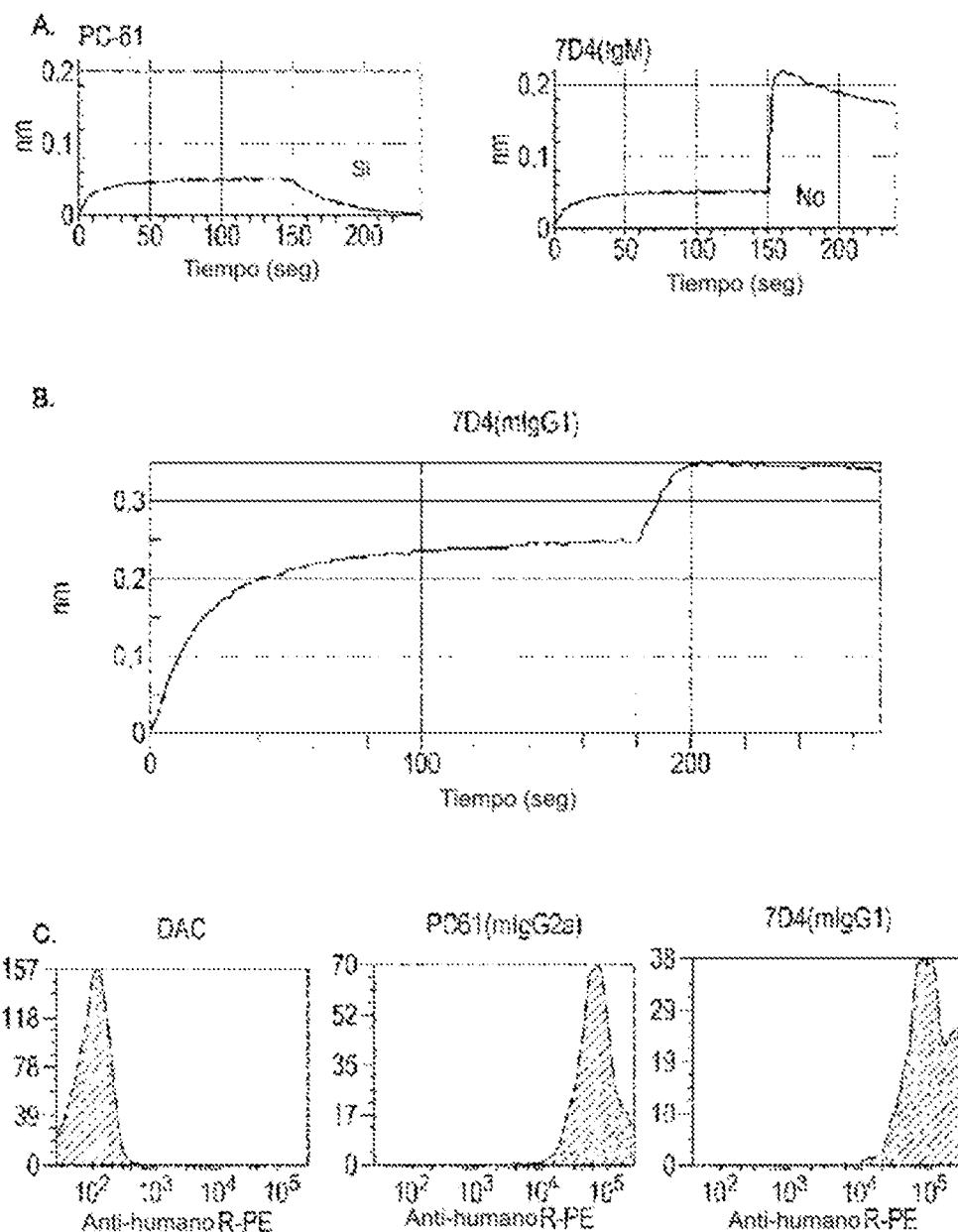


FIGURA 2

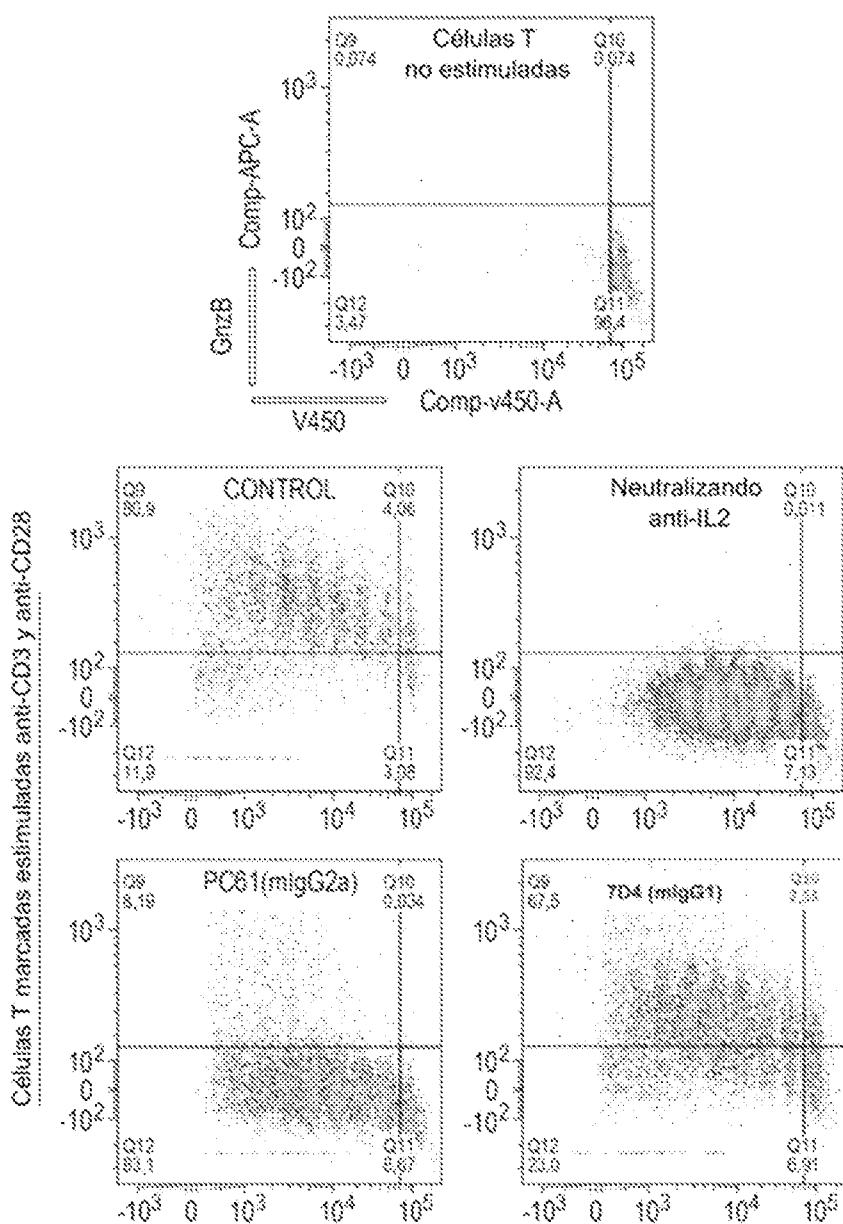


FIGURA 3

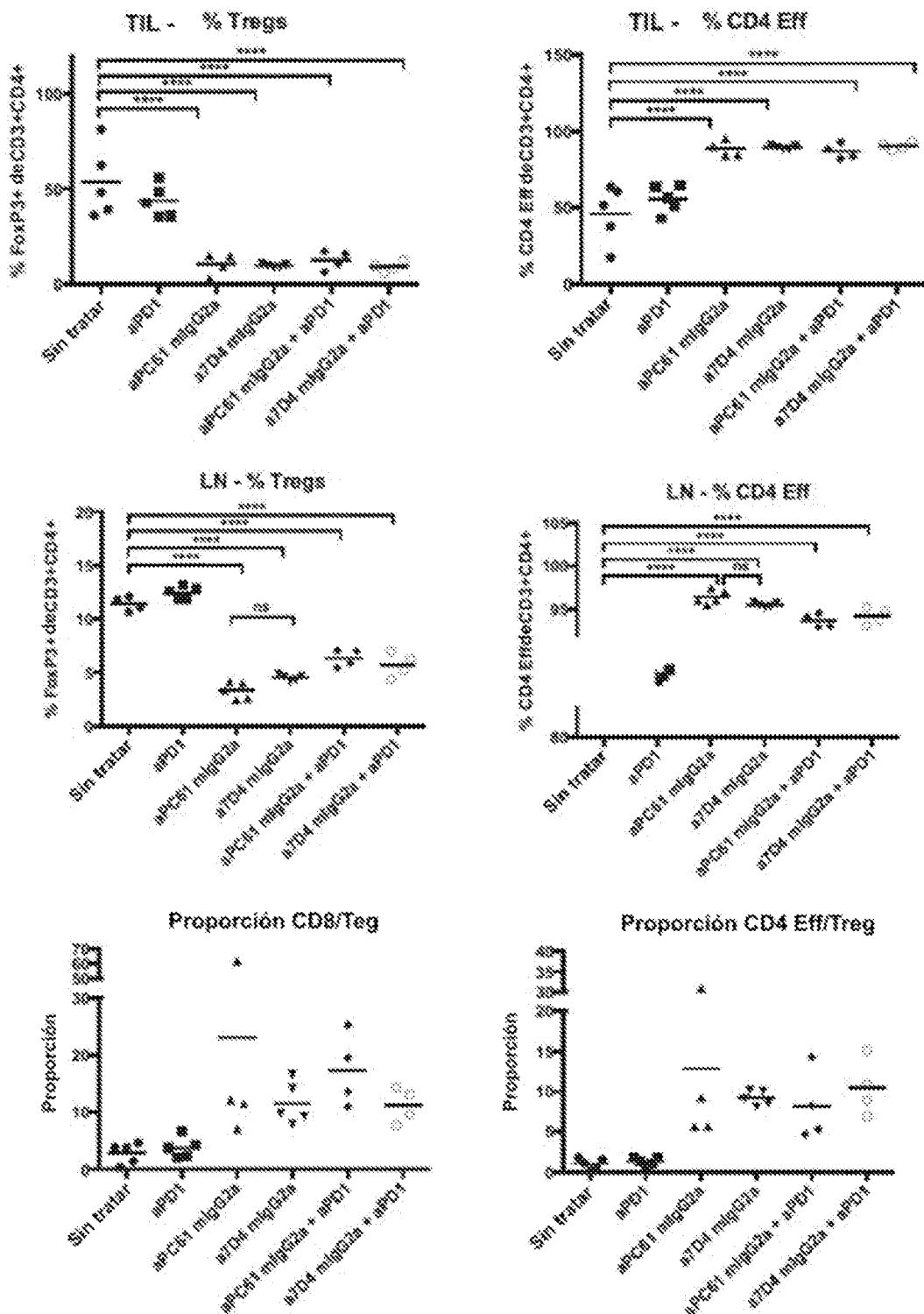


FIGURA 4

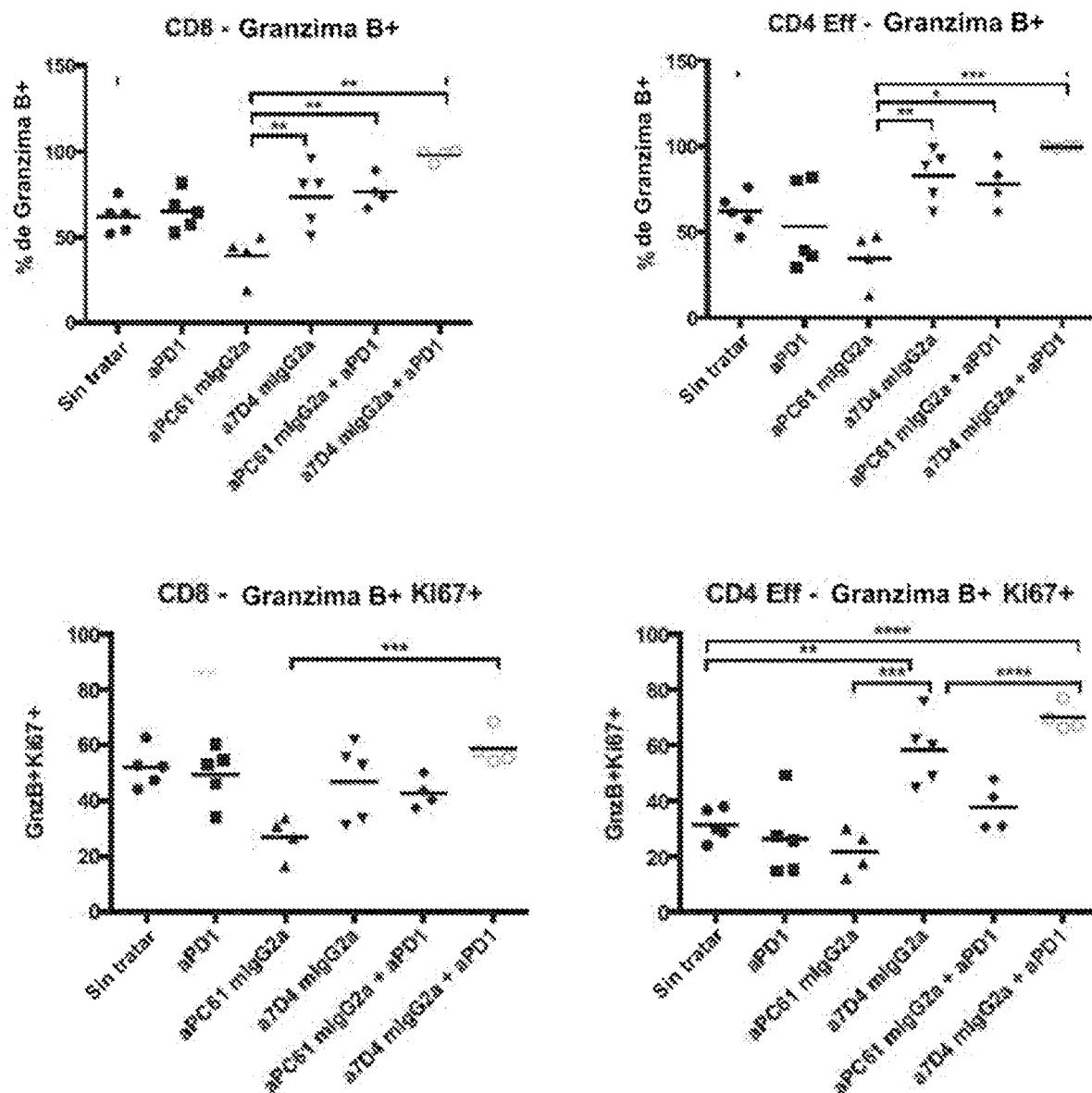


FIGURA 5

Modelo CT26

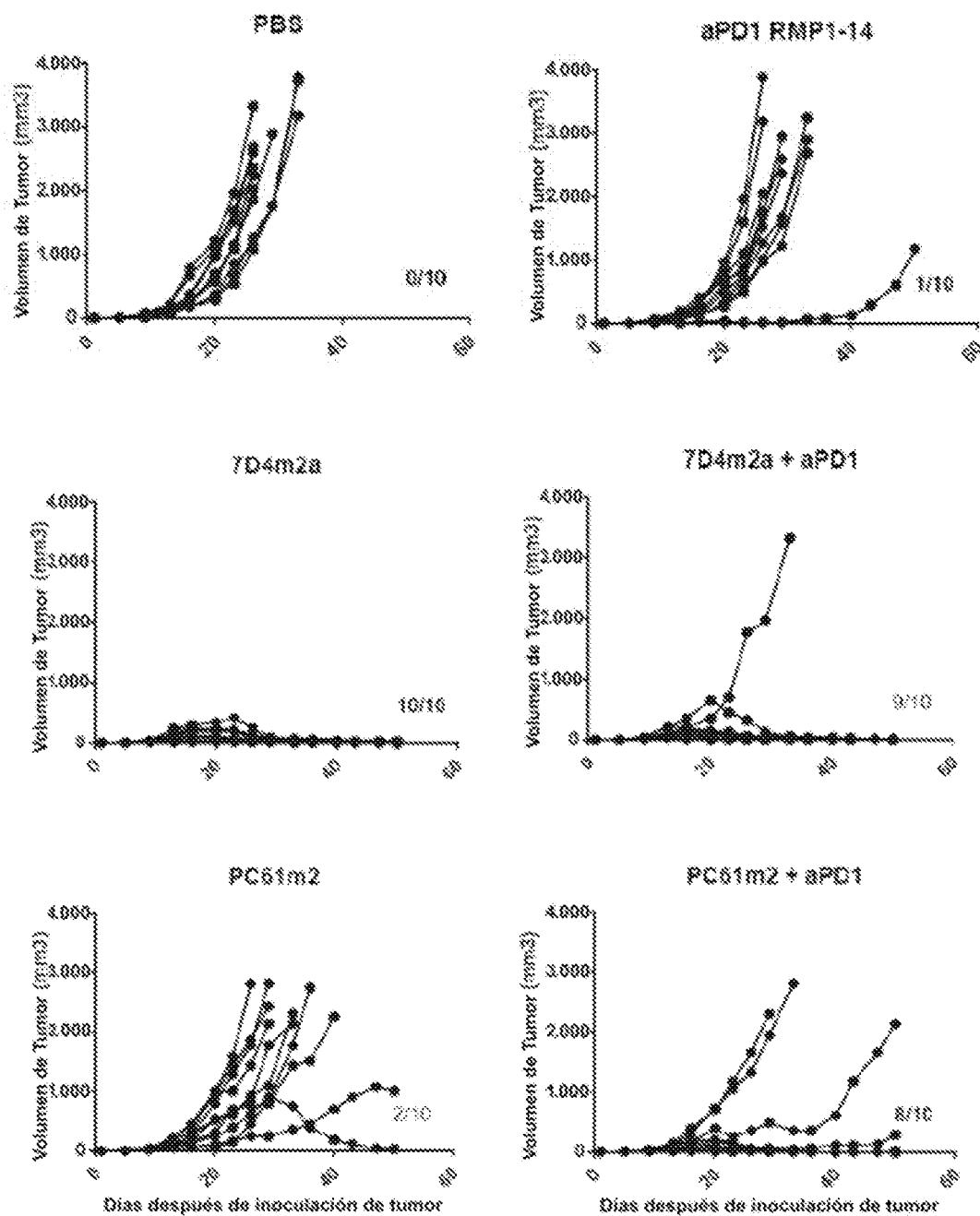


FIGURA 6
Modelo CT28

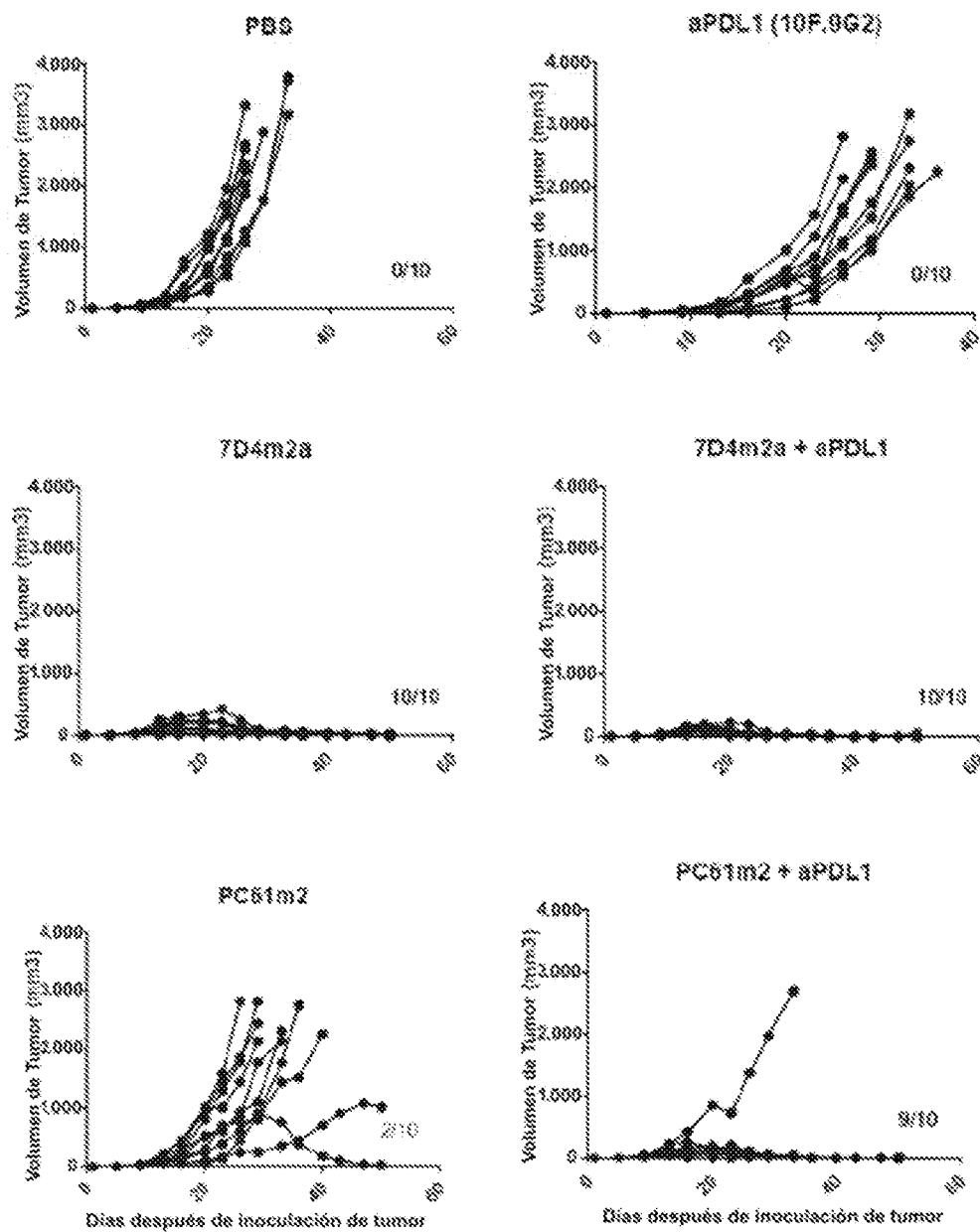


FIGURA 7

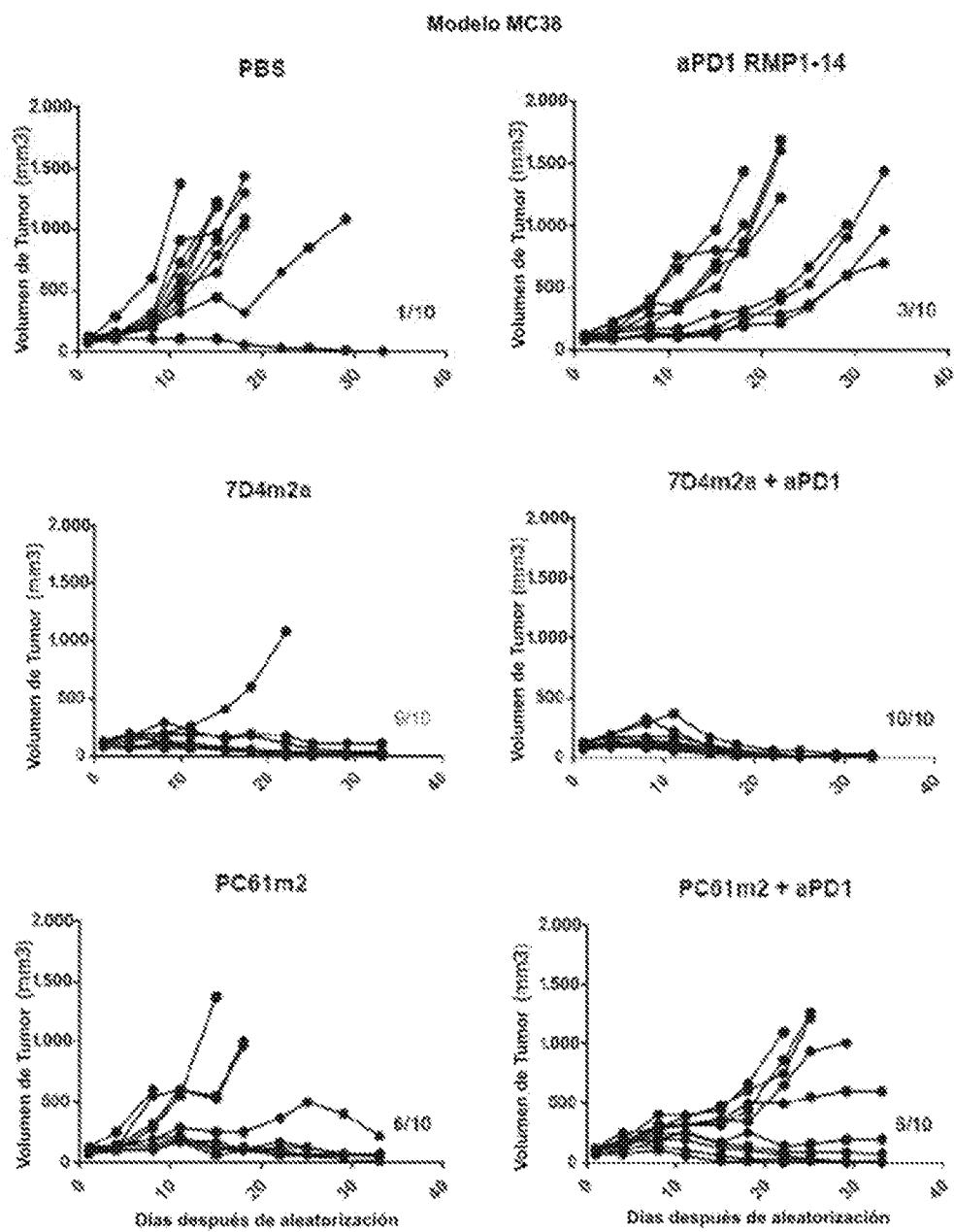


FIGURA 8

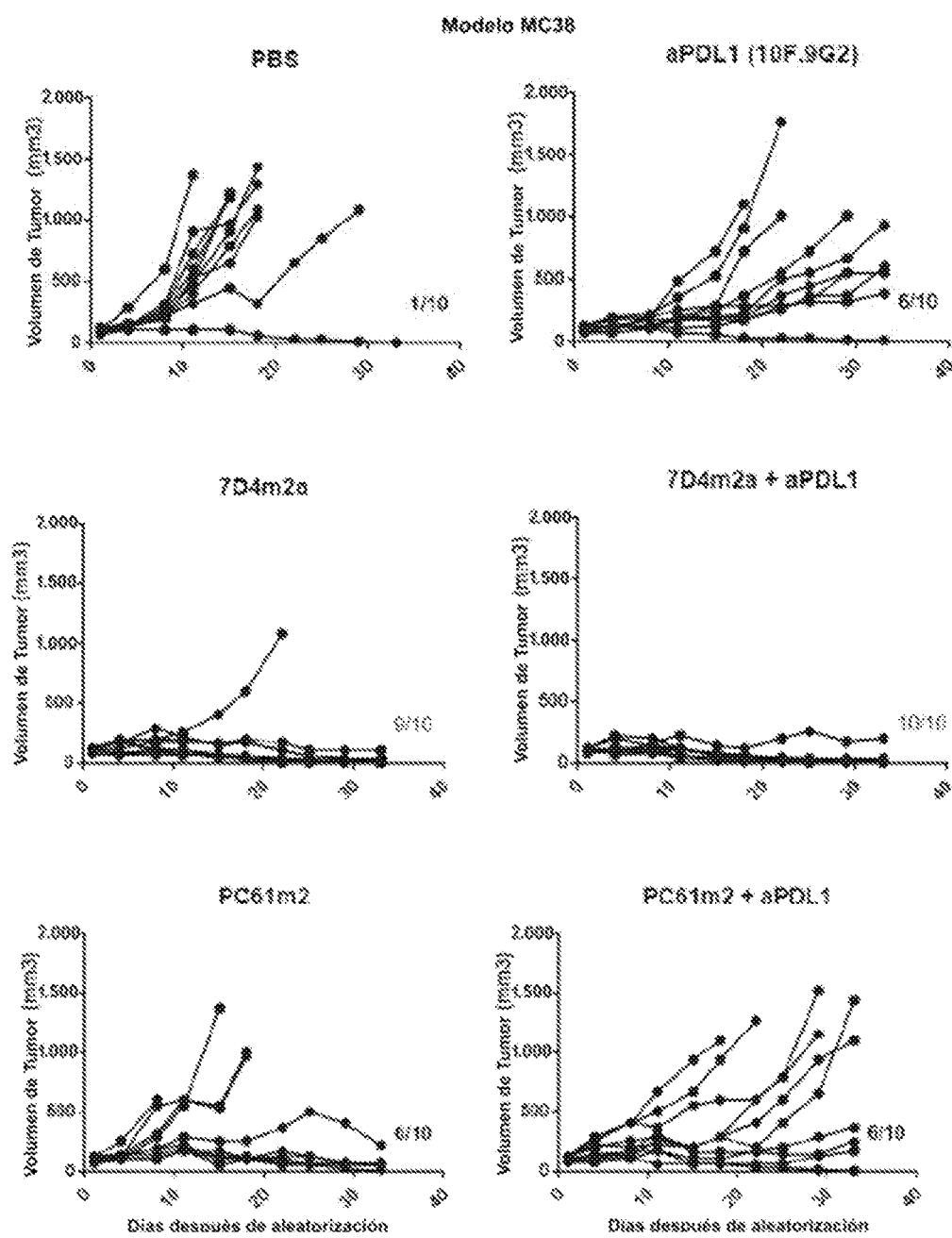


FIGURA 9

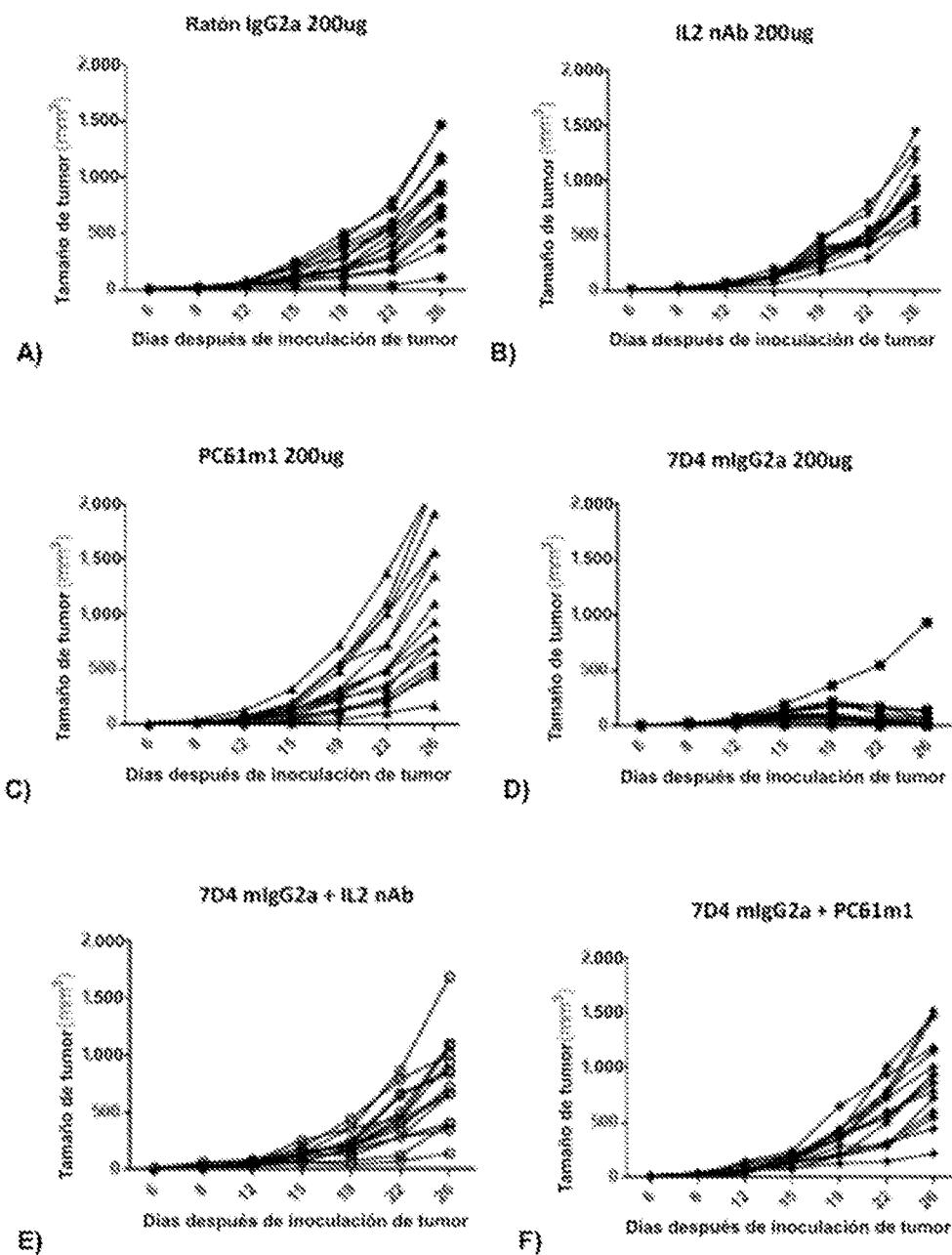


FIGURA 10

10 20 30 40 50 60
 MDSYLLMWGL LTFIMVPGCQ AELCDDDFPE IPHATEKAMA YKEGTMILNCE CKRGFRPIKS
 Epitopo 3

70 80 90 100 110 120
 GSLYMLCTGN SSHSSWDNQC OCTSSATENT TKQVTPQEE QKERKTTEMQ SPMQPVDQAS
 Epitopo 4

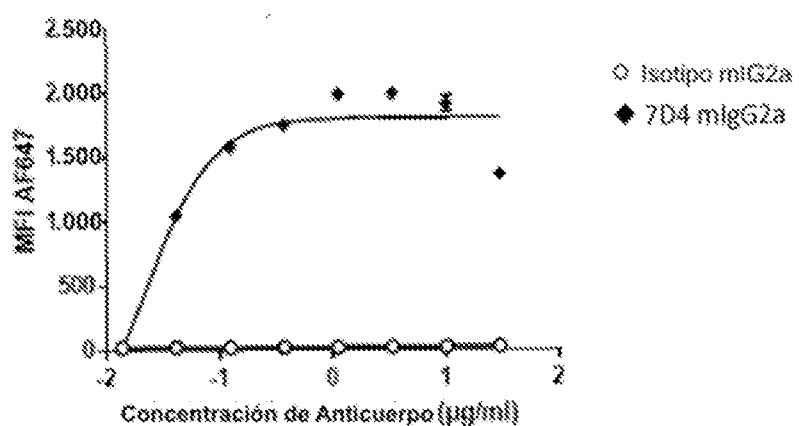
130 140 150 160 170 180
 LPGHCREPPP WNEEATERTY RFLVVGQMVYK QCVQGYFALH RGFRAESVCKM THGKTRWTFQF
 DAC Epitopo 1 Epitopo 2 Epitopo 2

190 200 210 220 230 240
 QLICTGEMET SQFPGEKEXPQ ASPEGRPESE TSCLVTTDF QIOTEMAATM ETSIFTTEYQ
 Epitopo 2 cont.

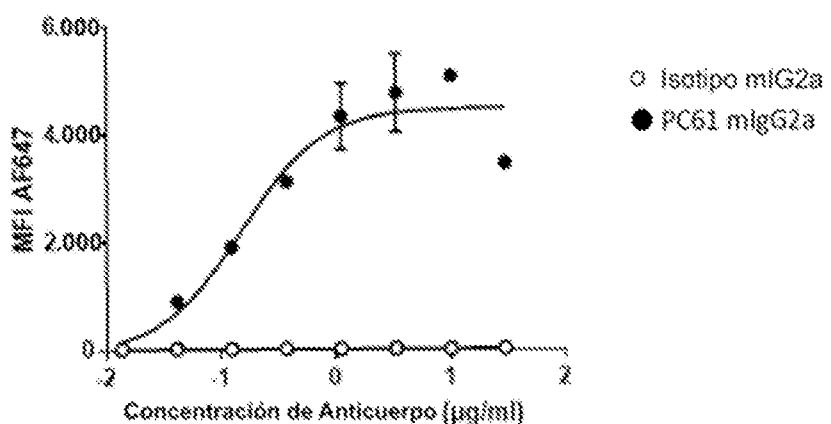
250 260 270
 VAVAGCVFLL ISVLLLISGLT WQRRQRKSRR TI

FIGURA 11

A)



B)



C)

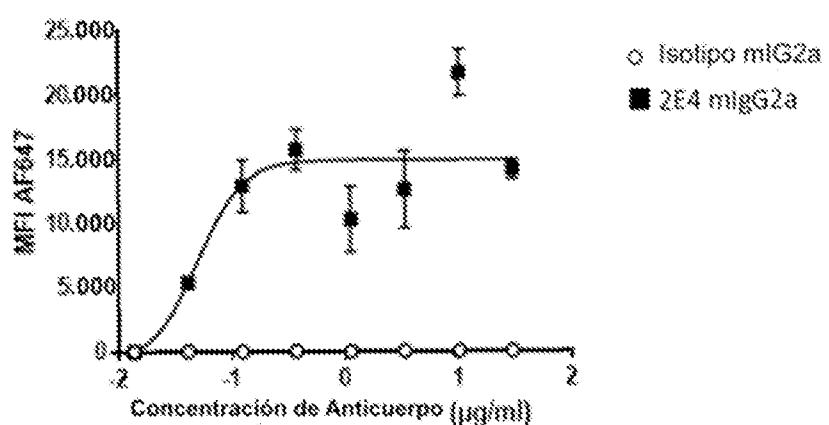
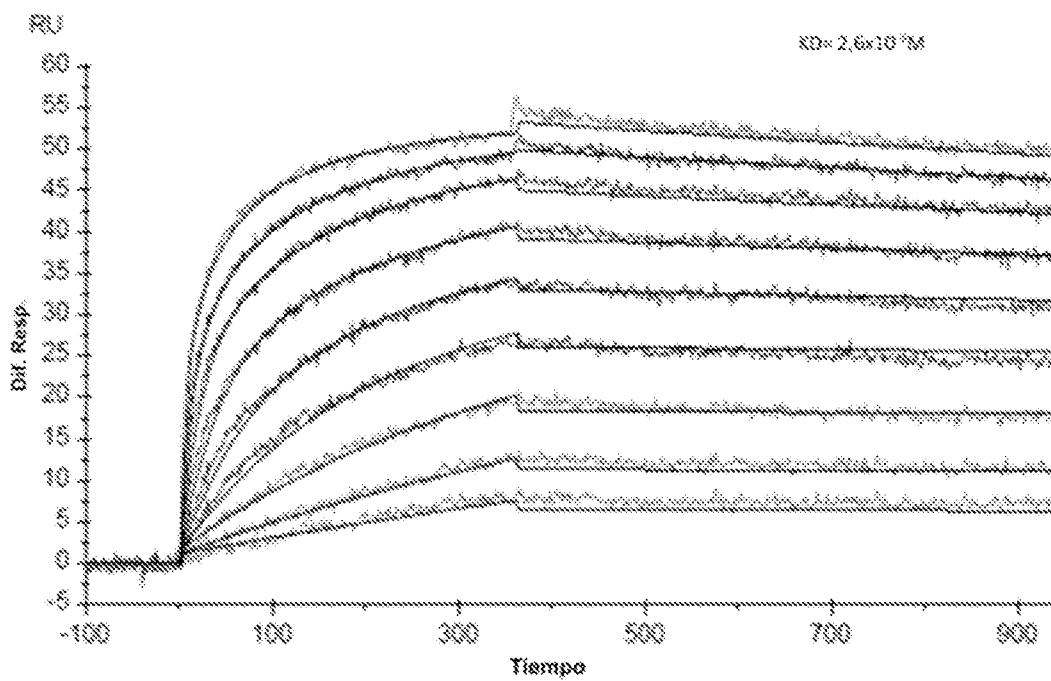


FIGURA 12

A)



B)

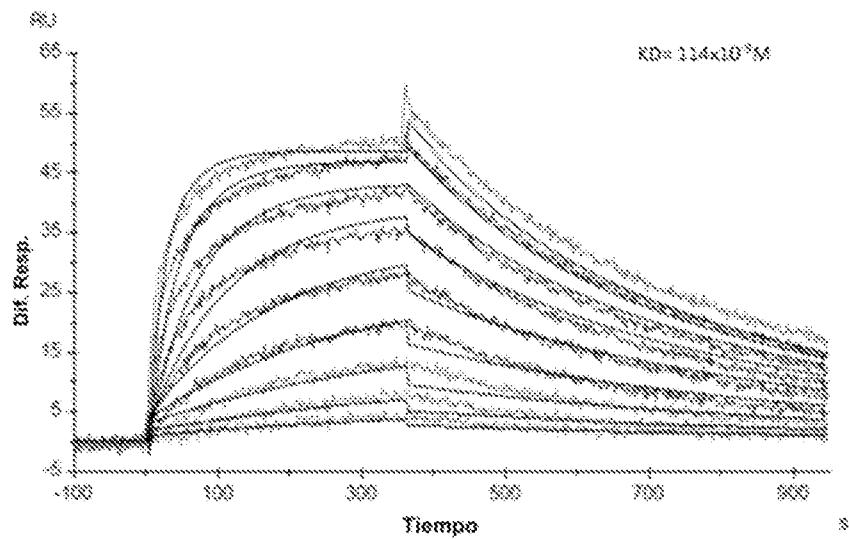


FIGURA 13

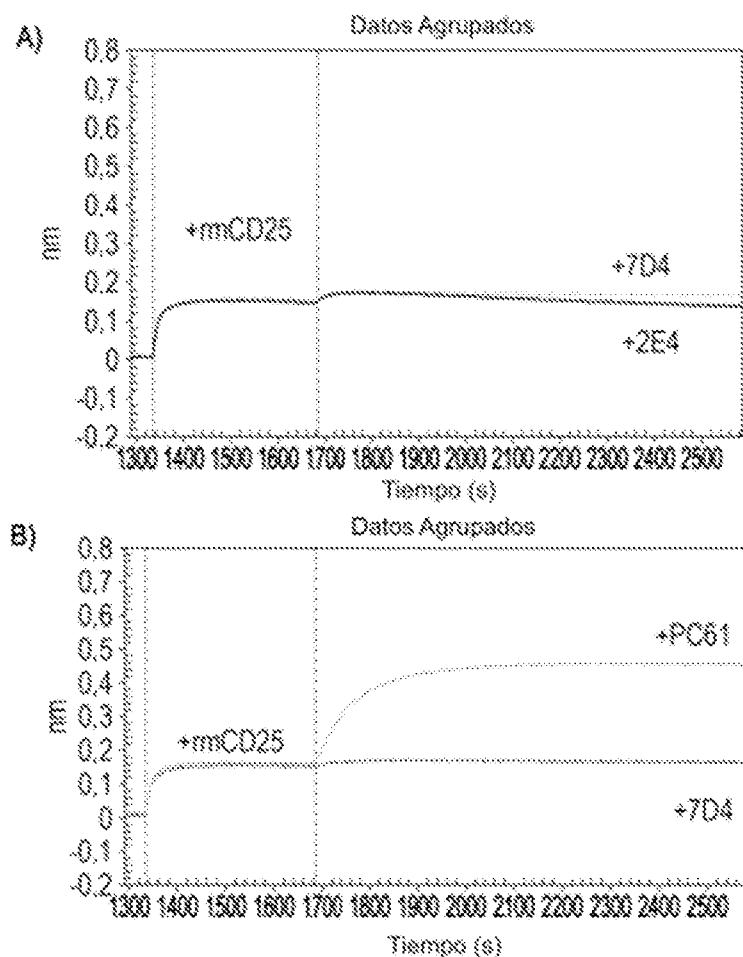


FIGURA 14

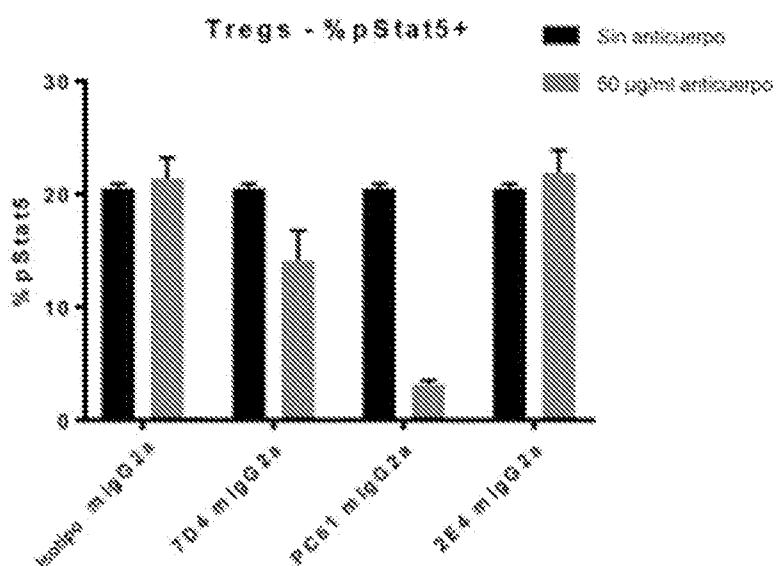


FIGURA 15

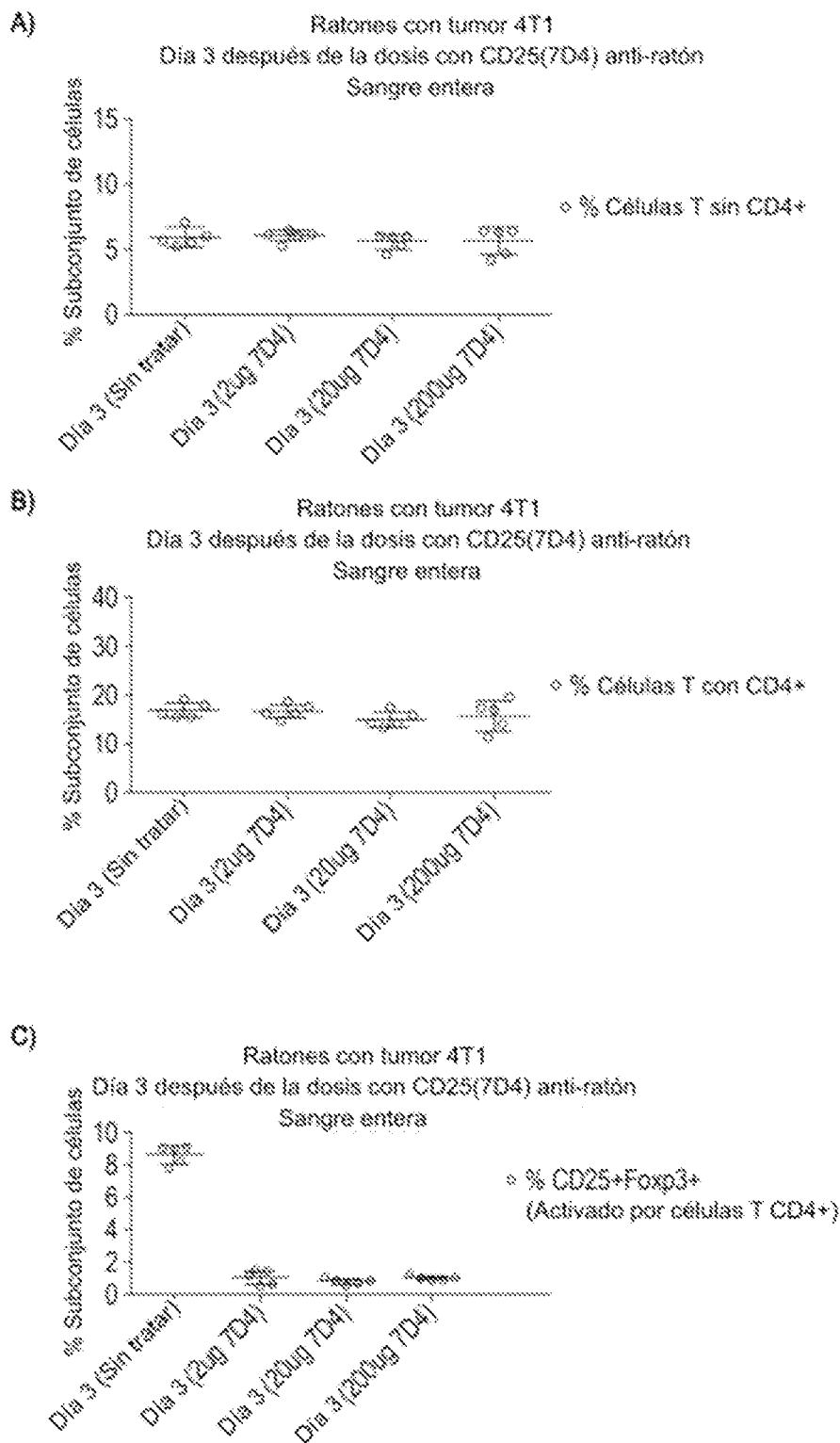
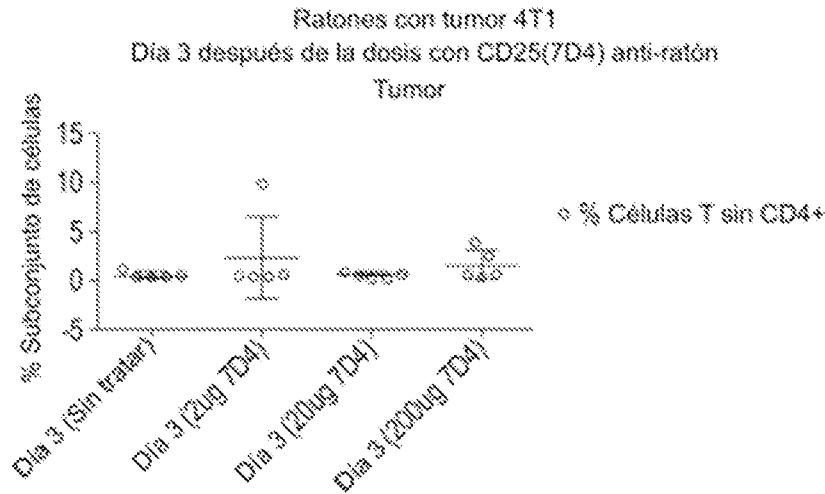
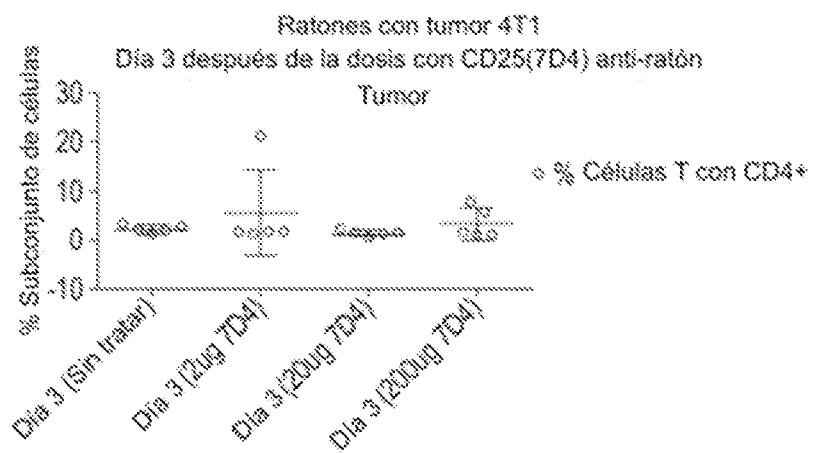


FIGURE 15 cont.

D)



E)



F)

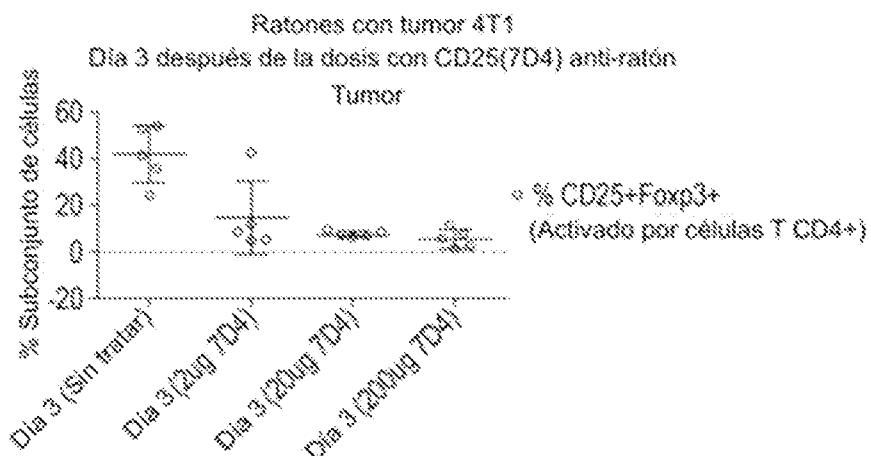


FIGURA 15 cont.

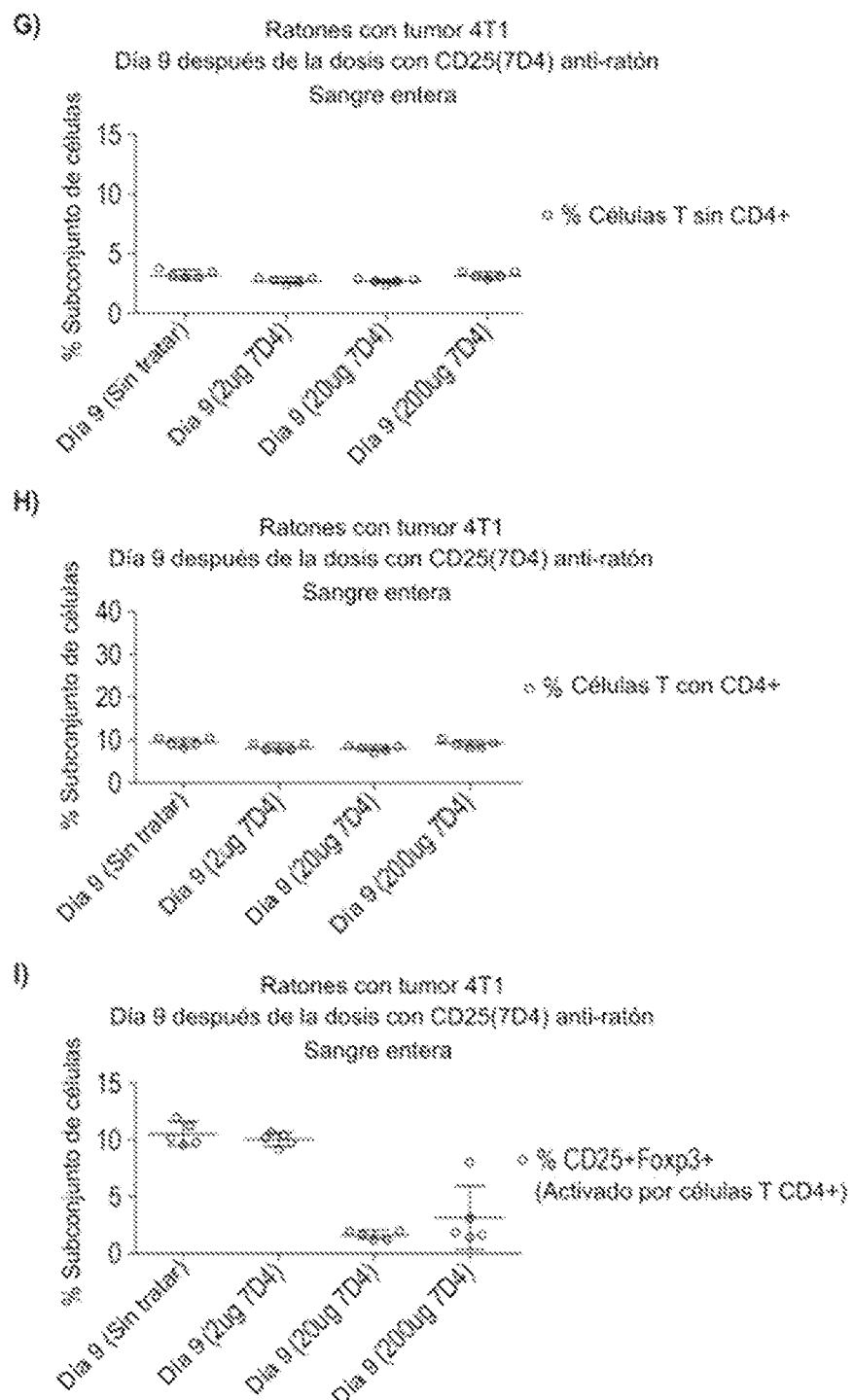


FIGURA 15 cont.

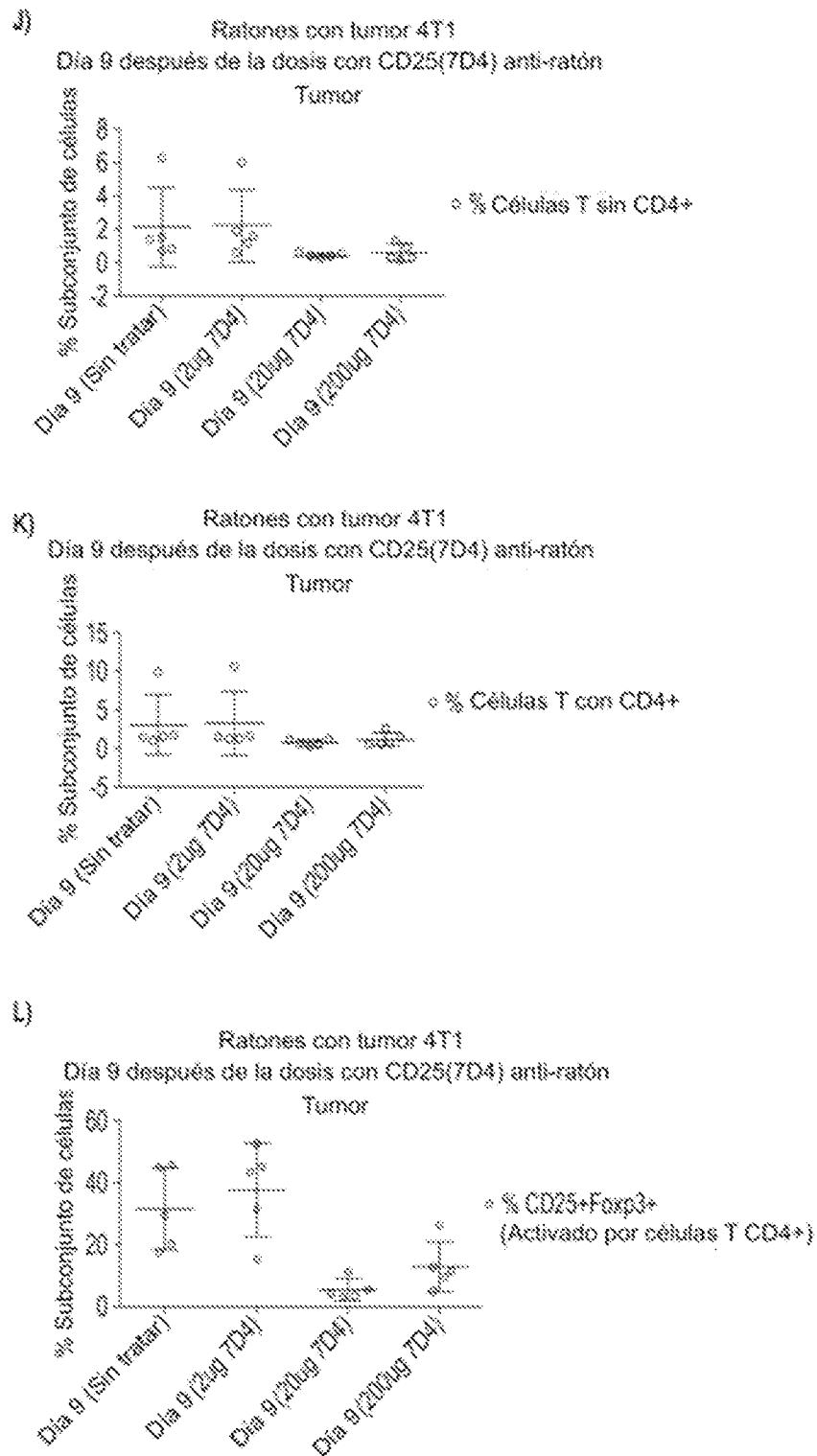


FIGURA 16

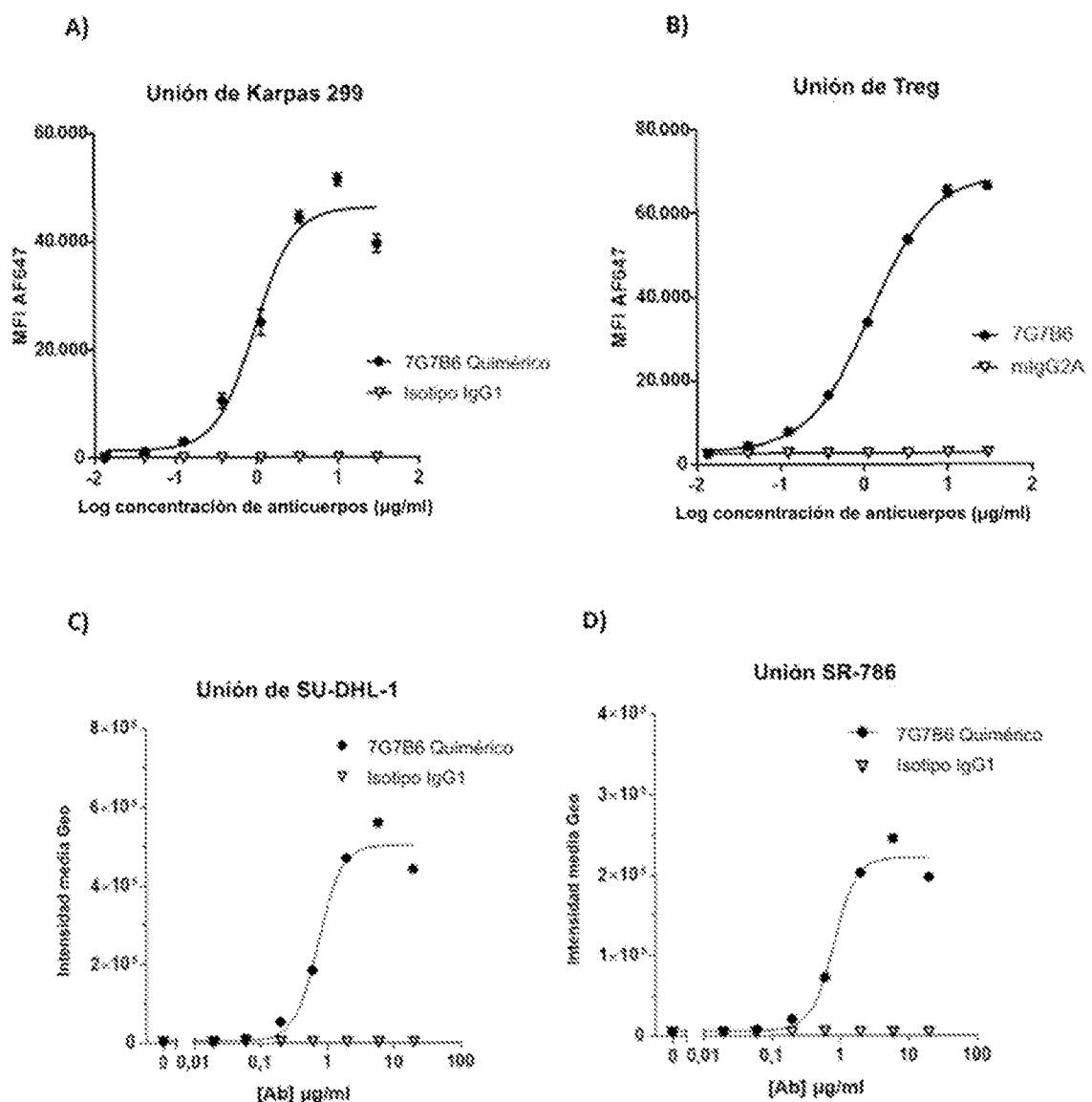


FIGURA 17

Titulación de IL2

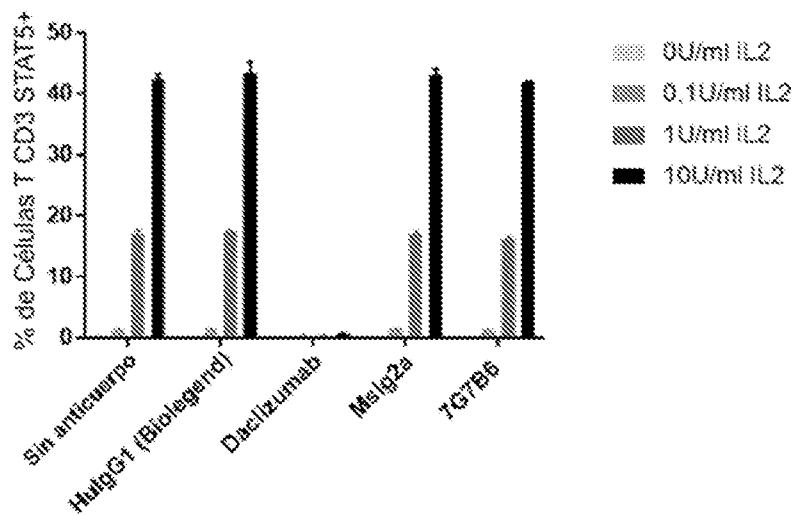


FIGURA 18

Células T Pan - Células CD4 en proliferación Gr8+

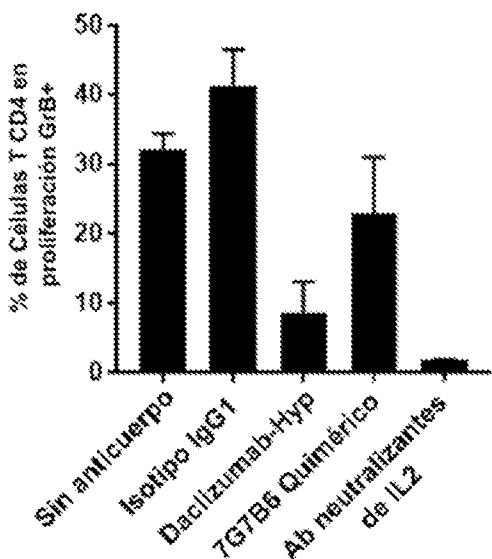


FIGURA 19

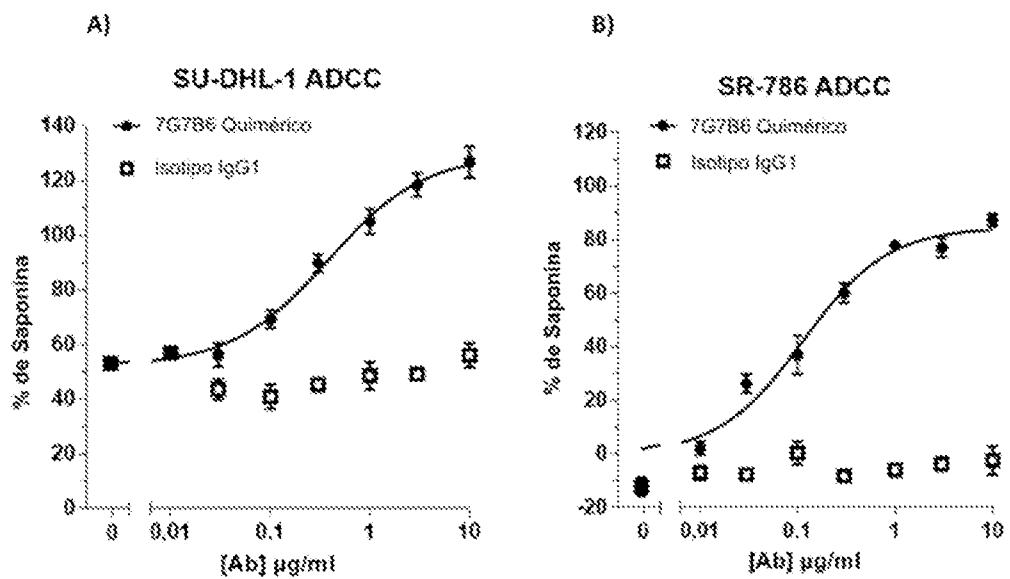


FIGURA 20

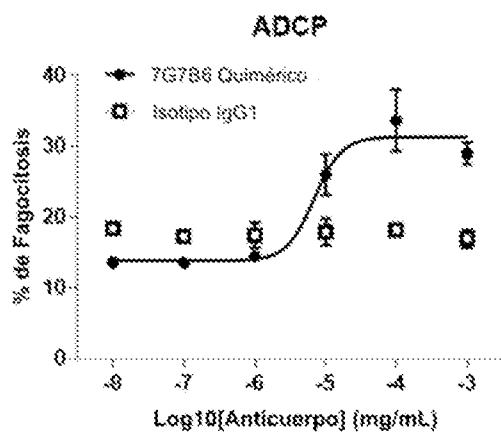


FIGURA 21

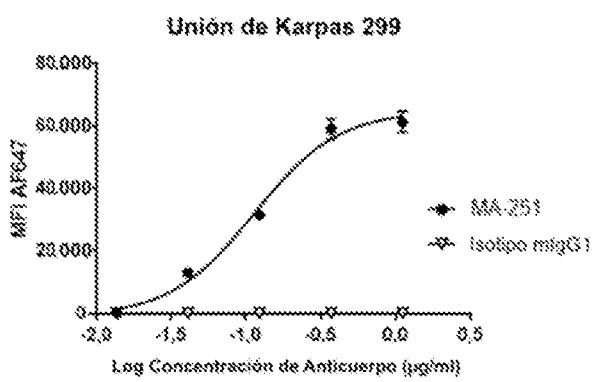


FIGURA 22

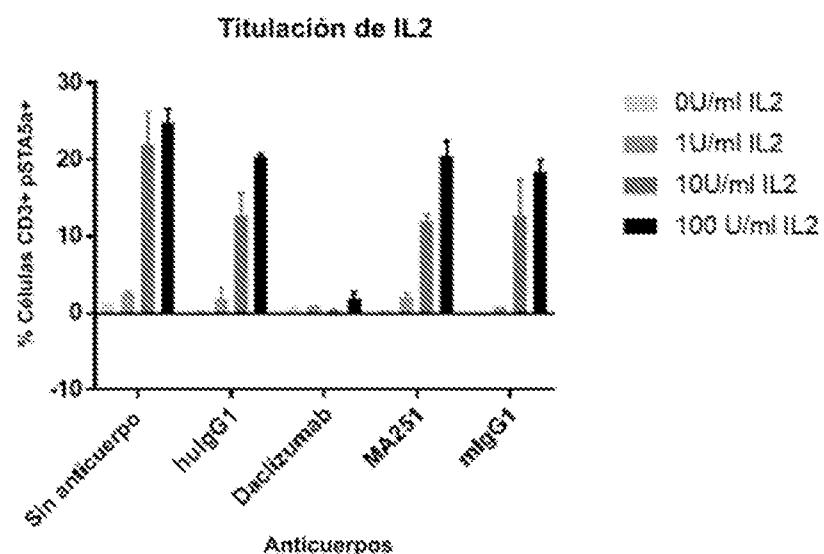


FIGURA 23

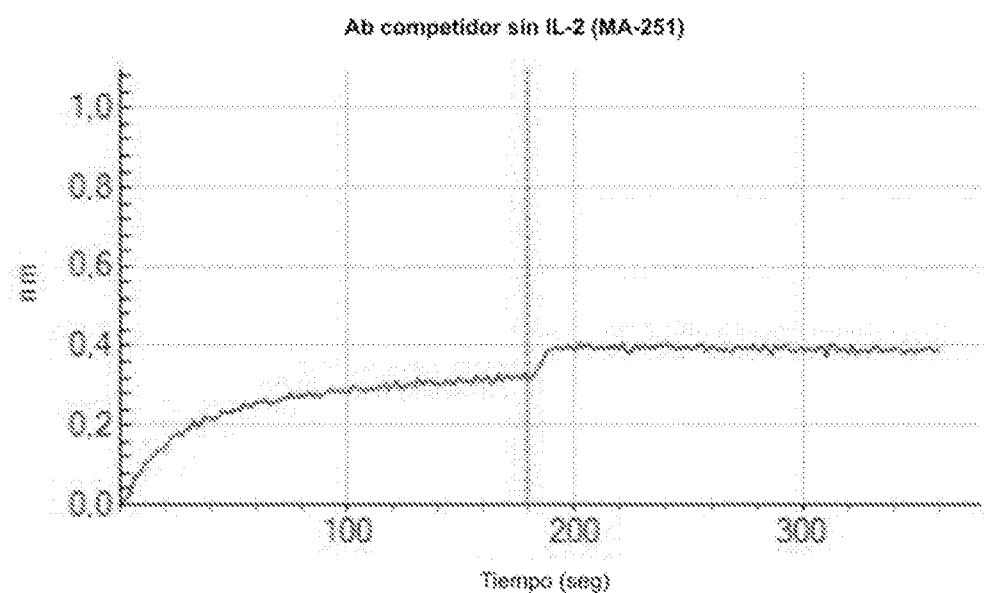


FIGURA 24

Datos Agrupados

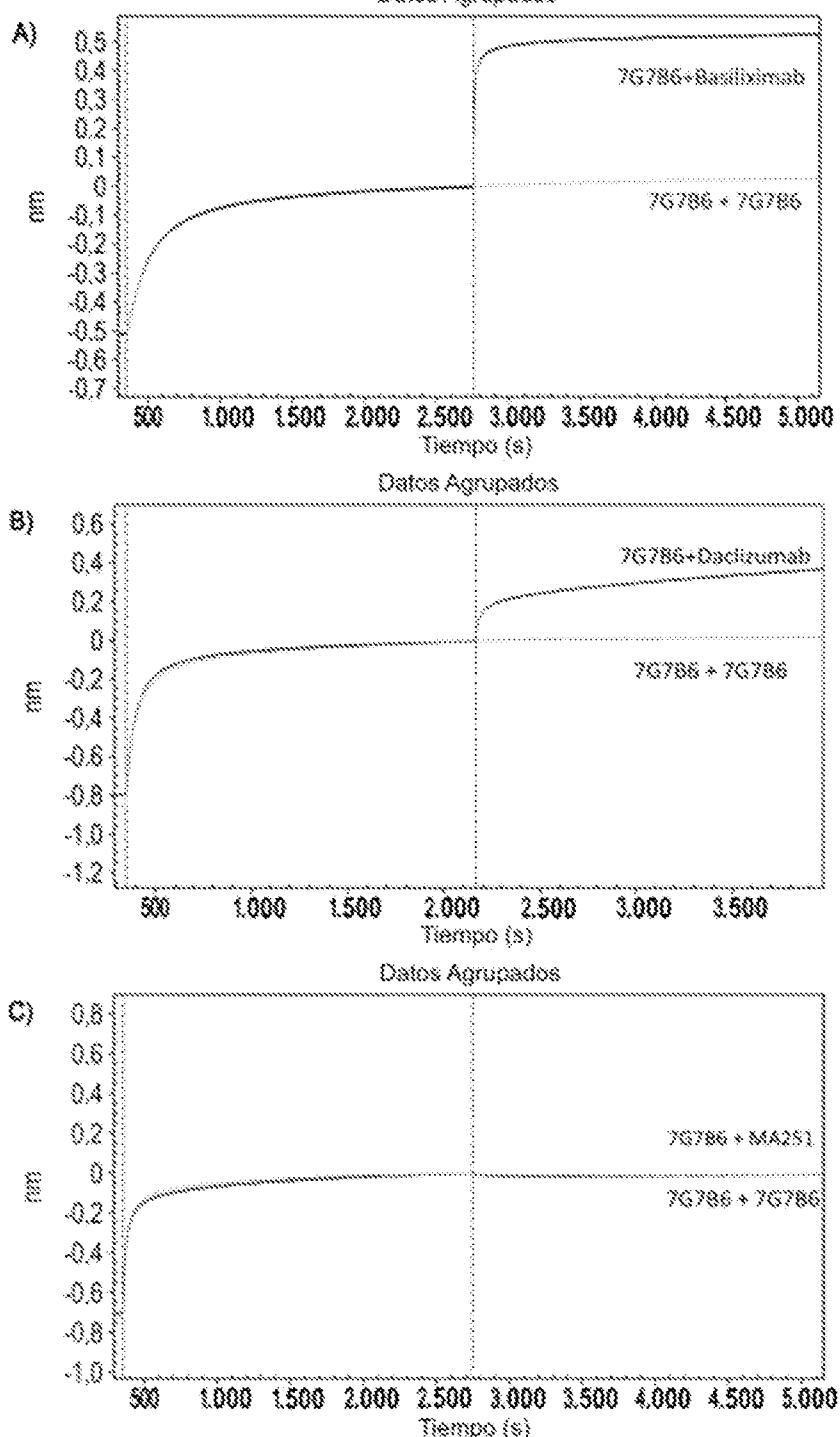


FIGURA 24 cont.

Datos Agrupados

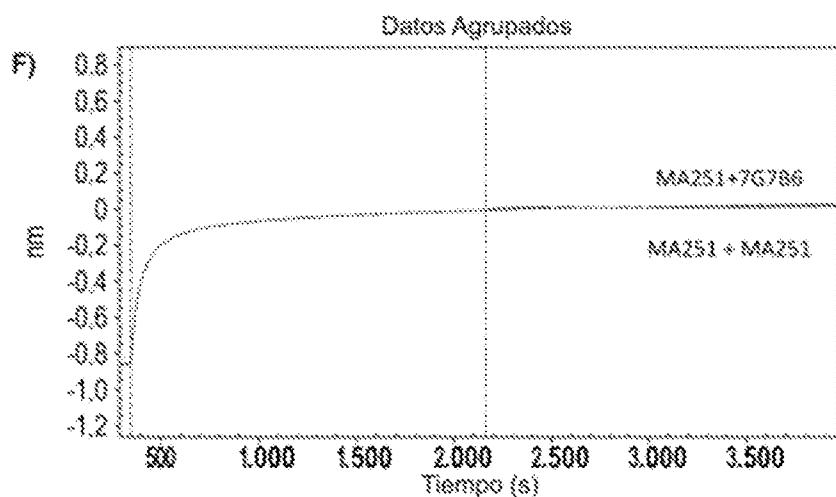
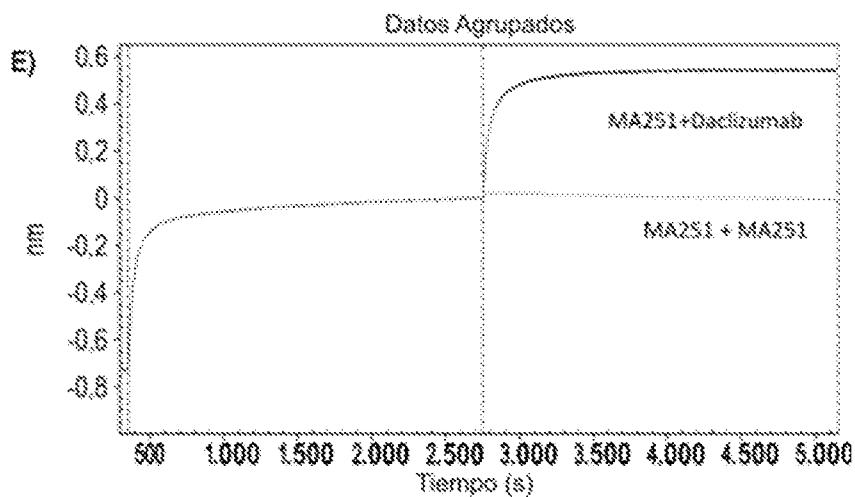
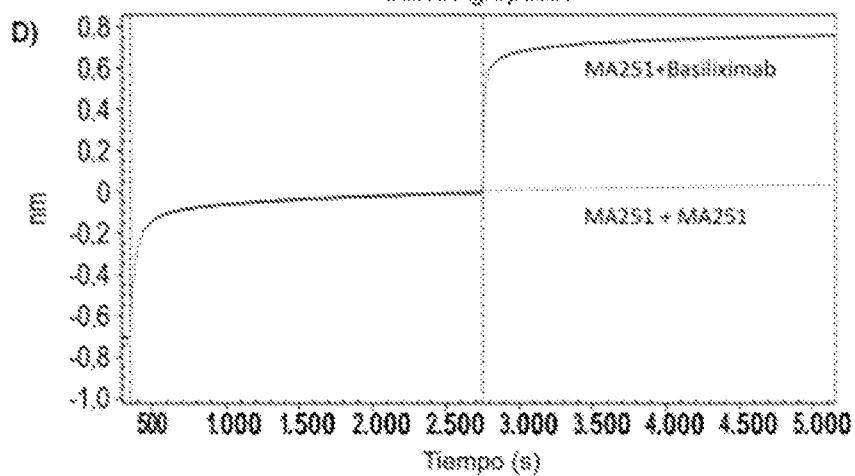


FIGURA 24 cont.

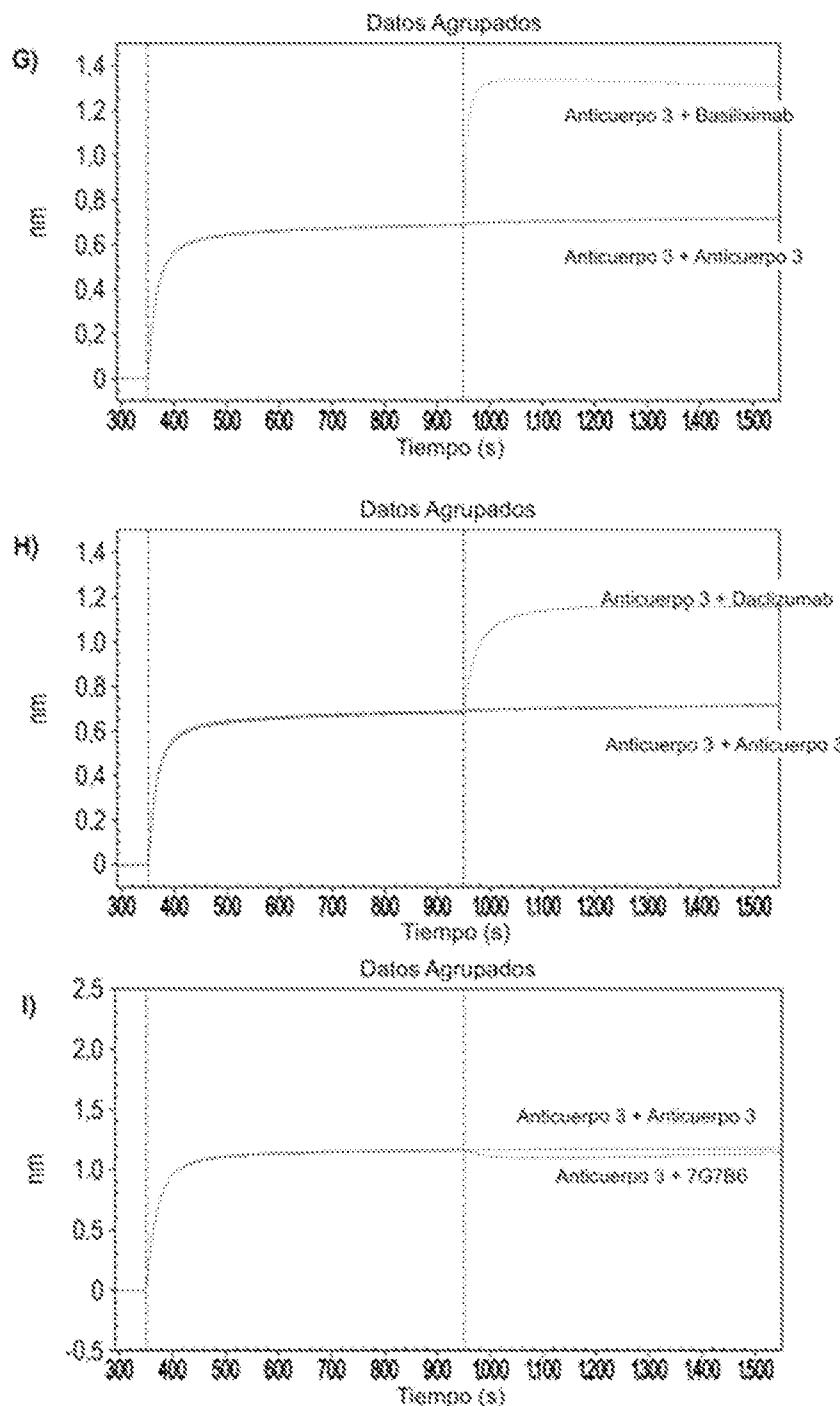


FIGURA 24 cont.

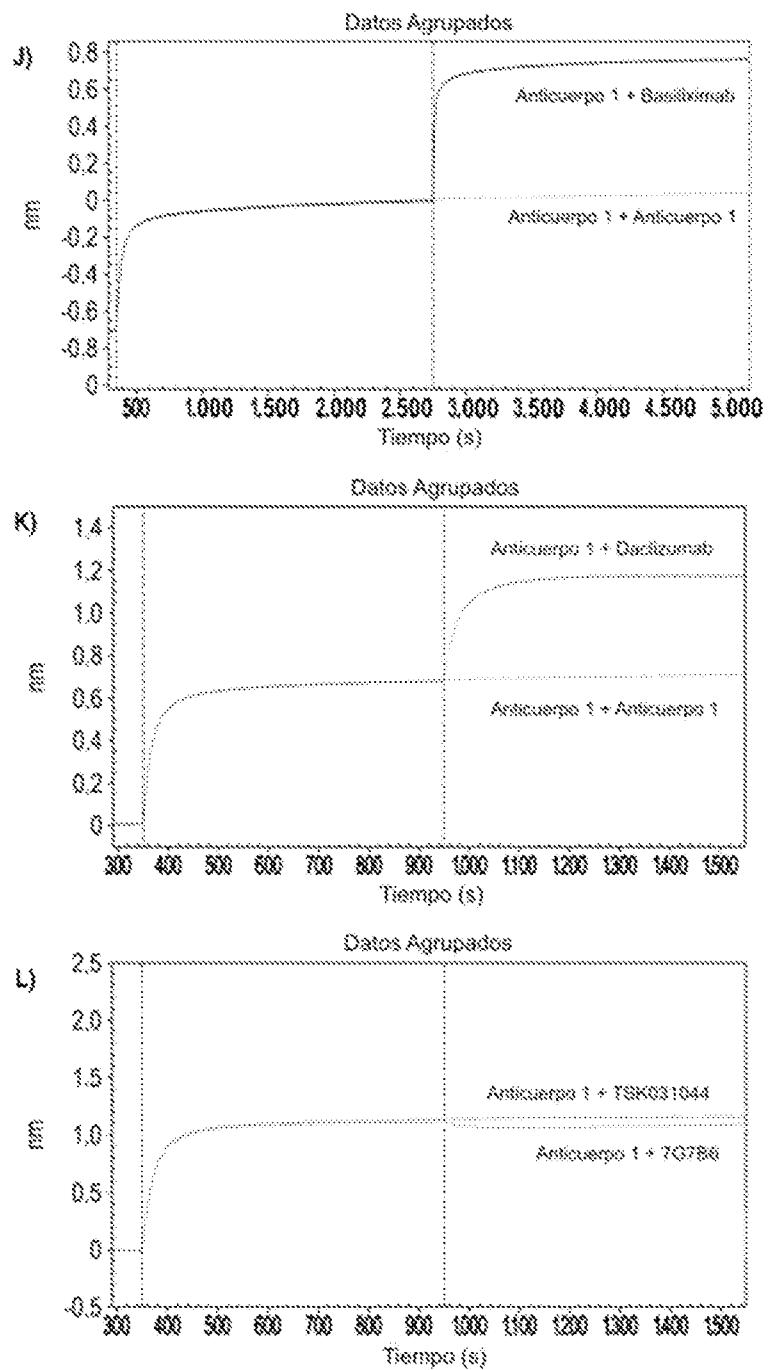
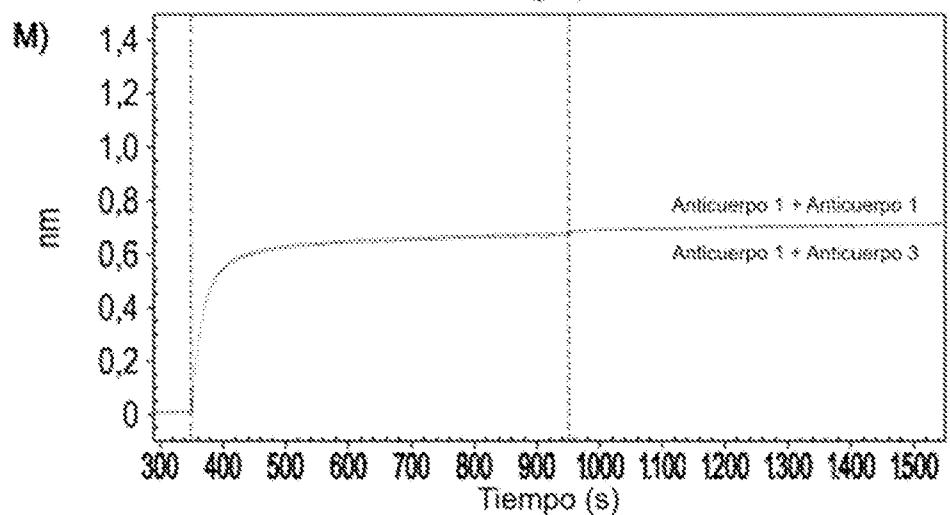


FIGURA 24 cont.

Datos Agrupados



Datos Agrupados

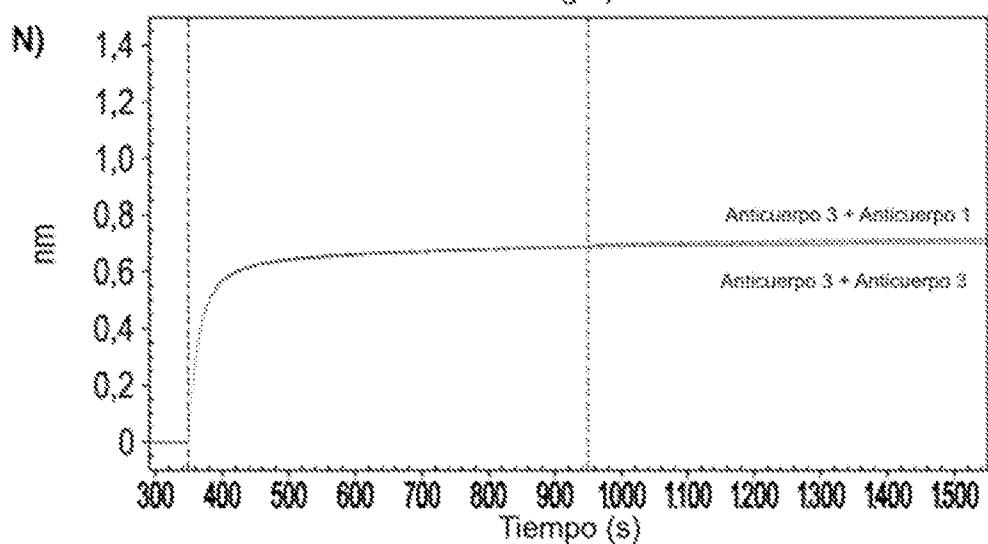


FIGURA 24 cont.

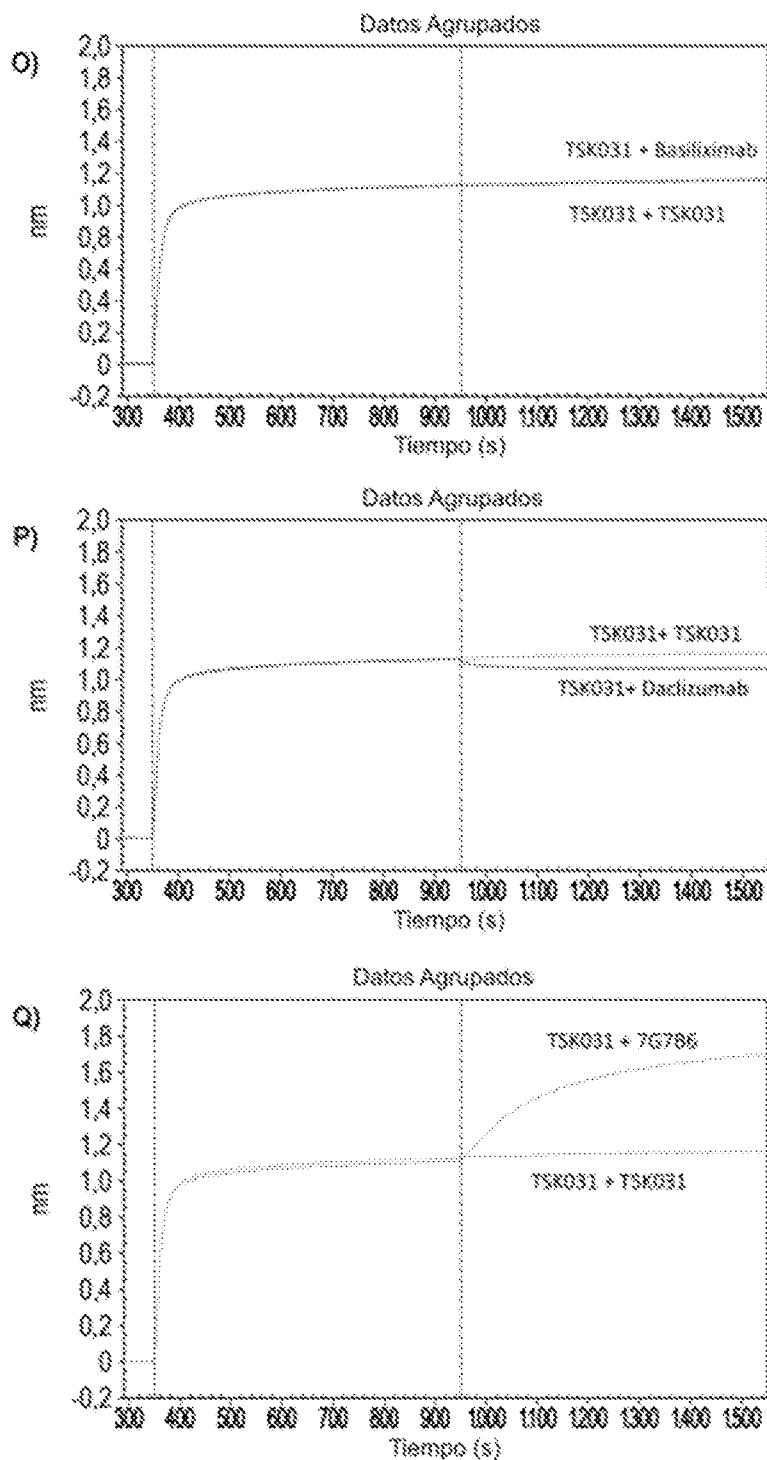


FIGURA 25

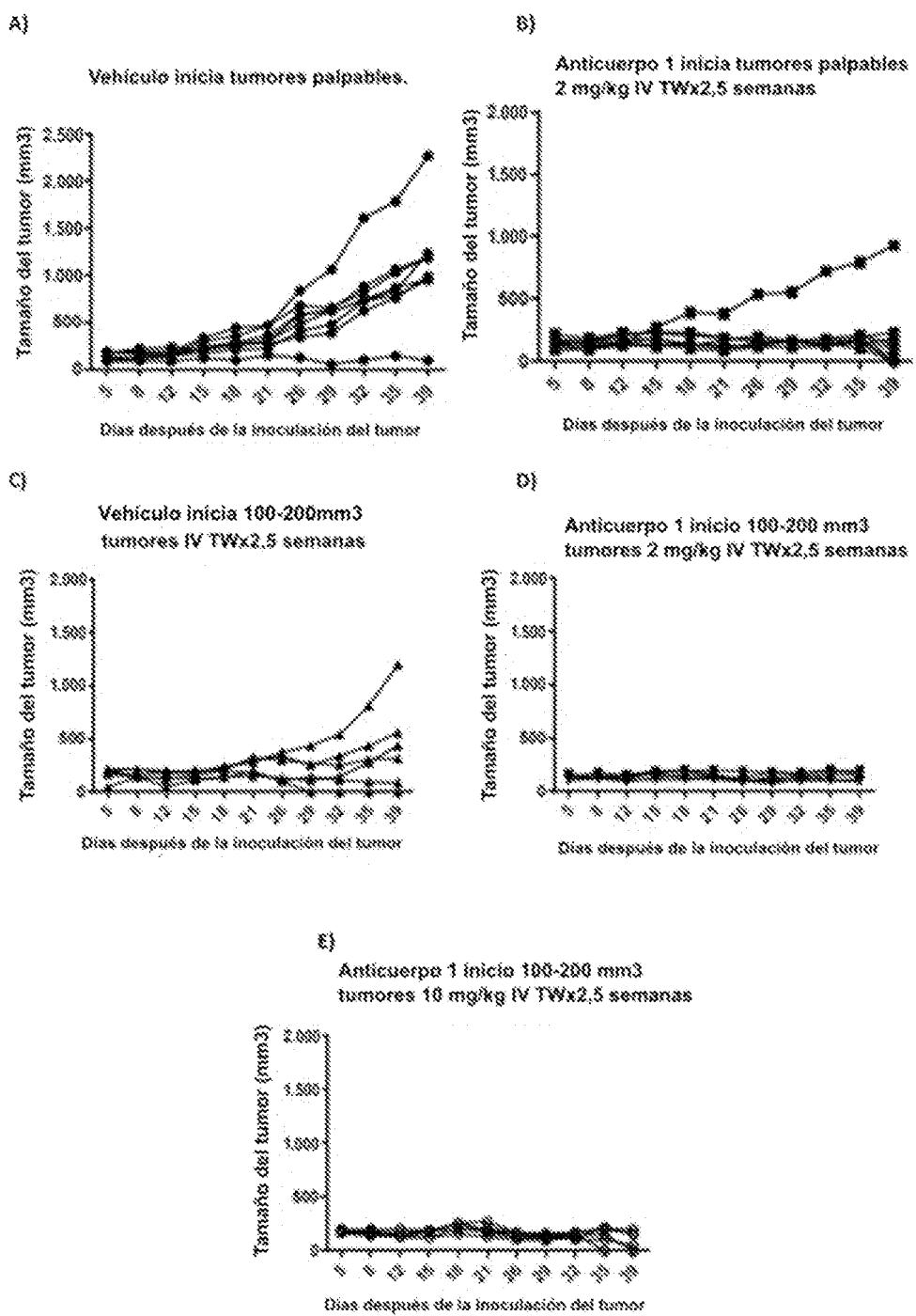
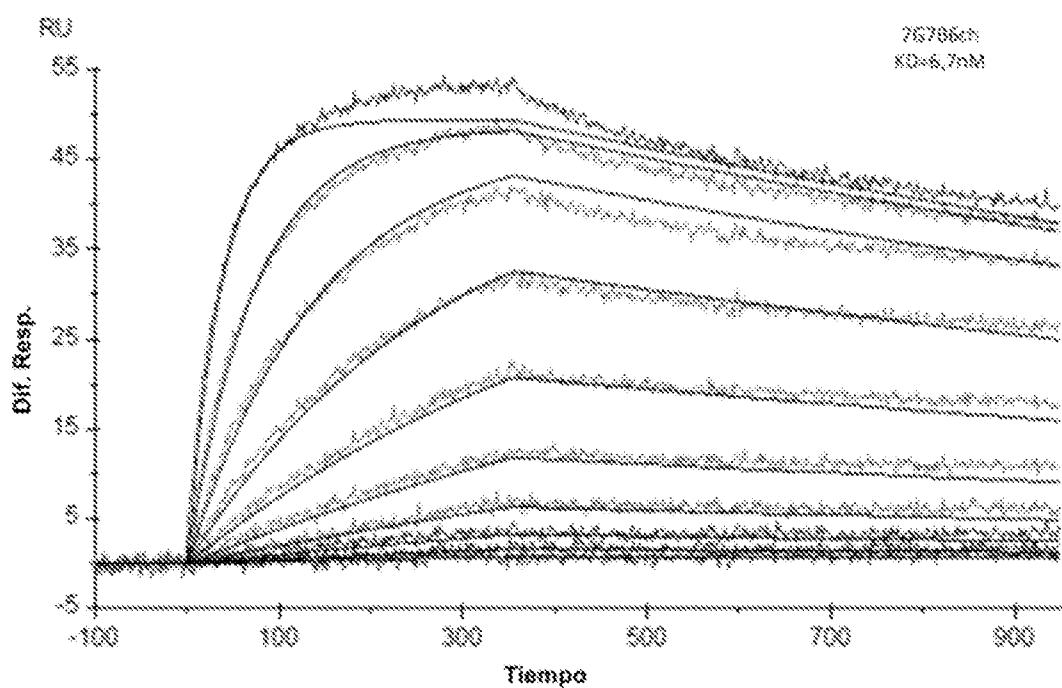


FIGURA 26

A)



B)

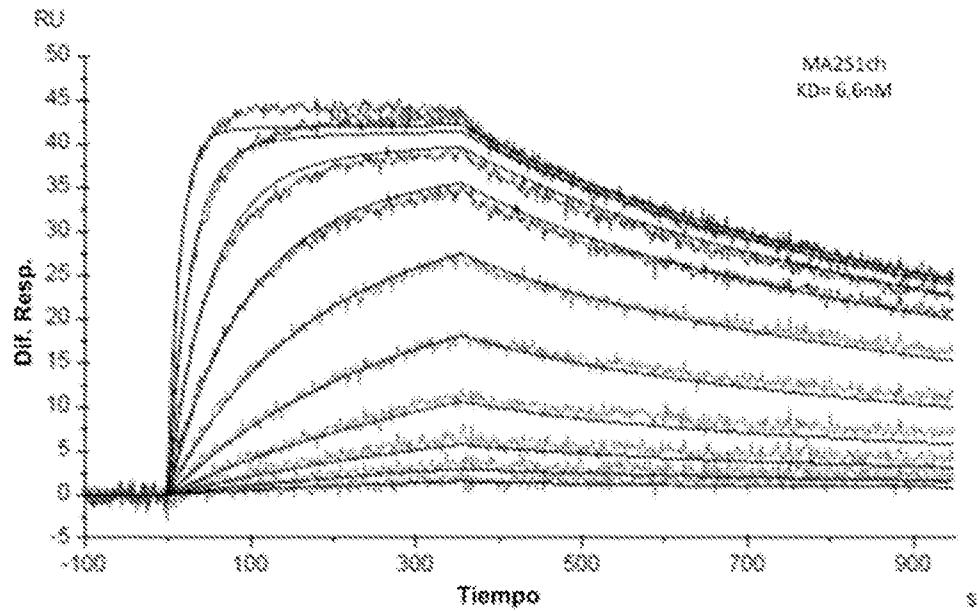
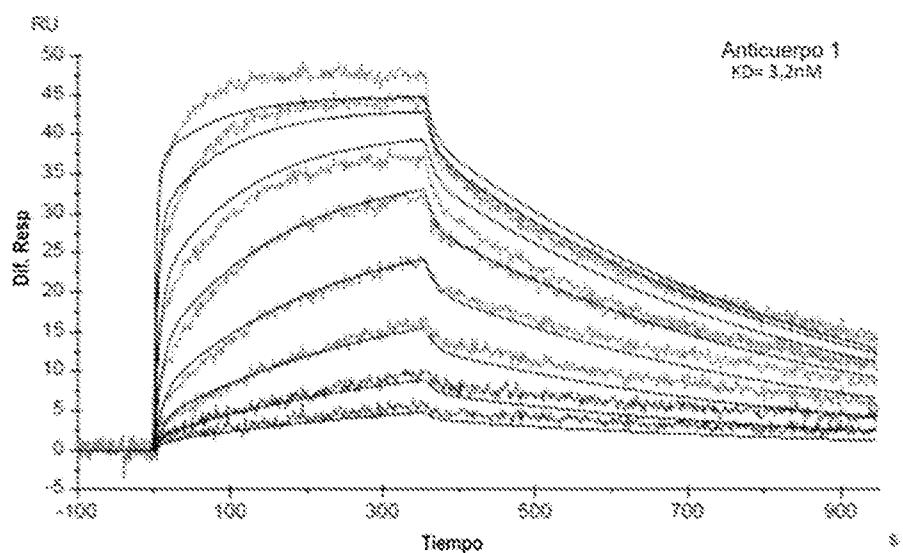


FIGURA 26 cont.

g)



o)

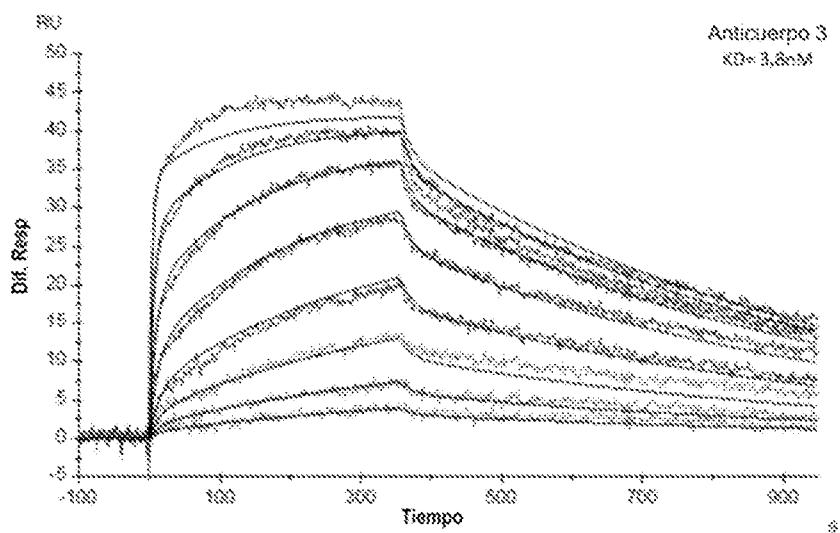


FIGURA 26 cont.

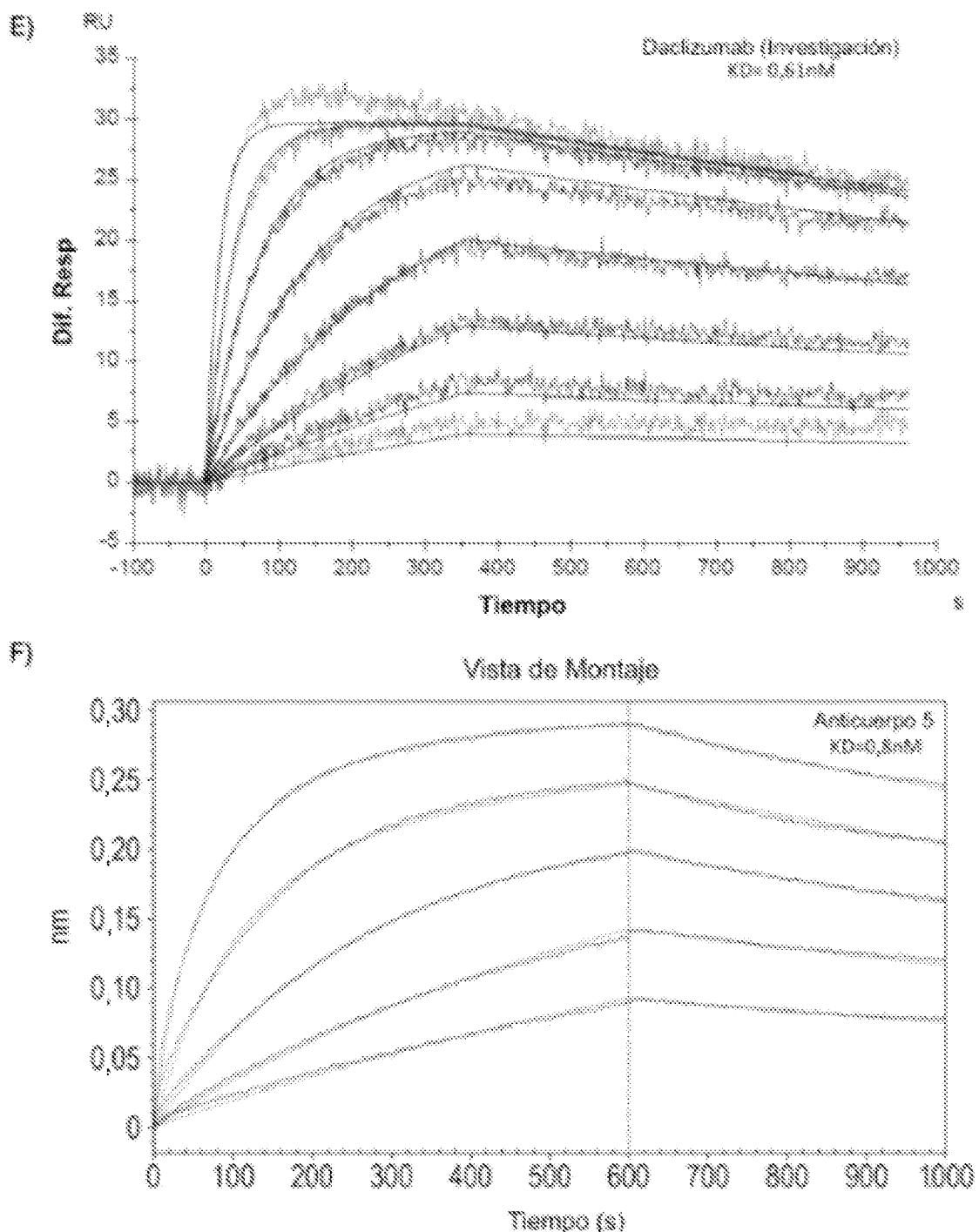
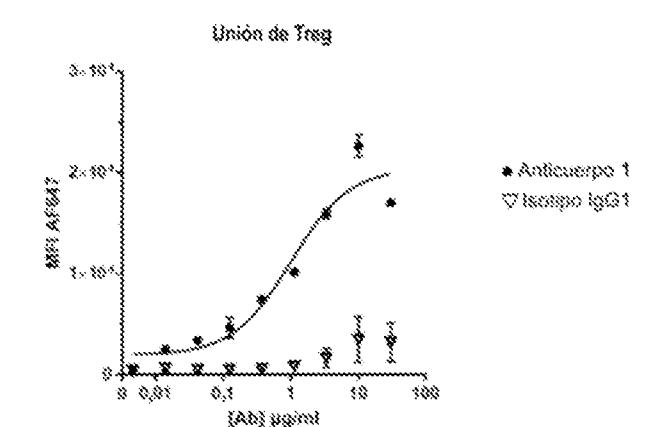
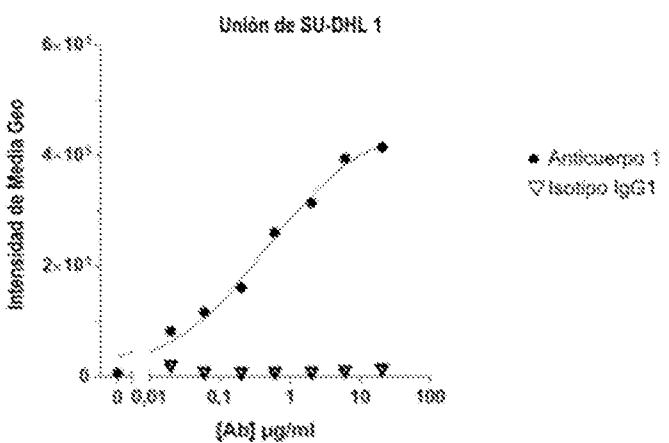


FIGURA 27

A)



B)



C)

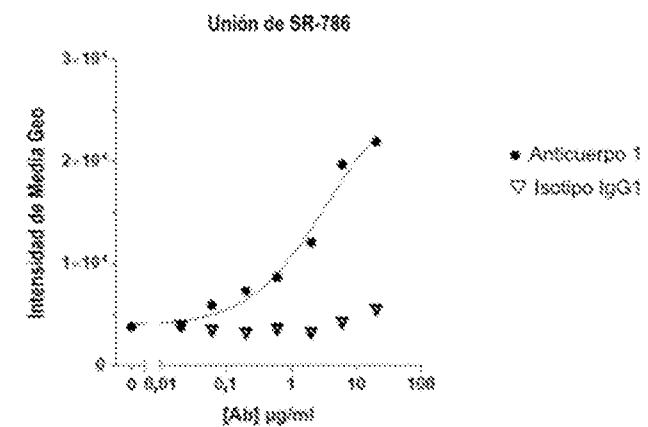


FIGURA 28

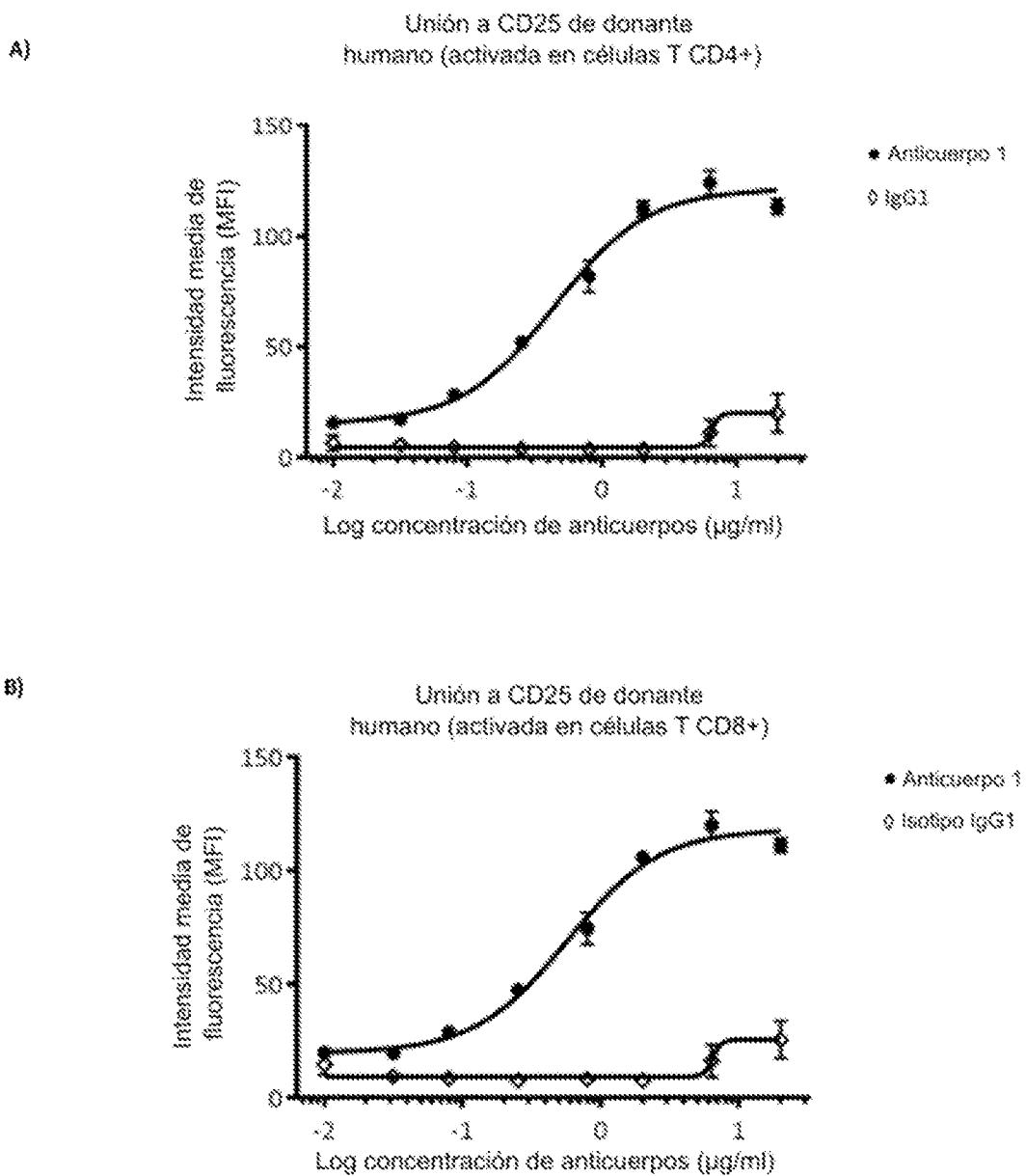
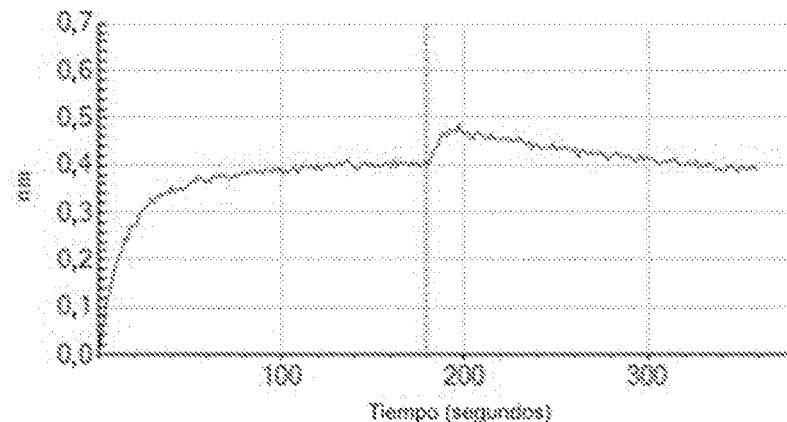


FIGURA 29

Ab competidor sin IL-2 (Anticuerpo 1)

A)



B)

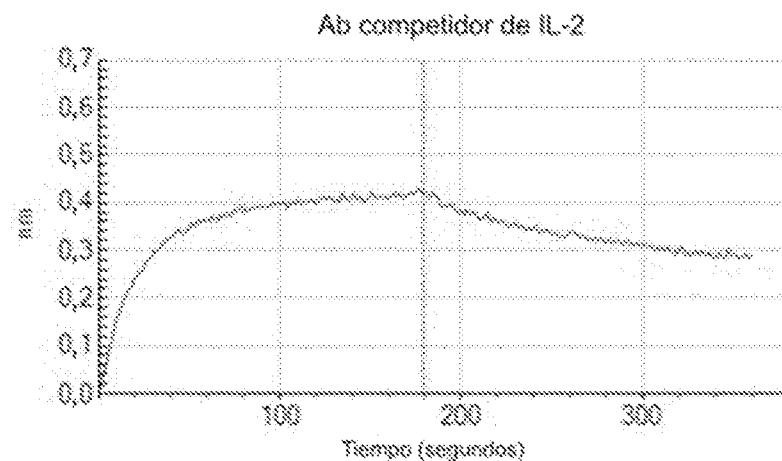


FIGURA 30

La unión competitiva a Dacizumab se determina mediante Octet

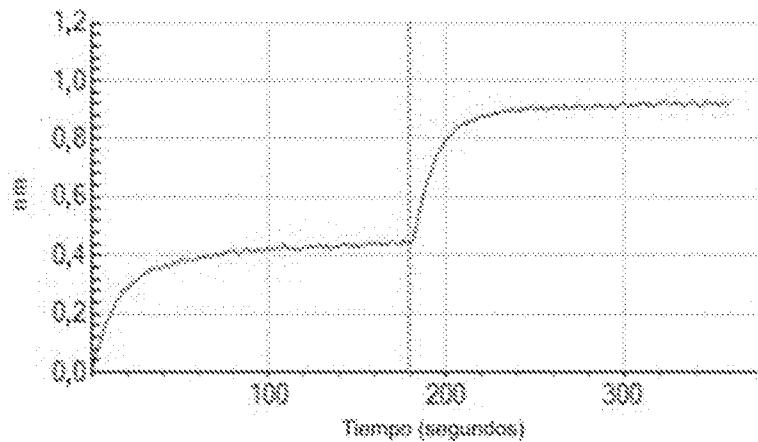


FIGURA 31
Titulación de IL2

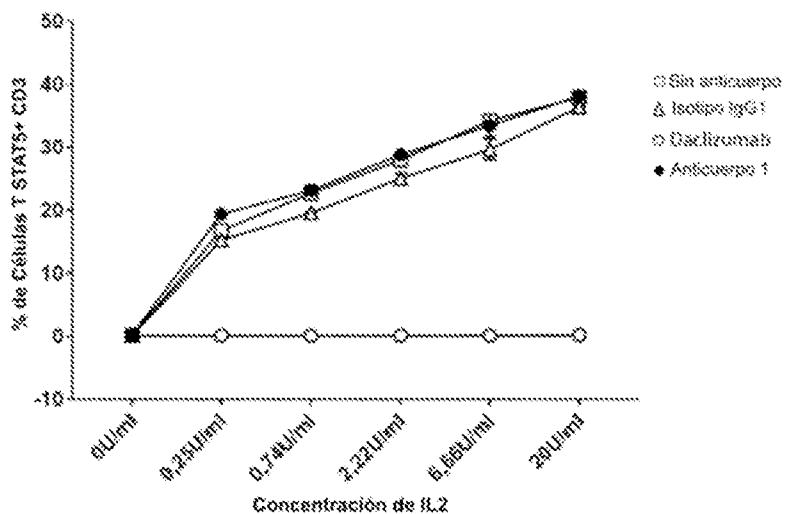


FIGURA 32

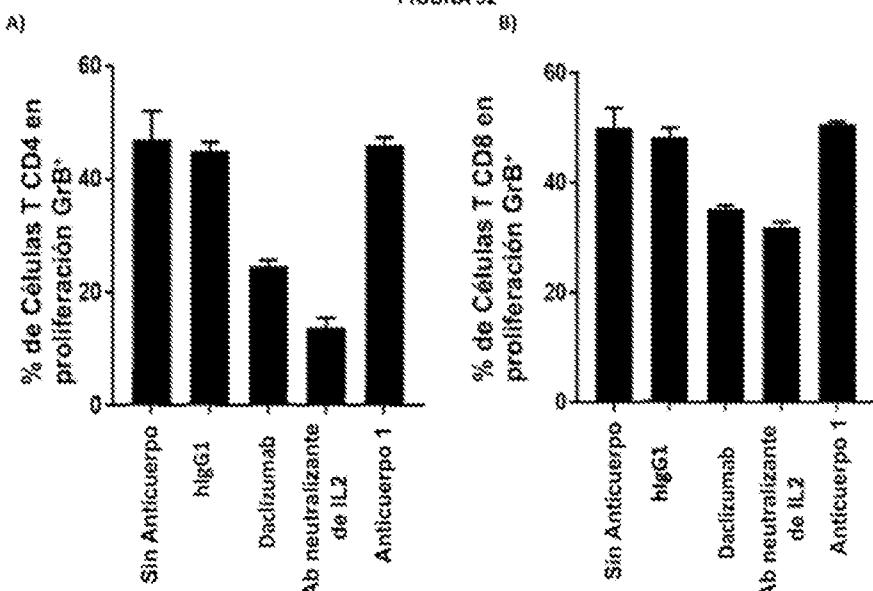


FIGURA 33

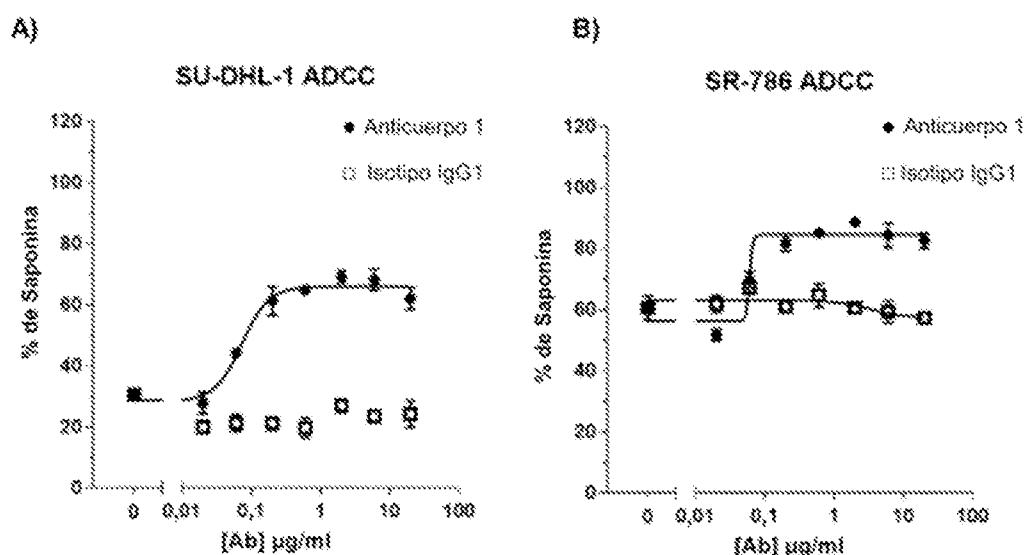


FIGURA 34

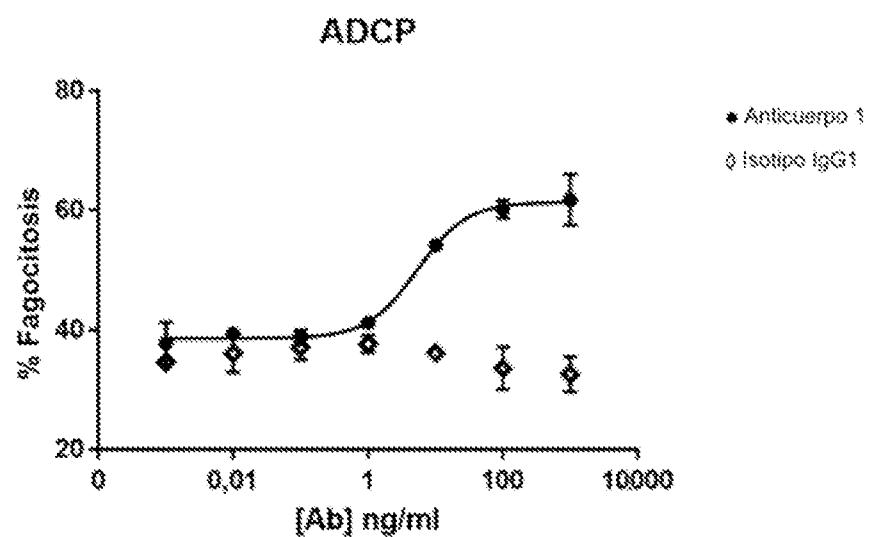


FIGURA 35

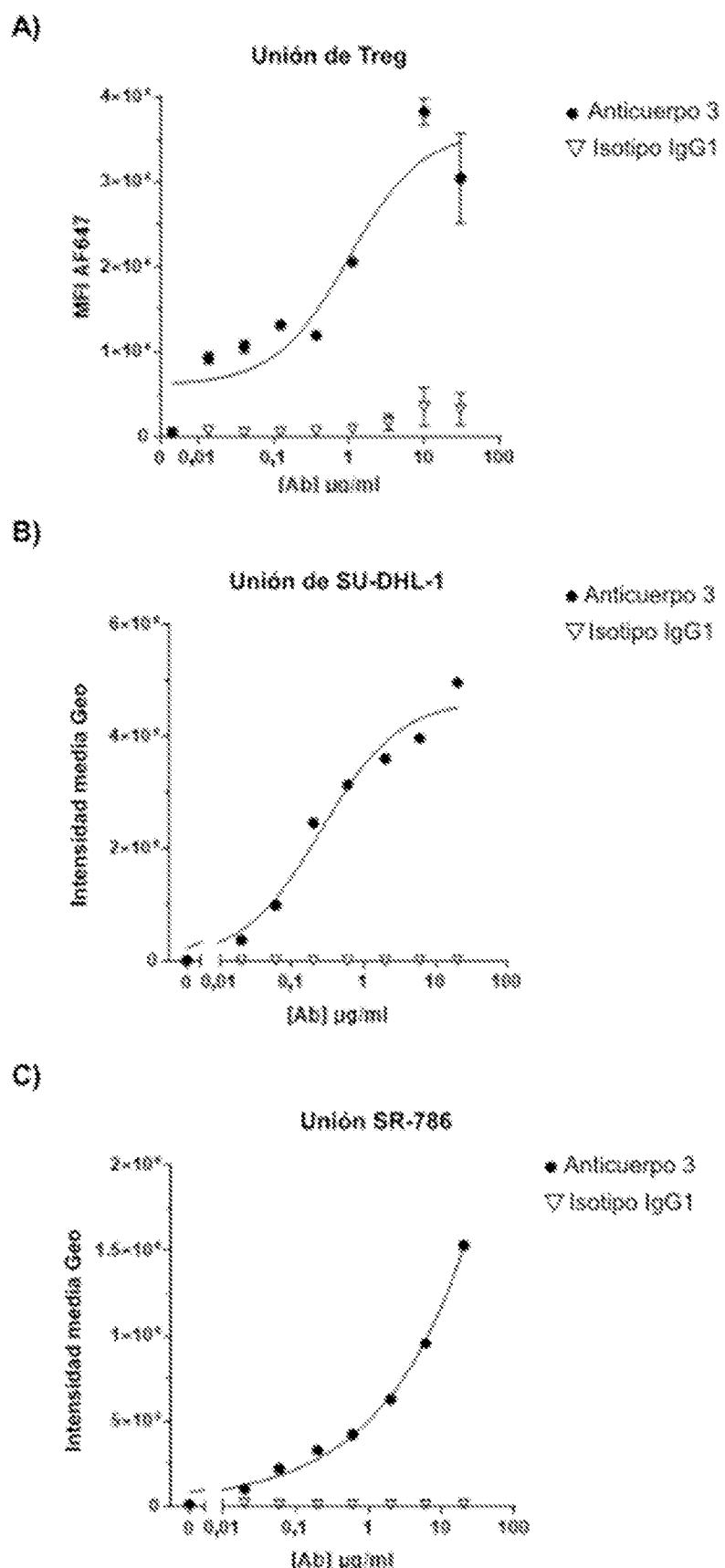
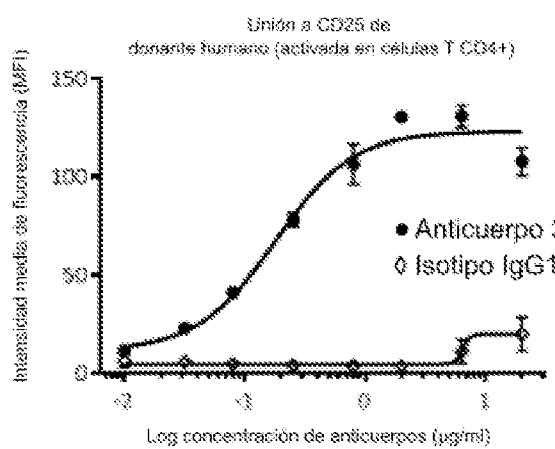
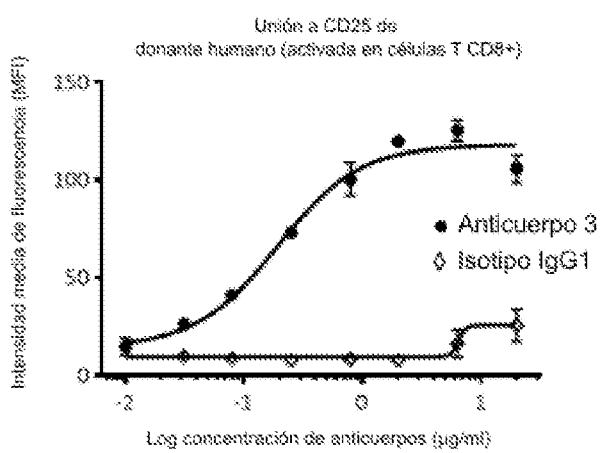


FIGURA 36

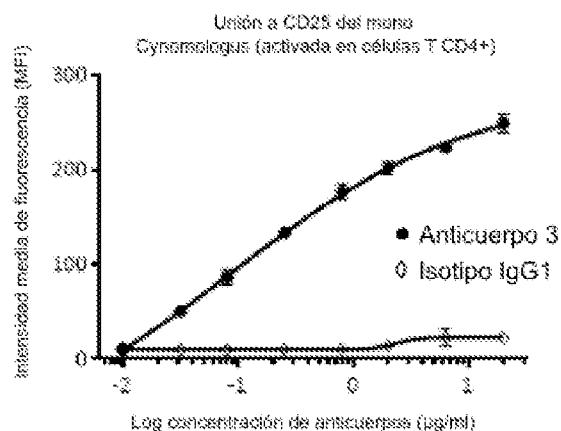
A)



B)



C)



D)

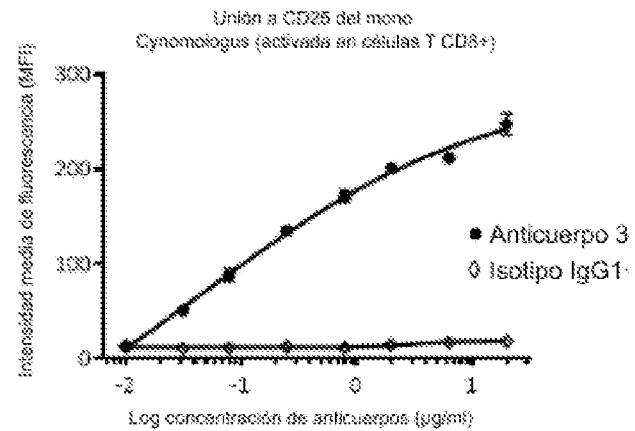


FIGURA 37

Ab competidor sin IL-2 (Anticuerpo 3)

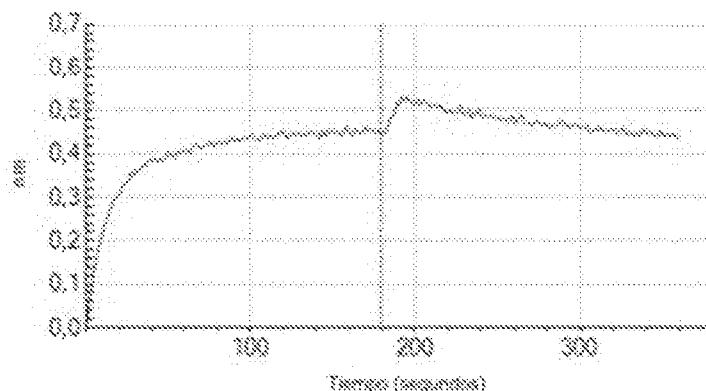


FIGURA 38

La unión competitiva a Dacizumab se determina mediante Octet

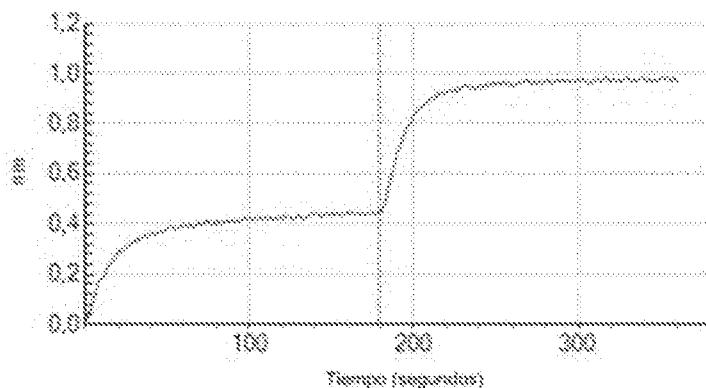


FIGURA 39

Titulación de IL2

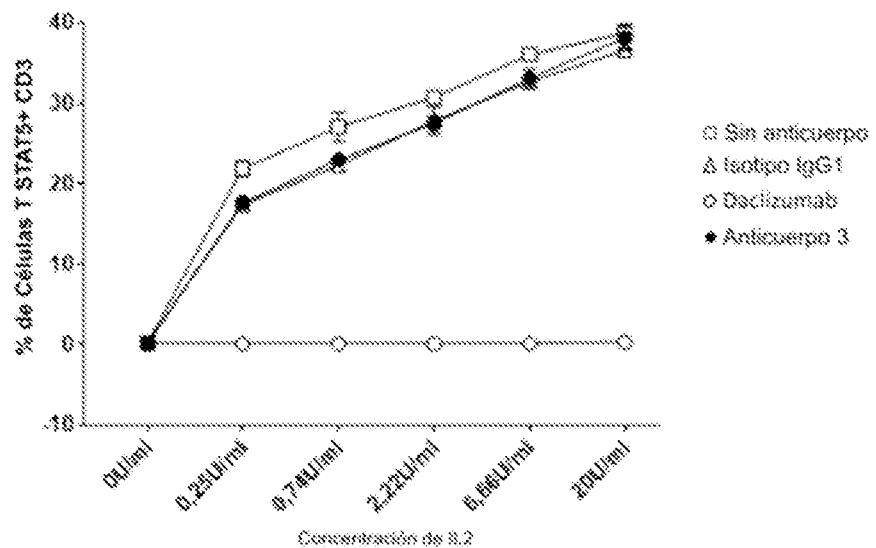
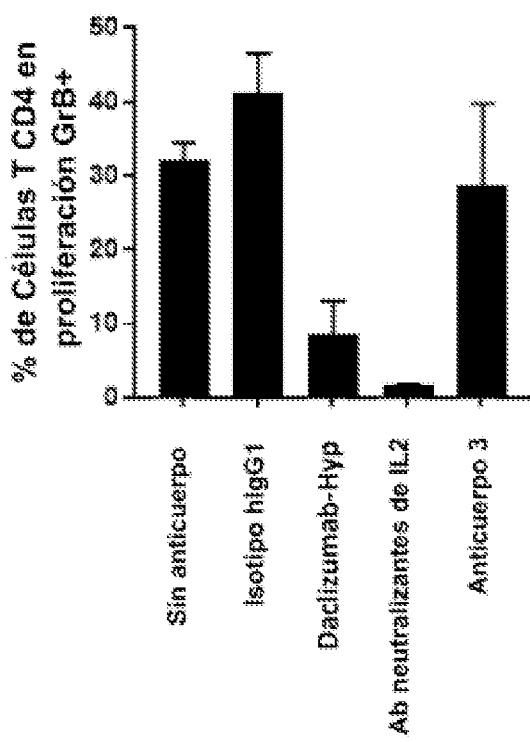


FIGURA 40

A)

Células T Pan - Células CD4 en proliferación GrB+



B)

Células T Pan - Células CD8 en proliferación GrB+

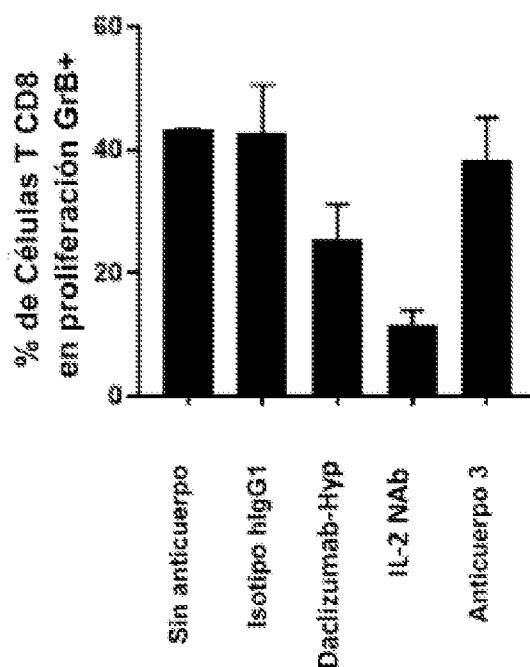


FIGURA 41

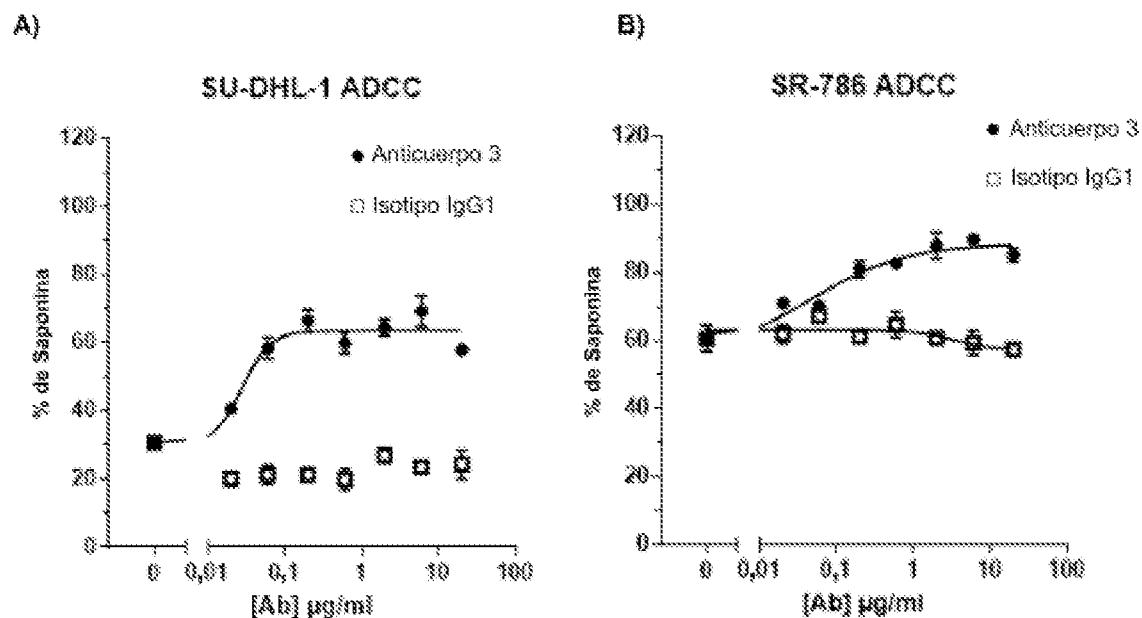


FIGURA 42

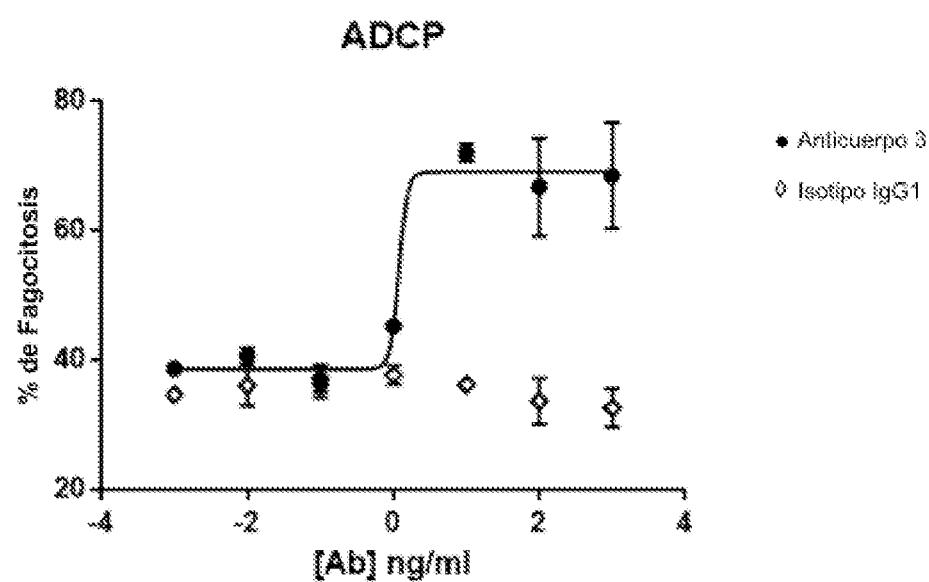
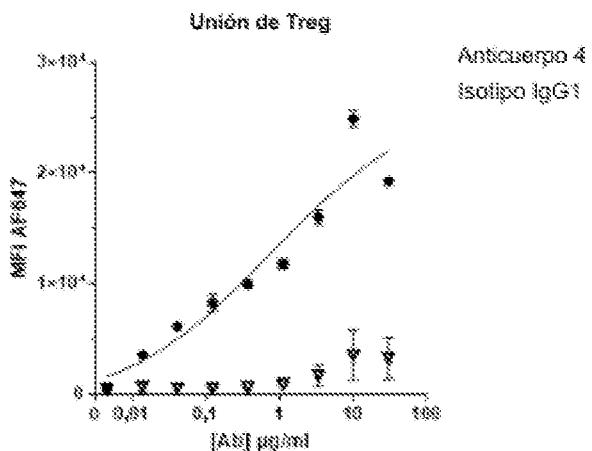
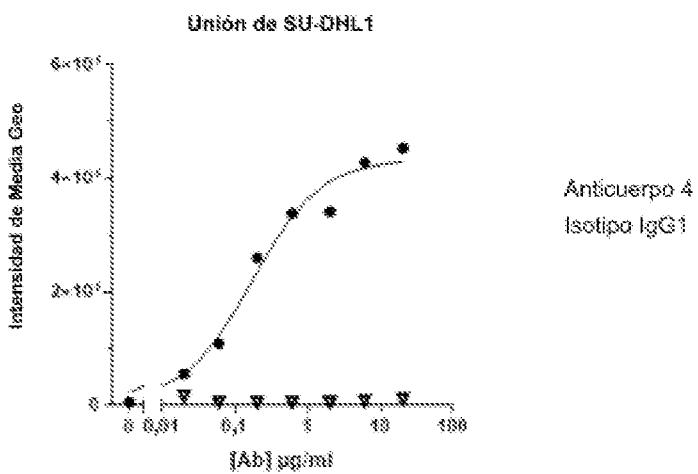


FIGURA 43

A)



B)



C)

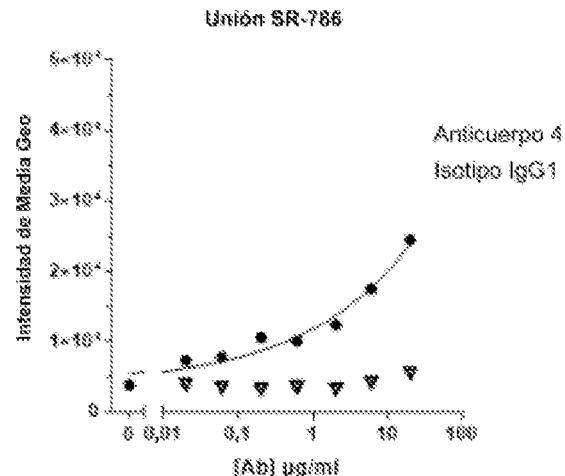


FIGURA 44

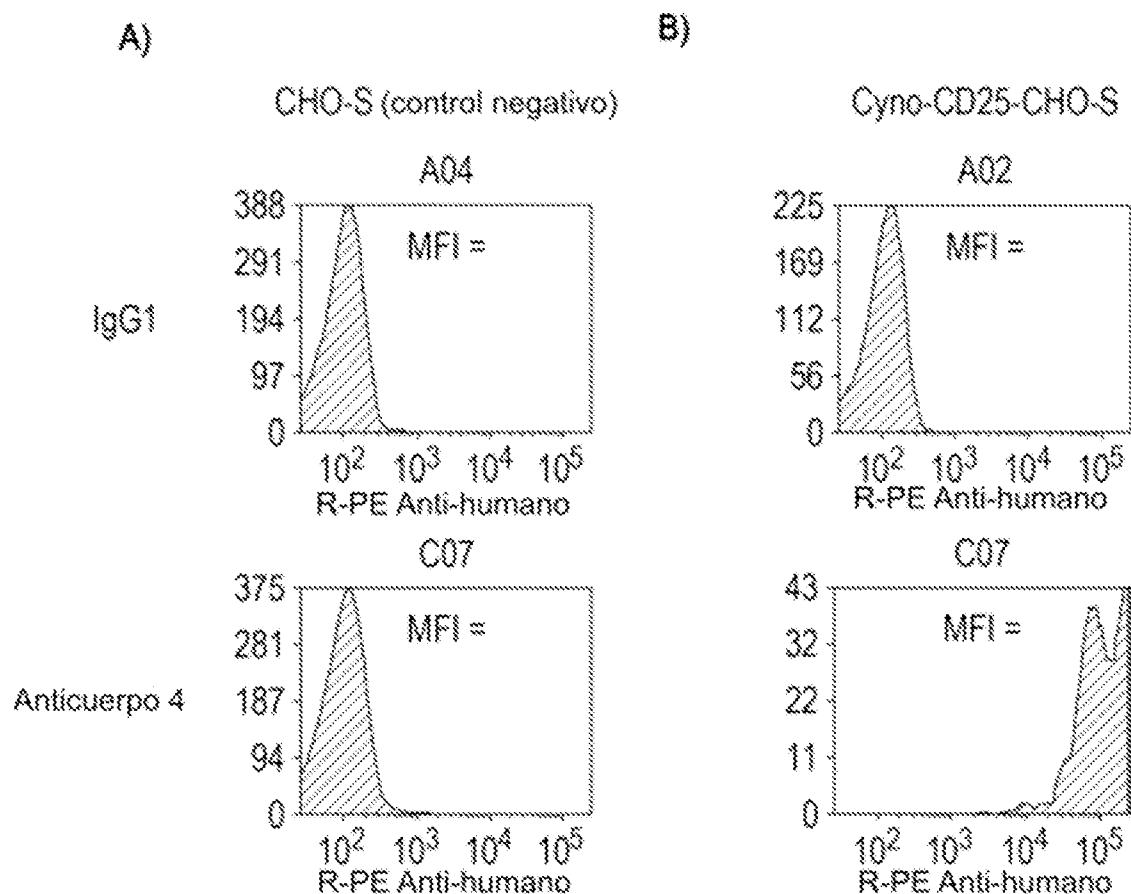


FIGURA 45

Ab competidor sin IL-2 (Anticuerpo 4)

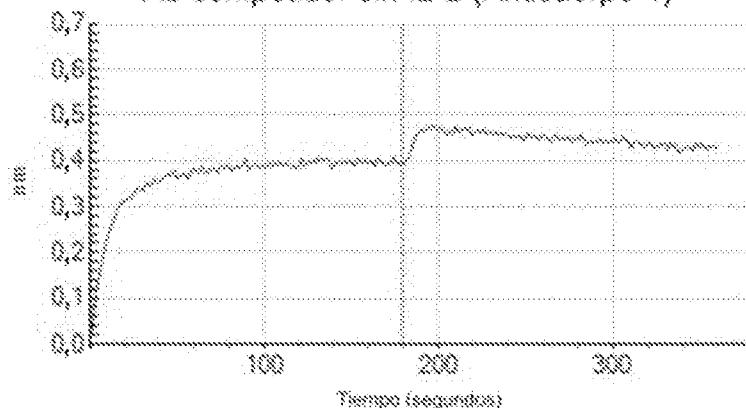


FIGURA 46

La unión competitiva a Dacizumab se determina mediante Octet

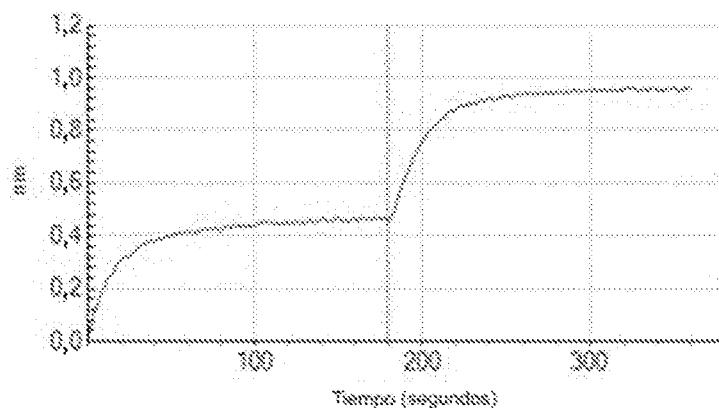


FIGURA 47

Titulación de IL2

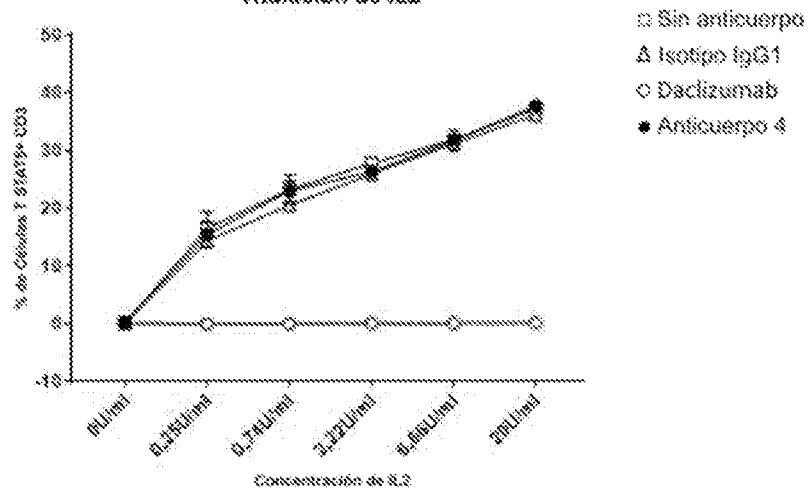
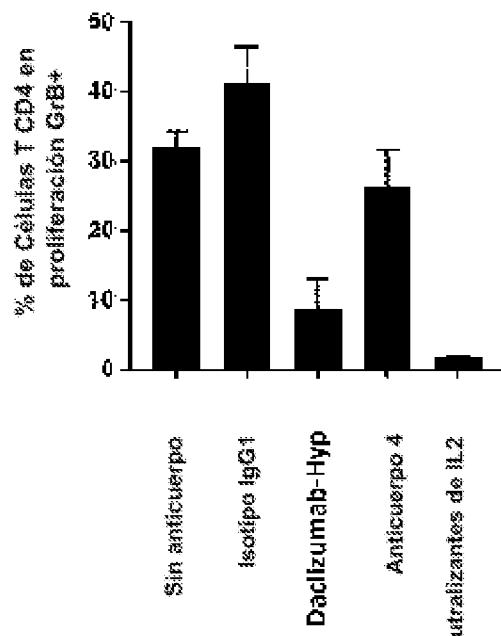


FIGURA 48

A)

Células T Pan - Células CD4 en proliferación GrB+



B)

Células T Pan - Células CD8 en proliferación GrB+

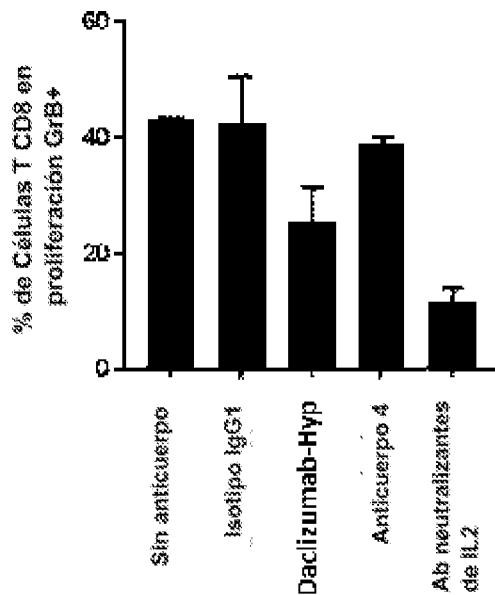


FIGURA 49

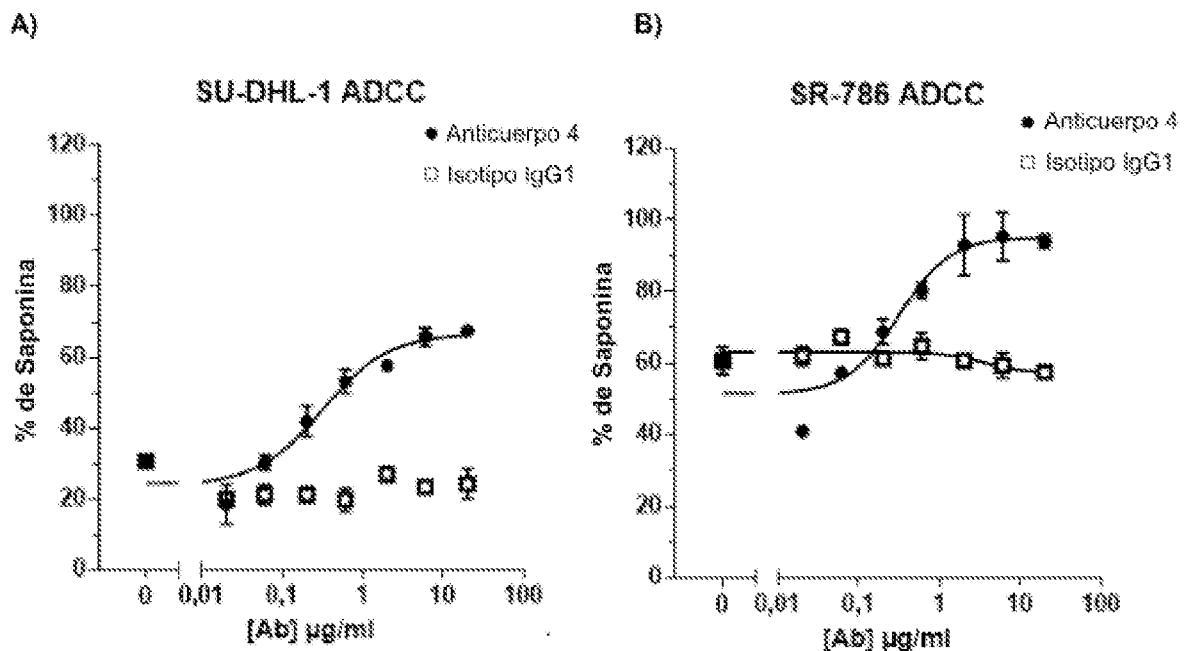


FIGURA 50

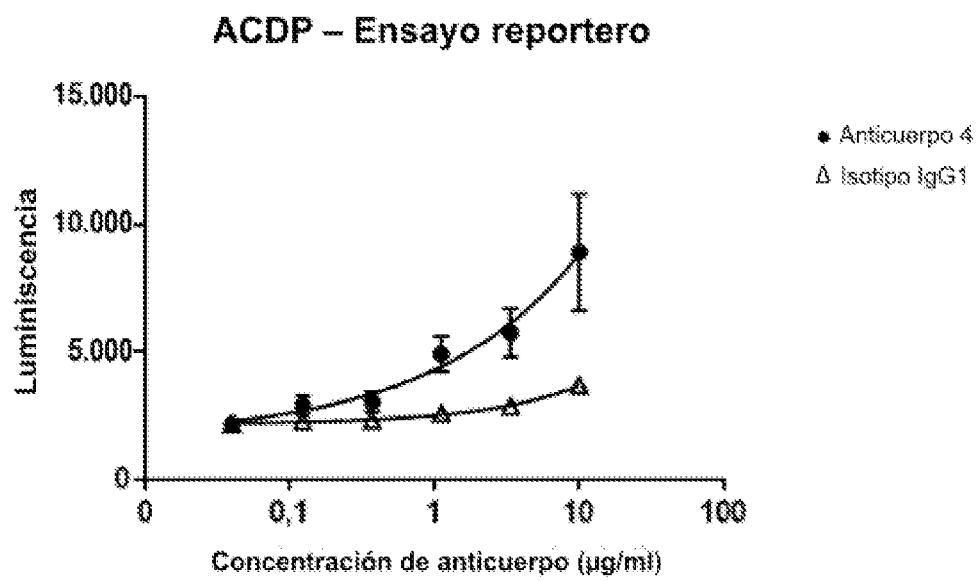
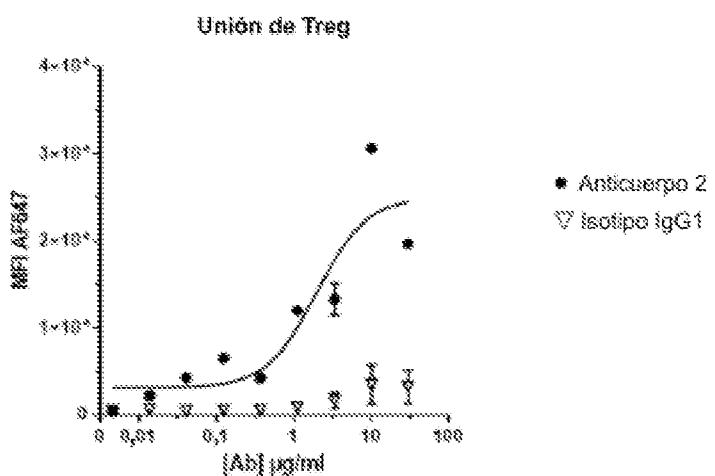
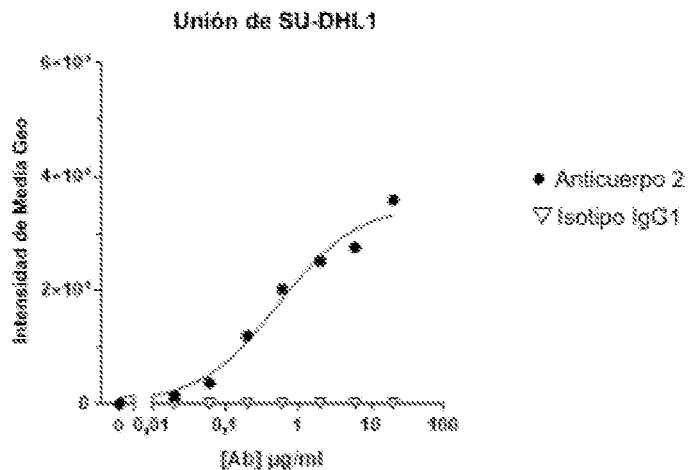


FIGURA S1

A)



B)



C)

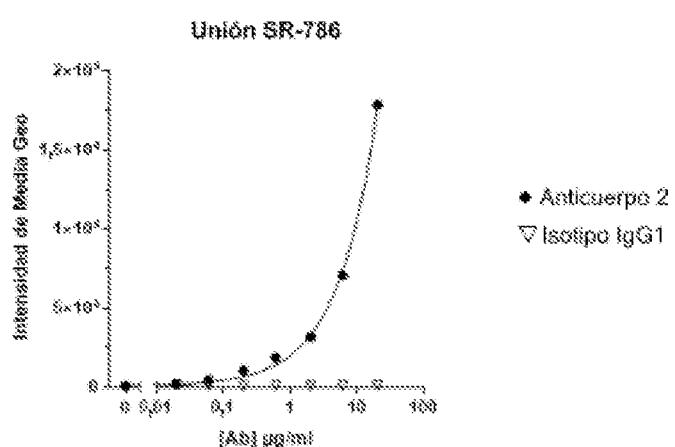
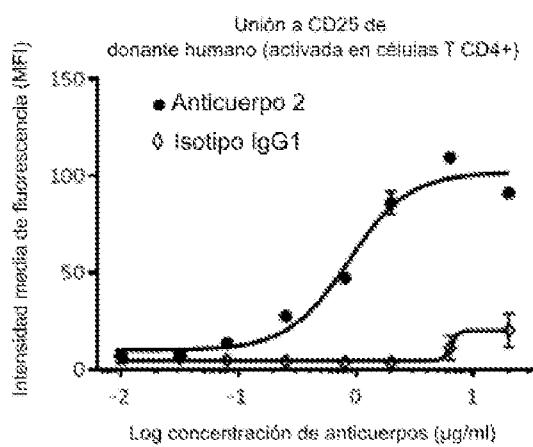
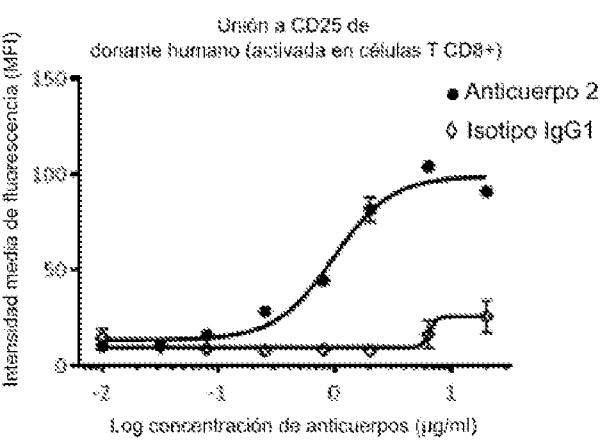


FIGURA 52

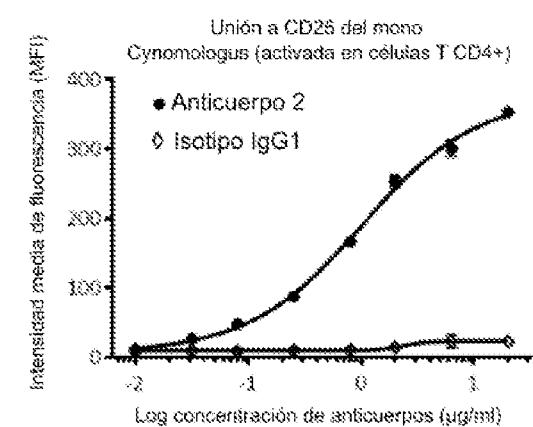
A)



B)



C)



D)

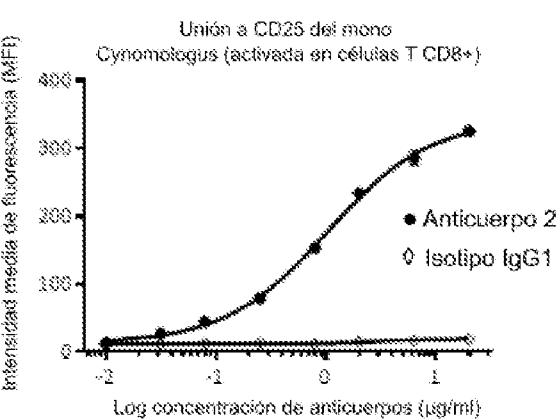


FIGURA 53

Ab competidor sin IL-2 (Anticuerpo 2)

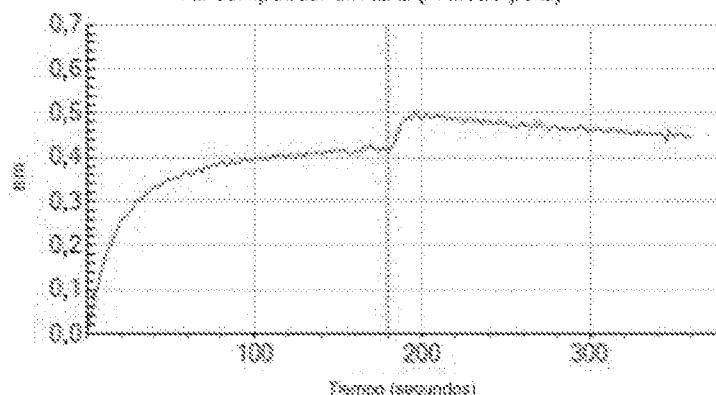


FIGURA 54

La unión competitiva a Dacizumab se determina mediante Octet

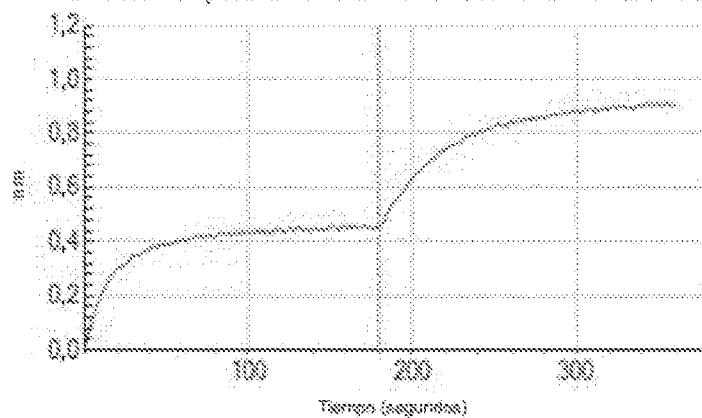


FIGURA 55

Titulación de IL-2

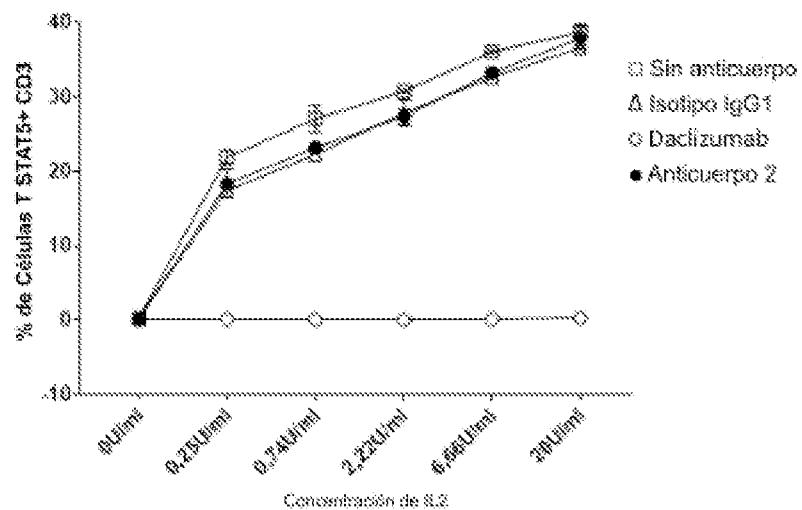
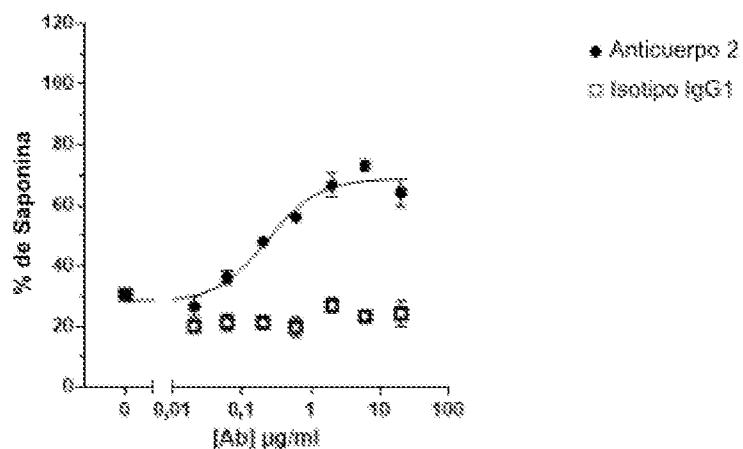


FIGURA 56

A)

SU-DHL-1 ADCC



B)

SR-786 ADCC

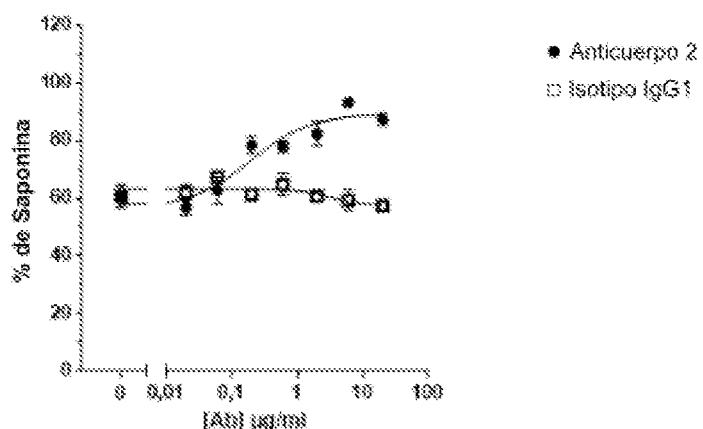


FIGURA 57
ADCP

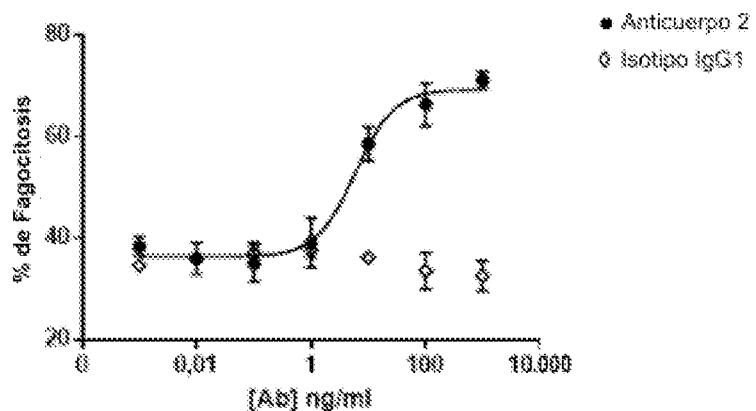


Figura 58

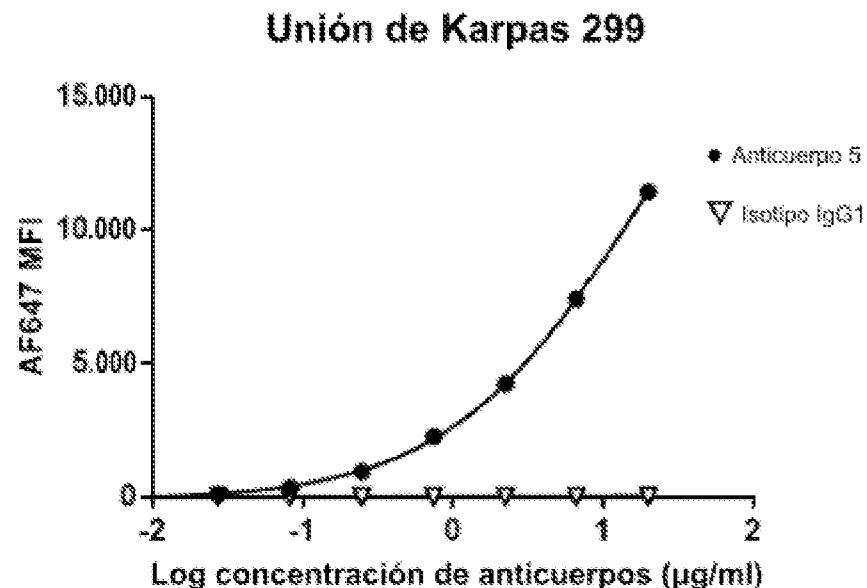


Figura 59

Abs anti-CD25 bloqueantes versus no bloqueantes

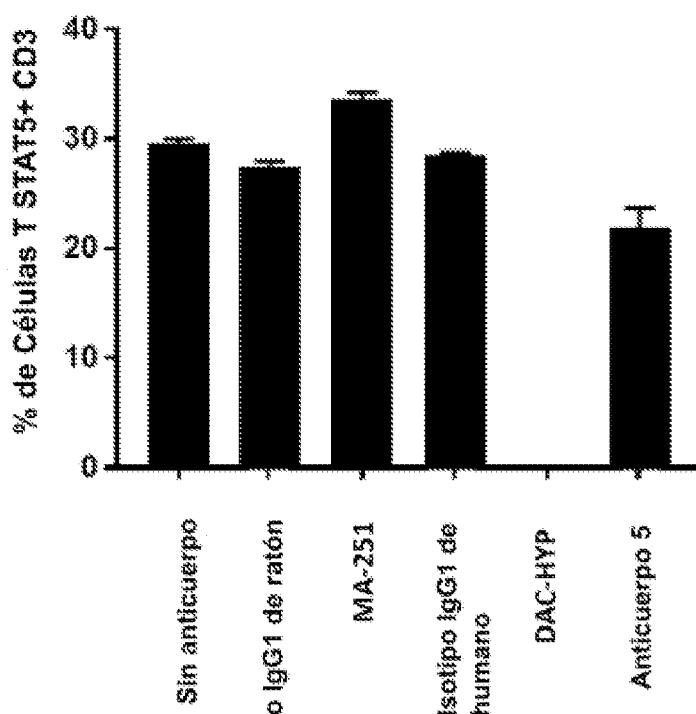


FIGURA 60

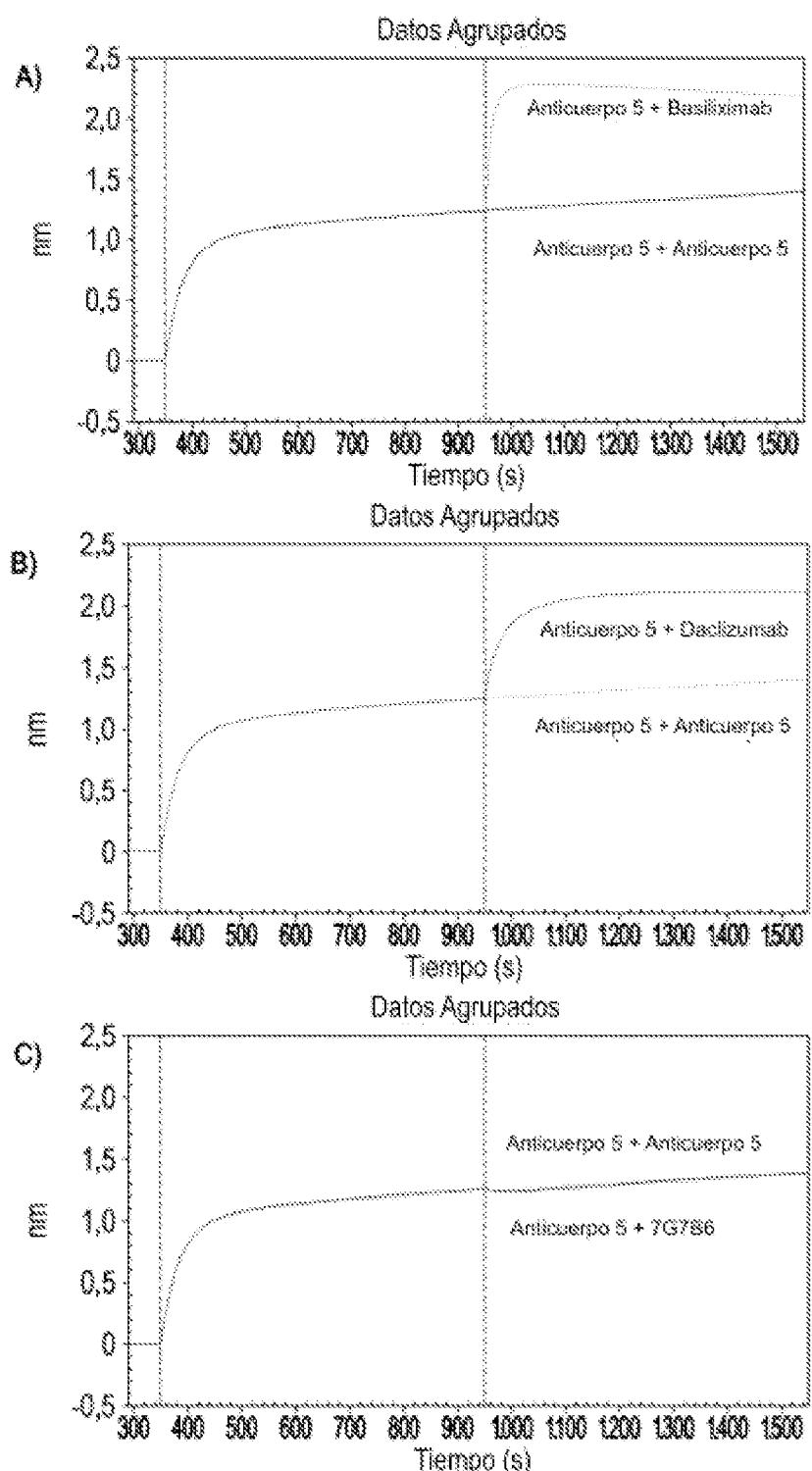


Figura 61

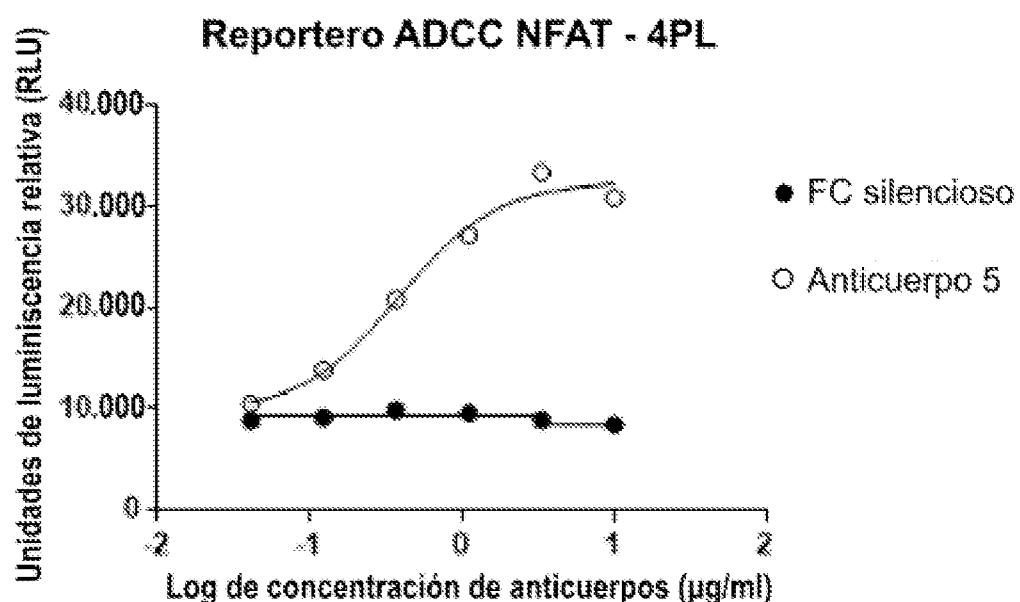


Figura 62

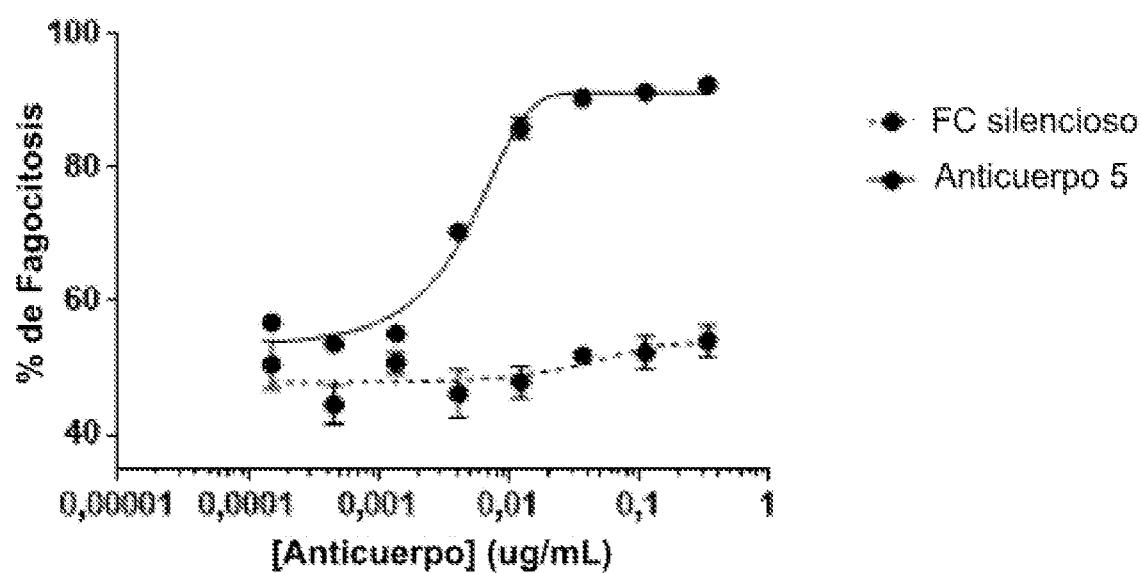
Actividad de APCP

Figura 63

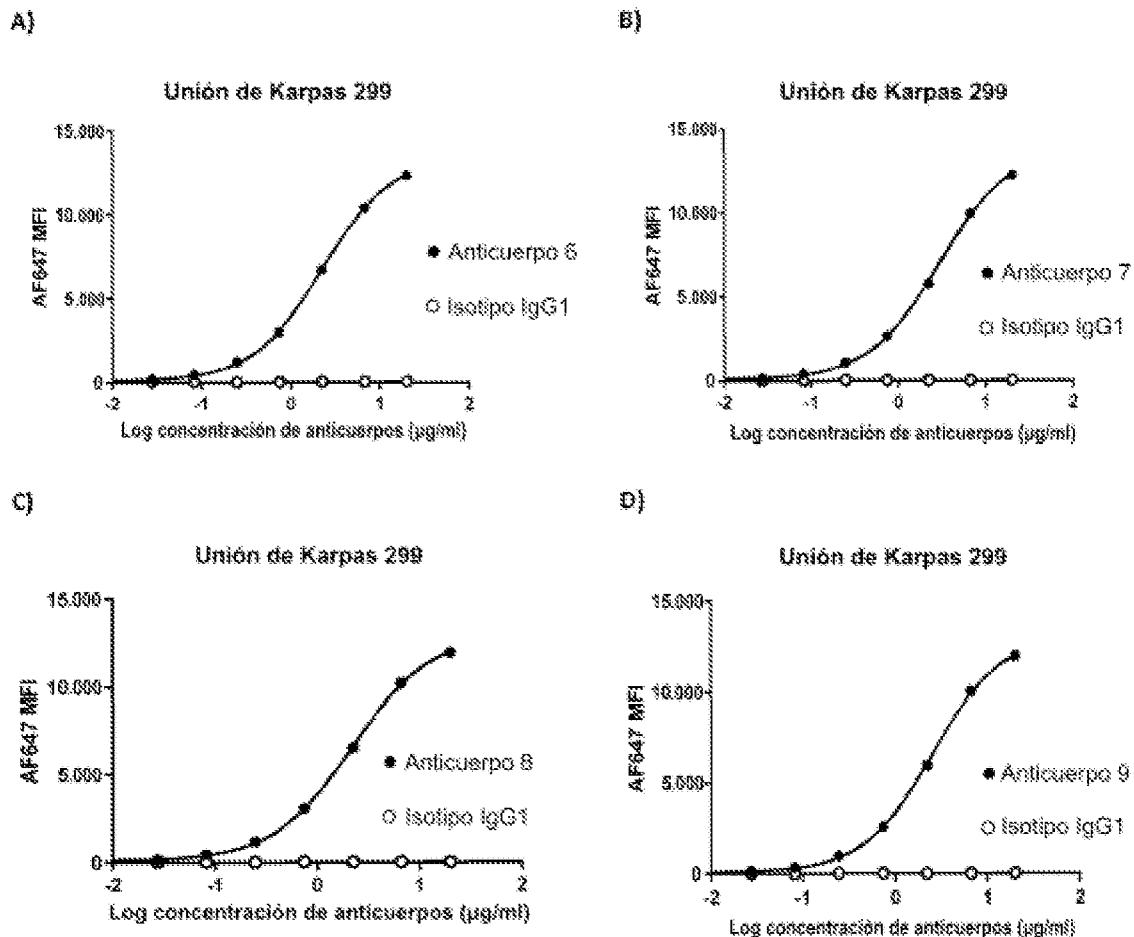
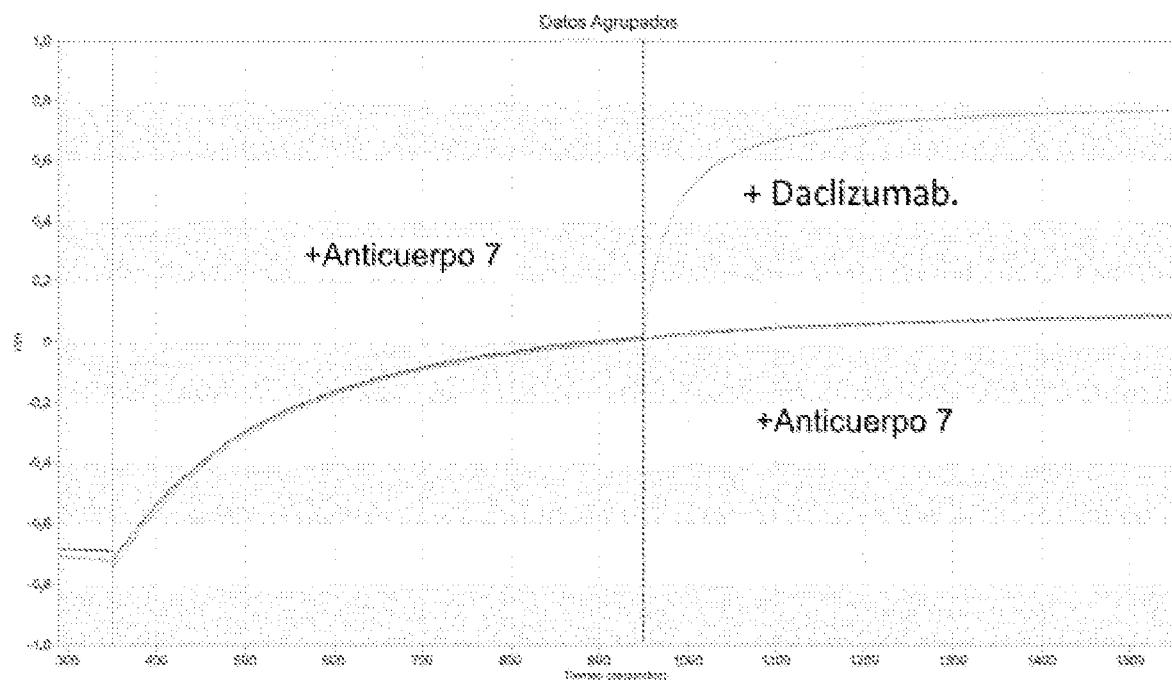


Figura 64

A)



B)

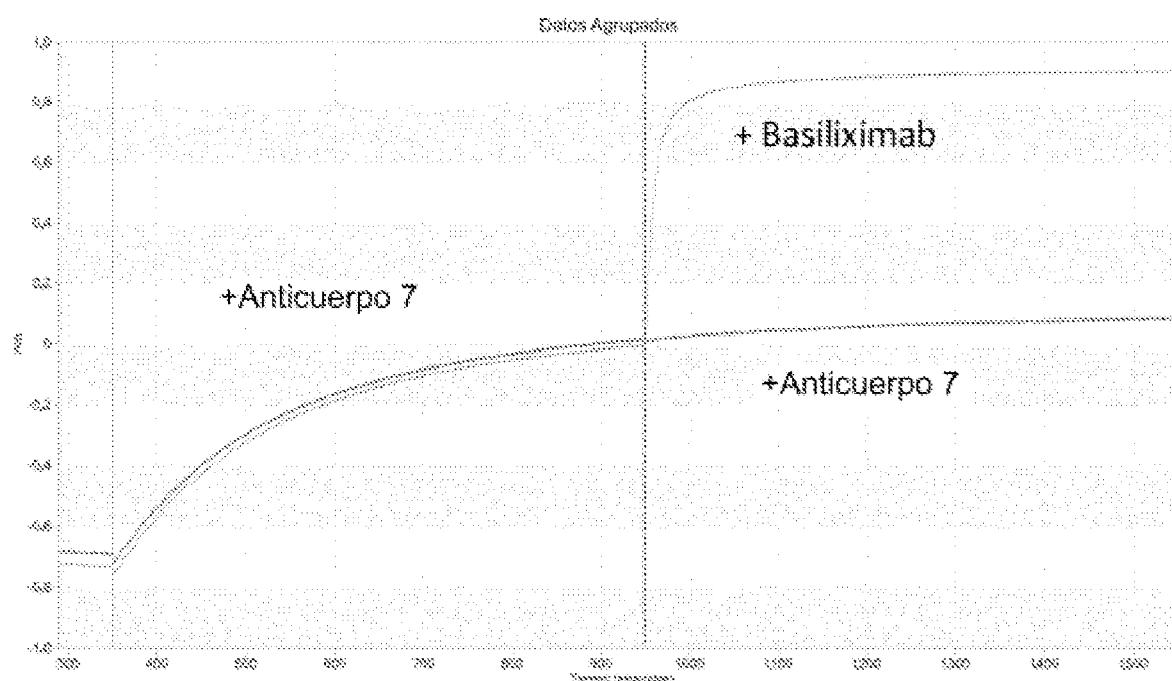


Figura 65

Señalización de 10U/ml IL2

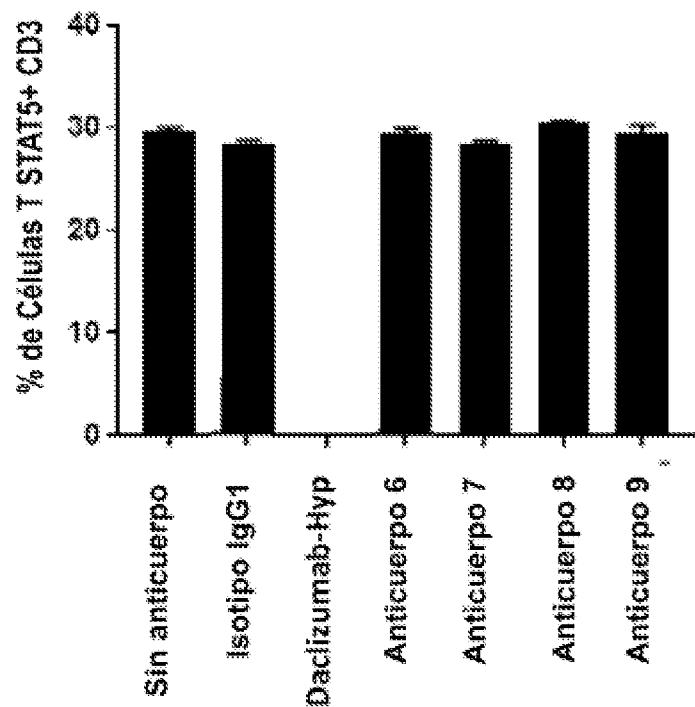


Figura 66

Reportero ADCC NFAT – 4PL

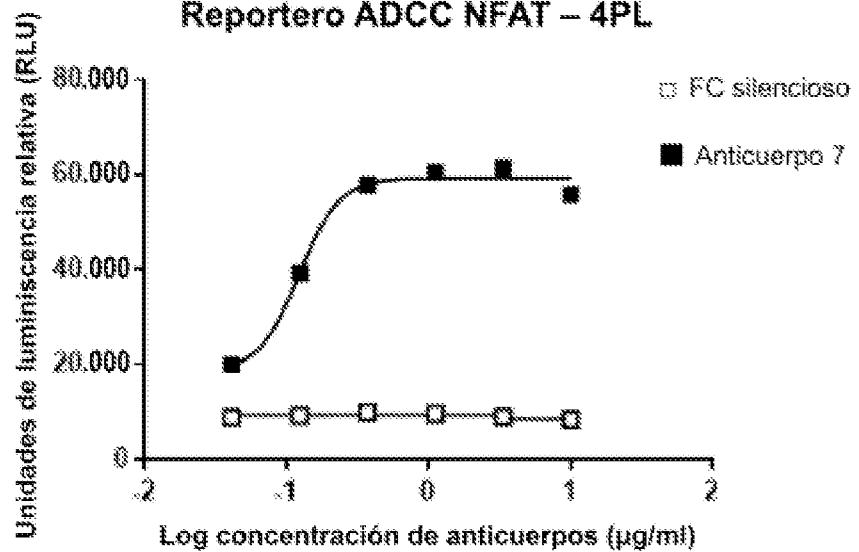


Figura 67

Ensayo ADCP

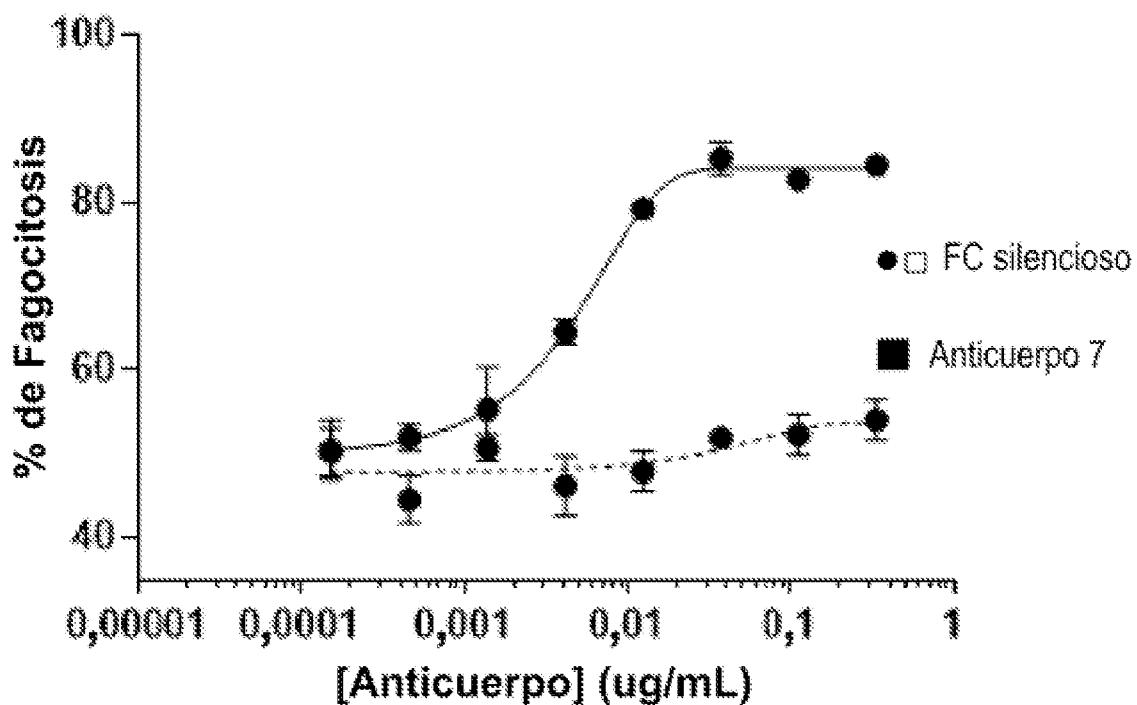
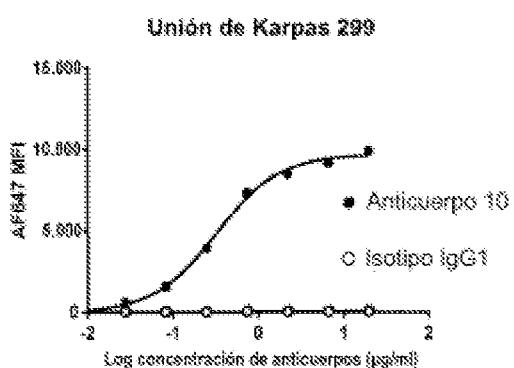
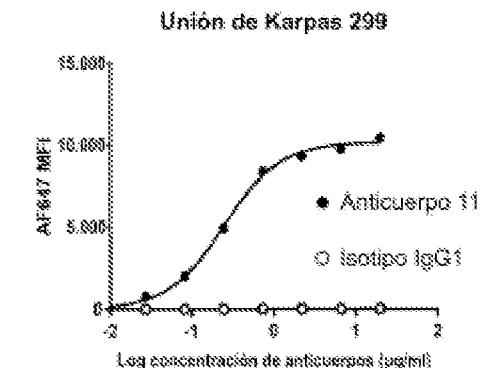


Figura 68

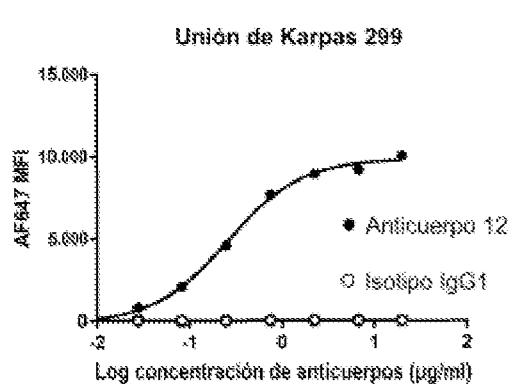
A)



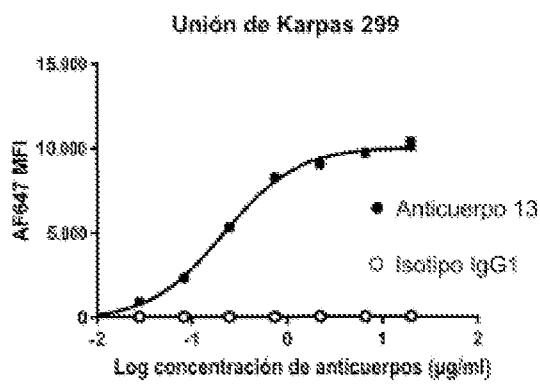
B)



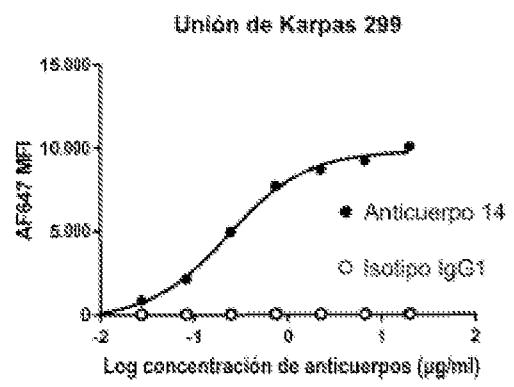
C)



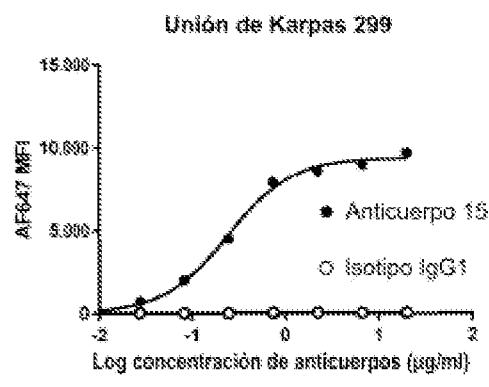
D)



E)



F)



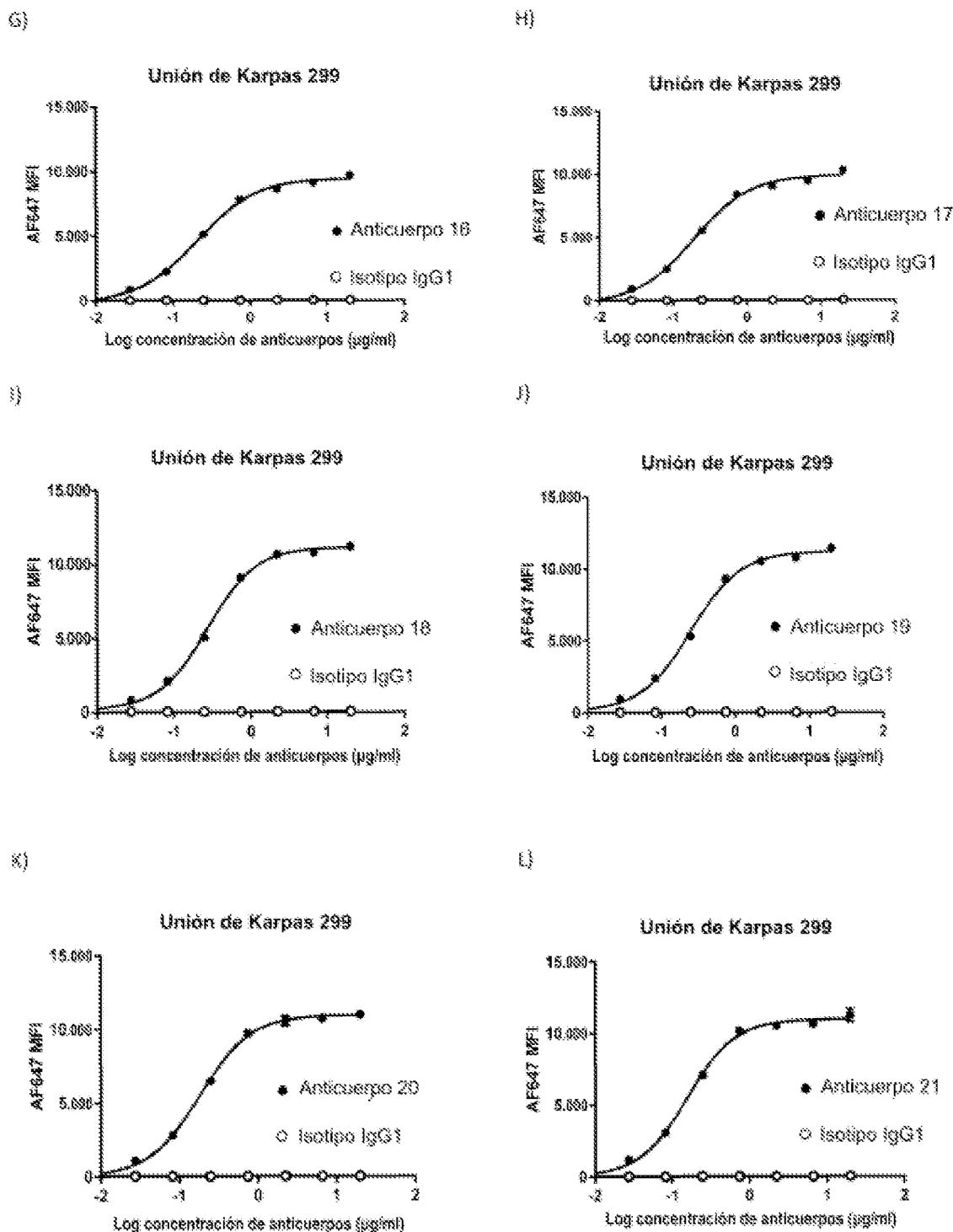
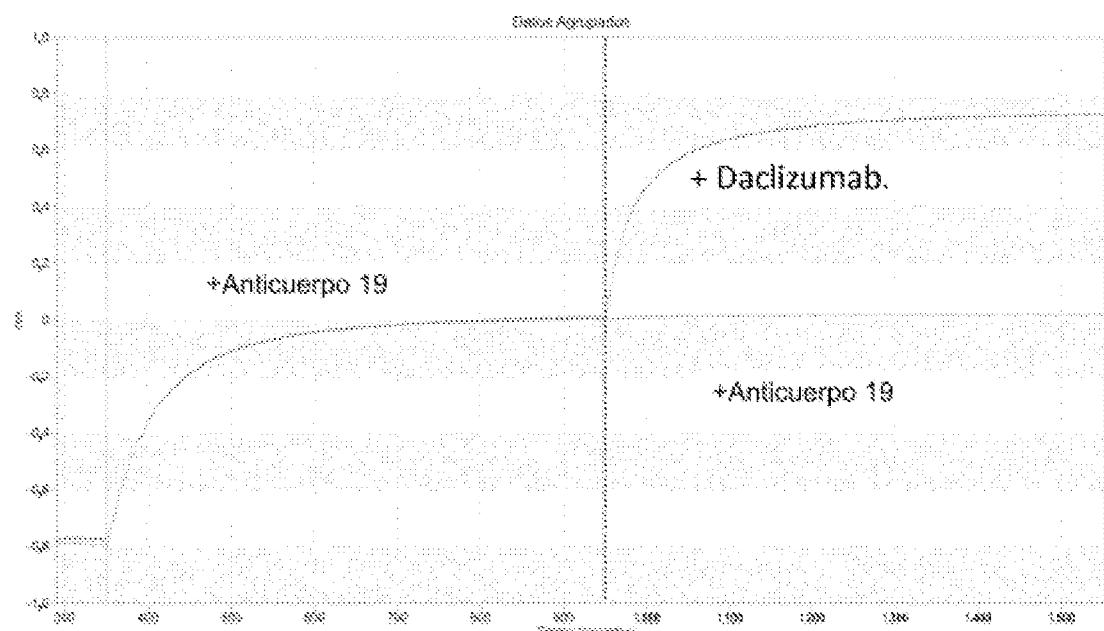


FIGURA 69

A)



B)

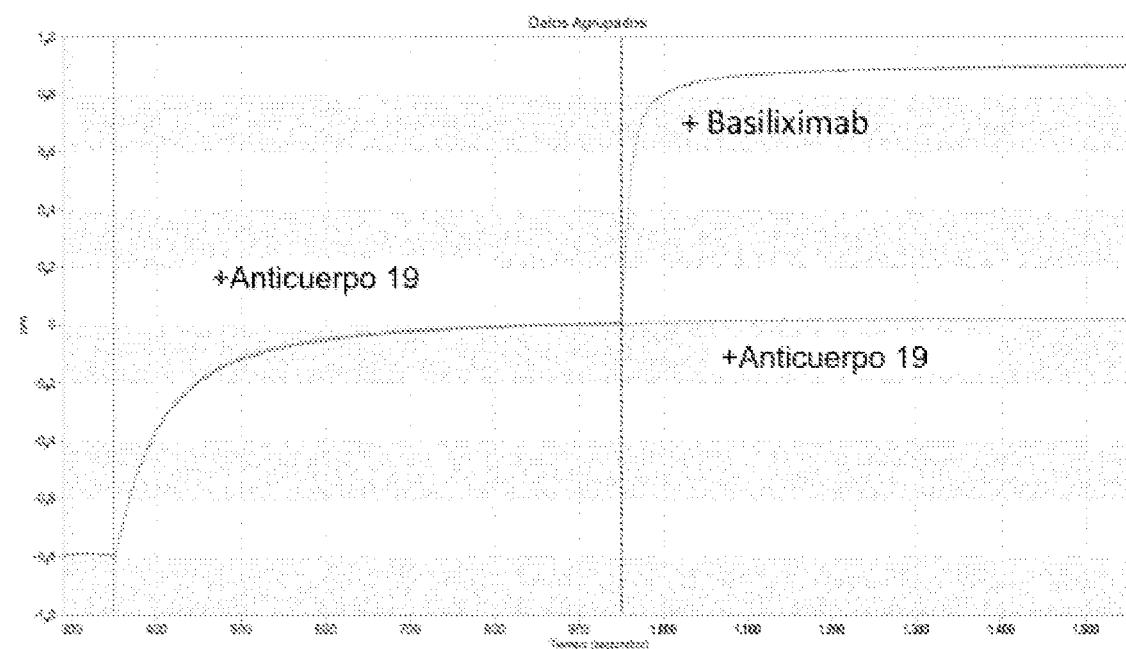


Figura 70

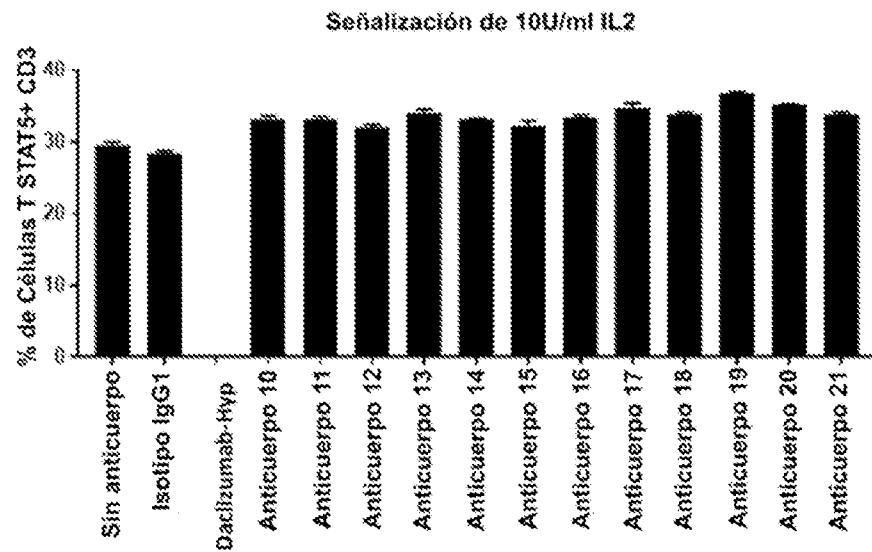


Figura 71

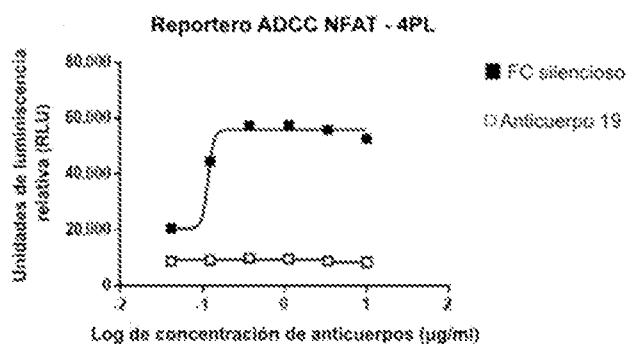


Figura 72

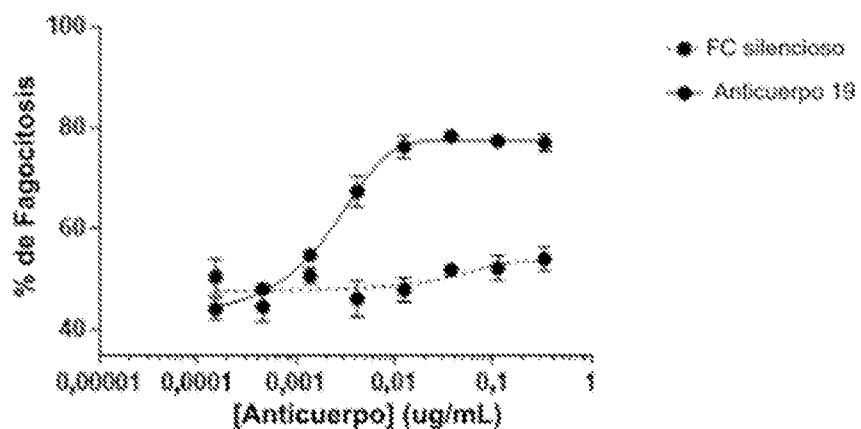


Figura 73

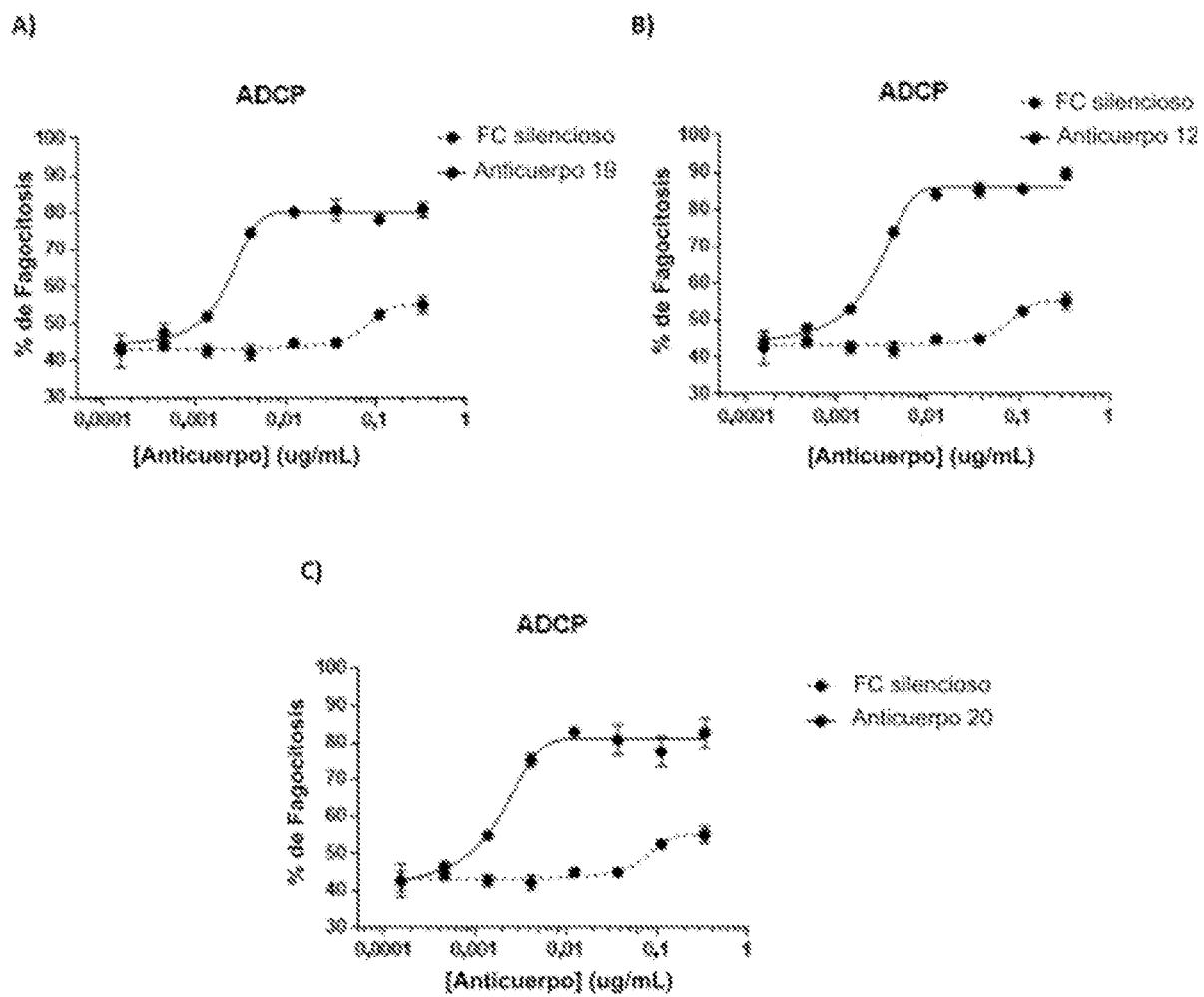
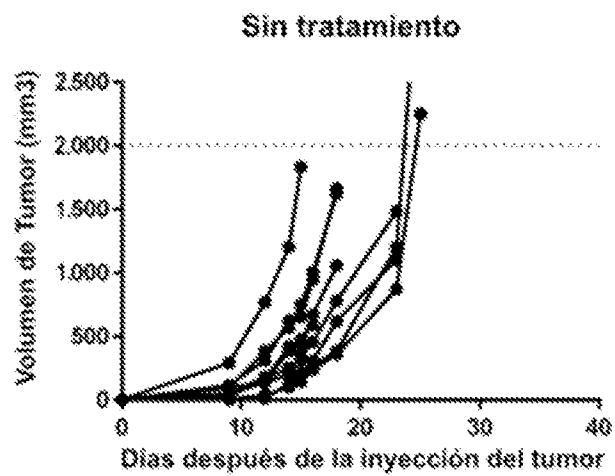
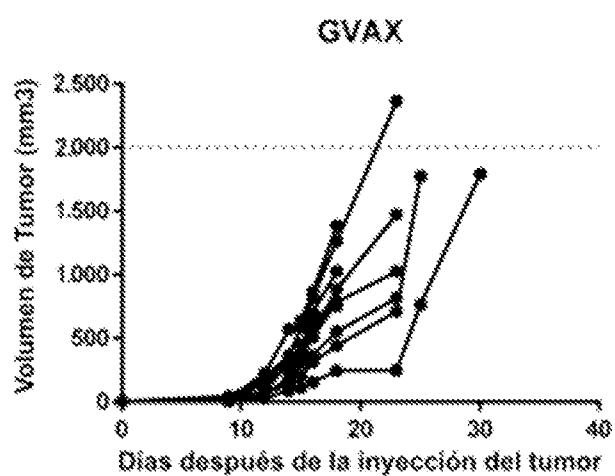


Figura 74

A)



B)



C)

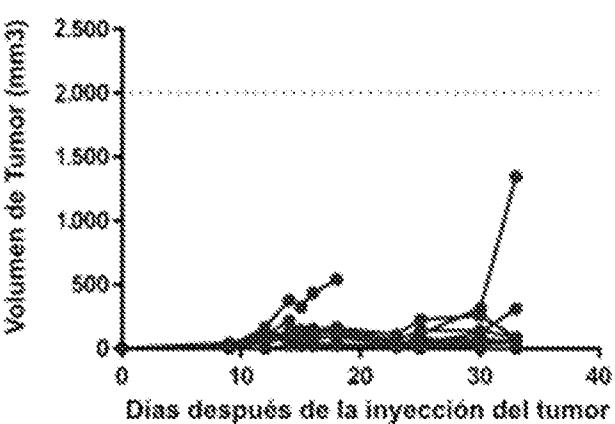


FIGURA 75

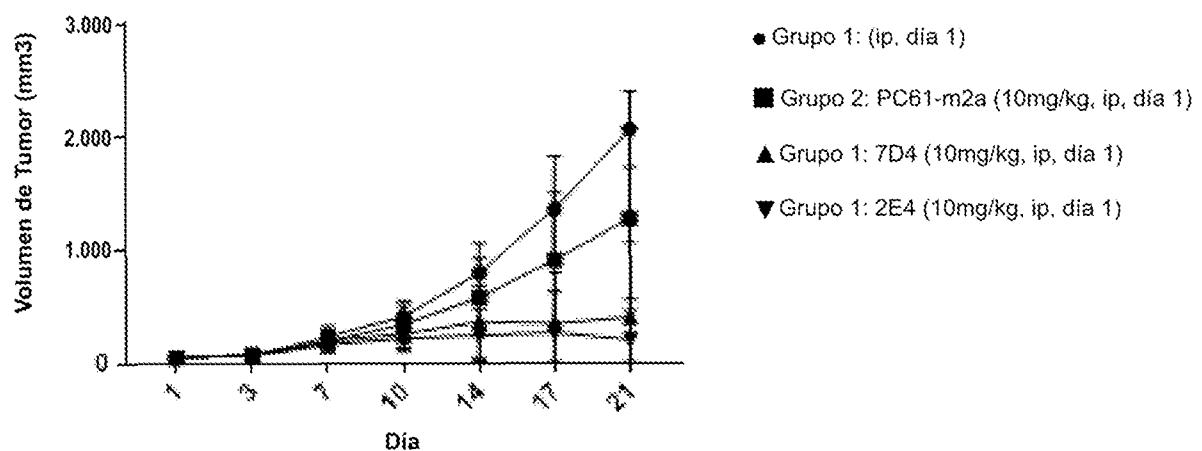


FIGURA 76

