

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 721**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2007 E 07852826 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 2083858**

54 Título: **Terapias inmunitarias humanas que usan un agonista de CD27 solo o en combinación con otros inmunomoduladores**

30 Prioridad:

20.10.2006 GB 0620894

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

30.01.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF SOUTHAMPTON (100.0%)
UNIVERSITY ROAD
HIGHFIELD SO17 1BJ, GB**

72 Inventor/es:

**GLENNIE, MARTIN JOHN;
TUTT, ALISON LOUISE y
AL-SHAMKHANI, AYMEN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 440 721 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

Terapias inmunitarias humanas que usan un agonista de CD27 solo o en combinación con otros inmunomoduladores

5

Campo de la invención

La invención se refiere en general al uso de un agonista de CD27, preferentemente un anticuerpo agonista de CD27, como un adyuvante para promover la inmunidad de linfocitos T en el sujeto que lo necesite, por ejemplo, un sujeto con cáncer, infección, enfermedad autoinmunitaria, alergia o trastorno inflamatorio o un sujeto al que se administra una vacuna. Más preferentemente el agonista de CD27 será un anticuerpo intacto humano, humanizado o quimérico o un fragmento del mismo o puede comprender un anticuerpo monocatenario tal como scFv que se une específicamente a CD27 humano. Como alternativa, el agonista puede comprender un anticuerpo modificado por ingeniería genética que se ha modificado para potenciar o reducir sus interacciones con sistemas efectores del hospedador o para reducir los efectos secundarios adversos. En algunas realizaciones preferidas, la unión de estos anticuerpos agonistas anti CD27 con células inmunitarias no se bloqueará por CD70 o ligandos relacionados.

10

15

Adicionalmente, la divulgación proporciona nuevas combinaciones adyuvantes, preferentemente combinaciones sinérgicas, para inducir una respuesta inmunitaria de linfocitos T potenciada en un sujeto que lo necesite que comprenden (i) al menos un agonista de CD27 y (ii) otro inmunoestimulante o inmunomodulador, por ejemplo un anticuerpo de CD40, anticuerpo de CD28, anticuerpo de OX40, anticuerpo de 4-1BB, anti CTLA-4, agonista de TLR (receptor de tipo toll) o un resto que agote los linfocitos T reguladores, o una citocina tal como una interleucina, por ejemplo, IL-2 o un interferón (beta, beta, gamma, etc.). De forma similar, estas combinaciones de adyuvantes son útiles en el tratamiento de afecciones en las que se desea terapéuticamente inmunidad de linfocitos T potenciada tales como cáncer, enfermedades infecciosas, alergia, autoinmunidad, trastornos inflamatorios y para potenciar la eficacia de vacunas.

20

25

Las monoterapias objeto que implican la administración de un agonista de CD27, preferentemente un anticuerpo agonista de CD27 cuya unión con células inmunitarias preferentemente no está bloqueada por CD70 y terapias de combinación que implican la administración de un agonista de CD27 y otro resto tal como otro inmunomodulador o agente terapéutico son útiles en la potenciación de la inmunidad de CTL y proliferación de linfocitos T y supervivencia *in vivo*. Como se analiza en más detalle posteriormente, la presente invención se basa al menos en parte en la sorprendente observación de los inventores de que se requieren interacciones CD27:CD70 para la actividad agonista de anticuerpos de CD40 (el mAb anti CD70 bloquea completamente la actividad del CD40 agonista lo que muestra que se requieren interacciones CD27:CD70 "corriente abajo" del desencadenamiento de CD40). Esta observación sugirió el potencial terapéutico de los anticuerpos agonistas de CD27 como adyuvantes terapéuticos y para activar e inducir la expansión de linfocitos T específicos de antígeno, particularmente linfocitos T CD8+, es decir, células efectoras y de memoria CD8+ efectoras. Aunque los solicitantes no desean quedar ligados por sus hipótesis, plantean la teoría de que la propiedad agonista de los anticuerpos anti CD27 objeto en linfocitos T puede ser atribuible, al menos en parte, al hecho de que la unión de dichos anticuerpos puede no estar bloqueada por CD70. Sin embargo, la invención no se limita a lo mismo y abarca el uso de cualquier anticuerpo agonista anti CD27 o conjugado o fragmento del mismo que tenga un efecto agonista en la inmunidad de linfocitos T. Como se describe en detalle posteriormente, las presentes monoterapias y terapias de combinación son especialmente útiles en el tratamiento de seres humanos u otros mamíferos con linfomas y otros cánceres o afecciones infecciosas en las que sean terapéuticamente deseables respuestas inmunitarias de CTL específicas de antígeno potenciadas.

30

35

40

45

Como se ha observado el agonista de CD27 puede administrarse solo o junto con otros restos terapéuticos tales como otros adyuvantes inmunitarios o inmunoestimuladores o inmunomoduladores, con o sin un antígeno adecuado, tal como un péptido de cáncer. Por ejemplo, en una realización el agonista de CD27 puede administrarse en asociación con un anticuerpo agonista de CD40. En esta realización de la invención el agonista de CD40 puede comprender un anticuerpo quimérico agonista anti CD40 humano denominado en el presente documento LOB 7/4 o una variante humanizada del mismo. Se ha demostrado por los inventores que este anticuerpo quimérico induce efectos antitumorales potentes en una serie de tumores que expresan CD40 y que potencia la inmunidad celular. Basándose en estos resultados el uso de este anticuerpo quimérico y variantes del mismo, por ejemplo, versiones humanas o humanizadas del mismo como un adyuvante inmunitario o producto terapéutico para tratar diversas enfermedades crónicas incluyendo cánceres (positivos y negativos para CD40), especialmente tumores sólidos así como su uso como un adyuvante inmunitario para tratar enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades alérgicas e inflamatorias se enseñan en una solicitud de patente anterior por algunos de los inventores del presente documento.

50

55

60

En realizaciones preferidas de la invención el agonista de CD27 objeto es un anticuerpo que se usa para tratar cáncer, enfermedades infecciosas, trastornos autoinmunitarios, trastornos alérgicos o trastornos inflamatorios solo o con un antígeno, o se administra junto con una vacuna u otros agentes terapéuticos o inmunoterapéuticos, por ejemplo, un anticuerpo para CD40, OX40, CD28, CTLA-4 o 4-1BB; un agonista de TLR; un resto que agota los linfocitos T reguladores; una citocina; un agente antiangiogénesis; o un producto quimioterapéutico. A lo largo de la presente solicitud cuando se mencionan terapias de combinación, debería entenderse que los restos respectivos

65

tales como anticuerpos agonistas pueden administrarse por separado o en combinación, por ejemplo en la misma o diferentes composiciones, y puede efectuarse administración de los restos respectivos en cualquier orden. Además, se pretende que estas terapias de combinación y monoterapias abarquen la administración de restos adicionales útiles en el tratamiento de la enfermedad o afección particular.

5

Antecedentes de la invención

Se reconoce ahora ampliamente que la generación de inmunidad protectora depende no solamente de la exposición al antígeno, sino también del contexto en el que se encuentra el antígeno. Existen numerosos ejemplos en los que la introducción de un nuevo antígeno en un hospedador en un contexto no inflamatorio genera tolerancia inmunológica en lugar de inmunidad a largo plazo mientras que la exposición al antígeno en presencia de un agente inflamatorio (adyuvante) induce inmunidad (Mondino *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 93: 2245 (1996); Pulendran *et al.*, J. Exp. Med. 188: 2075 (1998); Jenkins *et al.*, Immunity 1: 443 (1994); y Kearney *et al.*, Immunity 1: 327 (1994)). Puesto que puede significar la diferencia entre la tolerancia y la inmunidad, se ha puesto mucho esfuerzo en descubrir los "adyuvantes" presentes dentro de agentes infecciosos que estimulan las rutas moleculares implicadas en la creación del contexto inmunogénico apropiado de la presentación de antígenos.

El CD27 es un miembro de la superfamilia del receptor de factor de necrosis tumoral (TNFR) que también incluye TNFR tipo I y II (CD120a y b), receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR), CD30, Fas/Apo-1 (CD95), CD40, 4-1BB y OX40. Se sabe que estas proteínas desempeñan papeles clave en el crecimiento, supervivencia y diferenciación celular así como apoptosis o muerte celular programada. La homología entre estos miembros de la familia se restringe a la región extracelular y se caracteriza por la presencia de un motivo de nudo de cisteína que aparece tres veces en CD27 (McDonald *et al.*, Cell 73: 4121-424 (1993)).

CD27 es una proteína transmembrana glicosilada de tipo I de aproximadamente 55 kilodalton y existe como homodímeros con un enlace disulfuro que une los dos monómeros. El enlace disulfuro está en el dominio extracelular cerca de la membrana (Camerini *et al.*, J Immunol. 147: 3165-69 (1991)). El ligando para CD27, CD70, pertenece a la familia de ligandos de TNF. CD70 es una proteína transmembrana de tipo II con un peso molecular aparente de 50 kd (Goodwin *et al.*, Cell 73: 447-456 (1993)). Basándose en la homología con TNF alfa y beta, se predijo que CD70 tendría una estructura trimérica compuesta de tres subunidades idénticas que interaccionan con tres homodímeros de CD27 (Peitsch *et al.*, Mol. Immunol. 152: 1756-1761 (1994)). TNF alfa que también es una proteína transmembrana de tipo II, se libera de la célula por escisión proteolítica, mientras que TNF beta y NGF se secretan.

CD27 y su ligando CD70 se expresan en poblaciones discretas de linfocitos T y B. CD27 se expresa en linfocitos T en reposo y CD70 en linfocitos T y B activados y células dendríticas. Dentro de los subconjuntos de linfocitos T, CD27 se expresa de forma estable en células CD45RA+ incluso después de la activación, mientras que en células CD45RO+ se expresa débilmente y se pierde después de la activación (Sugita *et al.*, J Immunol. 149: 3208-3216 (1992); Hintzen *et al.*, J Immunol. 151: 2426-2435 (1993)). En células CD45RA+, la activación por diversos medios da como resultado la regulación positiva de la expresión de CD27 (Hintzen *et al.*, J Immunol. 151: 2426-2435 (1993)). CD27 se expresa en alta cantidad en la mayoría de los linfomas de linfocitos B no de Hodgkin y leucemias linfocíticas crónicas de linfocitos B (Ranheim *et al.*, Blood 85: 3556-3565). Las líneas de linfocitos B Ramos y Raji, también expresan niveles significativos de CD27 y CD70.

También se sabe que el ligamiento de CD27 junto con el tratamiento de linfocitos T con dosis subóptima de anticuerpos de PMA, PHA, anti CD2 o anti CD3 da como resultado la proliferación de linfocitos T, definiendo de este modo un papel coestimulador para CD27. También se ha indicado que los efectos coestimuladores mediados por CD27 pueden inhibirse específicamente usando un anticuerpo anti CD27 o CD27 soluble recombinante o anticuerpo anti CD70 y que el ligamiento de CD27 por su ligando, CD70, puede generar linfocitos T citolíticos (Goodwin *et al.*, Cell 73: 447-456 (1993)).

Otra molécula coestimuladora que se sabe que regula la inmunidad adaptativa es CD40. CD40 es un miembro de la superfamilia del receptor TNF y es esencial para un espectro de respuestas inmunitarias mediadas por células y se requiere para el desarrollo de inmunidad humoral dependiente de linfocitos T (Aruffo *et al.*, Cell 72: 291 (1993); Farrington *et al.*, Proc Natl Acad Sci., USA 91: 1099 (1994); Renshaw *et al.*, J Exp Med 180: 1889 (1994)). En su estado natural, el ligando CD40 expresado en linfocitos T CD4+ interacciona con CD40 expresado en linfocitos B o DC, promoviendo el aumento de la activación del APC y, conjuntamente, la activación adicional de los linfocitos T (Liu *et al.* Semin Immunol 9: 235 (1994); Bishop *et al.*, Cytokine Growth Factor Rev 14: 297 (2003)). Para las DC, el ligamiento de CD40 conduce clásicamente a una respuesta similar a la estimulación mediante TLR tal como regulación positiva de marcadores de activación y producción de citocinas inflamatorias (Quezada *et al.* Annu Rev Immunol 22: 307 (2004); O'Sullivan B y Thomas R Crit Rev Immunol 22: 83 (2003)). Su importancia en las respuestas de CD8 se demostró por estudios que muestran que la estimulación de APC mediante CD40 rescataba respuestas de linfocitos T CD8+ dependientes de CD4 en ausencia de células CD4 (Lefrancois *et al.*, J Immunol. 164: 725 (2000); Bennett *et al.*, Nature 393: 478 (1998); Ridge *et al.*, Nature 393: 474 (1998); Schoenberger *et al.*, Nature 393: 474 (1998)). Este hallazgo originó muchas especulaciones de que los agonistas de CD40 por sí solos podrían rescatar potencialmente respuestas de linfocitos T CD8+ en decadencia en algunas situaciones de

enfermedad (French *et al.*, Nature Medicine 1999).

Hirano *et al.*, Immunology Letters, 89(2-3): 251-257 (2003) muestran la actividad sinérgica de un anticuerpo agonista anti CD27 con un anti CD40 para inducir las respuestas de anticuerpos en linfocitos B en presencia de IL-2 e IL-10.

Otros estudios, sin embargo, han demostrado que la estimulación con CD40 solamente promueve insuficientemente la inmunidad a largo plazo. En algunos sistemas modelo, el tratamiento con anti CD40 solamente promovió insuficientemente la inmunidad a largo plazo, es decir, produce producción de citocinas inflamatorias ineficaz, así como la deleción de linfocitos T específicos de antígeno (Mauri *et al.* Nat Med 6: 673 (2001); Kedl *et al.* Proc Natl Acad Sci., USA 98: 10811 (2001)) y la terminación de respuestas de linfocitos B (Erickson *et al.*, J Clin Invest 109: 613 (2002)). Además, se ha usado ligando CD40 trimerizado soluble en la clínica como un agonista para la ruta de CD40 y lo poco que se ha indicado es coherente con la conclusión de que la estimulación de CD40 solamente no consigue reconstituir todas las señales necesarias para inmunidad de linfocitos T CD8+ a largo plazo (Vonderheide *et al.*, J Clin Oncol 19: 3280 (2001)).

Se ha sugerido que los anticuerpos tanto antagonistas como agonistas específicos de CD40 tienen potencial como productos terapéuticos humanos. Los anticuerpos antagonistas anti CD40 incluyen los que (1) bloquean la interacción CD40/CD40L en al menos 90% y tienen supuestas propiedades antineoplásicas (Armitage *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5674492; Fanslow *et al.*, 1995, Leukocyte Typing V Schlossman *et al.*, eds., 1: 555-556); (2) los que antagonizan la señalización mediante CD40 (deBoer *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5677165) y (3) los que suministran una señal estimuladora mediante CD40 pero no aumentan la interacción entre CD40 y CD40L, por ejemplo, G28-5, (Ledbetter *et al.*, Patente de Estados Unidos N° 5182368; documento PCT WO 96/18413).

Se han presentado anticuerpos agonistas anti CD40 por varios grupos. Por ejemplo, se ha indicado que un mAAb, CD40.4 (5C3) (PharMingen, San Diego, California) aumenta la interacción entre CD40 y CD40L en aproximadamente 30-40% (Schlossman *et al.*, eds., Leukocyte Typing, 1995, 1: 547-556). Adicionalmente, Seattle Genetics en la Patente de Estados Unidos N° 6843989 alegan proporcionar métodos para tratar cáncer en seres humanos usando anticuerpos anti CD40 humano. Se alega que estos anticuerpos suministran una señal estimuladora, potencian la interacción entre CD40 y CD40L en al menos el 45% y potencian la estimulación mediada por CD40L y poseen actividad neoplásica *in vivo*. El anticuerpo ejemplificado desvelado en la patente de Seattle Genetics derivó de S2C6, un anticuerpo agonista anti CD40 humano que se ha mostrado previamente que suministra fuertes señales promotoras del crecimiento a linfocitos B (Paulie *et al.*, 1989, J Immunol. 142: 590-595).

Sin embargo, a pesar de estos informes previos, se necesitan métodos y terapias humanas mejorados que usen adyuvantes que promuevan la inmunidad de Th1 y que potencien la activación y expansión de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno, es decir, linfocitos CD8+ efectoros y de memoria. Particularmente, se necesitan métodos mejorados para tratar cáncer humano y otras enfermedades usando adyuvantes terapéuticos que sean seguros y eficaces, es decir, que no induzcan efectos secundarios indeseados pero que induzcan efectos terapéuticos sustanciales, por ejemplo, efectos antitumorales. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona también otras ventajas.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona nuevos métodos para el tratamiento de seres humanos usando un anticuerpo agonista de CD27 solo o junto con otro agente terapéutico, por ejemplo, otro agente inmunoestimulante o inmunomodulador tal como un anticuerpo agonista de CD40, CD40L soluble, un agonista de 4-1BB:4-1BBL, un agonista de OX40, agonista de TLR, un resto que agote los linfocitos T reguladores, o una citocina tal como una interleucina o un interferón. Como se ha observado anteriormente en realizaciones preferidas la unión de estos anticuerpos agonistas de CD27 con células inmunitarias no se bloqueará por CD70 ya que esto puede tener un efecto beneficioso en la actividad agonista de estos anticuerpos en linfocitos T. Estas combinaciones normalmente se emplearían junto con una vacuna en forma de proteína, péptidos, células inmunogénicas o ADN. Los resultados posteriores muestran que el bloqueo de la coestimulación de CD27 tiene un efecto profundo en la inmunidad antitumoral inducida por un anticuerpo agonista anti CD40 muchos más que el bloqueo de la coestimulación de 4-1BB, y que este es aparentemente el resultado de un deterioro grave de la expansión de linfocitos T CD8+ durante el bloqueo de CD27-CD70. Estos resultados sugieren que pueden usarse agonistas de CD27, por ejemplo, anticuerpos agonistas anti CD27, como adyuvantes terapéuticos para promover la expansión de linfocitos T CD8+ y en el tratamiento de afecciones en las que esto sea terapéuticamente deseable, tales como cáncer, trastornos infecciosos, autoinmunidad, trastornos alérgicos y trastornos inflamatorios. Además, se sugiere que un agonista de CD27, por ejemplo, un anticuerpo agonista de CD27 puede administrarse en asociación con un antígeno o vacuna para promover la inmunidad de linfocitos T CD8+ específica de antígeno. En una realización especialmente preferida se usará el agonista de CD27 para tratar un cáncer tal como un linfoma u otros cánceres identificados posteriormente.

Aunque el mecanismo por el que los anticuerpos monoclonales anti CD40 generan respuestas inmunitarias contra tumores en seres humanos o roedores no se entiende completamente, parece actuar mediante la estimulación de células dendríticas a un nivel que refuerza las respuestas de CTL y evita la necesidad de células auxiliares CD40. Se muestra en la presente memoria que el anticuerpo monoclonal agonista de CD40 promueve la expresión fuerte

de 4-1BB en las células CD8 en expansión, junto con una pérdida modesta de CD27 a medida que se generan CTL efectoras. Resulta interesante que mientras que el tratamiento con mAb de CD40 provocó una activación profunda de las células dendríticas en ratones portadores de tumores, la expresión de 4-1BBL y CD70, los ligandos respectivos para 4-1BB y CD27, era relativamente débil y transitoria. A pesar de esta falta de expresión su implicación se estableció mostrando que el mAb (AT113-2:anti-4-1BBL y TAN1-6:anti-CD70), que bloqueaba la interacción de CD70, bloquea la eficacia terapéutica del tratamiento con mAb de CD40. De forma similar no tenían influencia en la actividad citotóxica de células CTL específicas de tumor ni *in vitro* ni *in vivo*. Basándose en esto, los presentes inventores concluyeron que las interacciones 4-1BB:4-1BBL y particularmente CD27:CD70 son claves para explicar la actividad de los anticuerpos agonistas de CD40 y que estos anticuerpos actúan desencadenando proliferación y supervivencia de linfocitos T CD8. Además, los inventores muestran por primera vez en el presente documento que un anticuerpo agonista anti CD27 es altamente eficaz por sí solo en la protección de ratones portadores de linfoma (A31 y BCL1) lo que indica que pueden generarse CTL en un estadio posterior que DC y que pueden usarse anticuerpos agonistas de CD27 para tratar cáncer y otras enfermedades en las que sea necesaria inmunidad celular potenciada. Resulta importante que este mAb anti-CD27 no protegía ratones SCID inmunocomprometidos de estos mismos tumores, subrayando la necesidad de un sistema inmunitario funcional (linfocitos T CD8) para proporcionar esta protección.

Por lo tanto, la presente invención proporciona nuevas terapias de combinación y monoterapias para promover la inmunidad de linfocitos T en un sujeto que lo necesite, por ejemplo, un sujeto con linfoma que comprende la administración de al menos un anticuerpo agonista de CD27 y opcionalmente otro resto tal como un agonista de CD40. Como se ha observado anteriormente, si se utiliza un agonista de CD40 en asociación con el anticuerpo agonista de CD27 objeto, el agonista de CD40 comprenderá preferentemente un anticuerpo anti CD40 humano, por ejemplo, un anticuerpo quimérico denominado en el presente documento LOB 7/4 o un derivado del mismo, por ejemplo, anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos que contienen las secuencias variables pesadas y ligeras o CDR derivadas del anticuerpo LOB 7/4. Los presentes inventores han descubierto que este anticuerpo quimérico posee propiedades ventajosas cuando se usa como un producto terapéutico, por ejemplo para el tratamiento de cáncer, especialmente linfomas que expresan CD40 y tumores sólidos.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 contiene los resultados de un experimento que muestra que TAN1-6 (anticuerpo anti CD70) y AT113-2 (anti 4-1BBL) bloquean las interacciones de 4-1BB y CD70/CD27 respectivamente *in vitro* y durante respuestas *in vivo*.

La Figura 2 contiene los resultados de un experimento que muestra el efecto de anti 4-1BBL (AT113-2) y anti CD70 (TAN1-6) en la actividad terapéutica de anti CD40 en ratones BCL1.

La Figura 3 contiene los resultados de un experimento que muestra el efecto de anti 4-1BBL y anti CD70 en la acumulación de linfocitos T CD8+ y la erradicación del tumor de BCL1 después de terapia con mAb anti CD40.

La Figura 4 contiene los resultados de un experimento que muestra que anti 4-1BBL (AT113-2) y anti CD70 (TAN1-6) no afectan a los cambios fenotípicos inducidos por anti CD40 o cambios en el número de DC esplénicas de ratones BCL1.

La Figura 5 contiene los resultados de un experimento que muestra que los anticuerpos anti 4-1BBL y anti CD70 no inhiben el estadio efector de la respuesta *in vivo* o *in vitro*.

La Figura 6 contiene los resultados de un experimento que demuestra la eficacia terapéutica y potencia de anticuerpos monoclonales agonistas de CD27 contra dos linfomas de linfocitos B (BCL1 y A31).

La Figura 7 contiene experimentos que muestran que el mAb anti CD27 induce una respuesta más fuerte (mayor y más larga) en células OT-I que el ligando CD70. La figura muestra la expansión de células específicas de Ag (OT-1) en ratones a los que se proporciona Ab de control Ag+, CD70 recombinante soluble Ag+ o un anticuerpo agonista de CD27 de acuerdo con la invención. Los resultados en la figura muestran expansión sustancial de CD8+ OT-1 con el mAb agonista de CD27 (Véase Ejemplo 6)

La Figura 8 muestra células que expresan de forma transitoria CD27 de ratón marcadas con anticuerpos anti CD27 de ratón. Como se muestra en la misma tanto el CD27 anti ratón anti rata de ensayo (AT124-1) como el CD27 anti ratón de hámster de control positivo (LG3A10) marcaron las células transfectadas de ratón. Ninguno de los anticuerpos se unió a células no transfectadas (datos no mostrados).

La Figura 9 muestra el bloqueo de CD70 y CD27 con el mAb anti CD27. Esta figura muestra que AT124-1 se une a CD27 en la superficie de linfocitos T de ratón activados y que esta unión no se inhibe por la interacción de CD27 con su ligando natural CD70. Por el contrario, en la comparación se mostró que el anticuerpo anti CD27 disponible en el mercado (LG3A10; un no agonista) competía por la unión con CD70.

Descripción detallada de la invención

Las interacciones entre miembros de la superfamilia de TNFR y sus ligandos de la familia TNF desempeñan un papel crítico para proporcionar coestimulación en varios estadios durante el desarrollo de una respuesta de linfocitos T CD8 específica de antígeno, eficaz a patógenos y tumores. Al principio de la respuesta, el ligamiento de CD40 en células dendríticas (DC) con su ligando, CD154 (CD40L), en linfocitos Th activados, induce la activación, o licenciamiento, de DC y potencia su capacidad para presentar antígenos a linfocitos T CD8 vírgenes (Bennett, Carbone *et al.* 1998; Ridge, Di Rosa *et al.* 1998; Toes, Schoenberger *et al.* 1998). Se ha mostrado que los mAb anti CD40 o ligando de CD40 soluble (CD40L), que pueden sustituir linfocitos Th para licenciamiento de DC, tienen potencial terapéutico en varias situaciones que requieren respuestas de linfocitos T, incluyendo vacunación y tratamiento de tumores, (French, Chan *et al.* 1999; Tutt, O'Brien *et al.* 2002; van Mierlo, den Boer *et al.* 2002; Murray, Lu *et al.* 2003) virus e infecciones (Rolph y Kaufman 2001; Murray, Lu *et al.* 2003). La activación inducida por CD40 de DC se caracteriza por un aumento en su expresión de moléculas de adhesión y coestimuladoras, incluyendo ICAM-1, B7.1, B7.2, CD70 y ligando de 4-1BB (4-1BBL) (Cella, Scheidegger *et al.* 1996; Diehl, van Mierlo *et al.* 2002; Tesselaar, Xiao *et al.* 2003)). Aunque la activación/estimulación de CTL específica de antígeno inicial depende de la interacción CD28:B7 (Lenschow, Walunas *et al.* 1996; Carreno y Collins 2002)), la posterior expansión y supervivencia de células efectoras se controla por una multitud de interacciones coestimuladoras adicionales. El papel preciso de cada una de estas rutas en el mantenimiento de respuestas de memoria es actualmente un área de investigación activa. Dos receptores que parecen ser críticos en el mantenimiento de respuestas de CTL son los miembros de la familia TNFR 4-1BB (CD137) (DeBenedette, Shahinian *et al.* 1997; Futagawa, Akiba *et al.* 2002) y CD27 (Tesselaar, Xiao *et al.* 2003), cuya interacción con sus ligandos respectivos, 4-1BBL y CD70 se expresa principalmente en DC. Por ejemplo, se sabe que, aunque las respuestas de CTL conducidas por mAb anti CD40 son independientes de auxiliar, siguen dependiendo de interacciones tanto CD28:B7 como CD27:CD70 ((Prilliman, Lemmens *et al.* 2002; Tutt, O'Brien *et al.* 2002; Taraban, Rowley *et al.* 2004). Se tiene actualmente menos información sobre la importancia de 4-1BB durante respuestas de CTL conducidas por mAb anti CD40, pero está claro que la sensibilización dependiente de linfocitos T auxiliares de CTL depende al menos parcialmente de 4-1BB y está notablemente comprometida por el bloqueo de 4-1BB (Diehl, van Mierlo *et al.* 2002).

Los presentes inventores han demostrado previamente que el mAb anti CD40 estimula una respuesta de CTL independiente de auxiliar contra varios linfomas singénicos, que erradica con éxito tumores existentes, y deja a los ratones resistentes para una nueva exposición (French, Chan *et al.* 1999; Tutt, O'Brien *et al.* 2002). Los ensayos clínicos tempranos con mAb anti CD40 muestran éxito clínico y beneficio para los pacientes.

Por el contrario la presente invención se refiere al papel de CD27 como un adyuvante inmune terapéutico y para promover la inmunidad de linfocitos T CD8+, por ejemplo, en sujetos con linfoma. En un sistema modelo de Ova, los inventores han mostrado recientemente que la coestimulación mediante CD27 es esencial para la sensibilización mediada por mAb de CD40 de CTL específicos de ovoalbúmina. Aunque la sensibilización de linfocitos T específicos de ovoalbúmina endógenos no se vio cuando se anuló la interacción CD70-CD27, se detectó la sensibilización de linfocitos T transgénicos para TCR específicos de ovoalbúmina (OT-I), aunque a un nivel notablemente reducido. Además, aunque los linfocitos T OT-I sensibilizados en ausencia de señalización de CD27 eran capaces de diferenciarse en linfocitos T citotóxicos, su capacidad para montar una respuesta secundaria fue defectuosa. A la luz de estos hallazgos los inventores deseaban abordar el papel de la coestimulación de CD27 en inmunoterapia mediada por mAb de CD40 del linfoma y compararlo con el papel de su pariente cercano 4-1BB. Los resultados de estos estudios que se proporcionan en los ejemplos posteriores muestran que el bloqueo de la coestimulación mediante CD27 tiene un efecto mayor en la respuesta antitumoral inducida por un anticuerpo agonista y este efecto es mucho más pronunciado que el bloqueo de la coestimulación de 4-1BB. Los inventores creen además que esto se debe a un deterioro grave de la expansión de linfocitos T CD8+ durante el bloqueo de CD27-CD70.

Basándose en esto, la presente divulgación proporciona nuevos métodos de terapia humana administrando una cantidad inmunológicamente promotora (adyuvante) o terapéuticamente eficaz de (i) al menos un agonista de CD27 y (ii) opcionalmente otro resto terapéutico que puede comprender otro inmunomodulador o inmunoestimulante tal como un agonista de CD40, un agonista de OX-40, un agonista de 4-1BB, anti CTLA-4, un resto que agote los linfocitos T reguladores (Treg), o una citocina tal como un interferón o una interleucina o puede comprender un fármaco o agente quimioterapéutico. El agonista de CD27 solo o en combinación da como resultado la potenciación del aumento de la proliferación de linfocitos T CD8+ y respuestas inmunitarias de CTL, por ejemplo las inducidas por un agonista de CD40 tal como un anticuerpo agonista de CD40.

La presente divulgación proporciona además por primera vez anticuerpos agonistas anti CD27 útiles para promover la inmunidad de linfocitos T. En una realización preferida la unión de estos anticuerpos agonistas no se verá afectada (inhibida) por CD70. Aunque esto no es esencial para la presente invención, se cree que los anticuerpos agonistas que no compiten con CD70 pueden poseer propiedades ventajosas cuando se usan como adyuvantes inmunitarios, por ejemplo, en el tratamiento de cánceres tales como linfomas.

El agonista de CD27 preferentemente comprenderá un anticuerpo agonista anti CD27. Este anticuerpo que puede competir o no con CD70 comprenderá preferentemente un anticuerpo humano, humanizado, quimérico agonista anti CD27 humano que comprende preferentemente un dominio constante humano que puede ser un dominio constante

humano IgG1, IgG2, IgG3 IgG4, IgM, IgD, IgE, IgA1 o IgA2. Estos dominios constantes pueden modificarse si se desea para potenciar o modificar la función efectora. Además, el anticuerpo puede mutarse para retirar o alterar la glicosilación. De forma similar, si se usa otro anticuerpo agonista junto con el anticuerpo agonista de CD27 de forma similar serán preferentemente anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, preferentemente que contengan un dominio constante humano y pueden mutarse como se ha descrito anteriormente con respecto al anticuerpo agonista de CD27. Además, están dentro del alcance de la invención anticuerpos monocatenarios y fragmentos de anticuerpo tales como Fab, scFv, minicuerpos y similares.

En una realización ejemplar si se coadministra un agonista de CD40 con el agonista de CD27 el agonista de CD40 comprenderá un anticuerpo quimérico anti CD40 humano denominado en el presente documento LOB 7/4, o una variante del mismo, o un fragmento del mismo, especialmente versiones humanizadas del mismo, y/o anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que posean la misma especificidad epitópica que LOB 7/4 o que compitan con LOB 7/4 por la unión con CD40 humano.

En una realización ejemplar la presente invención proporciona nuevos métodos para tratar cáncer humano, tales como tumores sólidos y linfomas administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo agonista anti CD27. Opcionalmente, este agonista puede administrarse en asociación con otro agonista o citocina, por ejemplo, uno que induzca un efecto sinérgico con el mismo tal como un agonista de CD40, un agonista de 4-1BB:4-1BBL tal como un anticuerpo agonista de 4-1BBL, un agonista de 4-1BB tal como un anticuerpo agonista de 4-1BB, anti CTLA-4 o una interleucina tal como IL-2 o un interferón tal como un interferón alfa, beta o gamma o un resto que dé cómo resultado agotamiento de Treg. Estas combinaciones inmunitarias pueden administrarse juntas o en combinación. Estos agonistas o combinaciones de agonista/citocina pueden estar en la misma composición o composiciones diferentes. Preferentemente se administran de forma sincrónica o casi sincrónica entre sí. Típicamente, estos restos terapéuticos se administran en un intervalo de 24 horas entre sí, más típicamente en un intervalo de 8 horas, y aún más típicamente en un intervalo de 1-4 horas entre sí.

Los cánceres que pueden tratarse con el agonista de CD27 objeto, es decir, anticuerpo agonista de CD27 incluyen como ejemplo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, eritroleucemia monocítica mielomonocítica promielocítica mieloblástica, leucemia crónica, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfocítica crónica, Linfoma de Policitemia vera, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no de Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada, tumores sólidos, sarcomas y carcinomas, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, osteosarcoma, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomyosarcoma, sarcoma de colon, carcinoma colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de los conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, carcinoma nasofaríngeo, y carcinoma esofágico. En realizaciones preferidas el anticuerpo objeto se usa para tratar tumores sólidos que expresan CD40 tales como melanoma que expresa CD40, carcinoma de pulmón no pequeño, carcinoma de mama de conductos invasivos, linfoma de linfocitos B grande difuso y otros tumores sólidos que expresan CD40.

La divulgación proporciona además nuevos métodos para potenciar la inmunidad celular en un sujeto humano que necesite dicho tratamiento administrando una cantidad de la combinación de agonista de adyuvante objeto a un paciente que lo necesite solo o en combinación con otro agente activo tal como una citocina y opcionalmente un antígeno.

Adicionalmente, la presente divulgación se refiere a tratar enfermedades inflamatorias humanas y deficiencias usando la combinación de adyuvante objeto sola o junto con otros productos terapéuticos basados en el sistema inmunitario y no basados en el sistema inmunitario. Dichas afecciones incluyen por ejemplo lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerodermia (por ejemplo, síndrome de CRST), miositis inflamatoria, síndrome de Sjogren (SS), enfermedad de tejido conectivo mixta (por ejemplo, MCTD, síndrome de Sharp), artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), síndrome de dificultad respiratoria aguda, inflamación pulmonar, osteoporosis, sensibilidad de tipo retardado, asma, cirrosis biliar primaria (PBC), y púrpura trombocitopénica idiopática (ITP).

Los métodos objeto que administran preferentemente un anticuerpo agonista anti CD27 humano y opcionalmente otro inmunoestimulante o inmunomodulador tal como un anticuerpo agonista de CD40, OX-40, 4-1BB o CTLA-4, resto que agota los linfocitos T reguladores o una citocina se administrará a un hospedador que necesite dicho tratamiento para inducir una respuesta inmunitaria celular o antitumoral específica de antígeno potenciada. En realizaciones preferidas estos anticuerpos se administrarán a un sujeto que tenga o esté en riesgo de desarrollar un cáncer, una infección, particularmente una enfermedad infecciosa crónica, por ejemplo, que implique un virus,

bacteria o parásito; o una afección autoinmunitaria, inflamatoria o alérgica. Por ejemplo el anticuerpo objeto o combinación puede usarse para inducir respuestas inmunitarias celulares específicas de antígeno contra VIH. El VIH es un ejemplo bien reconocido de una enfermedad en la que la inmunidad protectora requerirá casi con certeza la generación de respuestas inmunitarias celulares potentes y de vida larga contra el virus.

5 Como se ha observado, la presente divulgación proporciona terapias de anticuerpo agonista y terapias de combinación que pueden usarse en el tratamiento de enfermedades infecciosas crónicas que implican virus, bacterias, hongos o parásitos así como enfermedades proliferativas tales como cáncer, enfermedades autoinmunitarias, trastornos alérgicos y enfermedades inflamatorias en las que el tratamiento eficaz requiere la inducción de una respuesta inmunitaria específica de antígeno celular potente.

El agonista de CD27 objeto puede administrarse opcionalmente en combinación con otros adyuvantes inmunitarios tales como linfocinas y citocinas. Los ejemplos de las mismas incluyen interferones tales como interferón alfa, beta y gamma, interleucinas tales como IL-2, IL-4, IL-6, IL-13 etc., factores estimulantes de colonias, TNF, y similares.

15 Adicionalmente, los anticuerpos anti CD40 humano objeto pueden administrarse en combinación con otros agentes antitumorales tales como productos quimioterapéuticos y citotoxinas habitualmente usados para tratar cáncer, agentes que inhiben la angiogénesis y similares. Estos agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse por separado o en combinación con el anticuerpo agonista anti CD27 objeto. Además, en algunas realizaciones un resto efector tal como un producto quimioterapéutico puede unirse directa o indirectamente al anticuerpo agonista anti CD27 humano objeto u otro opcionalmente incluido tal como anti CD40 humano, anti OX-40, anti 4-1BB, anti CTLA-4 etc. por ejemplo, mediante el uso de un enlazador.

25 Además, en algunas realizaciones el anticuerpo anti CD27 humano objeto o combinación terapéutica que contiene un anticuerpo agonista de CD27 puede administrarse en combinación con un antígeno deseado o unirse con un antígeno.

Los antígenos ejemplares incluyen pero sin limitación antígenos bacterianos, virales, parasitarios, alérgenos, autoantígenos y asociados con tumores. Si se usa una vacuna basada en ADN el antígeno se codificará por una secuencia de la construcción de ADN administrada. Como alternativa, si el antígeno se administra como un conjugado el antígeno será una proteína comprendida en el conjugado administrado. Además, el antígeno se administra separado del anticuerpo de CD27 y el antígeno puede tomar cualquier forma. Particularmente, el antígeno puede incluir antígenos proteicos, péptidos, organismos inactivados completos y similares.

35 Los ejemplos específicos de antígenos que pueden usarse en la invención incluyen antígenos de hepatitis A, B, C o D, virus de la gripe, *Listeria*, *Clostridium botulinum*, tuberculosis, tularemia, *Variola major* (viruela), fiebres hemorrágicas virales, *Yersinia pestis* (peste), VIH, herpes, virus del papiloma y otros antígenos asociados con agentes infecciosos. Otros antígenos incluyen antígenos asociados con una célula tumoral, antígenos asociados con afecciones autoinmunitarias, alergia y asma. La administración de dicho antígeno junto con el anticuerpo agonista anti CD27 objeto puede usarse en un producto terapéutico o vacuna profiláctica para conferir inmunidad contra dichas afecciones de enfermedad.

45 En algunas realizaciones los métodos y composiciones pueden usarse para tratar a un individuo en riesgo de tener una infección o que tiene una infección incluyendo un antígeno del agente infeccioso. Una infección se refiere a una enfermedad o afección atribuible a la presencia en el hospedador de un organismo ajeno o un agente que se reproduce dentro del hospedador. Un sujeto en riesgo de tener una infección es un sujeto que está predispuesto a desarrollar una infección. Dicho individuo puede incluir por ejemplo un sujeto con una exposición conocida o sospechada a un organismo o agente infeccioso. Un sujeto en riesgo de tener una infección también puede incluir un sujeto con una afección asociada con una capacidad alterada para montar una respuesta inmunitaria para un agente u organismo infeccioso, por ejemplo un sujeto con una inmunodeficiencia congénita o adquirida, un niño, una persona mayor, un sujeto que se somete a radiación o quimioterapia, un sujeto con una lesión de quemadura, un sujeto con una lesión traumática, un sujeto que se somete a cirugía u otro procedimiento médico o dental invasivo, u otro individuo inmunocomprometido.

55 Las infecciones que pueden tratarse o prevenirse usando las combinaciones de anticuerpos agonistas objeto potencialmente en combinación con otros potenciadores inmunitarios incluyen infecciones bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias. Otros tipos menos comunes de infecciones también incluyen rickettsias, micoplasmas y agentes que provocan tembladera, encefalopatía esponjiforme bovina (BSE) y enfermedades priónicas (por ejemplo kuru y enfermedad de Creutzfeldt-Jacob). Se conocen bien ejemplos de bacterias, virus, hongos y parásitos que infectan a seres humanos. Una infección puede ser aguda, subaguda, crónica o latente y puede estar localizada o ser sistémica. Además, la infección puede ser predominantemente intracelular o extracelular durante al menos una fase del ciclo de vida del agente del organismo infeccioso en el hospedador.

65 Las infecciones bacterianas contra las que pueden usarse anticuerpos objeto para potenciar una respuesta inmunitaria celular incluyen bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas. Los ejemplos de bacterias Gram positivas incluyen pero sin limitación especies de *Pasteurella*, especies de *Estafilococos* y especies de

Estreptococos. Los ejemplos de bacterias Gram negativas incluyen pero sin limitación *Escherichia coli*, especies de *Pseudomonas* y especies de *Salmonella*. Los ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen pero sin limitación *Heliobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* spp. (por ejemplo *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*,
 5 *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, (Estreptococo de grupo A), *Streptococcus agalactiae* (Estreptococo de Grupo B), *Streptococcus* (grupo *viridans*), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*,
 10 *Streptococcus* (spp. anaerobias), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* spp. patogénica, *Enterococcus* spp.,
Haemophilus influenzae, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* spp., *Erysipelothrix rhusiopathie*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*,
Pasteurella multocida, *Bacteroides* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenu*, *Leptospira*, *Rickettsia* y *Actinomyces israelii*.

Los ejemplos de virus que provocan infecciones en seres humanos incluyen pero sin limitación Retroviridae (por ejemplo virus de deficiencia humana, tales como VIH-1 (también denominado HTLV-III), VIH-II, LAC o IDLV-III/LAV o VIH-III y otros aislados tales como VIH-LP, Picornaviridae (por ejemplo poliovirus, hepatitis A, enterovirus, virus Coxsackie humanos, rinovirus, ecovirus), Calciviridae (por ejemplo cepas que provocan gastroenteritis), Togaviridae (por ejemplo virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola), Flaviviridae (por ejemplo virus del dengue, virus de encefalitis, virus de la fiebre amarilla), Coronaviridae (por ejemplo coronavirus), Rhabdoviridae (por ejemplo virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia), Filoviridae (por ejemplo virus del Ébola), Paramyxoviridae (por ejemplo virus paragripal, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio), Orthomyxoviridae (por ejemplo virus de la gripe), Bungaviridae (por ejemplo virus Hataán, virus bunta, flebovirus, y virus de Nairo), Arena viridae (virus de fiebres hemorrágicas), Reoviridae (por ejemplo reovirus, orbivirus, rotavirus), Bimaviridae, Hepadnaviridae (virus de la hepatitis B), Parvoviridae (parvovirus), Papovaviridae (virus del papiloma, virus de polioma), Adenoviridae (adenovirus), Herpeviridae (por ejemplo virus del herpes simple (VHS) I y II, virus de la varicela zoster, virus de la viruela) e Iridoviridae (por ejemplo virus de la fiebre porcina Africana) y virus no clasificados (por ejemplo los agentes etiológicos de encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis delta, los agentes de hepatitis no A, no B (clase 1 transmitida por vía entérica; clase 2 transmitida por vía parenteral tal como Hepatitis C); virus Norwalk y relacionados y astrovirus).

30 Los ejemplos de hongos incluyen *Aspergillus* spp., *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* y otras *Candida* spp., *Blastomyces dermatidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Chlamydia trachomatis*, *Nocardia* spp., y *Pneumocystis carinii*.

35 Los parásitos incluyen pero sin limitación parásitos portados en la sangre y/o tisulares tales como *Babesia microti*, *Babesi divergens*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Leishmania tropica*, *Leishmania* spp., *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovdni*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma gambiense* y *Trypanosoma rhodesiense* (enfermedad del sueño Africana), *Trypanosoma cruzi* (enfermedad de Chagas) y *Toxoplasma gondii*, platelmintos y nemátodos.

40 Como se observa la presente invención preferentemente se refiere al uso de un anticuerpo agonista anti CD27 humano opcionalmente en asociación con otro resto tal como un anticuerpo agonista anti CD40, OX-40, CTLA-4, 4-1BB humano o una citocina o agente que agote los linfocitos T reguladores en el tratamiento de enfermedades proliferativas tales como cánceres. El cáncer es una afección de crecimiento descontrolado de células que interfiere con el funcionamiento normal de los órganos y sistemas corporales. Un sujeto que tiene cáncer es un sujeto que
 45 tiene células cancerosas medibles de forma objetiva presentes en el cuerpo del sujeto. Un sujeto en riesgo de desarrollar cáncer es un sujeto predispuesto a desarrollar un cáncer, por ejemplo basándose en el historial familiar, la predisposición genética, sujeto expuesto a radiación u otro agente causante de cáncer. Los cánceres que migran de su localización original y siembran órganos vitales pueden conducir con el tiempo a la muerte del sujeto mediante el deterioro funcional del órgano afectado. Los cánceres hematopoyéticos, tales como leucemia, pueden superar por
 50 competencia a los compartimentos hematopoyéticos normales en un sujeto conduciendo de este modo a insuficiencia hematopoyética (en forma de anemia, trombocitopenia y neutropenia) causando en última instancia la muerte.

55 Las composiciones de la invención que comprenden un anticuerpo agonista de CD27 y opcionalmente otro resto como se ha mencionado anteriormente pueden usarse para tratar una diversidad de cánceres o sujetos en riesgo de desarrollar cáncer, por ejemplo, mediante la inclusión de un antígeno asociado a tumor (TAA). Este es un antígeno expresado en una célula tumoral. Los ejemplos de dichos cánceres incluyen cánceres de mama, de próstata, de colon y de sangre tales como leucemia, leucemia linfocítica crónica y similares. Un antígeno asociado a tumor también puede ser un antígeno expresado predominantemente por células tumorales pero no exclusivamente.

60 Los cánceres adicionales incluyen los ya mencionados así como carcinoma de células basales, cáncer del tracto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer de cerebro y sistema nervioso central (SNC), cáncer del cuello uterino, coriocarcinoma, cánceres colorrectales, cáncer de tejido conectivo, cáncer del sistema digestivo, cáncer endometrial, cáncer esofágico, cáncer del ojo, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, neoplasia intraepitelial,
 65 cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (células pequeñas, células grandes), linfoma incluyendo linfoma de Hodgkin y linfoma no de Hodgkin; melanoma; neuroblastoma; cáncer de la cavidad

oral (por ejemplo labio, lengua, boca y faringe), cáncer ovárico; cáncer pancreático; retinoblastoma; rhabdomyosarcoma; cáncer rectal; cáncer del sistema respiratorio; sarcoma; cáncer de piel; cáncer de estómago; cáncer testicular; cáncer tiroideo; cáncer uterino; cáncer del sistema urinario; así como otros carcinomas y sarcomas.

5 El agonista de CD27 objeto, y composiciones que lo contienen o terapias de combinación como se han definido previamente pueden usarse también para tratar enfermedades autoinmunitarias tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes de tipo I, psoriasis u otros trastornos autoinmunitarios. Otra enfermedad autoinmunitaria que puede tratarse potencialmente con los adyuvantes inmunitarios de la invención incluyen enfermedad de Crohn y otras enfermedades inflamatorias del intestino tales como colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico (SLE),
10 encefalitis autoinmunitaria, miastenia grave (MG), tiroiditis de Hashimoto, síndrome de Goodpasture, pénfigo, enfermedad de Graves, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, esclerodermia con anticuerpos anticógeno, enfermedad del tejido conectivo mixta, polipositis, anemia perniciosa, enfermedad de Addison idiopática, infertilidad asociada con autoinmunidad, glomerulonefritis (por ejemplo glomerulonefritis semilunar, glomerulonefritis proliferativa), penfigoide ampolloso, síndrome de Sjogren, artritis psoriásica, resistencia a insulina, diabetes mellitus autoinmunitaria (diabetes mellitus de tipo 1; diabetes mellitus insulino dependiente),
15 hepatitis autoinmunitaria, hemofilia autoinmunitaria, síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS), hepatitis autoinmunitaria, hemofilia autoinmunitaria, síndrome linfoproliferativo autoinmunitario, uveorretinitis autoinmunitaria y síndrome de Guillain-Barre. Recientemente, la arteriosclerosis y la enfermedad de Alzheimer se han reconocido como enfermedades autoinmunitarias. Por lo tanto, en esta realización de la invención el agonista de CD27 objeto, típicamente un anticuerpo agonista de CD27 puede administrarse solo o en combinación con un autoantígeno contra el que el hospedador induce una respuesta inmunitaria no deseada que contribuye a destrucción tisular y al daño de tejidos normales.

25 Los anticuerpos anti CD27 objeto y terapias de combinación también pueden usarse para tratar asma y enfermedades alérgicas e inflamatorias. El asma es un trastorno del sistema respiratorio caracterizado por inflamación y estrechamiento de las vías respiratorias y aumento de la sensibilidad de las vías respiratorias y a agentes inhalados. El asma se asocia frecuentemente pero no exclusivamente con síntomas atópicos o alérgicos. La alergia es hipersensibilidad adquirida a una sustancia (alérgeno). Las afecciones alérgicas incluyen eccema, rinitis alérgica, o coriza, fiebre del heno, asma bronquial, urticaria y alergias alimentarias y otras afecciones atópicas. Un
30 alérgeno es una sustancia que puede inducir una respuesta alérgica o asmática en un sujeto susceptible. Hay numerosos alérgenos incluyendo pólenes, venenos de insectos, piel animal, polvo, esporas fúngicas y fármacos.

Los ejemplos de alérgenos naturales y vegetales incluyen proteínas específicas de los siguientes géneros: Cánidos, *Dermatophagoides*, *Felis*, *Ambrosia*, *Lotium*, *Cryptomeria*, *Alternaria*, *Alder*, *Alinus*, *Betula*, *Quercus*, *Olea*, *Artemisia*,
35 *Plantago*, *Parietaria*, *Blatella*, *Apis*, *Cupressus*, *Juniperus*, *Thuya*, *Chamaecyparis*, *Periplanet*, *Agopyron*, *Secale*, *Triticum*, *Dactylis*, *Festuca*, *Poa*, *Avena*, *Holcus*, *Anthoxanthum*, *Arrhenatherum*, *Agrostis*, *Phleum*, *Phalaris*, *Paspalum*, *Sorghum* y *Bromis*.

40 Se entiende que los anticuerpos objeto, composiciones que contienen anticuerpos y conjugados de los mismos pueden combinarse con otras terapias para tratar la afección específica, por ejemplo, enfermedad infecciosa, cáncer o afección autoinmunitaria. Por ejemplo en el caso de cáncer los métodos de la invención pueden combinarse con quimioterapia o radioterapia.

45 Se conocen bien métodos para preparar anticuerpos contra antígenos deseados. Sin embargo, hasta la presente invención, no se han presentado mAb agonistas de CD27 ni se ha sugerido el uso de los mismos para terapia inmunitaria como se reivindica en el presente documento.

50 Por el contrario, como se ha observado anteriormente se conocen anticuerpos agonistas de CD40 así como el uso de los mismos en terapias inmunitarias. Además, en la Figura 9 la presente solicitud proporciona las secuencias variables para la cadena pesada y ligera de un anticuerpo quimérico agonista de CD40 LOB 7/4 ejemplar preferido que permitiría a un experto en la materia preparar este anticuerpo por métodos recombinantes. Si el anticuerpo de CD27 se usa en asociación con un anticuerpo agonista de CD40, las cantidades eficaces del agonista de CD40 y agonista de CD27 objeto pueden determinarse de forma empírica, o basándose en cantidades inmunológicamente eficaces en modelos animales. Las cantidades relativas son las que dan como resultado una respuesta de CTL
55 potenciada y proliferación de linfocitos T CD8+ *in vivo*. Los factores adicionales para considerar incluyen la antigenicidad, la formulación, la vía de administración, el número de dosis inmunitarias para administrar, la condición física, el peso y la edad del individuo, los efectos adversos y similares. Dichos factores se conocen bien por los expertos en la materia y pueden determinarse por los expertos en la materia (véase por ejemplo Paoletti y McInnes, eds., *Vaccines, from Concept to Clinic: A Guide to the Development and Clinical Testing of Vaccines for Human Use* CRC Press (1999)). Se entiende que el agonista de CD27 objeto puede administrarse solo o junto con otros adyuvantes.
60

65 El agonista objeto o combinación del mismo, por ejemplo, combinación de anticuerpos agonistas de CD40/CD27, puede administrarse de forma local o sistémica por cualquier método conocido en la técnica incluyendo pero sin limitación vías intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, oral u otra mucosa. Las vías adicionales incluyen administración intracraneal (por ejemplo intracisternal o intraventricular), intraorbital,

oftálmica, intracapsular, intraespinal y tópica. Los adyuvantes y composiciones de vacuna de la invención pueden administrarse en un vehículo farmacéutico no tóxico, adecuado, o pueden formularse en microcápsulas o un implante de liberación prolongada. Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden administrarse múltiples veces, si se desea, para mantener la respuesta inmunitaria celular deseada. La vía, formulación y programa de inmunización apropiados pueden determinarse por un experto en la materia.

En los métodos de la invención, en algunos casos el anticuerpo o combinación de conjugado de anticuerpos puede administrarse junto con uno o varios antígenos u otros agentes activos, por ejemplo, una citocina o producto quimioterapéutico. Estas composiciones y agentes activos que contienen pueden administrarse por separado o en combinación en cualquier orden que consiga la potenciación deseada de la inmunidad celular. Típicamente, estas composiciones se administran en un intervalo de tiempo corto entre sí, es decir en un intervalo de tiempo de aproximadamente un día entre sí, típicamente varias horas entre sí, y más típicamente en un intervalo de aproximadamente una hora o menos entre sí.

En algunos casos, puede ser beneficioso incluir un resto en el anticuerpo recombinante agonista que facilite la purificación de afinidad. Dichos restos incluyen moléculas relativamente pequeñas que no interfieren con la función de los polipéptidos en el conjugado. Como alternativa, los marcadores pueden retirarse por escisión. Los ejemplos de dichos marcadores incluyen marcadores de polihistidina, marcadores de hemaglutinina, proteína de unión a maltasa, lectinas, glutatión-S transferasa, avidina y similares. Otros marcadores de afinidad adecuados incluyen FLAG, proteína verde fluorescente (GFP), myc y similares.

Los anticuerpos objeto y conjugados de anticuerpos que los contienen pueden administrarse con un vehículo fisiológicamente aceptable tal como solución salina fisiológica. La composición también puede incluir otro vehículo o excipiente tal como tampones, tales como citrato, fosfato, acetato y bicarbonato, aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos, proteínas tales como albúmina de suero, ácido etilendiamina tetraacético, cloruro sódico u otras sales, liposomas, manitol, sorbitol, glicerol y similares. Los agentes de la divulgación pueden formularse de diversas maneras, de acuerdo con la vía correspondiente de administración. Por ejemplo, pueden realizarse formulaciones líquidas para ingestión o inyección, pueden prepararse geles o procedimientos para ingestión, inhalación o aplicación tópica. Los métodos para preparar dichas formulaciones se conocen bien y pueden hallarse por ejemplo en, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18ª Ed., Mack Publishing Company, Easton Pa.

Los anticuerpos agonistas objeto pueden expresarse usando cualquier vector capaz de dirigir su expresión, por ejemplo una célula transducida con el vector. Los vectores que pueden usarse incluyen por ejemplo baculovirus, vectores basados en T7 para su uso en bacterias, vectores de expresión de levaduras, vectores de expresión de mamíferos, vectores de expresión virales, y similares. Los vectores virales incluyen vectores retrovirales, adenovirales, adenoasociados, virus del herpes, virus de simio 40 y vectores de virus del papiloma bovino.

Las células procariotas y eucariotas que pueden usarse para facilitar la expresión de los anticuerpos agonistas objetos incluyen por ejemplo microbios, células vegetales y animales, por ejemplo, procariotas tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, y similares, células de insecto tales como células Sf21, células de levadura tales como *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces* y *Pichia*, y células de mamífero tales como COS, HEK293, CHO, BHK, NIH 3T3, HeLa, y similares. Un experto en la materia puede seleccionar fácilmente componentes apropiados para un sistema de expresión particular, incluyendo vector de expresión, promotores, marcadores seleccionables y similares adecuados para una célula u organismo deseado. La selección y uso de diversos sistemas de expresión puede encontrarse por ejemplo en Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Nueva York, N. Y. (1993); y Pouwels *et al.*, "Cloning Vectors: A Laboratory Manual", 1985 Supl. 1987. También se proporcionan células eucariotas que contienen y expresan las construcciones de ADN objeto.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se usa en su sentido más amplio para incluir anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Esto incluye fragmentos Fab, F(ab')₂, minicuerpos, Ab de cadena sencilla y Fv.

Además el término "anticuerpo" incluye anticuerpos de origen natural así como anticuerpos de origen no natural tales como anticuerpos monocatenarios, anticuerpos quiméricos, anticuerpos bifuncionales y humanizados. Se prefieren para su uso en la invención anticuerpos quiméricos, humanizados y completamente humanos. Se conocen bien por los expertos en la materia métodos para la síntesis de anticuerpos quiméricos, humanizados, con injertos de CDR, monocatenarios y bifuncionales. Además, como se ha observado anteriormente se conocen anticuerpos específicos para CD27 y están disponibles y pueden prepararse por inmunización de un hospedador adecuado con un antígeno de CD27, preferentemente antígeno de CD27 humano. Como se observa en la presente divulgación si se usa un anticuerpo de CD40 el anticuerpo de CD40 puede comprender LOB 7/4 quimérico que tiene las secuencias de cadena pesada y ligera variables contenidas en la Figura 9 cuya síntesis se representa de forma esquemática en la Figura 10 y 11.

Los anticuerpos agonistas de CD27 de la presente divulgación pueden ser intactos o modificados por ingeniería genética. Por ejemplo, el mAb de CD27 puede estar completamente o parcialmente glicosilado y/o seleccionarse

para aumentar o disminuir la unión con sistemas efectores humanos tales como complemento, efectores que portan FcR, tales como macrófagos, o para extender o reducir la semivida. Estas modificaciones pueden realizarse para mejorar la eficacia y potencialmente también reducir efectos secundarios tóxicos.

5 En consecuencia, se pretende que los siguientes ejemplos ilustren pero no limiten la presente invención.

Ejemplos

Materiales y Métodos

10

(Los siguientes materiales y métodos se usaron en los Ejemplos 1-6).

15 Animales y líneas celulares. Se proporcionaron ratones BALB/c y C57B1/6 por Harlan (Blackthorn, Oxon, Reino Unido) y se mantuvieron en instalaciones animales locales. La línea de linfoma B de ratón BCL1 (Slavin y Strober 1978) se mantuvo *in vivo* por pase i.p. en ratones BALB/c. Se retiraron los bazo en el estadio terminal de la enfermedad y se prepararon suspensiones celulares individuales como se ha descrito previamente. Las células P BCL1 son una sublínea derivada de BCL1 y crecidas en cultivo (Illidge, Honeychurch *et al.* 2000). Se realizaron experimentos animales bajo licencia de acuerdo con las directrices de licencias del Ministerio del Interior de Reino Unido y se aprobaron por el Comité de Ética de la Universidad de Southampton.

20

25 Anticuerpos y reactivos. El mAb de tratamiento anti CD40 usado en el presente estudio fue 3/23 (originalmente proporcionado por G. Klaus, Instituto Nacional de Investigación Médica, Londres, Reino Unido). El mAb anti 4-1BBL, AT113-2, y el mAb anti CD70 TAN1-6 (Taraban, Rowley *et al.* 2004) se indujeron de forma interna inmunizando ratas con proteína de fusión 4-1BBL-Fc o proteína CD70 recombinante soluble respectivamente. Para la preparación de mAb, las células de hibridoma se expandieron en cultivo estacionario y se prepararon con IgG a partir de sobrenadante usando perlas de Sepharose acoplado a Proteína G. Los anticuerpos usados para análisis citométrico de flujo fueron: ID3 (anti-CD19) (Krop, de Fougerolles *et al.* 1996) 16-10A1 (anti-B7-1) y GL-1 (anti-B7-2) (ambos de la Colección Americana de Cultivos Tipo), ICAM-1 (ref), N418 (anti-CD11c) (ATCC), Mc10-6A5 (mAb Anti Id-BCL1) (George, McBride *et al.* 1991), LOB12/3 (anti-4-1BB) (Taraban, Rowley *et al.* 2004), YTS169 (anti-CD8), todos preparados y marcados con PE o FITC de forma interna; anti CD27 marcado con PE y anti CD8 marcado con APC (ambos de Pharmingen). Se generaron proteínas de fusión solubles, sCD70-Fc y s4-1BBL-Fc como se ha descrito previamente (Rowley y Al-Shamkhani 2004).

30

35 BIACORE. Se realizó Análisis de Biacore de la unión de TAN1-6 y AT113-2 como se ha descrito previamente (Al-Shamkhani, Mallett *et al.* 1997).

40 Transferencia Adoptiva de células OT-1. Se inyectaron linfocitos T transgénicos de TCR restringidos con H-2Kb específicos de OVA (1×10^6) de ratones OT-I i.v. en receptores C57BL/6 de sexo coincidente. Después de 1 o 2 días, los linfocitos T se sensibilizaron mediante administración i.p. de OVA (5 mg) en combinación con: mAb anti CD40 o de control Anti Id linfoma A31 (500 μ g de cada uno), o mAb anti CD40 y anti CD70 / anti 4-1BBL (500 μ g de cada uno). Al día siguiente estos ratones recibieron una inyección adicional de mAb de control Anti Id linfoma A31, mAb anti CD70 o anti 4-1BBL (500 μ g). Para el seguimiento se tiñeron linfocitos T específicos de Ag, muestras de sangre (50 μ l), con tetrámeros de H-2Kb OVAp marcado con PE (Proimmune o Beckman Coulter) y anti CD8 marcado con APC (Pharmingen) (Taraban, Rowley *et al.* 2004).

45

50 Control de respuesta anti OVA endógena. Los ratones C57BL/6 se sensibilizaron por administración i.p. de OVA (5 mg) en combinación con mAb anti CD40 y de control (Anti Id linfoma A31), anti CD70 o anti CD137L (500 μ g de cada uno). Al día siguiente los ratones recibieron una inyección adicional de mAb de control, anti CD70 o anti CD137L (500 μ g). Para seguimiento de linfocitos T específicos de Ag, 6 días después de la sensibilización, se tiñeron muestras de sangre (50 μ l), con tetrámeros de H-2Kb OVAp marcado con PE y anti CD80 marcado con APC (Pharmingen) y se realizó análisis citométrico de flujo usando un FACSCalibur (BD Biosciences, Mountain View, CA.).

55

Análisis citométrico de flujo de linfocitos esplénicos y DC después de tumor y mAb anti CD40

60

65 A ratones BALB/c de edad coincidente se les proporcionaron 5×10^7 células BCL1 el día 0 (i.v.) y después 1 mg de mAb anti CD40 o control de isotipo coincidente (i.v.) cuando el nivel de las células tumorales en el bazo había alcanzado aproximadamente el 5% de células totales, típicamente el día 4 después del tumor. En experimentos para contemplar el efecto de mAb anti 4-1BBL y anti CD70 en la respuesta de tratamiento con mAb anti CD40, se inyectaron 0,5 mg del mAb de bloqueo i.p. 4 horas antes de la inyección de anti CD40 y después de nuevo los días 1 y 3 después del mAb anti CD40. Los animales se sacrificaron los días indicados, se retiraron los bazo y se prepararon suspensiones. Las células de tumor BCL1 se detectaron usando Id PE-anti CD19 y FITC anti BCL1. Se siguieron los cambios de número y fenotipo de linfocitos CD8+ usando APC-anti CD8a y PE anti 4-1BB y anti CD27. Se realizó análisis citométrico de flujo usando un FACSCalibur (BD Biosciences).

65

- Para análisis de DC, se cortaron de forma gruesa bazos completos y se digirieron en 5 ml de colagenasa D 1 mg/ml (Roche) y DNasa 0,05 mg/ml (Sigma) en RPMI-1640 y se agitaron suavemente durante 30 minutos a 37 grados C. Se añadieron después 20 ml de medio y se preparó una suspensión celular individual. Las células se lavaron una vez, se resuspendieron y las muestras se marcaron para citometría de flujo usando PE-anti CD11c y FITC-anti B7.1, ICAM, 4-1BB, 4-1BBL y CD70 en presencia del mAb anti receptor FcγII y III, se añadió 2.4G2. 7-aminoactinomicina-D (7AAD) a una concentración final de 2 μg/ml a las muestras 15 minutos antes del análisis de modo que las células muertas y autofluorescentes pudieran excluirse usando FL3. Se realizó análisis citométrico de flujo usando un FACSCalibur.
- 5 Se inyectó i.v. a Grupos de Inmunoterapia de 5 ratones de edad coincidente 10^7 células BCL1 el día 0 y después anti CD40 i.v. los días 4 a 7 (250 mg/día) y mAb de bloqueo i.p. los días 4, 7, 9 y 11 (500 mg/día) cuando estuviera indicado.
- 15 Ensayo de muerte *in vivo*. Se inyectó a los Ratones 2 x 10^7 células BCL1 i.p., y 48 horas después 1 mg de anti CD40 i.p. Después de 8 días, se inyectó a grupos de tres ratones i.p. 1 mg del mAb de bloqueo apropiado y después 5 horas más tarde 2 x 10^7 esplenocitos marcados con CFSE de ratones portadores de tumor BCL1 terminales. Veinticuatro horas después, se recogieron células de la cavidad peritoneal lavando y tiñendo con Anti Id BCL1 marcado con PE y anti CD8 marcado con APC.
- 20 Ensayo de citotoxicidad. Se usó un ensayo de liberación de Cr 51 de 4 horas convencional para evaluar la actividad citotóxica de efectores esplénicos como se ha descrito previamente (Tutt, O'Brien *et al.* 2002). Brevemente, se prepararon homogeneizados esplénicos de ratones que portaban BCL1 4-5 días después del tratamiento anti CD40. Las células tumorales restantes se retiraron usando mAb anti Id FITC seguido de perlas de MACS anti FITC y columnas de LS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Las células restantes se usaron como efectores.
- 25 Las células PBCL1 se marcaron con 51 Cr y se usaron como dianas. Para evaluar el efecto de mAb en la citotoxicidad, se incluyeron a una concentración final de 50 μg/ml. La liberación máxima de radiactividad se calculó usando células diana a las que se añadieron 150 μl de Nonidet P-40 1%. El porcentaje de liberación de 51 Cr específico se calculó usando la fórmula convencional: porcentaje de liberación específica = [(liberación de muestra – liberación de fondo)/(liberación máxima – liberación de fondo)] x 100.
- 30 Ejemplo 1: TAN1-6 (ANTI-CD70) y AT113-2 (Anti-4-1BBL) Bloquean las interacciones 4-1BBL/4-1BB y CD70/CD27 respectivamente *in vitro* e *in vivo*
- 35 En este experimento contenido en la Figura 1, tanto en 1a como en 1b se activaron esplenocitos BALB/c durante 48 horas con 1 microgramo/ml de anti-CD3 para regular positivamente la expresión de CD70 y 4-1BB en linfocitos T. En 3a, la unión de proteína de fusión sCD70-IgFc (1,125 microgramos/ml) con los esplenocitos activados se detectó usando el mAb anti Fc humano marcado con FITC (SB2H2, 10 microgramos/ml) en presencia de proteína de fusión s4-1BBL-Ig (1,125 microgramos/ml) con las células se detectó usando el mAb anti Fc humano marcado con FITC SB2H2 en presencia de TAN1-6 (línea sólida) o AT113-2 (línea discontinua) (50 microgramos/ml). Tanto en a como en 1b los histogramas rellenos muestran un control de hIgG detectado con SB2H2. En 1c, la respuesta de linfocitos T CD8 específica de Ova endógena en ratones C57B1/6 se controló después de la administración i.p. de OVA (5 mg) y anti-CD40 (1 mg) en combinación con IgG de control (anti idiotipo A31), mAb anti-CD70 (TAN1-6) o anti 4-1BBL (AT113-2) (0,5 mg de cada uno). Después de 24 horas, los ratones recibieron inyecciones repetidas de mAb de control, anti CD70 o anti 4-1BBL. Seis días después, los linfocitos T específicos de OVA en la sangre periférica se detectaron con tetrámero anti CD8 marcado con APC y H-2Kb SIINFEKL marcado con PE.
- 45 Ejemplo 2: Efecto de anti 4-1BBL (AT113-2) y anti CD70 (TAN1-6) en la actividad terapéutica de anti CD40 en ratones BCL1
- 50 En este experimento mostrado en la Figura 2, se inocularon grupos de 5 ratones iv con 1 X 10^7 células tumorales BCL1 el día 0, se trataron iv con anti CD40 los días 4, 5, 6 y 7 postumorales (500 microgramos por día). Donde se muestre, los grupos también recibieron anti 4-1BBL y/o anti CD70 los días 4, 7, 9 y 11 (500 microgramos/mAb/día, i.p.). Los ratones se controlaron con respecto a desarrollo tumoral. Estos resultados en la Figura 4 representan y contienen los resultados de uno de 3 experimentos similares.
- 55 Ejemplo 3: Efecto de anti 4-1BBL y anti CD70 en la acumulación de linfocitos T CD8+ y la erradicación de tumores BCL1 después de terapia con mAb anti CD40
- 60 En este experimento cuyos resultados están contenidos en la Figura 3, se inocularon grupos de ratones con 5 X 10^7 células BCL1 iv y cuatro días después (día 0 en la figura) se trataron con mAb anti CD40, momento en el cual el nivel de células tumorales Id+ en el bazo fue entre 3 y 5%. Cuando se indique, los ratones también recibieron mAb anti 4-1BBL y/o anti CD70 los días 0, 1 y 2 (500 microgramos/mAb/día). Los días indicados, se controlaron el tumor esplénico y linfocitos T CD8+ por citometría de flujo como se describe en los Materiales y Métodos en el presente documento. El experimento en la Figura 3a muestra el número total de células tumorales esplénicas y 3b los números totales de linfocitos CD8+ después de tratamiento de BCL1. Los puntos son la media de animales por duplicado, y los resultados mostrados representan los resultados de 4 experimentos similares.
- 65

Ejemplo 4: Anti 4-1BBL (AT113-2) y anti CD70 (TAN1-6) no afectan a los cambios fenotípicos inducidos por anti CD40 o cambios en el número de DC esplénicas de ratones BCL1

5 En el experimento de la Figura 4 los ratones se inocularon con 5×10^7 células BCL1 iv y cuatro días después (día 0 en la figura) se trataron con mAb anti CD40 (1 mg). Cuando se indique, los ratones también recibieron anti 4-1 BBL o anti CD70 i.p. cuatro horas antes del tratamiento anti CD40, y de nuevo 1 y 2 días después (500 microgramos/día). El día tres, el número total de DC esplénicas se analizó como en la Figura 2. Los resultados en la Figura 4 representan la media de ratones por duplicado y contienen los resultados de 1 de 2 experimentos similares.

10

Ejemplo 5: Anti 4-1BBL y anti CD70 no inhiben el estado efector de la respuesta *in vivo* o *in vitro*

Este experimento está contenido en la Figura 5. En la Figura 5a se proporcionó a los ratones inyecciones i.p. de 2×10^7 células BCL1 y 48 horas después mAb anti CD40 (1 mg). Después de 8 días adicionales, se inyectó a grupos de tres ratones i.p. 1 mg del anticuerpo de bloqueo apropiado y después 5 horas más tarde 2×10^7 esplenocitos marcados con CFSE de ratones portadores de tumores BCL1. 24 horas después, se recogieron células de la cavidad peritoneal, se tiñeron con Anti Id BCL1 marcado con PE, y se evaluaron por citometría de flujo. Las células positivas dobles (CFSE+ e Id+) seleccionadas representan las células tumorales supervivientes. En 5b) los ratones se inocularon con 5×10^7 BCL1 i.v. y se trataron 4 días más tarde con mAb anti CD40 (1 mg, i.v.). 5 días después se prepararon linfocitos esplénicos anti CD40 y las células tumorales restantes se retiraron usando mAb Anti Id BCL1 marcado con PE y perlas anti PE como se describe en el Material y Métodos. Los esplenocitos restantes (aproximadamente 40% de CD8+) se usaron como efectores, y se incubaron con células IIBCL1 marcadas con 51 Cr como dianas, solas, o en presencia de anti CD40, anti CD8, anti 4-1BBL o anti CD70 a 100 microgramos/ml. Los resultados en el mismo se expresan como el porcentaje de lisis específico de células diana.

25

Ejemplo 6: Potencia terapéutica de anti CD27 contra linfoma A31 y BCL1

En este experimento mostrado en la Figura 6, se proporcionó a los ratones inyecciones de 2×10^7 células BCL1 iv y posteriormente se trataron iv con IgG de control, mAb anti CD40, mAb anti CD27 o anti 4-1BB (1 mg). Los ratones se controlaron dos veces al día y los resultados en la figura representan uno de dos experimentos similares. Particularmente, un día después de las transferencias adoptivas de 4×10^6 linfocitos CD8+ OT-I (día 0), los ratones B6 receptores se inmunizaron iv con 30 mmoles de péptido OVA (SINFEKL, OVA 257-264). Los animales también recibieron cuatro inyecciones iv (los días 90, 1, 2 y 3; 250 microgramos por inyección) de CD70 soluble recombinante o mAb anti CD27 de ratón (preparación del mismo descrita en el siguiente ejemplo) o de control. Para el seguimiento de linfocitos T CD8+ específicos de OVA *in vivo*, se tiñeron muestras sanguíneas con tetrámero de OVA 257-264 PE H-2KB y anti CD8alfa APC. La expansión de linfocitos T CD8+ específicos de OVA se muestra el día 4, en el máximo de la respuesta.

35

Ejemplo 7: Preparación de mAb anti CD27 de ratón AT124-1

40

Se prepararon células CHO secretoras de CD27 de ratón-huFc y se procesó el sobrenadante del mismo sobre Proteína A para purificar la proteína de fusión. Se inmunizaron ratas Lou con 50 microgramos/dosis de proteína de fusión en CFA, IFCA, después PBS siguiendo métodos convencionales. Los hibridomas se exploraron inicialmente en la proteína de fusión y posteriormente en las células. Las células fueron células de bazo activadas por Con A es decir, linfocitos T activados.

45

En comparación con CD27 de Hámster comercial (LG3A10 (Becton Dickinson) P 04 2 115), AT124-1 (el anticuerpo de la invención) estaba parcialmente o no estaba bloqueado por CD70-Fc (IFM de 110 hasta 80) mientras que LG3A10-PE estaba bloqueado de 1500 hasta 180 de IFM. Este experimento se repitió con P 04 2 130 con resultados similares.

50

Como se muestra en la Figura 7 tanto el anti CD27 de rata de la invención (AT124-1) como el anti CD27 de ratón de hámster de control positivo (LG3A10) marcaron las células transfectadas con CD27 de ratón. Ninguno de los anticuerpos se unió a células no transfectadas.

55

Resultados

Cambios fenotípicos en linfocitos T CD8 esplénicos y DC durante tratamiento con anti CD40 de linfoma BCL1

60

Efecto del bloqueo de las interacciones 4-1BBL/4-1BB y CD70/CD27 en la respuesta terapéutica a anti CD40

Los inventores investigaron la importancia de las moléculas 4-1BB y CD27 para la respuesta terapéutica vista después del tratamiento con mAb de CD40 de ratones portadores de tumores. El efecto de alterar las interacciones 4-1BBL/4-1BB y CD70/CD27 se investigó usando mAb de bloqueo específico para 4-1BBL y CD70. Se confirmó que AT113-2 (anti 4-1BBL) y TAN1-6 (anti CD70) serán capaces de alterar las interacciones 4-1BBL/4-1BB y CD70/CD27 respectivamente, mostrando que bloqueaban la unión de s4-1BBL-Fc y sCD70-Fc con linfocitos T

65

activados (Figura 1a y b). Además, ambos mAb se unieron a sus antígenos diana con afinidad similar como se determina por análisis de BIACore. Los valores de KD para AT113-2 (anti 4-1BBL) y TAN1-6 (anti CD70) fueron de $3,8 \times 10^{-9}$ y $3,0 \times 10^{-9}$ respectivamente. Para confirmar que los mAb anti CD70 y anti 4-1BBL eran capaces de bloquear respuestas *in vivo*, los inventores investigaron su efecto en la respuesta de CD8 endógena a OVA en ratones C57BL/6 (Figura 1c). Como se ha mostrado previamente (Taraban, Rowley *et al.* 2004), la expansión mediada por CD40 de linfocitos T CD8 específicos de OVA endógenos se inhibía casi completamente por mAb anti CD70. En comparación, el mAb anti 4-1BBL dio como resultado una reducción del 50% en el nivel de linfocitos T específicos de OVA inducidos por anti CD40.

Los inventores determinaron después el efecto de los mAb anti CD70 y anti 4-BBL en la respuesta terapéutica de ratones portadores de tumores BCL1 a mAb anti CD40. Los ratones se inocularon con 1×10^7 células tumorales BCL1 i.v. el día 0, y se trataron con anti CD40 los días 4, 5, 6 y 7 después del tumor. La Figura 2 muestra que, como han indicado previamente los inventores (French, Chan *et al.* 1999; Tutt, O'Brien *et al.* 2002) los ratones portadores de BCL1 tratados con anti CD40 están protegidos contra linfoma y llegan a convertirse en supervivientes a largo plazo (sobrevivieron más de 100 días). Sin embargo, el mAb de CD70 bloqueó completamente la actividad terapéutica del tratamiento con mAb de CD40. Por el contrario, los ratones que recibieron el mAb de 4-1BBL de bloqueo sobrevivieron durante una mediana de 73 días, en comparación con 18 días para el grupo no tratado, y después sucumbieron a la enfermedad, lo que sugiere algún deterioro en el desarrollo de la inmunidad a largo plazo en ausencia de coestimulación con 4-1BB. Los inventores hallaron uniformemente que los ratones tratados con mAb de CD40 que recibían tanto anti 4-1BBL como anti CD70 sucumbían al tumor ligeramente más pronto que los animales de control no tratados (mediana de la supervivencia en 14 días en comparación con 17 días), lo que sugiere que esta combinación podría bloquear la actividad terapéutica de mAb de CD40 y quizás también una respuesta espontánea débil al tumor.

Los inventores investigaron a continuación los efectos de bloquear con mAb anti 4-1BBL y anti CD70 sobre la cinética de la respuesta de CD8 al tratamiento con mAb de CD40. La Figura 3 muestra los efectos del mAb de 4-1BBL y anti CD70 sobre el crecimiento de BCL1 (Figura 3a) y la respuesta de linfocitos T CD8 (Figura 3b) en el bazo de ratones tratados con mAb de CD40. En comparación con mAb de CD40 solamente, el tratamiento con mAb de CD40 en presencia de anti 4-1BBL dio como resultado un retardo en la expansión de linfocitos T CD8 de aproximadamente 2 días dando como resultado la eliminación más lenta de células tumorales del bazo. Sin embargo, aunque estuviera retardado, el número final de células CD8 era al menos tan alto como con anti CD40 solamente. Resulta interesante que, en estos experimentos, cuando la dosis tumoral inicial fue de 5×10^7 células, en lugar de las 1×10^7 células usadas en la mayoría de los experimentos de inmunoterapia, los ratones tratados con mAb de CD40 y mAb de 4-1BBL de bloqueo llegaron a convertirse en supervivientes a largo plazo y fueron inmunes a una nueva exposición al tumor (resultados no mostrados).

Por el contrario, el mAb anti CD70 bloqueó completamente la radicación inducida por anti CD40 de células tumorales. Esta falta de respuesta se reflejó en la capacidad de la población de linfocitos T CD8+ para expandirse y explica la capacidad de mAb de CD70 para bloquear completamente la terapia mediada por mAb de CD40 de tumor BCL1 mostrada en la Figura 2. Los resultados demuestran que el bloqueo de interacciones anti CD70/anti CD27 tiene un profundo efecto en la respuesta terapéutica. Por el contrario, la influencia de la interacción 4-1 BBL/4-1 BB parece relativamente modesta.

Puesto que se ha observado que tanto anti 4-1BBL como anti CD70 tenían un efecto sobre la respuesta de CD8 inducida por mAb de CD40 (no mostrado) los inventores evaluaron adicionalmente si tenían algún efecto en los cambios inducidos por anti CD40 en el número de DC y fenotipo en ratones portadores de tumores. Como se muestra en la Figura 4, ni anti 4-1BBL ni anti CD70 inhibieron el aumento de la expresión de B7.1, B7.2 e ICAM (a) o en el número de DC recuperadas (b) después de tratamiento con anti CD40 de los ratones portadores de tumores. Por lo tanto el bloqueo de estos correceptores no influyó en el reclutamiento de DC y es poco probable que afecte a su activación.

CD27 y 4-1BB no actúan en el estadio efector de la respuesta antitumoral mediada por mAb de CD40. Puesto que los inventores han observado que las células tumorales BCL1 en sí mismas expresan tanto CD70 como 4-1BBL (Figura 5a) y también puesto que se ha indicado que CD70 también se expresa por linfocitos T activados (muy recientemente por Steve Rosenberg), los inventores investigaron después si el anti 4-1BBL y el anti CD70 tenían un efecto sobre el estadio efector de la respuesta de CTL. Se observó (observaciones no publicadas) que cuando se administran células tumorales BCL1 y se tratan con mAb anti CD40 en la cavidad peritoneal, entonces la respuesta de CD8 en ese compartimento alcanza un máximo el día 8 después del tratamiento, momento en el cual aproximadamente el 30% de los linfocitos recuperados son CD8+ (5% en ratones vírgenes) y elimina el tumor rápidamente. Este sistema se usó para investigar el estadio efector de destrucción mediada por CTL *in vivo*. Los ratones recibieron i.p. BCL1 y mAb anti CD40 como se describe y 8 días después se les inyectó anti CD40 i.p. con 1 mg de mAb de bloqueo anti 4-1BBL, anti CD8, anti CD4 o anti CD70, o PBS de control. Cinco horas después se les inyectó i.p. 2×10^7 esplenocitos marcados con CFSE de ratones portadores de BCL1 terminales como dianas de CTL. También se inyectaron esplenocitos marcados en ratones vírgenes como comparación. Veinticuatro horas después, se recogieron células de la cavidad peritoneal, y se analizaron con respecto a la presencia de células tumorales BCL1 marcadas con CFSE. Las células de la cavidad peritoneal recogidas de ratones vírgenes incluyeron

células tumorales marcadas con CFSE 22-27% (Figura 5). Por el contrario, las células tumorales se erradicaron completamente en ratones que se habían sometido a tratamiento con anti CD40 de BCL1, subrayando la eficacia de este tratamiento. Como se esperaba, la inyección de mAb anti CD8 bloqueó la eliminación de células tumorales marcadas con CFSE de la cavidad peritoneal. Sin embargo, los anti CD4, anti CD4-1BBL y anti CD70 no tuvieron ningún efecto en la eliminación de células tumorales transferidas. Estos resultados se confirmaron en un ensayo de citotoxicidad usando esplenocitos tomados de ratones portadores de BCL1 5 días después del tratamiento con anti CD40, después de la retirada de células tumorales residuales, como efectores, y los resultados se muestran en la Figura 5c. Ni anti 4-1BBL ni anti CD70 tuvieron un efecto directo sobre la citotoxicidad de esplenocitos inmunitarios.

10 Inmunoterapia directa mediante 4-1BB y CD27.

Los resultados anteriores sugieren que la sorprendente respuesta de CTL vista después de la inoculación de tumor y tratamiento con mAb de CD40, depende parcialmente del desencadenamiento mediante 4-1BB y depende completamente de interacciones entre CD27 y CD70. Por lo tanto, para investigar si se podía atajar la actividad agonista mediante CD40 y simular estos correceptores directamente, los inventores investigaron a continuación la potencia terapéutica de anti 4-1BB o anti CD27 agonistas contra el linfoma BCL1. Como se muestra en la Figura 6, el mAb anti CD70 era completamente protector para tumor BCL1 y dio resultados que eran muy similares a los obtenidos con mAb anti CD40. Por el contrario mAb anti 4-1BB tiene una actividad terapéutica modesta para este tumor, proporcionando poca prolongación de la supervivencia.

El mAb agonista de CD40 es uno de los reactivos más interesantes que se están investigando actualmente para uso humano. Durante algún tiempo se ha sabido que, incluso como una monoterapia, el mAb anti CD40 tiene eficacia en una serie de situaciones de vacuna, incluyendo inducción de inmunidad tumoral en modelos murinos y más recientemente en pacientes. Por ejemplo, los datos recientes de Vonderheide *et al* (2006) han mostrado que un mAb de CD40 completamente humano puede suministrar PR en el 27% de los pacientes de melanoma cuando se proporciona cerca de su MTD (0,2 mg/kg).

Aunque se sabe que el CD40 desempeña un papel crítico en el sistema inmunitario, particularmente en la activación de APC, tales como DC, se desconoce mucho acerca del papel de la interacción de correceptor:ligando entre la DC activada y el CTL correspondiente. Muchas pruebas muestran que el desencadenamiento mediante CD40, tal como el suministrado con un mAb, activa las DC dando como resultado la regulación positiva del MHC, B7.1/2, y diversos correceptores y citocinas, para permitir la generación de CTL efectores. Además, se encuentra en general que el uso del agonista de CD40 apropiado reemplaza la necesidad de linfocitos T auxiliares, y dada la escasez de epítopos auxiliares expresados por ciertos tumores, quizás esto explica el éxito de los agonistas de CD40 en una situación de cáncer. En la presente invención objeto los inventores han investigado el papel de 4-1BBL y CD70, y han mostrado lo importantes que son las señales mediante sus receptores respectivos, 4-1BB y CD27, en el control de las respuestas de CTL. Adicionalmente, los inventores descubrieron que el tratamiento con CD40 promueve una expansión de DC notable y, como se ha indicado ampliamente, un aumento en la expresión de ICAM-1, B7.1 y B7.2 en DC esplénicas, coherente con su activación o "licenciamiento" para presentación de antígenos. Se acepta en general que la respuesta antitumoral inducida por mAb de CD40 se debe a presentación cruzada de antígenos tumorales por APC activadas (van Mierlo, Boonman *et al.* 2004). De forma coherente con esto, los inventores han mostrado previamente que la terapia con mAb de CD40 es al menos parcialmente eficaz con tumores negativos para CD40 (French, Chan *et al.* 1999). Las DC esplénicas de ratones que recibieron solamente tumor mostraron un grado de activación, con regulación positiva parcial de B7.1, B7.2 e ICAM-1. Sin embargo, de forma en cierto modo sorprendente a la vista del claro efecto tanto de anti CD70 como de anti 4-1BBL sobre la respuesta inducida por CD40 a linfoma (Figura 2), a pesar de numerosos intentos, solamente se detectaron aumentos pequeños y transitorios en la expresión de CD70 y 4-1BBL después de tratamiento con anti CD40, e incluso estos se anularon en presencia de tumor. Resulta interesante que se ha mostrado también que la expresión de 4-1BBL en DC activadas *in vitro* es baja (DeBenedette, Shahinian *et al.* 1997; Futagawa, Akiba *et al.* 2002), aunque Diehl *et al* (Diehl, van Mierlo *et al.* 2002) han mostrado fuerte expresión en esplenocitos en respuesta a anti CD40 *in vivo*.

La baja expresión de 4-1BBL y CD70 en DC esplénicas *in vivo* puede reflejar una expresión transitoria de estos dos ligandos o modulación continua por interacción con sus receptores 4-1BB y CD27. Resulta interesante que los inventores han descubierto que el tratamiento de BMDC *in vitro* promueve la expresión de CD70, quizás debido a que no encuentra CD27. Aunque la expresión de CD70 se ha demostrado en DC activadas *in vitro* (Futagawa, Akiba *et al.* 2002; Tesselaar, Xiao *et al.* 2003) (Taraban, Rowley *et al.* 2002; Bullock y Yagita 2005), la expresión *in vivo* de CD70 en DC ha sido generalmente baja y transitoria (Tesselaar, Xiao *et al.* 2003; Hendriks, Xiao *et al.* 2005), supuestamente para evitar la activación inapropiada de linfocitos T mediante el CD27 expresado de forma constitutiva (Tesselaar, Arens *et al.* 2003).

A pesar de esta falta de expresión de CD70, el mAb contra 4-1BBL o CD70 fue eficaz en el bloqueo de la respuesta antitumoral y en el último caso la inhibición fue completa. Dicho bloqueo parecía actuar al nivel de estimulación de CTL, puesto que aunque estos mAb de bloqueo evitaron la generación de linfocitos T citotóxicos, no tenían efecto sobre el número o activación de DC esplénicas, o sobre la función citotóxica de los linfocitos T CD8 una vez que se habían generado. Juntos estos estudios muestran que 4-1BB y particularmente CD27 son críticos en el control de respuestas de CTL durante el tratamiento con mAb anti CD40, más probablemente para actuar al nivel de la

interacción entre el DC y los linfocitos T CD8 de respuesta.

La expresión de 4-1 BB en linfocitos T CD8 durante el desarrollo de la respuesta anti linfoma inducida por CD40 fue coherente con el patrón establecido (Vinay y Kwon 1998; Takahashi, Mittler *et al.* 1999) con 4-1BB rápidamente inducido en la población de CTL esplénicos inducidos por CD40 en expansión (Figura 1), y después se perdió junto con la erradicación de células tumorales, pero antes de la contracción de la población de CTL de uno a dos días después (Tutt, O'Brien *et al.* 2002). La expresión prolongada de 4-1 BB durante 4 días durante la respuesta, supuestamente debido a disponibilidad antigénica continua, se asemeja a la hallada durante la infección persistente y rechazo de trasplantes (Tan, Ha *et al.* 2000; Seo, Park *et al.* 2003). En ratones no tratados en el estadio de enfermedad terminal, los inventores identificaron una población clara de linfocitos T CD8+ 4-1BB, lo que apoya la idea de que BCL1 solo es capaz de inducir una respuesta de linfocitos T débil, ineficaz, que después se refuerza a un nivel eficaz por el tratamiento con mAb de CD40.

Aunque se induce 4-1BB en linfocitos T y hay pruebas de que proporciona coestimulación para la proliferación de linfocitos T (20), se cree que influye principalmente en la supervivencia celular (Takahashi, Mittler *et al.* 1999; Lee, Park *et al.* 2002), induciendo la expresión de proteínas antiapoptóticas (Lee, Park *et al.* 2002). Aunque la importancia de 4-1BB en el desarrollo de respuestas de CTL se ha demostrado en la situación de aloinjerto, en la que se ha mostrado que el bloqueo de las interacciones 4-1BB/4-1BBL da como resultado la potenciación de la supervivencia del injerto, con una inhibición de la expansión de linfocitos T alorreactivos y actividad de CTL reducida (Cho, Kwon *et al.* 2004), los estudios en ratones 4-1 BB^{-/-} y 4-1 BBL^{-/-} han mostrado solamente deterioro relativamente menor en respuestas de CTL primarias a infecciones virales (Tan, Whitmire *et al.* 2000; Bertram, Dawicki *et al.* 2004), con un efecto más pronunciado sobre la respuesta de recuerdo después de segunda exposición (Dawicki y Watts 2004). Resulta importante que los estudios que usan mAb agonistas anti 4-1BB *in vivo* han mostrado que son capaces de promover la terapia eficaz en una serie de modelos tumorales escasamente inmunogénicos (Wilcox, Flies *et al.* 2002) y que la señalización de 4-1BB es importante predominantemente durante las respuestas de CD8 (Shuford, Klussman *et al.* 1997).

Al contrario que 4-1BB, CD27 se expresa constitutivamente en linfocitos T vírgenes (Gravestain, Blom *et al.* 1993). Después de tratamiento anti CD40 de tumor, los inventores fueron capaces de detectar poblaciones de CD27 alto y bajo (Figura 1c) en los linfocitos CD8+ esplénicos en expansión, representando posiblemente células sensibilizadas con una regulación positiva transitoria de CD27 (Gravestain, Blom *et al.* 1993; Lens, de Jong *et al.* 1996) y una población de efectores terminales senescentes como se describe en Kaech *et al.* (Kaech, Tan *et al.* 2003) respectivamente. La expresión de su ligando, CD70, en DC está estrechamente regulada, evitando de este modo la activación inapropiada de linfocitos T (Tesselaar, Arens *et al.* 2003). Sin embargo, recientemente, se ha mostrado que el desencadenamiento constitutivo de CD27 por CD70 potencia tanto la expansión como la actividad de linfocitos CD8+ en respuesta a presentación viral o tumoral (Arens, Schepers *et al.* 2004). Los inventores han mostrado recientemente que CD70 soluble promueve respuestas de CTL primarias y secundarias fuertes *in vivo* (Rowley y Al-Shamkhani 2004). Por el contrario, los ratones deficientes en CD27 desarrollan respuestas de CD8+ alteradas a virus de la gripe y, como 4-1BB, CD27 parece promover la supervivencia de linfocitos T CD8+ activados durante la respuesta primaria (Hendriks, Gravestain *et al.* 2000; Hendriks, Xiao *et al.* 2003), pero que, a diferencia de 4-1BB, también es importante en respuestas CD4+. Los ratones deficientes en CD27 también muestran una respuesta alterada a segunda exposición (Hendriks, Gravestain *et al.* 2000).

Además de la idea bien establecida de que la expansión de linfocitos T requiere coestimulación entre ligandos en DC y receptores coestimuladores en linfocitos T, la detección de estas moléculas en otros tipos celulares sugiere un papel para una red más compleja de interacciones durante la respuesta de linfocitos T. Por ejemplo, se ha detectado CD70 en linfocitos T activados (Borst, Hendriks *et al.* 2005; Hendriks, Xiao *et al.* 2005) y 4-1BB en DC activadas tanto *in vivo* como *in vitro*. Aunque los inventores no pudieron detectar CD70 en linfocitos T activados en su estudio, se detectó claramente 4-1BB en DC activadas durante el transcurso de la respuesta (resultados no mostrados).

Finalmente, los inventores confirmaron la importancia relativa de desencadenar mediante CD70 usando un mAb agonista de CD27 como agentes terapéuticos para linfoma de ratón. Los datos en el presente documento muestran que el mAb de CD27 era tan eficaz como el mAb de CD40 en el desarrollo de inmunidad tumoral. El trabajo en curso está investigando el mecanismo de acción de este mAb, que supuestamente actúa estimulando los linfocitos T directamente. La dependencia total de la respuesta de linfocitos T CD8 inducida por anti CD40 en los modelos de linfoma tanto OVA como BCL1 en las interacciones de CD70/CD27 es coherente con los efectos indicados de la ruta coestimuladora CD70:CD27 en estudios usando modelos virales. Aunque la importancia de las interacciones 4-1BB/4-1BBL en el desarrollo de respuestas de CTL se ha demostrado en la situación de aloinjerto, donde el bloqueo de interacciones 4-1BB/4-1BBL da como resultado potenciación de la supervivencia del injerto (DeBenedette, Wen *et al.* 1999; Cho, Kwon *et al.* 2004), los estudios en ratones 4-1BB^{-/-} y 4-1BBL^{-/-} han mostrado deterioros solamente relativamente menores en respuestas de CTL primarias a infecciones por LCMV y gripe (Bertram, Dawicki *et al.* 2004) (Tan, Whitmire *et al.* 1999) (Hendriks, Xiao *et al.* 2005). La observación de que los ratones 4-1BBL^{-/-} mostraban un defecto más grave en su respuesta después de inmunización con un péptido de LCMV lipidado (Tan, Whitmire *et al.* 2000) sugirió que la coestimulación con 4-1BB es más crítica cuando la estimulación antigénica es débil o limitante. Por el contrario, los ratones deficientes en CD27 desarrollan respuestas de CD8+ alteradas a virus de la gripe en el pulmón y ganglio linfático de drenaje, aunque resulta interesante que la expansión de linfocitos CD8

- antivirales en el bazo estaba relativamente inalterada (Hendriks, Xiao *et al.* 2003) en este sistema. Se ha mostrado que los ratones deficientes tanto en 4-1BB como en CD27 demuestran una respuesta secundaria alterada a la segunda exposición viral (Hendriks, Gravestein *et al.* 2000) (Dawicki y Watts 2004). Aunque los experimentos de los inventores muestran que la presencia de mAb anti 4-1BBL no evitó la eliminación inicial del tumor después de
- 5 tratamiento con anti CD40, en los experimentos de inmunoterapia de los inventores los animales que recibieron mAb anti CD40 y anti 4-1BBL no llegaron a convertirse en supervivientes a largo plazo (Figura 2), lo que sugiere algún deterioro en el desarrollo de su inmunidad a largo plazo. En resumen, estos resultados y las conclusiones subyacentes basadas en ellos enumeradas anteriormente sugieren que las terapias de combinación y monoterapias que usan anticuerpos agonistas de CD27, por ejemplo, combinaciones agonistas sinérgicas, proporcionarán un
- 10 nuevo medio para promover la inmunidad de Th1 y proliferación de linfocitos T CD8+ y pueden usarse en el tratamiento de cáncer, infección, inflamación, alergia y autoinmunidad y para promover la eficacia de las vacunas.
- Al-Shamkhani, A., S. Mallett, *et al.* (1997). "Affinity and Kinetics of the Interaction between Soluble Trimeric OX40 Ligand, a Member of the Tumor Necrosis Factor Superfamily, and Its Receptor OX40 on Activated T Cells." *J. Biol. Chem.* 272(8): 5275-5282.
- 15 Bennett, S. R. M., F. R. Carbone, *et al.* (1998). "Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling." *Nature* 393(6684): 478-480.
- 20 Carreno, B. M. y M. Collins (2002). "THE B7 FAMILY OF LIGANDS AND ITS RECEPTORS: New Pathways for Costimulation and Inhibition of Immune Responses." *Annual Review of Immunology* 20(1): 29-53.
- Cella, M., D. Scheidegger, *et al.* (1996). "Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation." *J. Exp. Med.* 184 (2): 747-752.
- 25 DeBenedette, M. A., A. Shahinian, *et al.* (1997). "Costimulation of CD28- T lymphocytes by 4-1BB ligand." *J Immunol* 158(2): 551-559.
- DeBenedette, M. A., T. Wen, *et al.* (1999). "Analysis of 4-1BB ligand (4-1BBL)-deficient mice and of mice lacking both 4-1 BBL and CD28 reveals a role for 4-1 BBL in skin allograft rejection and in the cytotoxic T cell response to influenza virus." *J Immunol* 163(9): 4833-41.
- 30 Diehl, L., G. J. D. van Mierlo, *et al.* (2002). "In Vivo Triggering Through 4-1BB Enables Th-Independent Priming of CTL in the Presence of an Intact CD28 Costimulatory Pathway." *J Immunol* 168(8): 3755-3762.
- 35 French, R. R., H. T. C. Chan, *et al.* (1999). "CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help." *Nat Med* 5(5): 548-553.
- 40 Futagawa, T., H. Akiba, *et al.* (2002). "Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells." *Int. Immunol.* 14(3): 275-286.
- George, A. J., H. M. McBride, *et al.* (1991). "Monoclonal antibodies raised against the idiotype of the murine B cell lymphoma, BCL1 act primarily with heavy chain determinants." *Hybridoma* 10(2): 219-27.
- 45 Gravestein, L. A., B. Blom, *et al.* (1993). "Cloning and expression of murine CD27: comparison with 4-1 BB, another lymphocyte-specific member of the nerve growth factor receptor family." *Eur J Immunol* 23(4): 943-50.
- Hendriks, J., L. A. Gravestein, *et al.* (2000). "CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity." *Nat Immunol* 1(5): 433-40.
- 50 Hendriks, J., Y. Xiao, *et al.* (2003). "CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool." *J Exp Med* 198(9): 1369-80.
- Hendriks, J., Y. Xiao, *et al.* (2005). "During viral infection of the respiratory tract, CD27, 4-1BB, and OX40 collectively determine formation of CD8+ memory T cells and their capacity for secondary expansion." *J Immunol* 175(3): 1665-76.
- 55 Huang, J., K. W. Kerstann, *et al.* (2006). "Modulation by IL-2 of CD70 and CD27 Expression on CD8+ T Cells: Importance for the Therapeutic Effectiveness of Cell Transfer Immunotherapy." *J Immunol* 176(12): 7726-35.
- 60 Kaech, S. M., J. T. Tan, *et al.* (2003). "Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells." *Nat Immunol* 4(12): 1191-8.
- Krop, I., A. de Fougerolles, *et al.* (1996). "Self-renewal of B-1 lymphocytes is dependent on CD19." *Eur J Immunol.* 26(1): 238-242.
- 65

- Lens, S. M., R. de Jong, *et al.* (1996). "Phenotype and function of human B cells expressing CD70 (CD27 ligand)." *Eur J Immunol* 26(12): 2964-71.
- 5 Lenschow, D. J., T. L. Walunas, *et al.* (1996). "CD28/B7 SYSTEM OF T CELL COSTIMULATION." *Annual Review of Immunology* 14(1): 233-258.
- Murray, H. W., C. M. Lu, *et al.* (2003). "Modulation of T-Cell Costimulation as Immunotherapy or Immunotherapy in Experimental Visceral Leishmaniasis." *Infect. Immun.* 71(11): 6453-6462.
- 10 Napolitani, G., A. Rinaldi, *et al.* (2005). "Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells." *Nat Immunol* 6(8): 769-76.
- Quezada, S. A., L. Z. Jarvinen, *et al.* (2004). "CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity." *Annu Rev Immunol* 22: 307-28.
- 15 Ridge, J. P., F. Di Rosa, *et al.* (1998). "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell." *Nature* 393(6684): 474-478.
- Rowley, T. F. y A. Al-Shamkhani (2004). "Stimulation by Soluble CD70 Promotes Strong Primary and Secondary CD8+ Cytotoxic T Cell Responses In Vivo." *J Immunol* 172(10): 6039-6046.
- 20 Slavin, S. y S. Strober (1978). "Spontaneous murine B-cell leukaemia." *nature* 272(5654): 624-626.
- Taraban, V. Y., T. F. Rowley, *et al.* (2004). "Cutting Edge: A Critical Role for CD70 in CD8 T Cell Priming by CD40-Licensed APCs." *J Immunol* 173(11): 6542-6546.
- 25 Tesselaar, K., Y. Xiao, *et al.* (2003). "Expression of the Murine CD27 Ligand CD70 In Vitro and In Vivo." *J Immunol* 170(1): 33-40.
- 30 Toes, R. E. M., S. P. Schoenberger, *et al.* (1998). "CD40-CD40Ligand interactions and their role in cytotoxic T lymphocyte priming and anti-tumor immunity." *Seminars in Immunology* 10(6): 443-448.
- Tutt, A. L., L. O'Brien, *et al.* (2002). "T Cell Immunity to Lymphoma Following Treatment with Anti-CD40 Monoclonal Antibody." *J Immunol* 168(6): 2720-2728.
- 35 van Mierlo, G. J. D., A. T. den Boer, *et al.* (2002). "CD40 stimulation leads to effective therapy of CD40-tumors through induction of strong systemic cytotoxic T lymphocyte immunity." *PNAS* 99(8): 5561-5566.
- Vonderheide, R. H., J. P. Dutcher, *et al.* (2001). "Phase I study of recombinant human CD40 ligand in cancer patients." *J Clin Oncol* 19(13): 3280-7.
- 40 Watts, T. H. (2005). "TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses." *Annu Rev Immunol* 23: 23-68.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un anticuerpo agonista anti CD27 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo en la preparación de un medicamento para uso en un método para tratar cáncer,
 5 estando dicho anticuerpo o fragmento opcionalmente unido a un resto efector, seleccionándose dicho anticuerpo o fragmento preferentemente de los siguientes:
- (i) un anticuerpo agonista anti CD27 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo seleccionado de un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico preferentemente que contiene una región constante humana, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo primatizado y anticuerpo monocatenario;
 10 (ii) un anticuerpo agonista anti CD27 humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo que contiene al menos un dominio constante humano seleccionado de los dominios constantes de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE; o
 15 (iii) un anticuerpo agonista anti CD27 humano que comprende un anticuerpo IgG1 intacto, un anticuerpo IgG2 intacto, un anticuerpo IgG3 intacto, un anticuerpo IgG4 intacto, un anticuerpo IgM intacto, un anticuerpo IgA1 intacto, un anticuerpo IgA2 intacto, un anticuerpo IgA secretor intacto, un anticuerpo IgD intacto, un anticuerpo IgA2 intacto, en el que el anticuerpo está glicosilado en una célula eucariota.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde el anticuerpo agonista o fragmento del mismo posee al menos una de las siguientes propiedades:
- (i) reconoce una parte extracelular de CD27 humano;
 25 (ii) la unión del mismo con CD27 no se ve afectada de forma apreciable por CD70 humano o ligandos relacionados con CD70;
 (iii) compite con CD70;
 (iv) está modificado por ingeniería genética para modificar la unión con los sistemas efectores de anticuerpo, pudiendo ser dicha modificación
 30 a) potenciación de la unión, o
 b) reducción de la unión;
 (v) está modificado para alterar al menos uno de glicosilación de Fc, unión con FcR, unión con FcRn, e interacción con proteínas del sistema de complemento;
 (vi) comprende una o más modificaciones que se seleccionan de modificaciones que reducen o potencian la interacción con proteínas del sistema de complemento, o reducen toxicidad indeseable incluyendo la liberación indeseable de citocinas;
 35 (vii) promueve las respuestas inmunitarias de linfocitos T en seres humanos;
 (viii) promueve la inmunidad de Th1;
 (ix) promueve la proliferación o supervivencia de linfocitos T específicos de antígeno incluyendo al menos uno de linfocitos T CD8+ vírgenes o no vírgenes, linfocitos efectores CD8+ o células de memoria, o linfocitos T que opcionalmente pueden estar modificados por ingeniería genética que se han expandido *in vitro* y después se han transferido a seres humanos;
 40 (x) induce proliferación, supervivencia y/o respuesta lítica de linfocitos citotóxicos (CTL) de linfocitos T CD8 potenciadas en un sujeto que lo necesite;
 (xi) promueve la generación de linfocitos T de memoria específicos de antígeno *in vivo*; o
 45 (xii) conduce la expansión de linfocitos T de una manera dependiente de antígeno *in vivo*.
3. Uso se acuerdo con la reivindicación 1 o 2 donde el método para tratar cáncer comprende además administrar al menos un anticuerpo agonista anti CD40, OX-40, 4-1BB o CTLA-4 y/o al menos un antígeno o alérgeno; en el que dichos restos pueden administrarse por separado o administrarse en combinación.
 50
4. El uso de la reivindicación 3 donde el método para tratar cáncer da como resultado al menos uno de los siguientes:
- (i) promoción de las respuestas inmunitarias de linfocitos T;
 55 (ii) promoción de la generación de linfocitos T de memoria específicos de antígeno;
 (iii) promoción de la expansión de linfocitos T de una manera dependiente de antígeno;
 (iv) promoción de la inmunidad de Th1;
 (iv) promueve la proliferación o supervivencia de linfocitos T específicos de antígeno incluyendo al menos uno de linfocitos T CD8+ vírgenes o no vírgenes, células efectoras CD8+, o células de memoria, o linfocitos T que opcionalmente pueden estar modificados por ingeniería genética que se han expandido *in vitro* y después se han transferido a seres humanos;
 60 (xii) promoción de la generación de linfocitos T de memoria específicos de antígeno *in vivo*;
 (xiii) conduce la expansión de linfocitos T de una manera dependiente de antígeno *in vivo*; o
 (xiii) induce la proliferación, supervivencia y/o respuesta lítica de linfocitos citotóxicos (CTL) de linfocitos T CD8 potenciadas en un sujeto que lo necesite.
 65

5. El uso de la reivindicación 4 en el que dicho anticuerpo agonista de CD27 anti CD27 humano o fragmento de unión a antígeno del mismo se administra en combinación con otro resto terapéutico, por ejemplo, uno seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 (i) otro agonista inmunitario,
 (ii) anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo agonista o antagonista anti CD40, por ejemplo, proteína de fusión de CD40L soluble LOB 7/4 013 o fragmento de CD40 soluble o un conjugado de los mismos,
 (iii) un anticuerpo anti OX40,
 (iv) un anticuerpo anti 4-IBB,
 10 (v) un anticuerpo anti CD70,
 (vi) un anticuerpo anti B7.1,
 (vii) un anticuerpo anti B7.2,
 (viii) un anticuerpo anti CTLA-4,
 (ix) un anticuerpo anti CD28,
 15 (ix) un resto que agota o bloquea los linfocitos T reguladores,
 (x) una citocina,
 (xi) un producto quimioterapéutico,
 (xii) un producto radioterapéutico,
 (xiii) un inmunomodulador,
 20 (xiv) un inmunostimulador,
 (xv) un anticuerpo estimulador inmunitario o proteína que actúa como un coestimulador positivo,
 (xvi) un anticuerpo inmunitario o proteína que actúa como un coestimulador negativo,
 (xvii) un anticuerpo u otro resto que bloquea las señales inhibitorias a linfocitos T, y
 (xviii) un anticuerpo que se une a células tumorales o vasculatura o estroma.

25 6. El uso de la reivindicación 4 en el que el antígeno es un antígeno asociado a tumor o cáncer seleccionado del grupo que consiste en un péptido asociado a tumor (TAA), lisado tumoral, células tumorales apoptóticas y células dendríticas portadoras de tumores, por ejemplo, un antígeno de melanoma y la combinación potencia (refuerza) la respuesta inmunitaria inducida contra las células tumorales que expresan el antígeno diana.

30 7. El uso de la reivindicación 4 que comprende el uso de (i) al menos un agonista de CD27, por ejemplo, un anticuerpo agonista de CD27 o una proteína de fusión de CD70 soluble o un fragmento soluble o conjugado soluble del mismo y (ii) al menos un agonista seleccionado de un agonista de CD40, por ejemplo, un anticuerpo quimérico, humano o humanizado que se une específicamente con CD40 humano, más preferentemente SC26, CP-870,693, 35 LOB 714 o un derivado de los mismos o un anticuerpo que posee la misma especificidad epitópica; un anticuerpo de 4-IBB (CD 137), un anticuerpo de OX-40, un anticuerpo de CD28 y un anticuerpo de CTLA-4 y donde dichos agonistas se administran por separado, en cualquier orden, o en combinación donde dicha administración que da como resultado la inducción de forma aditiva o sinérgica de una respuesta de linfocitos T potenciada que comprende 40 administrar al sujeto que lo necesite una cantidad aditiva o sinérgicamente eficaz de (i) al menos un agonista de CD27 y (ii) al menos un agonista seleccionado de un agonista de CD40, un anticuerpo de 4-IBB (CD 137), un anticuerpo de OX-40, un anticuerpo de CD25 y un anticuerpo de CTLA-4, y en el que dichos agonistas se administran por separado, en cualquier orden, o en combinación y opcionalmente que incluye además la administración de un antígeno, por ejemplo, seleccionado de un antígeno tumoral, antígeno bacteriano, antígeno viral, antígeno parasitario, alérgeno y autoantígeno y dicho uso incluye además opcionalmente la administración de 45 al menos un producto quimioterapéutico o citocina, por ejemplo, un interferón, interleucina, factor de necrosis tumoral o factor estimulante de colonias.

50 8. El uso de la reivindicación 7 donde dichos agonistas se administran en un intervalo de un día entre sí, más preferentemente en un intervalo de 8 horas entre sí o en un intervalo de 1-4 horas entre sí.

9. El uso de la reivindicación 7 que se usa para tratar cáncer que expresa CD40 o un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: cáncer de mama, de hígado, ovárico, colorrectal, de pulmón, de estómago, de riñón, melanoma, ovárico o renal y linfoma, por ejemplo, linfoma no de Hodgkin.

55 10. Un anticuerpo agonista anti CD27 humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y/o al menos un antígeno o alérgeno para uso simultáneo, separado o secuencial en un método para tratar cáncer.

60 11. Un anticuerpo agonista anti CD27 humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo para uso en el tratamiento de cáncer.

12. El anticuerpo agonista anti CD27 humano, o un fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 11 en el que el anticuerpo o fragmento posee al menos una de las propiedades definidas en la reivindicación 2.

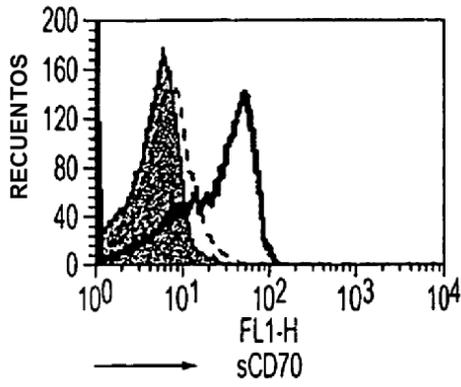


FIG. 1A

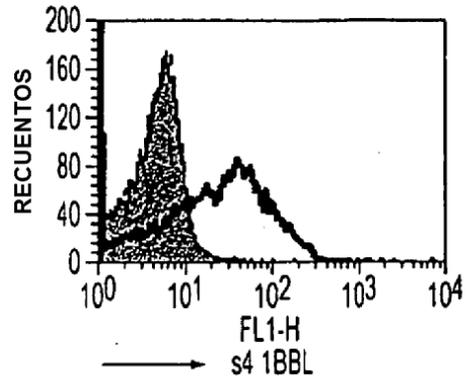


FIG. 1B

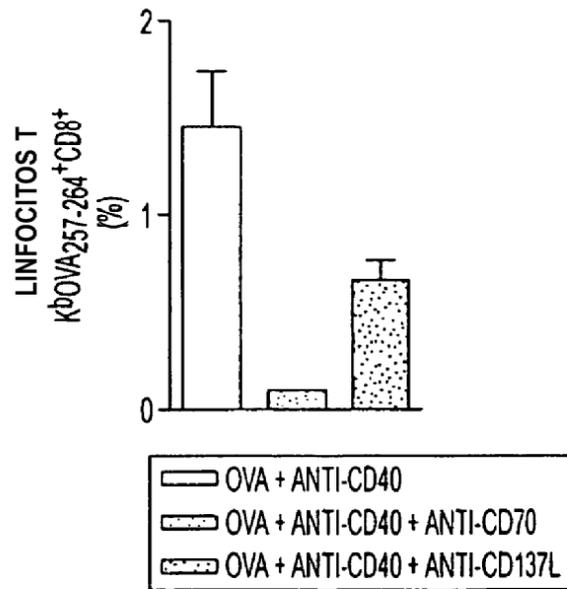


FIG. 1C

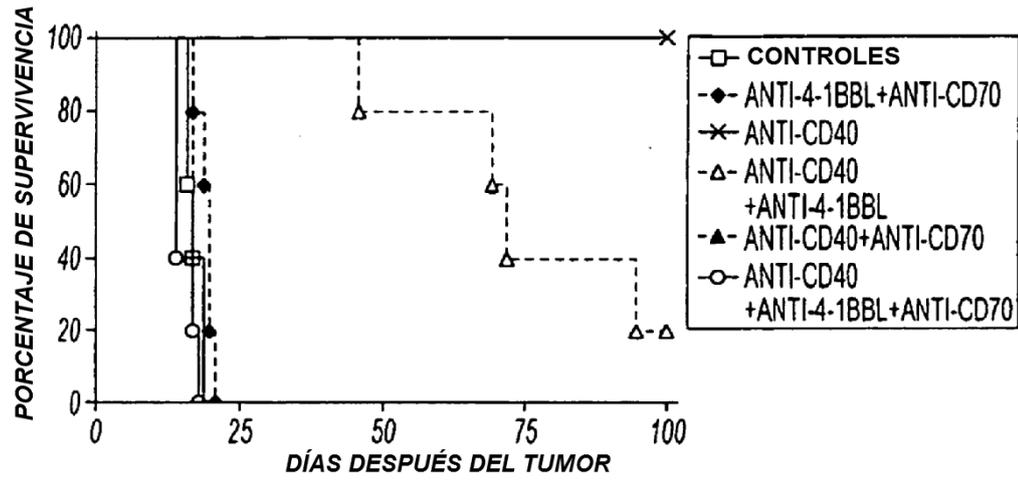


FIG. 2

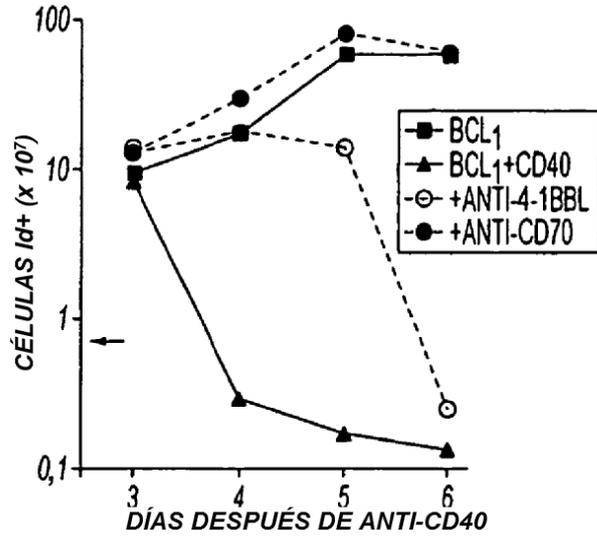


FIG. 3A

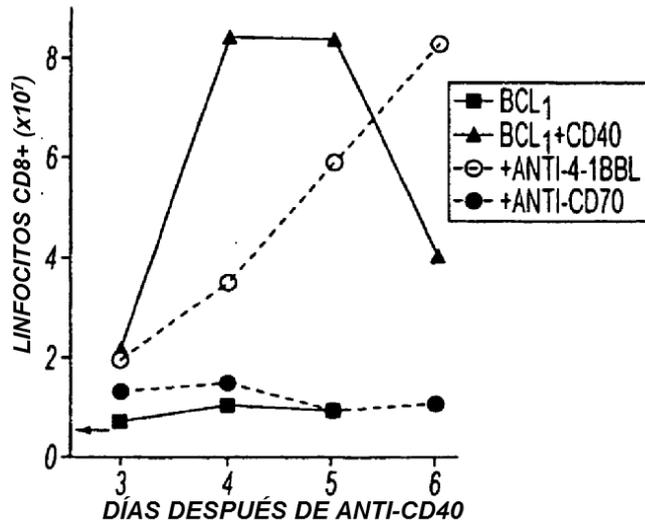


FIG. 3B

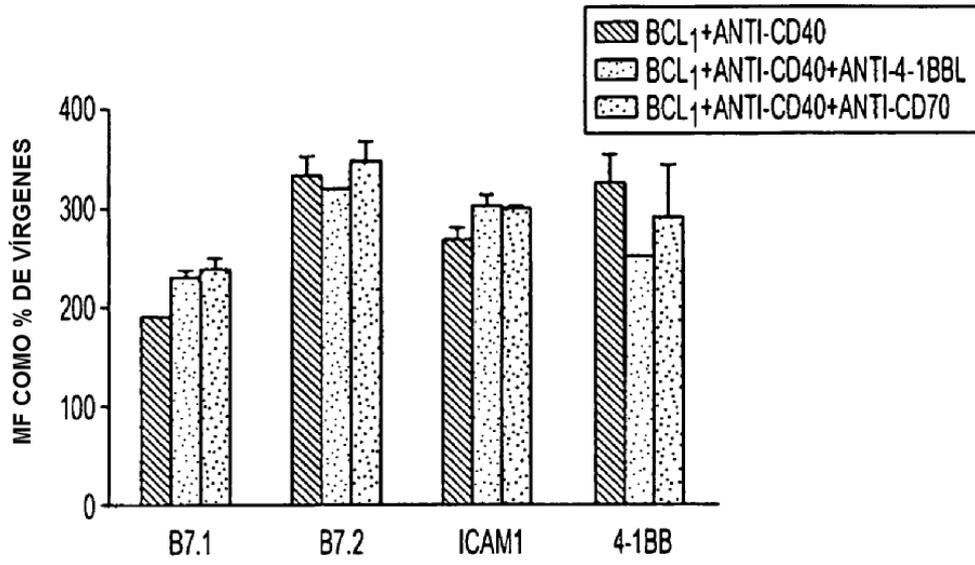


FIG. 4A

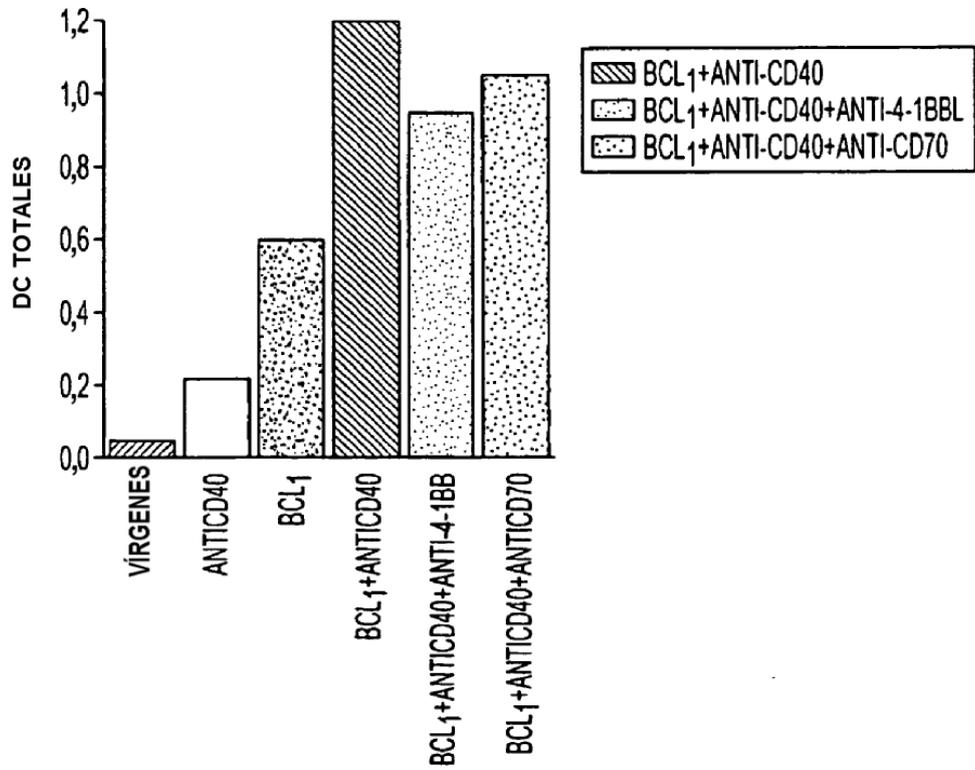


FIG. 4B

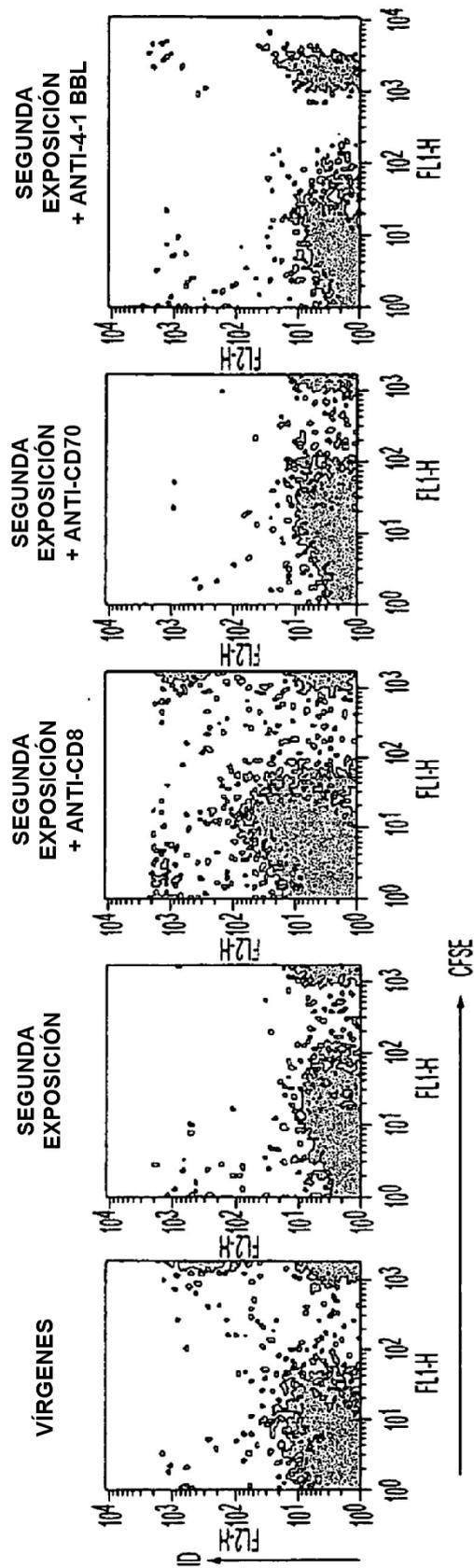


FIG. 5A

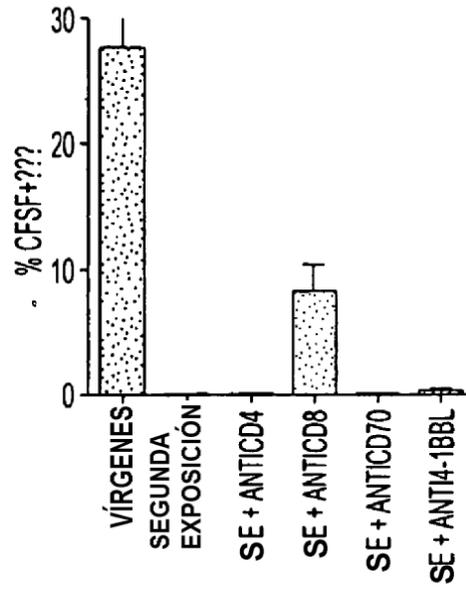


FIG. 5B

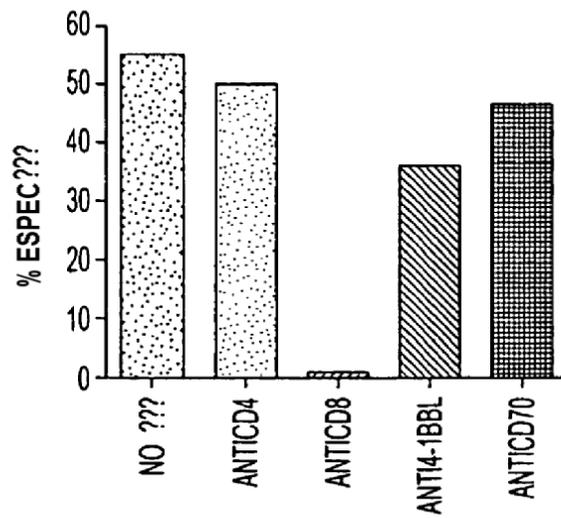


FIG. 5C

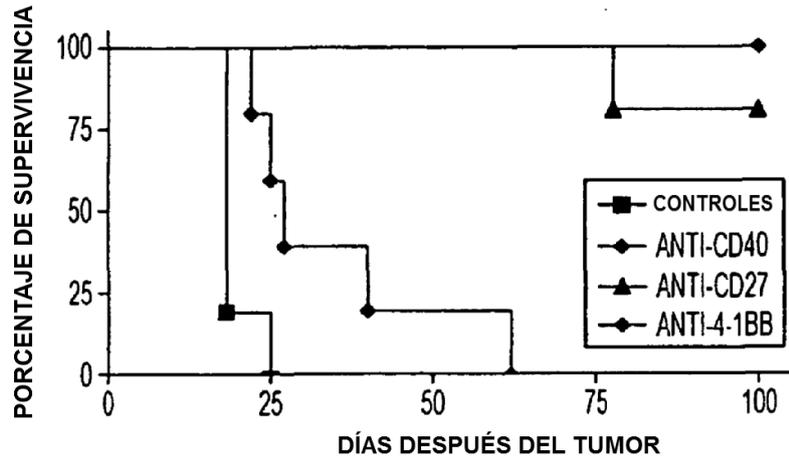


FIG. 6

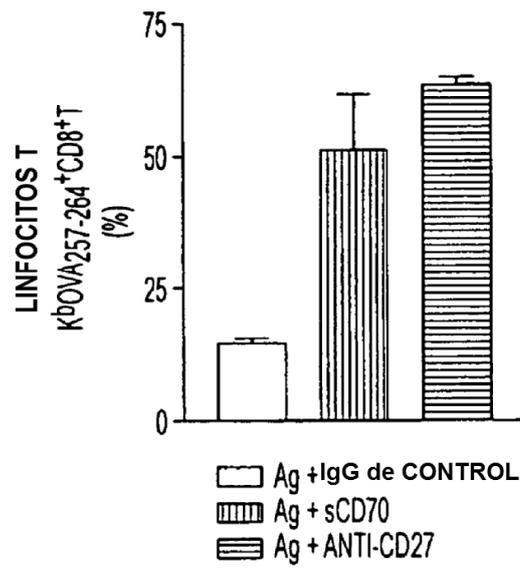


FIG. 7

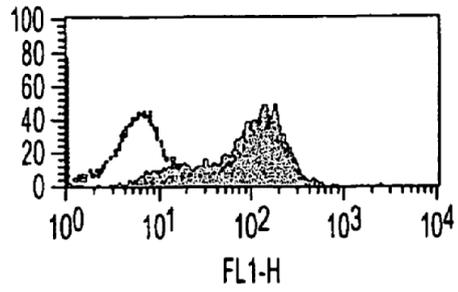


FIG. 8A

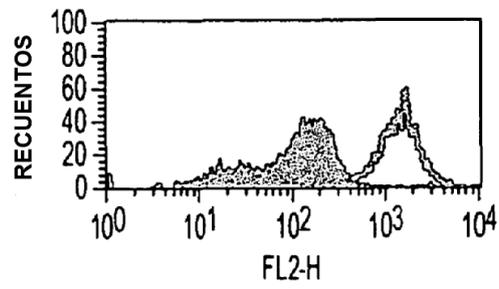


FIG. 8B

AT124-1(ANTI-CD27)
(FITC DIRECTO)



FIG. 9A

M5/114 (IgG de RATA de CONTROL)
(FITC DIRECTO)



FIG. 9B

LG3A10 (ANTI-CD27 de HÁMSTER)
(PE DIRECTO)



FIG. 9C

M418 (IgG de HÁMSTER de CONTROL)
(PE DIRECTO)

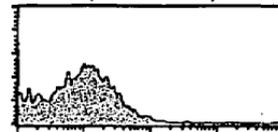


FIG. 9D

AT124-1 ANTI-CD27 DE RATA
(MARCAJE INDIRECTO)

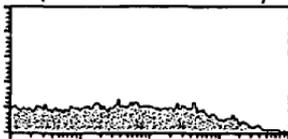


FIG. 9E

M5/114 IgG de RATA de CONTROL
(MARCAJE INDIRECTO)



FIG. 9F

LG3A10 (ANTI-CD27 de HÁMSTER)
(MARCAJE INDIRECTO)



FIG. 9G

N418 IgG de HÁMSTER DE CONTROL
(MARCAJE INDIRECTO)



FIG. 9H