



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 008**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/12** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99909562 .3**  
96 Fecha de presentación : **23.02.1999**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1060247**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.12.2000**

54 Título: **Composiciones que contienen un agente de unión a receptor OX-40 o un ácido nucleico que codifica el mismo y procedimientos para potenciar la respuesta inmune específica de antígeno.**

30 Prioridad: **24.02.1998 US 28716**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2009**

73 Titular/es: **Sisters of Providence in Oregon  
Providence Portland Medical Center  
4805 N.E. Glisan Street  
Portland, Oregon 97213, US**

72 Inventor/es: **Weinberg, Andrew, D.**

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 315 008 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

Composiciones que contienen un agente de unión a receptor OX-40 o un ácido nucleído que codifica el mismo y procedimientos para potenciar la respuesta inmune específica de antígeno.

### Campo de la invención

Esta invención está relacionada con la generación de respuestas inmunes mejoradas en animales, particularmente en humanos y mamíferos no humanos. La invención también está relacionada con la producción de composiciones y materiales para usar en los métodos, por ejemplo en vacunas relacionadas, células, plásmidos, vectores virales y otros, y preparaciones derivadas de ellos. Otros aspectos de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción.

### Antecedentes de la invención

Es conocido que muchas interacciones receptor-ligando están involucradas en la inducción, establecimiento y modulación de respuestas inmunes dirigidas frente a antígenos. Al menos dos señales son necesarias para activar una respuesta de células T CD4 ó CD8 a un antígeno (Lenschow *et al.*, 1996). La primera señal se transmite a través del receptor de la célula T (TCR) mediante un antígeno (típicamente un péptido) unido a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I ó II que está presente en la superficie de una célula presentadora de antígeno (APC). La segunda señal implica la unión de un ligando presente en la superficie de la APC con una segunda molécula receptora en la superficie de la célula T. Esta segunda señal se denomina co-estimulación, y el ligando de la APC se conoce habitualmente como una molécula co-estimuladora. La segunda señal que está mejor caracterizada se transmite mediante una interacción entre el receptor CD28 de la célula T, y sus ligandos B7.1 ó B7.2 en la APC, aunque se han descrito algunos otros ejemplos de interacciones de receptor/molécula co-estimuladoras.

En combinación, las dos señales activan la célula T, la cual a su vez secreta citoquinas y prolifera. En el caso de las células T CD4, las células activadas (denominadas CD4+) producen citoquinas, incluyendo IL-2 e INF $\gamma$ , las cuales activan las células T asesinas (CD8+) en el lugar de la inflamación. Una vez se han activado las células T CD4, se expresa otro receptor, el CTLA-4, el cual es homólogo al CD28 y se une a moléculas B7 con una afinidad mayor que CD28. La interacción B7/CTLA-4 inhibe la señal de activación de CD28 y transmite una señal negativa que puede infra-regular las respuestas de las células T (Krummel *et al.*, 1996; Walunas *et al.*, 1996). Este mecanismo de infra-regulación puede servir para prevenir respuestas excesivas del sistema inmune, por ejemplo reduciendo la cantidad de citoquinas producidas durante un caso de inflamación. Simultáneamente, no obstante, también puede infra-regular el número de células T que continúan para llegar a ser "células de memoria". Reducir el número de células de memoria significa que menos células de estas estarán disponibles para responder al mismo antígeno la próxima vez que este se encuentre. Sin embargo, hay un número de situaciones donde sería ventajoso mantener, en lugar de infra-regular, una respuesta activa de células T. Por ejemplo, los pacientes con cáncer se beneficiarían de mantener una respuesta activa de las células T frente a células tumorales. El concepto de vacunación requiere que se mantenga una población de células T de memoria que reconozcan el antígeno administrado.

Otra combinación de receptor/ligando para la que se ha propuesto una función en la co-estimulación de células T CD4 es el emparejamiento receptor OX-40/ligando OX-40. Mientras que el receptor CD28 está presente en la superficie de muchas subclases de células T (independientemente de si están activadas o no), el receptor OX-40 ("OX-40") (Paterson *et al.*, 1987; Calderhead *et al.*, 1993) se ha mostrado que está presente sólo en células T CD4+ activadas mediante antígeno *in vivo* (Weinberg *et al.*, 1994; 1996). Así, se ha demostrado que el OX-40 está presente en células T CD4+ activadas que reconocen un autoantígeno en el lugar de inflamación en una enfermedad autoinmune, pero no en el sistema sanguíneo periférico (Weinberg *et al.*, 1994; 1996). También se ha mostrado que OX-40 está presente en la superficie de un porcentaje de células T CD4+ aisladas de linfocitos infiltrados en tumor y células drenadas de nódulo linfático extraídas de pacientes con tumores de células escamosas de cabeza y cuello y melanomas (Vetto *et al.*, 1997). Se ha mostrado que el ligando de OX-40, un miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF), co-estimula las células T que han sido activadas con un anticuerpo anti-CD-3 (por ejemplo, de una manera específica no antigénica) (Godfrey *et al.*, 1994). Sin embargo, más allá de su función co-estimuladora general, se desconoce a día de hoy la función biológica de la interacción del receptor OX-40/ligando OX-40 en la ruta de respuesta inmunitaria. El Abstract de Morris *et al* Proceedings in American Association for Cancer Research Annual Meeting, 38, No. 0, 1997, describe una transfección satisfactoria de ligando OX-40 en líneas celulares tumorales murinas y humanas.

### Resumen de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones añadidas.

Esta invención proporciona la fabricación de composiciones farmacéuticas para métodos que se pueden usar para mejorar y mantener la respuesta inmune de un mamífero hacia un antígeno seleccionado. Mientras que los procedimientos anteriores han intentado aumentar la respuesta inmune en general, las composiciones y métodos descritos aquí están dirigidos específicamente a células T que han sido recientemente activadas en respuesta a un antígeno particular (llamadas "células de memoria") o células T que están en el proceso de tal sensibilización (en inglés "priming"). En particular, se cree que los efectos de los métodos aquí descritos incluyen el incremento del número de células T de memoria, mejorando con ello la respuesta del sistema inmune a un antígeno específico (elegido).

## ES 2 315 008 T3

Subyacentes a la invención hay los descubrimientos (1) que la ocupación del receptor OX-40 en células T CD4<sup>+</sup>, especialmente, por ejemplo durante, o poco después, de la sensibilización de dichas células por un antígeno, puede resultar en una respuesta incrementada de las células T CD4<sup>+</sup> a ese antígeno y (2) que la elevada respuesta a ese antígeno se puede mantener por un periodo de tiempo sustancialmente más largo que en ausencia de dicha ocupación.

5 Como resultado, aumentar la respuesta inmune proporcionando moléculas que ocupan el receptor OX-40, por ejemplo durante la sensibilización de células T, puede incrementar notablemente la resistencia de un animal a una enfermedad, mediante el aumento del reconocimiento por células T de antígenos presentados por agentes infecciosos, tales como bacterias y virus, así como células tumorales.

10 En consecuencia, la presente invención proporciona el uso de (i) un agente de unión que se une específicamente a un receptor OX-40, siendo dicho agente de unión un OX-40L, un dominio funcional de OX40L, una proteína de fusión que comprende OX40L o un dominio funcional de OX40L, un anticuerpo anti-OX-40, o una porción inmunológicamente efectiva de un anticuerpo anti-OX-40, en la fabricación de una composición farmacéutica destinada a mejorar en un mamífero la respuesta inmune frente un antígeno específico elegido, donde la composición se administra de tal forma

15 que dicho agente de unión se presenta a las células T del mamífero durante o poco después de la sensibilización de las células T por dicho antígeno o mientras dicho antígeno se está presentando a las células T.

También proporciona un agente de unión que se une específicamente al receptor OX40, siendo dicho agente de unión OX-40L, un dominio funcional de OX40L, una proteína de fusión que comprende OX40L o un dominio funcional de OX40L, un anticuerpo anti-OX-40, o una porción inmunológicamente efectiva de un anticuerpo anti-OX-40 para usar en un método de tratamiento de un mamífero para mejorar mediante administración la respuesta inmune del mamífero frente un antígeno específico elegido de tal forma que dicho agente de unión se presenta a células T del mamífero durante o poco después de la sensibilización de las células T por dicho antígeno o mientras dicho antígeno se está presentando a células T.

25

El antígeno se puede seleccionar de entre antígenos virales, antígenos bacterianos y antígenos tumorales.

Un agente de unión al receptor OX-40 purificado y un portador farmacéuticamente aceptable se pueden usar en la fabricación de una composición farmacéutica destinada a mejorar la respuesta inmune de un mamífero a un antígeno mediante administración de la composición al mamífero para presentar el agente de unión de OX-40 a células T del mamífero durante o poco después de la sensibilización de las células T por el antígeno, por ejemplo aproximadamente 3-7 días después de la administración del antígeno.

30

Se puede aplicar la técnica para mejorar la respuesta inmune de un mamífero a una célula tumoral en el mamífero.

35

Más en general, se puede usar un agente de unión al receptor OX-40 en la fabricación de un fármaco destinado a mejorar la respuesta inmune frente un tumor en un mamífero incrementando la cantidad de agente de unión al receptor OX-40 en el sitio del tumor.

40 En un ejemplo de la invención, realizado para la comparación con la administración a animales de ciertas células tumorales que solas resultan en una letalidad del 100%, la administración junto a las células tumorales de moléculas que ocupan el receptor OX-40 protegió a los animales de las células tumorales.

Sin pretender restringirse por la teoría, una posible explicación del mecanismo que subyace en este descubrimiento se representa en la Fig. 1 de los dibujos adjuntos. La Figura 1 ilustra esquemáticamente la función de las células T CD4 en el sistema inmune. Las células T naive (es decir, aquellas no expuestas previamente a un antígeno) en el bazo o nódulos linfáticos se diferencian en células activadas ("efectoras") en respuesta a un antígeno. Como se ha discutido anteriormente, la activación requiere la presentación de antígeno en el contexto de una molécula del MHC, junto con una molécula co-estimuladora. Se cree que las moléculas co-estimuladoras caracterizadas hasta la fecha, tal como la molécula B7, actúan en la transición celular de naive a efectora. Después de la activación, se propone que un subconjunto sustancial de estas células efectoras produce citoquinas y, a través de un mecanismo de retroalimentación que puede implicar ciertas interacciones receptor/ligando de células T (por ejemplo, CTLA-4/B7), posteriormente sufre muerte celular programada. El subconjunto restante de células T se expande y continúa para llegar a ser células de memoria, preparadas para responder a futuras exposiciones al antígeno. Se cree que la co-estimulación de células T mediante la ocupación del receptor OX-40 durante este periodo puede incrementar la función de las células T efectoras y también incrementar la proporción de células CD4<sup>+</sup> activadas específicas de antígeno que restan después de la exposición inicial al antígeno y que finalmente adoptan un fenotipo de memoria. Así, se propone que, al contrario de las moléculas co-estimuladoras convencionales que actúan en la transición celular de naive a efectora, los ligandos OX-40 actúan en la transición celular de efectora a memoria. Por lo tanto, la ocupación del receptor OX-40 sirve para incrementar la proporción de células efectoras que continúan para llegar a ser células de memoria. Mediante el incremento de esta población de células, se mejora la capacidad presente y futura del sistema inmune a responder a ese antígeno específico y esta capacidad de respuesta mejorada se mantiene durante un periodo de tiempo significativamente superior. En contraste, métodos descritos previamente para mejorar la respuesta inmune proporcionando moléculas co-estimuladoras hacen uso de moléculas co-estimuladoras, tal como B7, que actúan en la transición celular de naive a efectora (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Europea EP 0 733 373 (Bristol Myers Squibb: L Chen *et al.*: Composiciones y métodos para aumentar la inmunogenicidad de células tumorales mediante la administración de células transfectadas con B7 y CD2)). Por lo tanto, se cree que la mejora de la población de células de memoria específicas de antígeno no se ha descrito, sino más bien la mejora de una respuesta inmune inicial. Se cree

45

50

55

60

65

## ES 2 315 008 T3

que métodos de mejora de la respuesta inmune como los aquí descritos son capaces de producir una buena mejora de la respuesta inmune aumentando la población de células T de memoria específicas de antígeno.

Se enfatiza que esta es sólo una posible explicación para la invención aquí descrita y reivindicada; sin tener en cuenta el mecanismo real, aquí se proporciona la administración de moléculas que ocupan el receptor OX-40 durante la activación por antígeno y puede conferir un beneficio inmunológico significativo.

Las moléculas que pueden ocupar el receptor OX-40 están aquí referidas como agentes de unión al receptor OX-40.

Los agentes de unión al receptor OX-40 de acuerdo con la presente invención son el ligando OX-40, dominios funcionales del ligando OX-40, tal como el dominio extracelular, tanto solo como conjugado a otros dominios peptídicos, es decir, como proteínas de fusión, y anticuerpos con especificidad de receptor anti-OX-40.

Tales agentes de unión al receptor OX-40 se pueden usar para inducir o mejorar una respuesta inmune mediada por células T CD4<sup>+</sup> frente una amplia variedad de antígenos, incluyendo antígenos virales, antígenos bacterianos y antígenos tumorales. En un aspecto de la invención, se pueden usar los agentes de unión al receptor OX-40 para mejorar la respuesta inmune de un animal a un antígeno.

Aquí descrito hay un método destinado a mejorar la respuesta inmune de un animal a un antígeno, que comprende la administración al animal de una composición que comprende un agente de unión al receptor OX-40 purificado y un portador farmacéuticamente aceptable, en el que dicha composición se administra al animal de tal forma que el agente de unión al receptor OX-40 se presenta a las células T del mamífero durante o poco después de la sensibilización de las células T por el antígeno. Se considera que el proceso de sensibilización de las células T por un antígeno en mamíferos tiene lugar aproximadamente dentro de los 3-7 días que siguen a la administración del antígeno. Por lo tanto, "poco después de la sensibilización" se refiere generalmente a un periodo de tiempo de aproximadamente 3-10 días que siguen a la administración del antígeno.

Se puede administrar el agente de unión al receptor OX-40 a un mamífero por ejemplo hasta aproximadamente 10 días después, más típicamente una semana después, y preferentemente aproximadamente 3-7 días después de la administración de una preparación de antígeno con el fin de mejorar la respuesta inmune mediada por células T CD4<sup>+</sup> del mamífero frente el antígeno administrado. Se cree que el momento exacto habitualmente no es crítico.

La presente invención también proporciona la mejora de la respuesta inmune de un mamífero a un tumor. Se puede estimular la respuesta inmune de un mamífero a un tumor mediante la administración al mamífero de una dosis terapéuticamente efectiva de un agente de unión al receptor OX-40 purificado.

Las composiciones de vacunas aquí descritas incluyen uno o más antígenos y una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente de unión al receptor OX-40. Tal y como se ha puntualizado anteriormente, se puede seleccionar el antígeno de entre el grupo que consiste en antígenos tumorales, antígenos bacterianos y antígenos virales. Cuando la vacuna incluye un antígeno viral y cuando el antígeno viral se administra por medio de un virus atenuado o de replicación defectuosa, se puede proporcionar el agente de unión al receptor OX-40 por medio de una molécula de ácido nucleico que codifica el agente insertado en el genoma del virus, de tal manera que este se expresa en las células del mamífero al cual se ha administrado la vacuna. Cuando la vacuna incluye un antígeno bacteriano liberado por medio de una bacteria atenuada o una preparación de antígenos bacterianos, se puede proporcionar el agente de unión al receptor OX-40 a través de una molécula de ácido nucleico que codifica el agente, tal molécula de ácido nucleico está contenida y se expresa dentro de la célula bacteriana. Del mismo modo, cuando la vacuna incluye una preparación de antígeno tumoral, tal como membranas de células tumorales, se puede proporcionar el agente de unión al receptor OX-40 mediante una molécula de ácido nucleico que codifica el agente, tal molécula de ácido nucleico se expresa dentro de la célula tumoral antes de la ruptura de la célula para la preparación de la vacuna. El antígeno y un material que proporciona un agente de unión al receptor OX-40 se pueden administrar al animal tanto de manera separada como a la vez: el periodo de tiempo referido como poco después de la sensibilización se refiere al contacto fisiológico efectivo, el cual puede ocurrir después de la administración física especialmente donde lo que se administra es una composición que proporciona indirectamente el agente de unión al receptor OX-40 *in vivo*, p.e., el ácido nucleico mencionado anteriormente.

También se describe el suministro o mejora de la expresión de un agente de unión al receptor OX-40 en una célula, tal como una célula presentadora de antígeno (APC), por ejemplo, una célula tumoral. La expresión de un agente de unión al receptor OX-40 en una APC se puede conseguir administrando en el interior de la célula un vector que lleva una secuencia de ácido nucleico que codifica para el agente, donde la expresión de la secuencia de ácido nucleico resulta en niveles de expresión del agente que son más elevados que los de una célula comparable que carece del vector. Los vectores adecuados para administrar y expresar el agente de unión al receptor OX-40 son bien conocidos en el estado de la técnica e incluyen vectores plasmídicos y vectores virales, tales como vectores de adenovirus, de virus del herpes y de retrovirus. El vector puede acarrear una o más secuencias adicionales de ácido nucleico que codifican antígenos frente a los cuales se desea una respuesta inmune. Así, se describe un método para mejorar la inmunogenicidad de una célula, comprendiendo el método introducir en la célula una molécula de ácido nucleico que codifica para un agente de unión al receptor OX-40, de modo que el agente de unión al receptor OX-40 se expresa en la superficie de la célula.

La APC puede ser una célula tumoral extraída de un mamífero. A este respecto, la invención es útil para mejorar la respuesta inmune del mamífero frente a células tumorales presentes en su cuerpo. Las células tumorales se pueden extraer de un mamífero. Después, se introduce un vector que expresa el agente de unión al receptor OX-40 en las células extraídas, las cuales son devueltas después al mamífero. Preferentemente se atenúan las células tumorales antes de la re-introducción en el paciente; se conocen bien los mecanismos para atenuar células tumorales e incluyen, por ejemplo, la irradiación. El resultado de este procedimiento es que las células tumorales atenuadas re-introducidas presentan simultáneamente tanto los antígenos tumorales como el agente de unión al receptor OX-40 a las células T CD4, lo que resulta en una elevada respuesta inmune mediada por células T CD4<sup>+</sup> frente a células tumorales en el cuerpo del mamífero. Debido a que ciertas células tumorales evaden la respuesta inmune del cuerpo mediante la infra-regulación de la expresión de las moléculas MHC presentadoras de antígeno, puede ser ventajoso introducir en las células tumorales extraídas no sólo un vector que exprese el agente de unión al receptor OX-40, sino también un vector que exprese una molécula del MHC, preferentemente una molécula del MHC de clase II. Se puede introducir en las células tumorales un solo vector que exprese tanto el agente de unión al receptor OX-40 como la molécula de MHC. Así, se proporciona un método para estimular la respuesta inmune de un mamífero a un tumor en el mamífero, donde el método comprende: (a) extraer células tumorales del mamífero; (b) atenuar las células tumorales extraídas; (c) introducir en las células atenuadas una molécula de ácido nucleico que codifica para un agente de unión al receptor OX-40 de manera que el agente de unión al receptor OX-40 se expresa en la superficie de las células tumorales atenuadas; y (d) administrar al mamífero una dosis terapéuticamente efectiva de una preparación de las células tumorales atenuadas que contienen la molécula de ácido nucleico.

También se describen nuevos métodos de inmunoterapia adoptiva en los que la respuesta inmune de un mamífero a un antígeno se mejora mediante la extracción de las células T del mamífero, la incubación de las células T extraídas con un agente de unión al receptor OX-40 *ex vivo*, y devolución de las células T al mamífero. Tal método puede ser particularmente beneficioso para el tratamiento de pacientes de cáncer. También se describe un método para mejorar la respuesta inmune de un animal frente a un tumor, que comprende incrementar la cantidad de un agente de unión al receptor OX-40 en el sitio del tumor (es decir, la zona del cuerpo que incluye el tumor y una inmediatamente adyacente). Se puede conseguir incrementar la cantidad de agente de unión al receptor OX-40 mediante la administración en el sitio del tumor de una composición seleccionada del grupo que consiste en agentes de unión al receptor OX-40 y moléculas de ácido nucleico que codifican para los agentes de unión al receptor OX-40.

La invención se describe adicionalmente a modo de ejemplo, pero no por ello con intención de limitar el alcance de la invención en la descripción, figuras de los dibujos acompañantes y ejemplos mostrados más adelante.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación esquemática de un mecanismo propuesto de la activación y respuestas de las células T CD4 del sistema inmune.

La Figura 2 es un gráfico que muestra el efecto de la ocupación del receptor OX-40 en la proliferación de células T *in vitro*.

La Figura 3 es un gráfico que muestra una comparación de los niveles de IL-2 producidos por células T re-estimuladas con APCs que expresan bien MHC de clase II solo, bien MHC de clase II más B7.1 o bien MHC de clase II más ligando OX-40.

La Figura 4 es un gráfico que ilustra el efecto protector de la administración del agente de unión al receptor OX-40 a ratones inoculados con células tumorales.

La Figura 5 es un gráfico que muestra el efecto protector de la transferencia adoptiva de esplenocitos de ratones inoculados con agente de unión al receptor OX-40 y células tumorales en ratones naïve subsecuentemente desafiados con células tumorales.

La Figura 6 es un gráfico que muestra el efecto protector de la administración de agente de unión al receptor OX-40 a ratones inoculados con células tumorales sometidas a pasajes *in vivo*.

La Figura 7 es un gráfico que muestra que el efecto protector de el agente de unión al receptor OX-40 frente a células tumorales sometidas a pasajes *in vivo* es dependiente de la dosis de agente de unión al receptor OX-40 administrada.

La Figura 8 es un gráfico que muestra el efecto protector de la vacunación de ratones con células tumorales irradiadas que expresan el agente de unión al receptor OX-40 y MHC de clase II.

La Figura 9 muestra fotomicrográficos de biopsias de cáncer de pecho con tinción de dos pacientes para mostrar la localización de linfocitos y células OX40R<sup>+</sup>, relevante para el tratamiento de dichos cánceres mediante los métodos aquí descritos.

Las Figuras 10-14 son gráficos que muestran la supervivencia de los animales en los experimentos de los Ejemplos anteriores 6-9.

## Descripción detallada

### 1. Definiciones

5 Para facilitar la revisión y comprensión de la invención tal y como se describe aquí, se proporcionan las siguientes definiciones de términos:

*Receptor OX-40*: una proteína (también llamada de otra forma ACT-4 y ACT35) que se expresa en la superficie de una célula T CD4<sup>+</sup> activada de mamífero (Weinberg *et al.*, 1994, 1996, WO 95/12673 (Stanford Univ & Becton Dickinson; Godfrey *et al.*); Latza *et al.*, 1994). Se han clonado y secuenciado secuencias de ADN que codifican homólogos del receptor OX-40 de ratón, rata y humano (Mallet *et al.*, 1990; Calderhead *et al.*, 1993; Latza *et al.*, 1994; WO 95/12673 (*supra*)).

*Ligando OX-40*: una proteína (también llamada de otra forma gp34 y ACT-4-L) que se expresa en la superficie de ciertas células de mamíferos (tales como células presentadoras de antígenos (“APCs”)), las cuales interactúan específicamente con el receptor OX-40 (la proteína como tal pero no su función se describió en Miura *et al.*, 1991; WO 95/21915 (Stanford Univ; Godfrey *et al.*) identificaron la proteína humana y su función, usando la denominación ACT-4-L; y la patente U.S. No. 5.457.035 (Immunex: PR Baum *et al.*) describió una proteína murina de función equivalente). Se han clonado y secuenciado genes que codifican ligandos OX-40 de ratón y humano (U.S. No. 5.457.035 (*supra*); Miura *et al.*, 1991; Godfrey *et al.*, 1994). El ligando OX-40 incluye dominios intracelulares, transmembrana y extracelulares; se puede producir una forma soluble funcionalmente activa del ligando OX-40 (“ligando OX-40 soluble”) mediante la eliminación de los dominios intracelulares y transmembrana, tal y como se describe en la Patente U.S. No. 5.457.035 y WO 95/21915. Una forma funcionalmente activa del ligando OX-40 es una forma que retiene la capacidad de unirse específicamente al receptor OX-40; A continuación se discuten métodos para determinar la capacidad de una molécula ligando OX-40 o un derivado para unirse específicamente al receptor OX-40. Se describen métodos para fabricar y usar el ligando OX-40 y sus derivados en la WO 95/21915 (*supra*), la cual también describe proteínas que comprenden la fracción soluble del ligando OX-40 enlazado a otros péptidos, tales como regiones Fc de Ig humana, que pueden ser producidas para facilitar la purificación del ligando OX-40 de las células de cultivo, o para mejorar la estabilidad de la molécula después de la administración al mamífero *in vivo* (véase también la Patente U.S. No. 5,457,035).

El término “OX-40L”, tal y como aquí se usa, incluye el ligando OX-40 entero, el ligando OX-40 soluble, y proteínas de fusión que comprenden una porción funcionalmente activa del ligando OX-40 unido covalentemente a un segundo dominio proteico. Dentro de la definición de OX-40L están incluidas variantes del ligando OX-40, las cuales se diferencian de las moléculas ligando OX-40 que se encuentran en la naturaleza en la secuencia de aminoácidos pero retienen la capacidad de unirse específicamente al receptor OX-40. Tales variantes se describen en la Patente U.S. No. 5.457.035 y WO 95/21915 (*supra*).

*Agente de unión al receptor OX-40*: un agente que se une sustancialmente sólo a un antígeno OX-40 que esté presente en la superficie de una célula T de mamífero activada mediante antígeno, tales como células T CD4<sup>+</sup> activadas. El término “agente de unión al receptor OX-40”, tal y como aquí se usa, significa anticuerpos anti-OX-40 y OX-40L.

El término “anticuerpos anti-OX-40” abarca anticuerpos monoclonales y policlonales que son específicos de de OX-40, es decir, que al evaluarse usando los métodos descritos a continuación, se unen sustancialmente sólo al receptor OX-40, así como a porciones inmunológicamente efectivas (“fragmentos”) del mismo. Preferentemente, los anticuerpos anti-OX-40 usados en la presente invención son anticuerpos monoclonales (o porciones inmunológicamente efectivas de los mismos) y preferentemente anticuerpos monoclonales humanizados (o porciones inmunológicamente efectivas de los mismos). Porciones inmunológicamente efectivas de anticuerpos monoclonales incluyen las porciones Fab, Fab’, F(ab’)<sub>2</sub>, Fabc y Fv (para una revisión, véase Better y Horowitz. 1989). En la presente invención, las porciones inmunológicamente efectivas de anticuerpos monoclonales son, preferentemente, porciones que incluyen un dominio de cadena pesada. En WO 95/12673 y WO /95/21815 (*supra*) se describen formas humanizadas de anticuerpo monoclonales anti-OX-40 y porciones inmunológicamente efectivas de anticuerpos anti-OX-40, junto con métodos que se pueden utilizar para producir tales anticuerpos. Los anticuerpos anti-OX-40 también se pueden producir usando procedimientos estándar que están descritos en una variedad de textos, incluyendo “Antibodies, A Laboratory Manual” de Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

Se conocen bien los métodos para fabricar anticuerpos monoclonales humanizados, e incluyen por ejemplo aquellos descritos en las Patente U.S. Nos 5.585.089 (Protein Design: CL Queen *et al.*; “Humanized Immunoglobulins”), 5.565.332 (“Production of Chimeric Antibodies--A Combinatorial Approach”), 5.225.539 (Med Res Council: GP Winter; “Recombinant Altered Antibodies And Methods Of Making Altered Antibodies”), 5.693.761-762 (Protein Design: CL Queen *et al.*; “Polynucleotides Encoding Improved Humanized Immunoglobulins”), y “Humanized Immunoglobulins”), y 5.530.101 (Protein Design: CL Queen *et al.*; “Humanized Immunoglobulins”), y las referencias allí citadas.

Del mismo modo, los métodos para fabricar y usar porciones inmunológicamente efectivas de anticuerpos monoclonales, también referidas como fragmentos de anticuerpos, se conocen bien e incluyen por ejemplo aquellos descritos en Better y Horowitz (1989) (“Expression of Engineered Antibodies and Antibody Fragments in Microorganisms”); Better *et al.* (1990) (“Production and Scale-Up of Chimeric Fab Fragments from Bacteria”); Glockshuber *et al.* (1990)

(“A Comparison of Strategies to Stabilize Immunoglobulin Fv Fragments”); y las Patentes U.S. Nos. 5.648.237 (Genentech: PJ Carter; “Expression of Functional Antibody Fragments”), 4.946.778 (Genex: RC LADner *et al*; “Single Polypeptide Chain Binding Molecules”), y 5.455.030 (Enzon: RC LADner *et al*; “Immunotherapy Using Single Chain Polypeptide Binding Molecules”), y las referencias allí citadas.

5 En la presente invención se pueden utilizar varias formulaciones de OX-40L como agentes de unión al receptor OX-40, incluyendo la molécula OX-40L entera, el OX-40L soluble, y proteínas de fusión en las que, por ejemplo, el dominio extracelular del OX-40L se enlaza covalentemente a un segundo dominio proteico. El segundo dominio proteico puede tener un número de funciones, que incluyen la mejora de la actividad del OX-40L, facilitar la purificación, o incrementar la estabilidad de la proteína en el cuerpo. En tales proteínas de fusión, el OX-40L, preferentemente como dominio extracelular u otro fragmento del mismo o la muteína de tal dominio o fragmento, se fusiona con una proteína elegida adecuadamente tal como una proteína sanguínea o un fragmento de la misma que corresponde a proteínas sanguíneas adecuadamente elegidas del sujeto a tratar. El ejemplo específico que se describe a continuación implica la fusión entre el dominio extracelular OX-40L y un polipéptido que representa un dominio constante de IgG humana, particularmente los dominios CH2 y CH3 de IgG. Preferentemente, tales fusiones incluirán una región bisagra de una secuencia de aminoácidos que corresponde a una región bisagra de la IgG en la que, preferentemente, se han mutado cualesquiera residuos de cisteína a residuos aminoácidos no sulfurados, tales como alanina o glicina. Se prefiere tener el extremo N-terminal de la secuencia parcial del OX-40L a continuación del extremo C-terminal de la secuencia parcial de la IgG en la proteína de fusión, opcionalmente interviniendo una secuencia espaciadora. Pero el arreglo opuesto también puede ser útil y también está abarcado dentro del alcance de la invención. Un ejemplo alternativo de una pareja de fusión implica el uso de los dominios 3 y 4 de la secuencia de la CD4 en lugar de las regiones CH2 y CH3 de la IgG. Tales proteínas de fusión se pueden fabricar en cualquier sistema de expresión heterólogo adecuado, y, cuando sea apropiado, el ADN que codifica la proteína de fusión puede también codificar una señal secretora conocida apropiada para el sistema celular hospedador utilizado, de tal forma que el ADN se traduce en una proteína que primero incluye la señal secretora y la secuencia de corte pero después se transporta fuera de la célula sin tales secuencias auxiliares.

Un ejemplo de una forma recombinante de OX-40L es OX-40L:HuFcIgG, donde el dominio extracelular OX-40L está fusionado con la cadena pesada de la IgG humana. La producción de tales proteínas de fusión se describe en la Patente U.S. No. 5.457.035. A modo de ejemplo, la fusión OX-40L:HuFcIgG usada en los experimentos descritos a continuación se produjo como sigue. La proteína de fusión OX-40L:HuFcIgG se expresó en el conocido sistema de expresión celular CHO, usando selección G418 y el conocido sistema del vector de clonación pGEM-T. Se construyó una secuencia guía que comprendía una señal secretora apropiada para el sistema de expresión celular CHO usando oligonucleótidos sintéticos, y se hibridó y se ligó para formar un fragmento de aproximadamente 90 pb. Después del ensamblaje, el ADN se escindió de un gel de agarosa y se amplificó mediante reacción PCR usando cebadores específicos para generar sitios HindIII y XhoI en los extremos. La guía se clonó después en el vector de clonación pGEM-T para formar un vector producto que comprendía la secuencia guía. La secuencia guía incluía también bases para codificar 7 residuos de aminoácidos derivados de la secuencia de la cadena pesada del anticuerpo para proporcionar un sitio de corte del péptido señal. Se llevó a cabo una PCR y se clonó una sub-secuencia de un gen IgG1 humano (cADN) que comprendía dominios bisagra, CH2 y CH3 con la introducción de sitios XhoI y PstI en los extremos 5' y 3' respectivamente para permitir la ligación con las secuencias guía y OX40L humana. Después de la clonación en pGEM-T, se aisló un fragmento XhoI - PstI y se ligó en el vector que comprendía la secuencia guía tal y como se ha mencionado anteriormente (después de que el vector se hubiera digerido con XhoI y PstI), para formar un vector resultado más que comprende una secuencia guía y regiones bisagra-CH2-CH3. Se llevó a cabo una PCR y se clonó el dominio extracelular del gen OX-40L humano con la introducción de sitios PstI y HindIII en los extremos 5' y 3' respectivamente, y se ligó en el vector de clonación pGEM-T. Se seleccionaron los clones con la orientación correcta, de modo que la digestión con PstI sola dé lugar a la liberación de un fragmento de gen que contenía OX40L y una secuencia de de clonación múltiple (en inglés “polylinker”) en el extremo 3'. Este fragmento se ligó después en el sitio PstI del vector resultado anterior, conformando con ello un vector que codifica la construcción de fusión guía-IgG-OX40L deseada. Después se aisló la construcción genética como un fragmento HindIII y se transfirió a un vector de expresión que contenía un promotor hCMV para dirigir la expresión, y un marcador seleccionable neoR. Se cribaron los clones para encontrar insertos en la dirección correcta, y después se crecieron para la transfección. Esta construcción se usó para transfectar células CHO, y los clones CHO positivos se seleccionaron usando G418; Se detectó la secreción de la proteína de fusión mediante la incubación de los sobrenadantes con células de mieloma Sp2/0 transfectadas con OX40 y detección mediante análisis citométrico de flujo. Se engrosaron las células con elevada secreción y la proteína de fusión del sobrenadante se purificó en una columna de proteína G-Sepharose. El material eluido se corrió en un gel SDS-PAGE (12%) y el gel se tiñó con Coomassie blue para confirmar la pureza. Para la secuencia humana OX-40 (“ACT-4-h-1”), véase WO 95/12673, y para la secuencia OX-40L humana (“ACT-4-h-1-L”), véase la WO 95/21915 y los documentos allí referenciados. Otros péptidos que pueden resultar útiles para fusionarse con el agente de unión al receptor OX-40 incluyen moléculas MCH de clase II solubles, otras moléculas co-estimuladoras tales como B7.1 y B7.2, y citoquinas potenciadoras de células T tales como IL-2.

La determinación de que un agente particular se une sustancialmente sólo a el receptor OX-40 se puede hacer fácilmente mediante el uso o adaptación de procedimientos rutinarios. Un ensayo *in vitro* adecuado hace uso del procedimiento Western Blot (descrito en muchos textos estándar, incluyendo “Antibodies, A Laboratory Manual” por Horlow y Lane). Para determinar que un agente de unión al receptor OX-40 dado, tal como un fragmento seleccionado del OX-40L soluble, se une sustancialmente sólo a la proteína OX-40 humana, se extrae la proteína total celular de células humanas que no expresan el antígeno OX-40, tales como células no linfocíticas (por ejemplo., una célula COS

o una célula CHO) transformadas con una molécula de ácido nucleico que codifica OX-40. Como control negativo, también se extrae la proteína total celular de células no transformadas. Después se someten estas preparaciones proteicas a electroforesis en un gel de poliacrilamida no desnaturizador. A continuación esto, las proteínas se transfieren a una membrana (por ejemplo, de nitrocelulosa) mediante la realización de Western Blot, y se incuban el agente a analizar con la membrana. Después de lavar la membrana para eliminar el agente unido de manera no específica, se detecta la presencia de agente unido mediante el uso de un anticuerpo producido frente al agente a analizar conjugado con un agente de detección, tal como la enzima alcalina fosfatasa; la aplicación del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/nitroazul de tetrazolium resulta en la producción de un denso compuesto azul por la fosfatasa alcalina inmunolocalizada. Mediante esta técnica, los agentes que se unen sustancialmente sólo a OX-40 humana demostrarán unirse a la banda de OX-40 humana (que se localizará en el gel en una posición dada determinada por su peso molecular) en el extracto de células transformadas con OX-40, mientras poca o ninguna unión se observará en el extracto de células no transformadas. La unión no específica del agente a otras proteínas puede ocurrir y podrá ser detectable como una débil señal en el Western Blot. La naturaleza no específica de esta unión será reconocida por el experto en la materia por la débil señal que se obtiene en el Western Blot en relación con la fuerte señal primaria que se deriva de la unión específica agente/proteína OX-40 humana. Idealmente, un agente de unión al receptor OX-40 no se unirá a las proteínas extraídas de células no transfectadas.

Además de los ensayos de unión usando proteínas extraídas, los agentes putativos de unión al receptor OX-40 se pueden probar para confirmar su capacidad para unirse sustancialmente sólo al receptor OX-40 *in vivo* mediante la conjugación del agente a una etiqueta fluorescente (tal como FITC) y análisis de su unión a las poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> activadas y no activadas mediante Clasificación de Células Activadas por Fluorescencia (FACS). Un agente que se une sustancialmente sólo al receptor OX-40 solo teñirá células T CD4<sup>+</sup> activadas.

*Transformada:* Una célula transformada es una célula en la que ha sido introducida una molécula de ácido nucleico mediante técnicas de biología molecular. Tal y como se usa en la presente invención, el término transformación abarca todas las técnicas mediante las cuales se puede introducir una molécula de ácido nucleico en tal célula, incluyendo transfección con vectores virales, transformación con vectores plasmídicos, e introducción de ADN desnudo mediante electroporación, lipofección, y aceleración de partículas.

*Aislado:* Un componente biológico “aislado” (tal como un ácido nucleico o una proteína) ha sido sustancialmente purificado o separado de otros compuestos biológicos en la célula del organismo en el cual ocurre el componente de forma natural, esto es, otro ADN y RNA cromosómico y extracromosómico, y proteínas. Los ácidos nucleicos y proteínas que se han “aislado” incluyen así ácidos nucleicos y proteínas purificados por procedimientos de purificación estándar. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparados por expresión recombinante en una célula hospedadora así como ácidos nucleicos de síntesis química.

*Purificado:* El término purificado no requiere pureza absoluta. Más bien, tiene intención de ser un término relativo. Así, por ejemplo, una preparación de ligando OX-40 purificada es aquella en la cual el ligando OX-40 es más puro que el ligando en su entorno natural dentro de una célula. Preferentemente, se purifica una preparación de ligando OX-40 de tal forma que la proteína ligando OX-40 representa al menos el 50% del contenido total de proteína de la preparación.

*Unido operativamente:* Una primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se sitúa en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia de codificación si el promotor afecta a la transcripción o la expresión de la secuencia de codificación. Generalmente, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, cuando es necesario juntar dos regiones de codificación de proteínas, están en el mismo marco de lectura.

*Recombinante:* Un ácido nucleico recombinante es aquel que tiene una secuencia que no ocurre de forma natural o tiene una secuencia que está hecha por una combinación artificial de dos segmentos de secuencia de otra manera separados. Esta combinación artificial se consigue habitualmente por síntesis química o, más comúnmente, por la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética.

*Mamífero:* Este término incluye tanto mamíferos humanos como no humanos. Del mismo modo, el término “paciente” incluye tanto sujetos humanos como no humanos.

## 2. Composiciones y Métodos para Mejorar la Respuesta Inmune Específica de Antígeno en Animales

La mejora de la respuesta inmune específica de antígeno en un mamífero mediante la ocupación del receptor OX-40 en células T CD4 durante o después de la activación por el antígeno se puede conseguir usando una amplia variedad de métodos. El método de elección dependerá principalmente del tipo de antígeno frente al cual se desea mejorar la respuesta inmune, y a continuación se describen varios métodos disponibles. Cualquier método que se seleccione, el agente de unión al receptor OX-40 purificado se debería administrar al animal de tal forma que es presentado a las células T del animal durante o poco después de la sensibilización de las células T por el antígeno. Dado que la activación de células T tiene lugar generalmente aproximadamente dentro de los 3-7 días después de que un antígeno es presentado al sistema inmune, generalmente se prefiere administrar el agente de unión al receptor OX-40 al animal

mediante el método seleccionado aproximadamente dentro de los 7 días después de que el sistema inmune del animal es expuesto al antígeno. Cuando el agente de unión al receptor OX-40 se administra simultáneamente con el antígeno, puede ser ventajoso administrar una forma del agente que tiene estabilidad mejorada (es decir, vida media mejorada) en el cuerpo de modo que el agente permanece en el sistema circulatorio por un periodo de tiempo suficiente para ocupar el receptor OX-40 durante o después de la sensibilización por el antígeno. Las formas del agente de unión al receptor OX-40 que tienen tal estabilidad mejorada incluyen proteínas de fusión que comprenden el ligando OX-40 soluble fusionado con, por ejemplo, la región constante de la IgG humana. Para determinar la vida media de cualquier agente de unión al receptor OX-40 seleccionado, se pueden usar métodos estándar. Por ejemplo, después de la administración del agente por inyección intravenosa, se extrae una pequeña muestra de sangre del animal, con muestras sucesivas extrayéndose cada 6-24 horas durante un periodo de aproximadamente 10 días. A continuación, la concentración del agente presente en cada muestra se determina (por ejemplo, usando métodos inmunológicos de cuantificación, tales como aquellos discutidos en Harlow & Lane, 1998, por ejemplo, ELISA). La vida media del agente se define como el tiempo puntual en el cual la concentración del agente cae al 50% de aquella medida en la primera muestra.

En algunas situaciones, por ejemplo cuando el antígeno es presentado al sistema inmune a lo largo de un periodo prolongado (por ejemplo, en pacientes con cáncer), el agente de unión al receptor OX-40 puede administrarse más de 7 días después de que el sistema inmune sea expuesto al antígeno. Por ejemplo, después de una extracción quirúrgica de un tumor primario de un paciente, se puede administrar un agente de unión al receptor OX-40 para mejorar la respuesta inmune a antígenos tumorales presentes en metástasis, promoviendo con ello la erradicación de tales metástasis del cuerpo. En tal situación, la administración del agente de unión al receptor OX-40 ocurrirá normalmente más de 7 días después de que el sistema inmune del paciente fue expuesto por primera vez a los antígenos tumorales, pero en cualquier caso estará presente cuando los antígenos están siendo presentados a las células T.

Mientras que la molécula que ocupa el receptor OX-40 típicamente será una proteína, tal como un anticuerpo anti-OX-40 o un ligando OX-40, la preparación que se administra al mamífero puede adquirir una serie de formas, incluyendo una preparación de un agente de unión al receptor OX-40 purificado, una molécula de ácido nucleico que codifica el agente de unión al receptor OX-40, una célula o un virus que expresa el agente de unión al receptor OX-40, o una preparación derivada de tal célula o virus.

En su forma más simple, la preparación administrada al mamífero es un agente de unión al receptor OX-40, administrado de una forma dosificadora convencional, y preferentemente combinado con un excipiente, portador o diluyente farmacéutico. Los portadores farmacéuticos adecuados pueden ser sólidos o líquidos, y pueden incluir tampones, antioxidantes tales como ácido ascórbico, otros polipéptidos o proteínas tales como albúmina sérica, carbohidratos, agentes quelantes y otros estabilizantes y excipientes. Los portadores sólidos adecuados incluyen lactosa, estearato de magnesio, tierra alba, sacarosa, talco, ácido esteárico, gelatina, agar, pectina, acacia y manteca de cacao. La cantidad de portador sólido variará ampliamente dependiendo de cuál sea el seleccionado, pero será preferentemente de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 1 g de agente activo por dosis. Los portadores líquidos adecuados incluyen un tampón salino neutro, opcionalmente con conservantes, estabilizantes y excipientes adecuados. El portador o diluyente también puede incluir material de retardo de tiempo bien conocido en la técnica tal como, por ejemplo, diestearato de glicerol, tanto solo como con cera. Los siguientes ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados son sólo ejemplares y un experto en la materia reconocerá que se puede usar un rango muy amplio de tales portadores. Para administrar agentes de unión al receptor OX-40 también se pueden usar sistemas de administración basados en liposomas. Los sistemas basados en liposomas, los cuales pueden utilizarse para proporcionar una liberación regular a lo largo del tiempo del agente a la corriente sanguínea, son bien conocidos en la técnica y se ejemplifican mediante los sistemas descritos en la Patente U.S. Nos. 4.356.167 (Sandoz: LA Kelly; "Liposome drug delivery systems"), 5.580.575 (ImaRx: EC Unger *et al.*; "Therapeutic drug delivery systems"), 5.595.756 (Inex Pharm and Univ of BC: MB Bally *et al.*; "Liposomal compositions for enhanced retention of bioactive agents") y 5.188.837 (Nova Pharm: AJ Domb; "Lipospheres for controlled delivery of substances"), y los documentos allí citados.

La formulación del agente de unión al receptor OX-40 con un portador farmacéutico puede adquirir muchas formas físicas, pero preferentemente es una suspensión o solución líquida estéril, adecuada para la inyección directa. Preferentemente, se administrará al paciente el agente de unión al receptor OX-40 en una formulación como se ha descrito anteriormente (es decir, en combinación con un portador farmacéutico), en la que la formulación incluye una cantidad clínicamente efectiva del agente.

Tal y como se usa en la presente invención "una cantidad clínicamente efectiva" es una cantidad que resulta en un efecto clínicamente significativo. Esta naturaleza de este efecto variará con el contexto clínico en el que se esté usando el agente de unión al receptor OX-40, por ejemplo, si el agente se está administrando como un terapéutico (por ejemplo, para tratar una enfermedad infecciosa, o cáncer) o como un profiláctico (por ejemplo, una vacuna). En el contexto terapéutico, si el agente de unión al receptor OX-40 se está administrando a un paciente con cáncer, se apreciará que cualquier mejora en la condición del paciente sea clínicamente significativa. Por lo tanto, en una situación tal, "una cantidad clínicamente efectiva" abarca cantidades de agente de unión al receptor OX-40 que resultan en al menos una remisión parcial del cáncer así como cantidades que ralentizan o limitan la progresión del cáncer. Del mismo modo, en el contexto terapéutico en el que el agente se está usando para mejorar la respuesta inmune de un paciente a un agente infeccioso, tal como un virus o una bacteria, donde el paciente ya está infectado por el agente, una cantidad clínicamente efectiva es una cantidad que resulta en un efecto clínicamente efectivo, lo que quiere decir un efecto que resulta en cierto grado de remisión de la infección o de los síntomas clínicos.

## ES 2 315 008 T3

En el contexto profiláctico, tal como la vacunación, una cantidad clínicamente efectiva de un agente de unión al receptor OX-40 es una cantidad suficiente para proporcionar una mejora de la respuesta inmune a el antígeno diana, es decir, para producir una respuesta inmune mayor que la que se presentaría sin administración del agente de unión al receptor OX-40. La cuantificación de la respuesta inmune que se deriva de una vacunación puede obtenerse de cualquier forma estándar, por ejemplo, midiendo la titulación de anticuerpo sérico para el nivel y/o duración frente a cualquier antígeno de prueba conveniente, y/o la proliferación de linfocitos en respuesta al antígeno de prueba *in vitro*.

Se apreciará que una dosis clínicamente efectiva de un agente de unión al receptor OX-40 variará dependiendo del propio agente de unión al receptor OX-40 que se use (por ejemplo si es un ligando OX-40 soluble o un fragmento de anticuerpo anti-OX-40), el contexto clínico (por ejemplo, si el agente se está usando terapéuticamente o profilácticamente), las características del paciente (edad, peso, otras medicaciones que está tomando, etc.) y, en el contexto terapéutico, la severidad de la condición. Así, la valoración de una dosificación clínicamente efectiva será decidida finalmente por un médico, veterinario, u otro personal sanitario que esté familiarizado con el paciente. Típicamente, la administración de agente de unión al receptor OX-40 a un mamífero de acuerdo con los métodos de la presente invención implicarán la administración de aproximadamente 10 ng a 1 g de agente de unión al receptor OX-40 por dosis, usándose comúnmente unidades dosis unitarias de aproximadamente 10 µg a 100 mg, y estando entre los rangos comúnmente usados las dosificaciones específicas de hasta 1 mg o 10 mg.

Para las aplicaciones terapéuticas, el agente de unión al receptor OX-40 se puede administrar al paciente a través de varias de rutas, incluyendo la intravenosa o, cuando el paciente tiene un tumor, directamente en el lugar del tumor. El agente puede ser el único ingrediente activo en la composición, o puede estar combinado con otros agentes que tengan un efecto beneficioso, tales como interferón u otras moléculas inmuno-estimulantes.

En el contexto profiláctico (vacuna), el agente de unión al receptor OX-40 se puede administrar al animal en combinación con una preparación de vacuna convencional, tal como una preparación de vacuna que comprende antígenos bacterianos o víricos. El agente de unión al receptor OX-40 puede combinarse con la vacuna convencional, o se puede administrar como una preparación separada junto con la vacuna convencional. Como se ha comentado anteriormente, la selección de un agente de unión al receptor OX-40 adecuado se hará para asegurar que el antígeno permanece en el sistema circulatorio tiempo suficiente para unirse a los receptores OX-40 en las células T durante la sensibilización por el antígeno (es decir, aproximadamente 3-7 días después de la administración del antígeno). Preferentemente, cuando el agente de unión al receptor OX-40 se administra por separado, se administra dentro de aproximadamente una semana desde que se administra la vacuna. Preparaciones de vacunas convencionales adecuadas para su uso en la presente invención incluyen aquellas preparadas con antígenos bacterianos purificados, bacterias destruidas con calor, subunidades de vacunas y vacunas víricas basadas en virus vivos o atenuados.

Cuando el agente de unión al receptor OX-40 se administra al mamífero en una única preparación con los antígenos de la vacuna, la formulación se puede preparar simplemente mediante la mezcla de una cantidad clínicamente efectiva de un agente de unión al receptor OX-40 con la preparación de antígeno. Alternativamente, el agente de unión al receptor OX-40 se puede producir junto con el antígeno. Por ejemplo, cuando el antígeno que se va a administrar como vacuna es un antígeno bacteriano o una mezcla de antígenos bacterianos, la bacteria a partir de la cual se prepara la preparación puede ser una bacteria transgénica que expresa el agente de unión al receptor OX-40. En tal situación, el agente de unión al receptor OX-40 se obtiene directamente en combinación con los antígenos bacterianos. Del mismo modo, las vacunas que comprenden antígenos tumorales y agente de unión al receptor OX-40 se pueden preparar a partir de células tumorales que expresan el agente de unión al receptor OX-40. Los métodos para expresar proteínas tales como el ligando OX-40 en células transgénicas procarióticas y eucarióticas son bien conocidos se describen en textos estándar de laboratorio tales como Sambrook *et al.* (1988).

También se describe que la respuesta inmune de un mamífero a un antígeno particular se puede mejorar mediante la administración al mamífero de una molécula de ácido nucleico que codifica el agente de unión al receptor OX-40. Tal molécula de ácido nucleico se administra preferentemente bien dentro de una célula, o bien como parte del genoma viral, pero también se puede administrar directamente como una molécula de ácido nucleico "desnuda". Por ejemplo, se puede introducir una molécula de ácido nucleico que codifica un agente de unión al receptor OX-40 en una bacteria atenuada (es decir, una forma de organismo que no causa una enfermedad significativa cuando se administra a un mamífero) en un vector plasmídico de tal forma que el agente de unión al receptor OX-40 se expresa en la superficie de la bacteria. La bacteria se puede administrar al mamífero de la misma manera que una vacuna de bacteria atenuada convencional. Alternativamente, la molécula de ácido nucleico que codifica el agente de unión al receptor OX-40 se puede introducir dentro del genoma de un virus, el cual se usa como una vacuna viva atenuada. Los virus atenuados incluyen aquellos en los que se ha eliminado un gen esencial, como se describe en las Patentes U.S. Nos. 5.665.362 and 5.837.261 (Cantab Pharmaceuticals: Inglis *et al.*). Los virus que son adecuados para este propósito incluyen virus de ADN, tales como adeno, herpes, papova, papiloma y parvo virus, así como virus de RNA tales como el virus de la polio y el virus de la gripe. En las Patentes U.S. Nos. 5.665.362 and 5.837.261 (*supra*), 5.338.683 (Health Research: E Paoletti) y 5.494.807 (E Paoletti) se describen métodos para preparar virus portadores de secuencias de ácido nucleico heterólogas que pueden ser utilizados como vacunas víricas.

Se puede introducir un ácido nucleico que codifica un agente de unión al receptor OX-40 en una célula tumoral. En muchos pacientes con cáncer, las células tumorales escapan la detección por parte del sistema inmune mediante mecanismos tales como la infra-regulación de la expresión de moléculas MHC y/o co-estimuladoras. En consecuencia,

un método de tratamiento propuesto previamente ha sido eliminar las células tumorales del paciente e introducir en ellas ácidos nucleicos que codifican, por ejemplo, MCH de clase II, la molécula co-estimuladora B7 y la molécula estimuladora/adhesiva CD2 (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Europea publicada con número EP 0 733 373 y las referencias allí citadas). Se espera que la aplicación del descubrimiento aquí descrito a esos métodos, la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica un agente de unión al receptor OX-40 en células tumorales, proporcione un beneficio considerable.

Todos los tipos de tumores son potencialmente susceptibles de tratamiento mediante esta aproximación incluyendo, por ejemplo, carcinoma de pecho, pulmón, páncreas, ovario, riñón, colon y vejiga, así como melanomas y sarcomas. Las moléculas de ácido nucleico que codifican un agente de unión al receptor OX-40 se incorporan a un vector apropiado para la expresión del agente de unión al receptor OX-40 en células tumorales. Los vectores apropiados incluyen vectores plasmídicos, cósmicos y víricos, tales como retrovirus, adenovirus y virus del herpes. Para este propósito se pueden utilizar virus atenuados, tales como los descritos en las Patentes U.S. Nos. 5.665.362 y 5.837.261. Debido a la elevada eficiencia con la cual los vectores víricos infectan células de mamíferos, se espera que los vectores víricos ofrezcan ventajas sobre otro tipo de vectores. Además de una molécula de ácido nucleico que codifica un agente de unión al receptor OX-40, también se pueden introducir en el vector otras moléculas de ácido nucleico para mejorar aún más el efecto inmunogénico. Como ejemplo, tal molécula adicional de ácido nucleico incluye ácidos nucleicos que codifican proteínas MCH de clase II (incluyendo subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ), y otras moléculas co-estimuladoras, tales como B7.1 y B7.2. Si se desea, también se puede introducir en el vector una molécula de ácido nucleico que codifica un marcador elegible, de tal forma que se pueden seleccionar fácilmente aquellas células tumorales que se transforman satisfactoriamente con el vector.

A continuación el vector se introduce dentro de la célula tumoral mediante una de una variedad de técnicas, tales como electroporación, lipofección, co-cultivo con células productoras de virus, u otros medios estándar. En una realización preferida, las células tumorales son células que se han extraído del paciente a tratar, pero las células tumorales pueden ser alternativamente células de una línea de células tumorales, tal como las líneas de células tumorales disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

Si se desea cribar las células para seleccionar aquellas en las cuales se ha introducido el vector, esto se puede conseguir mediante una variedad de medios, que incluyen seleccionar por la expresión del marcador elegible si se utiliza alguno, o cribar por la expresión del agente de unión al receptor OX-40 en la superficie de las células. Se puede llevar a cabo convenientemente este último procedimiento usando un separador celular activado por fluorescencia ("fluorescence activated cell sorter", FACS).

Posteriormente se administran las células tumorales a un paciente en combinación con un portador adecuado como agua tamponada, solución salina o glicina. En una realización preferida, cuando las células tumorales son células originalmente extraídas del paciente, estas son atenuadas antes de que se administren al paciente. Una célula atenuada es aquella que es activa metabólicamente pero que ya no puede proliferar. Los métodos para atenuar células son bien conocidos e incluyen aquellos descritos en la EP 0 733 373.

En una realización alternativa, se puede administrar al paciente las membranas celulares de las células tumorales, las cuales incluyen el agente de unión al receptor OX-40, en lugar de las células tumorales intactas. Se puede preparar fácilmente una preparación de membranas celulares mediante la rotura o la lisis de las células usando técnicas estándar, tales como una Prensa Francesa, congelación-descongelación, o sonicación. Después de la rotura de las células, se puede obtener una fracción enriquecida en membranas mediante centrifugación.

También se describe que las moléculas de ácido nucleico que expresan un agente de unión al receptor OX-40 alternativamente se pueden administrar al paciente directamente en forma de ADN "desnudo", de forma que la expresión del agente de unión al receptor OX-40 ocurre en el cuerpo del paciente. Los métodos para la administración de ADN desnudo a animales de manera que se cause la expresión de este AND en el cuerpo del paciente son bien conocidos y están descritos, por ejemplo, en las Patentes U.S. Nos. 5.620.896 (Univ Massachusetts Med Ctr: JE Herrmann *et al.*; "DNA vaccines against rotavirus infections"), 5.643.578 (Univ Massachusetts Med Ctr & St Jude Children's Res Hosp: HL Robinson *et al.*; "Immunization by inoculation of DNA transcription unit") and 5.593.972 (Wistar Inst & Univ of PA: DB Weiner *et al.*; "Genetic immunization"), y referencias allí citadas.

La presente invención también abarca otros métodos de inmunoterapia para el tratamiento de condiciones como cáncer, incluyendo inmunoterapia adoptiva. Tal y como se conoce en la técnica, la inmunoterapia adoptiva implica la obtención de células linfoides expuestas a un antígeno particular, el cultivo de esas células *ex vivo* en condiciones bajo las cuales se mejora la actividad de las células, y la administración posterior de las células al individuo. Las células linfoides son preferentemente células T extraídas del paciente con cáncer, por ejemplo células T de un nódulo linfático infiltrado. La presente invención enseña que la ocupación del receptor OX-40 en estas células con un agente de unión al receptor OX-40 estimulará estas células y mejorará el número de células de memoria producidas a partir de estas células. En consecuencia, un aspecto de la presente invención es una forma de inmunoterapia adoptiva en la cual la incubación de las células linfoides *ex vivo* se lleva a cabo en un medio que contiene un agente de unión al receptor OX-40 antes de la administración de las células al paciente. Los detalles técnicos de los métodos para la obtención de células linfoides El cultivo *ex vivo* de tales células con estimulantes inmunitarios, y la administración a los pacientes son bien conocidos en el campo y están descritos por ejemplo en la Patente U.S. Nos. 4.690.915 (US DHHS: SA Rosenberg; "Adoptive immunotherapy as a treatment modality in humans"), 5.229.115 (Immunex: DA

Lynch; "Adoptive immunotherapy with interleukin-7", 5.631.006 (Endotronics: GB Melink *et al.*: "Immunotherapy protocol of culturing leukocytes in the presence of interleukin-2 in a hollow fiber cartridge", and 4.902.288 (M Ingram; "Implantable immunotherapy system using stimulated cells"), y referencias allí citadas.

### 3. Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran los métodos y materiales para usar en conexión con la presente invención, y también indican la eficacia de la presente invención.

#### Ejemplo 1

##### *Estimulación de Células T Específicas de Antígeno con Agente de Unión al Receptor OX-40*

Para demostrar que los agentes de unión al receptor OX-40 pueden estimular las células T específicas de antígeno, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* de proliferación de células T usando células T específicas de la proteína básica de mielina (MBP) y anticuerpo anti-OX-40 como agente de unión al receptor OX-40.

Después de la expansión en RPMI y FCS al 10%, las células T específicas de MBP se recogieron, se lavaron, se contaron y se resuspendieron en un medio usado en el ensayo de proliferación de células T descrito por Vandembark *et al.* (1985). Se estimularon  $2 \times 10^5$  de células T en medio de estimulación en placas de 96 pocillos y fondo plano durante 48 horas, y se pulsaron durante 18 horas con  $1 \mu\text{Ci} [^3\text{H}]\text{-TdR}$ . Se recolectaron las células y se calculó la media de incorporación de timidina (cpm) de pocillos triplicados. Los anticuerpos monoclonales para CD3, OX-40 y CD28 de rata fueron obtenidos comercialmente de Pharmigen (La Jolla, CA).

Para examinar el efecto del OX-40L sobre la proliferación de células T *in vitro*, se sembraron las células T en una placa de 96 pocillos planos a  $2 \times 10^5$ /pocillo y se estimularon con  $10 \mu\text{g/ml}$  de anti-CD3 soluble o bien ligado a la placa más concentraciones crecientes de anticuerpo anti-OX-40. Las células se cultivaron durante 48 hr, se marcaron con  $^3\text{H}$ -timidina durante 18 hr, y se recolectaron y se contaron. Los resultados, mostrados en la Fig. 2, se presentan como la media de CPM con la desviación estándar calculada de pocillos triplicados. Los resultados indican que el agente de unión al receptor OX-40 (es decir, el anticuerpo monoclonal anti-OX-40) produce una co-estimulación/estimulación (mitogénesis) de las células T  $\text{CD4}^+$  específicas de MBP dependiente de la dosis.

#### Ejemplo 2

##### *La Ocupación del Receptor OX-40 es en la Etapa Efectora*

Para determinar la etapa de desarrollo de las células T (es decir, célula naive o efectora) en la cual es efectiva la ocupación del receptor OX-40, se utilizó una línea de células de fibroblasto que expresa la molécula  $\text{IE}^k$  MHC de clase II murina (Dubey *et al.*, 1995). Esta línea celular puede presentar un antígeno (citocromo c de paloma, (PCC)) a las células T de los ratones transgénicos de receptor de células T descritos por Kaye y Hedrick (1989). Usando esta línea celular, se produjo una línea celular de fibroblastos transgénicos que expresa el ligando OX-40 y que puede estimular las células T  $\text{CD4}^+$  esplénicas de los ratones transgénicos de receptor de células T.

Los experimentos que comparan el efecto de la estimulación de células T naive tomadas directamente de los ratones con antígeno PCC en combinación con fibroblastos que expresan (1) MHC de clase II solo, (2) MHC de clase II y B7.1, (3) MHC de clase II y ligando OX-40, o (4) MHC de clase II, ligando OX-40 y B7.1 mostraron que la combinación MHC de clase II/ligando OX-40/B7.1 era el mejor estimulante de células T naive (resultados no mostrados).

Después de esto, las células T naive sacadas directamente de los animales se estimularon con antígeno PCC y fibroblastos que expresan MHC de tipo II y B7.1 para producir células efectoras. Después, estas células efectoras se expandieron en IL-2 durante 5 días, se lavaron y se re-estimularon con antígeno PCC y en combinación con fibroblastos que expresan (1) MHC de clase II solo, (2) MHC de clase II y B7.1 o (3) MHC de clase II y ligando OX-40. El experimento se realizó usando tres proporciones de APC:células T, y el efecto de este segundo acontecimiento de estimulación se midió mediante la cuantificación de la producción de IL-2. Los resultados, representados en la Fig 3, mostraron que la presentación del antígeno por APCs que expresan el MHC de clase II y el ligando OX-40 era el estimulador más potente de las células T en etapa efectora. En consecuencia, parece que la ocupación del receptor OX-40 es más importante en la etapa efectora de las células T, lo que sugiere que la ocupación del receptor OX-40 tiene una función en el desarrollo de las células T  $\text{CD4}^+$  en etapa efectora y puede mejorar el desarrollo de células de memoria. Esto diferencia claramente el efecto de co-estimulación de OX-40L de la co-estimulación de moléculas co-estimuladoras descritas previamente, las cuales actúan en la transición de célula naive a célula efectora.

## Ejemplo 3

*El Agente de Unión al Receptor OX-40 induce Resistencia a Tumor*

5 Para demostrar el efecto de proporcionar agente de unión al receptor OX-40 a las células T durante la estimulación por el tumor *in vivo*, se realizaron experimentos usando OX-40L soluble fusionado con la porción Fc de la IgG humana (“OX-40L:HuFcIgG”) como agente de unión al receptor OX-40.

10 El protocolo de inoculación para esta serie de experimentos se realizó mediante inoculación subcutánea en los ratones a día 0 con aproximadamente  $1$  a  $3 \times 10^5$  células de sarcoma tumoral MCA 303 (huntzicker & Fox 1995). Tres días después se inyectó intraperitonealmente OX-40L:HuFcIgG a los animales, y se les dio una segunda dosis a día 7 después de la inoculación del tumor (la dosis varió dependiendo del experimento, véanse los detalles a continuación). A continuación se monitorizó el crecimiento tumoral en los animales durante 50 días o más. Los animales se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron un tamaño de  $0,3 \text{ in}^2$ .

15 La figura 4 muestra el notable efecto de la inyección i.p. del ligando OX-40 soluble en tumor establecido 3 días. Se inyectaron  $3 \times 10^5$  células tumorales MCA 303 sometidas a pases *in vitro* en seis animales. Tres animales recibieron i.p.  $100 \mu\text{g}$  de ligando OX-40 murino soluble en  $500 \mu\text{l}$  de RPMI y tres animales recibieron  $500 \mu\text{l}$  de RPMI solo, tres y siete días después de la inoculación del tumor. Se monitorizaron signos de tumor en los animales durante 50 días desde la inoculación. Tal y como se muestra en la Fig. 4, mientras que todos los animales que recibieron células tumorales sin OX-40L murieron en el plazo de 38 días, los animales que sí recibieron OX-40L permanecieron libres de tumor.

20 Después de esto, los animales que se habían tratado con ligando OX-40 soluble durante la sensibilización por el tumor y que se habían vuelto resistentes a la provocación tumoral fueron depletados de células T CD4<sup>+</sup> mediante la administración i.p. de anti-CD8. Estos animales se sacrificaron y se aislaron y fenotiparon sus esplenocitos para mostrar que las células T CD8<sup>+</sup> habían sido depletadas. Se transfirieron adoptivamente las células del bazo en ratones naive (1 equivalente de bazo/ratón), y los ratones receptores fueron provocados con tumor MCA 303 9 días después de la transferencia. Se inoculó un número equivalente de células de tumor MCA 303 en ratones naive de control y se monitorizaron signos de tumor en todos los animales durante 50 días desde la inoculación. Como se muestra en la Fig. 5, mientras que todos los animales que sólo recibieron células tumorales murieron en el plazo de 31 días desde la administración de las células tumorales, todos los animales que recibieron los esplenocitos transferidos desde animales inmunes a tumor permanecieron sanos. Este experimento indica que el efecto de la administración de agente de unión al receptor OX-40 a los ratones junto con las células tumorales produce una población suficiente de células T de memoria específicas de antígeno tumoral para conferir inmunidad después de la transferencia adoptiva. Es evidente, por lo tanto, que la co-estimulación de células T efectoras mediante la ocupación del receptor OX-40 es importante en la transición de la célula de efectora a memoria.

## 40 Ejemplo 4

*El Agente de Unión al Receptor OX-40 Confiere Resistencia a Células Tumorales Sometidas a Pases in vivo*

45 La protección que se confiere mediante la administración de OX-40L descrita en el Ejemplo 3 era frente a células tumorales sometidas a pases *in vitro*. Debido a que las células tumorales sometidas a pases *in vivo* son significativamente más tumorigénicas, se examinó la capacidad del OX-40L para conferir protección frente a células sometidas a pases *in vivo*. Se inyectaron subcutáneamente  $1 \times 10^5$  células tumorales MCA 303 que habían sido sometidas a pases *in vivo* en diez animales. Se inyectaron i.p.  $100 \mu\text{g}$  de ligando OX-40 soluble en cinco animales y el mismo volumen de RPMI se inyectó en cinco animales, tres y siete días después de la inoculación del tumor. Se hizo un seguimiento de signos de tumor en los animales durante 80 días desde la inoculación del tumor. Los resultados, mostrados en la Fig. 6, indican que la administración de OX-40L confiere una protección mejorada incluso frente a células tumorales sometidas a pases *in vivo* altamente tumorigénicas.

55 La capacidad del OX-40L para conferir protección frente a células tumorales sometidas a pases *in vivo* también se examinó usando diferentes dosis de OX-40L. Se inyectaron subcutáneamente  $1 \times 10^5$  células tumorales MCA 303 que habían sido sometidas a pases *in vivo* en veinte animales. Se separaron los animales en cinco grupos y se les inyectaron i.p. cantidades crecientes de ligando OX-40 soluble en los días 3 y 7 después de la inoculación del tumor. El grupo control recibió RPMI, mientras que la titulación de la dosis se realizó con 25, 50, 100, y  $250 \mu\text{g}$  de OX-40L por inyección. Se hizo un seguimiento de signos de tumor en los animales durante 66 días después de la inoculación del tumor. Los resultados, mostrados en la Fig. 7, indican que la resistencia mejorada a tumor exhibida por los animales que habían recibido OX-40L es dependiente de la dosis de OX-40L recibida, y que, incluso contra las virulentas células tumorales sometidas a pases *in vitro*, un 50% de supervivencia es alcanzable con dosis más elevadas de agente de unión al receptor OX-40.

65

## Ejemplo 5

*Agentes de Unión al Receptor OX-40 como Componentes de una Vacuna Tumoral*

5 Este ejemplo demuestra la eficacia de los agentes de unión al receptor OX-40 en vacunas tumorales. Una línea de células de melanoma B16 de ratón, F10, la cual no expresa el MHC de clase II o el ligando OX-40 se transfectó (con Lipofectina) con ADNc para el ligando OX-40 y CIITA. El ADNc CIITA codifica una proteína que se une al promotor del MHC de clase II y potencia la síntesis y expresión en la superficie celular de los genes MHC de clase II endógenos. Se co-transfectaron estos dos genes en la línea parental F10 y se aislaron tres variantes; 1) MHC de clase II<sup>+</sup>, 2) ligando OX-40<sup>+</sup> y 3) MCH de clase II<sup>+</sup> y ligando OX-40<sup>+</sup>. Estas variantes de transfección y la línea parental se irradiaron con 500 rads y se inyectaron subcutáneamente en animales naive (2×10<sup>6</sup> células/inyección) y el procedimiento de vacunación se repitió 14 días después. Los animales inmunizados fueron provocados con la línea celular parental F10 inyectada subcutáneamente (5×10<sup>5</sup> células/animal).

15 La Figura 8 muestra el resultado de un experimento en el cual se inyectó en animales naive tumor parental F10 irradiado, tumor F10 resistente a higromicina, F10 que expresa MHC de clase II solo, o F10 que expresa MHC de clase II y ligando OX-40. Dos semanas más tarde se provocó a estos animales con tumor F10 parental vivo y se realizó un seguimiento de signos de tumor en los animales durante 84 días. Tal y como se muestra en la Fig. 8, los animales que no recibieron inmunización inicial sucumbieron rápidamente a las células tumorales F10, mientras que la inmunización inicial con el tumor F10 irradiado confirió algún grado de protección. Se vio una protección mayor con animales que fueron inmunizados con las células F10 irradiadas que expresan MHC de clase II, y una protección máxima se observó cuando la inmunización se realizó usando células F10 que expresan tanto MHC de clase II como OX-40L. Este resultado es esperado puesto que las células F10 que no expresan MHC de clase II estarían enormemente perjudicadas en su capacidad para interactuar con el receptor de la célula T. Muchas células tumorales infra-regulan o suprimen completamente la expresión del MHC de clase II. Por lo tanto, en una aplicación clínica, puede ser ventajoso transformar células tumorales extraídas de un paciente con moléculas de ácido nucleico que codifican el MHC de clase II y un agente de unión al receptor OX-40, antes de que las células se devuelvan al paciente.

## 30 Ejemplos 6-9

En los siguientes ejemplos adicionales, el receptor OX-40 (OX-40R) es ocupado bien por un ligando OX-40 (OX-40L) o bien por un anticuerpo agonista par enviar una señal co-estimuladora a las células T efectoras, y se observó que esto mejoró una respuesta de las células T específicas de tumor. La inyección de OX-40L:Ig o anti-OX-40R *in vivo* durante la sensibilización por el tumor llevó a un porcentaje de sobrevivientes libres de tumor (20-55%) de 4 tumores diferentes derivados de 4 tejidos separados. El efecto anti-OX40R fue dependiente de la dosis y acentuó la memoria de las células T específicas de tumor. Se cree que los datos de estos ejemplos indican que la ocupación del OX-40R *in vivo* aumenta la sensibilización específica por el tumor mediante la estimulación/expansión del repertorio natural de células T específicas de tumor del hospedador. También se cree que la aparición de células T OX-40<sup>+</sup> agrupadas en torno a células tumorales *in vivo* indica que esto es una aproximación práctica para expandir las células T reactivas a tumor y con ello mejorar la inmunoterapia tumoral en pacientes con cáncer.

## Ejemplo 6

45 *Expresión del OX-40R en Cáncer de Pecho Humano*

Con el fin de determinar la relación espacial entre células T OX-40<sup>+</sup> y células tumorales, se examinaron por inmunohistoquímica diversas biopsias de cáncer de pecho humano. Se analizaron las células CD4<sup>+</sup> y OX-40R<sup>-</sup> tanto en los tumores primarios como en los nódulos linfáticos invadidos por el tumor. La Fig. 9 es una muestra representativa de dos pacientes separados ambos con carcinoma de pecho ductil infiltrante. El panel A representa linfocitos infiltrados en tumor en un tumor 1<sup>o</sup>, mientras que el panel B representa un nódulo linfático con infiltración tumoral. Las células OX-40R<sup>+</sup> se visualizaron (con mayor magnificación) y eran un subgrupo de los linfocitos invasores que estaban muy próximos a las células tumorales. Una cantidad de las células OX-40R<sup>+</sup> parecen ser mayores (blastos) con algunas exhibiendo la apariencia de linfocitos sufriendo mitosis. El panel B representa un nódulo linfático en el cual más de la mitad de la arquitectura ha sido invadida por el tumor. Hay abundantes células CD4<sup>-</sup> que rodean el tumor invasor. Las células OX-40R<sup>+</sup> se encontraron concentradas en áreas directamente adyacentes a las células tumorales invasoras. También se encontraron células OX-40R<sup>-</sup> en zonas que no estaban invadidas por el tumor, pero el mayor porcentaje se encontró más cerca del sitio de la infiltración tumoral. Se cree que las células OX-40R<sup>-</sup> en estas secciones de tejido representan seguramente células T específicas de tumor.

## Ejemplo 7

*Ocupación del OX-40R in vivo Durante la Sensibilización por el tumor (Sarcoma)*

65 Sin desear restringirse por la teoría, se cree que las células OX-40R<sup>+</sup> en el lugar del tumor o los nódulos linfáticos de drenaje son seguramente células T específicas de tumor *in vivo*. Se cree que la ocupación del OX-40R causa una potente respuesta co-estimuladora que lleva a la proliferación de las células T, el incremento de la producción de citoquinas, y la supervivencia mejorada de las células T efectoras. La Figura 10 muestra los resultados de pruebas

diseñadas para investigar si la ocupación del OX-40R *in vivo* durante la sensibilización por el tumor conduciría a una mejorada respuesta específica anti-tumoral. La Figura 10 representa ratones en los que se inyectó subcutáneamente (s.c.) un inóculo letal de MCA 303 (sarcoma inducido por metilcolantreno) y que fueron tratados 3 y 7 días después con mOX-40L:Ig, DR3:Ig, o bien con solución salina. Los ratones tratados con DR3:Ig se tuvieron que sacrificar debido al crecimiento de un tumor con cinética similar a los ratones que recibieron solución salina. En comparación, todos los ratones que recibieron mOX-40L:Ig tuvieron un retraso en el crecimiento del tumor y un 60% permanecieron libres de tumor durante más de 70 días. Se volvió a provocar subcutáneamente a los ratones protegidos con mOX-40L:Ig con tumor MCA 303 y los ratones permanecieron libres de tumor, se cree que indica que habían desarrollado una respuesta de células T de memoria específica de tumor.

Los ratones a los que se inyectó MCA 303 fueron sometidos a titulación de dosis de mOX-40L:Ig en los días 3 y 7 después de la inoculación del tumor. Los ratones que recibieron 25 o 50 micro-g de mOX-40L:Ig tuvieron que sacrificarse debido al crecimiento del tumor en una franja de tiempo similar a los ratones control tratados con solución salina. El cincuenta por ciento de los ratones que recibieron 100 micro-g de mOX-40L:Ig experimentaron un retraso en el crecimiento del tumor, mientras que el 100% de los ratones que recibieron 250 micro-g se retrasaron en el crecimiento del tumor. Por último, el 25% del grupo de 100 micro-g y el 50% del grupo de 250 micro-g estuvieron libres de tumor durante más de 70 días después del desafío con tumor. Se debería hacer notar que la línea tumoral MCA 303 se vuelve más tumorigénica y menos inmunogénica cuantas más veces se somete a pases *in vivo*. La línea tumoral MCA 303 en la Fig. 11 había sido sometida a más pases *in vivo* que en la Fig. 10, por lo tanto se cree que el tratamiento con mOX-40L:Ig ha dado una cantidad de efecto ligeramente menor en la dosis de 100 micro-g.

La Fig. 12 muestra el destino de ratones en los que se inoculó MCA 303 sometido a pases *in vitro* y después tratados con mOX-40L:Ig (MCA 303 tratado *in vitro* era más fácil de tratar). Se inoculó el tumor s.c. en los ratones y se les inyectó mOX-40L:Ig en los días 3 y 6 después de la inoculación del tumor. El panel 4A muestra que todos los ratones tratados con mOX-40L:Ig sobrevivieron al desafío inicial con tumor mientras que todos los ratones en los que se inyectó solución salina tuvieron que ser sacrificados debido a una carga excesiva de tumor. Los ratones tratados con mOX-40L:Ig que sobrevivieron el desafío inicial con tumor (Fig. 12.A) fueron después vueltos a desafiar con MCA 303 y todos los ratones fueron inmunes al segundo desafío durante 53 días (resultados no mostrados). Se inoculó MCA 303 s.c. en estos mismos animales y 10 días después se depletaron de células CD8 inyectando un anti-Lyt 2 intraperitonealmente (i.p.) Tres días después estos ratones se sacrificaron y mostraron estar depletados de células CD8 (<2%) en el bazo y  $1,45 \times 10^{-7}$  de estas células del bazo fueron transferidas a ratones naive. Quince días después se desafió a los ratones con MCA 303 s.c. y la Fig. 12B muestra que los ratones que recibieron las células inmunes depletadas de CD8 fueron resistentes al desafío tumoral mientras que los ratones control tuvieron que sacrificarse debido a la carga tumoral.

#### Ejemplo 8

##### *Tratamiento con OX-40R Específico en un Modelo Tumoral Débilmente Inmunogénico (B16/F10)*

La variante F10 de la línea de melanoma B16/B16 no provoca una respuesta inmune protectora cuando se inyecta s.c. como vacuna irradiada (resultados no mostrados), y se ha caracterizado por tanto como un tumor débilmente inmunogénico. La Figura 13 muestra los resultados de pruebas diseñadas para determinar si la ocupación del OX-40R durante la sensibilización por el tumor podría mejorar la inmunidad a este agresivo tumor. La Figura 13A muestra que tratar a los ratones con mOX-40L:Ig en los días 3 y 7 desde la inoculación del tumor F10 fue efectiva en comparación con los ratones control (el 25% aproximadamente sobrevivió el desafío tumoral a largo plazo). La Fig. 13B muestra que un reactivo separado que se une al OX40R (anticuerpo monoclonal OX-86) administrado a la misma dosis mejoró la supervivencia libre de tumor hasta un nivel similar que el mOX-40L:Ig. El porcentaje de ratones libres de tumor en el tratamiento con anticuerpo fue muy parecido al de mOX-40L:Ig y ambos reactivos demostraron proporcionar una protección al tumor estadísticamente significativa durante un análisis log rank ( $p = ,007$  (anticuerpo) y  $,05$  (mOX-40L:Ig)).

#### Ejemplo 9

##### *Mejora de la Inmunidad Anti-tumoral en Modelo de Cáncer Colorectal (CT26)*

Se diseñó un protocolo similar para tratar ratones con células tumorales CT26 inyectadas s.c. tal y como se indica anteriormente (mOX-40L:Ig - régimen de dos dosis). Se usó huOX-40L:Ig como control negativo porque no se une al OX-40R murino. En un experimento inicial el régimen de dos dosis fue capaz de mejorar la supervivencia libre de tumor significativamente  $p = ,04$  (resultados no mostrados). Se realizó el experimento idéntico al descrito anteriormente salvo que con inyecciones múltiples después de la inoculación del tumor (inyecciones administradas en los días 2, 7, 14, 21, 27, y 40). La Fig. 14A muestra que la inyección múltiple fue beneficiosa para la supervivencia libre de tumor con un valor p de mayor confianza ( $p = ,01$ ) que el programa de inyección de dos dosis. Siete de los ratones supervivientes del grupo tratado con mOX-40L:Ig se volvieron a desafiar con CT26. La Fig. 14B muestra que todos los ratones tratados con mOX-40L:Ig resistieron el desafío y permanecieron libres de tumor, mientras que todos los ratones naive de control sucumbieron al desafío tumoral. Los 7 ratones libres de tumor se volvieron después a desafiar con un tumor singénico de un origen tisular diferente (Renca - origen renal) para probar la respuesta específica a tumor. Seis de los 7 ratones resistentes a CT26 tuvieron especificidad a antígenos tumorales asociados a cáncer de colon.

## Resumen de los Ejemplos 6-9

*Ocupación del OX-40R durante la Sensibilización por el tumor*

5 La Tabla 1 resume los datos de cuatro modelos tumorales, ejemplos 6-9, en los cuales se ocupó el OX-40R durante la sensibilización por el tumor. Los datos sugieren que los tumores más inmunogénicos responden en mayor grado al tratamiento, pero aún se encontró también un nivel de resultados terapéuticos en el modelo de melanoma escasamente inmunogénico (F10). En las figuras anteriores se han mostrado datos para todas las líneas tumorales salvo para la línea de cáncer de pecho SM1. La línea de cáncer de mama SM1 es débilmente inmunogénica (resultados no mostrados).  
 10 Los ratones a los que se inyectó tumor SM1 y a continuación OX40L:Ig en los como se mostró días 3 y 7 después de la inoculación tuvieron una mejorada actividad anti-tumoral como se mostró mediante el incremento de supervivencia libre de tumor. Se sometieron los datos de SM1 a un análisis estadístico log-rank y se mostraron significativos con un valor  $p = .01$ .

15

TABLA 1

*Ejemplos 6-9 de Ocupación del OX-40R durante la Sensibilización por el tumor*

| 20 | <b>Origen del tumor</b>      | <b>Inmunogenicidad</b> | <b>Tratamiento</b>  | <b>Ratones<br/>libres de tumor<br/>/infectados</b> |
|----|------------------------------|------------------------|---|--|
| 25 |                              |                        |   |  |
| 30 | MCA 303<br>(Sarcoma)         | Moderada               | mOX- 40L:Ig<br>solución salina o<br>DR3:Ig                | 9/16<br><br>0/16                                   |
| 35 |                              |                        |   |  |
| 40 | CT26<br>(Carcinoma de Colon) | Moderada               | mOX-40L:Ig<br>hOX-40L:Ig                                  | 9/24<br>2/24                                       |
| 45 |                              |                        |   |  |
| 50 | SM1<br>(Cáncer de pecho)     | Débilmente             | mOX-40L:Ig<br>solución salina                             | 7/28<br>1/28                                       |
| 55 |                              |                        |   |  |
| 60 | B 16/F10<br>(Melanoma)       | Escasamente            | mOX-40L:Ig<br>solución salina<br>antiOX-40R<br>Ig de rata | 5/20<br>0/20<br>5/25<br>0/25                       |

65 Se cree que la ocupación del OX-40R *in vivo* durante la sensibilización por el tumor mostró un beneficio terapéutico significativo en diversos modelos tumorales. El efecto fue dependiente de la dosis y creó una inmunidad específica de tumor de larga duración en los ratones que se curaron del desafío tumoral inicial. Otros datos que muestran que las células OX-40R<sup>+</sup> de dentro de las lesiones inflamatorias en EAE fueron las células T que respondieron al auto-antígeno sugieren que los experimentos aquí descritos estaban dirigidos a las células específicas de antígeno (Ag) tumoral con la terapia específica de OX-40R<sup>+</sup>. Se ha mostrado que la ocupación del OX-40R *in vitro* causa un potente

acontecimiento co-estimulador que mejora la proliferación, supervivencia y producción de citoquinas de las células T. Por lo tanto, se cree que la ocupación del OX-40R durante la sensibilización por el tumor está mejorando la expansión y funcionamiento de las células T CD4<sup>+</sup> específicas de Ag tumoral, que conduce a una supervivencia libre de tumor. La aparición de células T OX-40R<sup>+</sup> adyacentes a células tumorales en biopsias de cáncer de pecho sugiere que estos descubrimientos se pueden aplicar en estudios clínicos en humanos con efectos terapéuticos similares.

La ocupación del OX-40R *in vivo* durante la sensibilización por el tumor condujo a un porcentaje de ratones libres de tumor en 4 tumores sólidos diferentes procedentes de 4 tipos tisulares separados. Los datos sugieren que la terapia basada en OX-40R generalmente puede mejorar el sistema inmune, no sólo para la inmunidad a un tumor, sino también como un adyuvante inmunológico para todo tipo de vacunas (virales, bacterianas, etc.). Se ha descrito la mejora inmune específica de OX-40R con una demostración de que un anticuerpo para el OX-40R, suministrado *in vivo*, pudo exacerbar la enfermedad autoinmune y convertir una forma crónica de GVHD en GVHD aguda.

Se cree que la proteína de fusión huOX-40L:Ig es un ejemplo de una proteína aplicable a la presente invención que puede usarse en estudios clínicos en humanos y que puede estimular las células T humanas *in vitro*. Tanto el anticuerpo como la proteína de fusión OX-40L soluble pueden funcionar con una potencia similar en los modelos tumorales aquí mencionados (Fig. 13 y otros resultados no mostrados), pero es posible que el anticuerpo pueda tener algunas ventajas en el futuro si resulta ser menos inmunogénico y tener una vida media más larga *in vivo*.

La mejora de la inmunidad a tumor con anticuerpos tales como anti-4-1 BB o anti-CTLA4 son otros ejemplos de antígenos de activación de células T que mejoran la inmunidad específica de tumor cuando son provocados o bloqueados. Al igual que el OX-40R, el receptor 4-1BB se describió originalmente como un Ag de activación de células T que es un miembro de la familia de receptores TNF y que tiene propiedades co-estimuladoras potentes. El receptor 4-1BB se expresa tanto en las células T CD8 y CD4 como en células NK. La función co-estimuladora del receptor 4-1BB parece ser principalmente efectiva en células T CD8<sup>+</sup>, y la ocupación de este receptor durante la sensibilización por el tumor condujo a un incremento de 50 veces en la función citolítica de las células T CD8<sup>+</sup> específicas de tumor y mejoró la supervivencia libre de tumor. La proteína CTLA-4 se expresa tanto en células T CD8 como CD4 y cuando es ocupada por su ligando(s) (B7.1 o B7.2) induce una señal de infra-regulación a la célula T. Los anticuerpos que bloquean la interacción CTLA-4/B7 mejoran la función específica de Ag de las células T y puede finalmente mejorar la inmunidad específica a tumor. La terapia específica de OX-40R fue potente por sí misma pero no ha conducido todavía al 100% de ratones libres de tumor, por lo tanto una terapia que combina una ocupación anti-CTLA4 o anti-4-1BB con anti-OX-40R de acuerdo con la presente invención puede proporcionar realizaciones ventajosas de la presente invención, para acentuar la terapia de células T específicas de Ag. Terapias alternativas de células T específicas de tumor pueden combinar dos o más de estos anticuerpos durante la sensibilización por el tumor con el objetivo de mejorar las respuestas tanto de las células T efectoras/de memoria CD8 como las CD4 específicas de Ag.

Se cree que la ocupación *in vivo* del OX-40R durante la sensibilización específica a Ag incrementa el número y periodo de vida de las células T CD44<sup>+</sup> específicas de Ag (resultados no mostrados). La mayoría de células T llegan a ser susceptibles a la activación inducida de muerte celular (AICD) después de encontrarse con un Ag en la fase efectora de la célula T y sólo unas pocas continúan para llegar a ser células T de memoria. Se cree que la ocupación del OX-40R durante la sensibilización por el tumor se dirige las células T CD4<sup>+</sup> reactivas al tumor y las salva de la AICD. Cantidades crecientes de células específicas de Ag permiten a los ratones permanecer libres de tumor y combatir un segundo desafío tumoral. La Fig. 11B muestra que los ratones inmunes a tumor tratados con OX-40R pueden conferir inmunidad anti tumor a través de la transferencia de células del bazo depletadas de CD8. Estos datos sugieren que hay un incremento y/o mejora de las células T CD4<sup>+</sup> de memoria específicas de Ag y que son capaces de transferir protección adoptiva. Las células T CD4<sup>+</sup> pueden no ser las células efectoras finales que interactúan con el tumor porque en los cuatro modelos las células tumorales no expresaban MHC de clase II. Sin embargo la producción mejorada de citoquinas por las células T CD4<sup>+</sup> específicas de Ag puede ser efectiva ayudando a activar a las células T CD8<sup>+</sup>, células NK, y macrófagos que a su vez pueden interactuar directamente con y destruir tumores.

Se cree que el OX-40R se expresa sólo en las células T CD4<sup>+</sup> aisladas del lugar de inflamación en cáncer y enfermedades autoinmunes y que es rotado con bastante rapidez (en 24-48 hr). Sin embargo, se ha mostrado que tanto las células T CD4 como las CD8 pueden expresar el OX-40R si se estimulan *in vitro* con Con A o PHA. Parece que la única manera de sobre-regular la expresión del OX-40R en las células T es a través de la ocupación del TCR. Incluso en situaciones altamente inflamatorias, tales como una estimulación con super-Ag, no parece haber una sobre-regulación del OX-40R en las células no específicas de Ag. En ratones en los que se ha inyectado el super-Ag SEA, sólo se expresa el OX-40R en células T Vbeta3/CD4<sup>+</sup> que es el TCR diana para este super-Ag. Por lo tanto, se cree que la ocupación del OX-40R durante la sensibilización por el tumor *in vivo* se dirige a las células T más recientemente activadas por Ag.

Se ha mostrado que la inflamación asociada con la estimulación por super-Ag y los síntomas clínicos de EAE implican la producción de citoquinas Th1. Se cree que la ocupación del OX-40R en líneas Th1 pueden acentuar la proliferación de células T mediante la sobre-regulación de la transcripción y traducción de IL-2, y que las células T efectoras parecen ser más sensibles a la co-estimulación específica de OX-40R que las células T naive. Las células T efectoras que se han diferenciado para formar citoquinas Th1 o Th2 son ambas sensibles a la co-estimulación específica de OX-40R. La ocupación del OX-40R en las células efectoras Th2 incrementó la traducción y secreción de IL4 e IL5 y mejoró su proliferación. Dos informes mostraron recientemente que la ocupación del OX-40R puede

polarizar las células al fenotipo Th2. Nuestros datos sugieren que la polarización de las células T es dependiente del entorno de citoquinas que rodea las células T durante la diferenciación y que la ocupación del OX-40R acentuará tanto la respuesta Th1 como la Th2. Se ha mostrado que una respuesta inmune anti-tumoral Th2 no conduce a la erradicación del tumor, pero sí lo hace una respuesta de tipo 1. Por lo tanto, se espera que será ventajoso mejorar las respuestas Th1 durante la sensibilización por el tumor (con IL-2, IFN-gamma, y/o anti-IL-4) con el objetivo de obtener una respuesta inmune anti-tumoral óptima cuando se administran reactivos que ocupen el OX-40R *in vivo*.

El OX40L sólo se expresa en células presentadoras de antígenos activadas tales como células B, células dendríticas, células endoteliales y macrófagos. La expresión *in vivo* del OX-40L parece ocurrir en situaciones altamente inflamatorias tales como la infección de ratones con MMTV (LN infiltrados) o en ratones con EAE en macrófagos aislados del órgano inflamado (cerebro). Incluso en las respuestas primarias normales de células T tales como la inmunización con Ag en CFA la expresión de OX-40L fue bastante baja en los macrófagos del bazo. El OX-40R se expresa cada vez que una célula T es provocada por a través del TCR, por lo tanto el potente efecto co-estimulador del OX-40R podría estar regulado por la inaccesibilidad del OX40L en la APC. El sistema inmune ha evolucionado para generar una respuesta inmune para eliminar entidades extrañas rápidamente, e infra-regularse después rápidamente. Dado que la co-estimulación mediada por OX-40L es bastante potente en la fase efectora de las células T, puede que sólo sea necesaria en casos en los que ocurre una invasión masiva que a su vez causa una inflamación a largo plazo. Los tumores agresivos infra-regulan las respuestas inmunes a través de mecanismos inmunosupresivos, por lo tanto las APC cercanas al lugar del tumor posiblemente no expresan el OX40L. Se cree que las respuestas inmunes específicas de tumor estaban siendo mejoradas en los experimentos descritos anteriormente por la adición de una señal que ocupa el OX-40R *in vivo* y por tanto un porcentaje de los ratones desafiados con tumor fueron capaces de permanecer libres de tumor.

En resumen, en los ejemplos 6-9 anteriores, se cree que la ocupación del OX-40R durante la sensibilización por el tumor ha sido efectiva en retrasar y prevenir la aparición de tumores en comparación con ratones tratados control. El efecto del OX-40R fue dependiente de la dosis y se observó en una variedad de modelos tumorales inmunogénicos y no inmunogénicos. Se encontró expresión del OX-40R en células T localizadas en el lugar del tumor en varios cánceres humanos (melanoma, cabeza y cuello, y cáncer de pecho (véase por ejemplo la Fig. 9)). Un examen de la relación física de las células T OX-40R<sup>+</sup> con las células del cáncer de pecho tanto en un tumor 1<sup>o</sup> como en un nódulo linfático invadido por tumor indicó que las células OX-40R<sup>+</sup> estaban concentradas en áreas circundantes al tumor y se cree que son células T específicas de tumor. Se cree que la combinación de los datos terapéuticos del OX-40R en el modelo tumoral de ratón y la aparición de OX-40R<sup>+</sup> en pacientes que padecen un tumor indica que la inmunidad reactiva a tumor se puede mejorar con reactivos diseñados para ocupar el OX-40R en pacientes con cáncer. Se cree que los datos indican que la ocupación del OX-40R especialmente por ejemplo durante la sensibilización específica por Ag puede ser un útil adyuvante en una amplia variedad de marcos de vacunas.

Los ejemplos precedentes ilustran más la presente invención, pero no son limitantes.

## Referencias

- Better et al.** (1989) *Methods in Enzymology* 178: 476-496.
- Better and Horowitz** (1990) *Advances in Gene Technology: The Molecular Biology of Immune Disease & the Immune Response (ICSU Short Reports)*, (Streilein *et al.*, eds.) vol. 10:105.
- Calderhead et al.** (1993) *J. Immunol.* 151: 5261-5271.
- Dubey et al.** (1995) *J. Immunol.* 155: 45.
- Glockshuber et al.** (1990) *Biochemistry* 29: 1362-1367.
- Godfrey et al.** (1994) *J. Exp. Med.* 180: 757-762.
- Harlow and Lane** (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory* (ISBN 0-87969-314-2).
- Huntzicker et al.** (1995) 9th International Congress of Immunology, San Francisco, *Abstract* #5170:872.
- Kaye and Hedrick** (1989) *Nature* 341: 746
- Krummel et al.** (1996) *J. Exp. Med.* 183: 2533.
- Latza et al.** (1994) *Eur. J. Immunol.* 24: 677-683.
- Lenschow et al.** (1996) *Ann. Rev. Immunol.* 14: 233.
- Mallett et al.** (1990) *EMBO J.* 9: 1063-1068.

## ES 2 315 008 T3

Miura et al. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11: 1313-1325.

Paterson et al. (1987) *Mol. Immunol.* 24: 1281-1290.

5 Sambrook et al. (1989). In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York.

Vandenbark et al. (1985) *J. Immunol.* 135: 223.

10 Vetto et al. (1997) *Am. J. Surg.* 174: 258-265.

Walunas et al. (1996) *J. Exp. Med.* 183: 2541-2550.

Weinberg et al. (1996) *Nature Medicine* 2: 183-189.

15 Weinberg et al. (1994) *J. Immunol.* 152: 4712-4721.

### Referencias citadas en la descripción

20 *Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.*

### Documentos de patentes citados en la descripción

- 25
- EP 0733373 A [0015] [0059] [0063]
  - WO 9512673 A [0030] [0030] 0034

30 [0038]

  - WO 9521915 A [0031] [0031] [0031]

[0032] [0034] [0038]

35

  - US 5457035 A [0031] [0031] [0031]

[0031] [0032] [0038]

40

  - US 5585089 A [0035]
  - US 5565332 A [0035]
  - US 5225539 A [0035]

45

  - US 5693761762 A [0035]
  - US 5530101 A [0035]

50

  - US 5648237 A [0036]
  - US 4946778 A [0036]
  - US 5455030 A [0036]

55

### Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción

- 60
- MORRIS et al. *Proceedings in American Association for Cancer Research Annual Meeting*, 1997, vol. 380 [0004]
  - HARLOW; LANE. *Antibodies, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 [0034] [0100]
  - BETTER et al. *Methods in Enzymology*, 1989, vol. 178, 476-496 [0100]

65

  - BETTER; HOROWITZ et al. *Advances in Gene Technology: The Molecular Biology of Immune Disease & the Immune Response (ICSU Short Reports)*. 1990, vol. 10, 105 [0100]

## ES 2 315 008 T3

- CALDERHEAD *et al. J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 5261-5271 [0100]
- DUBEY *et al. J. Immunol.*, 1995, vol. 155, 45 [0100]
- 5 • GLOCKSHUBER *et al. Biochemistry*, 1990, vol. 29, 1362-1367 [0100]
- GODFREY *et al. J. Exp. Med.*, 1994, vol. 180, 757-762 [0100]
- 10 • HUNTZICKER *et al. 9th International Congress of Immunology, San Francisco*, 1995, vol. 5170, 872 [0100]
- KAYE; HEDRICK. *Nature*, 1989, vol. 341, 746 [0100]
- KRUMMEL *et al. J. Exp. Med.*, 1996, vol. 183, 2533 [0100]
- 15 • LATZA *et al. Eur. J. Immunol.*, 1994, vol. 24, 677-683 [0100]
- LENSCHOW *et al. Ann. Rev. Immunol.*, 1996, vol. 14, 233 [0100]
- MALLETT *et al. EMBO J.*, 1990, vol. 9, 1063-1068 [0100]
- 20 • MIURA *et al. Mol. Cell. Biol.*, 1991, vol. 11, 1313-1325 [0100]
- PATERSON *et al. Mol. Immunol.*, 1987, vol. 24, 1281-1290 [0100]
- 25 • SAMBROOK *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor*, 1989 [0100]
- VANDENBARK *et al. J. Immunol.*, 1985, vol. 135, 223 [0100]
- VETTO *et al. Am. J. Surg.*, 1997, vol. 174, 258-265 [0100]
- 30 • WALUNAS *et al. J. Exp. Med.*, 1996, vol. 183, 2541-2550 [0100]
- WEINBERG *et al. Nature Medicine*, 1996, vol. 2, 183-189 [0100]
- 35 • WEINBERG *et al. J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 4712-4721 [0100]

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un agente de unión que se une específicamente a un receptor OX40, siendo dicho agente de unión un OX-40L, un dominio funcional de OX40L, una proteína de fusión que comprende OX40L o un dominio funcional de OX40L, un anticuerpo anti-OX-40, o una porción inmunológicamente efectiva de un anticuerpo anti-OX-40, en la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de un mamífero para mejorar mediante la administración la respuesta inmune frente un antígeno específico elegido en el mamífero de tal manera que dicho agente de unión se presenta a células T del mamífero durante o poco después de la sensibilización de las células T por dicho antígeno o mientras dicho antígeno se está presentando a células T.
- 10 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que se usa un anticuerpo anti-OX40 que es un anticuerpo monoclonal.
- 15 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que se usa un anticuerpo anti-OX40 que es un anticuerpo monoclonal humanizado.
- 20 4. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, 2 ó 3 en el que el antígeno es un antígeno viral, un antígeno bacteriano o un antígeno tumoral.
- 25 5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4 en el que el antígeno es un antígeno tumoral en un mamífero con un tumor.
- 30 6. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que se usa un agente de unión purificado, según se define en la reivindicación 1, y un portador farmacéuticamente aceptable en la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de un mamífero para mejorar la respuesta inmune del mamífero frente un antígeno específico elegido en el mamífero mediante administración de la composición y presentación a las células T del mamífero durante o poco después de la sensibilización de las células T por dicho antígeno.
- 35 7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el agente de unión es para el tratamiento del mamífero mediante administración al mamífero aproximadamente 3-7 días después de la administración del antígeno.
- 40 8. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se usa un agente de unión según se define en la reivindicación 1, en la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de un mamífero para mejorar la respuesta inmune de un mamífero frente un antígeno mediante (a) extraer células T de dicho mamífero, (b) incubar *ex vivo* las células T extraídas con dicho agente de unión, y (c) devolver las células T así tratadas al mamífero.
- 45 9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 en el que el mamífero tiene un tumor, y el antígeno es un antígeno tumoral.
- 50 10. Un agente de unión que se une específicamente a un receptor OX40, siendo dicho agente de unión un OX-40L, un dominio funcional de OX40L, una proteína de fusión que comprende OX40L o un dominio funcional de OX40L, un anticuerpo anti-OX-40, o una porción inmunológicamente efectiva de un anticuerpo anti-OX-40, para el uso en un método de tratamiento de un mamífero para mejorar mediante administración la respuesta inmune frente un antígeno específico elegido en el mamífero de tal forma que dicho agente de unión se presenta a las células T del mamífero durante o poco después de la sensibilización de las células T por dicho antígeno o mientras dicho antígeno se está presentando a las células T.
- 55 11. El agente de unión para usar en un método de tratamiento de un mamífero para mejorar la respuesta inmune frente un antígeno específico elegido en el mamífero de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el agente de unión es un anticuerpo anti-OX40 que es un anticuerpo monoclonal.
- 60 12. El agente de unión para usar en un método de tratamiento de un mamífero para mejorar la respuesta inmune frente un antígeno específico elegido en el mamífero de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el agente de unión es un anticuerpo monoclonal humanizado.
- 65 13. El agente de unión para usar en un método de tratamiento de un mamífero para mejorar la respuesta inmune frente un antígeno específico elegido en el mamífero de acuerdo con la reivindicación 10, la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el que el antígeno es un antígeno viral, un antígeno bacteriano o un antígeno tumoral.
14. El agente de unión para usar en un método de tratamiento de un mamífero para mejorar la respuesta inmune frente un antígeno específico elegido en el mamífero de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el antígeno es un antígeno tumoral en un mamífero con un tumor.
15. El agente de unión para usar en un método de tratamiento de un mamífero para mejorar la respuesta inmune frente un antígeno específico elegido en el mamífero de acuerdo con la reivindicación 10, en el que en el método se usa una composición farmacéutica que comprende dicho agente de unión purificado y un portador farmacéuticamente aceptable para el tratamiento del mamífero para mejorar la respuesta inmune del mamífero frente un antígeno espe-

## ES 2 315 008 T3

cífico elegido mediante la administración de la composición y presentación a células T del mamífero durante o poco después de la sensibilización de las células T por el antígeno.

5 16. El agente de unión para usar en un método de tratamiento de un mamífero para mejorar la respuesta inmune frente un antígeno específico elegido en el mamífero de acuerdo con la reivindicación 15 en el que el agente de unión es para el tratamiento del mamífero mediante la administración al mamífero aproximadamente 3-7 días después de la administración del antígeno.

10 17. El agente de unión para usar en un método de tratamiento de un mamífero para mejorar la respuesta inmune frente un antígeno específico elegido en el mamífero de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el método comprende tratar al mamífero para mejorar la respuesta inmune del mamífero frente un antígeno mediante (a) extraer células T de dicho mamífero, (b) incubar *ex vivo* las células T extraídas con dicho agente de unión, y (c) devolver las células T así tratadas al mamífero.

15 18. El agente de unión para usar en un método de tratamiento de un mamífero para mejorar la respuesta inmune frente un antígeno específico elegido en el mamífero de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el mamífero tiene un tumor, y el antígeno es un antígeno tumoral.

20

25

30

35

40

45

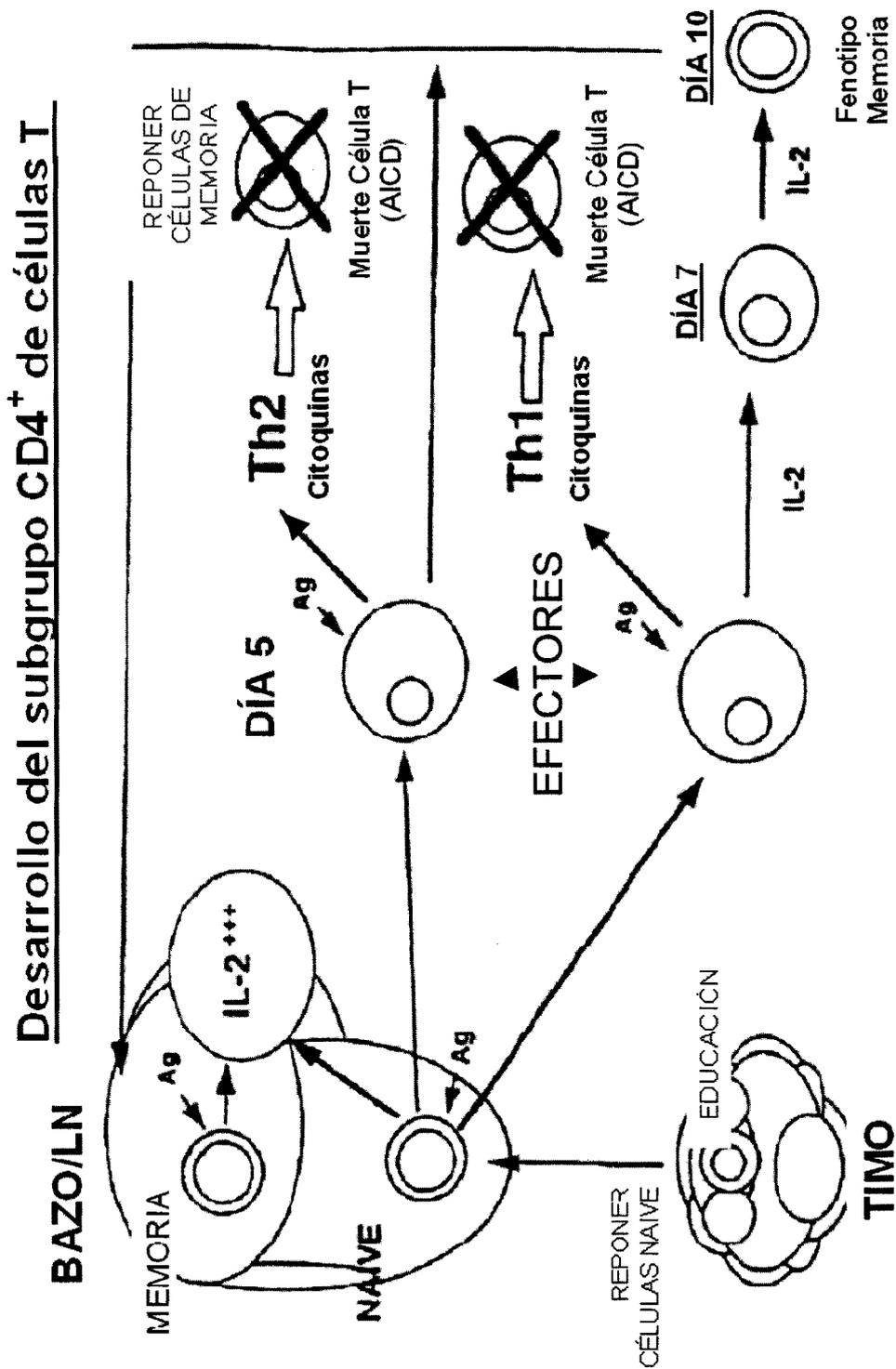
50

55

60

65

FIG. 1



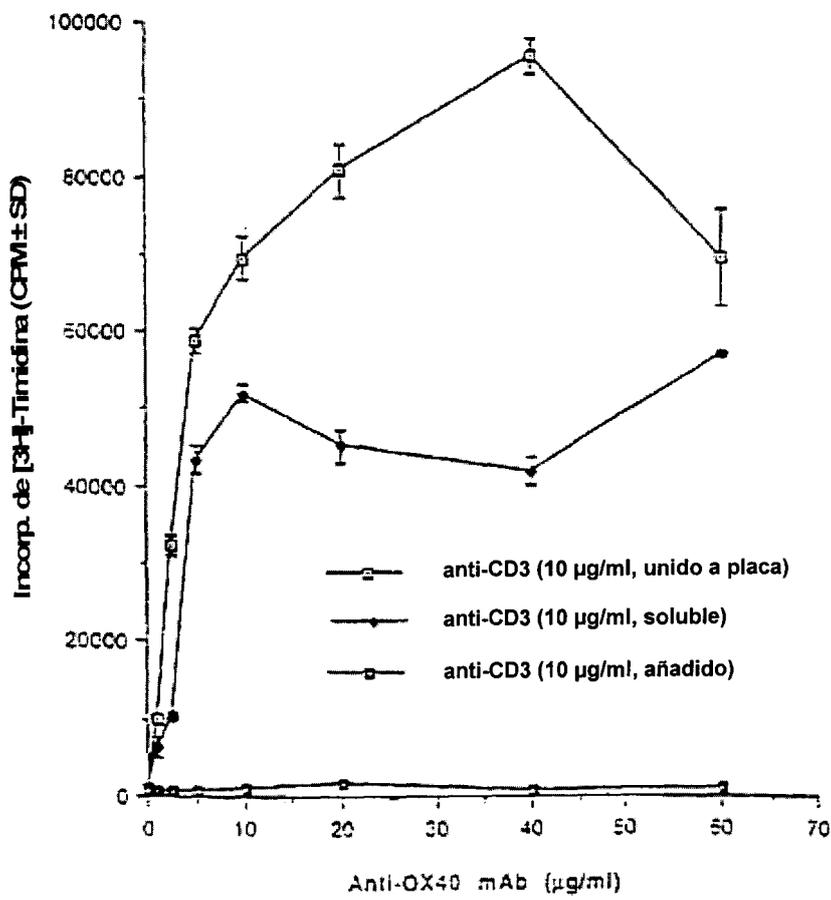


FIG. 2

FIG. 3

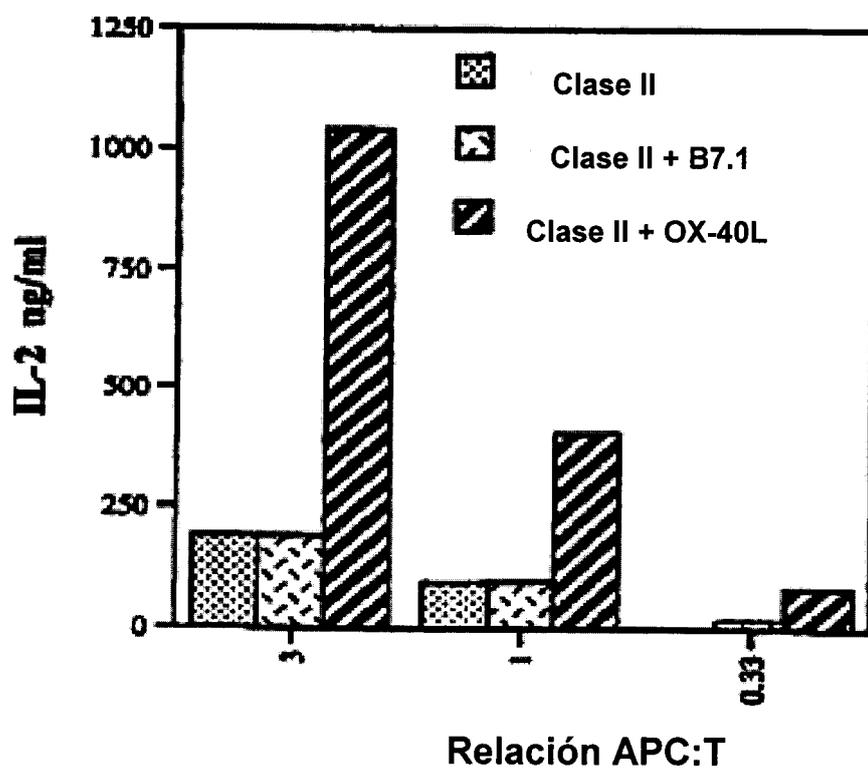
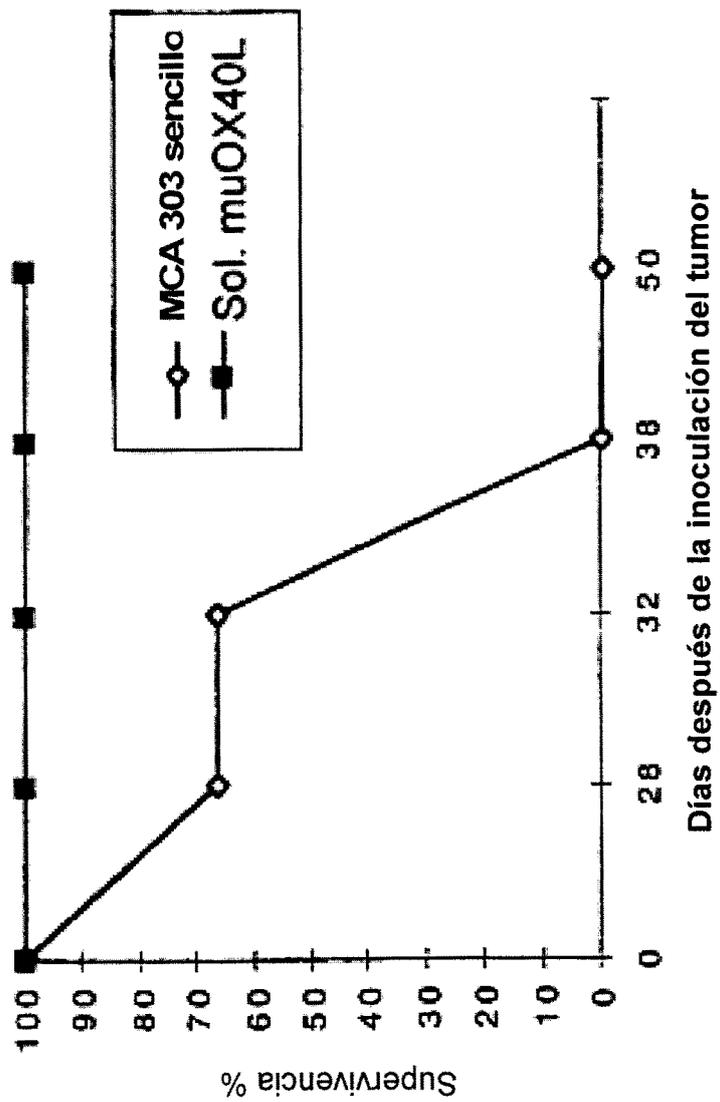


FIG. 4



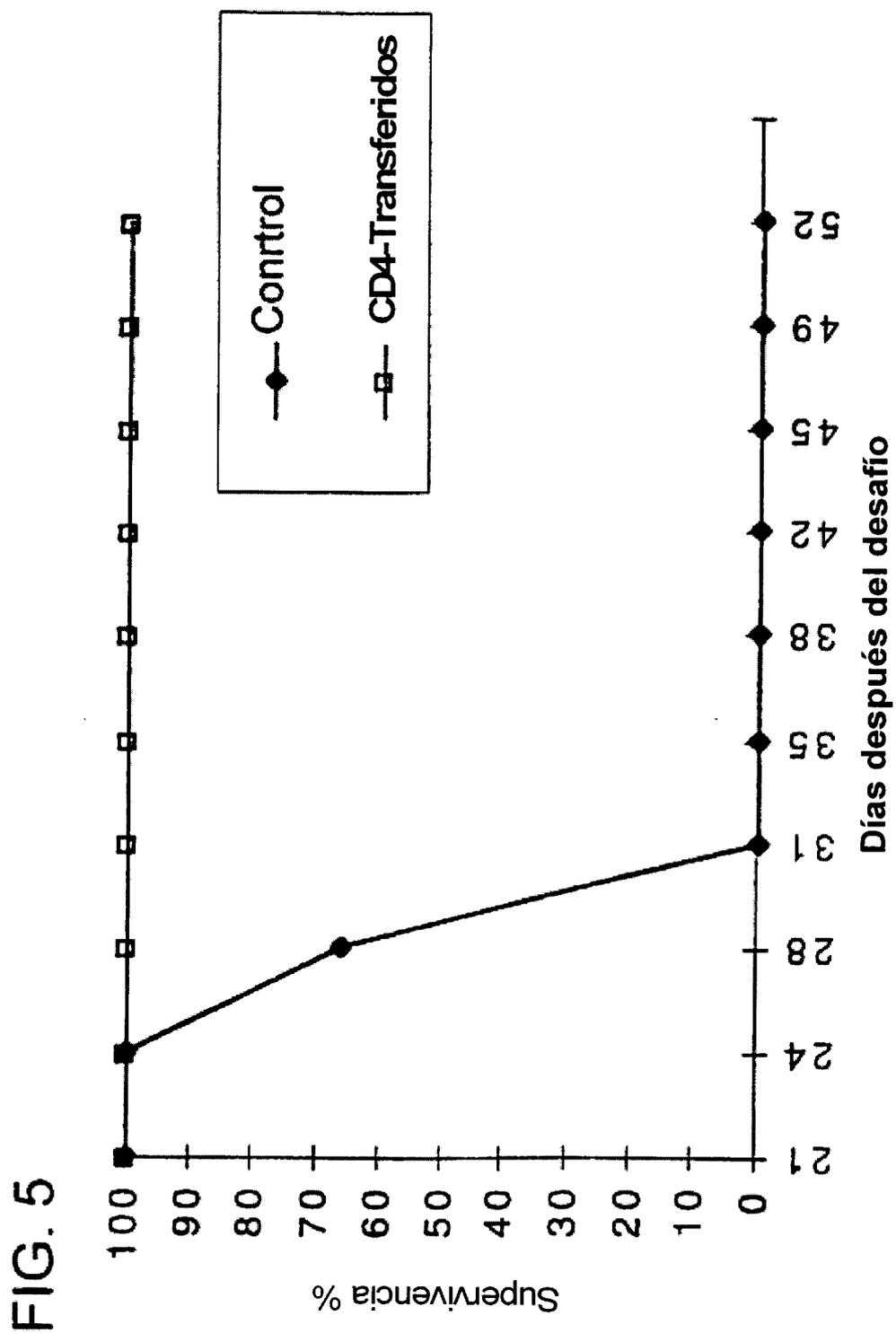
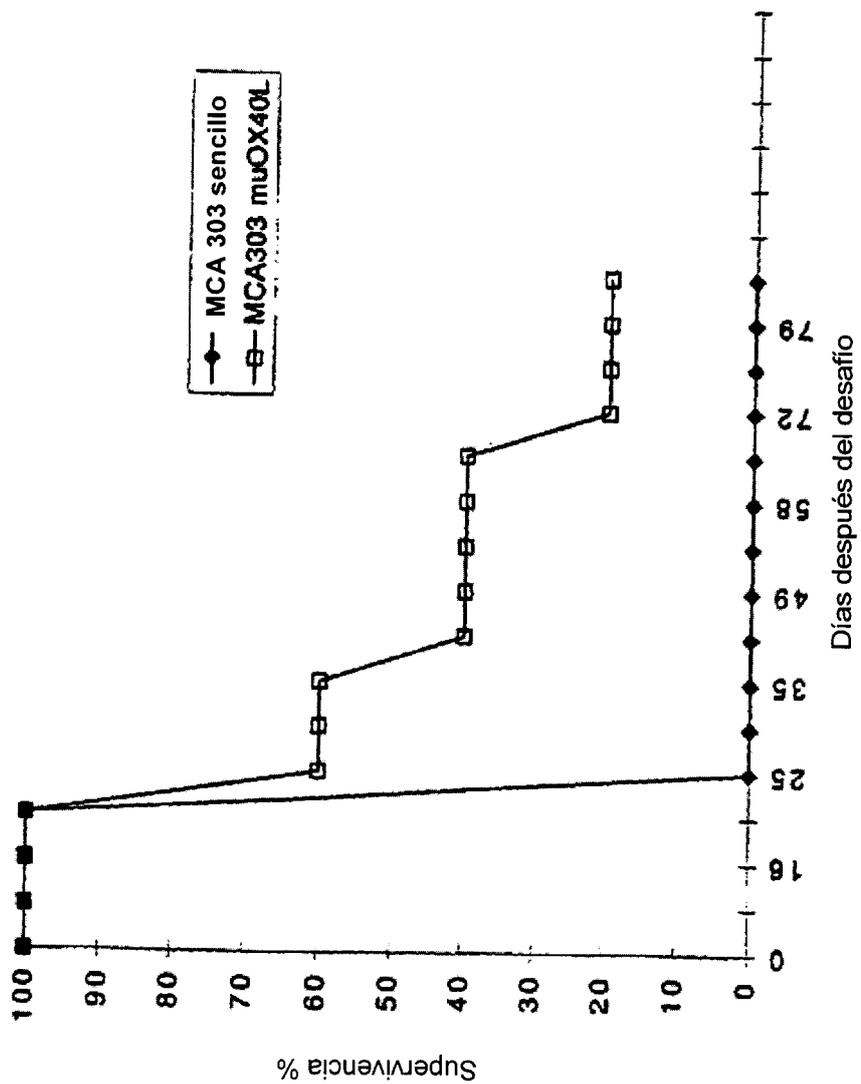


FIG. 6



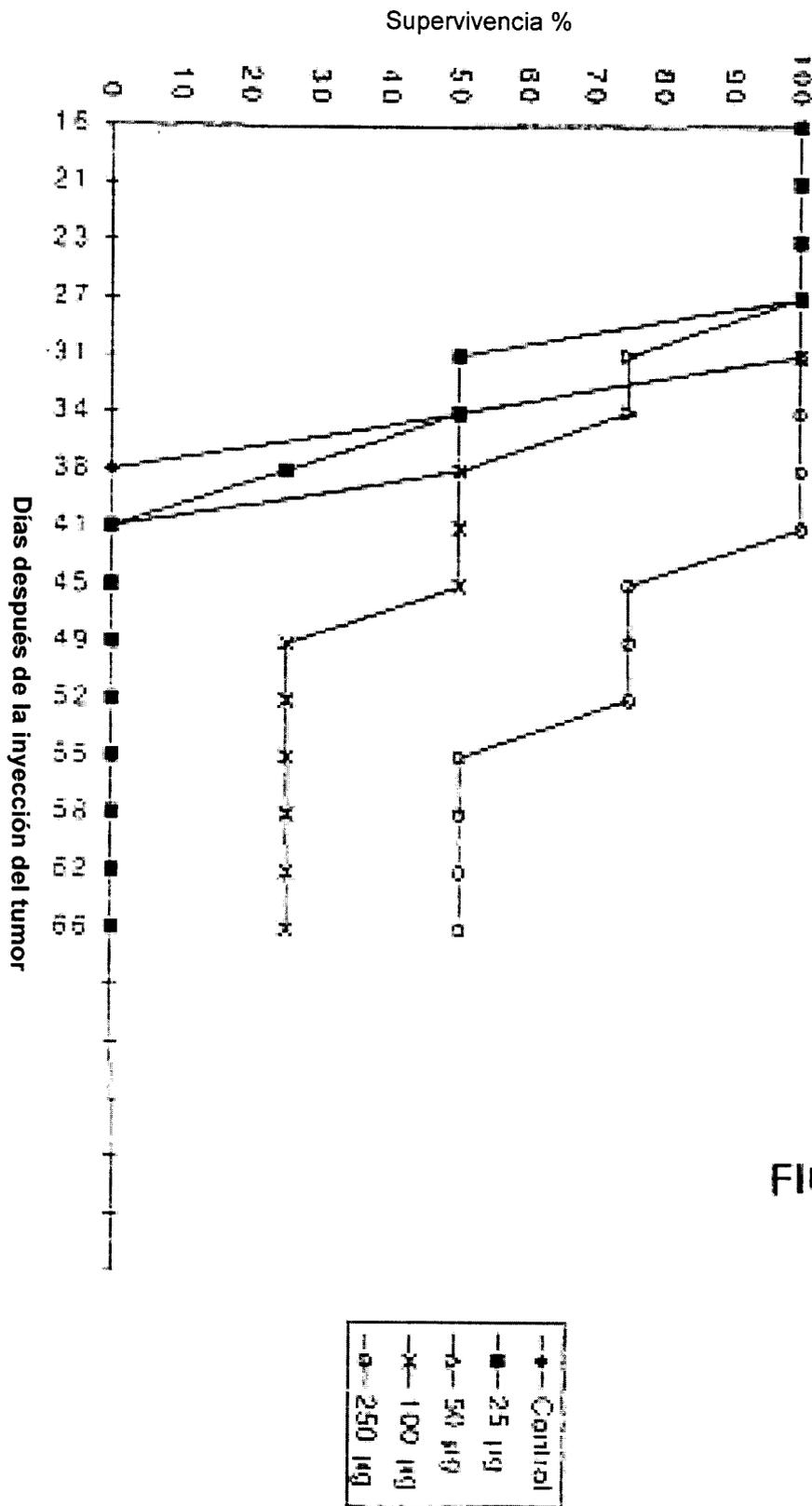
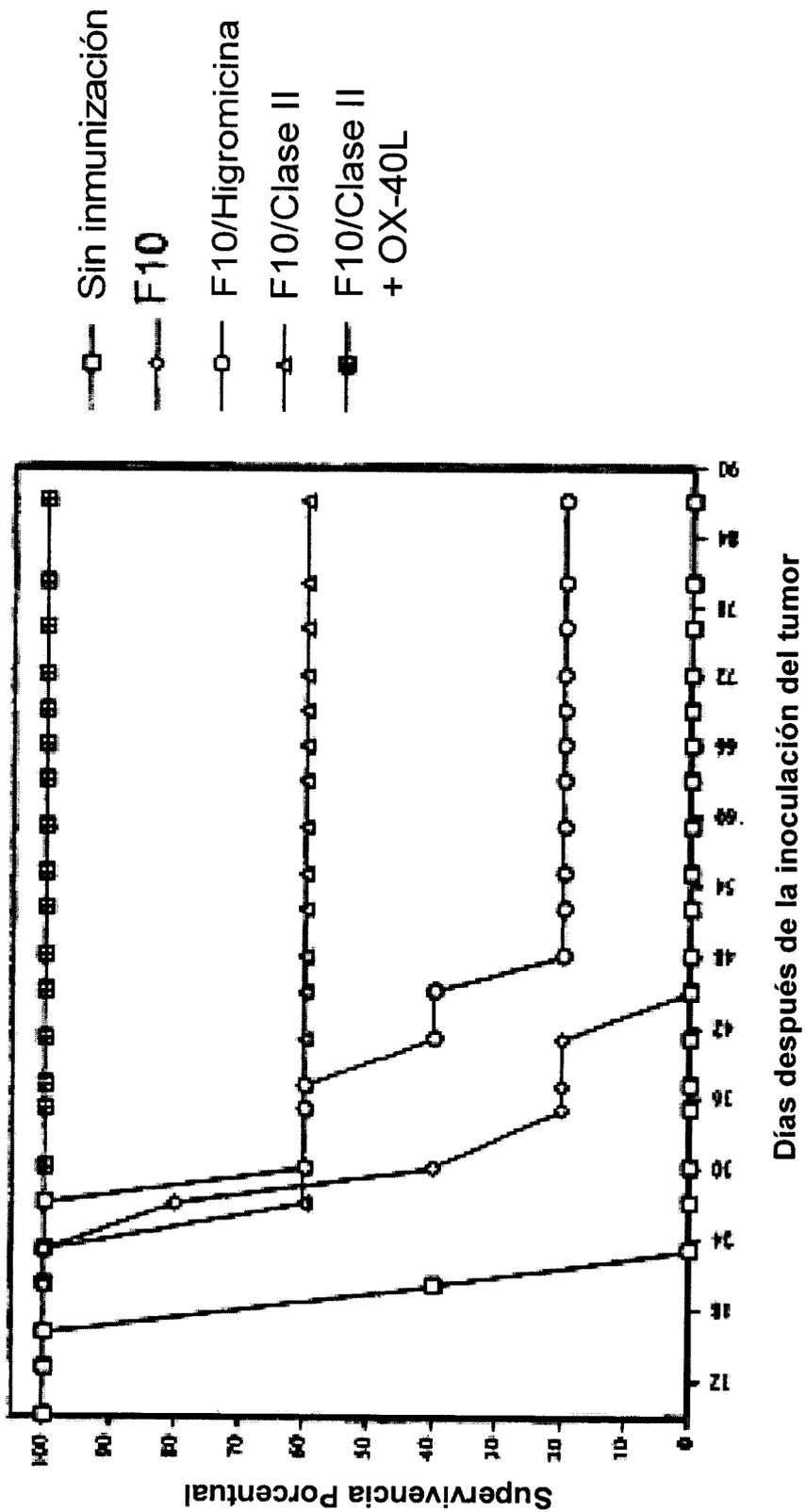


FIG. 7

FIG. 8



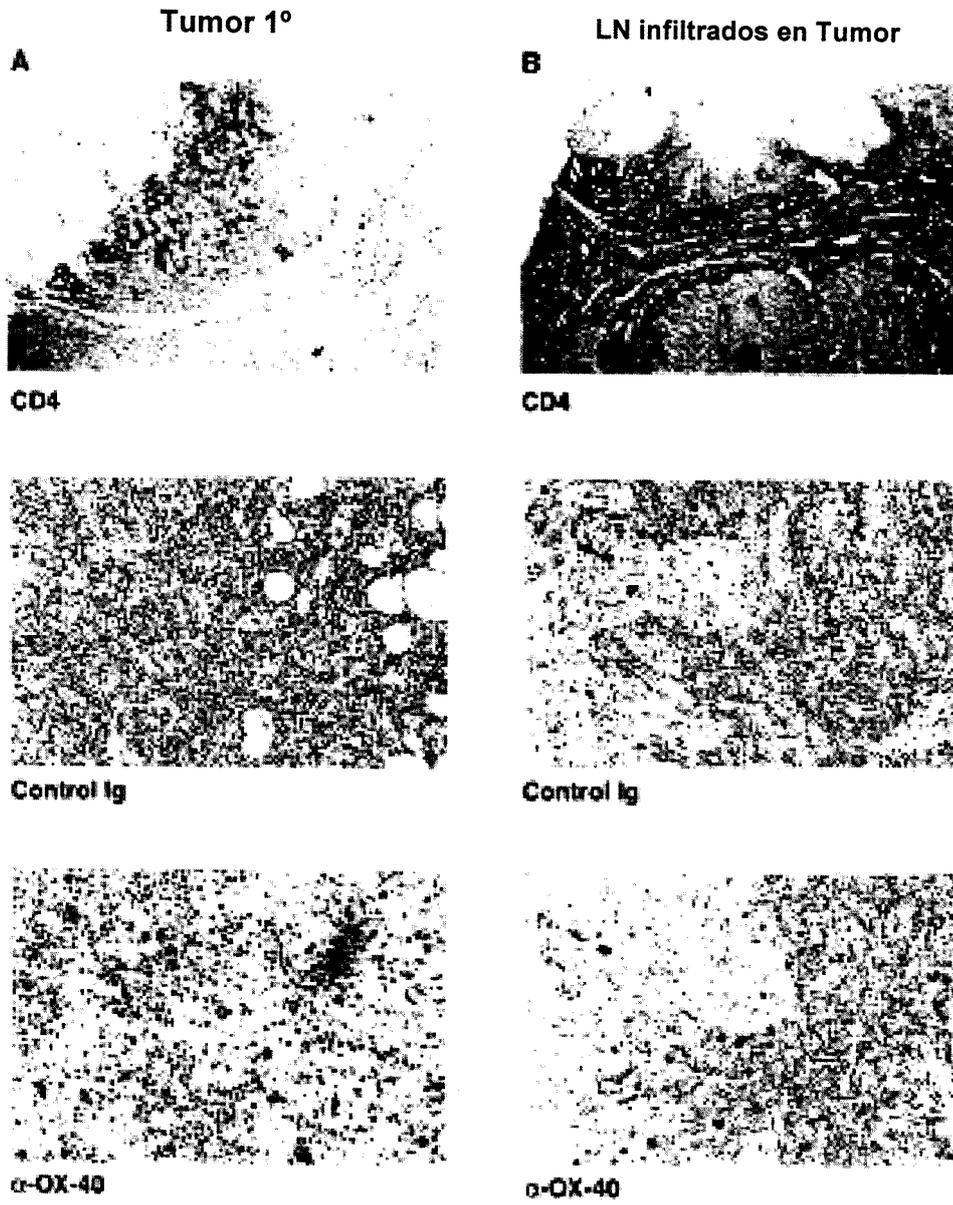


FIG. 9

FIG. 10

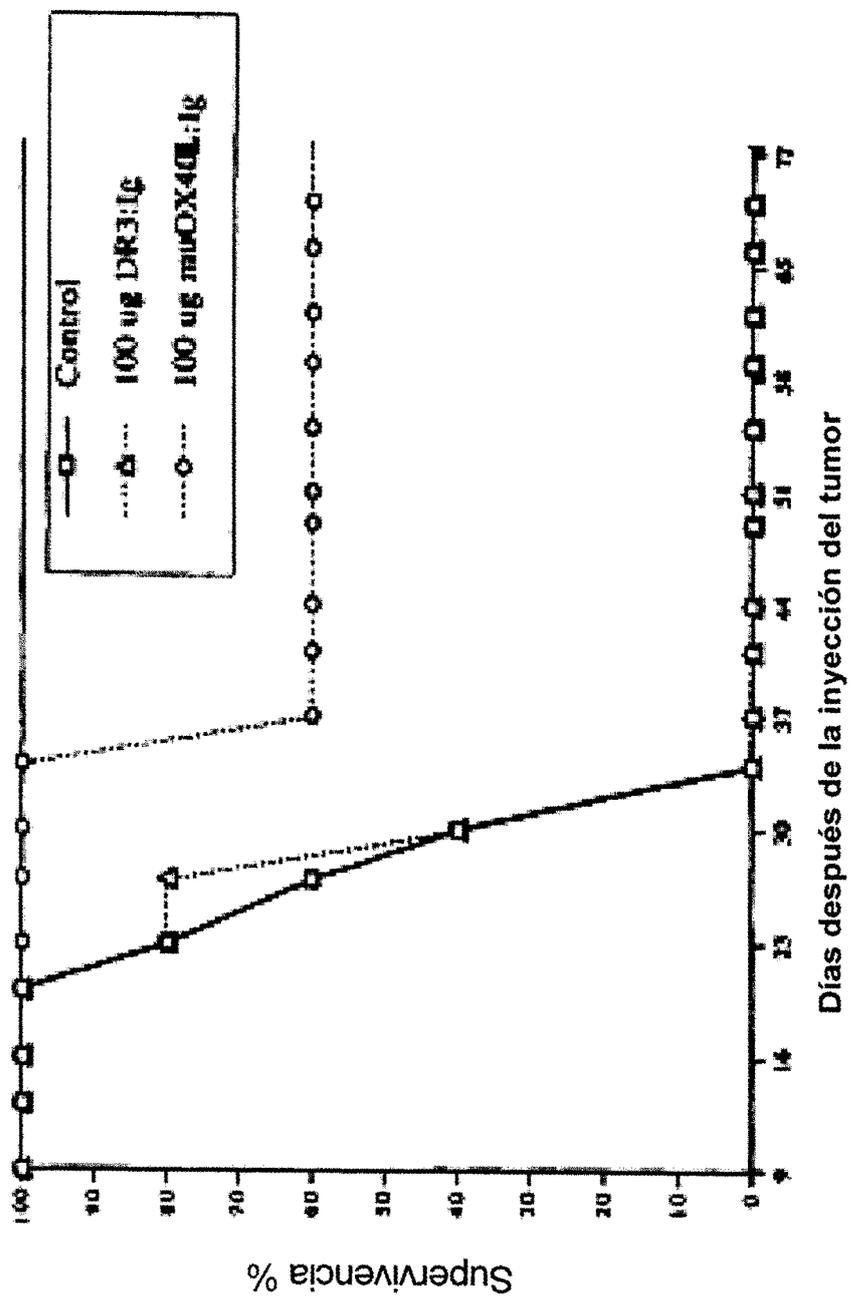


FIG. 11

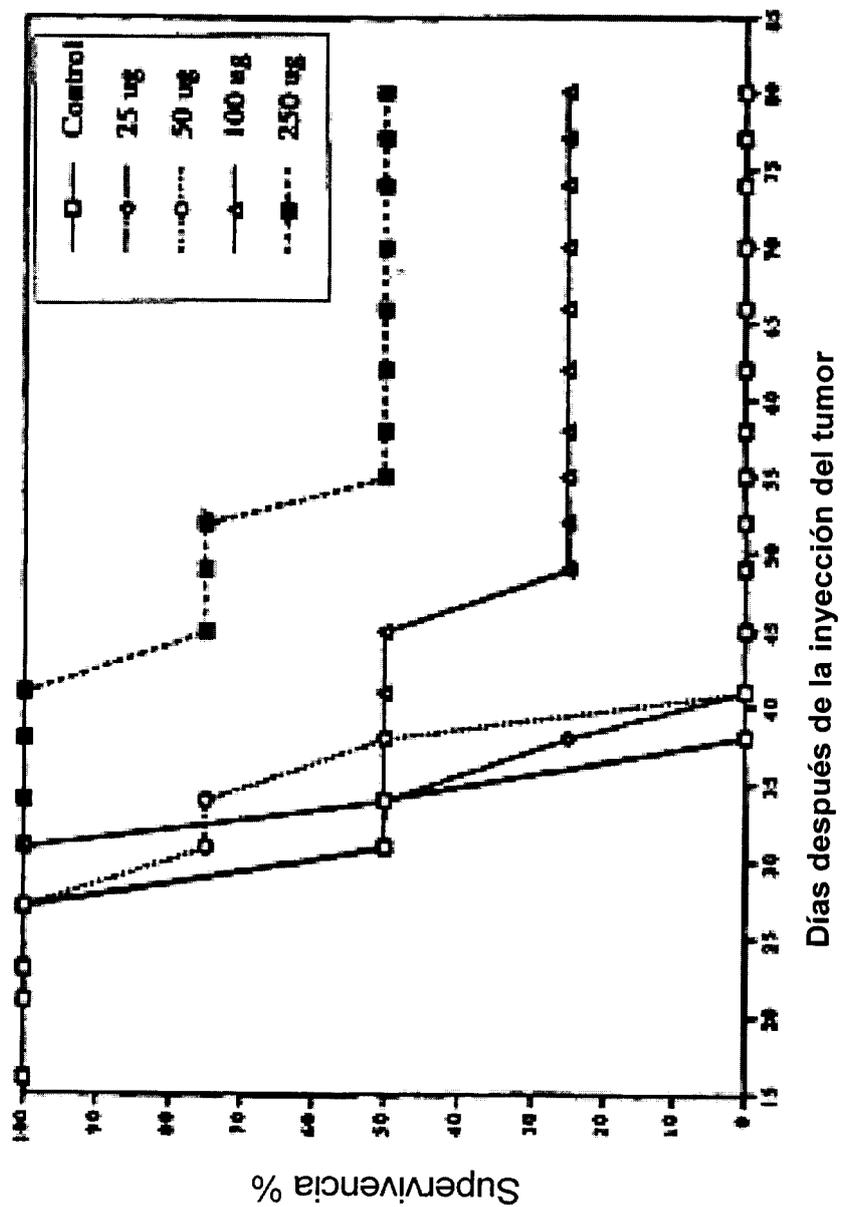


FIG. 12A

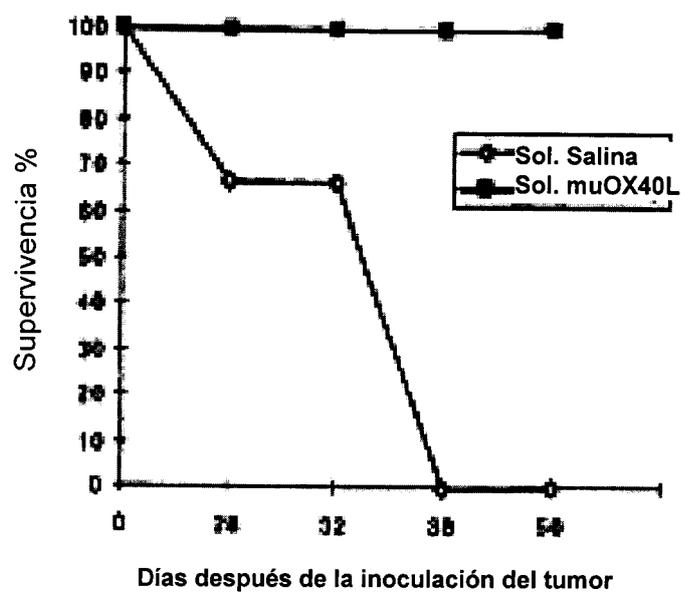


FIG. 12B

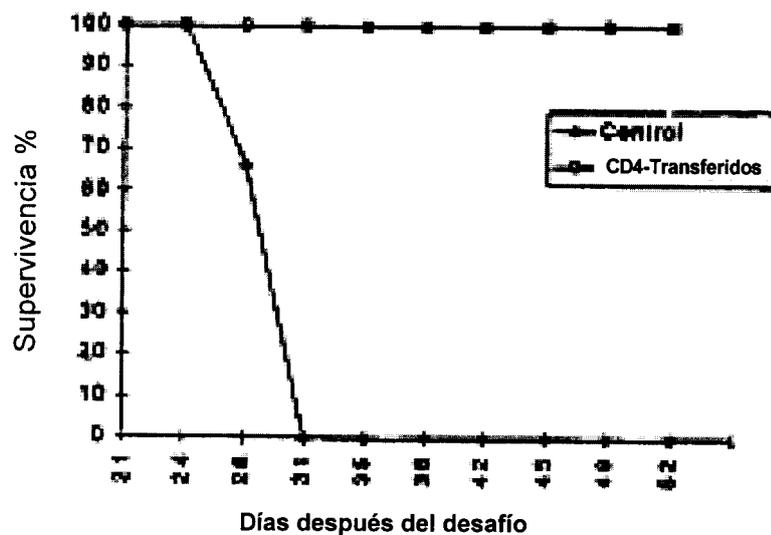


FIG. 13A

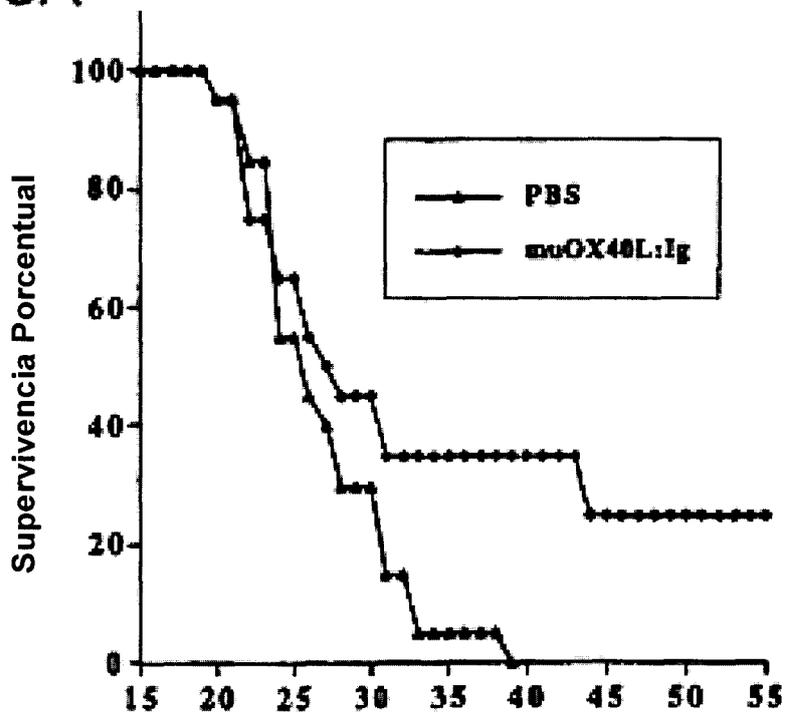


FIG. 13B

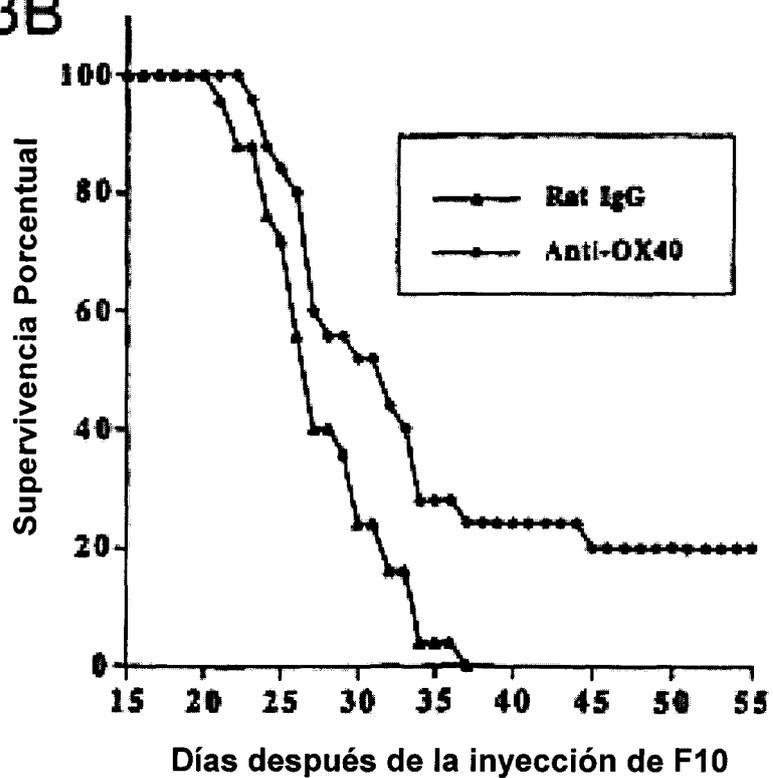


FIG. 14A

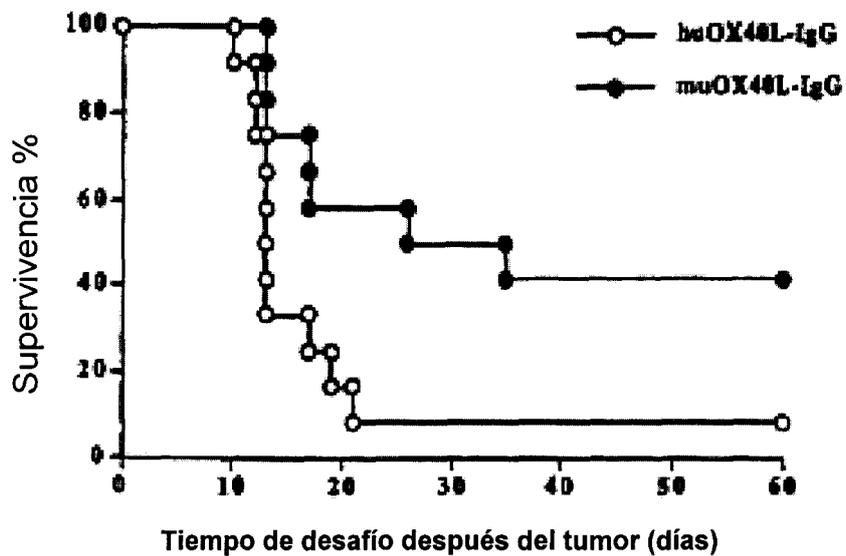


FIG. 14B

