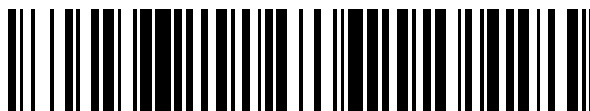


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 386**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2005 E 05737106 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 1740617**

54 Título: **Método para el tratamiento de condiciones mediadas por células T por la disminución de las células positivas de ICOS in vivo.**

30 Prioridad:

23.04.2004 EP 04009659

21.06.2004 US 581479 P

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

11.02.2014

73 Titular/es:

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND
LETZTVERTRETEN DURCH DAS ROBERT KOCH-
INSTITUT VERTRETEN DURCH SEINEN PR
(100.0%)**

**NORDUFER 20
13353 BERLIN, DE**

72 Inventor/es:

KROCZEK, RICHARD

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 442 386 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

Método para el tratamiento de condiciones mediadas por células T por la disminución de las células positivas de ICOS in vivo.

5 La presente invención se relaciona en general con agentes enlazantes útiles en la disminución selectiva de células T in vivo. Más específicamente, la invención se relaciona a agentes enlazantes de ICOS que una vez enlazados a los expresados ICOS en la superficie de las células, en particular células T soporte de ICOS, resultan en la disminución in vivo de las células a las que están enlazados. Métodos de tratamiento de enfermedades relacionadas con células T usando dichos agentes enlazantes de ICOS, composiciones farmacéuticas que comprenden dichos agentes enlazantes de ICOS, un método de identificación de un agente enlazante de ICOS, y también se proporcionan anticuerpos anti-ICOS monoclonales capaces de eliminación in vivo de células que expresan ICOS en su superficie.

10 El concepto de disminución de las células T en la enfermedad autoinmune y trasplante no es nuevo y ha sido practicado con éxito en la clínica por décadas (Hargreaves REG, Trends in Molecular Medicine 2004;10: 130-135). Sin embargo, los antígenos que fueron dirigidos sobre las células T (CD3, CD4, CD52) se expresan ampliamente en células T en reposo y activadas o incluso en otros tipos de células. Por lo tanto, los regímenes terapéuticos existentes son ampliamente inmunosupresores. La disminución de las células T activadas que expresan ICOS in vivo, tal como se describe en la presente invención, ofrece mucha mayor especificidad del efecto terapéutico, ya que ICOS se expresa solamente de manera significativa en las células T efectoras activadas. (Löhning M, Journal of Experimental Medicine 2003;197:181-193; Bonhagen K, European Journal of Immunology 2003;33:392-401).

15 En la Solicitud de Patente Europea EP1 158 004 A2 se describen anticuerpos humanos, los cuales pueden matar transfectantes que sobreexpresan ICOS in vitro basados en el mecanismo de Citotoxicidad Mediada por Células Dependiente de Anticuerpos (ADCC) con linfocitos de sangre periférica humana. El experimento descrito demuestra que los anticuerpos utilizados pueden mediar un cierto tipo de citotoxicidad *in vitro* pero no proporciona ninguna información si las células T que expresan ICOS pueden en modo alguno ser disminuidas in vivo. Hay un número de razones, por qué este experimento no pueda proveer esta información: 1. Líneas transfectadas que sobreexpresan ICOS fueron usadas como objetivos y las células T no normales con expresión de ICOS fisiológica. 2. ADCC tal como se usa en el experimento descrito con frecuencia ha sido demostrado como un mecanismo de disminución celular in vitro, pero ha sido excluido en gran medida como un mecanismo para la disminución celular in vivo (Alters SE, Journal of Immunology 1990;144: 4587-4592; Uchida J, Journal of Experimental Medicine 2004;199:1659-1669). La ADCC trabajará in vitro con cualquier anticuerpo capaz de enlazarse a una molécula de superficie teniendo el isótopo derecho a ser reconocido por las células citotóxicas in vitro. 3. Hay una variedad de razones adicionales (véase abajo), por qué las pruebas de disminución in vitro en general no tienen ningún valor predictivo para la disminución in vivo (Uchida J, Journal of Experimental Medicine 2004;199:1659-1669, Isaacs JD, Rheumatology 2001;40:724-738). Esta es la razón por la que ha sido difícil generar anticuerpos de disminución in vivo dirigidos contra otros antígenos de activación de la superficie de células T como CTLA-4 o OX40, puesto que (por ejemplo basado en ADCC) la disminución de células T contra estos objetivos funcionará bien in vivo (Hargreaves REG, Trends in Molecular Medicine 2004;10:130-135).

20 Un mayor número de factores son importantes en la determinación de si una molécula de superficie celular determinado puede ser utilizado como un objetivo para la disminución celular in vivo: nivel de expresión de superficie de la célula de la molécula objetivo, valencia del antígeno objetivo, la distribución del antígeno objetivo en la superficie de la célula, su proximidad a la membrana celular, ocurrencia o no de internalización de la molécula objetivo después del enlazamiento del anticuerpo, el curso y la duración de la expresión fisiológica, la accesibilidad del antígeno objetivo en varios tejidos (nodos linfáticos, bazo, sangre), y otros factores (Alters SE, Journal of Immunology 1990;144:4587-4592; Uchida J, Journal of Experimental Medicine 2004;199:1659-1669; Isaacs JD, Rheumatology 2001;40:724-738). Estos factores y por lo tanto la utilidad general de una molécula determinada como un objetivo para la disminución celular sólo pueden ser probados usando un modelo apropiado in vivo.

25 Por otra parte, ICOS como molécula co-estimuladora plantea el peligro de que los anticuerpos u otros agentes dirigidos a ICOS en lugar de disminución a una activación adversa y a la expansión de células T ICOS⁺ in vivo con enfermedades potencialmente severas- agravando los efectos. Hasta la fecha no hay datos disponibles si las células T se pueden disminuir in vivo utilizando una molécula co-estimulante como objetivo. Las pruebas in vitro para efectos co-estimulantes ICOS no tienen un valor predictivo para la situación in vivo. Las pruebas in vitro para efectos co-estimulantes de ICOS no tienen un valor predictivo para la situación in vivo, puesto que muchos parámetros críticos muchos parámetros críticos no pueden ser reproducidos correctamente in vitro (por ejemplo densidad de

superficie de ICOS y distribución de la superficie, características de enlace de los agentes enlazantes de ICOS a diversos tejidos, etc.). Por lo tanto, la cuestión de si ICOS se puede utilizar como un objetivo para una disminución terapéutica de las células T activadas *in vivo* sin la activación de células adversa y la proliferación sólo puede ser contestada en un modelo apropiado de enfermedad *in vivo*. Solamente una prueba de este tipo *in vivo* tiene una capacidad predictiva para la utilidad de ICOS como objetivo terapéutico. Al mismo tiempo, solo las pruebas *in vivo* tienen un valor predictivo para la utilidad de los anticuerpos monoclonales dirigidos a ICOS como agentes de disminución.

En la presente invención se describe que es posible disminuir las células T que expresan ICOS *in vivo* sin reacciones adversas (por ejemplo activación celular, proliferación, expansión de células T que expresan ICOS) en un modelo de alergia de pulmones con el uso de anticuerpos monoclonales. Además se demuestran que es posible atenuar la enfermedad modelo por disminución de células ICOS⁺ *in vivo*.

El sistema inmune se compone de varios tipos de células altamente especializadas, entre ellos linfocitos T. Fisiológicamente, los linfocitos T circulan en el cuerpo en un estado de reposo. Bajo estas circunstancias, las células T expresan en su superficie el receptor de células T, el cual es responsable por el reconocimiento de antígeno. Además del receptor de células T, los linfocitos T en reposo expresan un número de otras moléculas de la superficie celular de una manera constitutiva. Algunas de estas proteínas superficiales son responsables de la migración adecuada de las células T a través de compartimentos del cuerpo, algunos proporcionan fuerzas de enlace ("adhesión") a otras células del sistema inmune, algunos se expresan para asegurar la activación apropiada de las células T una vez que éstos reconocen su antígeno (por ejemplo CD4, CD8, CD3, CD28). Siempre que las células T que patrullan los diversos compartimentos corporales no encuentren un antígeno al que se dirige su receptor de células T, permanecen en reposo y no cambian su patrón de moléculas de superficie celular. Una vez que las células T encuentran antígeno presentado por "células presentadoras de antígeno" (por ejemplo las células dendríticas), las células T se activan parcialmente. El reconocimiento del antígeno por el receptor de células T solo es en la mayoría de los casos insuficiente para la activación completa de los linfocitos T, que por lo general requiere la estimulación simultánea por moléculas de superficie de células T adicionales (también llamados más adelante "co-estimuladora" o "moléculas co-estimulantes"). Tras la activación por antígeno, las células T comienzan a expresar un número de nuevas moléculas de superficie celular (por ejemplo CD25, CD69), entre ellas también nuevas moléculas co-estimulantes (por ejemplo ICOS, OX-40, 4-1BB, (Carreno B et al., *Annu. Rev. Immunol.* 2002, 20:29-53; Croft M, *Nat. Rev. Immunol.* 2003, 3: 609-620)). Las células T activadas también empiezan a proliferar e inician a sintetizar numerosas citoquinas, por ejemplo IL-2 y IFN- γ , que empiezan a funcionar como mensajeros. Por lo tanto la activación de células T no es un proceso de una sola etapa pero consiste de una activación inicial seguida por etapas consecutivas en curso de activación y diferenciación de células T. El punto final de este proceso de activación son "células T efectoras", que están completamente activadas y células T armadas capaces de ejercer una variedad de funciones efectoras. Las funciones típicas efectoras son: a) síntesis y secreción de sustancias citotóxicas (empleadas para "matar" a otras células), b) la comunicación con otras células del sistema inmune vía moléculas de superficie de células T o vía citoquinas secretadas. A través de estas funciones efectoras de células T dirigen la respuesta inmune específica de antígeno. Las células T efectoras se acumulan en el sitio de la invasión de patógenos y son capaces de eliminar células infectadas por la liberación de sustancias citotóxicas. Las células T efectoras también inducen la inflamación y dirigen y controlan la generación de anticuerpos específicos de antígeno por las células B. En la defensa fisiológica inmune, células citotóxicas, así como los anticuerpos formados específicamente, eliminan los patógenos virales o bacterianas que han invadido el cuerpo. Una vez que el patógeno está despejado, las células T que han participado en la defensa inmune contra este patógeno fisiológicamente mueren o se transforman a las células T de "memoria".

Bajo ciertas circunstancias, sin embargo, el sistema inmune no vuelve a un estado de reposo. Un tipo de mal funcionamiento es una sobrerreacción hacia el patógeno. En ese caso, las células T específicas de antígeno resultan muy fuertemente activadas por el patógeno invasor y esto resulta en una muerte extremadamente fuerte de células corporales infectadas por el patógeno (virus, bacterias). Un ejemplo de este tipo de reacción aberrante sería la deficiencia hepática fulminante observada en algunos casos de infección con el virus de la hepatitis B. En esta situación, la mayoría de las células hepáticas son infectadas por el virus de la hepatitis B. El huésped monta una fuerte respuesta inmune abiertamente y desarrolla muchas células T citotóxicas reconociendo los antígenos virales de la hepatitis B. Como resultado, la mayoría de las células hepáticas del huésped se mueren en la fase efectora de las células T, disminuyendo ampliamente las células funcionales hepáticas del paciente y conduciéndolo a una falla/insuficiencia hepática que amenaza la vida.

Otro tipo de mal funcionamiento del sistema inmune es la reacción autoinmune. El disparador de las reacciones autoinmunes es en gran parte desconocida y puede ser originalmente una infección. Cualquiera que sea la causa original, la característica común de condiciones autoinmunes es que el sistema inmune reconoce de forma aberrante antígenos propios como "extraños" y por lo tanto voltea las defensas inmunes (células T, células B) contra los propios tejidos del cuerpo. Surgen varios cuadros clínicos dependiendo del tipo de tejido reconocido como "extraño" por el sistema inmune. Clínicamente "enfermedades autoinmunes" bien caracterizadas son por ejemplo la artritis reumatoide, la espondilitis anquilosante, el síndrome de Sjögren, enfermedades inflamatorias del intestino (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), esclerosis múltiple, sarcoidosis, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, vasculitis, y otros. En todas estas enfermedades o las células T atacan directamente el tejido del huésped o instruyen a las células B para generar anticuerpos autorreactivos causantes de las enfermedades (Tan EM, Ann NY Acad Sci 1997, 815:1-14). En todos los casos de reacciones autoinmunes las células T efectoras se acumulan en los tejidos atacados.

Otro tipo de mal funcionamiento del sistema inmune es la reacción alérgica. Fisiológicamente, el sistema inmune está diseñado para reconocer antígenos de patógenos extraños que representan un peligro para el huésped. En contraste, son ignorados antígenos extraños que no representan un peligro para el huésped. A este grupo de antígenos extraños no peligrosos pertenecen muchos antígenos del medio ambiente, por ejemplo, polen, antígenos de alimentos o venenos de abeja. El sistema inmune de un huésped alérgico reconoce de forma aberrante estos antígenos ambientales y reacciona a ellos mediante la generación de células T efectoras contra estos antígenos ambientales. Al mismo tiempo, el huésped reacciona mediante la activación de su sistema inmune de células B contra estos antígenos. Por otra parte, la reacción alérgica de las células B es dirigida y controlada por las células T efectoras. Como resultado de este reconocimiento aberrante de antígenos del medio ambiente, y dependiendo del tipo de antígeno reconocido, individuos alérgicos sufren de una variedad de condiciones. Una entidad de la enfermedad principal es el asma alérgica del pulmón, en el cual las proteínas extrañas inhaladas son reconocidas de forma aberrante por el sistema inmune (a menudo polen de árbol y césped), que conduce a una inflamación del tejido pulmonar y el desarrollo de una respuesta de anticuerpos contra el antígeno (a menudo del isotipo IgE). Las reacciones alérgicas pueden ser desencadenadas por componentes de los alimentos, resultando a menudo en condiciones agudas peligrosas para la vida. También pueden surgir de la alergia contra los venenos de abeja condiciones peligrosas para la vida.

También se encuentran reacciones no deseadas del sistema inmune de las células T y células B después de trasplantes de tejidos alogénicos. El anfitrión recibe bien sea un órgano del donante o recibe células hematopoyéticas (por ejemplo, células madre, médula ósea) de la cual surgen las células inmunes. En la primera instancia con frecuencia el receptor reconoce el órgano como extraño y monta una defensa inmune (células T efectoras, respuesta de células B humoral dirigida por células T efectoras) contra el tejido extraño ("rechazo de órgano"). En la segunda instancia la célula madre ajena trasplantada o células de la médula ósea pueden montar un ataque inmune contra el receptor. Este ataque inmune conduce a una "enfermedad del receptor contra injerto". El rechazo de órganos o la enfermedad del receptor contra el injerto se pueden prevenir mediante la supresión y / o la eliminación de las células T efectoras comprometidas del receptor o del injerto. (Hale G et al., Blood 1998, 92:4581-4590).

Enfermedades de cáncer se caracterizan por un crecimiento continuo sin represión de las propias células del cuerpo. En algunos casos las células del sistema inmune están afectadas por esta expansión incontrolada y estas condiciones se denominan linfomas. Linfomas de células T expresan característicamente antígenos de activación de superficie de las células T y se asemejan en eso respecto a las células T activadas.

Reacciones inmunes fisiológicos que implican células T y dirigidos contra la invasión de patógenos sino también procesos inflamatorios patológicos en el curso de las enfermedades autoinmunes (para una lista no limitante de enfermedades véase más arriba), reacciones alérgicas crónicas (para una lista no limitante de enfermedades véase más arriba) o reacciones de trasplante (que comprenden el rechazo de órganos, enfermedad de injerto contra huésped) todos conducen a la acumulación de células T efectoras específicas de antígeno activados en el sitio de la reacción inmune.

Son relativamente inespecíficas terapias inmunes empleadas hasta la fecha. Inmunosupresores farmacológicos como los compuestos esteroides, Ciclosporina A o Rapamicina ejercen su acción en muchas células del sistema inmune de una manera y efecto muy amplio. Así la aplicación de estos inmunosupresores hace el destinatario severamente inmunocomprometido que lleva a muchos efectos secundarios no deseados. Al mismo tiempo, estos agentes actúan sólo en la medida que se aplican, ya que suprimen la activación de las células T, pero no eliminan

las células T. En consecuencia, una vez que este tipo de agente inmunosupresor se retira, las células T con un receptor de células T apropiado reconocerán el autoantígeno o alérgeno y la reacción inmune no deseada se reiniciará.

5 Un método alternativo de tratamiento es el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales para la eliminación permanente de ciertas células T. Después de la unión del anticuerpo las células T son retiradas de la circulación y destruidas permanentemente. El tratamiento con anticuerpos monoclonales (mAb) dirigido a la molécula de superficie de células T CD3 ha sido empleado en el pasado (Brock MV et al., J. Heart Lung Transplant. 2001, 20:1282-1290). Este tipo de tratamiento, sin embargo, elimina la población completa de células T y deja el paciente severamente inmunocomprometido y por lo tanto muy susceptible a infección. Una aproximación preferible sería
10 eliminar selectivamente sólo las células T que participan activamente en la autoinmune/alérgica/inflamatoria respuesta de rechazo, dejando el resto de la población de células T intactas. Este método de tratamiento aún no se ha logrado.

15 ICOS es una molécula co-estimuladora con características de expresión inusuales. No se expresa en células T en reposo (por ejemplo, células T ingenuas, células T de memoria en reposo) pero es de novo expresado en la superficie de la célula después de la activación de células T in vivo y permanece en la superficie de la célula a lo largo de toda la fase de células T efectoras (Bonhagen K et al., Eur J. Immunol. 2003, 33: 392- 410). Esto no se expresa en otras células del sistema inmune tales como células B, células dendríticas o macrófagos (Hutloff et al., Nature 1999, 397: 263- 266). ICOS interactúa fisiológicamente con otra molécula de la superficie celular, el Ligando ICOS (ICOS-L), el cual se expresa en una variedad de células en el cuerpo (Carreno B et al., Annu. Rev. Immunol. 2002, 20: 29- 53). El acoplamiento y el entrecruzamiento de ICOS por su ligando natural en la presencia del antígeno aumenta fisiológicamente todas funciones de las célula T efectoras (por ejemplo proliferación, secreción de citoquinas y moléculas citotóxicas, la regulación positiva de moléculas superficiales de la célula (Yoshinaga SK et al., Nature 1999, 402: 827- 832). La sobreexpresión de ICOS-L in vivo, sin embargo, conduce a una estimulación de las células T que resulta en una expansión patológica de las células de plasma y una interrupción funcional del sistema inmune (Yoshinaga SK et al., Nature 1999, 402: 827- 832). *In vitro*, la co-estimulación de todas las funciones de las células T también se puede observar después del acoplamiento de ICOS por anticuerpos específicos de ICOS, los cuales entrecruzan ICOS en la superficie celular (Hutloff et al., Nature 1999, 397: 263- 266). Basado en estos datos, el acoplamiento de ICOS por anticuerpos monoclonales o policlonales es por lo tanto probable que desencadene una activación y expansión co-estimuladora no deseada de células T positivas de ICOS in vivo (véase también el
25 Ejemplo 4), con muchos efectos adversos.

Ahora hemos encontrado que es posible aislar agentes de enlace ICOS que causan la disminución in vivo de las células T a los que están enlazados. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un método de disminución específicamente a las células T efectoras impulsando una reacción inmune no deseada.

35 La invención tiene muchas ventajas con respecto a los modos de terapia existentes. Sólo las células T que reconocen el autoinmune/alérgico/inflamación/antígeno de trasplante no deseado son muy específicamente y permanentemente removidas del sistema inmune y el efecto beneficioso continúa después del cese del tratamiento. Los individuos tratados se mantendrán plenamente inmunocompetentes contra patógenos infecciosos. Puesto que estas células T efectoras también dirigen la generación de células B específicas de antígeno y por lo tanto regulan la secreción de anticuerpos específicos de antígeno, la eliminación de las células T efectoras específicas de antígeno
40 también puede conducir a una supresión de la respuesta de células B específicas de antígeno. Así la disminución de las células positivas de ICOS del sistema inmune representa un gran avance en el tratamiento de muchas condiciones con las reacciones inmunes no deseadas. Para el propósito de la presente invención, se entiende que comprenden células positivas de ICOS (células positivas de ICOS) cualquier célula que expresa ICOS en la superficie de la célula, en particular, células T, preferiblemente células T activadas.

45 Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un anticuerpo de enlace ICOS o fragmento de anticuerpo, en el que dicho anticuerpo una vez enlazado a ICOS expresado en la superficie de las células, preferiblemente en células T activadas soporte de ICOS, resulta en la disminución in vivo de las células al que está enlazado.

50 En el contexto de la presente invención y tal como se usa en la presente descripción, el término "anticuerpo que enlaza ICOS" incluye también un fragmento de anticuerpo que enlaza ICOS. El término "disminución" tal como se usa en la presente invención se refiere a la eliminación parcial o preferiblemente total de las células positivas de ICOS del sistema inmune. Por lo tanto los agentes de enlace ICOS de la presente invención pueden ser cualquier

agente capaz de enlazarse a ICOS y capaz de eliminar parcialmente o preferiblemente totalmente las células positivas ICOS del sistema inmune.

5 Preferiblemente, la disminución de las células positivas de ICOS se refiere a una disminución terapéuticamente efectiva de células que expresan ICOS en la superficie de las células del sistema inmune, preferiblemente de células T activadas positivas de ICOS.

10 La disminución terapéuticamente efectiva de células positivas de ICOS puede conducir a una reducción de las células T activadas en un individuo que sufre una sobre-reacción hacia un patógeno, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, una reacción alérgica, una enfermedad de injerto contra huésped o un linfoma de células T. Preferiblemente, la disminución terapéuticamente efectiva de células positivas de ICOS conduce a un efecto terapéutico en las reacciones inmunes aberrantes o inapropiadas antes mencionadas. Una disminución terapéuticamente efectiva puede ser detectada mediante la observación de una reducción en el número total de células positivas de ICOS in vivo, en particular en una muestra de sangre o de tejido obtenidas de un paciente, o por la supresión de reacciones inmunes aberrantes o inapropiadas. La disminución de las células positivas de ICOS se puede detectar por ejemplo mediante el uso de los métodos descritos en los ejemplos aquí o por cualquier otro método adecuado conocido en la técnica (por ejemplo, la histología).

15 El agente de enlazamiento de ICOS comprende preferiblemente un péptido de enlazamiento de ICOS o proteína capaz de enlazarse a ICOS expresado en la superficie de las células, preferiblemente células T activadas soporte de ICOS, en donde los resultados de enlazamiento en la disminución in vivo de las células a las que el péptido de enlazamiento de ICOS o la proteína se ha enlazado. Preferiblemente, el agente de enlazamiento de ICOS enlaza ICOS humano y disminuye las células humanas que expresan ICOS en su superficie, en particular, las células T activadas, in vivo, en particular sin activación celular adversa, proliferación o la expresión de las células T que expresan ICOS.

20 Tal como se usa aquí, los términos "proteína de enlazamiento" o "péptido de enlazamiento" se refiere a una clase de proteínas o péptidos que se enlazan a ICOS expresado en las superficies de células y disminuye células soporte de ICOS al que están enlazados, en particular, células T activadas soporte de ICOS, de una manera terapéuticamente efectiva incluyendo, sin limitación, anticuerpos policlonales o monoclonales, fragmentos de anticuerpo y andamios proteicos dirigidos contra ICOS, por ejemplo, Anticalinas que están dirigidos contra ICOS. La efectividad terapéutica de la disminución de células T positivas de ICOS puede evaluarse directamente mediante el control de los niveles de células T positivas de ICOS en la circulación o en los tejidos afectados, e indirectamente por ejemplo mediante la medición de los parámetros de la inflamación local o sistémica, mediante la determinación de los niveles de autoanticuerpos o mediante pruebas de la función del órgano.

30 El péptido o proteína del enlazamiento de ICOS es un anticuerpo o fragmento del mismo, que se enlaza al ICOS expresado en la superficie de las células, preferiblemente células T activadas soporte de ICOS, en donde los resultados de enlazamiento en la disminución in vivo de las células a las que el anticuerpo anti-ICOS o fragmento del mismo está enlazado. El procedimiento para la preparación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo se efectúa preferiblemente utilizando la técnica estándar de hibridoma (véase por ejemplo, Ejemplo 1) o de acuerdo con cualquiera de los métodos recombinantes bien conocidos por la persona experta (Technology Feature, Nature 2003,426:725-731; Hudson PJ, Nat. Medicine 2003, 9:129-134).

40 Aquí, el término anticuerpo o fragmento de anticuerpo también se entiende en el sentido de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, o partes de enlazamiento de antígenos de los mismos, en particular las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de anticuerpos, que han sido preparados recombinantemente y, donde sea apropiado, modificados, tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos multifuncionales, biespecíficos u oligospecíficos, anticuerpos de cadena sencilla y fragmentos Fab, Fab' o F(ab)₂ (véase, por ejemplo, EP- B1- 0 368 684, US 4, 816, 567, US 4, 816, 397, WO 88/01649, WO 93/06213 o WO 98/24884), fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, anticuerpos antiidiotípicos (anti- Id), y fragmentos de enlazamiento a epítipo de cualquiera de los anteriores.

50 Como una alternativa a los anticuerpos clásicos, también es posible, por ejemplo, utilizar andamios proteicos contra ICOS, por ejemplo, Anticalinas que se basan en la lipocalina (Beste et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1898-1903). Los sitios de enlazamiento a ligandos naturales de las lipocalinas, por ejemplo la proteína de enlazamiento a retinol o la proteína de enlazamiento a bilin, pueden ser alterados, por ejemplo por medio de una aproximación "diseño combinatorio de proteínas", de tal manera que se enlazan a los haptenos seleccionados, aquí

para ICOS (Skerra, 2000, Biochim. Biophys. Acta, 1482, 337-50). Otros andamios de proteínas conocidas se conocen por ser alternativas a los anticuerpos para el reconocimiento (Skerra (2000) J. Mol. Recognit., 13, 167-187).

5 En una realización ventajosa de la presente invención el anticuerpo anti-ICOS o fragmento del mismo disminuye las células de enlace positivas de ICOS a través de la atracción y activación del complemento. Entonces el complemento activado mata a las células a través de su acción citotóxica. Alternativamente, las células positivas de ICOS pueden estar disminuidas por las células fagocíticas que se acoplan con el anticuerpo de enlace anti-ICOS o fragmento de la misma a través de sus receptores Fc y por lo tanto reciben una señal para fagocitar la célula anticuerpo marcada in vivo.

10 Aquí, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que median la eliminación de las células positivas de ICOS también se denominan anticuerpos anti-ICOS o fragmentos de anticuerpos anti-ICOS. Los agentes enlazantes de ICOS que disminuyen las células positivas de ICOS in vivo también se pueden identificar usando un método de selección de un agente de enlazamiento de ICOS.

15 También se provee por la presente invención el anticuerpo monoclonal MIC-944 el cual es producido por el hibridoma MIC-944, el cual ha sido depositado por el demandante el 14 de abril 2004 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Gm- bH (DSMZ) en Braunschweig, Alemania, bajo el número de acceso DSM ACC 2645, y el anticuerpo monoclonal 9F3 producido por el hibridoma 9F3, el cual ha sido depositado por el demandante en 14 de Abril 14 de 2004 en la DSMZ bajo el número de acceso DCM ACC 2646. Estos anticuerpos enlazan ICOS de ratón y se ha demostrado que disminuyen las células T de ratón in vivo que soportan ICOS en su superficie (Véase aquí Ejemplos 1, 3, 4 y 5).

20 En una realización los agentes enlazantes de ICOS de la presente invención que enlazan ICOS humanos disminuyen las células positivas humanas de ICOS de una manera comparable a la disminución de las células de ratón positivas de ICOS por los anticuerpos monoclonales 9F3.

25 En una realización, el agente enlazante de ICOS es un anticuerpo o un fragmento enlazante del antígeno del mismo que tiene una especificidad epitópica para ICOS humano similar a la del anticuerpo monoclonal 9F3 para ICOS de ratón e incluye anticuerpos o fragmentos enlazantes del antígeno reactivo con el mismo o un epítipo funcionalmente equivalente en ICOS de humanos como el epítipo de ICOS de ratón enlazado por el anticuerpo monoclonal 9F3.

30 El término epítipo pretende referirse a aquella porción del antígeno capaz de ser reconocida por y enlazada por un anticuerpo. Los epítipos consisten usualmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y tienen características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específicas. El epítipo de ICOS enlazado por agentes enlazantes de ICOS de la presente invención es preferiblemente uno que no resulte en la co-estimulación de ICOS y en su lugar permite que las células que soportan ICOS sean disminuidas por el agente enlazante de ICOS in vivo.

35 En consecuencia, un epítipo funcionalmente equivalente es un epítipo que cuando se enlaza por agentes enlazantes de ICOS de la presente invención es preferiblemente uno que no resulte en la co-estimulación de ICOS y en su lugar permite que las células que soportan n ICOS sean disminuidas in vivo por el agente enlazante de ICOS, por ejemplo, el epítipo en ICOS humano o en ICOS de ratón, tal como el epítipo en ICOS de ratón reconocidos por el anticuerpo 9F3.

40 En el caso de selección de epítipos específicos conservados de agentes enlazantes de ICOS se puede llevar a cabo utilizando un ensayo de competición. Si el agente de enlazamiento de ICOS que se está probando compite con uno de los anticuerpos monoclonales 9F3 entonces es probable que el agente enlazante de ICOS se enlace al mismo, o un epítipo estrechamente relacionado. Todavía otra manera de determinar si un agente tiene la especificidad del anticuerpo monoclonal 9F3 descritos aquí es pre-incubar uno de estos anticuerpos monoclonales con ICOS y dejar que se enlacen, entonces añadir el agente que se está probando para determinar si el agente que se está probando es inhibido en su capacidad para enlazarse a ICOS. Si lo es entonces, con toda probabilidad, tiene
45 la misma o una especificidad de enlace al epítipo funcionalmente equivalente como el anticuerpo monoclonal anti-ICOS 9F3 descrito aquí.

Ventajosamente, los anticuerpos específicos de ICOS pueden ser diseñados para enlazamiento óptimo del complemento, mediante el uso de anticuerpos quiméricos con una cadena pesada de IgG adecuado, en el que la región de enlazamiento del complemento ha sido mutado opcionalmente para enlazamiento máximo de

componentes del complemento de acuerdo con métodos estándar (Miletic VD et al., *Curr. Opin. Immunol.* 1995, 7: 41- 47).

5 En otra realización los anticuerpos específicos de ICOS pueden ser diseñados para enlazamiento óptimo al receptor Fc de las células fagocíticas de acuerdo con métodos estándar (F. Shakib (Ed.), *The human IgG subclasses*, Pergamon Press 1990; Winkel JG van de, Capel PJ (Eds.), *Human IgG Fc receptors*, Springer 1996), de modo que los resultados de la disminución son óptimos in vivo

10 Los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de enlazamiento a antígeno que se enlaza específicamente a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica tal como la técnica de hibridoma (Kohler & Milstein, 1975, *Nature*, 256: 495- 497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today*, 4: 72) y la técnica del hibridoma de EBV (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp77- 96, Alan R Liss, Inc., 1985).

15 Los anticuerpos o fragmentos de los mismos para su uso en la invención también se pueden generar usando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales por clonación y expresión de ADNc de la región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos por ejemplo los métodos descritos por Babcook, J. et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (15): 7843-7848 y en WO92/02551.

20 Los anticuerpos humanizados son preferiblemente moléculas de anticuerpos a partir de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de la especie no humana y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo US 5, 585, 089).

25 Los anticuerpos quiméricos son preferiblemente aquellos anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulina que han sido modificados genéticamente de forma que los genes de cadena ligera y pesada están compuestos de segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Es probable que estos anticuerpos quiméricos sean menos antigénicos. Anticuerpos bivalentes se pueden hacer por métodos conocidos en la técnica (Milstein et al., 1983, *Nature* 305:537-539; WO 93/08829, Trauneker et al., 1991, *EMBO J.* 10:3655-3659). Anticuerpos multivalentes puede comprender múltiples especificidades o pueden ser monoespecíficos (véase, por ejemplo WO 92/22853).

30 Los anticuerpos para uso en la presente invención también pueden generarse usando diversos métodos de presentación de fagos conocidos en la técnica e incluyen los descritos por Brinkman et al. (in *J. Immunol. Methods*, 1995, 182: 41- 50), Ames et al. (*J. Immunol. Methods*, 1995, 184: 177- 186), Kettleborough et al. (*Eur. J. Immunol.* 1994, 24: 952-958), Persic et al. (*Gene*, 1997 187 9- 18), Burton et al. (*Advances in Immunology*, 1994, 57: 191- 280) y WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y US 5, 698, 426; 5, 223, 409; 5, 403, 484; 5, 580, 717; 5, 427, 908; 5, 750, 753; 5, 821, 047; 5, 571, 698; 5, 427, 908; 5, 516, 637; 5, 780, 225; 5, 658, 727; 5, 733, 743 y 5, 969, 108. Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla, tales como las descritas en US. 4, 946, 778 también se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla a ICOS. Además, los ratones transgénicos, u otros organismos, incluyendo otros mamíferos, se pueden usar para expresar anticuerpos humanizados.

40 En otra forma de realización preferida de la presente invención, el anticuerpo enlazante de ICOS comprende un componente enlazante de ICOS conjugado a una o más moléculas efectoras. Se describen aquí anteriormente Ejemplos de componentes adecuados enlazantes de ICOS preferiblemente anticuerpos y fragmentos de anti-ICOS de los mismos, e ICOS-L y fragmentos de los mismos.

45 En un ejemplo, el componente enlazante de ICOS para uso en el agente enlazante de ICOS puede comprender la totalidad o parte de la ICOS-L (B7h, GL50, BRP-1, B7-H2, LICOS), variantes del enlazante de ICOS de ICOS-L, o fragmentos del enlazante de ICOS de ICOS-L, preferiblemente ICOS-L soluble o un fragmento soluble o variante de ICOS-L. Preferiblemente, el ICOS-L comprende la región extracelular que comprende los residuos 1 a 258 de ICOS-L humano (Ling V et al., *J. Immunol.* 2000, 164:1653-1657). Esta secuencia puede ser modificada para optimizar la afinidad enlazante a ICOS.

El término "molécula efectora" tal como se utiliza aquí incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros sintéticos o de origen natural, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos por ejemplo, ADN, ARN y fragmentos de los mismos, radionúclidos, particularmente radioyoduro, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden detectarse mediante espectroscopía de RMN o ESR.

La molécula efectora puede causar la disminución *in vivo* de las células positivas de ICOS a la que está enlazado. En una realización la molécula efectora es capaz de reclutar y activar el complemento o mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) *in vivo*, o la mediación de la fagocitosis por enlazamiento a receptores Fc *in vivo*. Tales componentes pueden incluir subtipos de región Fc de inmunoglobulina que se sabe exhiben estas características tales como la IgG1 e IgG3 humana, IgG2a de murino o IgG2b de rata. Estos subtipos de inmunoglobulina se pueden modificar adicionalmente para mejorar estas funciones efectoras *in vivo*.

En otro ejemplo las moléculas efectoras pueden ser citotoxinas o agentes citotóxicos incluyendo cualquier agente que es perjudicial para (por ejemplo, mata) las células. Los Ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Moléculas efectoras también incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramycin (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionúclidos tales como ^{111}In y ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuto 213 , Californio252, Iridio192 y Tungsteno188/Renio188; o fármacos tales como pero no limitados a, alquilfosfocolinas, inhibidores de la topoisomerasa I, taxoides y suramina. El agente enlazante de ICOS también puede disminuir las células positivas de ICOS mediante la inducción de la apoptosis de dicha célula tras el enlazamiento. Un agente enlazante de ICOS puede ser optimizado para disminuir las células T efectoras positivas de ICOS, por ejemplo en combinación con otros agentes farmacológicos, para inducir la apoptosis en estas células (Yu XZ et al., J. Immunol. 2003, 170: 3002-3006).

Las técnicas para conjugar tales moléculas efectoras a proteínas son bien conocidos en la técnica (véase, Hellstrom et al., Controlled Drug Delivery, 2nd Ed., Robinson et al., eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev., 62:119-58 and Dubowchik et al., 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123). En un ejemplo, el anticuerpo enlazante de ICOS o fragmento del mismo pueden fusionarse a través de un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), opcionalmente el terminal N o el terminal C, a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o porción de la misma; preferiblemente al menos una porción de 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína). Preferiblemente, el anticuerpo, o fragmento de la misma, está vinculada a la otra proteína en el Límite N del dominio constante del anticuerpo. Procedimientos de ADN recombinantes pueden ser usados para crear tales fusiones, por ejemplo como se describe en WO 86/01533 y EP 0392745.

En realizaciones adicionales la molécula (s) efectora puede incrementar la vida media del anticuerpo enlazante de ICOS *in vivo*, y/o mejorar la entrega del anticuerpo enlazante de ICOS, a través de una barrera epitelial al sistema inmune y/o reducir la inmunogenicidad del agente enlazante de ICOS.

Los anticuerpos se unen preferiblemente a unidades estructurales poli (etilenglicol) (PEG). El anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG pueden ser unidas a través de cualquier aminoácido de cadena lateral disponible o grupo funcional aminoácido terminal localizado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo amino libre, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo. Tales aminoácidos pueden producirse de forma natural en el fragmento de anticuerpo o pueden ser diseñados en el fragmento usando métodos de ADN recombinante. Véase por ejemplo US 5,219,996 y US 5,677,425. Se pueden utilizar sitios múltiples para conectar dos o más moléculas de PEG. Preferiblemente moléculas de PEG están vinculadas covalentemente a través de un grupo tiol de al menos un residuo de cisteína localizado en el fragmento de anticuerpo. Cuando se utilice un grupo tiol como el

punto de unión apropiadamente activado de moléculas efectoras, por ejemplo, se pueden utilizar los derivados del tiol selectivos tales como maleimidados y derivados de cisteína.

Cuando se usa un grupo tiol como el punto de unión apropiadamente activado de moléculas efectoras, se pueden utilizar por ejemplo los derivados de tiol selectivos tales como maleimidados y derivados de cisteína.

- 5 Preferiblemente, el anticuerpo es un fragmento Fab' modificado que es PEGilado, es decir, tiene PEG (poli (etilenglicol)) unido covalentemente a la misma, por ejemplo de acuerdo con el método divulgado en documento EP 0948544 (véase también "Poly (ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Poly (ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC and "Bioconjugation Protein Coupling
10 Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam and A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54: 531- 545). Preferiblemente PEG está unido a una cisteína en la región bisagra. En un ejemplo, un fragmento de PEG modificado Fab' tiene un grupo maleimida unido covalentemente vinculado a un grupo tiol en una región bisagra modificada. Un residuo de lisina puede vincularse covalentemente al grupo maleimida y para cada uno de los grupos amina en el residuo de lisina puede unirse un
15 polímero metoxipoli (etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20, 000 Da. El peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab' puede por lo tanto ser de aproximadamente 40, 000 Da.

En un ejemplo, el anticuerpo enlazante de ICOS de la presente invención también bloquea la unión del ICOS-L para ICOS. El bloqueo ligando puede ser determinado por métodos estándar de citometría de flujo o resonancia de plasmón superficial.

- 20 Preferiblemente, el anticuerpo enlazante de ICOS se selecciona y/o modifica para prevenir la estimulación de ICOS y por lo tanto la coestimulación de células T. La coestimulación es preferiblemente detectable como una mayor activación de células T mediada por TCR. La coestimulación puede medirse in vitro mediante técnicas estándar de detección de la inducción de la proliferación celular mejorada o la producción de citoquinas, por ejemplo IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5 e IL-10, o la supervivencia celular. La coestimulación puede ser detectada in vivo por incremento
25 del número de células inmunes, particularmente las células T, y empeoramiento de los síntomas de la enfermedad en modelos animales de enfermedades inflamatorias, autoinmunes, y alérgicas, el trasplante y el cáncer.

- Dependiendo de la molécula (s) efectora seleccionada el anticuerpo de enlazamiento de ICOS para uso en la presente invención se pueden seleccionar y/o modificar para permanecer en la superficie de la célula o para ser capaz de internalización rápida de la superficie celular in vivo. Cuando al menos uno de la molécula (s) efectora es un agente citotóxico, es preferible que el anticuerpo enlazante de ICOS se internalice rápidamente de la superficie
30 de la célula en la célula positiva de ICOS. La internalización del anticuerpo enlazante de ICOS en la célula positiva de ICOS in vivo puede ser medida por citometría de flujo estándar o microscopía de fluorescencia.

Como se discute aquí a continuación, la presente invención también se refiere a usos favorables en el tratamiento de enfermedades de los anticuerpos enlazantes de ICOS de la presente invención.

- 35 Un segundo aspecto de la presente invención por lo tanto se refiere a una composición farmacéutica que comprende un enlazante de ICOS el cual disminuye in vivo las células positivas de ICOS y un diluyente farmacéuticamente aceptable, excipiente y/o portador. El agente enlazante de ICOS se puede seleccionar de cualquier forma de realización de la invención. Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de al menos uno o más agentes enlazantes de ICOS, en particular al menos un
40 anticuerpo o fragmento de anticuerpo el cual se enlaza a ICOS expresado en la superficie de las células, preferiblemente células T activadas.

- Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo enlazante de ICOS el cual disminuye las células positivas de ICOS in vivo para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una condición mediada directamente o indirectamente por las células que expresan ICOS en su superficie. Las
45 células positivas de ICOS son preferiblemente células T activadas. Preferiblemente, el medicamento es para la profilaxis o el tratamiento de una condición tal como por ejemplo una sobrerreacción mediada por células T a un patógeno, una enfermedad autoinmune, enfermedad inflamatoria, una reacción alérgica, un rechazo del órgano trasplantado, una enfermedad de injerto contra huésped, o cáncer.

5 Preferiblemente, el medicamento es para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades autoinmunes, tal como la artritis reumatoide, la espondilitis anquilosante, el síndrome de Sjögren, enfermedades inflamatorias del intestino (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), la esclerosis múltiple, la sarcoidosis, la psoriasis, el lupus eritematoso sistémico, vasculitis, y otros. La profilaxis o el tratamiento proporcionado por la presente invención también se refieren a rechazo de órganos o la enfermedad de injerto contra huésped, enfermedades alérgicas tales como el asma alérgica, alergia a alimentos y al veneno de abeja. También se refiere a la eliminación de las células cancerosas que expresan la molécula ICOS en la superficie celular del cuerpo de un paciente.

Para tal uso de los anticuerpos enlazantes de ICOS se administran preferiblemente en la forma de una composición farmacéutica.

10 El término "tratamiento" tal como se utiliza aquí incluye preferiblemente, ya sea terapéutica o terapia profiláctica. Cuando se hace una referencia aquí a un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o condición usando un anticuerpo de enlazamiento ICOS particular, es de entenderse que dicha referencia pretende incluir el uso de anticuerpos enlazantes de ICOS para la manufactura de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de la enfermedad. Los anticuerpos enlazantes de ICOS para uso en la invención se pueden administrar en
15 combinación, por ejemplo de forma simultánea, secuencial o separadamente, con uno o más de otros compuestos terapéuticamente activos, los cuales pueden ser por ejemplo otros agentes inmunosupresores o terapias contra el cáncer.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un método para reducir una población de células T que expresan ICOS en un anfitrión humano, que comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo enlazante de ICOS de acuerdo con cualquier realización del anticuerpo enlazante de ICOS de la presente invención. Preferiblemente, la cantidad efectiva del anticuerpo enlazante de ICOS es suficiente para una reducción medible de la titulación de células T activadas en la sangre o una muestra de tejido obtenida de un paciente que sufre de una de las enfermedades inmunológicas mencionadas aquí.

Un quinto aspecto de la presente invención también se refiere a un método de tratamiento de un paciente que sufre de una condición mediada directamente o indirectamente por las células T activadas, el método que comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo enlazante de ICOS el cual disminuye terapéuticamente de forma efectiva las células T activadas.

Como se ha mencionado aquí, una cantidad suficiente o efectiva del anticuerpo de enlazamiento de ICOS es preferiblemente una cantidad terapéuticamente efectiva, en particular de una dosis unitaria de administración de un medicamento.

Como se ha mencionado aquí un paciente puede sufrir sin limitación de una condición la cual se selecciona de entre el grupo que consiste de asma alérgica, fiebre del heno, alergia al veneno de abeja, alergia a los alimentos, esclerosis múltiple, sarcoidosis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, enfermedades inflamatorias del intestino (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), psoriasis, vasculitis, linfoma de células T que expresan ICOS, rechazo de un órgano o tejido trasplantado, y la enfermedad de injerto contra huésped. La disminución de ICOS in vivo será terapéuticamente efectivo en todas las enfermedades, en la cual las células T ICOS⁺ representan la principal población de células efectoras, es decir, las células T que impulsan el proceso de la enfermedad.

La dosis efectiva del anticuerpo enlazante de ICOS para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el tipo y la severidad de la enfermedad, la forma de dosificación, la edad, peso corporal y sexo del paciente, la duración del tratamiento y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Preferiblemente, la dosis unitaria es terapéuticamente efectiva para el tratamiento de un adulto, un niño, un niño pequeño, o un recién nacido.

La dosis diaria total del anticuerpo de enlazamiento de ICOS puede estar en cantidades, por ejemplo, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal o más preferiblemente de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal. Las composiciones de dosis única pueden contener tales cantidades o submúltiplos de las mismas para constituir la dosis diaria. En general, el tratamiento puede comprender la administración de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1000 mg de un agente enlazante de ICOS por día en dosis únicas o múltiples. Una combinación de más de un agente enlazante de ICOS puede ser utilizado para la manufactura de un medicamento.

5 Para la producción del medicamento un agente enlazante de ICOS se formula preferiblemente con uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables o sustancias auxiliares, tales como solución fisiológica reguladora, por ejemplo, solución de cloruro de sodio, agua desmineralizada, estabilizadores, tales como la proteasa o inhibidores de nucleasa, preferiblemente aprotinina, ácido ϵ -aminocaproico o pepstatina A o agentes secuestrantes tales como EDTA, formulaciones de gel, tales como vaselina blanca, parafina de baja viscosidad y/o cera amarilla, etc. dependiendo del tipo de administración.

10 Aditivos adecuados adicionales son, por ejemplo, detergentes, tales como, por ejemplo, Triton X-100 o desoxicolato de sodio, pero también polioles, tales como, por ejemplo, polietilén glicol o glicerol, azúcares, tales como, por ejemplo, sacarosa o glucosa, compuestos zwitteriónicos, tales como, por ejemplo, aminoácidos tales como glicina o taurina en particular, o betaína y/o una proteína, tales como, por ejemplo, o albúmina de suero bovino o humano. Se prefieren detergentes, polioles y/o compuestos zwitteriónicos.

15 La solución fisiológica reguladora tiene preferiblemente un pH de aproximadamente 6.0-8.0, especialmente un pH de aproximadamente 6.8-7.8, en particular un pH de aproximadamente 7.4, y/o una osmolaridad de aproximadamente 200-400 miliosmoles/litro, preferiblemente de aproximadamente 290-310 miliosmoles/litro. En general El pH de la composición farmacéutica en general se ajusta usando un regulador orgánico o inorgánico adecuado.

20 La composición farmacéutica o medicamento que comprende un agente enlazante de ICOS se puede administrar de una manera convencional, por ejemplo por medio de formas de dosificación orales, por ejemplo tabletas o cápsulas, por medio de las membranas mucosas, por ejemplo de la nariz o de la cavidad oral, por medio de la inhalación, inyecciones, infusiones o geles. Además es posible administrar la composición farmacéutica por vía tópica y local, en la forma de complejos de liposomas. Adicionalmente, el tratamiento puede llevarse a cabo por medio de un sistema terapéutico transdérmico (TTS), el cual hace posible una liberación temporal controlada de las composiciones farmacéuticas. Los TTS son conocidos por ejemplo, de EP 0 944 398 A1, EP 0 916 336 A1, EP 0 889 723 A1 o EP 0 852 493 A1.

25 La composición farmacéutica puede ser manufacturada para administración oral, nasal, rectal, parenteral, intratraqueal, tópica o vaginal. La administración parenteral incluye administración subcutánea, intercutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal, en particular el uso de la inyección preparada adecuadamente o soluciones de infusión.

30 La presente divulgación se refiere a un método de selección de un agente de enlazamiento de ICOS, en donde el método comprende las etapas de: (a) proporcionar células soporte de ICOS, (b) proporcionar un compuesto de prueba, y (c) medir o detectar la influencia del compuesto de la prueba sobre la disminución de las células soporte de ICOS.

35 El compuesto de prueba se proporciona en la forma de una biblioteca de compuestos químicos. Preferiblemente, el término "biblioteca de compuestos químicos" se refiere a una pluralidad de compuestos químicos que han sido ensamblados a partir de cualquiera de varias fuentes, incluyendo las moléculas de síntesis química y productos naturales, o que se han generado por técnicas de química combinatoria.

El compuesto de prueba puede ser en principio cualquier compuesto químico, tal como un compuesto de origen natural, o un compuesto sintetizado químicamente que es idéntico o similar a un compuesto de origen natural, o cualquier compuesto sintetizado químicamente que no se presenta en la naturaleza.

40 Un compuesto de origen natural puede ser un compuesto que puede ser detectado en o aislado a partir de un organismo unicelular o multicelular único, en particular un compuesto que puede ser detectado en o aislado a partir de un animal, una planta, un hongo, una levadura, bacteria, o cualquier otro organismo que contiene células o en un virus. Un compuesto sintetizado químicamente que no se presenta en la naturaleza se puede sintetizar mediante química combinatoria.

45 Preferiblemente, un compuesto de prueba comprende una estructura principal derivada de un compuesto de origen natural, preferiblemente una estructura principal de un péptido o proteína la cual se enlaza a ICOS. Preferiblemente, el compuesto de prueba es un anticuerpo o fragmento del mismo el cual se deriva de una inmunización de un animal usando un soluble derivado de ICOS, por ejemplo, como la proteína de fusión en el Ejemplo 1, más abajo, o un derivado de ICOS humano. El compuesto de prueba también puede ser un derivado recombinante de un anticuerpo anti-ICOS o fragmento del mismo.

5 El compuesto de prueba puede ser cualquier anticuerpo anti-ICOS, preferiblemente un anticuerpo que reacciona con ICOS localizado en la superficie de una célula T activada. Preferiblemente, el compuesto de prueba comprende un anticuerpo anti-ICOS monoclonal o un fragmento del mismo, en particular un derivado producido de forma recombinante o fragmento de un anticuerpo anti-ICOS monoclonal, en particular, un anticuerpo humanizado monoclonal o fragmento del mismo o un fragmento de anticuerpo que comprende al menos uno, preferiblemente todas las tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo anti-ICOS.

10 La célula soporte de ICOS es preferiblemente una célula T activada, preferiblemente una célula T humana, o una célula animal o humana recombinante que soporta un receptor de células T, preferiblemente un receptor de células T humanas. Las células T activadas se pueden aislar de un paciente que sufre preferiblemente de una sobrerreacción a un agente patógeno, una enfermedad autoinmune, inflamación, una reacción alérgica, un rechazo del órgano trasplantado, una enfermedad de injerto contra huésped, o un linfoma, preferiblemente como se ha mencionado dentro de cualquier forma de realización de la presente invención.

15 En alternativa, las células T activadas soporte de ICOS pueden derivarse de un animal de experimentación, en particular de un receptor de células T animal transgénico. Las células T activadas soporte de ICOS se pueden obtener por la estimulación de las células T en donde se utiliza un antígeno específicamente reconocido por un receptor de células T o mediante la utilización de un activador de células T policlonales como por ejemplo, Enterotoxina B Estafilocócica (SEB), Células T transgénicas se estimulan preferiblemente con el antígeno reconocido por el receptor transgénico de células T.

20 Las células T activadas soporte de ICOS pueden ser generadas por la estimulación in vivo, en particular por inmunización o reintroducción en un animal que comprende células T transgénicas, y/o por la estimulación o reestimulación in vitro, por ejemplo, tales como en la generación de las células T soporte de ICOS en los Ejemplos 2 a 5, más abajo. La influencia del compuesto de prueba sobre las células soporte de ICOS puede ser seleccionada utilizando ensayos in vitro y/o utilizando un modelo animal in vivo.

25 Generación de células que expresan ICOS. Células que expresan ICOS pueden ser generadas mediante la activación de las células T humanas primarias, por ejemplo con antígeno o con estimuladores policlonales como fitohemaglutinina o acetato de forbol miristato en combinación con ionomicina. Alternativamente, las células que expresan ICOS pueden ser generadas por transfección de líneas de células apropiadas con un vector de expresión eucariota que contiene el ADNc para una porción extracelular de ICOS. Las células T activadas, clones de células T o transfectantes pueden ser monitoreados para una óptima expresión de ICOS por tinción con un mAAb específico de ICOS o por tinción con ICOSL soluble y analizado utilizando citometría de flujo.

30 Generación de polipéptido recombinante de ICOS. El polipéptido recombinante que contiene secuencias de la porción extracelular de ICOS humano se puede expresar en E. coli o cualquier sistema de expresión eucariota (por ejemplo, levadura, líneas de células humana o animal) con el uso de vectores de expresión apropiados mediante técnicas estándar. Para facilitar la purificación, una etiqueta adecuada puede estar unida al polipéptido ICOS, por ejemplo, una etiqueta de His o una región constante de un anticuerpo. En el caso de que el polipéptido se pueda expresar en E. coli sólo en una forma desnaturalizada en cuerpos de inclusión; el polipéptido puede ser totalmente desnaturalizado, posteriormente renaturalizado en un regulador adecuado, y entonces se purifica hasta la homogeneidad utilizando técnicas de cromatografía estándar.

35 Generación de un agente de enlazamiento de ICOS expresando la porción extracelular de ICOS-L. La porción extracelular de ICOS-L se enlaza a ICOS con una especificidad alta y se puede utilizar como un agente enlazante de ICOS. Para mejorar la afinidad de ICOS-L a ICOS, el ADNc que codifica la porción extracelular de ICOS-L implicada en el enlace a ICOS puede ser mutagenizado mediante técnicas estándar. En la forma natural o en la forma optimizada, la región de enlazamiento de ICOS de ICOS-L puede ser utilizado como un componente de una disminución de agente enlazante de ICOS generado por técnicas recombinantes.

40 Generación de un agente enlazante de ICOS por inmunización de animales. Un agente enlazante de ICOS puede ser generado mediante la inmunización de un animal (por ejemplo, ratón, rata, hámster, conejo) con células que expresan ICOS, o con una proteína recombinante que contiene la porción extracelular entera o parcial de ICOS humano. Se pueden fusionar blastos de células B del animal inmunizado (por ejemplo, a partir del bazo, nodo linfático, médula ósea o sangre periférica) a una línea celular permanente (por ejemplo, mieloma o una línea permanente impulsada por oncógeno) para generar una línea de hibridoma que secreta mAbs específica de ICOS. Alternativamente, se seleccionan blastos de células B del animal inmunizado para enlazamiento de ICOS y utilizado

5 para clonar el ADNc que codifica para la región enlazante de ICOS del receptor de células B. Esta región IgG-V clonada se puede utilizar para la manipulación de un agente enlazante de ICOS recombinante. Alternativamente, un agente enlazante de ICOS también se pueden generar utilizando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales por clonación y expresión de ADNc de la región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos por ejemplo los métodos descritos por Babcook, J. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (15): 7843- 7848 y en WO92/02551.

10 Generación de un agente enlazante de ICOS por selección de un repertorio sintético. En lugar de la inmunización de animales, un agente enlazante de ICOS puede ser aislado a partir de un repertorio sintético, por ejemplo, una biblioteca de despliegue de anticuerpos. Una respectiva (por ejemplo, fagos) biblioteca de despliegue se selecciona para un agente enlazante de ICOS por ELISA o cualquier técnica basada en la afinidad adecuada (por ejemplo, panorámica). Para asegurar una alta afinidad de enlace del polipéptido de ICOS, la secuencia de codificación de ADNc del agente enlazante es aislado y sometido a un procedimiento de mutagénesis aleatoria (por ejemplo, PCR propensa a errores, combinación aleatoria de ADN, la PCR dirigida al sitio). El ADNc mutagénico que codifica el agente de enlazamiento se re-expresa y se vuelve a seleccionar para el enlazamiento óptimo del polipéptido ICOS extracelular. Este ADNc final es entonces utilizado como un componente para la construcción de un agente enlazante de ICOS biológicamente útil (por ejemplo, anticuerpo, anticuerpo parcial, etc.).

20 Selección del agente enlazante de ICOS para una afinidad la cual se requiere para la disminución in vivo sin efectos adversos. Cualquiera que sea el tipo y la fuente del agente enlazante de ICOS (constructo ICOS-L, mAb obtenido de un animal inmunizado o un agente enlazante recombinante derivado de blastos de células B o un repertorio sintético), el agente enlazante de ICOS es seleccionado por el enlazamiento a ICOS con una afinidad óptima para la disminución in vivo. Para este fin, una forma recombinante del polipéptido ICOS extracelular o células que expresan ICOS se utilizan como un objetivo para un ensayo de enlazamiento. Uno de los asociados de enlazamiento (polipéptido de ICOS o el agente de enlace ICOS) está inmovilizado y las características de enlazamiento del otro componente (etiquetado) se observan en un ensayo adecuado (por ejemplo Biacore). Se escogen los agentes de enlazamiento de ICOS con una constante de enlace apropiada.

25 Selección del agente de enlazamiento de ICOS para la especificidad. Cuando se desea, el agente de enlazamiento puede ser seleccionado para la especificidad de ICOS utilizando por ejemplo, la citometría de flujo y/o inmunohistoquímica.

30 Manipulación del agente enlazante de ICOS para minimizar la inmunogenicidad en el humano. Si el agente enlazante de ICOS no se deriva de un anticuerpo humano, se puede "humanizar" para prevenir el desarrollo de anticuerpos neutralizantes en el paciente tratado. Para este fin, las regiones responsables del enlazamiento del polipéptido extracelular ICOS se "injertan" en un marco polipéptido humano (por ejemplo, la región constante de IgG) utilizando técnicas estándar de biología molecular, de manera que el agente de enlazamiento de ICOS recombinante contiene en gran parte secuencias no-inmunogénicas de proteínas humanas.

35 Manipulación del agente enlazante de ICOS para el enlace óptimo del complemento in vivo. El enlace del complemento se puede utilizar para disminuir las células positivas de ICOS (células positivas de ICOS) de la circulación. Para este fin, el agente enlazante de ICOS está diseñado para contener regiones que aseguran un enlace óptimo del complemento. In vivo, el enlazamiento del complemento al agente de enlazamiento de ICOS desencadenará la muerte de la célula soporte de ICOS. El agente enlazante de ICOS se puede probar in vitro para este efecto utilizando un sistema de ensayo que contiene células vivas soporte de ICOS, el agente enlazante de ICOS y complemento humano. La efectividad del enlazamiento del complemento se puede medir por ejemplo por la disminución de complemento soluble en la fase líquida con el tiempo o por la medición de la muerte celular de las células soporte de ICOS utilizando métodos estándar (por ejemplo, liberación de ⁵¹Cr, la liberación de un colorante intracelular, o conteo de células vivas).

45 Manipulación del agente de enlazamiento de ICOS para la inducción óptima de la fagocitosis de las células positivas de ICOS in vivo. La disminución de células positivas de ICOS in vivo se puede lograr a través de la fagocitosis de las células positivas de ICOS por las células fagocíticas (por ejemplo, macrófagos, células Kupffer del hígado, intestino y macrófagos pulmonares, macrófagos del bazo) mediada por el agente enlazante de ICOS. Esto puede ser, por ejemplo una fagocitosis mediada por el receptor de Fc o una fagocitosis inducida por el uso de un agente enlazante de ICOS el cual es bivalente en que reconoce ICOS y también un objetivo adecuado (por ejemplo, receptor de Fc) en células fagocíticas. Un agente enlazante de ICOS se puede seleccionar para la acción óptima inductora de fagocitosis mediante el cultivo de células positivas de ICOS junto con las células fagocíticas en la presencia de

cantidades variables de agente enlazante de ICOS. El grado de fagocitosis se determina por ensayos estándar, por ejemplo mediante el etiquetado de las células positivas de ICOS y las células fagocíticas con tintes coloreados de manera diferente seguidos de un ensayo para determinar el grado de fagocitosis por técnicas microscópicas estándar.

5 Selección del agente enlazante de ICOS para la activación mínima de células primarias soporte de ICOS. Para generar un agente enlazante de ICOS capaz de eliminar las células positivas de ICOS de la circulación de un paciente a través de la activación del complemento o a través de la fagocitosis, es deseable utilizar un agente enlazante de ICOS con actividad co estimulante mínima o ausente, lo cual podría conducir a la activación desfavorable de la célula o expansión in vivo. La selección del agente enlazante de ICOS para la mínima actividad
10 co estimulante de células T se lleva a cabo in vitro utilizando ensayos de coestimulación estándar, por ejemplo el uso de cantidades subóptimas de mAb OKT3 enlazado a una fase sólida en combinación con cantidades tituladas del agente enlazante de ICOS también enlazado a una fase sólida. Un agente enlazante de ICOS que carece de actividad coestimuladora no aumentaría el grado de proliferación celular o la síntesis de citoquinas observado con el mAb OKT3 solo.

15 Manipulación del agente enlazante de ICOS para la inducción de citotoxicidad del agente dependiente del enlazante de ICOS in vivo. La citotoxicidad dependiente de anticuerpos es un fenómeno bien caracterizado y se puede observar, por ejemplo cuando mAb se enlaza con su región enlazante del antígeno a una célula objetivo y con su región Fc a receptores de Fc sobre las células citotóxicas (por ejemplo CD16 sobre células NK). El entrecruzamiento inducido del receptor de Fc (por ejemplo CD16) activa la capacidad citotóxica de las células citotóxicas las cuales
20 lisis la célula objetivo. Otras células, por ejemplo macrófagos, también exhiben citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Un agente enlazante de ICOS se puede optimizar para la mediación de este tipo de citotoxicidad por la elección de una región Fc óptima como una parte del constructo de la proteína. Pruebas de tal agente in vitro para la inducción de la citotoxicidad es un procedimiento estándar. Células objetivo soporte de ICOS son cultivadas con el agente enlazante de ICOS en la presencia de células NK u otras células citotóxicas y el grado de objetivo de la lisis celular (liberación de la etiqueta) inducida por el agente enlazante de ICOS se mide con el tiempo.

Manipulación del agente enlazante de ICOS para la inducción de la apoptosis en las células positivas de ICOS in vivo. Desde ICOS se expresa en células T efectoras, las cuales son más propensas a la apoptosis en comparación con las células T ingenuas o de memoria, una forma alternativa para disminuir las células T positivas de ICOS in vivo se puede lograr a través de la inducción de la apoptosis en estas células. La apoptosis de la célula objetivo positiva
30 de ICOS se mide por ensayos estándar (por ejemplo, ensayo de túnel).

Manipulación de un agente enlazante de ICOS para la internalización óptima in vivo. Un efecto óptimo de disminución in vivo de un agente enlazante de ICOS covalentemente enlazado a una citotoxina en muchos casos requiere una rápida internalización del agente enlazante de ICOS. Por lo tanto, un agente enlazante de ICOS está diseñado para reconocer un epítipo en ICOS el cual induce una rápida internalización de ICOS. Alternativamente, el
35 agente enlazante de ICOS bivalente reconoce una molécula de superficie celular adicional en las células positivas de ICOS y a través de este doble especificidad induce una rápida internalización de ICOS. La internalización de ICOS se puede medir in vitro mediante ensayos convencionales, por ejemplo mediante el etiquetado con fluorescencia del agente enlazante de ICOS seguido por análisis de microscopía estándar (internalización de la señal fluorescente).

40 Manipulación y prueba de un agente enlazante de ICOS después de la inyección en un compartimento corporal (por ejemplo, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intratraqueal, por vía intravenosa o por vía intramuscular) para la disminución óptima de células positivas de ICOS in vivo. Esta aproximación puede ser utilizado como una selección funcional final para cualquiera de las propiedades de disminución del agente enlazante de ICOS descrito anteriormente (por ejemplo, la disminución a través de la fagocitosis, citotoxicidad dependiente de anticuerpos, la apoptosis, la internalización de una citotoxina, el enlazamiento del complemento) o como la única
45 aproximación de selección para la elección de una disminución óptima del agente enlazante de ICOS. Si el agente enlazante de ICOS reconoce un epítipo de ICOS compartido por ICOS humano y de rata o humano y de ratón (Buonfiglio et al., Eur. J. Immunol. 1999, 29: 2863- 2874), la prueba de selección se puede realizar directamente en un sistema animal (por ejemplo rata o ratón). Esto incluye la prueba de disminución de fagocitosis mediada por la
50 disminución, ya que el mAb humano es capaz de enlazarse a los receptores de Fc animales en las células fagocíticas y para inducir la fagocitosis (Isaacs JD, Rheumatology 2001, 40: 724- 738). Un sistema animal adecuado puede ser el modelo de inflamación pulmonar alérgica (véase el Ejemplo 5, a continuación). Son igualmente apropiados modelos de enfermedades convencionales alternativos, por ejemplo modelos de enfermedad inflamatoria

del intestino, modelos de trasplante o modelos autoinmunes. Si el agente enlazante de ICOS reconoce un epítipo compartido por el humano y sólo un animal primate, la prueba de la capacidad de disminución del agente enlazante de ICOS puede ser probado en el animal primate (por ejemplo, modelo de trasplante, modelo de inflamación). La disminución de las células positivas de ICOS *in vivo* también se puede lograr mediante el diseño de un agente enlazante de ICOS en el cual la región enlazante de ICOS se injerta en el marco de la inmunoglobulina (región constante la cual media los efectos biológicos) de un anticuerpo con capacidad de disminución establecida en los humanos, por ejemplo, el cM-T412 mAb dirigido a la molécula de superficie de células CD4 en las células T. (Isaacs JD, *Rheumatology* 2001, 40: 724- 738). Un sistema de selección alternativo para un agente enlazante de ICOS específica para ICOS humano, pero no el reconocimiento de ICOS de ratón o rata, puede ser un modelo animal "humanizado", por ejemplo un ratón "humanizado" SCID. Células humanas positivas de ICOS pueden ser transferidos a un animal tal y no son rechazadas, ya que estos animales carecen de células T y B. Después de la transferencia de las células positivas de ICOS humanas, estos animales son tratados con el agente enlazante de ICOS de elección como se describió anteriormente. En todos los modelos *in vivo*, la capacidad del agente enlazante de ICOS para disminuir las células positivas de ICOS puede ser evaluada de una manera estándar. Entre otros, los siguientes parámetros se pueden determinar: 1) Los niveles de células positivas de ICOS en la circulación o en los órganos del cuerpo por citometría de flujo o histología, 2) si las células positivas de ICOS transferidas llevan un marcador (por ejemplo, alomarcador, receptor de transgénicos, etiqueta fluorescente), el porcentaje de células de marcador positivo; 2) el grado de infiltración inflamatorio en el órgano objetivo; 3) los parámetros de inflamación sistémica (por ejemplo, la proteína C-reactiva); 4) los niveles de la función del órgano (por ejemplo, azúcar en la sangre en un modelo autoinmune de diabetes); 5) peso; 6) puntaje clínico de enfermedades.

La presente divulgación de la invención se refiere a un método para producir un medicamento para el tratamiento de una afección mediada directamente o indirectamente por las células T, en donde el método comprende las etapas de: (a) llevar a cabo el método de la invención de la selección de un agente enlazante de ICOS, (b) aislar un compuesto de prueba medido o detectado adecuado para el tratamiento de una afección mediada directamente o indirectamente por las células T, y (c) formular el compuesto de prueba medido o detectado con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

En una realización preferida, la condición que será tratada es una enfermedad alérgica o autoinmune, enfermedad inflamatoria o un cáncer mediadas por células T. Preferiblemente, dicha condición es una sobrerreacción a un agente patógeno, una enfermedad autoinmune, una reacción alérgica, un rechazo de trasplante de órganos, una enfermedad de injerto contra huésped, o un cáncer. Preferiblemente, dicha condición se puede seleccionar de entre el grupo que consiste de asma alérgica, fiebre del heno, alergia al veneno de abeja, alergia a los alimentos, esclerosis múltiple, sarcoidosis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, enfermedades inflamatorias del intestino (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), psoriasis, linfoma de células T que expresan ICOS, rechazo de un órgano o tejido trasplantado, y la enfermedad de injerto contra huésped.

En lo que sigue, la invención se describe con referencia a las Figuras 1 a 5 sin ninguna limitación en los Ejemplos 1 a 6. Las Figuras muestran:

Figura 1: Establecimiento de un modelo *in vivo* para la prueba de mAb dirigida a ICOS por su capacidad de disminución.

Figura 2: Pruebas de mAb dirigidas a ICOS de murino para la disminución *in vivo* después de la transferencia adoptiva de células T transgénicas positivas de ICOS específicas de OVA sin aplicación local de OVA.

Figura 3: Pruebas de mAb dirigido a ICOS de murino para la disminución *in vivo* después de la transferencia adoptiva de células T transgénicas positivas de ICOS específicas de y la aplicación local de OVA en adyuvante completo de Freund.

Figura 4: Montaje experimental utilizado para analizar el efecto de los anticuerpos anti-ICOS en el modelo de inflamación alérgica de las vías respiratorias en ratones BALB/c.

Figura 5: La tinción de linfoma angioinmunoblástico humano con mAb F44 específico de ICOS que demuestra la expresión de ICOS por las células cancerosas.

Ejemplo 1: Generación de mAb contra ICOS murino.

Ratas LEWIS fueron inmunizadas con la proteína soluble quimérica de fusión de ICOS de murino Ig de conejo como se describe (Mages HW et al, Eur. J. Immunol 2000, 30: 1040-1047), las células del bazo se fusionaron con mieloma P3X63Ag8.653 (American Type Culture Collection) por técnicas estándar y los hibridomas resultantes fueron seleccionados por citometría de flujo utilizando células L transfectadas con ICOS de murino (Mages HW et al., Eur. J. Immunol. 2000, 30: 1040- 1047). Se obtuvieron utilizando esta aproximación 12 mAb diferentes dirigidos contra ICOS de murino.

Ejemplo 2: Establecimiento de un modelo in vivo para la prueba mAb específica de ICOS para la capacidad de disminución.

Se estimularon células de bazo de ratones DO11.10, la cuales contienen células T con un receptor transgénico específico para ovoalbúmina (OVA) con péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ durante 3 días in vitro. Al final de este cultivo 90% de las células T transgénicas expresaron ICOS. Las células T transgénicas fueron transferidas a continuación, por vía intravenosa (i.v.) en ratones singénicos BALB/c. (10×10^6 células T/ratón). En los días 1, 2, 3, y 4 después de la transferencia se analizaron las células T transgénicas (las cuales pueden ser rastreadas utilizando el mAb KJ1-26 dirigido al receptor de células T transgénico) en los nodos linfáticos (LN), el bazo y la sangre para la expresión de las moléculas de superficie de activación de ICOS, CD69 y CD25. El experimento demostró que las células T activadas, positivas de ICOS continúan expandiéndose in vivo y representar hasta el 4% de todos los linfocitos en los compartimentos examinados en el día 4 (Figura 1a). El experimento también demostró que las células T transgénicas transferidas continúan expresando ICOS durante días in vivo (Figura 1b), en menor medida también las moléculas de activación CD69 y CD25, las cuales son subreguladas una manera más rápida (figuras 1c y d).

Ejemplo 3: Pruebas de mAb dirigido a ICOS de murino para la disminución in vivo después de la transferencia adoptiva de células T transgénicas positivas de ICOS específicas de OVA sin aplicación local de OVA.

La configuración básica del experimento fue como el descrito en el Ejemplo 2. Después de 2 días de cultivo in vitro con el péptido OVA, 5×10^6 células T DO11.10 OVA-TCR transgénicas KJ1.26⁺ (50% de ellos positivas de ICOS) se transfirieron vía intravenosa en ratones BALB/c. Varios mAb específicos de ICOS se administraron por vía intraperitoneal a una dosis de 500 µg en 300 µl de PBS inmediatamente después de la transferencia. El control negativo fue el tratamiento con PBS, el tratamiento con mAb GK1.5 mAb (un mAb anti-CD4 con capacidad de disminución conocida) sirvió como un control positivo. En el día 6 el LN periférico fue retirado y se analizó para el porcentaje de células T transgénicas KJ1.26⁺ por citometría de flujo (tratamiento simulado con PBS= 100%). Este experimento determinó que en la ausencia de OVA (el antígeno reconocido por las células T transgénicas) algunos mAb (MIC-944, 9F3 y MIC-403) disminuyeron efectivamente las células T positivas de ICOS in vivo, mientras que otros mAb específicos de ICOS se encontraron sin efecto o, en el caso de 12A7 y MIC-697 causaron un incremento en las células T positivas de ICOS (Figura 2)

Ejemplo 4: Pruebas de mAb dirigido a ICOS de murino para la disminución in vivo después de la transferencia adoptiva de células T transgénicas específicas de OVA positivas de ICOS y la aplicación local de OVA en adyuvante completo de Freund.

Era deseable para probar si los anticuerpos dirigidos a ICOS disminuirían las células positivas de ICOS in vivo también en la presencia del antígeno OVA sin efectos co-estimuladores indeseables. Células de bazo DO11.10 se estimularon con péptido de OVA durante 48 horas *in vitro*. De este cultivo de células T transgénicas CD4⁺ 10×10^6 específicos de OVA (80% de ellos positivo de ICOS al final del cultivo) se transfirieron a receptores BALB/c por vía de inyección intravenosa. Dos días antes de la transferencia, los ratones receptores habían sido inmunizados por vía subcutánea en 4 regiones separadas en la parte posterior con 200 µg de OVA en adyuvante completo de Freund para proveer el antígeno de OVA para el sistema inmune. Los ratones se trataron entonces con el mAb indicado (200 µg por inyección vía intraperitoneal (i.p.)) en los días 0 (día de la transferencia), 1, y 3. En el día 5 se retiraron el LN inguinal de drenaje y se analizó por citometría de flujo para la presencia de células T transgénicas KJ1-26⁺. Este experimento demostró que el tratamiento con mAb MIC-944 reduce fuertemente el número de células T específicas de OVA in vivo en comparación con los animales de control tratados con PBS solo en la presencia del antígeno nominal de OVA (Fig. 3). La aplicación de otro mAb específica de ICOS ligeramente (12A7, MIC-113) o significativamente (MIC-697, MIC-280) incrementó el número de células T transgénicas in vivo. Este experimento determinó a) que la disminución de las células T positivas de ICOS in vivo es posible utilizando ciertas mAb dirigidas a ICOS, b) que otro mAb dirigido a ICOS puede tener un efecto opuesto desfavorable, es decir la expansión de células positivas de ICOS in vivo cuando el antígeno está presente, mediante la estimulación de la señalización de ICOS.

Ejemplo 5: Prevención de la inflamación pulmonar alérgica a través de disminución de las células T positivas de ICOS.

Hemos probado si los mAb dirigidos a ICOS de murino pueden prevenir la inflamación alérgica en un modelo murino de asma alérgica. Células esplénicas DO11.10 fueron disminuidas de células T CD8⁺ y se cultivaron bajo condiciones de polarización Th2 durante 6 días en la presencia del péptido₃₂₃₋₃₃₉ de OVA, con la adición de IL-2 en el día 5. Bajo estas condiciones las células T transgénicas se diferencian para producir citoquinas pro-alérgicas pro-inflamatorias IL-4, IL-5 e IL-13. Después del período de cultivo de 6 días, las células T transgénicas (2×10^6 /ratones) fueron transferidas por inyección intravenosa en ratones singénicos BALB/c. 95% de las células transferidas fueron células T transgénicas, 90% de las cuales eran positivas de ICOS. Los ratones receptores fueron expuestos al OVA antígeno (50 µg) por aplicación intranasal (i.n.) en el día antes de la transferencia (d- 1), en el día de la transferencia (d0) y en los días 1 y 2 después de la transferencia (Fig. 4a). En este modelo, las células T transgénicas migran a los pulmones, se produce la activación por el antígeno OVA localmente aplicado, la liberación proalérgica/mediadora proinflamatoria y de este modo inducen una inflamación alérgica de los pulmones. El grado de la inflamación alérgica se puede medir por la apariencia de los eosinófilos y en menor grado los linfocitos en los bronquios de los animales. El grado de la respuesta inflamatoria de los pulmones se evaluó por la remoción de lavado broncoalveolar (BAL) en el día 4 después de la transferencia y el análisis de las células presentes en el BAL por citometría de flujo y la diferenciación celular microscópica. Los animales receptores fueron tratados con 400 µg de mAb 9F3 específicos de ICOS o MIC-403 o MIC-944 en los días 1, 0, 1, 2 por alternando inyecciones por vía intravenosa y vía intraperitoneal (Fig. 4a). Los animales de control negativo recibieron PBS por vía i.n. y fueron tratados en forma simulada con PBS ("control PBS"). Lo animales de control positivo recibieron OVA por vía i.n., y un tratamiento simulado con PBS ("control de OVA "). Los datos de la Figura 4b y c demuestran que sólo la aplicación del mAb 9F3 resultó en una supresión completa de la reacción inflamatoria alérgica en los pulmones (es decir, una reducción de los niveles observados en el "control de PBS"). También se observó algún efecto supresor con el mAb MIC-944, pero se logró efecto no anti-alérgico por el tratamiento con mAb MIC-403. Análisis adicionales por citometría de flujo revelaron que el mAb 9F3 reduce efectivamente el número de transgénicos, células T KJ1-26⁺ CD4⁺ en el BAL (Figura 4d). También se logró reducción de las células T transgénicas con mAb MIC-944, pero no se observó reducción con mAb MIC-403. Estos experimentos determinaron que el desarrollo de una inflamación alérgica de los pulmones se puede prevenir efectivamente mediante la aplicación de anti-ICOS mAb. Además, los experimentos demostraron que una selección cuidadosa de los mAbs anti-ICOS es necesaria para demostrar la eficacia en modelos animales asemejándose a asma pulmonar alérgica humana. Los métodos descritos aquí representan un ejemplo de cómo se pueden identificar tales anticuerpos.

Ejemplo 6: Expresión de ICOS en células cancerosas.

Las secciones de tejido de un linfoma angioinmunoblástico humano se tiñeron con mAb F44 dirigido a ICOS humanos (Hutloff A et al., Nature 1999, 397:263-266) usando APAAP, una técnica estándar inmunohistoquímica (Figura 5). El patrón de tinción indica que este linfoma expresa ICOS en la superficie celular, lo que demuestra que los anticuerpos específicos de ICOS podrían identificarse para el uso en la disminución de las células positivas de ICOS en pacientes con cáncer.

REIVINDICACIONES

1. Un agente enlazante de ICOS seleccionado de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, en donde dicho agente una vez enlazado a ICOS expresa en la superficie de las células, en particular células T soporte de ICOS, resulta en la disminución in vivo de las células a la cuales está enlazado.
- 5 2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 la cual es, o compite cruzado con, un anticuerpo monoclonal secretado por la línea celular de hibridoma MIC-944, depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bajo el número de acceso DSM ACC 2645, o por la línea celular de hibridoma 9F3, depositado en la DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC 2646.
3. El agente enlazante de ICOS de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde ICOS es ICOS humano.
- 10 4. El agente enlazante de ICOS de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el anticuerpo anti-ICOS o fragmento del mismo es monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado, biespecífico, multiespecífico, en particular, un anticuerpo recombinante o fragmento de anticuerpo.
5. El agente enlazante de ICOS de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 4 en el que el enlazante del agente enlazante de ICOS a ICOS impide el enlazamiento de ICOSL a ICOS.
- 15 6. El agente enlazante de ICOS de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 5 que enlaza ICOS sin estimular la señalización de ICOS.
7. El agente enlazante de ICOS de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 6 el cual es internalizado en la célula al enlazante a ICOS.
8. El agente enlazante de ICOS de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 6 el cual no se internaliza en la célula al enlazante a ICOS.
- 20 9. Una composición farmacéutica que comprende un agente enlazante de ICOS de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 8 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. Un uso de un agente enlazante de ICOS de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 9 para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una condición mediada directamente o indirectamente por las células que expresan ICOS en su superficie.
- 25 11. Un uso de un agente enlazante de ICOS de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 9 para la manufactura de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una condición mediada directamente o indirectamente por las células T.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en donde la condición es una enfermedad alérgica, inflamatoria o autoinmune, y/o cáncer mediada por células T.
- 30 13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la condición es una enfermedad mediada por células T seleccionado del grupo consistente de asma alérgica, fiebre del heno, alergia al veneno de abeja, alergia a los alimentos, esclerosis múltiple, sarcoidosis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, enfermedades inflamatorias del intestino (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), psoriasis, vasculitis, linfoma de células T que expresan ICOS, rechazo de un órgano o tejido trasplantado y la enfermedad de injerto contra huésped.
- 35 14. El agente enlazante de ICOS de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 1 a 8, el cual comprende un agente de enlazante de ICOS conjugado a una o más moléculas efectoras.
- 40 15. El agente enlazante de ICOS de acuerdo con la reivindicación 14 en el que la al menos una molécula efectora es un agente citotóxico.
16. El agente enlazante de ICOS de acuerdo con la reivindicación 14 en el que la al menos una molécula efectora incluye una región Fc de inmunoglobulina.

Fig. 1

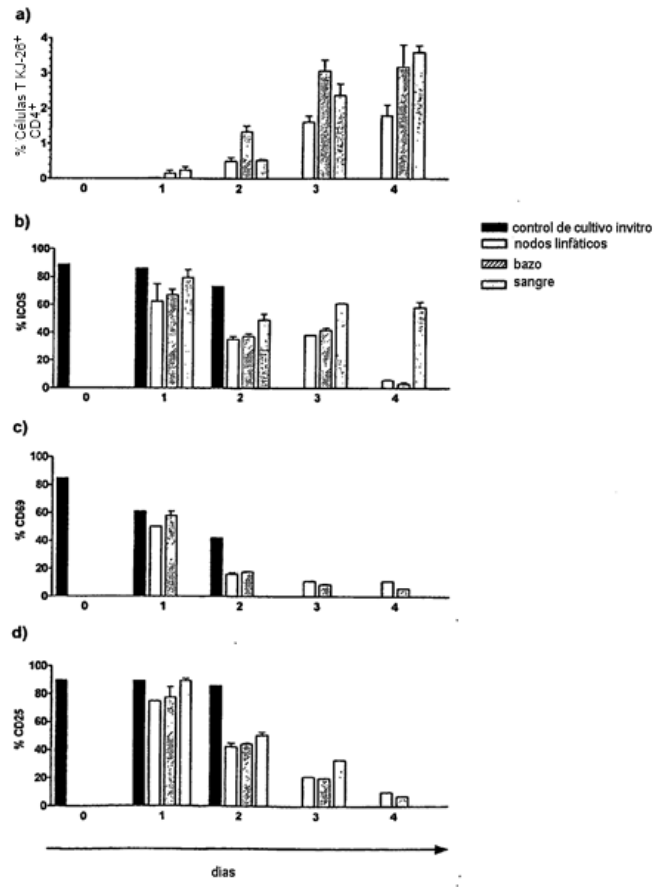


Fig. 2

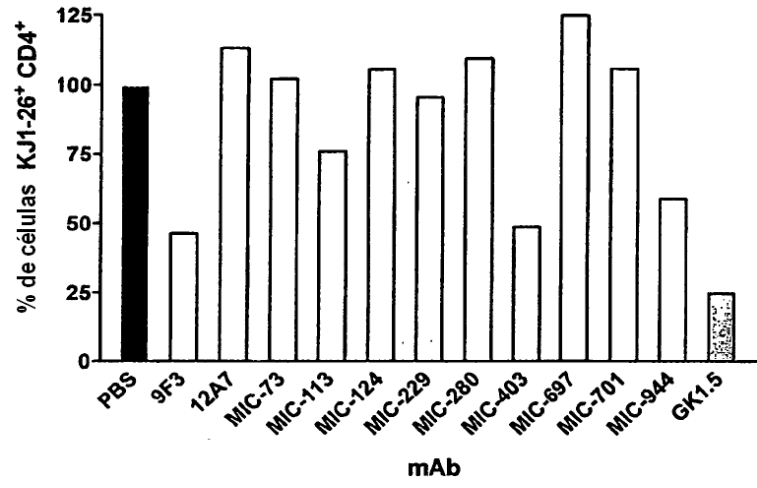


Fig. 3

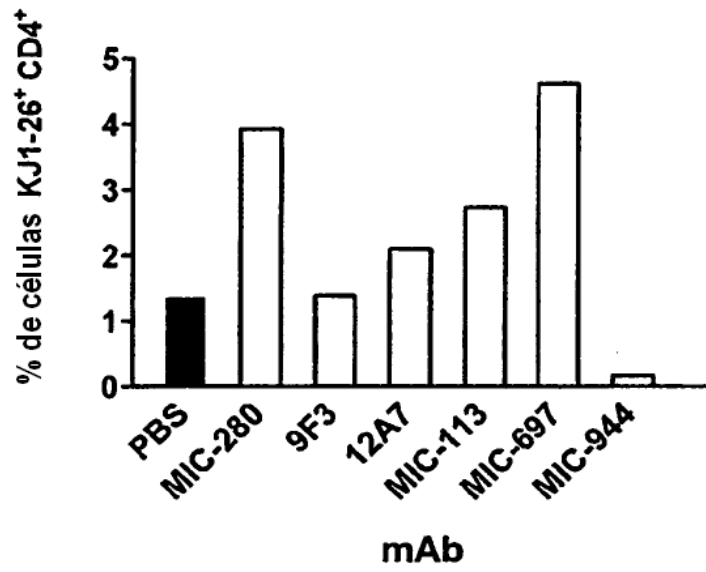


Fig. 4

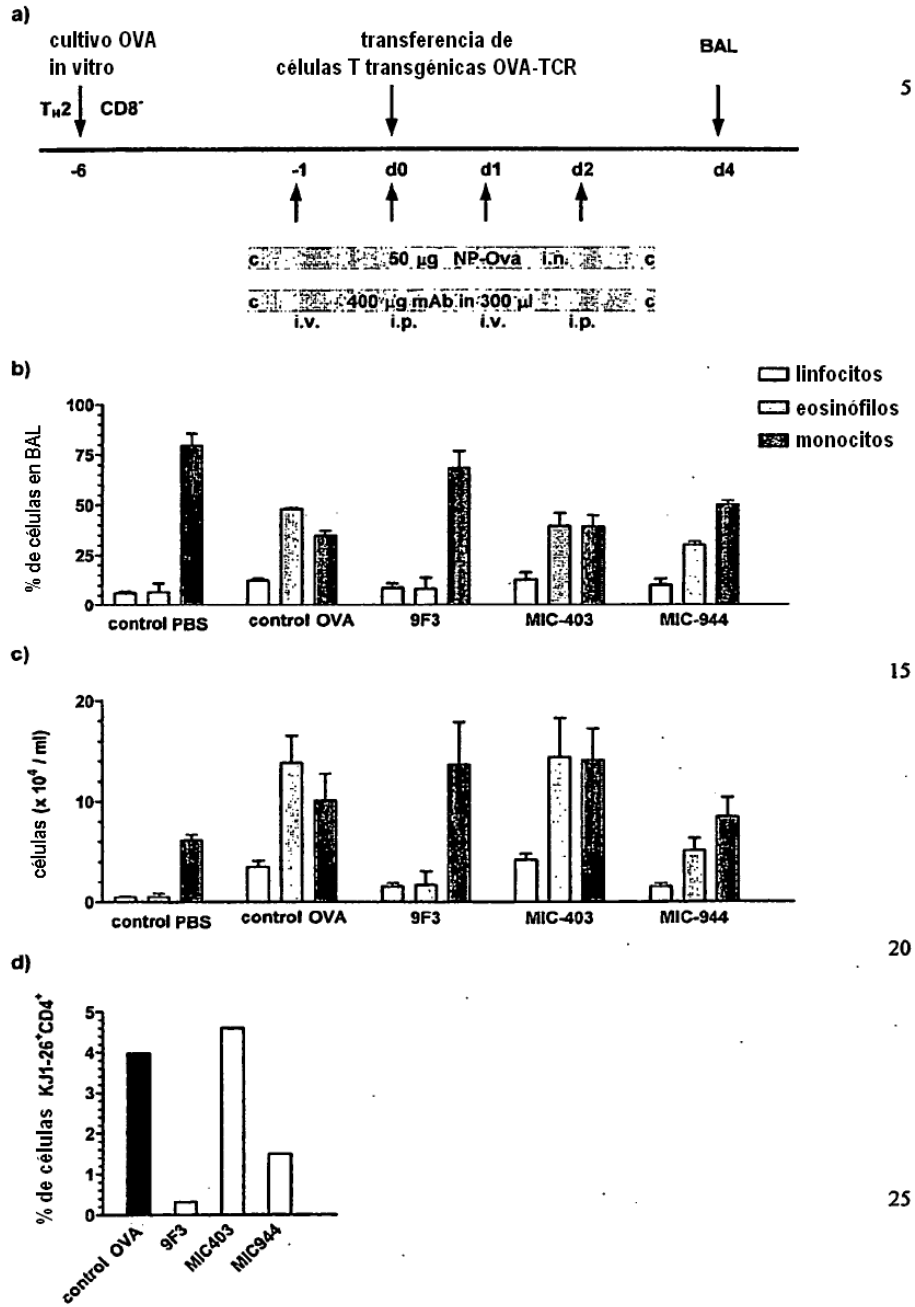


Fig. 5

