

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 168**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03728392 .6**
96 Fecha de presentación: **11.04.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1503794**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2005**

54 Título: **Procedimientos de tratamiento usando anticuerpos CTLA-4**

30 Prioridad:
12.04.2002 US 372284 P
17.05.2002 US 381274 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.07.2012

73 Titular/es:
MEDAREX, INC.
707 STATE ROAD
PRINCETON, NJ 08540, US

72 Inventor/es:
DAVIS, Thomas;
KELER, Tibor;
GRAZIANO, Robert y
KORMAN, Alan J.

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 384 168 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

Procedimientos de tratamiento usando anticuerpos CTLA-4

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere generalmente a la inmunología molecular y al tratamiento de enfermedades humanas. En particular, se refiere a anticuerpos contra CTLA-4 humano para su uso en novedosos procedimientos para tratar cáncer.

Antecedentes de la invención

10 El sistema inmunitario de los vertebrados requiere múltiples señales para lograr la óptima activación inmunitaria (véase, por ejemplo, Janeway, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1989; 54:1-14; Paul William E., ed. Raven Press, N.Y., Fundamental Immunology, 4ª edición (1998), particularmente los capítulos 12 y 13, páginas 411 a 478). Las interacciones entre linfocitos T y células presentadoras de antígeno (APC) son esenciales para la respuesta inmunitaria. Los niveles de muchas moléculas cohesivas encontradas en linfocitos T y APC aumentan durante una respuesta inmunitaria (Springer y col., A. Rev. Immunol. 1987; 5:223-252; Shaw y Shimizu, Current Opinion in Immunology, 1988 Eds. Kindt y Long, 1:92-97; y Hemler, Immunology Today 1988; 9:109-113). El aumento de los niveles de estas moléculas puede ayudar a explicar por qué las APC activadas son más eficaces en la estimulación de la proliferación de linfocitos T específica para antígeno que las APC en reposo (Kaiuchi y col., J. Immunol. 1983; 131:109-114; Kreiger y col., J. Immunol. 1985; 135:2937-2945; McKenzie, J. Immunol. 1988; 141:2907-2911; y Hawrylowicz y Unanue, J. Immunol. 1988; 141:4083-4088).

20 La respuesta inmunitaria de linfocitos T es un proceso complejo que implica interacciones célula-célula (Springer y col., A. Rev. Immunol. 1987; 5:223-252), particularmente entre linfocitos T y células accesorias tales como APC, y la producción de mediadores inmunitarios solubles (citocinas o linfocinas) (Dinarello, New Engl. J. Med 1987; 317:940-945; Sallusto, J. Exp. Med. 1997; 179:1109-1118). Esta respuesta está regulada por varios receptores de la superficie de linfocitos T que incluyen el complejo de receptores de linfocitos T (Weiss, Ann. Rev. Immunol. 1986; 4:593-619) y otras moléculas de superficie "accesorias" (Allison, Curr. Opin. Immunol. 1994; 6:414-419; Springer, 1987, arriba). Muchas de estas moléculas accesorias son antígenos de diferenciación de la superficie (DS) celular que se producen de modo natural, definidos por la reactividad de anticuerpos monoclonales sobre la superficie de células (McMichael, Ed., Leukocyte Typing III, Oxford Univ. Press, Oxford, N.Y., 1987).

30 La respuesta antigénica de linfocitos T colaboradores (Th) requiere señales proporcionadas por APC. La primera señal se inicia por la interacción del complejo de receptores de linfocitos T (Weiss, J. Clin. Invest. 1990;86:1015) con antígeno presentado en el contexto de moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor de clase II (MHC) en la APC (Allen, Immunol. Today 1987; 8:270). Esta señal específica para antígeno no es suficiente para generar una respuesta completa, y en ausencia de una segunda señal puede conducir en realidad a inactivación clónica o anergia (Schwartz, Science 1990; 248:1349). El requisito para una segunda señal "coestimuladora" proporcionada por el MHC se ha demostrado en varios sistemas experimentales (Schwartz, arriba; Weaver y Unanue, Immunol. Today 1990; 11:49). La naturaleza molecular de esta segunda señal no se entiende completamente, aunque es evidente en algunos casos que ambas moléculas solubles tales como interleucina (IL)-1 (Weaver y Unanue, arriba) y receptores de membrana implicados en la adhesión intercelular (Springer, Nature 1990; 346:425) pueden proporcionar señales coestimuladoras.

40 El antígeno CD28, una glicoproteína homodimérica de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Aruffo y Seed, Proc. Natl. Acad. Sci. 1987; 84:8573-8577) es una molécula accesoria encontrada en la mayoría de los linfocitos T humanos maduros (Damle y col., J. Immunol. 1983; 131:2296-2300). Los presentes hechos sugieren que esta molécula funciona con una ruta de activación de linfocitos T alternativa distinta de la iniciada por el complejo de receptores de linfocitos T (June y col., Mol. Cell. Biol. 1987; 7:4472-4481). Anticuerpos monoclonales (MAb) reactivos con antígeno CD28 pueden aumentar las respuestas de linfocitos T iniciadas por diversos estímulos policlonales (revisado por June y col., arriba). Estos efectos estimulantes resultan de la producción de citocinas inducidas por MAb (Thompson y col., Proc. Natl. Acad. Sci 1989; 86:1333-1337; y Lindsten y col., Science 1989; 244:339-343) como consecuencia del aumento de la estabilización del ARNm (Lindsten y col., 1989, arriba). Los mAb anti-CD28 también pueden tener efectos inhibidores, es decir, pueden bloquear las reacciones de linfocitos mixtos autólogos (Damle y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 1981; 78:5096-6001) y la activación de clones de linfocitos T específicos para antígeno (Lesslauer y col., Eur. J. Immunol. 1986; 16:1289-1296).

55 CTLA-4 es una molécula de la superficie de linfocitos T que se identificó originalmente por cribado diferencial de una biblioteca de ADNc de linfocitos T citotóxicos murinos (Brunet y col., Nature 328:267-270(1987)). CTLA-4 también es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig); CTLA-4 comprende un único dominio de Ig extracelular. Se han encontrado transcritos de CTLA-4 en poblaciones de linfocitos T que tienen actividad citotóxica, sugiriendo que CTLA-4 podría funcionar en la respuesta citolítica (Brunet y col., arriba; Brunet y col., Immunol. Rev. 103-21-36 (1988)). Los investigadores han informado de la clonación y el mapeo de un gen para el homólogo humano de CTLA-4 (Dariavach y col., Eur. J. Immunol. 18:1901-1905 (1988)) para la misma región cromosómica (2q33-34) que CD28 (Lafage-Pochitaloff y col., Immunogenetics 31:198-201 (1990)). La comparación de secuencias entre este

ADN humano de CTLA-4 y el que codifica proteínas de CD28 revela homología significativa de secuencia, con el mayor grado de homología en las regiones yuxtamembrana y citoplásmica (Brunet y col., 1988, arriba; Dariavach y col., 1988, arriba).

5 Se acepta que CTLA-4 se opone a la actividad de CD28 y amortigua la activación de linfocitos T (Krummel, J. Exp. Med. 1995; 182:459-465; Krummel y col., Int'l Immunol. 1996; 8:519-523; Chambers y col., Immunity. 1997; 7:885-895). Ratonés eficientes en CTLA-4 sufren linfoproliferación masiva (Chambers y col., arriba). Se ha informado que el bloqueo de CTLA-4 aumenta las respuestas de linfocitos T *in vitro* (Walunas y col., Immunity. 1994; 1:405-413) y *in vivo* (Kearney, J. Immunol. 1995; 155:1032-1036), agrava la inmunidad antitumoral (Leach, Science 1996; 271:1734-1736) y potencia una enfermedad autoinmunitaria inducida (Luhder, J Exp. Med. 1998; 187:427-432).
10 También se ha informado que CTLA-4 tiene un impacto alternativo o adicional sobre el carácter inicial de la respuesta inmunitaria de linfocitos T (Chambers, Curr. Opin. Immunol. 1997; 9:396-404; Bluestone, J. Immunol. 1997; 158:1989-1993; Thompson, Immunity 1997; 7:445-450). Esto está de acuerdo con la observación de que algunos pacientes autoinmunitarios tienen autoanticuerpos para CTLA-4. Es posible que los autoanticuerpos bloqueantes de CTLA-4 desempeñen una función patogénica en estos pacientes (Matsui, J. Immunol. 1999; 162:4328-4335).
15

Los anticuerpos para CTLA-4 no humanos se han usado en los diversos estudios tratados anteriormente. Además, los anticuerpos humanos contra CTLA-4 humano se han descrito como moduladores de la inmunoestimulación en varias afecciones de enfermedad tales como tratando o previniendo infección vírica y bacteriana y para tratar cáncer (por ejemplo, publicación PCT WO 01/14424 y publicación PCT WO 00/37504). La patente de EE.UU. n° 5.855.887 desvela un procedimiento de aumento de la respuesta de un linfocito T de mamífero a estimulación antigénica combinando un linfocito T con un agente de bloqueo de CTLA-4. La patente de EE.UU. n° 5.811.097 desvela un procedimiento de disminución del crecimiento de tumores de no linfocitos T administrando un agente de bloqueo de CTLA-4. Las solicitudes de patente de EE.UU. n° 09/644.668 y 09/948.939 desvelan anticuerpos para CTLA-4 humano. Los anticuerpos anti-CTLA-4 que pueden co-estimular la proliferación de linfocitos T y su uso en el tratamiento de trastornos sensibles a la proliferación de linfocitos T se describen en los documentos WO 98/42752 y US 6.207.156. El documento WO 95/33770 describe que anticuerpos anti-CTLA-4 pueden inducir apoptosis de linfocitos T específicos para antígeno, y su uso terapéutico, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.
20
25

La cita o discusión de cualquier referencia en esta sección o en cualquier parte en la memoria descriptiva sólo se hace para aclarar la descripción de la presente invención y no es una admisión de que tal referencia sea "técnica anterior" frente a cualquier invención descrita en este documento.
30

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-CTLA-4 humanos para su uso en el tratamiento de un cáncer en un paciente humano, en el que el paciente, antes de la administración del anticuerpo, ha sido tratado con cirugía de manipulación del tumor, quimioterapia o radiación y ha desarrollado una respuesta inmunitaria al cáncer, en el que el anticuerpo es para reforzar la respuesta inmunitaria del paciente y en el que el anticuerpo es para ser administrado al paciente de forma que la concentración en plasma del anticuerpo anti-CTLA-4 sea al menos de 2 µg/ml durante más de cuatro meses.
35

La presente invención también se refiere a anticuerpos anti-CTLA-4 humanos para su uso en el tratamiento de un cáncer en un paciente humano, en el que el paciente, antes de la administración del anticuerpo, ha sido tratado con una vacuna contra el cáncer y ha desarrollado una respuesta inmunitaria al cáncer, en el que el anticuerpo es para reforzar la respuesta inmunitaria del paciente y en el que el anticuerpo es para ser administrado al paciente de forma que la concentración en plasma del anticuerpo anti-CTLA-4 sea al menos de 2 µg/ml durante más de cuatro meses.
40

En este documento también se describen procedimientos de promoción o potenciación de una respuesta inmunitaria secundaria o de memoria usando anticuerpos anti-CTLA4. Los anticuerpos anti-CTLA-4 demuestran una capacidad para aumentar la magnitud de inmunidad protectora en un sujeto ya inmunizado para antígenos protectores de un patógeno, por ejemplo, antígenos del cáncer o antígenos de un agente infeccioso. Tal inmunización previa puede haberse producido como resultado de exposición natural, por ejemplo, a células cancerosas de un tumor reseccionado o de infección resuelta o suprimida con un agente infeccioso. Tales pacientes pueden probarse para pruebas de tal exposición, es decir, para inmunidad a un antígeno protector para el patógeno. Alternativamente, el paciente puede haberse vacunado contra el patógeno, en cuyo caso la inmunidad puede suponerse o probarse.
45
50

Los anticuerpos para CTLA-4 de la invención pueden usarse en el tratamiento de tumores malignos, en los que el paciente ha recibido previamente una vacuna contra el cáncer o demuestra algún nivel de inmunidad protectora natural al tumor. Los anticuerpos pueden usarse como un único agente o en combinación con uno o varios agentes, tales como quimioterapia, radioterapia, citocinas, quimiocinas y otras moléculas de señalización biológica, vacunas específicas para tumor, rescate de citoblastos autólogos y alogénicos (por ejemplo, para aumentar los efectos de injerto frente a tumor), otros anticuerpos terapéuticos, terapias de elección de diana molecular, terapia antiangiogénica, agentes infecciosos con intención terapéutica (tales como bacterias localizadoras de tumores) y terapia génica. Los anticuerpos pueden administrarse como una dosis única o como múltiples dosis. Los anticuerpos
55

pueden usarse en terapia adyuvante o neoadyuvante, tanto solos como conjuntamente con las terapias anteriormente mencionadas.

El tratamiento con un anticuerpo anti-CTLA4 puede usarse para activar una respuesta de memoria preexistente en pacientes tratados con una vacuna contra el cáncer. Por tanto, los pacientes tratados con vacuna pueden seleccionarse para tratamiento adicional con un anticuerpo anti-CTLA4 para así inducir o potenciar adicionalmente una respuesta inmunitaria.

En una realización, el antígeno es un antígeno del cáncer y el paciente ha sido previamente tratado con una vacuna contra el cáncer. El antígeno del cáncer puede ser, por ejemplo, un antígeno de melanoma o antígeno de cáncer de próstata. Un anticuerpo anti-CTLA-4 humano preferido de la invención es 10D1, pero los procedimientos de la presente invención pueden usarse con cualquier anticuerpo para CTLA-4 humano.

Los procedimientos de tratamiento de la invención, que se diseñan para estimular una respuesta inmunitaria secundaria o de memoria, pueden ser particularmente relevantes en el tratamiento de pacientes inmunodeprimidos que podrían estar en riesgo de complicaciones de la enfermedad. Ejemplos de tales pacientes inmunodeprimidos incluyen pacientes con infecciones retrovíticas, que incluyen VIH, pacientes con deficiencias congénitas, heredadas, autoinmunitarias o inmunitarias farmacéuticamente inducidas, que incluyen pacientes diabéticos y ancianos, y pacientes con heridas, traumatismo o quemaduras graves.

La invención también demuestra que los pacientes pueden tratarse durante periodos de tiempo prolongados con anti-CTLA4 sin experimentar efectos secundarios perjudiciales tales como activación de linfocitos T no específica, tal como autoinmunidad.

Las concentraciones en plasma de anti-CTLA4 pueden mantenerse por encima de niveles detectables durante al menos 1, 2, 3, 4 ó 5 meses, o más, sin consecuencias inmunológicas no planeadas. El anticuerpo anti-CTLA-4 para su uso según la invención es para ser administrado al paciente de forma que la concentración en plasma del anticuerpo anti-CTLA-4 sea al menos de 2 µg/ml durante más de cuatro o cinco meses. En una realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 es para ser administrado múltiples veces de forma que la concentración en plasma sea al menos de 2 µg/ml durante más de cuatro o cinco meses. Generalmente, el anticuerpo anti-CTLA-4 es para ser administrado en una cantidad y a intervalos de forma que la concentración en plasma del anticuerpo anti-CTLA-4 en el paciente sea al menos de 2 µg/ml durante más de cuatro o cinco meses. En una realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 se administra en una cantidad y a intervalos de forma que la concentración en plasma del anticuerpo anti-CTLA-4 en el paciente sea al menos de 5 µg/ml durante más de cuatro o cinco meses. En otra realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 se administra en una cantidad y a intervalos de forma que la concentración en plasma del anticuerpo anti-CTLA-4 en el paciente sea al menos de 10 µg/ml durante más de cuatro o cinco meses. En una realización preferida, el paciente que está tratándose durante periodos de tiempo prolongados con el anticuerpo anti-CTLA-4 padece un tumor maligno, tal como melanoma o cáncer de próstata. En otra realización preferida, el paciente ha sido o está siendo tratado con una vacuna, además de tratamiento con el anticuerpo anti-CTLA-4.

En una realización preferida, el anticuerpo anti-CTLA-4 de la presente invención es anticuerpo monoclonal humano 10D1 como se desvela en el documento WO 01/14424.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra respuestas específicas para anticuerpo de melanoma en animales tratados con una vacuna contra el melanoma y el anticuerpo anti-CTLA-4 10D1. La reactividad del anticuerpo en muestras de sangre recogidas de animales tratados se midió por citometría de flujo.

La **Figura 2** muestra el perfil farmacocinético del anticuerpo anti-CTLA-4 10D1 durante la dosificación crónica de primates. El anticuerpo se administró en los días 0, 28, 56, 84 y 140 y las concentraciones en plasma de 10D1 se analizaron por ELISA. Se muestra la media +/- EEM de seis animales tratados.

La **Figura 3** muestra el perfil farmacocinético del anticuerpo anti-CTLA-4 10D1 en pacientes con cáncer de próstata tratados con una dosis única de 10D1 en el día 0. Se muestra la concentración en plasma (µg/ml). Se muestra la media +/- EEM para 14 pacientes tratados.

La **Figura 4** muestra niveles de antígeno específico de la próstata (PSA) en ng/ml en dos pacientes humanos en diversos momentos de tiempo después de la infusión de un anticuerpo anti-CTLA4 en el día 0.

Descripción detallada

En este documento se describen novedosos procedimientos basados en anticuerpos para CTLA-4 para promover o potenciar una respuesta inmunitaria secundaria o de memoria, y para el tratamiento más eficaz del cáncer. Además, se desvelan concentraciones en plasma preferidas del anticuerpo anti-CTLA-4.

La presente invención se basa, en parte, en observaciones hechas durante la prueba clínica de un anticuerpo anti-CTLA-4 de secuencia humana en inmunoterapia de cánceres, como se describe más adelante. Las pruebas

demuestran la eficacia del anticuerpo anti-CTLA en el tratamiento de sujetos con exposición previa a antígeno de tumor. Además, se muestra la persistencia de niveles en plasma detectables del anticuerpo anti-CTLA-4 tras administraciones tanto únicas como múltiples.

A. Prueba clínica de pacientes previamente vacunados con vacuna contra el cáncer

- 5 Nueve pacientes con melanoma avanzado o cáncer de ovario avanzado participaron en un estudio en el que recibieron 3 mg/kg de anticuerpo monoclonal para CTLA-4 10D1 (Medarex) intravenosamente. Los pacientes recibieron tratamiento previo para melanoma en estadio temprano que incluía inmunoterapia (tres pacientes recibieron α -interferón, un paciente recibió una vacuna de gangliósido GM2 mezclado con QS-21), cirugía (4
- 10 pacientes), radiación (2 pacientes), quimioterapia (3 pacientes) e inhibidor de proteasoma (1 paciente). Las dos pacientes con cáncer de ovario habían recibido múltiples quimioterapias. Además, todos los pacientes participaron en los estudios de vacuna de fase I. Tres pacientes con melanoma y las dos con cáncer de ovario se inmunizaron con células autólogas manipuladas para secretar GM-CSF. Uno de estos pacientes también recibió una vacuna MUC-1. Tres pacientes con melanoma se inmunizaron con células dendríticas autólogas manipuladas para expresar gp100 y MART-1. Un paciente con melanoma se vacunó con el péptido gyp100 y IL-2 de alta dosis.
- 15 Tres pacientes con melanoma vacunados previamente con células tumorales secretoras de GM-CSF tuvieron necrosis tumoral extensa tras el tratamiento con 10D1. La histopatología de tejido reseccionado de los tres pacientes mostró vasos sanguíneos tumorales gravemente lesionados con infiltrados de linfocitos y granulocitos en la proximidad del tumor. Un paciente tuvo una masa mediastínica completamente reseccionada tres meses después del tratamiento con 10D1. Los cuatro pacientes previamente vacunados con antígenos melanosómicos tuvieron
- 20 infiltrados linfocíticos en la proximidad de los tumores, pero no tuvieron necrosis tumoral. Las pacientes con cáncer de ovario no se sometieron ni a resección ni a biopsia, pero ambas pacientes tuvieron cambios favorables en los niveles en sangre de CA-125 (un marcador tumoral para cáncer de ovario) tras el tratamiento con 10D1.

B. Prueba de pacientes con exposición natural al antígeno del tumor

- 25 Catorce pacientes con melanoma en estadio IV recibieron el anticuerpo anti-CTLA-4 10D1 conjuntamente con vacunación con dos péptidos gp100 en uno o más ciclos de tratamiento. Todos los pacientes tuvieron cirugía previa para su tumor primario. Seis pacientes tuvieron quimioterapia previa. Once pacientes tuvieron inmunoterapia previa. La respuesta clínica se midió por tomografía axial computarizada (CT) y resonancia magnética nuclear (RMN). Un paciente, sometido a cirugía y quimioterapia previa, tuvo redisolución completa de los tumores de pulmón, cerebro y subcutáneos después de 5 ciclos de tratamiento. Otros dos pacientes respondieron parcialmente al tratamiento. Dos
- 30 pacientes no respondieron al tratamiento de forma "mixta" debido a que algunas lesiones se redujeron mientras que otras aumentaron de tamaño. Es posible, debido a que no se realizaron biopsias de tejido, que el aumento de las lesiones en los pacientes que no respondieron al tratamiento de forma mixta no fuera debido al cáncer. Un paciente (paciente 3), por ejemplo, tuvo redisolución de varias lesiones de pulmón, pero un aumento de los ganglios linfáticos mediastínicos. Los vasos linfáticos de los pulmones drenan en los ganglios linfáticos mediastínicos (Schwartz, y col.,
- 35 Principles of Surgery, 1984, 4ª ed., pág. 661); y los ganglios linfáticos pueden aumentar como resultado de la inflamación en los tejidos dentro del cuenco de drenaje de los ganglios linfáticos. Es posible que el paciente 3 fuera un paciente que respondió completamente al tratamiento con ganglios linfáticos que aumentaron debido a la inflamación, no debido al cáncer.

- 40 Basándose en los resultados tratados anteriormente, la presente invención proporciona varios usos ventajosos de anticuerpos anti-CTLA-4. Estos anticuerpos proporcionan estimulación inmunitaria secundaria o de memoria como se demuestra en los pacientes con cáncer previamente inmunizados o expuestos. Por tanto, los anticuerpos anti-CTLA-4 pueden usarse como un refuerzo, que es especialmente útil en pacientes inmunodeprimidos. La supresión del sistema inmunitario puede producirse a partir de varias causas que incluyen, pero no se limitan a, enfermedad (incluyendo enfermedades de inmunodeficiencia como el VIH), envejecimiento, carga tumoral elevada, terapia contra
- 45 el cáncer (por ejemplo, quimioterapia y radiación), además de otras causas. Por tanto, la terapia con anticuerpos anti-CTLA-4 está indicada para reforzar la inmunidad en sujetos inmunodeprimidos.

C. Prueba de monos con anticuerpo para CTLA-4 y vacuna contra el melanoma

- 50 Monos *Cynomolgus* se trataron con vacuna contra el melanoma sola o con vacuna contra el melanoma y anticuerpo anti-CTLA-4 10D1 en los días 0, 28, 56, 84 y 140. El uso del anticuerpo anti-CTLA-4 en combinación con la vacuna produjo una respuesta a anticuerpos significativamente mayor contra células de melanoma que el uso de la vacuna sola. Además, los estudios de proliferación de linfocitos T demostraron que el tratamiento con anticuerpo anti-CTLA-4 y la vacuna produjo proliferación específica para antígeno de células CD8⁺ y CD4⁺. Los niveles en plasma del anticuerpo anti-CTLA-4 permanecieron por encima de los niveles detectables durante todo el periodo de 160 días. La concentración media en plasma permaneció por encima de 20 μ g/ml durante el estudio de seis meses.
- 55 Este estudio mostró que la dosificación crónica de anticuerpo anti-CTLA-4 en primates es segura y que niveles en plasma detectables pueden mantenerse durante un periodo de seis meses.

D. Prueba de pacientes con melanoma avanzado con anticuerpo anti-CTLA-4

A diecisiete pacientes con melanoma avanzado se les administró intravenosamente una dosis única del anticuerpo anti-CTLA-4 10D1 a 3 mg/kg. Nueve pacientes tuvieron inmunoterapia previa, seis tuvieron radioterapia previa y cinco tuvieron quimioterapia previa. Los niveles en plasma del anticuerpo anti-CTLA-4 permanecieron detectables durante hasta cuatro meses. Dos pacientes tuvieron una respuesta parcial, que incluyó redisolución de tres masas de tejido blando y una reducción superior al 50 % en una masa de pulmón en un paciente previamente vacunado.

Este estudio mostró que los niveles en plasma pueden permanecer por encima de niveles detectables durante hasta cuatro meses en un paciente humano tras una dosis única del anticuerpo anti-CTLA-4. Además, la reducción de la masa de pulmón observada en el paciente previamente vacunado demostró que el anticuerpo para CTLA-4 puede activar una respuesta de memoria preexistente al tumor.

E. Prueba de pacientes con cáncer de próstata avanzado con anticuerpo anti-CTLA-4

A catorce pacientes con cáncer de próstata avanzado se les administró intravenosamente una dosis única de anticuerpo monoclonal humano anti-CTLA-4 10D1 a 3,0 mg/kg. Los niveles en plasma del anticuerpo anti-CTLA-4 estuvieron presentes durante hasta cuatro meses. Se observaron reducciones en el antígeno específico de la próstata (PSA) y alivio sintomático. Con la excepción de erupción cutánea y prurito, que fueron reversibles, no hubo efectos inmunitarios adversos.

Estas y otras ventajas de la invención se explican en mayor detalle más adelante y en los ejemplos.

Excepto cuando se indique, los términos “paciente” o “sujeto” se usan indistintamente y se refieren a mamíferos tales como pacientes humanos y primates no humanos, además de animales experimentales tales como conejos, ratas y ratones, y otros animales. Animales incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios y reptiles.

El término “tratar” incluye la administración de los compuestos o agentes de la presente invención para prevenir o retrasar la aparición de los síntomas, complicaciones o indicios bioquímicos de una enfermedad, aliviando los síntomas o deteniendo o inhibiendo adicionalmente el desarrollo de la enfermedad, afección o trastorno (por ejemplo, enfermedad autoinmunitaria). El tratamiento puede ser profiláctico (para prevenir o retrasar la aparición de la enfermedad, o para prevenir la manifestación de síntomas clínicos o subclínicos de la misma) o supresión terapéutica o alivio de síntomas después de la manifestación de la enfermedad.

El término “cáncer avanzado” significa cáncer que ya no está localizado al sitio tumoral primario, o un cáncer que está en el estadio III o IV según the American Joint Committee on Cancer (AJCC).

En general, el término “bien tolerado” se refiere a la ausencia de cambios adversos en el estado de salud que se producen como resultado del tratamiento y que afectaría las decisiones del tratamiento.

El término “linfocito” como se usa en este documento tiene el significado normal en la materia, y se refiere a cualquiera de los leucocitos no fagocíticos mononucleares encontrados en la sangre, linfa y tejidos linfoides, es decir, linfocitos B y T.

El término “subpoblaciones de linfocitos T” o “ subconjunto(s) de linfocitos T” se refiere a linfocitos T o linfocitos T caracterizados por la expresión de marcadores de superficie celular particulares (véase Barclay, A. N. y col. (eds.), 1997, The Leukocyte Antigen Facts Book, 2ª edición, Academic Press, Londres, Reino Unido). El término “estable” en referencia a linfocitos T se refiere al hecho de que la frecuencia o porcentaje de un subconjunto de linfocitos T no cambie durante la evolución o duración de la administración de un agente.

Los términos “antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos”, “CTLA-4”, “CTLA4”, “antígeno CTLA-4” y “CD152” (véase, por ejemplo, Murata (1999) Am. J. Pathol. 155:453-460) se usan indistintamente e incluyen variantes, isoformas, homólogos de especies de CTLA-4 humano y análogos que tienen al menos un epítipo común con CTLA-4 (véase, por ejemplo, Balzano (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7:28-32). La secuencia completa de CTLA-4 se encuentra en el nº de acceso de GenBank L15006.

El término “epítipo” significa un determinante de proteína que puede unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítipos normalmente consisten en agrupaciones de superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, además de características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se diferencian en que la unión al primero, pero no al último, se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes.

Un “anticuerpo” intacto comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) entreconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada en este documento HCVR o VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (abreviada en este documento LCVR o VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la

cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones estructurales (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina con tejidos huésped o factores, que incluyen diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. El término anticuerpo incluye porciones de unión a antígeno de un anticuerpo intacto que retienen la capacidad para unirse a CTLA-4. Ejemplos de unión incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y col., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse usando procedimientos recombinantes por un ligador sintético que les permite que se produzcan como una única cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenaria (scFv); véase, por ejemplo, Bird y col. (1988) Science 242:423-426; y Huston y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Tales anticuerpos monocatenarios están incluidos por referencia al término "anticuerpo". Los fragmentos pueden prepararse por técnicas recombinantes o escisión enzimática o química de anticuerpos intactos.

El término "anticuerpo de secuencia humana" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes (si están presentes) derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos de la secuencia humana de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis al azar o específica para sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Tales anticuerpos pueden generarse en animales transgénicos no humanos, es decir, como se describe en las publicaciones PCT nº WO 01/14424 y WO 00/37504. Sin embargo, el término "anticuerpo de secuencia humana", como se usa en este documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamífero, tales como un ratón, se han injertado sobre secuencias humanas de la región estructural (es decir, anticuerpos humanizados).

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad por un epítopo particular. Por consiguiente, el término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una especificidad de unión única que tienen regiones variables y constantes (si están presentes) derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera fusionado con una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo policlonal" se refiere a una preparación de más de 1 (dos o más) anticuerpo diferente para CTLA-4 humano. Una preparación tal incluye anticuerpos de unión a una gama de epítopos diferentes.

Los anticuerpos para CTLA-4 pueden unirse a un epítopo sobre CTLA-4 humano de manera que inhiban la interacción de CTLA-4 con un contrarreceptor para B7 humano. Debido a que la interacción de CTLA-4 humano con B7 humano traduce una señal que conduce a la inactivación de linfocitos T que llevan el receptor de CTLA-4 humano, el antagonismo de la interacción induce, aumenta o prolonga eficazmente la activación de linfocitos T que llevan el receptor de CTLA-4 humano, prolongando o aumentando así una respuesta inmunitaria. Anticuerpos anti-CTLA-4 preferidos se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 5.811.097; 5.855.887; 6.051.227; en las publicaciones PCT nº WO 01/14424 y WO 00/37504; y en la publicación de EE.UU. nº 2002/0039581 A1. En particular, el documento WO 01/14424 desvela anticuerpos anti-CTLA-4 humanos que comprenden una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID nº: 1 y una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID nº:2.

SEC ID n°1

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYTMH WVRQAPGKGLEWVT
 FISYDGNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCAR
 TGWLGPFDDYWGQGTLLVTVSS

SEC ID n°2

EIVLTQSPGTLSPGERATLSC RASQSVGSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY GAFSRAT
 GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QPYGSSPWT FGQGTKVEIK

Estos y otros anticuerpos adecuados para su uso en la presente invención pueden prepararse según procedimientos que son muy conocidos en la técnica y/o se describen en las referencias aquí citadas. En realizaciones preferidas, los anticuerpos anti-CTLA-4 usados en la invención son "anticuerpos humanos" - es decir, anticuerpos aislados de un ser humano - o son "anticuerpos de la secuencia humana" (definida arriba). Por ejemplo, la publicación de patente internacional número WO 01/14424 describe procedimientos por los que anticuerpos anti-CTLA-4 de la secuencia humana se aíslan de un ratón transgénico que ha sido modificado con genes de anticuerpo humano. Por tanto, estos anticuerpos, aunque se aíslan de un animal no humano, tienen secuencias de aminoácidos (incluyendo secuencias del dominio constante y variable) que se corresponden con las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo particularmente preferido, que se usa en los ejemplos, más adelante, se denomina aquí el anticuerpo 10D1. Este anticuerpo de secuencia humana se ha descrito previamente y se caracteriza completamente, por ejemplo, en el documento WO 01/14424.

La frase "respuesta de células inmunitarias" se refiere a la respuesta de células del sistema inmunitario a estímulos externos o internos (por ejemplo, antígeno, citocinas, quimiocinas y otras células) que producen cambios bioquímicos en las células inmunitarias que producen la migración de células inmunitarias, destrucción de células diana, fagocitosis, producción de anticuerpos, otros efectores solubles de la respuesta inmunitaria, y similares.

Los términos "respuesta de linfocitos T" y "actividad de linfocitos T" se usan aquí indistintamente para referirse al componente de respuesta inmunitaria dependiente de linfocitos T (es decir, la proliferación y/o diferenciación de linfocitos T en linfocitos T colaboradores, asesinos citotóxicos o supresores, la provisión de señales por linfocitos T colaboradores para linfocitos B que producen o previenen la producción de anticuerpos, la destrucción de células diana específicas por linfocitos T citotóxicos y la liberación de factores solubles tales como citocinas que modulan la función de otras células inmunitarias).

El término "respuesta inmunitaria" se refiere a la acción concertada de linfocitos, células presentadoras de antígeno, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citocinas y complemento) que producen lesión selectiva a, destrucción de, o eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerígenas o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Los componentes de una respuesta inmunitaria pueden detectarse *in vitro* por diversos procedimientos que son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, (1) los linfocitos T citotóxicos pueden incubarse con células diana radiactivamente marcadas y detectarse la lisis de estas células diana por la liberación de radiactividad, (2) los linfocitos T colaboradores pueden incubarse con antígenos y células presentadoras de antígeno y la síntesis y secreción de citocinas se mide mediante procedimientos convencionales (Windhagen A; y col., 1995, *Immunity* 2(4): 373-80), (3) las células presentadoras de antígeno pueden incubarse con antígeno de proteína completo y la presentación de ese antígeno sobre MHC detectarse por tanto ensayos de activación de linfocitos T como procedimientos biofísicos (Harding y col., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 4230-4), (4) los mastocitos pueden incubarse con reactivos que reticulan sus receptores de Fc-epsilon y la liberación de histamina se mide por inmunoensayo enzimático (Siraganian, y col., 1983, *TIPS* 4: 432-437).

De manera similar, los productos de una respuesta inmunitaria en un organismo modelo (por ejemplo, ratón) o en un paciente humano también pueden detectarse por diversos procedimientos que son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, (1) la producción de anticuerpos en respuesta a vacunación puede detectarse fácilmente mediante procedimientos convencionales actualmente usados en laboratorios clínicos, por ejemplo, un ELISA; (2) la migración de células inmunitarias a sitios de inflamación puede detectarse raspando la superficie de la piel y colocando un recipiente estéril para capturar las células migrantes sobre el sitio de raspado (Peters y col., 1988, *Blood* 72: 1310-5); (3) la proliferación de células mononucleares de la sangre periférica en respuesta a mitógenos o reacción de linfocitos mixtos puede medirse usando ³H-timidina; (4) la capacidad fagocítica de granulocitos, macrófagos y otros fagocitos en PBMC puede medirse colocando PBMC en pocillos junto con partículas marcadas (Peters y col., 1988); y (5) la diferenciación de células del sistema inmunitario puede medirse marcando PBMC con anticuerpos para moléculas de CD tales como CD4 y CD8 y midiendo la fracción de PBMC

que expresa estos marcadores.

Por comodidad, en la presente invención se describe frecuentemente que las respuestas inmunitarias son respuestas inmunitarias tanto “primarias” como “secundarias”. Una respuesta inmunitaria primaria, que también se describe como una respuesta inmunitaria “protectora”, se refiere a una respuesta inmunitaria producida en un individuo como resultado de alguna exposición inicial (por ejemplo, la “inmunización” inicial) a un antígeno particular. Una inmunización tal puede producirse, por ejemplo, como resultado de alguna exposición natural al antígeno (por ejemplo, de infección inicial por algún patógeno que exhibe o presenta el antígeno) o de antígeno presentado por células cancerosas de algún tumor en el individuo (por ejemplo, un tumor reseccionado). Alternativamente, la inmunización puede producirse como resultado de vacunar al individuo con una vacuna que contiene el antígeno. Por ejemplo, la vacuna puede ser una vacuna contra un patógeno particular (por ejemplo, contra un virus, una bacteria o un parásito) o puede ser una vacuna contra el cáncer que comprende uno o más antígenos de una célula cancerosa.

Una respuesta inmunitaria primaria puede debilitarse o atenuarse con el tiempo y puede incluso desaparecer o al menos atenuarse tanto que no pueda detectarse. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a una respuesta inmunitaria “secundaria”, que también se describe aquí como una “respuesta inmunitaria de memoria”. El término respuesta inmunitaria secundaria se refiere a una respuesta inmunitaria provocada en un individuo después de que ya se haya producido una respuesta inmunitaria primaria. Por tanto, una respuesta secundaria o inmunitaria puede provocarse, por ejemplo, para potenciar una respuesta inmunitaria existente que se ha debilitado o atenuado, o para volver a crear una respuesta inmunitaria previa que tanto ha desaparecido como que ya no puede detectarse. Un agente que puede administrarse para provocar una respuesta inmunitaria secundaria se denomina después en lo sucesivo un “refuerzo” ya que puede decirse que el agente “refuerza” la respuesta inmunitaria primaria.

Como ejemplo, y no a modo de limitación, una respuesta inmunitaria secundaria puede provocarse reintroduciendo al individuo un antígeno que provocó la respuesta inmunitaria primaria (por ejemplo, readministrando una vacuna). Sin embargo, una respuesta inmunitaria secundaria para un antígeno también puede provocarse administrando otros agentes que no contienen el presente antígeno. Por ejemplo, la presente invención proporciona procedimientos para potenciar una respuesta inmunitaria secundaria administrando un anticuerpo anti-CTLA-4 a un individuo. En tales procedimientos, el presente antígeno no necesita administrarse necesariamente con el anticuerpo anti-CTLA-4 y la composición que contiene el anticuerpo anti-CTLA-4 no necesita contener necesariamente el antígeno. La respuesta inmunitaria secundaria o de memoria puede ser tanto una respuesta humoral (anticuerpo) como una respuesta celular. Una respuesta humoral secundaria o de memoria se produce tras la estimulación de linfocitos B de memoria que se generaron en la primera presentación del antígeno. Las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (HTR) son un tipo de respuesta inmunitaria secundaria o de memoria celular que están mediadas por células CD4⁺. Una primera exposición a un antígeno sensibiliza el sistema inmunitario y exposición (exposiciones) adicional(es) producen una HTR.

Como se usa en este documento, el término “receptor de la superficie celular” incluye moléculas y complejos de moléculas que pueden recibir una señal y la transmisión de una señal tal a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un “receptor de la superficie celular” de la presente invención es el receptor de linfocitos T (TCR) o los ligandos B7 de CTLA-4.

El término “activación de linfocitos T no específicos” se refiere a la estimulación de linfocitos T independiente de su especificidad antigénica.

Como se usa en este documento, el término “célula efectora” se refiere a una célula inmunitaria que participa en la fase efectora de una respuesta inmunitaria, a diferencia de las fases cognitiva y de activación de una respuesta inmunitaria. Células inmunitarias a modo de ejemplo incluyen una célula de un origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (por ejemplo, linfocitos B y linfocitos T que incluyen linfocitos T citolíticos (CTL)), células asesinas, células asesinas naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleares, granulocitos, mastocitos y basófilos. Las células efectoras expresan receptores de Fc específicos y llevan a cabo funciones inmunitarias específicas. Una célula efectora puede inducir citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC), por ejemplo, un neutrófilo que puede inducir ADCC. Por ejemplo, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos que expresan Fc α R participan en la destrucción específica de células diana y la presentación de antígenos a otros componentes del sistema inmunitario, o unión a células que presentan antígenos. Una célula efectora también puede fagocitar un antígeno diana, célula diana o microorganismo.

“Célula diana” debe significar cualquier célula no deseable en un sujeto (por ejemplo, un ser humano o animal) que puede ser elegida como diana por una composición (por ejemplo, un anticuerpo de secuencia humana o un anticuerpo monoclonal humano de la invención, una molécula biespecífica o multiespecífica de la invención). La célula diana puede ser una célula que expresa o que expresa en exceso CTLA-4 humano. Células que expresan CTLA-4 humano pueden incluir células tumorales, por ejemplo, linfomas.

En la invención también se incluyen anticuerpos modificados. El término “anticuerpo modificado” incluye anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados que se han identificado, por ejemplo, por delección, adición o sustitución de porciones del anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede

modificarse delecionando la región constante y sustituyéndola con una región constante que implica aumentar la semivida, por ejemplo, semivida en suero, estabilidad o afinidad del anticuerpo.

Los conjugados de anticuerpo de la invención pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada o crear una respuesta biológica (por ejemplo, para reclutar células efectoras). El resto de fármaco no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón-alfa; o modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar un resto terapéutico de este tipo con anticuerpos son muy conocidas, véanse, por ejemplo, Arnon y col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld y col. (eds.), pág. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom y col., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2ª ed.), Robinson y col. (eds.), pág. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera y col. (eds.), pág. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective of The Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin y col. (eds.), pág. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe y col., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

TRATAMIENTO CONTRA EL CÁNCER

El bloqueo de CTLA-4 por anticuerpos puede potenciar la respuesta inmunitaria de memoria o secundaria a células cancerosas en el paciente. Los anticuerpos para CTLA-4 pueden combinarse con un agente inmunogénico, tal como células cancerosas, antígenos de tumor purificados (incluyendo proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de hidratos de carbono), células y células transfectadas con genes que codifican citocinas estimulantes inmunitarias y antígenos de superficie de la célula tales como B7 (véase, por ejemplo, Hurwitz, A. y col. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 1998; 95:10067-10071), o usarse solos, para estimular la inmunidad.

El bloqueo de CTLA-4 es eficaz cuando sigue a un protocolo de vacunación. Se han ideado muchas estrategias experimentales para la vacunación contra tumores (véanse Rosenberg, S., 2000, *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 300-302; Khayat, D. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 414-428; Foon, K. 2000, *ASCO Educational Book Spring*: 730-738; véanse también Restifo, N. y Sznol, M., *Cancer Vaccines*, Cap. 61, pág. 3023-3043 en DeVita, V. y col. (eds.), 1997, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, quinta edición). En una de estas estrategias, una vacuna se prepara usando células tumorales autólogas o alogénicas. Se ha mostrado que estas vacunas celulares son más eficaces cuando las células tumorales se transducen para expresar GM-CSF. Se ha mostrado que GM-CSF es un potente activador de la presentación de antígeno para la vacunación de tumores (Dranoff y col. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 1993; 90: 3539-43).

El bloqueo de anti-CTLA-4 para reforzar vacunas de células tumorales modificadas con GMCSF mejora la eficacia de vacunas en varios modelos tumorales experimental tales como carcinoma de mama (Hurwitz y col., 1998, arriba), cáncer de próstata primario (Hurwitz y col., *Cancer Research* 2000; 60:2444-8) y melanoma (van Elsas y col. *J. Exp. Med.* 1999, 190:355-66). En estos casos, los tumores no inmunogénicos tales como el melanoma B16 se han vuelto susceptibles a la destrucción por el sistema inmunitario. La vacuna contra células tumorales también puede modificarse para expresar otros activadores inmunitarios tales como IL2, y moléculas coestimulantes, entre otras.

El estudio de la expresión génica y patrones de expresión génica a gran escala en diversos tumores ha conducido a la definición de los llamados "antígenos específicos para tumor" (Rosenberg, *Immunity* 1999; 10:281-7). En muchos casos, estos antígenos específicos para tumor son antígenos de diferenciación expresados en los tumores y en la célula a partir de la cual se produjo el tumor, por ejemplo, antígenos de melanocito gp100, antígenos MAGE, Trp-2. Y, lo que es más importante, puede mostrarse que muchos de estos antígenos son las dianas de linfocitos T específicos para tumor encontrados en el huésped. El bloqueo de CTLA-4 puede usarse como un agente de refuerzo conjuntamente con vacunas basadas en versiones recombinantes de proteínas y/o péptidos que se encuentra que se expresan en un tumor con el fin de potenciar una respuesta inmunitaria secundaria o de memoria a estas proteínas. Estas proteínas son normalmente consideradas por el sistema inmunitario como autoantígenos y, por tanto, son tolerantes a ellas. El antígeno de tumor también puede incluir la proteína telomerasa, que se requiere para la síntesis de telómeros de cromosomas y que se expresa en más del 85 % de cánceres humanos y en sólo un número limitado de tejidos somáticos (Kim y col., *Science* 1994; 266:2011-2013). Estos tejidos somáticos pueden protegerse del ataque inmunitario por diversos medios. El antígeno de tumor también pueden ser "neo-antígenos" expresados en células cancerosas debido a mutaciones somáticas que alteran la secuencia de proteínas o crean proteínas de fusión entre dos secuencias no relacionadas (es decir, bcr-abl en el cromosoma Philadelphia), o idiotipo de tumores de linfocitos B. Otras vacunas contra tumores pueden incluir las proteínas de virus implicados en cánceres humanos tales como un virus del papiloma humano (VPH), virus de la hepatitis (VHB y VHC) y virus del

herpes asociado al sarcoma de Kaposi (VHSK). Otra forma de antígeno específico para tumor que puede usarse conjuntamente con el bloqueo de CTLA-4 es proteínas de choque térmico purificadas (HSP) aisladas del propio tejido tumoral. Estas proteínas de choque térmico contienen fragmentos de proteínas de las células tumorales y estas HSP son altamente eficientes en la administración a células presentadoras de antígeno para provocar

5 inmunidad tumoral (Suot y Srivastava, Science 1995; 269:1585-1588; Tamura y col., Science 1997, 278:117-120).

Las células dendríticas (CD) son potentes células presentadoras de antígeno que pueden usarse para sensibilizar respuestas específicas de antígeno. Las CD pueden producirse *ex vivo* y cargarse con diversos antígenos de proteína y péptido, además de extractos de células tumorales (Nestle y col., Nature Medicine 1998; 4:328-332). Las CD también pueden transducirse por medios genéticos para también expresar estos antígenos de tumor. Las CD

10 también se han fusionado directamente con células tumorales para los fines de inmunización (Kugler y col., Nature Medicine 2000; 6:332-336). Como un procedimiento de vacunación, la inmunización con CD puede reforzarse eficazmente con el bloqueo de CTLA-4 para activar respuestas antitumorales más potentes.

Otro tipo de vacuna contra el melanoma que puede combinarse con el bloqueo de CTLA-4 es una vacuna preparada a partir de un lisado de línea celular de melanoma conjuntamente con un adyuvante inmunológico tal como la vacuna MELACINE®, una mezcla de lisados de dos líneas celulares de melanoma humano más el adyuvante

15 inmunológico DETOX™. El tratamiento con vacuna puede reforzarse con anti-CTLA4, con o sin tratamiento quimioterapéutico adicional.

El bloqueo de CTLA-4 también puede usarse para reforzar la inmunidad inducida por tratamientos contra el cáncer convencionales. En estos casos puede ser posible reducir la dosis de reactivo quimioterapéutico administrado (Mokyr y col., Cancer Research, 1998; 58:5301-5304). El fundamento científico más allá del uso combinado del

20 bloqueo de CTLA-4 y quimioterapia es que la muerte celular, que es una consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos, debería producir niveles elevados de antígeno de tumor en la ruta de presentación de antígeno. Por tanto, CTLA-4 puede reforzar una respuesta inmunitaria sensibilizada a quimioterapia liberada de células tumorales. Además, la actividad inmunoestimuladora de CTLA-4 es útil para vencer

25 los efectos inmunosupresores de la quimioterapia. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos con los que puede combinarse el tratamiento con anti-CTLA-4 incluyen, pero no se limitan a, aldesleucina, altretamina, amifostina, asparaginasa, bleomicina, capecitabina, carboplatino, carmustina, cladribina, cisaprida, cisplatino, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, docetaxel, doxorubicina, dronabinol, epoetina-alfa, etopósido, filgrastim, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, granisetrona, hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, interferón alfa,

30 irinotecan, lansoprazol, levamisol, leucovorina, megestrol, mesna, metotrexato, metoclopramida, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, omeprazol, ondansetrona, paclitaxel (Taxol®), pilocarpina, proclorperazina, rituximab, tamoxifeno, taxol, clorhidrato de topotecan, trastuzumab, vinblastina, vincristina y tartrato de vinorelbina. Para el tratamiento de cáncer de próstata, un agente quimioterapéutico preferido con el que puede combinarse anti-CTLA-4 es paclitaxel (Taxol®). Para el tratamiento de cáncer por melanoma, un agente quimioterapéutico preferido con el

35 que puede combinarse anti-CTLA-4 es dacarbazina (DTIC).

Otras terapias de combinación que pueden producir sensibilización del sistema inmunitario mediante la muerte celular son radiación, cirugía y falta de hormonas (Kwon, E. y col. Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 1999; 96 (26): 15074-9). Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno de tumor en el huésped. Por ejemplo, cualquier

40 manipulación del tumor en el momento de la cirugía puede aumentar enormemente el número de células cancerosas en la sangre (Schwartz, y col., Principles of Surgery 1984. 4ª ed., pág. 338). Los inhibidores de la angiogénesis también pueden combinarse con bloqueo de CTLA-4. La inhibición de la angiogénesis conduce a la muerte de células tumorales que puede alimentar antígeno de tumor a las rutas de presentación de antígeno huésped. Todos estos producen la liberación de tumor y la posible sensibilización del sistema inmunitario que puede reforzar el

45 bloqueo de CTLA-4. Actualmente no hay vacuna eficaz, o patógenos para los que las vacunas convencionales tengan una eficacia menor que la completa. Éstos incluyen, pero no se limitan a, VIH, hepatitis (A, B y C), gripe, herpes, Giardia, malaria, Leishmania, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. El bloqueo de CTLA-4 es particularmente útil en reforzar la inmunidad contra infecciones establecidas por agentes tales como VIH que presentan antígenos alterados durante la evolución de las infecciones. Estos epítopes novedosos son reconocidos como extraños en el momento de la administración de anti-CTLA-4 humano, provocando así una fuerte respuesta de

50 linfocitos T que no es apagada por señales negativas por CTLA-4.

Algunos ejemplos de virus patógenos que causan infecciones tratables mediante procedimientos de la invención incluyen hepatitis (A, B o C), virus del herpes (por ejemplo, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II y CMV, virus de Epstein Barr), adenovirus, virus de la gripe, flavivirus, echovirus, rinovirus, virus coxsackie, comovirus, virus respiratorio sincitial, virus de las paperas, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubeola, parvovirus, virus de la variolovacuna, virus HTLV, virus del dengue, virus del papiloma, virus del molusco, virus de la poliomielitis, virus de

55 la rabia, virus JC y virus de la encefalitis arboviral.

Algunos ejemplos de bacterias patógenas que causan infecciones tratables mediante procedimientos de la invención incluyen clamidia, bacterias de Rickettsia, micobacterias, estafilococos, estreptococos, neumococos, meningococos y conococos, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionella, difteria, salmonella, bacilos, cólera, tétanos,

60 botulismo, ántrax, peste, leptospirosis y bacterias de la enfermedad de Lyme.

Algunos ejemplos de hongos patógenos que causan infecciones tratables mediante procedimientos de la invención incluyen *Candida (albicans, krusei, glabrata, tropicalis, etc.)*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus (fumigatus, niger, etc.)*, *Genus mucorales (Mucor, Absidia, Rhizopus)*, *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*.

- 5 Algunos ejemplos de parásitos patógenos que causan infecciones tratables mediante procedimientos de la invención incluyen *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba sp.*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium sp.*, *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*.

Fomento de reacciones “autoinmunitarias” beneficiosas

- 10 La capacidad de anticuerpos anti-CTLA-4 para provocar y amplificar respuestas autoinmunitarias se ha documentado en varios sistemas experimentales (EAE - encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, un modelo murino para EM (Perrin y col., J Immunol 1996; 157:1333-1336); diabetes (Luhder y col., 1998, arriba). De hecho, la inducción de respuestas antitumorales usando vacunas de células tumorales y péptidos revela que muchas respuestas antitumorales implican anti-autorreactividades (la despigmentación observada en anti-CTLA-4 + GM-CSF modificó melanoma B16 en van Elsas y col., arriba; la despigmentación en ratones vacunados con Trp-2 (Overwijk y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999 96:2982-2987); la prostatitis autoinmunitaria provocada por vacunas contra células tumorales TRAMP (Hurwitz 2000, arriba), la vacunación con antígeno de péptido de melanoma y vitiligo observada en ensayos clínicos humanos (Rosenberg y White, J Immunother Emphasis Tumor Immunol 1996; 19: 81-4).

- 20 Por tanto, es posible considerar el uso de refuerzo con anti-CTLA-4 conjuntamente con diversas auto-proteínas con el fin de idear protocolos de vacunación para generar eficazmente respuestas inmunitarias contra estas auto-proteínas para el tratamiento de enfermedad. Por ejemplo, las respuestas de anticuerpos neutralizantes a hormonas y otros factores solubles que se requieren para el crecimiento de tumores particulares pueden considerarse como posibles dianas de vacunación.

25 **Ejemplos**

- La presente invención también se describe por medio de los siguientes ejemplos. Sin embargo, el uso de estos u otros ejemplos en cualquier parte en la memoria descriptiva sólo es ilustrativo y de ninguna forma limita el alcance y el significado de la invención o de cualquier término ejemplificado. Asimismo, la invención no se limita a ninguna realización preferida particular descrita en este documento. De hecho, muchas modificaciones y variaciones de la invención pueden ser evidentes para aquellos expertos en la materia tras la lectura de esta memoria descriptiva y pueden hacerse sin apartarse de su espíritu y alcance. Por tanto, la invención sólo va a estar limitada por los términos de las reivindicaciones adjuntas junto con el alcance completo de los equivalentes a los que tienen derecho las reivindicaciones.

35 **Ejemplo 1:- El tratamiento con anti-CTLA-4 potencia las respuestas de anticuerpos secundarios y de linfocitos T a una vacuna contra células de melanoma en monos Cynomolgus**

- La capacidad de un anticuerpo anti-CTLA-4 humano de la invención para potenciar las respuestas de anticuerpos y de linfocitos T a una vacuna contra células de melanoma se examinó en monos Cynomolgus (obtenidos de Primate Products, Miami, Florida). Grupos de prueba de seis monos cada uno (tres machos, tres hembras) se trataron con tanto 1) una vacuna contra células de melanoma sola (SK-mel-3, una línea celular tumoral de melanoma humano transfectada para expresar GM-CSF) como 2) tanto SK-mel-3 como el anticuerpo anti-CTLA-4 10D1 descrito en el documento WO 01/14424. Una vacuna de células completas permitiría la investigación de reacciones autoinmunitarias con una variedad de tejidos normales en este modelo animal, a pesar del hecho de que la vacuna celular fuera de origen humano.

- 45 Para preparar la vacuna, células SK-mel se cultivaron a confluencia y se recogieron. Las células se trataron con mitomicina C, se lavaron varias veces y se resuspendieron a 1×10^7 /ml en solución salina. El anticuerpo se administró intravenosamente a una dosificación de 10 mg/kg en un volumen de 1,3 ml/kg. Las células SK-mel-3 se administraron subcutáneamente en una cantidad fija (5×10^6 células/animal a 0,5 ml/animal). Cada preparación de vacuna se probó para la producción de endotoxina (< 2 EU/ml) y GM-CSF después de 48 horas (2-8 ng/ml por 10^6 células). El anticuerpo y/o vacuna apropiados se administraron en los días 0, 28, 56, 84 y 140. Las respuestas de anticuerpos a la vacuna contra células de melanoma se evaluaron en los días 13, 41, 69 y 97 usando citometría de flujo. El estado de salud de los monos se evaluó dos veces a la semana y los pesos corporales se registraron semanalmente. La hematología, el análisis farmacocinético y los ensayos funcionales se realizaron antes del inicio del estudio y periódicamente durante el estudio. Se realizó un examen de patología macroscópico y microscópico completo en el día 167.

- 55 Se examinaron la especificidad de respuestas de anticuerpos en los animales tratados con la vacuna contra el melanoma y el anticuerpo anti-CTLA-4. El plasma de 6 monos Cynomolgus tratados con la vacuna SK-mel-3 y el mAb 10D1 se obtuvo en el día 41 de tratamiento y se recogió. El plasma se diluyó 1:1000 y se probó para reactividad a una variedad de líneas celulares de melanoma y de no melanoma por citometría de flujo. Los

resultados se muestran en la **Figura 1**, que demuestran que las respuestas de anticuerpos en los monos muestran mayor especificidad por líneas celulares de melanoma humano con respecto a líneas celulares de no melanoma humano o líneas celulares no humanas.

El efecto de la dosificación prolongada sobre los monos tratados con anticuerpo y/o vacuna se evaluó tras la administración de una dosis adicional en el día 140. La concentración en plasma del anticuerpo anti-CTLA-4 se monitorizó por ELISA con CTLA-4 recombinante en diversos momentos de tiempo durante la evolución del estudio hasta el día 160. Las concentraciones en plasma de 10D1 se determinaron a partir de diluciones de muestras analizadas contra una curva patrón. Los datos para la concentración en plasma de 10D1 durante la dosificación prolongada se muestran en la **Figura 2**, en los que se presenta la media \pm EEM de los seis animales tratados. Los resultados demuestran que los niveles en plasma del anticuerpo anti-CTLA-4 permanecieron por encima de niveles detectables durante la evolución entera del periodo de 160 días, sugiriendo que el bloqueo de CTLA4 se mantuvo durante el periodo de tratamiento. La concentración media en plasma para mAb 10D1 en los monos tratados alcanzó el pico entre 175 y 315 μ g/ml en el día después de la infusión, y permaneció por encima de 20 μ g/ml durante el estudio de seis meses. La química clínica, observaciones en el laboratorio y análisis de histología completos no revelaron ninguna alteración significativa relacionada con la administración de anticuerpo o vacuna. La dosificación crónica no produjo patología relacionada con el tratamiento, excepto la ligera irritación en el sitio de inyección de la vacuna de dos monos, a pesar de la posible capacidad del bloqueo de CTLA-4 para establecer respuestas anti-melanocito autorreactivas. Los monos no desarrollaron ninguna respuesta de anticuerpos detectable a mAb 10D1 y se mantuvieron altos niveles de anticuerpo en circulación activo durante la duración del estudio. Además, esta dosificación prolongada con el anticuerpo anti-CTLA-4 se asoció a eficacia de tratamiento y no se asoció a efectos secundarios perjudiciales (por ejemplo, activación de linfocitos T no específica). Por tanto, este experimento demuestra que los primates pueden tratarse eficazmente durante periodos de tiempo prolongados con un anticuerpo anti-CTLA-4 de forma que las concentraciones en plasma se mantienen por encima de niveles detectables durante al menos 1, 2, 3, 4 ó 5 meses o incluso más sin efectos secundarios graves.

Ejemplo 2:- Pruebas de la proliferación de linfocitos T específicos de antígeno de experimentos de hipersensibilidad de tipo retardado (HTR) en seres humanos.

Diecinueve pacientes con melanoma en el estadio III (2 pacientes) o IV (17 pacientes) reseccionado recibieron aumentos de dosis (0,3, 1 y 3 mg/kg) del anticuerpo para CTLA-4 10D1 con cada inyección de vacuna de péptidos gp100/tirosinasa/MART-1 con adyuvante incompleto de Freund. Los péptidos tirosinasa 368-376 (370D), MART-1 26-35 (27L) y gp100209-217 (210M) se diferenciaron cada uno del natural por una modificación de aminoácidos para aumentar la unión a HLA. La vacuna se administró ocho veces durante doce meses a 1 mg/dosis/péptido. Las respuestas inmunitarias medidas por reactividad de HTR indicaron que cuatro de nueve pacientes respondieron a gp100 y dos de nueve pacientes respondieron a MART-1. Los ensayos de ELISPOT mostraron respuestas inmunitarias en cuatro de los dieciséis pacientes probados usando linfocitos T CD8 frescos.

Ejemplo 3:- Resultados de ensayos clínicos humanos de fase I de MAb 10D1 en melanoma (MDXCTLA4-02)

MDXCTLA4-02 fue un ensayo clínico multicentro, de etiqueta abierta, de fase I para evaluar la seguridad y farmacocinética de MAb 10D1 en diecisiete pacientes con melanoma maligno no reseccionable progresivo. La mediana de la edad fue 59 años (intervalo 29-79). Nueve pacientes habían recibido inmunoterapia previa, seis tuvieron radiación previa y cinco tuvieron quimioterapia previa. Todos los pacientes recibieron una dosis única de 3 mg/kg de 10D1 intravenosamente durante 90 minutos y luego fueron seguidos para toxicidad, farmacocinética, activación de linfocitos T en circulación y desenlace clínico. Todas las infusiones se completaron con sólo acontecimientos adversos leves. Siete pacientes tuvieron erupciones cutáneas o prurito reversible leve. Los niveles en plasma del anticuerpo persistieron de uno a cuatro meses. No hubo aumento significativo en linfocitos T periféricos activados y no hubo pruebas de autoinmunidad clínica más allá de la erupción cutánea leve. Dos pacientes experimentaron una respuesta parcial que incluyó redisolución de tres masas de tejido blando y más del 50 % de reducción de una masa de pulmón. Además, el paciente que experimentó la reducción de más del 50 % en la masa de pulmón fue un paciente que previamente había sido tratado con una vacuna contra el melanoma, sugiriendo que el tratamiento con anticuerpo anti-CTLA-4 pudo activar una respuesta de memoria preexistente al tumor. Los resultados de este estudio indican que el tratamiento con anti-CTLA-4 fue bien tolerado con claras pruebas de actividad inmunológica y antitumoral.

Las subpoblaciones de linfocitos en pacientes tratados con 10D1 se analizaron por citometría de flujo en diversos momentos de tiempo después del tratamiento con anticuerpo. Los resultados se resumen en la **Tabla 1**, a continuación.

Tabla 1: Análisis de citometría de flujo de subpoblaciones de linfocitos en sujetos con cáncer por melanoma tratados con 3,0 mg/kg de MAb 10D1.

Subpoblación	Referencia	24 horas	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
CD3	72,9 ± 3,6	68,9 ± 4,1	75,1 ± 3,6	73,2 ± 4,3	74,7 ± 3,9	74,2 ± 4,2
CD4	48,8 ± 3,0	44,3 ± 3,6	49,3 ± 3,6	50,5 ± 3,8	49,2 ± 4,3	50,8 ± 4,5
CD8	22,3 ± 2,5	25,3 ± 3,0	26,2 ± 2,5	21,9 ± 1,8	26,3 ± 2,9	23,7 ± 2,7
CD19	12,2 ± 2,5	12,7 ± 3,0	8,7 ± 2,2	11,3 ± 2,9	9,4 ± 2,2	9,4 ± 2,1
CD4 + CD25	65,8 ± 3,4	64,9 ± 4,0	60,8 ± 3,4	61,7 ± 3,0	58,3 ± 3,0	60,9 ± 2,9
CD8 + CD25	14,4 ± 1,7	13,4 ± 1,8	13,1 ± 1,9	11,9 ± 1,6	10,9 ± 1,3	13,7 ± 2,1
CD4 + HLA-DR	11,8 ± 1,3	12,4 ± 1,7	19,7 ± 3,5	20,9 ± 1,9	18,4 ± 1,2	17,1 ± 1,6
CD8 + HLA-DR	13,6 ± 2,2	17,9 ± 2,8	17,7 ± 2,9	17,5 ± 2,3	20,2 ± 2,9	17,5 ± 2,6
CD4 + 45RO	23,7 ± 3,4	22,9 ± 3,7	19,4 ± 3,4	17,9 ± 3,8	17,3 ± 3,7	19,2 ± 3,8
CD8 + 45RO	40,5 ± 3,5	39,1 ± 3,8	37,6 ± 4,1	35,5 ± 4,9	35,1 ± 5,0	35,7 ± 4,3

5 Similar a los resultados observados en pacientes con cáncer de próstata (véase el Ejemplo 6 más adelante), los resultados en el estudio de melanoma demuestran que el tratamiento con 10D1 condujo a un aumento de aproximadamente el 50 % en la subpoblación de CD4/HLA-DR+ con el tiempo. Las otras subpoblaciones de linfocitos permanecieron esencialmente constantes con el tiempo. Como se ha descrito anteriormente, la capacidad del tratamiento con anticuerpo anti-CTLA4 para aumentar la subpoblación de CD4/HLA-DR+ con el tiempo puede usarse como característica selectiva cuando se evalúan anticuerpos anti-CTLA4 (es decir, puede evaluarse un panel de anticuerpos anti-CTLA4 para su capacidad para aumentar la subpoblación de CD4/HLA-DR+ y puede seleccionarse un anticuerpo anti-CTLA4 que pueda aumentar esta subpoblación con el tiempo). Además, la monitorización de subpoblaciones de linfocitos con el tiempo, en particular la subpoblación de CD4/HLA-DR+, puede realizarse en sujetos que están tratándose con anti-CTLA4 como marcador de la eficacia del anticuerpo.

15 **Ejemplo 4:- Estudio humano del bloqueo de anticuerpo anti-CTLA-4 en pacientes con melanoma y cáncer de ovario previamente vacunados**

A nueve pacientes con cáncer avanzado previamente inmunizados se les administró anticuerpo anti-CTLA-4 10D1. Los pacientes 1-6 se enrolaron al ensayo de fase I MDXCTLA4-02 con criterios de elegibilidad de melanoma en estadio III o IV quirúrgicamente no reseccionable, progresión de enfermedad, una esperanza de vida de al menos 12 semanas, función adecuada del órgano diana, terapia analgésica estable y un estado de rendimiento de Karnofsky de al menos el 60 %. Los pacientes se excluyeron si tuvieron un segundo tumor maligno (distinto del cáncer de piel por no melanoma tratado o cáncer de vejiga superficial), enfermedad autoinmunitaria, infección activa, hipersensibilidad a kanamicina; o si usaron corticosteroides. Los pacientes 7-9 se enrolaron al ensayo de fase I para pacientes con melanoma metastásico, carcinoma de ovario metastásico, carcinoma de pulmón de células no pequeñas metastásico o leucemia mielógena aguda

25 Cuatro pacientes se trataron previamente para melanoma en el estadio temprano (tres pacientes recibieron α -interferón, un paciente recibió una vacuna del gangliósido GM2 mezclado con QS-21, un paciente recibió radiación). Tratamientos no inmunológicos previos para melanoma metastásico incluyeron cirugía (cuatro pacientes), radiación (dos pacientes), quimioterapia (tres pacientes) e inhibidor de proteasoma (un paciente). Las dos pacientes con cáncer de ovario recibieron múltiples quimioterapias para enfermedad recurrente durante los tres a cuatro años precedentes al estudio.

35 Todos los pacientes participaron en estudios de vacunas de fase I para enfermedad metastásica antes de la entrada en este estudio. Tres pacientes con melanoma y las dos con cáncer de ovario se inmunizaron con células tumorales autólogas irradiadas manipuladas para secretar GM-CSF por transferencia génica mediada por adenovirus. Uno de estos pacientes (paciente 8) también recibió una vacuna MUC-1. Los tres pacientes con melanoma se inmunizaron con células dendríticas autólogas manipuladas para expresar gp100 y MART-1 por transferencia génica mediada por adenovirus. Un paciente con melanoma se vacunó con un péptido gp100 modificado e interleucina-2 de alta dosis.

40 Inicialmente, 10D1 se administró intravenosamente como una dosis de prueba de 0,2 mg en 10 ml de solución salina normal durante diez minutos para identificar posibles reacciones de hipersensibilidad. Entonces, el resto de la dosis de 10D1 de 3 mg/kg se administró intravenosamente durante noventa minutos. Tras la administración de anticuerpos, los pacientes se sometieron a evaluación clínica, de laboratorio y radiográfica diariamente durante tres

días, luego semanalmente durante cuatro semanas y luego mensualmente.

Un paciente tuvo una reacción de hipersensibilidad aguda manifestada por hipotensión leve y náuseas durante la infusión. La reacción se controló fácilmente con antihistamínicos y la infusión se completó sin ningún contratiempo. Cinco pacientes tuvieron síntomas constitucionales de grado I/II transitorios que incluyeron mialgia, artralgia, anorexia, fatiga, congestión nasal y tos durante dos a siete días tras la infusión. Un paciente tuvo síntomas intermitentemente recurrentes durante varios meses. Un paciente manifestó una anomalía de la función hepática de grado III transitoria.

Los tres pacientes con melanoma previamente vacunados con células tumorales secretoras de GM-CSF autólogas irradiadas tuvieron extensas necrosis tumorales tras el tratamiento con 10D1. El paciente 1 tuvo metástasis del sistema nervioso central, pulmón, abdomen y tejido blando tras el enrolamiento en el estudio. Un mes tras la administración de 10D1, el paciente 1 presentó cambios clínicos en su estado neurológico y una lesión subcutánea se inflamó agudamente. El paciente 1 murió seis días después. En la autopsia se observó una marcada necrosis tumoral hemorrágica del cerebro, metástasis epidurales y viscerales. El examen histopatológico mostró una extensa destrucción tumoral (al menos el 90 %) con hemorragia. Los vasos sanguíneos tumorales se lesionaron gravemente produciendo extensas necrosis isquémicas. Un borde de células tumorales viables permaneció en cada lesión acompañada de una reacción de granulocitos y linfocitos.

El paciente 2 tuvo síntomas constitucionales de grado II recurrentes que empezaron un mes después de la infusión de 10D1. La biopsia de una lesión mediastínica mostró una extensa necrosis tumoral con infiltrados de linfocitos y granulocitos. La inmunohistoquímica mostró la presencia de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y linfocitos B CD20⁺ productores de inmunoglobulina. La lesión mediastínica se reseccionó completamente dos meses después. El análisis patológico de la lesión mostró fibrosis densa, necrosis extensa y una respuesta de linfocitos y granulocitos en curso. También se observó una vasculopatía caracterizada por un infiltrado linfoide circunferencial en la pared de un vaso sanguíneo ocluido. La necrosis tumoral se relacionó espacialmente con la lesión del vaso.

El paciente 7 desarrolló inflamación en una gran lesión subcutánea tres semanas después de la infusión de 10D1. La lesión se extirpó dos meses después de la infusión. El examen patológico de la lesión mostró una extensa necrosis tumoral y fibrosis, una vasculopatía importante e infiltrados de linfocitos y granulocitos.

Se observaron efectos antitumorales menos espectaculares en los cuatro pacientes con melanoma previamente inmunizados con antígenos melanosómicos definidos. El paciente 3 se sometió a resección de un aumento de la lesión mediastínica siete meses después de la infusión. El análisis patológico mostró un infiltrado linfocítico denso sin necrosis tumoral. La inmunohistoquímica mostró la presencia de células CD8⁺, pero no células CD4⁺ o CD20⁺. El paciente 4 tuvo un infiltrado de células CD4⁺ similar sin necrosis tumoral en una metástasis de ganglios linfáticos, que se escindió dos meses después de la infusión de anticuerpos. El paciente 5 no tuvo infiltrados linfoides o necrosis tumoral en una lesión subcutánea, que se reseccionó dos meses después de la infusión de anticuerpos. El paciente 6 no tuvo una biopsia y su tumor progresó.

La infusión de anticuerpos produjo cambios en los niveles de CA-125 en las dos pacientes con carcinoma de ovario. CA-125 se desprende de la superficie de células de carcinoma de ovario y es un marcador útil del estado de enfermedad (Jacobs, 1. (1994) Gyn. Oncol. 55:S22-27). La paciente 8 tuvo una reducción del 43 % en los valores de CA-125 (230 a 132) que empezó dos meses después de la infusión de anticuerpos. Esta respuesta no se mantuvo, pero una segunda infusión de 10D1 estabilizó los niveles de CA-125 durante dos meses. La paciente 9 tuvo una estabilización de los valores de CA-125 un mes tras la infusión de anticuerpos con una reducción concomitante en ascitis. La paciente 9 tuvo un aumento rápido de CA-125 antes de la infusión.

Se observaron bajos títulos de autoanticuerpos (anticuerpos antinucleares, anticuerpos anti-tiroglobulina, factor reumatoide) que persistieron durante 1-2 meses en cuatro pacientes. No hubo pruebas clínicas de enfermedad autoinmunitaria.

Todos los pacientes con melanoma desarrollaron una erupción cutánea reticular y eritematosa de grado I asintomática en el tronco y las extremidades entre tres días y tres semanas después de la infusión del anticuerpo. Siete pacientes tuvieron una biopsia de piel. Cinco de los siete pacientes sometidos a biopsia tuvieron infiltrados de linfocitos T perivasculares importantes en la dermis superficial que se extendieron a la epidermis. Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ se encontraron adosados a los melanocitos agonizantes. El vitiligo no fue clínicamente evidente. Se observó hipopigmentación focal leve de la retina en un paciente, pero no se afectó la agudeza visual. Una paciente con carcinoma de ovario desarrolló una erupción cutánea eritematosa en la cara y el tronco dos semanas después de la infusión. La biopsia de piel mostró infiltrados de linfocitos T perivasculares en la dermis superficial, pero no reactividad hacia melanocitos.

10D1 indujo aumentos significativos en neutrófilos en circulación, e infiltrados de neutrófilos se asociaron a necrosis tumoral.

Los resultados muestran que una única infusión del anticuerpo anti-CTLA-4 10D1 puede tener efectos antitumorales significativos y puede administrarse con seguridad a pacientes humanos. La generación de bajos títulos de autoanticuerpos muestra que la terapia puede comprometer, al menos parcialmente, la tolerancia sistémica, pero no

se observaron pruebas clínicas de enfermedad autoinmunitaria.

Ejemplo 5: Estudio de administración del anticuerpo anti-CTLA-4 10D1 conjuntamente con vacunas de péptidos a pacientes con melanoma

- 5 Catorce pacientes con melanoma en estadio IV progresivo recibieron anticuerpo anti-CTLA-4 10D1 conjuntamente con vacunación con dos péptidos gp100 restringidos por HLA-A*0201. Las características de los pacientes se resumen en la **Tabla 2**, a continuación.

TABLA 2

Paciente	Edad/sexo	Sitios de enfermedad	Terapia previa ¹	Nº de ciclos de tratamiento ²	Respuesta ³ (meses)	Toxicidad de grado I/II	Toxicidad de grado III/IV
1	52/M	Pulmón	I, S	2	RP (10+)		Enterocolitis, dermatitis
2	40/F	Ganglio linfático supraclavicular	Q, I, C	1	SR	Vitiligo	Dermatitis
3	39/M	Pulmón, mediastino, subcutáneo	C	6	SR (mixta)		
4	55/F	Piel, subcutáneo	I, C	1	SR	Infiltrados pulmonares	
5	67/M	Hígado, retroperitoneo, subcutáneo	Q, I, R, C	4	SR	AAN+ ⁴	
6	59/M	Pulmón, subcutáneo	I, C	4	SR	Vitiligo	
7	48/M	Pulmón, cerebro, suprarrenal, subcutáneo	Q, I, C	2	SR		
8	48/M	Pulmón, hígado, suprarrenal, mesenterio, subcutáneo	Q, I, C	2	SR		
9	53/M	Mediastino, mesenterio, piel	I, R, C	2	SR		
10	62/M	Pulmón, hilio	Q, I, C	2	SR (mixta)		
11	54/M	Pulmón, cerebro, subcutáneo	Q, C	5	RC (7+)		Hipofisitis
12	43/M	Subdiafragma, músculo, subcutáneo	I, C	3	SR	AAN+	Hepatitis
13	49/F	Pulmón, subcutáneo	Q, I, C	4	RP (6+)		Dermatitis
14	63/M	Pulmón, ganglio linfático pélvico	C	4	SR		

¹ Q = quimioterapia, I = inmunoterapia, R = radioterapia, C = cirugía.

² un ciclo de tratamiento consiste en una infusión del anticuerpo para CTLA-4 y una vacunación con péptidos gp 100:209-217(210M) y gp100:280-288(288V).

³ SR = sin respuesta, RP = respuesta parcial, RC = respuesta completa.

⁴ AAN = anticuerpo antinuclear.

Todos los pacientes eran HLA*0201⁺ con un estado de rendimiento de Karnofsky \geq 60 %. Seis pacientes tuvieron metástasis viscerales. Los pacientes no tuvieron pruebas de enfermedad autoinmunitaria o de inmunodeficiencia. Todos los pacientes tuvieron cirugía previa para su lesión primaria. Seis pacientes tuvieron quimioterapia previa. Once pacientes tuvieron inmunoterapia previa que incluyó interferón- α (pacientes 2, 5-8, 10, 12 y 13), IL-2 de baja dosis (pacientes 2, 5 y 13), IL-2 intravenosa de alta dosis (pacientes 4, 7 y 8), vacunas contra el melanoma de células completas (pacientes 1, 2 y 6), vacuna de péptido NY-ESO-1 (pacientes 4 y 5) y GM-CSF (paciente 9). Los pacientes no tuvieron inmunización con gp100 previa y no tuvieron terapia sistémica en las tres semanas antes del tratamiento.

Se administró un ciclo de tratamiento cada tres semanas, que consistió en anticuerpo anti-CTLA-4 10D1 a 3 mg/kg administrado intravenosamente durante 90 minutos seguido de 1 mg del péptido gp100:209-217(210M) (IMDQVPFSV) emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (IFA) inyectado subcutáneamente en una extremidad y 1 mg del péptido gp100:280-288(288V) (YLEPGPVTV) emulsionado en IFA inyectado subcutáneamente en una segunda extremidad (péptidos sintéticos proporcionados por the National Cancer Institute Cancer Therapy Evaluation Program). Los pacientes se sometieron a aféresis antes del tratamiento y tres semanas tras cada dos ciclos de tratamiento. Se aislaron células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) por separación Ficoll-Hypaque y se criopreservaron en suero AB humano inactivado por calor con 10 % de sulfóxido de dimetilo y se guardaron a -180°C hasta uso posterior. Los pacientes recibieron de 1 a 6 ciclos de tratamiento (**Tabla 2**).

La respuesta clínica se evaluó usando tomografía axial computarizada (CT) del pecho, abdomen y pelvis; y resonancia magnética nuclear (RMN) del cerebro. Estos estudios de obtención de imágenes se realizaron en el plazo de 4 semanas desde el inicio del tratamiento y luego después de cada dos ciclos de tratamiento. Se usaron estudios radiológicos adicionales según se necesitara para evaluar sitios de enfermedad. La suma de los diámetros más largos de los tumores en cada paciente (criterios RECIST de la Organización mundial de la salud) se calculó antes y después del tratamiento. Una respuesta parcial se definió como una disminución de al menos el 30 %, pero inferior al 100 %, en la suma de los diámetros más largos de todas las metástasis evaluables que duraron al menos un mes, y ningún tumor nuevo o aumento de tumor. Una respuesta completa se definió como una disminución del 100 % en la suma de los diámetros más largos de todas las metástasis evaluables que duraron al menos un mes, y ningún tumor nuevo. Una no respuesta se definió como respuesta que no fue una respuesta parcial o completa.

Los pacientes se evaluaron para respuestas autoinmunitarias. A los pacientes se les realizó un examen oftalmológico antes del tratamiento y tres meses tras el inicio del tratamiento. Todos los pacientes tuvieron análisis de sangre en suero negativos antes del inicio del estudio para tiroglobulina Ab, factor reumatoide y anticuerpo antinuclear. Anti-Ab humano (antiidiotípico) humano, tasa de sedimentación de eritrocitos, Ab antinuclear, hormona estimulante tiroidea y niveles de T4 libre se midieron cada tres semanas durante el estudio.

Las concentraciones en plasma de 10D1 se determinaron usando ELISA convencional con pocillos de microtitulación recubiertos con CTLA-4-Ig (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota). Las diluciones de muestras de sangre se incubaron sobre las placas. El Ab anti-CTLA-4 unido se detectó con sonda específica para anti-F(ab) de IgG humana de cabra marcada con fosfatasa alcalina, que se reveló con sustrato p-NPP.

Se usó un ensayo de sensibilización *in vitro* de doce días, que es más sensible que ELISPOT o ensayos de tetrámero, para evaluar la reactividad inmunológica en los once pacientes con PBMC disponibles para ser probados (Rosenberg, S.A. y col., Nat. Med. 1998; 4:321-327). PBMC criopreservadas se descongelaron y se cultivaron en medio basado en Iscove completo con 10 % de suero AB humano inactivado por calor con 1 μ M de péptido gp100:209-217 o gp100:280-288 nativo y 300 UI/ml de IL-2. Las células se recogieron 11 a 13 días después del inicio del cultivo y se co-incubaron con células tumorales o células T2 pulsadas con péptido durante la noche. La liberación de interferón- γ (IFN- γ) en el sobrenadante se midió usando ensayos de ELISA comerciales (Pierce-Endogen, Rockford, Illinois). Los once pacientes presentaron inmunización satisfactoria contra el péptido gp100:209-217 nativo después de uno a cuatro ciclos de tratamiento. Seis pacientes se inmunizaron satisfactoriamente contra el péptido gp100:280-288 nativo.

Los análisis de citometría de flujo se realizaron después del bloqueo de receptores de Fc y la tinción con anticuerpos (BD Biosciences, San Diego, California) o tetrámeros (Beckman Coulter Immunomics, San Diego, California). Se comparó la expresión del marcador de superficie sobre PBMC de nueve pacientes antes y después de dos ciclos de tratamiento. La expresión de HLA-DR (un marcador de activación) aumentó significativamente en células CD3⁺CD4⁺ (P=0,0004; prueba de la t para datos emparejados) y células CD3⁺CD4⁺ (supuestamente CD8⁺) (P=0,04) después de la terapia. Las células CD3⁺CD4⁺ también mostraron significativamente un aumento de la expresión de CD45RO (un marcador de células de memoria) después de la terapia (P=0,04). No cambió el porcentaje de poblaciones de células que expresaban CD69, CD25 y CTLA-4.

Los pacientes 1, 11 y 13 respondieron al tratamiento (**Tabla 15**). El paciente 1 tuvo una reducción de una lesión de pulmón solitaria después de dos ciclos de tratamiento. El paciente 13 tuvo una reducción de una lesión de pulmón solitaria y redisolución completa de una lesión subcutánea después de dos ciclos de tratamiento. El paciente 11 tuvo 31 lesiones de pulmón, dos lesiones subcutáneas y una lesión de cerebro. La lesión del cerebro creció de 0,5 cm a aproximadamente 1,0 cm después de dos ciclos de tratamiento. Tras tres ciclos de tratamiento adicionales, el

paciente 11 tuvo redisolución completa de todas las lesiones, incluyendo la lesión de cerebro.

El paciente 3 tuvo una respuesta mixta en la que varias lesiones de pulmón se redisolieron después de cuatro ciclos de tratamiento, pero aumentaron los ganglios linfáticos mediastínicos. El paciente 10 tuvo una reducción significativa de una lesión hilar y varias otras lesiones de pulmón después de dos ciclos de tratamiento, pero aumentaron otras lesiones de pulmón.

Los acontecimientos adversos de grado I/II incluyeron diarrea (pacientes 3, 5 y 14), erupción cutánea (paciente 14), infiltrados pulmonares y dolor de pecho pleurítico leve (paciente 4) y vitiligo (pacientes 2 y 6).

Seis pacientes desarrollaron siete acontecimientos adversos de grado III/IV que incluyeron dermatitis (pacientes 1, 2 y 13), colitis/enterocolitis (pacientes 1 y 9), hipofisitis (inflamación de la glándula pituitaria) (paciente 11) y hepatitis (paciente 12). Todos los pacientes se recuperaron tras la suspensión del tratamiento y la administración de cuidado de apoyo y/o terapia con esteroides. No hubo recaídas o posteriores acontecimientos autoinmunitarios.

Los análisis de sangre para el cribado autoinmunitario fueron normales, excepto para los pacientes 5 y 12 que desarrollaron Ab antinucleares.

Este estudio demostró pruebas objetivas de regresión de tumores de melanoma metastásicos en pacientes que recibieron anticuerpo anti-CTLA-4 10D1 conjuntamente con dos vacunas de péptido.

Ejemplo 6: Un ensayo clínico humano de fase I de MAb 10D1 en cáncer de próstata (MDXCTLA4-01)

MDXCTLA4-01 fue un estudio de etiqueta abierta del anticuerpo monoclonal anti-antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (anti-CTLA-4) 10D1 (MAb 10D1) en pacientes con cáncer de próstata metastásico progresivo resistente al tratamiento con hormonas. El tratamiento fue una dosis única de MAb 10D1 que se administró intravenosamente, como una infusión, a una dosificación de 3,0 mg/kg.

Los pacientes con diagnóstico histológico de adenocarcinoma primario de la próstata, y carcinoma metastásico progresivo de la próstata después de falta de andrógenos y al menos una manipulación no hormonal sistémica, se cribaron para la participación en este estudio. Los criterios de enrolamiento fueron: enfermedad medible progresiva, PSA progresiva, PSA >5 ng/ml, testosterona <50 ng/dl, supresión de andrógenos gonadales primarios, esperanza de vida >12 semanas y estado del rendimiento de Karnofsky \geq 60 %.

Debido a la importancia de la monitorización del estado inmunitario de pacientes en el ensayo y el objetivo específico de monitorizar efectos generalizados sobre la activación de linfocitos T por anticuerpo anti-CTLA-4, los criterios de entrada en este estudio incluyeron niveles mínimos de linfocitos T CD4 y CD8 de \geq 500/ml y \geq 500/ml, respectivamente. Sin embargo, durante la recogida inicial en el estudio se observó que los pacientes con cáncer de próstata tenían números de linfocitos T significativamente reducidos, aunque los linfocitos T CD4 y CD8 estaban claramente presentes. Muchos pacientes fueron inicialmente rechazados basándose en los anteriores criterios de entrada. Las cifras de linfocitos T reducidas aparentes observadas es una observación previamente no documentada en pacientes con cáncer de próstata que puede tener relevancia en tratamientos que impliquen la vacunación contra el cáncer en estos pacientes. Posterior a estas observaciones, los criterios de entrada se corrigieron para incluir pacientes que tenían cifras de CD4 y CD8 de \geq 300/ml y \geq 200/ml, respectivamente.

Los sujetos se sometieron a examen físico, ECG, radiografía del pecho, obtención de imágenes de diagnóstico y muestreo de sangre para evaluaciones hematológicas, bioquímicas y de la función inmunitaria. Se usaron entrevistas telefónicas mensuales hasta seis meses después del tratamiento para recoger y registrar información sobre un subconjunto de acontecimientos adversos, que incluyeron acontecimientos adversos autoinmunitarios después de la progresión de la enfermedad. Se monitorizaron PSA (disminución, duración de la disminución, progresión, tiempo hasta la progresión) y la respuesta a enfermedad (completa, parcial, estable, progresiva). Las concentraciones en plasma de MAb 10D1 se estuvieron evaluando inmediatamente antes de, durante y hasta dos meses después de la infusión.

Se enrolaron catorce pacientes con HRPC. La mediana de la edad fue 69 años (intervalo 56-79). Siete pacientes habían recibido quimioterapia previa. Todos los pacientes recibieron una dosis única de 3 mg/kg de 10D1 intravenosamente durante 90 minutos y luego fue seguido para toxicidad, farmacocinética, activación de linfocitos T en circulación y desenlace clínico. Todas las infusiones se completaron como se había planeado con sólo acontecimientos adversos (AE) leves relacionados con la infusión. Las erupciones cutáneas o prurito leves y reversibles respondieron a terapia con esteroides orales. Ningún otro AE de grado 3 o superior se relacionó con 10D1. El perfil farmacocinético se muestra en la **Figura 3**, que presenta la concentración en plasma en μ g/ml. La media +/- EEM se muestra para los 14 pacientes (n=14). Los resultados mostrados en la **Figura 3** demuestran que los niveles en plasma del anticuerpo fueron detectables durante hasta 3 meses y la monitorización adicional ha encontrado que los niveles en plasma pueden ser detectables durante incluso 4 meses. No hubo aumento significativo en linfocitos T periféricos activados, y no se observó autoinmunidad clínica. Dos de los 7 pacientes que fueron resistentes a la quimioterapia tuvieron una respuesta de PSA (criterios consenso) que duró 3 y 5 meses, uno con mejora sintomática. Otros pacientes experimentaron un cambio significativo en la pendiente de la curva para PSA. Los pacientes volvieron a tratarse con una segunda dosis de 10D1 (3 mg/kg) y, tras volver a tratarse, los

pacientes que respondieron previamente experimentaron de nuevo reducciones de PSA sin AE significativos. El tratamiento fue bien tolerado con claras pruebas de actividad inmunológica y antitumoral. Por tanto, estos estudios demuestran que pacientes humanos pueden tratarse con un anticuerpo anti-CTLA-4 de forma que los niveles en plasma del anticuerpo permanezcan por encima de niveles detectables durante 1, 2, 3 o incluso 4 meses sin efectos secundarios perjudiciales.

Las subpoblaciones de linfocitos en pacientes tratados con 10D1 se analizaron por citometría de flujo en diversos momentos de tiempo después del tratamiento con anticuerpo. Los resultados se resumen a continuación en la **Tabla 3** (los datos se presenta como media +/- EEM).

Tabla 3: Análisis de citometría de flujo de subpoblaciones de linfocitos en sujetos con cáncer de próstata tratados con 3,0 mg/kg de MAb 10D1.

Subpoblación	Referencia	24 horas	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
CD3	71,7 ± 3,45	75,6 ± 3,53	77,6 ± 2,45	78,5 ± 2,49	75,6 ± 2,42	76,0 ± 2,70
CD4	40,3 ± 3,49	38,7 ± 3,36	44,0 ± 3,20	38,7 ± 3,36	42,9 ± 2,98	44,5 ± 3,05
CD8	30,5 ± 3,91	35,6 ± 4,54	32,6 ± 4,43	30,8 ± 4,14	31,5 ± 4,28	30,7 ± 4,32
CD19	7,6 ± 1,24	5,7 ± 1,27	6,4 ± 1,24	6,2 ± 0,98	6,7 ± 1,27	6,8 ± 1,15
CD4 + CD25	69,2 ± 3,47	65,0 ± 3,38	66,0 ± 3,28	63,7 ± 3,09	65,6 ± 2,97	64,5 ± 3,25
CD8 + CD25	14,0 ± 2,54	11,2 ± 1,56	13,8 ± 2,91	15,4 ± 2,56	14,3 ± 2,68	15,5 ± 2,92
CD4 + HLA-DR	11,3 ± 2,78	11,4 ± 3,12	14,2 ± 2,49	17,1 ± 3,33	17,3 ± 3,32	17,4 ± 3,81
CD8 + HLA-DR	20,4 ± 3,44	21,5 ± 3,64	19,8 ± 3,87	20,6 ± 4,28	21,8 ± 3,82	20,7 ± 4,66
CD4 + 45RO	68,0 ± 4,98	72,4 ± 4,37	76,1 ± 4,19	76,0 ± 3,58	76,8 ± 3,93	76,9 ± 4,10
CD8 + 45RO	41,9 ± 6,00	44,8 ± 5,83	48,7 ± 6,04	48,4 ± 5,20	50,7 ± 5,64	50,7 ± 5,43

Los resultados demuestran que el tratamiento con 10D1 condujo a un aumento de aproximadamente el 50 % en la subpoblación de CD4/HLA-DR+ con el tiempo. Las otras subpoblaciones de linfocitos permanecieron esencialmente constantes con el tiempo.

Con el fin de evaluar si la administración de MAb 10D1 puede inducir activación de linfocitos T no específica no deseable, los linfocitos de la sangre periférica de los sujetos con cáncer de próstata se analizaron por citometría de flujo para cada uno de los siguientes marcadores: CD4, CD8, CD25, CD44, CD69 y HLA-DR. No se observó cambio significativo en la frecuencia de ninguno de estos marcadores durante la evolución del tratamiento para cada uno de los sujetos con cáncer de próstata tratados hasta aquí. Un ejemplo de este análisis se muestra en la **Tabla 4**, que muestra la frecuencia de células positivas para CD4, CD25, CD69 y células positivas para CD8, CD25, CD69 en momentos antes de, durante y posterior a la administración de MAb 10D1 en dos de los sujetos. Estos datos demuestran que MAb 10D1 no produce activación de linfocitos T no específica.

Tabla 4. Análisis de citometría de flujo de marcadores de activación de linfocitos T en sujetos con cáncer de próstata tratados con 3,0 mg/kg de MAb 10D1.

Número de paciente	Momento	% de CD(4+25+69)	% de CD(8+25+69)
3	Cribado	1,7	0,8
3	-30 min (antes de la infusión)	2,6	0,8
3	40 min	2,5	0,7
3	130 min	1,9	0,9
3	145 min	1,7	0,5

(continuación)

Número de paciente	Momento	% de CD(4+25+69)	% de CD(8+25+69)
3	160 min	1,7	1
3	190 min	1,5	1,5
3	250 min	2,1	1,2
3	370 min	1,3	0,9
3	24 h	1,6	1,6
3	48 h	2,7	3
3	72 h	0,9	0,5
3	Día 7	0,9	0,1
3	Día 14	0,4	0,5
3	Día 21	2,3	1,9
4	Cribado	1,4	0,8
4	-30 min (antes de la infusión)	0,5	0,3
4	40 min	0,3	0,1
4	130 min	0,3	0,1
4	145 min	0,4	0,2
4	160 min	0,2	0,2
4	190 min	0,8	0,3
4	250 min	0,1	0
4	370 min	0,3	0,1
4	24 h	0,2	0,3
4	48 h	0,4	0,6
4	72 h	0,8	0,3
4	Día 7	1	0,7
4	Día 14	1,1	0,8

5 Los resultados del ensayo clínico MDXCTLA4-01 han demostrado que las infusiones son tolerables con sólo reacciones menores. Se observó semivida en plasma prolongada del anticuerpo, permaneciendo el anticuerpo en el plasma durante aproximadamente 3 a 4 meses. Se observaron claras muestras de efectos inmunitarios sin activación de linfocitos T no específica significativa. Se han observado alivio sintomático y reducciones en los niveles de antígeno específico de la próstata (PSA) en pacientes con cáncer de próstata tratados con el anticuerpo anti-CTLA-4. Resultados representativos para las reducciones en los niveles de PSA se muestran en la **Figura 4**, que muestra niveles de PSA (en ng/ml) en dos pacientes (uno representado por círculos cerrados, el otro por círculos abiertos) en diversos momentos de tiempo después de la infusión de 3 mg/kg de anticuerpo anti-CTLA-4 en el día 0. Los resultados demuestran que los niveles de PSA disminuyeron después de la infusión del anticuerpo y permanecieron suprimidos durante aproximadamente 3-4 meses después del tratamiento, guardando relación con la presencia del anticuerpo anti-CTLA-4 en el plasma. También se observaron algunos otros efectos inmunitarios menores que incluyeron erupción cutánea inmunomediada y prurito, seroconversión transitoria a autoanticuerpos

10

positivos, cambios del pigmento melanina en pacientes con melanoma y reacciones inflamatorias en sitios tumorales. Excepto la erupción cutánea y el prurito, todos los efectos inmunitarios posiblemente adversos fueron subclínicos. En resumen, los resultados en curso de ensayos clínicos humanos con tratamiento con anticuerpo anti-CTLA-4 demuestran que el anticuerpo es bien tolerado y estimula efectos inmunitarios en receptores.

5 **Referencias citadas**

Numerosas referencias, que incluyen patentes, solicitudes de patente y diversas publicaciones, se citan y se tratan en la descripción de la presente invención. La cita y/o discusión de tales referencias se proporciona únicamente para aclarar la descripción de la presente invención y no es una admisión de que una referencia tal sea “técnica anterior” a la invención descrita en este documento.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo anti-CTLA-4 humano para su uso en el tratamiento de un cáncer en un paciente humano, en el que el paciente, antes de la administración del anticuerpo, ha sido tratado con cirugía de manipulación del tumor, quimioterapia o radiación y ha desarrollado una respuesta inmunitaria al cáncer, en el que el anticuerpo es para reforzar la respuesta inmunitaria del paciente y en el que el anticuerpo es para ser administrado al paciente de forma que la concentración en plasma del anticuerpo anti-CTLA-4 sea al menos de 2 µg/ml durante más de cuatro meses.
- 10 2. Un anticuerpo anti-CTLA-4 humano para su uso en el tratamiento de un cáncer en un paciente humano, en el que el paciente, antes de la administración del anticuerpo, ha sido tratado con un vacuna contra el cáncer y ha desarrollado una respuesta inmunitaria al cáncer, en el que el anticuerpo es para reforzar la respuesta inmunitaria del paciente y en el que el anticuerpo es para ser administrado al paciente de forma que la concentración en plasma del anticuerpo anti-CTLA-4 sea al menos de 2 µg/ml durante más de cuatro meses.
3. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo es para ser administrado al paciente múltiples veces.
- 15 4. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo es para ser administrado al paciente en una dosis única.
5. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que la administración del anticuerpo no produce efectos secundarios perjudiciales.
- 20 6. El anticuerpo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el efecto de la cantidad y el intervalo de administración del anticuerpo es que la concentración en plasma del anticuerpo anti-CTLA-4 en el paciente es al menos de 5 µg/ml durante más de cuatro meses.
7. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 6, en el que el efecto de la cantidad y el intervalo de administración del anticuerpo es que la concentración en plasma del anticuerpo anti-CTLA-4 en el paciente es al menos de 10 µg/ml durante más de cuatro meses.
8. El anticuerpo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el cáncer es un melanoma.
- 25 9. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en el que el paciente está inmunodeprimido.
10. El anticuerpo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID n°: 1 y una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID n°:2.

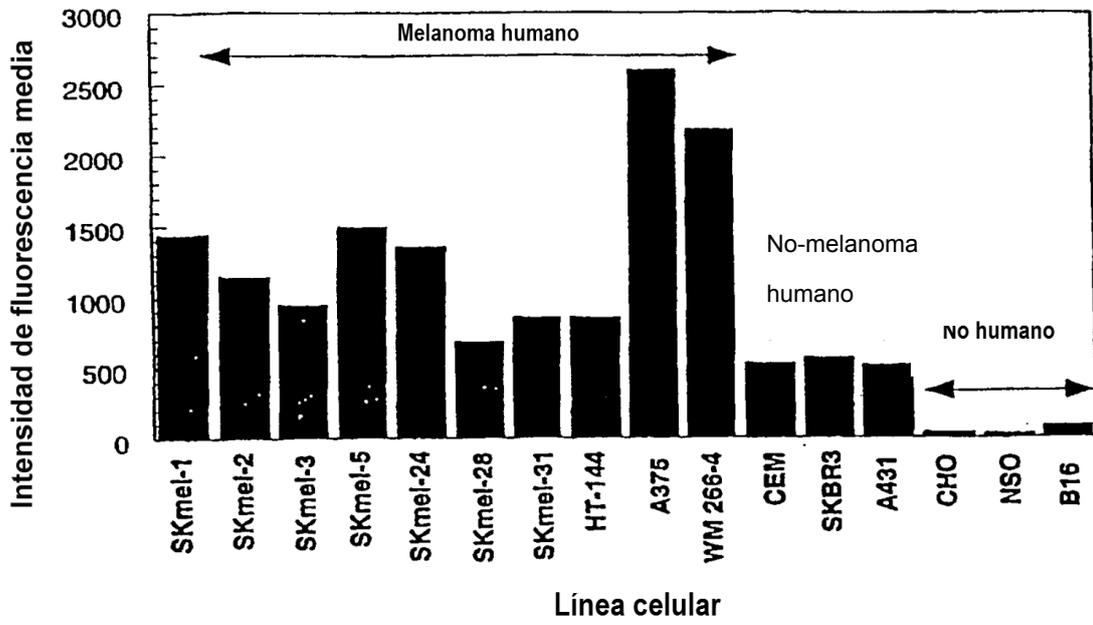


Figura 1

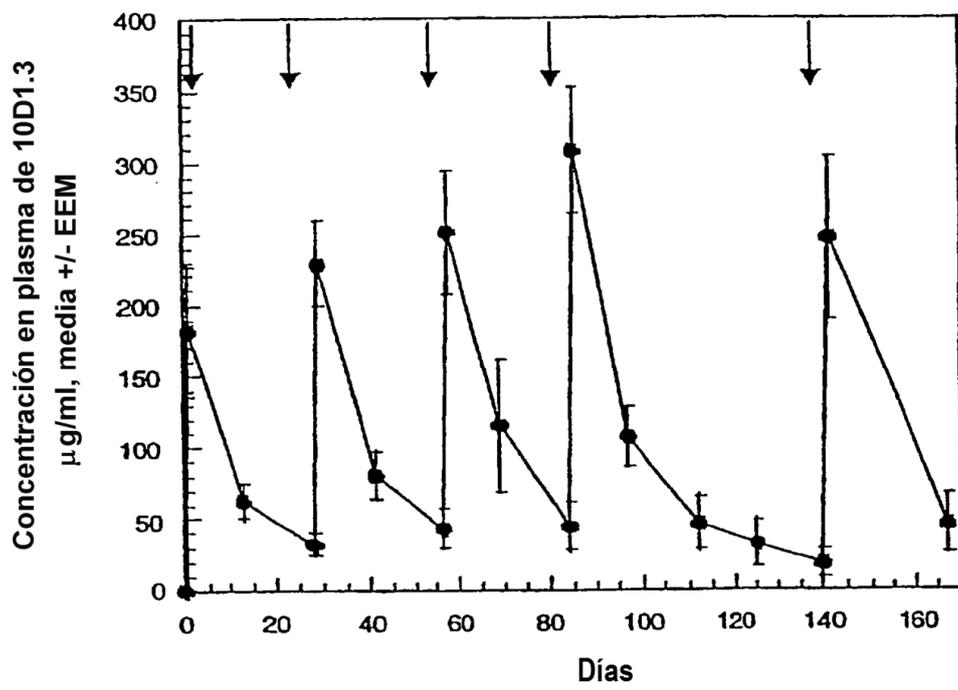


Figura 2

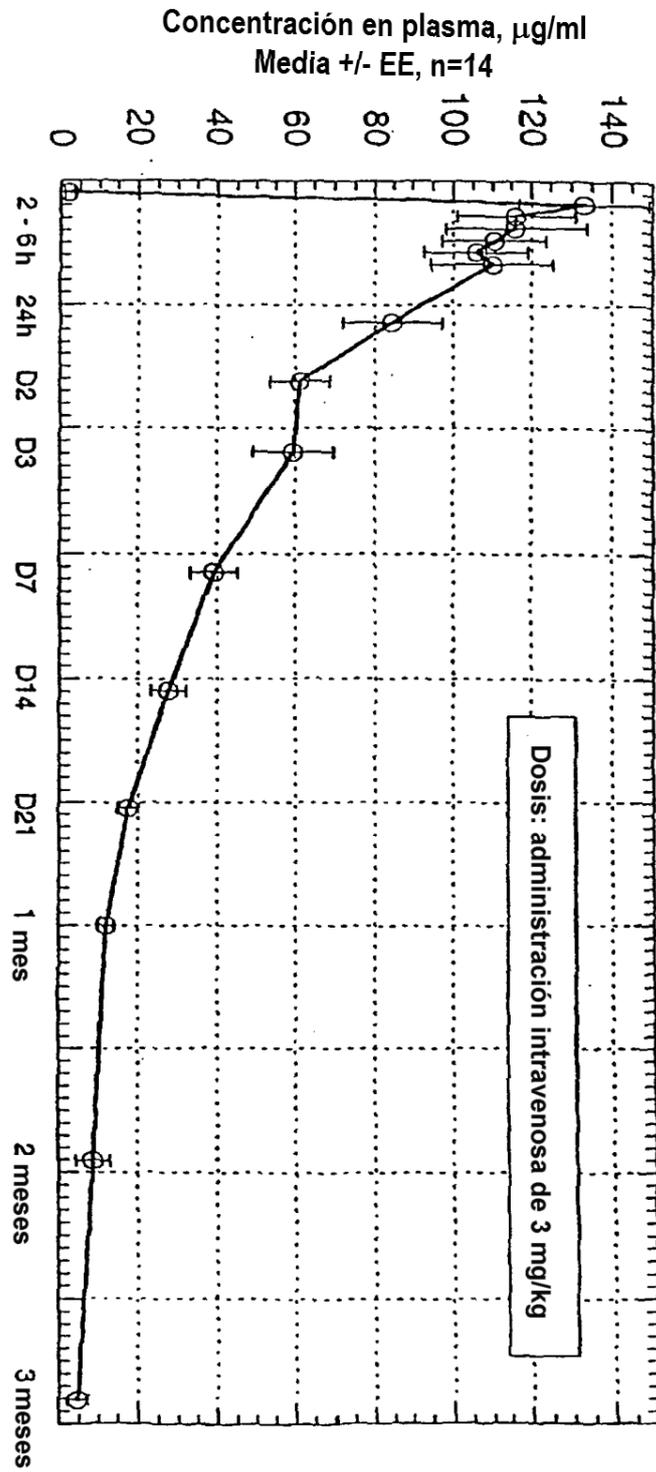


FIGURA 3

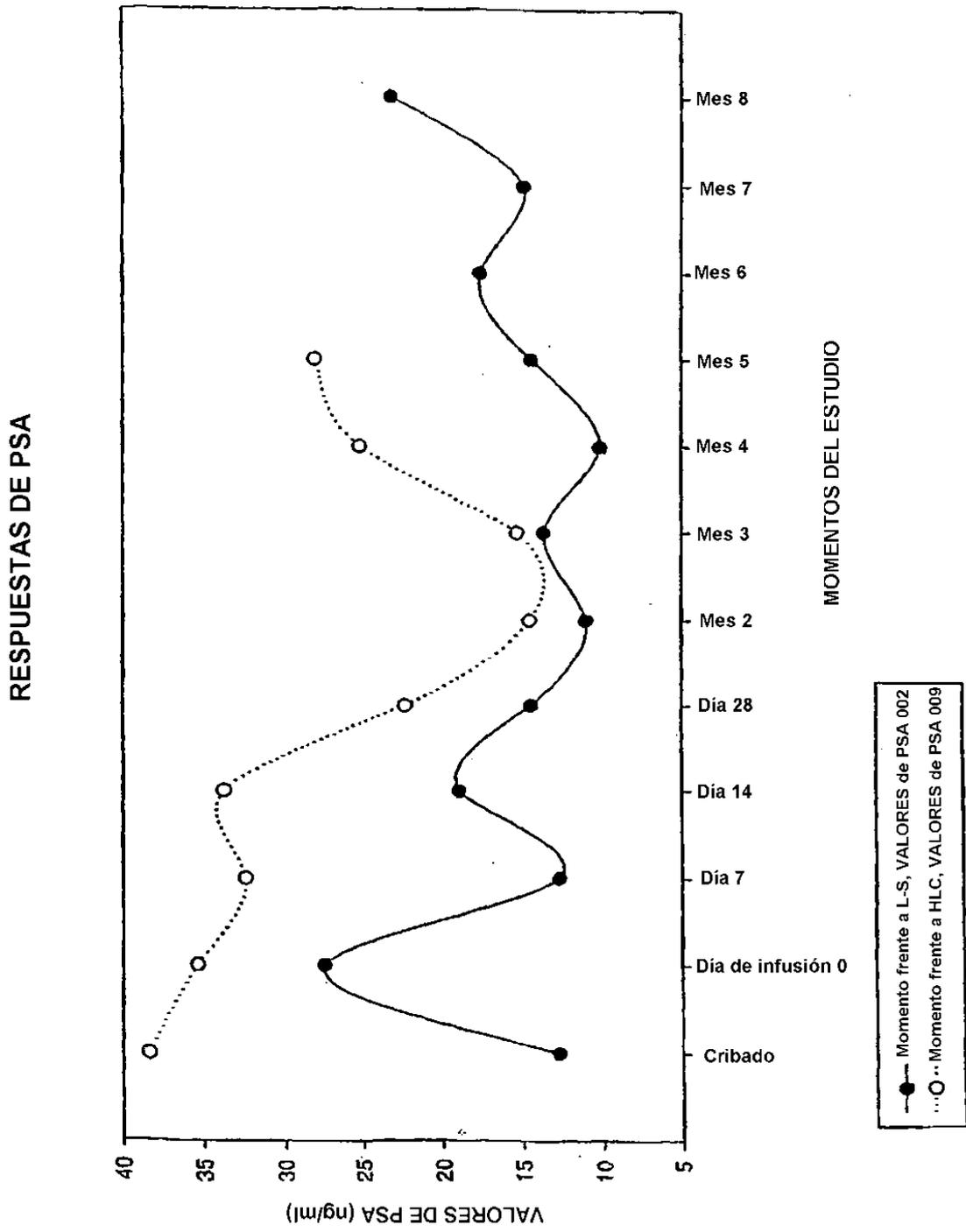


Figura 4