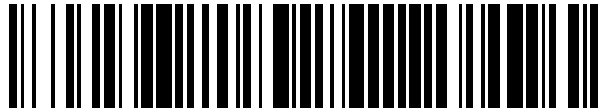


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 277**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.1996 E 10180032 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2332561**

54 Título: **Utilización combinada de un agente de bloqueo CTLA-4 y una terapia linfotóxica en el tratamiento de tumores**

30 Prioridad:

04.12.1995 US 566853
08.05.1996 US 646605

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.08.2016

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US

72 Inventor/es:

ALLISON, PATRICK JAMES;
LEACH, DANA R. y
KRUMMEL, MATTHEW, F.

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 579 277 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

Utilización combinada de un agente de bloqueo CTLA-4 y una terapia linfotóxica en el tratamiento de tumores

5 Introducción

[0001] La puesta en práctica de la inmunoterapia es un objetivo altamente deseado en el tratamiento de las enfermedades humanas. Promete una especificidad de acción que se encuentra raramente con el uso de fármacos convencionales. La base de la inmunoterapia es la manipulación de la respuesta inmune, particularmente las respuestas de células T. Las células T poseen sistemas complejos y sutiles para controlar sus interacciones, utilizar numerosos receptores y factores solubles para el proceso. El efecto que cualquier señal particular tendrá en la respuesta inmune puede variar dependiendo de los factores, receptores y contrarreceptores que están implicados.

[0002] Los mecanismos para regular por disminución las respuestas son tan importantes como los requeridos para la activación. La educación tímica que conduce a la tolerancia a células T es un mecanismo para prevenir una respuesta inmune a un antígeno particular. También se conocen otros mecanismos, tales como la secreción de citoquinas supresoras.

[0003] La activación de células T requiere no sólo la estimulación a través del receptor de antígeno (TCR), sino la señalización adicional a través de las moléculas de superficie coestimuladoras, tales como CD28. Los ligandos para CD28 son las proteínas B7-1 (CD80) y B72 (CD86), que se expresan en células presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas, células B activadas y monocitos. La interacción entre B7 y CD28 es uno de los diversos mecanismos de señalización coestimuladores que parece ser suficiente para desencadenar la maduración y proliferación de células T específicas de antígeno.

[0004] La falta de coestimulación y la concomitante insuficiencia de producción de IL-2, evitan la posterior proliferación de la célula T e inducen un estado de no reactividad denominado "anergia". Éste está asociado con un bloqueo en la transcripción del gen de IL-2 y una falta de sensibilidad de las células T afectadas a IL-4. La anergia se puede superar con una estimulación prolongada de IL-2. Una serie de virus y tumores pueden bloquear la activación y proliferación de células T mediante medios directos o indirectos, induciendo de este modo un estado de insuficiencia o no reactividad del sistema inmune del huésped a las células infectadas o transformadas. Entre una serie de perturbaciones funcionales de las células T, la anergia puede ser por lo menos parcialmente responsable del fallo del huésped para depurar las células patogénicas.

[0005] Sería ventajoso si, en el tratamiento de infecciones y tumores, se pudiera activar una fuerte respuesta inmune celular a través de la manipulación de receptores implicados en la coestimulación.

[0006] El uso de la proteína B7 en la mediación de la inmunidad anti-tumoral se describe en Chen et al. (1992) Cell 71: 1093-1102 y Townsend y Allison (1993) Science 259:368. Schwartz (1992) Cell 71:1065 revisa el papel de CD28, CTLA-4 y B7 en la producción de IL-2 y la inmunoterapia. Harding et al. (1994) Nature 356:607-609 demuestra que la señalización mediada por CD28 coestimula las células T murinas y evita la inducción de anergia en clones de células T.

La CTLA-4 es una molécula de la superficie de las células T que se identificó originalmente mediante cribado (screening) diferencial de una biblioteca de ADNc de células T citolíticas murinas, Brunet et al. (1987) Nature 328:267-270. El papel de CTLA-4 como segundo receptor para B7 se describe en Linsley et al. (1991) J. Exp. Med. 174:561-569. Freeman et al. (1993) Science 262: 907-909 describe la CTLA-4 en ratones deficientes de B7. Los ligandos para CTLA-4 se describen en Lenschow et al. (1993) P.N.A.S. 90:11054-11058.

[0007] Linsley et al. (1992) Science 257:792-795 describe la inmunosupresión in vivo por una forma soluble de CTLA-4. Lenschow et al. (1992) Science 257:789-792 describe la supervivencia a largo plazo de injertos de isletas pancreáticas por CTLA-4Ig. En Walunas et al. (1994) Immunity 1:405-413, se sugiere que CTLA-4 puede funcionar como regulador negativo de la activación de células T.

Descripción resumida de la invención

[0008] La descripción se refiere al aumento de la activación de células T a través del bloqueo de la señalización de CTLA-4. Se pueden utilizar, tal como se reivindica, moléculas de unión que interaccionan específicamente con el antígeno de CTLA-4, pero no activan la señalización (agentes de bloqueo). Los agentes de bloqueo también se pueden combinar con agentes estimuladores de la respuesta inmunitaria, tales como citoquinas y antígenos. Cuando la señalización de CTLA-4 es bloqueada de esta manera, la respuesta de las células T a antígeno está libre de inhibición. La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

[0009] La figura 1A es un gráfico que ilustra el crecimiento in vivo de la línea de células tumorales V51Blim10 en presencia

o ausencia de anticuerpos dirigidos contra CTLA-4 o CD28. La figure 1B es un gráfico que ilustra el tamaño promedio de tumor en ratones inyectados con 2×10^6 células V51Blim10 y anticuerpos. La figure 1C es un gráfico que ilustra el tamaño de crecimiento de un tumor individual en ratones inyectados con células V51Blim10.

- La figura 2 es un gráfico que muestra el crecimiento in vivo de tumores B7-51Blim10 en presencia o ausencia de anticuerpos dirigidos contra CTLA-4 o CD28.
- 5 La figura 3 muestra el rechazo de células de carcinoma de colon de tipo salvaje por ratones tratados previamente con células V51Blim10 y el anticuerpo anti-CTLA-4.
- La figure 4 muestra el crecimiento de tumores definidos después del tratamiento con anticuerpo anti-CTLA-4.
- La figure 5 muestra el crecimiento del fibrosarcoma murino
- 10 SA1N en ausencia o presencia de anticuerpos anti-CTLA-4.
- Las figuras 6A a 6F ilustran el efecto adyuvante de anticuerpos anti-CTLA-4 en la respuesta de células T a antígenos peptídicos.
- Las figuras 7A a 7B ilustran el efecto del bloqueo de CTLA-4 en el cambio de clases.
- Las figuras 8A a 8D presentan un análisis cinético del bloqueo de CTLA-4/B7 en la proliferación de células T CD4+ purificadas. En la figura 8B, se muestra la detección de IL-2. La cinética de la incorporación de timidina se muestra en la figura 1C. En la figura 8D se muestra una inhibición pronunciada de la producción de IL-2 observada cuando CTLA-4 también estaba implicada.
- 15 La figura 9 muestra la tinción con yoduro de propidio de células permeabilizadas para medir el contenido de ADN en varias etapas del bloqueo de CTLA-4/B7 en el cultivo
- 20 La figura 10 muestra el efecto de retardamiento del bloqueo de CTLA-4 en un fibrosarcoma.
- La figura 11 muestra el efecto del tratamiento de un carcinoma mamario con anti-CTLA-4 solo, células transducidas de GM-CSF solas o una combinación de las mismas.
- La figura 12 demuestra el efecto del bloqueo de CTLA-4 retrasado en un carcinoma renal.
- La figura 13 muestra el efecto del tratamiento del bloqueo de CTLA-4 solo o en combinación con la inmunización con células tumorales B16 irradiadas en tumores B16.
- 25 La figura 14 muestra el efecto de combinar el bloqueo de CTLA-4 con células B16 irradiadas y/o el tratamiento con citoquinas.

Referencias de las bases de datos para secuencias de nucleótidos y aminoácidos

- 30 **[0010]** La secuencia completa de ADNc de CLA-4 humana tiene el número de acceso del banco de genes L15006. La región de aminoácidos 1-37 es el péptido líder; 38-161 es el dominio de tipo V extracelular; 162-187 es el dominio transmembrana; y 188-223 es el dominio citoplasmático. Se han descrito variantes de la secuencia de nucleótidos, incluyendo una transición de G a A en la posición 49, una transición de C a T en la posición 272, y una transición de
- 35 A a G en la posición 439. La secuencia completa de ADN de CTLA-4 de ratón tiene el número de acceso EMBL X05719 (Brunet et al. (1987) Nature 328:267-270). La región de aminoácidos 1-35 es el péptido líder.
- [0011]** La secuencia completa de ADN de B7-1 (CD80) humano tiene el número de acceso del banco de genes X60958; el número de acceso para la secuencia del ratón es X60958; el número de acceso para la secuencia de la
- 40 rata es U05593. La secuencia completa de ADNc de B7-2 (CD86) humano tiene el número de acceso del banco de genes L25259; el número de acceso para la secuencia del ratón es L25606.
- [0012]** Los genes que codifican CD28 han sido ampliamente caracterizados. La secuencia de ARNm de pollo tiene el número de acceso del banco de genes X67915. La secuencia de ARNm de la rata tiene el número de acceso del
- 45 banco de genes X55288. La secuencia de ARNm humana tiene el número de acceso del banco de genes J02988. La secuencia de ARNm de ratón tiene el número de acceso del banco de genes M34536.

Descripción detallada de la invención

- 50 **[0013]** La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones.
- [0014]** No es necesario para la práctica de la invención que se entienda el mecanismo de acción. Los datos indican que la terapia libera células T a partir de las señales inhibitoras mediadas a través de CTLA-4. Las señales mediadas por CTLA-4 inhiben aparentemente la progresión del ciclo celular y la expresión de IL-2. La respuesta de
- 55 las células T al antígeno y la señalización coestimuladora de CD28 están por tanto reguladas por incremento en presencia de agentes de bloqueo de CTLA-4. Los usos no provocan una proliferación generalizada de células T no estimuladas.
- [0015]** Los usos de la presente invención son útiles cuando existe una respuesta mediada por células T inadecuada a un estímulo antigénico para un objetivo determinado. Las respuestas mediadas por células T in vivo incluyen la
- 60 generación de células T citolíticas, y la mayoría de respuestas de anticuerpo, particularmente aquellas que implican el cambio de clase de los isotipos de inmunoglobulina. El estímulo antigénico pueden ser células tumorales que expresan proteínas o combinaciones de proteínas en un contexto no natural.
- 65 **[0016]** Los agentes de bloqueo de CTLA-4 son moléculas que específicamente se unen al dominio extracelular de la proteína CTLA-4 y bloquean la unión de CTLA-4 a sus contrarreceptores, por ejemplo, CD80, CD86, etc.

- Normalmente, la afinidad de unión del agente de bloqueo será de por lo menos aproximadamente 100 PM. El agente de bloqueo será sustancialmente no reactivo con las moléculas relacionadas con CTLA-4, tales como CD28 y otros miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas. Por tanto, las moléculas tales como CD80 y CD86 están excluidas como agentes de bloqueo. Además, los agentes de bloqueo no activan la señalización de CTLA-4. De forma práctica, esto se consigue mediante el uso de moléculas de unión monovalentes o bivalentes. Un experto en la materia entenderá que las siguientes discusiones sobre la reactividad cruzada y la competición entre diferentes moléculas pretenden referirse a moléculas que tienen la misma especie de origen, por ejemplo la CTLA-4 humana se une a CD80 y 86 humanas, etc.
- 10 **[0017]** Los agentes de bloqueo candidatos se criban por su capacidad para cumplir estos criterios. Los ensayos para determinar la afinidad y la especificidad de unión son conocidos en la técnica, incluyendo ensayos competitivos y no competitivos. Los ensayos de interés incluyen ELISA, RIA, citometría de flujo, etc. Los ensayos de unión pueden utilizar proteína CTLA-4 purificada o semipurificada, o alternativamente pueden utilizar células T que expresan CTLA-4, por ejemplo células transfectadas con una construcción de expresión para CTLA-4; las células T que han sido estimuladas a través de la reticulación de CD3 y CD28; la adición de células alogénicas irradiadas, etc. Como ejemplo de ensayo de unión, la proteína CTLA-4 purificada se une a un soporte insoluble, por ejemplo placa de microtitulación, partículas magnéticas, etc. El agente de bloqueo candidato y CD80 o CD86 marcados solubles se añaden a las células y los componentes no unidos se eliminan mediante lavado. La capacidad del agente de bloqueo para competir con CD80 y CD86 por la unión a CTLA-4 se determina mediante la cuantificación de CD80 o CD86 marcado unido. La confirmación de que el agente de bloqueo no se reticula con CD28 se puede realizar con un ensayo similar, sustituyendo CD28 por CTLA-4. Las moléculas adecuadas tendrán por lo menos aproximadamente 10^3 menos unión a CD28 que a CTLA-4, más habitualmente por lo menos aproximadamente 10^4 menos unión.
- 15 25 **[0018]** Generalmente, una molécula de unión monovalente o bivalente soluble no activará la señalización de CTLA-4. Un ensayo funcional que detecta la activación de células T se puede utilizar para confirmación. Por ejemplo, se puede estimular una población de células T con células alogénicas irradiadas que expresan CD80 o CD86, en presencia o ausencia del agente de bloqueo candidato. Un agente que bloquee la señalización de CTLA-4 provocará un aumento en la activación de células T, medida mediante la proliferación y la progresión del ciclo celular, la liberación de IL-2, la regulación por incremento de CD25 y CD69, etc. Un experto en la materia entenderá que la expresión en la superficie de una célula, el empaquetamiento en un liposoma, la adherencia a una partícula o pocillo, etc. aumentará la valencia eficaz de la molécula.
- 30 **[0019]** Los anticuerpos o fragmentos de los mismos se utilizan como agentes de bloqueo. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales; intactos o truncados, por ejemplo F(ab')₂, Fab, Fv; xenogénicos, alogénicos, singénicos, o formas modificadas de los mismos, por ejemplo humanizados, quiméricos, etc.
- 35 **[0020]** En general, la afinidad será por lo menos aproximadamente de 10^{-6} , más habitualmente aproximadamente 10^{-8} M, es decir las afinidades de unión normalmente observadas con anticuerpos monoclonales específicos.
- 40 **[0021]** Existen una serie de ensayos de cribado (screening) para los agentes de bloqueo. Los componentes de dichos ensayos incluirán habitualmente la proteína CTLA-4; y opcionalmente un agente activante de CTLA-4, por ejemplo CD80, CD86, etc. La mezcla de ensayo comprenderá también un agente farmacológico candidato. En general, se desarrollan en paralelo una serie de mezclas de ensayo con diferentes concentraciones de agente para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Habitualmente, una de estas concentraciones sirve como control negativo, es decir a concentración cero o por debajo del nivel de detección.
- 45 **[0022]** De manera práctica, en estos ensayos uno o más de las moléculas se unirán a un marcador, donde el marcador puede proporcionar directa o indirectamente una señal detectable. Entre los diversos marcadores se incluyen radioisótopos, sustancias fluorescentes, sustancias quimioluminiscentes, enzimas, moléculas de unión específicas, partículas, por ejemplo partículas magnéticas, y similares. Las moléculas de unión específica incluyen parejas, tales como biotina y estreptavidina, digoxina y antidigoxina, etc. Para los miembros de unión específica, el miembro complementario normalmente estaría marcado con una molécula que se proporciona para la detección, según los procedimientos conocidos.
- 50 55 **[0023]** Un ensayo de cribado de interés está dirigido a agentes que interfieren con la activación de CTLA-4 por sus contrarreceptores. La cuantificación de la activación se puede conseguir mediante una serie de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la inhibición de la activación de células T se puede determinar mediante la cuantificación de la proliferación celular, la liberación de citoquinas, etc.
- 60 **[0024]** Otros ensayos de interés están dirigidos a agentes que bloquean la unión de CTLA-4 a sus contrarreceptores. La mezcla de ensayo comprenderá por lo menos una parte del contrarreceptor natural, o un oligopéptido que comparte suficiente similitud de secuencia para proporcionar una unión específica y el agente farmacológico candidato. El oligopéptido puede ser de cualquier longitud adecuada para las condiciones y requerimientos del ensayo, normalmente por lo menos aproximadamente 8 aminoácidos de longitud y hasta la proteína de longitud completa o fusión de la misma. La CTLA-4 se puede unir a un sustrato insoluble. El sustrato se
- 65

puede fabricar de una serie de materiales y formas, por ejemplo, placa de microtitulación, micropartículas, tira reactiva, partícula de resina, etc. El sustrato se elige para minimizar el fondo y maximizar la proporción de señal con respecto a radio. La unión se puede cuantificar mediante una serie de métodos conocidos en la técnica. Después de un periodo de incubación suficiente para permitir que la unión alcance el equilibrio, el soporte insoluble se lava, y se cuantifica el marcador remanente. Los agentes que interfieren con la unión disminuirán el marcador detectable.

[0025] Se pueden incluir otros reactivos en el ensayo de cribado. Ente éstos se incluyen reactivos como sales, proteínas neutras, por ejemplo albúmina, detergentes, etc, que se pueden utilizar para facilitar la unión óptima proteína-ADN y/o reducir las interacciones no específicas u originales. También se pueden utilizar reactivos que mejoran la eficacia del ensayo, tales como inhibidores de proteasa, agentes microbianos, etc.

[0026] Los anticuerpos adecuados para su uso como agentes de bloqueo se obtienen inmunizando un animal huésped con péptidos que comprenden toda o parte de la proteína CTLA-4. Entre los animales huéspedes adecuados se incluyen ratón, rata, oveja, cabra, hámster, conejo, etc. El origen del inmunógeno de proteína puede ser de ratón, humano, rata, mono, etc. El animal huésped será generalmente una especie diferente al inmunógeno, por ejemplo, CLA-4 de ratón utilizado para inmunizar hámsters, CTLA-4 humano para inmunizar ratones, etc. Las CTLA-4 humana y de ratón contienen tramos altamente conservados en el dominio extracelular (Harper et al. (1991) J. Immunol. 147: 1037-1044). Los péptidos derivados de dichas regiones altamente conservadas se pueden utilizar como inmunógenos para generar anticuerpos específicos por cruzamiento.

[0027] El inmunógeno puede comprender la proteína completa, o fragmentos y derivados de la misma. Los inmunógenos preferidos comprenden todo o parte del dominio extracelular de la CTLA-4 humana (residuos de aminoácidos 38-161), en el que estos residuos contienen las modificaciones posteriores a la traducción, tales como la glicosilación, hallada en la CTLA-4 nativa. Los inmunógenos que comprenden el dominio extracelular se producen de varias maneras conocidas en la técnica, por ejemplo, la expresión de genes clonados utilizando métodos recombinantes convencionales, aislamiento de células T, poblaciones de células clasificadas que expresan niveles elevados de células CTLA-4, etc.

[0028] Cuando se desea la expresión de una proteína recombinante o modificada, se utilizará un vector que codifica la parte deseada de CTLA-4. En general, se diseñará un vector de expresión, de manera que el dominio extracelular de la molécula CTLA-4 se encuentra sobre la superficie de una célula transfectada, o alternativamente, el dominio extracelular se secreta de la célula. Cuando se secreta el dominio extracelular, la secuencia codificante para el dominio extracelular se fusionará, en el marco, con secuencias que permiten la secreción, incluyendo un péptido señal. Los péptidos señal pueden ser exógenos o nativos. Una proteína de fusión de interés para la inmunización une el dominio extracelular de CTLA-4 con la región constante de una inmunoglobulina. Por ejemplo, se puede utilizar una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de CTLA-4 de ratón unido a la región bisagra de dominio Cg1 humano (bisagra CH2-CH3) para inmunizar hámsters.

[0029] Cuando se expresa la CTLA-4 en la superficie de la célula, la secuencia codificante para el dominio extracelular se fusionará, en el marco, con secuencias que codifican un péptido que ancla el dominio extracelular a la membrana y una secuencia señal. Dichas secuencias de ancla incluyen el dominio transmembrana de CTLA-4 nativo, o los dominios transmembrana de otras proteínas de la superficie celular, por ejemplo CD4, CD8, slg, etc. Las células de ratón transfectadas con el gen de CTLA-4 humana se pueden utilizar para inmunizar ratones y generan anticuerpos específicos para la proteína CTLA-4 humana.

[0030] Los anticuerpos monoclonales se producen mediante técnicas convencionales. En general, el bazo y/o los nódulos linfáticos de un animal huésped inmunizado proporcionan una fuente de células de plasma. Las células de plasma se immortalizan mediante la fusión con células de mieloma para producir células de hibridoma. El sobrenadante de cultivo de los hibridomas individuales se criba utilizando técnicas estándar para identificar aquellos que producen anticuerpos con la especificidad deseada. Los animales adecuados para la producción de anticuerpos monoclonales para la proteína humana incluyen ratón, rata, hámster, etc. Para desarrollar anticuerpos contra la proteína de ratón, el animal será generalmente un hámster, cobaya, conejo, etc. El anticuerpo se puede purificar a partir de los sobrenadantes de las células de hibridoma o fluido ascítico mediante técnicas convencionales, por ejemplo cromatografía de afinidad que utiliza CTLA-4 unido a un soporte insoluble, proteína A sefarosa, etc.

[0031] El anticuerpo se puede producir como una cadena única, en lugar de la estructura multimérica normal. Los anticuerpos de cadena única se describen en Jost et al. (1994) J.B.C. 269:26267-73, et al. Las secuencias de ADN que codifican la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera se unen a un espaciador que codifica por lo menos aproximadamente 4 aminoácidos de aminoácidos neutros pequeños, incluyendo glicina y/o serina. La proteína codificada por esta fusión permite el ensamblaje de una región variable funcional que mantiene la especificidad y afinidad del anticuerpo original.

[0032] Para el uso *in vivo*, particularmente para la inyección en humanos, es deseable disminuir la antigenicidad del agente de bloqueo. Una respuesta inmune de un receptor contra el agente de bloqueo disminuirá potencialmente el periodo de tiempo en el que la terapia es eficaz. Los métodos de humanización de anticuerpos son conocidos en la técnica. El anticuerpo humanizado puede ser el producto de un animal que tiene genes transgénicos de la región

constante de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, las solicitudes Internacionales de Patentes WO 90/10077 y WO 90/04036). Alternativamente, el anticuerpo de interés se puede manipular mediante técnicas de ADN recombinante para sustituir los dominios CH1, CH2, CH3, bisagra, y/o el dominio del armazón ("framework") con la correspondiente secuencia humana (véase WO 92/02190).

5

[0033] El uso de ADNc de Ig para la construcción de genes de inmunoglobulinas quiméricas es conocido en la técnica (Liu et al. (1987) P.N.A.S. 84:3439 y (1987) J. Immunol. 139: 3521). El ARNm se aísla de un hibridoma u otra célula que produzca el anticuerpo y se utiliza para producir ADNc. El ADNc de interés se puede amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores específicos (Patente de Estados Unidos nos. 10 4.683.195 y 4.683.202). Alternativamente, se produce una biblioteca y se criba para aislar la secuencia de interés. La secuencia de ADN que codifica la región variable del anticuerpo se fusiona a continuación con las secuencias de las regiones constantes humanas. Las secuencias de los genes de las regiones constantes humanas se pueden hallar en Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, N.I.H. publicación no. 91-3242. Los genes de la región C humana están fácilmente disponibles de clones conocidos. La elección del isotipo vendrá 15 guiada por las funciones efectoras deseadas, tales como la fijación del complemento, o la actividad en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Los isotipos preferidos son IgG1, IgG3 e IgG4. Se pueden utilizar cualquiera de las regiones constantes de cadena ligera humana, kappa o lambda. A continuación, se expresa el anticuerpo quimérico humanizado mediante métodos convencionales.

20 **[0034]** Los fragmentos de anticuerpos, tales como Fv, F(ab')₂ y Fab se pueden preparar mediante la división de la proteína intacta, por ejemplo mediante división con proteasa o división química. Alternativamente, se diseña un gen truncado. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una parte del fragmento F(ab')₂ incluiría secuencias de DNA que codifican el dominio CH1 y la región bisagra de la cadena H, seguido de un codón de parada de la traducción para producir la molécula truncada.

25

[0035] Las secuencias de consenso de las regiones H y L J se pueden utilizar para diseñar oligonucleótidos para su uso como cebadores para introducir sitios de restricción útiles en la región J para la posterior unión de los segmentos de la región V con segmentos de la región C humana. El ADNc de la región C se puede modificar mediante mutagénesis dirigida de sitio para colocar un sitio de restricción en la posición análoga en la secuencia humana.

30

[0036] Los vectores de inclusión incluyen plásmidos, retrovirus, YACs, episomas derivados de EBV, y similares. Un vector apropiado es el que codifica una secuencia de inmunoglobulina CH o CL humana funcionalmente completa, con sitios de restricción apropiados diseñados, de manera que cualquier secuencia VH o VL se puede insertar y expresar fácilmente. En dichos vectores, tiene lugar el ajuste ("splicing") entre el sitio dador del ajuste en la región J insertada y el sitio aceptor de ajuste que precede a la región C humana y, también en las regiones de ajuste que 35 aparecen en los exones CH humanos. La poliadenilación y terminación de la transcripción tiene lugar en sitios cromosómicos nativos en dirección 3' ("downstream") de las regiones codificantes. El anticuerpo quimérico resultante se puede unir a cualquier promotor fuerte, incluyendo LTRs retrovirales, por ejemplo el promotor temprano de SV-40, (Okayama et al. (1983) Mol. Cell. Bio. 3:280), LTR del virus del sarcoma de Rous (Gorman et al. (1982) P.N.A.S. 40 79:6777), y LTR del virus de la leukemia murina de moloney (Grosschedl et al. (1985) Cell 41:885); promotores de Ig nativa, etc.

[0037] El agente de bloqueo CTLA-4 se puede utilizar solo o en combinación con un agente estimulante de la respuesta inmune. Tal como se utiliza en la presente invención, un "agente estimulante de la respuesta inmune" se 45 refiere a cualquier agente que estimula directa o indirectamente una respuesta inmune en combinación con un agente de bloqueo CTLA-4. Por ejemplo, los agentes estimulantes de la respuesta inmune incluyen citoquinas, así como diversos antígenos que incluyen antígenos de tumores y antígenos derivados de patógenos. Además, los agentes estimulantes de la respuesta inmune incluyen células tumorales transducidas por citoquinas, por ejemplo células tumorales transducidas con GMCSF, así como células tumorales que han sido irradiadas y/o tratadas con un 50 agente quimioterapéutico ex vivo o in vivo. En algunos casos, el residuo celular de células tumorales muertas o que se están muriendo proporciona una estimulación de la respuesta inmune que se puede combinar in vivo o ex vivo con un agente de bloqueo CTLA-4. El uso de agentes quimioterapéuticos es un ejemplo de producción de un agente estimulante de la respuesta inmune por medios indirectos. El uso de una fuente para irradiar células tumorales ex vivo o in vivo también constituye un método que produce indirectamente agentes estimulantes de la respuesta 55 inmune. Los ejemplos 8 a 12 demuestran que los agentes estimulantes de la respuesta inmune pueden tener un efecto significativo sobre el tratamiento de tumores cuando se utiliza en combinación con un agente de bloqueo CTLA-4.

[0038] La base para el uso de agentes quimioterapéuticos con agentes de bloqueo de CTLA-4 es la siguiente. Tal 60 como se indica en los ejemplos, el bloqueo de CTLA-4 funciona mejor con tumores ya establecidos y aumenta la inmunoogenicidad de células tumorales irradiadas. Esto sugiere que el bloqueo de CTLA-4 se puede combinar con métodos más convencionales del tratamiento del cáncer para producir un efecto sinérgico. Por ejemplo, el bloqueo de CTLA-4 se puede iniciar poco después del tratamiento con el agente quimioterapéutico. La dosis del agente quimioterapéutico se ajusta a un nivel que elimina una cantidad razonable de masa tumoral y genera un residuo que 65 actúa como agente para estimular una respuesta inmune por células T como resultado del bloqueo de CTLA-4. Esto permite administrar el agente quimioterapéutico en niveles muy por debajo de los utilizados actualmente para

obtener la máxima eliminación de las células tumorales, ya que la respuesta inmune facilitada por CTLA-4 elimina la masa tumoral residual. Esto minimiza los frecuentemente terribles efectos secundarios, incluyendo la inmunosupresión asociada con la aplicación convencional de quimioterapia. Consideraciones similares son aplicables a la radioterapia. La dosis de agente quimioterapéutico o radiación si se utiliza conjuntamente con un agente de bloqueo CTLA-4 se encuentra preferiblemente entre el 2 y 20%, más preferiblemente entre 5 y 10% de la dosis utilizada normalmente.

[0039] Los agentes de bloqueo de CTLA-4, especialmente aquellos que consisten en un anticuerpo para la parte extracelular de CTLA-4, se pueden utilizar en combinación con uno o más agentes estimulantes de la respuesta inmune. Los agentes de bloqueo de CTLA-4 también se pueden combinar conjuntamente con el tratamiento de radiación y/o el tratamiento quimioterapéutico que producen indirectamente agentes estimulantes de la respuesta inmune. Dicho uso combinado implica el uso simultáneo o secuencial del agente de bloqueo CTLA-4 y el agente estimulante de la respuesta inmune y puede tener lugar en diferentes puntos. Por ejemplo, el agente de bloqueo CTLA-4 se puede administrar en un punto lejos del tumor después de haber irradiado directamente el tumor. Alternativamente, se puede utilizar un agente quimioterapéutico para tratar células tumorales de manera local o sistémica seguido del uso de un agente de bloqueo CTLA-4.

[0040] Entre las situaciones caracterizadas por una respuesta deficiente de células T huésped a antígeno se incluyen los tumores. La administración de los bloqueadores de CTLA-4 de la presente invención cambia específicamente el fenotipo de las células T activadas, dando lugar a una mayor respuesta a la activación mediada por antígeno. Es de interés el tratamiento de primates, más particularmente humanos, pero otros mamíferos también se pueden beneficiar del tratamiento, particularmente animales domésticos, tales como equinos, bovinos, ovinos, felinos, caninos, murinos, lagomorfa y similares.

[0041] La formulación debe administrarse en una dosis eficaz para aumentar la respuesta de las células T a la estimulación antigénica. La respuesta de las células T activadas se verán afectadas por el tratamiento de la presente invención en un mayor grado que las células T en reposo. La determinación de la respuesta de las células T variará con el estado patológico que se trata. Las mediciones útiles de la actividad de células T son la proliferación, la liberación de citoquinas, por ejemplo IL-2, IFN γ , TNF α ; la expresión de células T de marcadores, tales como CD25 y CD69; y otras mediciones de la actividad de células T conocidas en la técnica.

[0042] El tratamiento se puede realizar en combinación con la administración de citoquinas que estimulan las células presentadoras de antígenos, por ejemplo factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de la colonia de granulocitos (G-CSF), interleuquina 3 (IL-3), interleuquina 12 (IL-12), etc. Se pueden utilizar proteínas y/o citoquinas adicionales conocidas por potenciar la proliferación y la secreción de células T, tales como IL-1, IL-2, B7, anti-CD3 y anti-CD28, de manera simultánea o secuencial con los agentes de bloqueo para aumentar la respuesta inmune. La terapia se puede combinar con la transfección de células tumorales o linfocitos que se infiltran en los tumores con genes que codifican para diversas citoquinas o receptores de la superficie celular (véase Ogasawara et al. (1993) Cancer Res. 53: 3561-8; y Townsend et al. (1993) Science 259:368-370). Por ejemplo, se ha observado que la transfección de células tumorales con ADNc que codifica CD80 conduce al rechazo de células tumorales transfectadas, y puede inducir inmunidad a una estimulación posterior por las células tumorales parentales no transfectadas (Townsend et al. (1994) Cancer Res. 54:6477-6483). La terapia aumenta este efecto.

[0043] Las células T huésped específicas de tumores se pueden combinar *ex vivo* con los agentes de bloqueo de la presente invención, y antígenos o células tumorales y se reintroducen en el paciente. Cuando se administran a un huésped, las células estimuladas inducen una reacción tumoricida que da lugar a una regresión tumoral. Las células huésped se pueden aislar de una serie de fuentes, tales como nódulos linfáticos, por ejemplo, inguinales, mesentéricos, auxiliares distales superficiales, etc.; médula ósea; bazo, o sangre periférica, así como del tumor, por ejemplo, linfocitos que se infiltran en el tumor. Las células pueden ser alogénicas o, preferiblemente autólogas. Para la estimulación *ex vivo*, las células huésped se extraen de manera aséptica, y se suspenden en cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Las células se estimulan mediante alguno de una serie de protocolos, particularmente combinaciones de B7, anti-CD28, etc., en combinación con los agentes de bloqueo. Las células estimuladas se reintroducen al huésped mediante inyección, por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, etc. en una serie de formulaciones farmacéuticas, incluyendo aditivos, tales como aglutinantes, sustancias de carga, portadores, conservantes, agentes estabilizantes, emulsionantes y tampones. Los diluyentes y excipientes adecuados son agua, solución salina, glucosa y similares.

[0044] Entre las células tumorales cuyo crecimiento puede disminuir mediante la administración de los agentes de bloqueo de la presente invención se incluyen carcinomas, por ejemplo adenocarcinomas, que pueden tener un sitio primario del tumor en la mama, ovario, endometrio, cérvix, colon, pulmón, páncreas, esófago, próstata, intestino delgado, recto, útero o estómago; y carcinomas de células escamosas, que pueden tener un sitio primario en los pulmones, cavidad oral, lengua, laringe, esófago, piel, vejiga, cérvix, párpado, conjuntiva, vagina, etc. Otras clases de tumores que se pueden tratar incluyen sarcomas, por ejemplo, sarcomas miogénicos; neuromas; melanomas, leucemias; ciertos linfomas; tumores trofoblásticos y de células germinales; tumores neuroendocrinos y neuroectodérmicos.

[0045] Los tumores de particular interés son aquellos que presentan antígenos específicos de tumores. Dichos antígenos pueden estar presentes en un contexto anormal, a niveles inusualmente elevados, o pueden ser formas mutadas. El antígeno del tumor se puede administrar con los agentes de bloqueo de la presente invención para
5 aumentar la respuesta de las células T huésped contra las células tumorales. Dichos preparados de antígenos pueden comprender proteína purificada o lisatos de células tumorales.

[0046] Ejemplos de antígenos de tumores son citoqueratinas, particularmente citoqueratina 8, 18 y 19, como antígeno para carcinomas. El antígeno de la membrana epitelial, (EMA), el antígeno embrionario humano (HEA-
10 125); glóbulos de la grasa de la leche humanos, MBr1. MBr8, Ber-EP4, 17-1A, C26 y T16 también son antígenos de carcinoma conocidos. La desmina y la actina específica de músculo son antígenos de sarcomas biogénicos. La fosfatasa alcalina de placenta, la gonadotropina crónica beta-humana, y la alfa-fetoproteína son antígenos de tumores trofoblásticos y tumores de células germinales. El antígeno específico de próstata es un antígeno de carcinomas prostáticos, antígeno carcinoembrionario de adenocarcinomas de colon. HMB-45 es un antígeno de
15 melanomas. La cromagranina-A y la sinaptofisina son antígenos de tumores neuroendocrinos y tumores neuroectodérmicos. De particular interés son los tumores agresivos que forman masas tumorales sólidas que tienen áreas necróticas. La lisis de dichas células necróticas es una fuente rica de antígenos para células presentadoras de antígenos.

[0047] La administración de los agentes de bloqueo de la presente invención puede estar contraindicada para ciertos linfomas. En particular, los linfomas de células T no pueden beneficiarse de una mayor activación. El antígeno CD80 es expresado fuertemente por las células de Reed-Sternberg en la enfermedad de Hodgkin, que están frecuentemente rodeadas por células T que expresan CD28 (Delabie et al. (1993) Blood 82:2845-52). Se ha sugerido que la función de las células accesorias de las células de Reed-Sternberg conduce a la activación de
20 células T, y contribuye al síndrome de Hodgkin.

[0048] Muchas terapias convencionales para el cáncer, tales como la quimioterapia o la terapia por radiación, reducen de manera severa las poblaciones de linfocitos. Aunque la terapia de la presente invención puede aliviar esta inmunosupresión hasta cierto grado, una evolución preferida del tratamiento combinado utilizará dichas terapias
30 linfotóxicas antes o después de la terapia de la presente invención.

[0049] Los adyuvantes potencian la respuesta inmune a un antígeno. Los agentes de bloqueo de CTLA-4 se utilizan como adyuvante para incrementar la activación de células T, y para incrementar el cambio de clase de células productoras de anticuerpos, aumentando de este modo la concentración de anticuerpos de clase IgG producidos en
35 respuesta al inmunógeno. Los agentes de bloqueo se combinan con un inmunógeno en un medio fisiológicamente aceptables según técnicas convencionales para utilizar adyuvantes. El inmunógeno se puede combinar en una formulación individual con el agente de bloqueo, o se puede administrar por separado. Entre los inmunógenos se incluyen polisacáridos, proteínas, fragmentos de proteínas, haptenos, etc. De particular interés es la utilización con inmunógenos peptídicos. Los inmunógenos peptídicos pueden incluir antígenos de tumores y antígenos virales o
40 fragmentos de los mismos, tal como se ha descrito anteriormente.

[0050] Se pueden utilizar varios métodos para la administración. La formulación de agentes de bloqueo de CTLA-4 se puede inyectar de forma intravascular, subcutánea, peritoneal, etc. La dosificación de la formulación terapéutica variará ampliamente, dependiendo de la naturaleza de la enfermedad, la frecuencia de administración, la forma de
45 administración, el objetivo de la administración, la depuración del agente a partir del huésped, y similares. La dosis administrada variará dependiendo de factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente concreto, modo y ruta de administración, edad, salud y peso del receptor, naturaleza y extensión de los síntomas, tratamientos concurrentes, frecuencia del tratamiento y efecto deseado. La dosis se puede administrar de manera poco frecuente, como semanalmente o cada dos semanas, o se puede fraccionar en dosis más pequeñas y
50 administrarse diariamente, dos veces por semana, etc. para mantener un nivel de dosificación eficaz. En general, una dosificación diaria de principio activo puede ser de aproximadamente 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal. Las formas de dosificación adecuadas para la administración interna contienen en general desde aproximadamente 0,1 mg hasta 500 mg de principio activo por unidad. El principio activo puede variar desde un 0,5 hasta un 95% en peso en base al peso total de la composición.

[0051] En algunos casos, puede ser deseable limitar el periodo de tratamiento debido a la excesiva proliferación de células T. Las limitaciones se determinarán empíricamente, dependiendo de la respuesta del paciente a la terapia, el número de células T en el paciente, etc. El número de células T se puede monitorizar en un paciente mediante
55 métodos conocidos en la técnica, incluyendo la tinción con anticuerpos específicos de células T y citometría de flujo.

[0052] Los bloqueadores de CTLA-4 se preparan como formulaciones en una dosis eficaz en medios farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, solución salina normal, aceites vegetales, aceites minerales, PBS, etc. Las preparaciones farmacéuticas pueden incluir líquidos, gel o portadores sólidos, diluyentes, adyuvantes y excipientes fisiológicamente tolerables. Los aditivos pueden incluir agentes bactericidas, aditivos que mantienen la isotonicidad, por ejemplo, NaCl, manitol; y estabilidad química, por ejemplo, tampones y conservantes, o similares.
65 Los bloqueadores de CTLA-4 se pueden administrar como un cóctel o como un agente individual. Para la

administración parenteral, el agente de bloqueo se puede formular como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. También se pueden utilizar liposomas o vehículos no acuosos, tales como aceites fijados. La formulación se esteriliza mediante técnicas conocidas en el sector.

5 **[0053]** El efecto funcional del bloqueo de CTLA-4 también se puede inducir mediante la administración de otros agentes que mimetizan el cambio en la señalización intracelular observada con la invención de la presente invención. Por ejemplo, se sabe que se pueden activar quinasas citoplásmicas específicas en respuesta a la unión de receptores extracelulares. Los agentes que bloquean la actividad quinasa tendrían un efecto fisiológico similar a
10 la unión a un receptor de bloqueo. De manera similar, los agentes que aumentan las concentraciones de AMP cíclico, GTP y los niveles intracelulares de calcio pueden producir efectos fisiológicos que son análogos a los observados con la unión a receptores extracelulares.

[0054] los siguientes ejemplos se disponen a modo de ilustración y no a modo de limitación. La presente invención
15 es tal como se define en las reivindicaciones. La materia fuera de las reivindicaciones es de referencia.

Parte Experimental

EJEMPLO 1

20 Generación de Reactivo de Anticuerpos Monoclonales Con CTLA-4 de Ratón

a) Preparación de un Inmunógeno de CTLA-4 de Ratón

25 **[0055]** Se obtuvo una proteína de fusión que comprendía las partes extracelulares del gen del CTLA-4 de ratón y la región constante de IgG1 humana, denominada mCTLA4-Hgl, por parte de los Drs. P. Lane y K. Karjalainen (Baser Institute for Immunology, Basilea, Suiza). Se construyó un vector de expresión capaz de expresar la proteína mCTLA4-Hgl tal y como se describe [Lane, et al. Immunol. 80:56 (1993)]. En resumen, se generaron secuencias que codifican las partes extracelulares de la molécula CTLA-4 de ratón utilizando PCR. Se utilizó la siguiente pareja de
30 cebadores para amplificar estas secuencias de CTLA-4 a partir de un plásmido que contiene secuencias de CTLA-4 de ratón: 5'-TTACTCTACTCCCTGAGGAGCTCAGCACATTTGCC-3' (SEC ID N°:1) y 5'-TATACTTACCAGAATCCG GGCATGGTTCTGGATCA-3' (SEC ID N°:2). A continuación, se insertaron las secuencias de CTLA-4 amplificadas en un vector de expresión que permite la inserción de un gen de interés en dirección 5' ("upstream") de secuencias que codifican los dominios bisagra, CH2 y CH3 de la proteína IgG1 humana [Traunecker, et al. Trends Biotech.
35 9:109 (1991)]. Cada cebador contenía sitios de restricción apropiados para la subclonación en el vector de expresión de IgG1 humana, junto con un sitio dador de empalme ("splice") en 3' dentro del cebador de 3' para empalmarse a los exones de gl humana correctamente. El plásmido que contenía secuencias que codificaban la proteína de fusión mCTLA-4-Hgl se denominó pH β -APr-1-neo-mCTLA4-Hgl.

40 **[0056]** Para expresar la proteína mCTLA4-Hgl, se transfirió el vector de expresión pH β APr-1-neo-mCTLA4-Hgl en la línea de plasmacitoma de ratón, J558L (J558L es idéntica a la línea celular J558 que está disponible en ATCC [ATCC TIB 6]) utilizando la técnica estándar de fusión de protoplastos. Se cultivaron células J558L a 5×10^4 células/ml. A continuación, se seleccionaron células J558L transfectadas en presencia de medio que contenía xantina (Sigma) y ácido micofenólico (Calbiochem, LaJolla, CA) (medio selectivo). Se aplicó el medio selectivo 24h
45 después de la transfección y se cribaron dos semanas después los clones positivos (es decir, clones que crecieron en el medio selectivo). Se identificaron los clones que secretaban la proteína de fusión utilizando un ELISA para IgG1 humana. Se identificó un buen clon de secreción y se designó como clon n° 15. Se marcaron metabólicamente las células del clon n° 15 con metionina [^{35}S] y se inmunoprecipitaron las proteínas secretadas con proteína A y se resolvieron las proteínas precipitadas en un gel de poliacrilamida SDS. Se observó que la proteína mCTLA4-Hgl
50 migraba en geles de SDS-PAGE como un monómero de PM de aproximadamente 60.000 bajo condiciones reductoras y como un dímero bajo condiciones no reductoras.

[0057] Se obtuvieron preparaciones purificadas de proteína mCTLA4-Hg1 mediante cromatografía de afinidad de sobrenadantes de cultivo de células de clon n° 15 en una columna de proteína A-Sefarosa (Zymed, South San
55 Francisco, CA). En resumen, las células J558 que expresaban la proteína mCTLA4-Hgl crecieron en IMDM complementado con FCS al 5%, glutamina, 2ME y antibióticos. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo de las células y se centrifugaron a $1500 \times g$ para eliminar cualquier célula restante y se filtró el sobrenadante depurado a través de un tamaño de poro de 0,4 micras. Se ajustó el sobrenadante filtrado hasta un pH 8,5 utilizando NaOH 1N; a continuación, se hizo pasar el sobrenadante por una columna de proteína A-Sefarosa de 2 ml (volumen
60 empaquetado) a una velocidad de flujo de 2 ml/min. Se observa que la línea celular J558 produce una inmunoglobulina adicional (es decir, además de la proteína de fusión CTLA4g de ratón) que se une a la proteína G; por lo tanto, no se recomienda el uso de resinas de proteína G para la purificación de la proteína mCTLA4-Hgl a partir de células J558 transfectadas.

65 **[0058]** Se lavó la columna de proteína A con de 20 a 30 volúmenes de columna de PBS y se eluyó la proteína de

fusión con dietilamina 50 mM (pH 11,0). Se recogieron fracciones de dos mililitros en tubos que contenían 0,2 ml de Tris-HCl 1M para neutralizar el pH de la muestra. Se determinó la absorbancia a 280 nm y se utilizó para evaluar la concentración de proteína de cada fracción. Se combinaron las fracciones que contenían proteína y se dializaron durante toda la noche contra 2 a 3 cambios de PBS (1 litro por cambio). Se confirmó la presencia de proteína mCTLA4-Hgl mediante SDS-PAGE, que mostró una banda de aproximadamente 40 kD (el peso molecular predicho de la proteína de fusión). Además, se ensayó la proteína mCTLA4-Hgl purificada en un ELISA utilizando un anticuerpo IgG1 antihumano (HP6058; se utilizó el hibridoma de HP6058 (ATCC CRL 1786) como la fuente de anticuerpos de HP6058).

10 b) Inmunización de Hámsters

[0059] Para inmunizar hámsters con la proteína de fusión de CTLA-4 de ratón, se utilizó proteína mCTLA4-Hgl purificada (de aquí en adelante referida como CTLA-4Ig) para cubrir células de bacterias *Staphylococcus aureus* (StaphA) matadas por calor (Calbiochem, LaJolla, CA). Se inyectó a hámsters Golden Syrian de seis semanas de vida en la base de las patas 50 µl (volumen empaquetado) de bacterias StaphA matadas por calor cubiertas con aproximadamente 100 µg de CTLA-4Ig suspendida en 0,2 ml de PBS. Las células de StaphA se cubrieron tal como se indica a continuación.

[0060] Se prepararon células de StaphA de acuerdo con el protocolo del fabricante hasta una concentración de 10% p/v en solución salina (NaCl al 0,9%). Se centrifugó un ml de emulsión de células bacterianas a 1.400 x g para precipitar las bacterias y se extrajo el sobrenadante. Se añadió una solución de 1 ml que contenía aproximadamente 100 µg de CTLA-4Ig purificada en PBS al residuo y se incubó la mezcla a 37°C durante 2 horas con agitación. A continuación, se precipitaron las bacterias mediante centrifugación tal y como se describe anteriormente; se lavó el residuo dos veces con 1 ml de PBS/lavado. A continuación, se resuspendieron las células bacterianas cubiertas con CTLA-4Ig en aproximadamente 200 µl de PBS; se inyectaron 50 µl de esta preparación por base de las patas.

[0061] Se administraron un total de cinco inyecciones por hámster. El día del refuerzo final y antes de la inyección, se obtuvieron aproximadamente 100 µl de suero mediante sangrado intraocular realizado por la Office of Laboratory Animal Care staff (Univ. of Calif, Berkeley). Se analizó este suero en comparación con el suero obtenido mediante la metodología idéntica antes de la primera inyección.

[0062] Se utilizó un ELISA de unión a CTLA-4Ig para demostrar la presencia del anticuerpo que reconocía la proteína de fusión CTLA-4Ig en el sangrado post-inmunización. El ELISA de unión a CTLA-4Ig se llevó a cabo tal y como se indica a continuación. Se utilizó la proteína de fusión CTLA-4Ig o la proteína de fusión CD4Ig para cubrir los pocillos de placas de ELISA de base plana modificada de 96 pocillos (Corning, Coming, NY).

[0063] CD4Ig es una proteína de fusión que consiste en el dominio extracelular de CD4 de ratón y los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgG1 humana [Traunecker et al., supra.]; se utilizó la proteína CD4Ig como control negativo en los ensayos ELISA. Se preparó la proteína de fusión CD4Ig a partir de células J558 transfectadas y se purificó mediante cromatografía de afinidad en Sefarosa de proteína A tal y como se describe anteriormente para la proteína de fusión mCTLA4-Hgl (es decir, la CTLA-4Ig) en la sección (a).

[0064] Se colocaron cincuenta microlitros de las proteínas de fusión, a una concentración de 1 µg/ml en gelatina al 0,4% en PBS en los pocillos. Se incubaron las placas a 37°C durante 2-3 horas para permitir que las proteínas se absorbieran; a continuación, se lavaron las placas tres veces utilizando 150 µl de NaCl al 0,9% que contenía Tween-20 al 0,05%. A continuación, se bloquearon los restantes sitios de unión a proteína en los pocillos utilizando gelatina al 0,4% en PBS (tampón de bloqueo) durante 30 min a 37°C; tras la etapa de bloqueo, se lavaron las placas dos veces con NaCl al 0,9% que contenía Tween-20 al 0,05%. Se añadieron cincuenta microlitros de solución que contenía anticuerpos antiCTLA-4 (es decir, suero de hámsters inmunizados, anticuerpos purificados o sobrenadantes de cultivo) en pocillos por triplicado y se incubaron las placas durante 2-3 horas a 37°C. Para evaluar la cantidad de anticuerpos anti-CTLA-4 presentes en el suero de hámsters inmunizados, se ensayaron los sangrados post-inmunización utilizando diluciones que iban de 1:1000 a 1:100 (diluidas en gelatina al 0,4% que contenía PBS).

[0065] A continuación, se lavaron los pocillos tres veces utilizando 150 µl de NaCl al 0,9% que contenía Tween-20 al 0,05%. Se añadieron a los pocillos cincuenta microlitros de una solución que contenía sueros policlonales de IgG anti-hámster de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante (CalTag, South San Francisco, CA) a una concentración de 1 µg/ml en tampón de bloqueo y se incubaron las placas durante 1 hora a 37°C. A continuación, se lavaron las placas cuatro veces con NaCl al 0,9% que contenía Tween-20 al 0,05%. Se añadió una solución que contenía 0,55 mg/ml de ABTS 2,2'-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) en tampón de citrato [ácido cítrico 0,1 M (pH 4,35)] y se incubaron las placas durante aproximadamente 20 min a 37°C. A continuación, se leyeron las placas a 405 nm utilizando un lector de placas BioTech (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) para evaluar la absorbancia del producto verde de la reacción.

[0066] Los resultados del ELISA de unión a CTLA-4Ig demostraron la presencia de anticuerpo que reconocía la

proteína de fusión CTLA-4Ig en el sangrado post-inmunización a diluciones de suero 1000 veces mayor que la dilución en cuyo fondo podría detectarse utilizando sangrado pre-inmune.

c) *Aislamiento de líneas de hibridoma que secretan anticuerpos de CTLA-4 anti-ratón*

5

[0067] Tres días después de la inyección final, se extrajeron los nódulos linfáticos de drenaje de los hámsters. Se aislaron linfocitos de los nódulos linfáticos popliteales que drenan las patas traseras. Se realizaron suspensiones celulares a partir de los nódulos linfáticos aislados tal y como se indica a continuación. Se colocaron los nódulos diseccionados en una placa de cultivo tisular (Falcon Plastics, Mountain View, CA) que contenía medio RPMI
10 (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) complementado con FCS al 10% (BioWhittaker, Walkersville, MD). Se liberaron los linfocitos de los nódulos mediante la molienda suave de los nódulos con portaobjetos de vidrio esmerilado; se contaron las suspensiones de linfocitos utilizando un hemocitómetro.

[0068] Se fusionaron los linfocitos aislados de los hámsters inmunizados con la pareja celular de fusión,
15 P3X3.Ag8.653 (ATCC CRL 1580). Se dividieron las células P3X3.Ag8.653 1:20 cada 3 días antes de la fusión en IMDM (Univ. of Calif., San Francisco Tissue Culture Facility) que contenía FCS (suero de ternero fetal) al 20% (BioWhittaker, Walkersville, MD), 50 μ M de 2-ME, 50 μ M de gentamicina.

[0069] La fusión con la línea de mieloma utilizó una técnica de fusión estándar de polietilenglicol [McKearn et al.,
20 Immunol. Rev. 47:91 (1979)]. En resumen, se prepararon suspensiones celulares de linfocitos estériles en Medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) sin suero. Se lavaron los linfocitos dos veces con IMDM y se ajustaron a una densidad de $12,5 \times 10^6$ células/ml.

[0070] Se lavaron dos veces las células P3X3.Ag8.653 (desarrolladas tal y como se describe anteriormente) con
25 IMDM sin suero [se centrifugaron estas células durante 5 minutos a 1000 r.p.m. en una centrifuga TJ-6 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) a 25°C para precipitar las células] y se ajustó la densidad de células P3X3.Ag8.653 a 5×10^6 células/ml.

[0071] Se mezclaron cuatro mililitros de suspensión celular de linfocitos con 1 ml de las células P3X3.Ag8.653
30 lavadas en una placa de cultivo tisular de 60 mm (Falcon). Se colocaron las placas de cultivo tisular en portadores de placas de microtitulación (Beckman Instruments, Palo Alto, CA) y se centrifugaron a $250 \times g$ (1200 r.p.m.; centrifuga TJ-6) durante 5 minutos para generar una monocapa adherente de células en la base de la placa. Se aspiró el sobrenadante de las placas y se inundaron cuidadosamente las placas con 1 ml de polietilenglicol al 50% (PEG 1500, Boehringer Mannheim) en IMDM; se preparó la solución de PEG mediante el calentamiento de 4 ml de
35 PEG 1500 y 4 ml de IMDM por separado en un baño de agua a 60°C y, a continuación, la combinación mediante aspiración del PEG en una pipeta seguido del IMDM y el mezclado de manera vigorosa. Después de 30 segundos a temperatura ambiente, se inundaron las placas con 5 ml de IMDM sin suero.

[0072] Después del último lavado en día de la fusión, se dejaron durante 12 horas a 37°C con CO₂ al 5% las células
40 en la placa de 60 mm con 5 ml de medio IMDM que contenía FCS. Al día siguiente, se diluyeron las células fusionadas en 100 ml de IMDM que contenía medios FCS y IX HAT al 20% (Boehringer Mannheim, NJ) y se emplacaron 100 μ l por pocillo en placas de base plana de 96 pocillos. Tras 5 y 9 días, se añadieron 50 μ l adicionales de medios a cada pocillo. A continuación, se extrajeron 50 μ l de los medios y se añadieron medios nuevos a intervalos de 3 días. Una vez que el número de células estaba dentro de un rango de 1000-5000 por pocillo, se
45 ensayaron los sobrenadantes de hibridoma según su reactividad a CTLA-4Ig y según una falta de reactividad a CD4Ig mediante ELISA tal y como se describe anteriormente en la sección (b). Se utilizaron sobrenadantes de hibridoma sin diluir en el ELISA (50 μ l/pocillo).

[0073] Se clonaron repetidamente los hidridomas de pocillos positivos mediante dilución limitante en presencia de
50 capas de alimentación de timocitos de ratón irradiados. Se seleccionó una línea de hibridoma que secreta un anticuerpo monoclonal, denominado anticuerpo 9H10, mediante los siguientes criterios:

1) reactividad contra CTLA-4Ig pero no CD4Ig en ELISAs; 2) la capacidad de bloquear la unión de CTLA-4Ig con transfectantes de B7; 3) la capacidad de teñir células T activadas pero no células T recién aisladas; y 4) la capacidad de teñir un transfectante de CTLA-4 pero no de transfectantes de control.

55

[0074] Se demostró la capacidad del anticuerpo 9H10 de bloquear la unión de CTLA4Ig con los transfectantes de B7
de la siguiente manera. Se incubaron aproximadamente 10 μ l de mAb 9H10 a 22°C durante 30 min con 1 μ g de proteína de fusión de CTLA-4Ig en un volumen final de 50 μ l de una solución que comprende PBS. Se añadió a esta
mezcla 2×10^5 células de B7-EL-4, suspendidas en 10 μ l de PBS enfriada en hielo que contiene suero de ternero al
60 1% y 0,05% de acida sódica. Las células de B7-EL-4 son la línea celular de timoma EL4 derivada de C57BL/6 transfectada con un vector de expresión que codifica la proteína de superficie celular de B7 de ratón, tal y como se describe en Townsend et al. Cancer Res. 54:6477-83 (1994).

[0075] A continuación, se incubó la mezcla resultante en hielo durante 30 minutos, seguido de dos lavados con 4
65 ml/lavado de PBS que contiene suero de ternero al 1% y acida sódica al 0,05%. A continuación, se tiñeron las

células con IgG antihumana conjugada con isotiocinato de fluoresceína (FITC) (Caltag, South San Francisco, CA). Como control negativo para este experimento, se incubó la proteína de fusión de CTLA-4 g con una IgG de hámster de control o la línea celular parental de EL-4. Se analizaron las células en un FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA); se utilizó el programa LYSIS II (Becton Dickinson) para restringir electrónicamente en poblaciones
5 relevantes. En la mayoría de experimentos, se recogieron 10.000 casos regulados vivos para análisis. Los resultados mostraron que el anticuerpo 9H10 bloqueaba la unión de CTLA-A con células B7-EL-4.

[0076] La capacidad del anticuerpo 9H10 para teñir células T activadas pero no células T recién aisladas se demostró de la siguiente manera. Se generaron esplenocitos nuevos y activados. Se recogieron bazo de ratones
10 BALB/c de 4-6 semanas y se trocearon, y se trataron las suspensiones con solución hemolítica de Gey para extraer los glóbulos rojos, una técnica estándar en el sector [Mishell y Shiigi, Selected Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman y Co., San Francisco (1980) pág. 23-24]. Se cultivaron las células en RPMI que contenía suero de ternero fetal al 10%, con anticuerpo anti-CD-3 soluble a 10 µg/ml añadido para activar una parte de la población celular. La otra parte de los esplenocitos no se trató con anti-CD3 y representa la parte nueva (pero esplenocitos no activados).
15 A continuación, se tiñeron las dos poblaciones celulares con 1) una combinación de 9H10 (anticuerpo de anti-CTLA-A; 5 µg de anticuerpo) conjugado con FITC y Thyl.2 conjugado con PE o 2) una combinación de Ig de hámster conjugado con FITC y Thyl.2 conjugado con PE. Se analizaron los datos en un FACScan y se restringió electrónicamente para células positivas de Thyl.2 para analizar sólo la población de células T relevante. Los resultados de este experimento demostraron que el anticuerpo 9H10 teñido se activó (es decir, que expresa CTLA-
20 4), pero no las células T recién aisladas.

[0077] La capacidad del anticuerpo 9H10 de teñir un transfectante de CTLA-4, pero no transfectantes de control, se demostró de la siguiente manera. Se transfectó una línea celular (ATCC CCL 61) de CHO parental (Ovario de Hámster Chino, células CHO-K1) original con pSR1neo.CTLA-4. pSR1neo.CTLA-4 contiene el ADNc de 1,9 kb
25 completo que codifica la proteína CTLA-4 de ratón [Brunet et al., Nature 328:267 (1987)] insertado en el vector de expresión pSR1neo. Las células transfectadas con el vector pSR1neo.CTLA expresan la proteína CTLA-4 de ratón en la superficie celular.

[0078] Se tiñeron las células parentales (es decir, las células CHO-K1) y transfectadas con 1) una combinación de
30 9H10 (el anticuerpo anti-CTLA-4; 5 µg de anticuerpo) conjugado con FITC y Thyl.2 conjugado con PE o 2) una combinación de Ig de hámster conjugada con FITC y Thyl.2 conjugado con PE. Los datos se restringieron electrónicamente para células positivas de Thyl.2 para analizar sólo la población de células T relevante. Los resultados de este experimento demostraron que el anticuerpo 9H10 tiñe transfectantes de CTLA-4 pero no transfectantes de control.

[0079] Los resultados anteriores demostraron que el anticuerpo monoclonal 9H10 reacciona específicamente con la
35 proteína CTLA-4 de ratón.

EJEMPLO 2

40 Anticuerpos monoclonales Anti-CTLA-4 causan el rechazo de tumores V51BLim10 en ratones

[0080] Se utilizó el anticuerpo monoclonal de CTLA-4 anti-ratón, 9H10, para tratar ratones que recibieron inyecciones de una línea celular de carcinoma de colon. La inyección del mAb 9H10 junto con células tumorales
45 V51BLim10 dio lugar al rechazo completo de las células tumorales en los animales experimentales. En cambio, los ratones inyectados con células mAb anti-CD28 y V51BLim10 o ratones sólo inyectados con V51BLim10 desarrollaron ambos tumores que mostraban un incremento constante en el tamaño tumoral promedio durante un periodo de cuatro semanas.

50 a) Generación de la línea celular V51BLim10

[0081] Se generó la línea celular V51BLim10 mediante transfección del vector de expresión SR1neo en la línea celular 51BLim10. La línea celular 51BLim es una línea celular de carcinoma de colon que proporciona un modelo animal preciso para metástasis de cáncer de colon en humanos. Bresalier, et al., Cancer Res. 47:1398 (1987).
55

[0082] La línea celular V51BLim10 utilizada en los presentes experimentos se generó de la siguiente manera. Se inyectó la línea celular 51B de cáncer de colon murino establecida por Corbett et al., Cancer Res. 35:2434-9 (1975) en la pared del ciego de ratones BALB/c; se observó que los tumores colónicos resultantes realizan metástasis espontáneamente al hígado en una minoría de los ratones inyectados. Bresalier et al., Cancer Res. 47: 1398 (1987).
60 Se desarrollaron líneas celulares tumorales que tenían actividad metastásica progresivamente incrementada mediante la recogida de células de la metástasis original, que a continuación se utilizaron para reinyección sucesiva en los ciegos de ratones adicionales. A estas líneas celulares se denominaron de 51BLim-1 a 5BLim-5 donde el número de después del guión se refiere al número de ciclos metastásicos.

65 **[0083]** Se designó 51BLim10 a un derivado metastásico de 51 B obtenido por el Dr. Warren at the University of

California San Francisco; la línea celular 51BLim10 corresponde a la línea celular 51BLiM5 descrita por Bresalier, et al., Cancer Res. 47:1398 (1987).

[0084] Se transfectó el vector de expresión SRIneo en la línea celular 51 BLiM-10 para generar la célula V51BLim10 tal y como se ha descrito [Townsend et al. Cancer Res. 54: 6477-83 (1994)]. El vector de expresión SRIneo (obtenido de L. Lanier at DNAX Research Institute of Molecular and Cellular Biology, Palo Alto, CA) permite la expresión de un gen de interés bajo el control transcripcional del LTR de HTLV-1. El vector SRIneo también contiene el gen neo bajo el control transcripcional del promotor/potenciador de SV40. La presencia del gen neo permite la selección de células transfectadas que contienen el vector SRIneo.

10

[0085] Se transfectó el vector de expresión SRIneo en células 51 BLiM-10 mediante electroporación utilizando un electroporador BTX T 800 (BTX, Inc., San Diego, CA). Se aplicaron cinco pulsaciones de 99 μ s cada uno a 450 ó 600 V. Se llevó a cabo la electroporación en un volumen de reacción final de 750 μ l de una solución que comprendía sacarosa 270 mM, NaPO₄ (pH 7,4), MgCl₂ 1 mM, 5 x 10⁶ de células 51B LiM-10 y 50 μ g del vector de expresión SRIneo. Después de la electroporación, se cultivaron las células durante 24 horas en medio completo [MEM de Eagle (Univ. of Calif. at San Francisco Cell Culture Facility, San Francisco, CA) complementado con FCS al 10% (Sigma), aminoácidos no esenciales, solución de vitamina de MEM, L-glutamina, piruvato sódico, gentamicina (todos de Irvine Scientific, Santa Ana, CA) y bicarbonato sódico al 7,5% (Sigma)] a 37°C. Medio de selección [medio completo que contiene Geneticina 1 mg/ml (sulfato de G418, GIBCO, Grand Island, NY)]. Después de 14 días de cultivo en el medio de selección, se agruparon las células resistentes a fármaco y se utilizaron en experimentos posteriores como una población policlonal referida como V51BLim10.

[0086] Se mantuvieron células tumorales V51BLim10 en MEM de Eagle (Univ. of Calif. at San Francisco Cell Culture Facility, San Francisco, CA) complementado con FCS al 10% (Sigma), aminoácidos no esenciales, solución de vitamina de MEM, L-glutamina, piruvato sódico, gentamicina, penicilina-estreptomicina (todos de Irvine Scientific, Santa Ana, CA) y Geneticina 1 mg/ml. Se establecieron los cultivos celulares a partir de alícuotas congeladas de pocos pases (es decir, menos de 10 pases) y se mantuvieron en cultivo durante no más de 30 días antes de su uso.

[0087] Se observó que las células V51BLim10 y las células 51BLim10 parentales muestran tasas de crecimiento in vivo e in vitro similares. La expresión del gen de resistencia a la neomicina en las células V51BLim10 y una variedad de otras líneas celulares tumorales no ha tenido efecto en la tumorigenicidad o tasa de crecimiento de tumores de las células inyectadas.

b) Inyección de ratones con células tumorales V51BLim10 y anticuerpos monoclonales

35

[0088] Se recogieron células tumorales V51BLim10 de placas de cultivo tisular con tripsina-EDTA (Sigma), se lavaron tres veces en medios sin suero (MEM de Eagle) y se suspendieron a una concentración de 2 x 10⁷ células/ml.

[0089] Los ratones utilizados en este experimento eran ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas de vida (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Grupos de cinco ratones se anestesiaron mediante inhalación con metoxiflurano, se agujerearon las orejas para la identificación, y se inyectaron con 200 μ l de la suspensión de células tumorales V51BLim10 (4 x 10⁶) subcutáneamente en el costado izquierdo. Los grupos tratados recibieron inyecciones intraperitoneales de 100 μ g del mAb 9H10 antiCTLA-4 descrito anteriormente, o alternativamente el mAb anti-CD28, 37.51, en el mismo día, e inyecciones i.p. adicionales de 50 μ g en los días 3 y 6 después de la inyección de células tumorales (designado mediante las flechas oscurecidas en la Figura 1). Se dirige el anti-CD28 monoclonal, 37.51, contra la proteína CD28 de ratón [Gross et al., J. Immunol. 149: 380 (1992)] y sirve como control negativo.

[0090] Se monitorizaron los ratones por el crecimiento de tumores subcutáneos y se midieron los diámetros de bisección de tumores en desarrollo con calibradores. Todos los ratones que no se trataron, o se trataron con anticuerpo anti-CD28, desarrollaron tumores progresivamente en crecimiento y requirieron eutanasia 35 días después de la inoculación. En cambio, todos los ratones tratados con anticuerpo anti-CTLA-4 rechazaron completamente sus tumores tras un periodo corto de crecimiento limitado. Tal y como se muestra en la Figura 1A, el área de tumor promedio en mm² (mostrado a lo largo del eje y) decreció gradualmente a partir aproximadamente del día 14 después de la inyección del tumor (mostrado a lo largo del eje x), decreciendo hasta cero en el día 24 aproximadamente. El tratamiento con anti-CTLA-4 fue menos efectivo en dosis para tumores menores. LA Figura 1B muestra el tamaño de tumor medio en ratones inyectados con 2 x 10⁶ células tumorales y tratados tal y como se describe anteriormente con el anticuerpo anti-CTLA-4 o un anticuerpo de hámster irrelevante. El tratamiento con anticuerpo anti-CTLA-4 continuó teniendo un efecto espectacular en el crecimiento tumoral, pero un ratón desarrolló un tumor rápidamente, y otro mucho más tarde. La Figura 1C ilustra el crecimiento tumoral individual en ratones inyectados con 2 x 10⁶ células V51BLim10. Tres de los ratones quedaron sin tumor más allá de los 80 días. Es obvio que el bloqueo de CTLA-4 potenció significativamente el rechazo de las células tumorales negativas B7.

c) Inyección de ratones con células tumorales B7-51BLim10 y anticuerpos monoclonales

65

[0091] Se transfectaron células 51BLim10 tal y como se ha descrito anteriormente, con un plásmido que contenía el gen para B7-1 murino, y se clonaron mediante dilución limitante. Se recogieron células tumorales B7-51BLim10 de placas de cultivo tisular con tripsina-EDTA (Sigma), se lavaron tres veces en medios sin suero (MEM de Eagle) y se suspendieron a una concentración de 2×10^7 células/ml.

[0092] Los ratones utilizados en este experimento eran ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas de vida (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Grupos de cinco ratones se anestesiaron mediante inhalación con metoxiflurano, se agujerearon las orejas para la identificación, y se inyectaron con $100 \mu\text{l}$ de la suspensión de células tumorales B7-51BLim10 (4×10^6) subcutáneamente en el costado izquierdo. Los grupos tratados recibieron inyecciones intraperitoneales de $100 \mu\text{g}$ de mAb 9H10 antiCTLA-4 descrito anteriormente, o alternativamente mAb anti-CD28, 37.51. Se administraron inyecciones de 100, 50, y $50 \mu\text{g}$ en los días 0, 3 y 6, respectivamente (los días de inyección se designan mediante las flechas oscurecidas en la Figura 2). Se dirige el anti-CD28 monoclonal, 37.51, contra la proteína CD28 de ratón [Gross et al., J. Immunol. 149:380 (1992)] y sirve como control negativo.

[0093] Se monitorizaron los ratones por su crecimiento tumoral subcutáneo y se midieron los diámetros de bisección de tumores en con calibradores. En la Figura 2 se muestran los datos de este experimento. El tratamiento con anticuerpos anti-CTLA-4 inhibió el crecimiento del tumor B7-51BLim10 en comparación con los grupos de anti-CD28 y de control. Todos los ratones en los grupos no tratados y tratados con anti-CD28 desarrollaron pequeños tumores que crecieron progresivamente durante cinco a diez días y, a continuación, por último, experimentaron regresión en ocho de los diez ratones hacia aproximadamente el día 23 tras la inyección. Los dos pequeños tumores que no experimentaron regresión permanecieron estáticos durante aproximadamente 90 días. En cambio, 3 de los 5 ratones tratados con anticuerpo anti-CTLA-4 desarrollaron tumores muy pequeños, y todos ellos experimentaron regresión completa hacia el día 17.

d) El rechazo inducido por anti-CTLA-4 de células tumorales V51BLim10 da lugar a la protección contra la estimulación posterior con células de carcinoma de colon de tipo natural

[0094] Se reestimularon cinco ratones tratados con anti-CTLA-4 que habían rechazado completamente las células tumorales V51BLim10 70 días después con 4×10^6 células tumorales 51BLim10 de tipo natural inyectadas subcutáneamente en el costado opuesto. También se inyectaron cinco ratones no tratados anteriormente como controles. Se midieron los diámetros de los tumores y se indicaron tal y como se describe. El rechazo del tumor anterior dio lugar a una protección significativa contra la estimulación secundaria en comparación con los controles no tratados anteriormente. Todos los ratones de control desarrollaron progresivamente tumores crecientes, desarrollaron cargas tumorales masivas, y se sacrificaron en el día 35 después de la inoculación. 3 de 5 ratones inmunizados previamente quedaron sin tumor 70 días después de la estimulación. Sólo uno de los ratones inmunizados previamente presentó un tumor detectable antes del día 14, y el crecimiento de este tumor fue muy lento. En última instancia, se desarrollaron dos tumores más en los ratones inmunizados 42 días después de la estimulación. En la Figura 3 se muestran los datos. Estos resultados demostraron que el rechazo de tumor mediado por el bloqueo de CTLA-4 dio lugar a una memoria inmunológica.

e) El tratamiento con Anti-CTLA-4 reduce el crecimiento de tumores establecidos.

[0095] Se inyectaron grupos de ratones s.c. con 2×10^6 células tumorales 51BLim10. Se inyectaron animales de control ($n=10$) i.p. con $100 \mu\text{g}$ de anticuerpo de hámster irrelevante en los días 0, 3, 6 y 9, tal y como se indica mediante las flechas que apuntan hacia arriba en la Figura 4. Un grupo de tratamiento con anti-CTLA-4 recibió inyecciones i.p. en los mismos días. Se administraron a los otros ratones tratados ($n=5$) inyecciones i.p. de anticuerpo anti-CTLA-4 empezando en el día 7 y posteriormente en los días 10, 13 y 16 (flechas apuntando hacia abajo). En la Figura 4 se muestran los datos. Los ratones tratados con anticuerpos anti-CTLA-4 en cualquier instante presentaron un crecimiento tumoral significativamente reducido en comparación con controles no tratados. El tratamiento con retraso pareció ser más efectivo permaneciendo 2 de 5 ratones sin tumor más allá de treinta días después de la inoculación.

f) El tratamiento con Anti-CTLA-4 reduce el crecimiento del fibrosarcoma SA1N murino.

[0096] Los efectos del tratamiento con anti-CTLA-4 no se limitaron a líneas celulares de carcinoma. Se obtuvieron resultados similares con una línea celular de fibrosarcoma que crece rápidamente de ratones A/JCr. Se inyectaron s.c. grupos de ratones en el costado con una suspensión de 1×10^6 células de fibrosarcoma SA1N. Se inyectaron i.p. los grupos tratados con $100 \mu\text{g}$ anti-CTLA-4 o anticuerpo de control de hámster irrelevante en los días 0, 3 y 6, tal y como se indica mediante las flechas en la Figura 5. Todos los animales de control se sacrificaron antes del día 30. Dos de los cinco animales tratados con anti-CTLA-4 quedaron sin tumor en el día 55. Los datos se muestran en la Figura 5.

EJEMPLO 3

65

Anticuerpos Monoclonales Anti-CTLA-4 actúan como adyuvante**a) Preparación de inmunógeno**

5 **[0097]** Se obtuvo DNP-KLH de Calbiochem (San Diego, CA) y se suspendió en agua desionizada a 1 mg/ml, 100 ng/ml o 10 µg/ml. Se añadió un ml de Ayuvante Completo de Freund (Difco, MI) a cada 1 ml de los preparados de DNP-KLH. A continuación, éstos se emulsionaron en dos jeringas de 5 ml conectadas por un conector de cierre luer de dos extremos mediante el paso rápido a través del cierre luer, tal y como se describe en *Current Protocols in Immunology*, Colligan et al., eds., sección 2.4.

10

[0098] 30 minutos antes de la inyección del inmunógeno, se inyectaron ratones C57B1/6 de 4-6 semanas de edad en el peritoneo utilizando una jeringa de calibre 23 con 200 µg de anticuerpo de hámster de control no específico o con 200 µg de anticuerpo 9H10 anti-CTLA-4 (ambos en 200 µl de volumen total). Posteriormente, se inyectaron subcutáneamente los ratones utilizando una jeringa de calibre 21 en dos sitios en la espalda, con 200 µl del
15 inmunógeno de la forma descrita anteriormente, administrando una dosis de 100 µg, 10 ng o 1 µg/ratón, respectivamente. Tras tres días se repitieron las inyecciones de anticuerpo.

[0099] Diez días después del primer tratamiento, se sacrificaron los animales. Se obtuvo sangre mediante un pinchazo en el corazón y se extrajo a tubos eppendorf. Se dejó que estas muestras se coagularan a 4°C durante
20 toda la noche, y a continuación se centrifugaron para obtener suero.

[0100] Se analizaron los sueros por los anticuerpos de isotipo específico que reconocen DNP utilizando un ELISA de isotipo estándar, tal y como se describe en *Current Protocols in Immunology* (supra.) sección 2.1. En resumen, se puso DNP a 100 ng/ml en placas en un volumen de 50 µl en cada pocillo de una placa de ELISA de base redonda
25 modificada por Corning de 96 pocillos. Los pocillos se bloquean utilizando tampones tal y como se ha descrito. Se añadieron a cada pocillo diluciones en series de tres veces de cada suero, empezando por 1:100. Éstos se incubaron durante una hora a 25°C, y se lavaron con tampón de lavado. Se detectan los isotipos mediante el uso de anticuerpos específicos de ratón como agentes detectores a 1 µg/ml en 50 µl de tampón de bloqueo incubado durante una hora. Los anticuerpos de isotipo se biotinilan, y se lleva a cabo la detección mediante la incubación con
30 avidina-peroxidasa de rábano picante, el lavado y la adición de sustrato de peroxidasa (ABTS, Sigma, Mo.). Se añadió tampón de detención, y se leyó la absorbancia de cada pocillo con un lector de ELISA a una longitud de onda de 490-498 nm a los 5-8 min de la detención de la reacción.

[0101] Los resultados se muestran en la Figura 6. Cada uno de los paneles ilustra la concentración de un isotipo
35 diferente en la muestra de suero. El eje y muestra la lectura de D.O., donde un incremento en la D.O. indica una mayor concentración de anticuerpos en el suero que tenía ese isotipo. El eje x muestra la cantidad de antígeno que se inyectó, 100 µg, 10 ng o 1 µg por animal, respectivamente. Puede observarse que el anticuerpo anti-CTLA-4 incrementa el cambio de clase a IgG1, IgG2a e IgG2b a la dosis más alta de antígeno.

[0102] Se realizó el análisis de la función de células T tal y como se indica a continuación. Se aislaron células de nódulo linfático y se estimularon in vitro durante 72 horas con KLH. Se extrajeron nódulos linfáticos axilares, inguinales, mesentéricos, braquiales, cervicales y popliteales a un plato que contenía RPMI completo (FCS al 10% (Hyclone, Montana), glutamina 2 mM, β-mercaptoetanol 50 µM, gentamicina 50 µg/ml). Se trocearon los nódulos linfáticos para obtener suspensiones de células individuales, se filtraron a través de una malla de nytex para eliminar
45 partículas, y se contaron utilizando un hemocitómetro. Se pusieron en placas las células en 150 µl de RPMI completo en placas en grupo de base redonda de 96 pocillos a 5×10^5 , $2,5 \times 10^5$, ó $1,25 \times 10^5$ células/pocillo. Se añadieron soluciones KLH en RPMI completo hasta concentraciones finales de 100, 10, 1 ó 0 µg/ml y se incubaron las placas a 37°C durante 64 horas en incubadores humidificados con CO₂ al 5%. Después de 64 horas, se añadió
50 20 µl de RPMI completo que contenía 1 µCi de ³H-timidina a cada pocillo, y se incubaron las placas unas ocho horas adicionales. En ese instante, se recogieron los cultivos en filtros de fibra de vidrio utilizando un recolector de 96 pocillos Inotech. Se secaron los filtros y se contaron utilizando un contador Packard Matrix. Se repitieron las condiciones por triplicado, y los datos representan la media de los valores de los triplicados.

[0103] Los resultados se muestran en la Figura 7. La fila superior muestra un número constante de células (5×10^5
55 células), con concentraciones variables de antígeno (mostradas en el eje x). El eje y muestra la incorporación de ³H-timidina, una medida de la proliferación celular. El panel inferior muestra una concentración de antígeno constante (10 µg/ml), con cantidades variables de células (mostradas en el eje x). Los datos indican que el bloqueo de CTLA-4 sobrerregula fuertemente la respuesta de células T a las dosis más altas de antígeno.

60 EJEMPLO 4**Generación de anticuerpos dirigidos contra proteínas CTLA-4 humanas.**

[0104] Se generan anticuerpos anti-CTLA-4 humanos tal y como se indica a continuación.

65

a) *Proteínas CTLA-4 humanas para la inmunización de animales huésped*

[0105] Los inmunógenos que comprenden proteínas CTLA-4 humanas contienen todo o parte del dominio extracelular de la proteína CTLA-4 humana. El dominio extracelular de la proteína CTLA-4 humana comprende 5 residuos de aminoácidos 38-161, tal y como se enumera en las referencias de las bases de datos.

[0106] El inmunógeno de CTLA-4 humana comprende la proteína CTLA-4 humana completa o una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de CTLA-4 humana y un compañero de fusión. El inmunógeno comprende la proteína CTLA-4 completa insertada en la membrana de una célula; se utiliza la célula que expresa 10 CTLA-4 humana en la superficie para inmunizar un animal huésped.

[0107] Se generan inmunógenos que comprenden partes de la proteína CTLA-4 humana utilizando la PCR para amplificar secuencias de ADN que codifican la proteína CTLA-4 humana de ARNm de células H38, una línea de leucemia asociada a HCTV II (R. Gallo, National Cancer Institute). El ARNm se transcribe de forma inversa para 15 generar ADNc de la primera cadena. A continuación, se amplifica el ADNc. Estas secuencias se unen a secuencias que codifican un compañero de fusión, tal y como se describe en Linsley et al. [J. Exp. Med 174:561 (1991)]. El vector de expresión codifica una proteína de fusión denominada CTLA4Ig, la cual comprende (desde el extremo amino terminal hasta el extremo carboxi terminal) el péptido señal de oncostatina M, el dominio extracelular de 20 CTLA-4 humana y los dominios H, CH2 y CH3 de IgG1 humana. Se usa el péptido señal de oncostatina M en lugar del péptido señal de CTLA-4 humano natural. Se mutaron los residuos de cisteína descubiertos en el dominio bisagra natural de la molécula IgG1 humana a serinas en la construcción del vector que codifica la proteína CTLA41g (Linsley *et al.*, *supra*).

b) *Inmunización de animales huésped con proteínas CTLA-4 humanas*

25 **[0108]** Para inmunizar animales con inmunógenos que comprenden proteínas CTLA-4 humanas, se emplean animales huésped no humanos. Se utiliza el inmunógeno que comprende una proteína de fusión CTLA-4/IgG humana (por ejemplo, CTLA4Ig), para cubrir células de bacterias de *Staphylococcus A* (StaphA) muertas por calor tal y como se describe en el Ejemplo 1b. Se inyectaron las bases de las patas de ratones BALB/c de seis semanas de 30 vida con 50 µl (volumen empaquetado) de bacterias StaphA muertas por calor cubiertas con aproximadamente 100 µg de CTLA-4Ig suspendidas en 0,2 ml de PBS.

[0109] Se administran un total de cinco inyecciones por ratón. En el día del último refuerzo y antes de la inyección, se obtuvieron aproximadamente 100 µl de suero mediante sangrado intraocular tal y como se describe en el Ejemplo 35 1b. Se analiza el suero en compañía del suero obtenido mediante la metodología idéntica previa a la primera inyección (es decir, suero preinmune).

[0110] Se utiliza un ELISA de unión a CTLA-4Ig humana para demostrar la presencia de anticuerpo que reconoce la proteína de fusión CTLA-4Ig humana en el sangrado después de la inmunización. El ELISA de unión a CTLA-4Ig 40 humana se realiza tal y como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1b con la excepción de que las placas de ELISA se cubren con proteína CTLA-4 humana.

[0111] Se recogieron el suero y los nódulos linfáticos de los ratones inmunizados que contenían anticuerpo que reconoce la proteína de fusión CTLA-4Ig humana en el sangrado después de la inmunización en diluciones de suero 45 1000 veces mayor que la dilución a la que se podía detectar el ruido de fondo. Se preparan linfocitos a partir de nódulos linfáticos de drenaje en los ratones inmunizados y a continuación se utilizan para la generación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína CTLA-4 humana tal y como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1c.

50 **[0112]** Se preparan inmunógenos que comprenden células transformadas que expresan la proteína CTLA-4 humana en la superficie celular tal y como se indica a continuación. Se utilizan vectores de expresión que codifican la proteína CTLA-4 humana completa para transfectar la línea celular EL4 de linfoma de ratón (ATCC TIB 39). Se inyectan las células EL4 transfectadas en ratones utilizando de 1×10^6 a 1×10^7 de células transfectadas/inyección. Se inyectan células transfectadas en una solución que comprende PBS. Pueden inyectarse los ratones i.p. o en la 55 base de las patas traseras. Cuando se administran inyecciones i.p., se administran un total de 4 inyecciones aproximadamente. Cuando se utiliza la base de las patas como punto de inyección, se administran un total de 5 inyecciones aproximadamente. Se recoge el suero de los animales inmunizados y se evalúa la presencia de anticuerpos dirigidos contra la proteína CTLA-4 humana utilizando un ELISA tal y como se describe en el Ejemplo 1b, con la excepción de que las placas se cubren con proteínas CTLA-4 humanas.

60 c) *Aislamiento de líneas de hibridoma que secretan anticuerpos CTLA-4 anti-Humanos*

[0113] Se aíslan los linfocitos de nódulos linfáticos de drenaje o los bazos de animales inmunizados con el inmunógeno CTLA-4 humano y se fusionan con células P3X3.Ag8.653 para generar líneas celulares de hibridoma 65 utilizando el protocolo de fusión PEG descrito en el Ejemplo 1c. Se evalúa el sobrenadante del cultivo de pocillos que contienen 1000-5000 células/pocillo por la reactividad frente a CTLA-4 humana y por la falta de reactividad a

una proteína que no es CTLA-4, tal como la CD4 humana utilizando un ensayo ELISA.

[0114] Se clonan repetitivamente hibridomas de pocillos positivos mediante dilución limitante tal y como se describe en el Ejemplo 1c. Se seleccionan líneas de hibridoma que secretan anticuerpos monoclonales que son reactivos
5 contra proteínas CTLA-4 humanas pero no contra proteínas humanas irrelevantes (por ejemplo, CD4 humana), y que tienen la capacidad de teñir células transfectantes de CTLA-4 humana pero no transfectantes de control para la producción de anticuerpos monoclonales CTLA-4 anti-humanos.

EJEMPLO 5

10

Estimulación *ex vivo* de linfocitos infiltradores de tumores (TILs)

[0115] Se estimulan células huésped *ex vivo*, permitiéndolas diferenciarse en células efectoras inmunes específicas de tumores. A continuación, se reintroducen las células en el mismo huésped para mediar los efectos terapéuticos
15 anticáncer.

a) Aislamiento de linfocitos infiltradores de tumores (TILs)

[0116] Se obtienen linfocitos infiltradores de tumores utilizando técnicas estándar. Se dispersan tumores sólidos
20 (recién diseccionados o crioconservados) en suspensiones celulares individuales mediante digestión enzimática durante toda una noche [por ejemplo, agitando durante toda la noche a temperatura ambiente en medio RPMI 1640 que contiene hialuronidasa de tipo V al 0,01%, ADNasa de tipo I al 0,002%, colagenasa de tipo IV al 0,1% (Sigma, St. Louis), y antibióticos]. A continuación, se pasan las suspensiones de tumor a través de gradientes Ficoll-Hypaque (Lymphocyte Separation Medium, Organon Teknika Corp., Durham, NC). Las interfases de los gradientes contienen
25 células tumorales viables y se lavan células mononucleares, se ajustan a una concentración celular total desde 2,5 hasta $5,0 \times 10^5$ células/ml y se cultivan en medio completo. El medio completo comprende RPMI 1640 con suero humano de compatible con el tipo inactivado con calor al 10%, penicilina 50 IU/ml y estreptomycin 50 µg/ml (Biofluids, Rockville, MD), gentamicina 50 µg/ml (GIBCO Laboratories, Chagrin Falls, OH), anfotericina 250 ng/ml (Fungzone, Squibb, Flow Laboratories, McLean, VA), tampón HEPES 10 mM (Biofluids), y L-glutamina 2 mM (MA
30 Bioproducts, Walkersville, MD). Se añade medio condicionado de cultivos de células asesinas activadas por linfoquinas (LAK) autólogas o alogénicas de 3 a 4 días (ver a continuación) a una concentración final de 20% (v/v). Se añade IL-2 recombinante a una concentración final de 1000 U/ml.

[0117] Se mantienen los cultivos a 37°C en atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Se alimentan los cultivos
35 semanalmente mediante la recolección, la agrupación y la resuspensión de células a $2,5 \times 10^6$ células/ml en medio nuevo. Durante un periodo inicial (por ejemplo, de 2 a 3 semanas) de cultivo, los linfocitos proliferan selectivamente, mientras que las células tumorales restantes habitualmente desaparecieron por completo.

[0118] Para producir cultivos de células LAK, se obtienen linfocitos de sangre periférica (PBL) de pacientes o
40 donantes normales. Después de pasar a través de gradientes Ficoll-Hypaque, se cultivan las células a una concentración de 1×10^6 /ml en medio RPMI 1640 con suero humano al 2%, antibióticos, glutammina, y tampón HEPES. Se añade IL-2 recombinante a 1000 U/ml. Se mantienen los cultivos durante 3 a 7 días en una atmósfera humidificada con CO₂ al 2% a 37°.

*b) Estimulación *ex vivo* de TILs*

[0119] Se incuban 4×10^6 células, en 2 ml de medio de cultivo que contiene mAbs anti-CTLA-4, en un pocillo de
50 placas de 24 pocillos a 37°C en una atmósfera con CO₂ al 5% durante 2 días. El medio de cultivo comprende medio RPMI 1640 complementado con suero de ternero fetal inactivado por calor al 10%, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, piruvato sódico 1 µM, L-glutamina recién preparada 2 mM, estreptomycin 100 µg/ml, penicilina 100 U/ml, gentamicina 50 µg/ml, fungizona 0,5 µg/ml (todos de GIBCO, Grand Island, NY) y 2-ME 5×10^{-5} M (Sigma). Se recogen las células y se lavan.

[0120] Se cultivaron adicionalmente las células estimuladas inicialmente a 3×10^5 /pocillo en 2 ml de medio de cultivo
55 con IL-2 humana recombinante (disponible en Chiron Corp., Emeryville, CA; actividad específica desde 6 hasta 8×10^6 U/mg de proteína; unidades equivalentes a 2-3 Unidades Internacionales). Tras 3 días de incubación en IL-22, se recogen las células, se lavan, se cuentan para determinar el grado de proliferación, y se resuspenden en medios apropiados para la administración intravenosa (i.v.) (por ejemplo soluciones salinas fisiológicas tamponadas). Se realizan cultivos bacterianos para determinar la existencia de contaminación bacteriana anterior a la reinfusión de las
60 células activadas.

[0121] Después de resuspenderse los TILs activados en medios adecuados para la inyección, se obtiene acceso IV
en el huésped y se infunde la suspensión celular. Opcionalmente, se trata el huésped con agentes para inducir la función *in vivo* y la supervivencia de las células estimuladas (por ejemplo IL-2).

65

EJEMPLO 6

[0122] En este estudio investigamos el efecto de señales de CD28 y CTLA-4 en las respuestas de poblaciones de células T en respuesta al superantígeno enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB) *in vitro* e *in vivo*. Los resultados indican que CD28 proporciona un coestímulo importante para la respuesta de SEB *in vitro* y estas señales a través de CTLA-4 inhiben la respuesta. *In vivo*, el bloqueo de CD28 mediante fragmentos FAb o anticuerpos intactos tiene los efectos opuestos sobre la expansión de V β 8⁺ hacia un bloqueo similar con fragmentos FAb anti-CTLA-4 o anticuerpos intactos. El análisis de la cinética de la expansión supone que señales a través de CD28 inducen la expansión de células T, mientras que una señal contraria a través de CTLA-4 actúa durante la expansión de células T para atenuar la magnitud de la respuesta a SEB.

10 Procedimientos

[0123] *Ratones*. Se adquirieron ratones BALB/c de cuatro o cinco semanas de edad de Charles River y se utilizaron en menos de tres semanas.

[0124] *Anticuerpos y Reactivos*. Se purificaron CD28 anti-ratón de hámster del clon 37.N.51.1 (Gross et al. (1992) J. Immunol. 149:380), CTLA-4 anti-ratón de hámster del clon 9H10.11D3 (Krummel y Allison (1995) J. Exp. Med. 182:459), B7-1 anti-ratón de hámster del clon 1610.A (Razi-Wolf et al. (1992) J. Exp. Med. 89:4210), B7-2 anti-ratón de rata (del clon GL-1 (Hathcock et al. (1993) Science 262:905) e IgG de hámster irrelevante del clon F560.31 de fluido ascítico en nuestras instalaciones. Se obtuvieron fragmentos FAb mediante la digestión con papaína inmovilizada (Pierce, Rockford IL) mediante metodología estándar y se extrajo el anticuerpo no digerido mediante adsorción de Proteína A. Se analizaron todos los fragmentos FAb mediante SDS-PAGE antes de su uso. Se evaluó adicionalmente la pureza de FAbs anti-CD28 en ensayos funcionales por la capacidad de bloquear la proliferación de células T en un allo-MLR. Se obtuvo anti-V β 8.1,8.2 FITC (clon MR5-2) de Pharmingen (San Diego, CA).

[0125] *Ensayos in vitro*. Se trocearon bazos obtenidos de animales no tratados previamente para obtener suspensiones y se lisaron RBCs mediante tratamiento hipotónico con solución Geys seguido de dos lavados con PBS. Se pusieron en placas 2x10⁵ esplenocitos en 200 μ l de RPMI (que contenía FCS al 10%, β -mercaptoetanol 50 μ M, glutamina 2 mM, y gentamicina 50 μ g/ml) en placas de base redonda de 96 pocillos. Se añadió SEB en las concentraciones indicadas. Cuando se indica, se añadió anti-CD28 a una dilución 1:1000 de ascitis, se añadió anti-B7-1 a 5 μ g/ml y se añadió anti-B7-2 a 20 μ g/ml, y se añadieron cantidades iguales de anticuerpo de control no específico 560.31. Para experimentos con FAb, se añadieron anti-CD28, anti-CTLA-4 o fragmentos de FAb de control a 100 μ g/ml. Se incubaron cultivos durante 60 horas a 37 °C, se pulsaron con 1 μ Ci de ³H timidina y se dejó que se incubara durante unas 12 horas adicionales antes de la recogida.

[0126] *Respuestas SEB In Vivo*. Se inyectaron intraperitonealmente ratones con 200 μ l de PBS que contenía, cuando se indica, 200 μ g de anticuerpo. Después de 1-2 horas, se inyectaron intravenosamente ratones con 50 μ g por animal de SEB (Toxin Technologies, Sarasota F1) en PBS o PBS solo en un volumen total de 100 μ l.

[0127] *Citometría de flujo*. Para evaluar la población de células que expresan V β 8, se trocearon bazos para obtener suspensiones y se lisaron RBCs utilizando una solución Geys hipotónica. A continuación, se resuspendieron las células resultantes en 5 ml de RPMI-FCS al 10% y se recontaron alícuotas por triplicado utilizando un hemocitómetro. El error estándar para esto fue rutinariamente menos del 10% de la media. Para la tinción, se lavaron una vez las alícuotas en PBS/FCS al 1% con NaN al 0,01%, y se resuspendieron en PBS/FCS a una concentración de 10⁶ células/50 μ l. Se añadieron anticuerpos y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Se lavaron las células y se analizaron posteriormente usando un citómetro FACScan utilizando el software LysisII (Becton-Dickinson, Mountain View, CA). Se analizaron 10.000 casos restringidos por el porcentaje que expresa V β 8⁺ y se utilizó para obtener el número total de células V β 8 mediante la aplicación de la fórmula: #V β 8 = Rendimiento Celular Total x %V β 8 en muestra.

50 Resultados

[0128] *Papel de coestimulación en la proliferación in vitro mediada por SEB*. Se investigó la respuesta proliferativa de esplenocitos de ratones BALB/c a SEB para determinar el papel de las interacciones B7/CD28. A medida que se añadía SEB a los esplenocitos, se observó una proliferación dependiente de dosis en los cultivos. Las moléculas B7 en células de estos cultivos parecen suministrar la coestimulación, ya que la adición de anticuerpos anti-B7-1/B7-2 inhibió significativamente la respuesta. Además, la mayor señalización de CD28 mediante anticuerpos anti-CD28 aumentó la respuesta proliferativa. Este incremento puede estar mediado por la inmovilización del anticuerpo en células FcR⁺ B o mediante la formación de microagregados de anticuerpo. De modo interesante, la adición de anti-CD28 y anti-B7-1/B7-2 indujo un ligero incremento pero reproducible en la proliferación en comparación con anti-CD28 por sí solo, sugiriendo que otro ligando B7 aparte de CD28 (es decir CTLA-4) podría ser importante en la subregulación de la respuesta de células T a SEB.

[0129] Para tratar las contribuciones relativas de CD28 y CTLA-4 en la respuesta de células T, se añadieron a 65 cultivos estimulados por SEB fragmentos Fab de anticuerpo específicos para estas moléculas. La adición de FAbs

de CD28 inhibió la proliferación dependiente de SEB. La magnitud del bloqueo de FAb de CD28 es similar a la observada utilizando anticuerpos anti-B71/2, implicando interacciones CD28B7 en la aportación de alguna coestimulación para la proliferación en los cultivos control. No obstante, hubo un aumento de dos a tres veces de la proliferación en presencia de FAb de CTLA-4, implicando que las señales de CTLA-4 juegan un papel importante en la regulación de la respuesta. Esto además hace resaltar que las moléculas B7 en APC crean una interacción de señales amplificadoras a través de CD28 y señales atenuantes a través de CTLA-4.

[0130] *Las Señales CD28 y CTLA-4 tienen efectos opuestos en la expansión in vivo de células T V β 8+.* Se examinaron los efectos del tratamiento con anticuerpos anti-CD28 y anti-CTLA-4 en la respuesta de las células T a SEB. La expansión de células T a superantígenos tiene lugar *in vivo* habitualmente antes de 2-3 días después de la inyección. Se escogió las 60 horas como tiempo conveniente para analizar inicialmente los efectos de anti-CD28 y anti-CTLA-4 sobre la respuesta. Se inyectaron animales con PBS o SEB y los fragmentos mAbs o FAb relevantes. Después de 60 horas, se determinó el número total de TCRs que transportaban V β 8 mediante el recuento de la celularidad del bazo y las muestras con tinción de anticuerpo para determinar el porcentaje de células V β 8+. El número total de células que transportaban V β 8 aisladas del bazo de animales inyectados con SEB y anticuerpos control fue aproximadamente 2-3 veces el número presente en animales inyectados con control (PBS). En cambio, la inyección de dosis crecientes de anti-CD28 junto con SEB disminuyó el número de células que transportaban V β 8 observadas en este tiempo. La inyección de 5 μ g de anti-CD28 disminuyó modestamente el número de V β 8 recuperadas y las inyecciones de tanto 20 μ g como 200 μ g proporcionaron aproximadamente reducciones de dos veces idénticas. Para tratar la discrepancia de este resultado y los resultados *in vitro* que muestran una amplificación mediada por anti-CD28 de respuestas de células T, se inyectaron dosis diarias de fragmentos FAb de anticuerpo CD28 durante la respuesta a SEB. De un modo similar a los anticuerpos intactos, estos FAbs bloqueaban la expansión de las células V β 8+ a SEB de un modo dependiente de la dosis. Los efectos inhibidores de los anticuerpos intactos fueron similares a los que se observaron utilizando FAbs, lo que implica que tanto los anticuerpos anti-CD28 como los fragmentos FAb *in vivo* interfieren con las señales B7/CD28. Esto puede ser el resultado de la señalización ineficiente por anticuerpos bivalentes y la competición entre ligando nativo mediante por tanto los anticuerpos como fragmentos FAb.

[0131] Para comparar los efectos de CD28 frente CTLA-4, se coinyectaron anticuerpos anti-CTLA-4 con SEB. En contraste con lo que se observó con el tratamiento con anti-CD28, la administración de anti-CTLA-4 dio lugar a un incremento dependiente de la dosis en la acumulación de células V β 8+ esplénicas. La dosis más elevada de anti-CTLA-4 produjo un incremento de 2-3 veces en el número de células V β 8+ sobre el observado con SEB solo. La inyección diaria de fragmentos FAb anti-CTLA-4 también produjo incrementos considerables en el número de células V β 8+ detectadas en 60 horas. El hecho de que tanto el anti-CTLA-4 intacto como su fragmento FAb monovalente produjeran el mismo resultado sugiere que bajo estas condiciones ambas formas del anticuerpo bloqueaban las interacciones CTLA-4/B7. Además, se observó el hecho de que un incremento en células V β 8+ bajo estas condiciones concuerda con la idea de que los anticuerpos bloquean una señal inhibidora.

[0132] *Análisis cinética de poblaciones sensibles a SEB.* Se realizó un análisis cinético para tratar si CD28 y CTLA-4 afectaban a la magnitud de la respuesta o su regulación. Se utilizó una dosis de anticuerpo de 204 μ g/inyección, ya que esta dosis estaba en el intervalo requerido para la saturación de CD28, tal y como se determina mediante citometría de flujo. La respuesta a SEB y los anticuerpos de control fueron tal y como se esperaba; la fase de expansión alcanzó su máximo en el día 3, seguido por un descenso regular. En cambio, los ratones tratados con anti-CD28 y SEB mostraron sólo una expansión mínima con el máximo a las 72 horas siendo menos de un tercio de los niveles de control. No obstante, estas células parecen haber experimentado una expansión y las cantidades de células disminuyen durante los siete días posteriores.

[0133] Los ratones que recibieron SEB y mAbs anti-CTLA-4 mostraron mayores cantidades de células en relación con los animales tratados con anticuerpo de control durante el transcurso del experimento. Se incrementó espectacularmente la cantidad de células durante los primeros tres días con un rápido descenso de las cantidades celulares alcanzando niveles similares a los animales inyectados con control/SEB hacia el día 10. En el máximo de la respuesta, los animales tratados con CTLA-4 presentaban aproximadamente dos veces, como mucho, de células T V β 8+ en relación con animales tratados con anticuerpo de control. Por último, para tratar si CTLA-4 o CD28 presentan una señal dominante, se añadieron ambos anticuerpos de forma simultánea. Durante el transcurso del tiempo, este tratamiento produjo resultados idénticos a aquellos obtenidos con animales tratados con anti-CD28 solo.

[0134] *Las Interacciones B7/CD28/CTLA-4 son importantes para regular la respuesta a SEB in vitro.* Los datos presentados aquí sugieren un papel importante para señales coestimuladoras en la respuesta de células T murinas al superantígeno SEB. Las interacciones endógenas de B7-1/B7-2 con CD28 son importantes para inducir la proliferación, ya que el bloqueo, ya sea con anticuerpos anti-B7-1/2 o con fragmentos FAb de anti-CD28, redujo drásticamente la proliferación inducida por SEB. En cambio, la unión de CD28 mediante anticuerpos anti-CD28 intactos incrementa la proliferación sobre el umbral proporcionado por APC. Este incremento se debe probablemente a la microagregación o la agregación mediada por FcR de anticuerpos anti-CD28 que conducen a una reticulación eficaz de CD28.

[0135] En contraste con CD28, las interacciones de CTLA-4 con moléculas B7 reduce la respuesta de células T a SEB. La observación de que los fragmentos FAb de anti-CTLA-4 aumentan la proliferación indica que las interacciones CTLA-4B7 inhiben la respuesta proliferativa de células T a SEB. Además, los anticuerpos anti-B7-1/2 aumentan la proliferación en presencia de la estimulación óptima con anticuerpos CD28, proporcionando una base adicional a la idea de que las señales inhibitoras están mediadas a través de interacciones CTLA-4-B7.

[0136] CD28 y CTLA-4 tienen efectos opuestos en la expansión inducida por SEB de células T *in vivo*. La manipulación de la coestimulación en ratones tratados con SEB mediante la interferencia directa con señales transducidas a través de CD28 o CTLA-4 presenta efectos opuestos en la expansión de las células T V β 8+. Este resultado apoya los datos *in vitro* previos que sugieren que estas moléculas podrían competir para determinar el resultado proliferativo en presencia de un nivel fijado de señal TCR. Parece ser un requerimiento para las señales de CD28 para respuestas óptimas a SEB; el bloqueo con fragmentos FAb anti-CD28 o anticuerpos anti-CD28 intactos disminuye eficazmente la expansión proliferativa. La observación de que el bloqueo de CTLA-4 permite de forma similar la mayor expansión de células sensibles respalda además la similitud en los requisitos de coestimulación para respuestas *in vivo* a superantígeno o antígeno peptídico. Además, el análisis cinético implica que la competición entre CD28 y CTLA-4 por moléculas B7 determina un parámetro muy inicial de la respuesta a célula T; en este experimento tuvo lugar un cambio dependiente de CTLA-4 en la expansión dentro de los dos primeros días. Aunque es claro que el bloqueo de CTLA-4 incrementa la respuesta a SEB cuando se permite la unión de CD28, éste no tiene efecto sobre la proliferación residual cuando se bloquea CD28.

[0137] Los datos demuestran que CTLA-4 juega un papel en la reducción de la respuesta a SEB mediante la oposición de los efectos de CD28. Aunque esto puede representar un mecanismo para la tolerancia de las células T, también puede implicarse la inhibición en la alteración del fenotipo. Por ejemplo, las señales generadas por señales B7/CTLA-4 podrían inducir células de memoria o la expresión de linfoquinas y función efectora alternativas.

EJEMPLO 7

[0138] El análisis cinético de los efectos de la unión a CTLA-4 en la proliferación, producción de IL-2, muerte celular, progresión del ciclo celular y la aparición de marcadores de la activación de células T.

Materiales y métodos

[0139] *Anticuerpos y reactivos:* Los anticuerpos utilizados para la activación fueron: hibridoma 500A2 anti-CD3 (Allison et al. (1987) en T cell Receptor, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series. Alan R Liss, Inc., Nueva York, 33-45), hibridoma 37.N.51.1 anti-CD28 (Gross et al., supra), hibridoma 9H10.11G3 anti-CTLA-4 (Krummel et al., supra) e hibridoma 536 anti-Va3 (Havran et al. (1989) P.N.A.S. 86: 4185-4189). Ig CTLA-4 se describe en Lane et al. (1994) Immunol. 80: 58-61). La depleción de APC y CD8 se consiguió utilizando hibridomas 28-16-8A de MHC Clase II (Ozato y Sachs (1981) J. Immunol. 126: 317-323) y BP107 (Symington y Sprent (1981) Immunogenetics 14:53-61), e hibridoma 3.155 de anticuerpos anti-Cd8 (Sarmiento et al. (1980) J. Immunol. 125: 2665-2672). Se obtuvieron microesferas de látex de poliestireno con sulfato de 5 μ m \pm 0,1 μ m de diámetro promedio de Interfacial Dynamics Corp. (Portland, Or.)

[0140] *Preparación de linfocitos T CD4+:* se aislaron células de nódulos linfáticos de ratones BALB/c de 6-8 semanas de vida obtenidas de NCI (Bethesda, MD). Los linfocitos aislados se obtuvieron mediante troceado del tejido y la filtración de la suspensión resultante a través de nytex. Los preparados ricos en células T CD4+ se obtuvieron mediante el tratamiento con anticuerpos de complemento anti-Clase II y anticuerpos anti-CD8. Los preparados típicos fueron CD4+ al 95% con menos de un 0,75% de células positivas B220.

[0141] *Activación de células T Cd4+ utilizando anti-Cd3 inmovilizados:* Se recubrieron placas de base redonda de 96 pocillos con anti-CD3 a 0,1 μ g/ml en volúmenes de 50 μ l durante 2 horas a 37°C, a continuación se lavaron ampliamente y se bloquearon durante 30 minutos a 37°C con RPMI-1640 completo (que contenía FCS al 10%, β -mercaptoetanol 50 μ M, glutamina 2 mM y gentamicina 50 μ g/ml). Se añadieron células T a 1x10⁵ por pocillo en 200 μ l de RPMI-1640 completo y todos los cultivos celulares se incubaron a 37°C en CO₂ al 5%. Cuando se indicó se añadió anti-CD28 a 10 μ g/ml, se añadió Ig CTLA-4 a 5 μ g/ml y se añadieron fragmentos FAb de control o anti-CTLA-4 a 50 μ g/ml. Doce horas antes de la recogida, se pulsaron los pocillos con 20 μ l de RPMI completo que contenía 1 μ Ci de ³H timidina. Las placas se recogieron en almohadillas de filtro de vidrio y se midió la incorporación de ³H utilizando un contador de fase gas (Packard, Meriden, Ct.).

[0142] *Activación de células T utilizando microesferas de látex:* Se recubrieron microesferas de látex (partículas) tal como se describe en Krummel et al. (1995). Brevemente, se suspendieron 1x10⁷ partículas/ml en PBS con los anticuerpos indicados y se incubaron durante 1,5 horas a 37°C, seguido de lavado con PBS y bloqueo con FCS al 10%. Se añadió anti-CD3 a 0,5 μ g/ml, se añadió anti-CD28 a 1 μ g/ml, se añadió anti-CTLA-4 a 4 μ g/ml, y se normalizaron las soluciones de unión con anticuerpo 536 de control para mantener una concentración de anticuerpo total constante de 6 μ g/ml durante la unión. Se cultivaron células T (1x10⁵ células/200 μ l) con 1 x10 partículas en un volumen total de 200 μ l/pocillo. Para todos los ensayos se utilizaron placas de 96 pocillos de base redonda. Los cultivos se incubaron a 37°C en 5% de CO₂ y se pulsaron con 1 μ Ci de ³H-timidina para las 12 horas finales antes de

la recogida. La acción inhibitoria de CTLA-4 parece específica a los anticuerpos anti-CTLA-4, ya que otros anticuerpos de unión a células T, incluyendo anti-L selectina (Mel-14), anti-Thy 1.2 y anticuerpos no relacionados, no muestran efectos o ni un aumento de los efectos cuando se co-inmovilizan con anti-CD3 y anti-CD28.

5 **[0143]** Análisis de la viabilidad celular: Se cultivaron células T de forma idéntica que en los ensayos de proliferación. La viabilidad celular se evaluó mediante la adición de una décima parte de un volumen de azul de tripano al 0,4% (Sigma, St. Louis, Mo.) y se determinó el número de células utilizando un hemocitómetro. Se contaron 10^{-4} ml de cada cultivo a partir de pocillos duplicados y el valor de este volumen se multiplicó por dos para obtener un valor para el porcentaje de entrada (se introdujeron 50×10^4 células/ml). Las desviaciones estándar siempre fueron inferiores a un diez por ciento.

[0144] Análisis del ciclo celular: El análisis de yoduro de propidio del estado del ciclo celular se realizó tal como se ha descrito previamente (Telford et al. (1992) Cytometry 13: 137-143). Brevemente, las células se activaron tal como se ha descrito utilizando microesferas en placas de 96 pocillos. En los tiempos indicados, se recogieron tres pocillos idénticos (introducción de 3×10^5 en el inicio del cultivo por muestra), se lavaron con PBS y se fijaron con 1,0 ml de etanol al 80%. Las células se incubaron en hielo durante 30 minutos, se agruparon mediante centrifugación y se resuspendieron en 0,4 ml de una solución acuosa que contenía Triton X-100 al 0,1%, EDTA 0,1 mM, ARNasa A 0,05 mg/ml (50 U/mg) y yoduro de propidio 50 μ g/ml. Las muestras se almacenaron en hielo en la oscuridad hasta el análisis y cada muestra se analizó a una velocidad de flujo constante durante 2 minutos. Los datos se analizaron utilizando un sistema Coulter EPICS.

[0145] *Determinación de IL-2.* Se utilizó un ELISA para detectar IL-2 en sobrenadantes celulares. Brevemente, se recubrieron anticuerpos capturados a 1 μ g/ml sobre placas de ELISA Corning (Corning, NY) en tampón borato (borato sódico 0,2 M, pH 8,0) durante 2 horas a 37°C. A continuación, se lavaron estas placas de manera amplia, se bloquearon con Gelatin/POBS al 0,4% durante 30 minutos y se añadieron sobrenadantes de cultivos de células T (50 μ l) y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Las placas se lavaron de nuevo y se añadieron anticuerpos de detección biotinilados en PBS/Tween al 0,5% y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Las placas se lavaron de nuevo y se añadió una solución de 1 μ g/ml de Estreptavidina-HRPO en PBS/Tween y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Se añadieron 50 μ l de reactivo revelador (0,55 mg/ml ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) en tampón citrato (ácido cítrico 0,1 M, pH 4,35), se incubaron a 25°C durante 15 minutos y se determinó la absorbancia a 405 nm. Se obtuvo IL-2 recombinante de Boehringer Mannheim y se diluyó en serie para desarrollar una curva estándar. Los valores de absorbancia por triplicado de las muestras de prueba se convirtieron de este modo en cantidades de linfocitos medidas en nanogramos por mililitro. Los anticuerpos (captura: JE6-1A12 y detección: JES6-5H4 biotinilado) se obtuvieron de PharMingen (San Diego, CA).

[0146] *Análisis de la expresión de CD25 y CD69.* Se suspendieron 2×10^5 células en 50 μ l de PBS/suero de ternera al 1% azida sódica al 0,05% enfriado en hielo. Se añadieron anticuerpos anti-CD25-FITC, anti-CD69 o RatIgG FITC de control, se incubaron en hielo durante 30 minutos seguido de dos lavados de 4 ml de PBS/suero de ternera/azida sódica. Se adquirieron 5.000 casos seleccionados vivos en un Becton-Dickinson FACScan y se utilizó el programa LYSIS II para analizar las poblaciones relevantes.

Resultados

[0147] *La unión a CTLA-4 inhibe la proliferación y la producción de IL-2.* Se observó previamente que los anticuerpos a CTLA-4 o B7 solubles aumentaban la incorporación de timidina y la producción de IL-2 por células T activadas por anti-CD3 y anti-CD28 inmovilizados en ensayos de tres días estándar. Estos resultados indicaron que el bloqueo de las interacciones CTLA-4/B7 entre las propias células T aumentaba las respuestas mediante la eliminación de señales inhibitorias. Dado que los cultivos se analizaron en un punto de tiempo determinado, no fue posible determinar cuando tubo lugar el efecto en la evolución de los cultivos. En la figura 8A se presenta un análisis cinético de los resultados del bloqueo de CTLA-4/B7 en la proliferación de células T CD4+. La inclusión de fragmentos CTLA-4Ig o Fab de anti-CTLA-4 en cultivos estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 dio lugar a un aumento en la proliferación. El efecto fue ligero a las 26 horas, en cuyo instante sólo había una proliferación marginal en cualquiera de los cultivos. A tiempos posteriores, el bloqueo de CTLA-4/B7 dio lugar a un incremento de 1 $\frac{1}{2}$ a 2 veces en la proliferación. El efecto potenciador de este bloqueo fue incluso más claro a niveles de la producción de IL-2. Tal como se muestra en la figura 8B, IL-2 era detectable, aunque a niveles bajos, en cultivos estimulados con anti-CD3/CD28 antes de las 26 horas. La adición de Fab anti-CTLA4 o CTLA-4Ig dio lugar a un incremento de aproximadamente seis veces en la cantidad de IL-2 acumulada antes de 26 horas, y casi diez veces antes de 40 horas.

[0148] La cinética de la inhibición de la proliferación y la producción de IL-2 se examinaron mediante la reticulación de CTLA-4 junto con CD3 y CD28 utilizando microesferas recubiertas de anticuerpo. La cinética de la incorporación de timidina se muestra en la figura 1C. Una incorporación significativa era detectable antes de 26 horas en cultivos estimulados por anti-CD3 y anti-CD28. Esencialmente no hubo incorporación detectable a las 26 horas cuando el CTLA-4 también estaba unido, y la proliferación fue 3-4 veces inferior en estos cultivos a lo largo del periodo de ensayo. Tal como se muestra en la figura 8D, se observó una inhibición incluso más pronunciada de la producción de IL-2. La IL-2 era fácilmente detectable en cultivos estimulados con anti-CD3/CD-28 antes de 16 horas y aumentó

hasta 40 horas. Cuando también se unió CTLA-4, la IL-2 sólo era apenas detectable incluso después de 30 horas y alcanzó un nivel de sólo aproximadamente 1/5 del mismo en los cultivos de control en su máximo a 42 horas.

5 **[0149]** Estos resultados indican que los efectos inhibidores de CTLA-4, mediados por su ligando natural o por la reticulación de anticuerpos, se pueden detectar en el inicio del transcurso de la activación y no son debidos a la terminación abrupta de las respuestas en etapas posteriores en el proceso.

10 **[0150]** *La unión a CTLA-4 no induce la muerte celular, pero evita la progresión del ciclo celular.* Un mecanismo que podría explicar la inhibición de proliferación por CTLA-4 sería la inducción o aumento de la muerte celular. Dado que la inhibición fue detectable a lo largo del periodo de cultivo, se evaluó la cinética de la muerte celular que aparece en cultivos de células T. El recuento hematocitométrico de células teñidas con el colorante vital azul de tripano demostró que la recuperación total de células de los cultivos fue esencialmente el 100% de la entrada, incluso en aquellos en los que no tenía lugar la proliferación. En cultivos no estimulados, el número de células no viables aumenta durante el periodo de cultivo, alcanzando el 50% después de 54 horas. Hubo un ligero incremento en el número de células muertas recuperadas de cultivos estimulados con anti-CD3 solo, especialmente en tiempo más iniciales. En concordancia con los datos de proliferación, los cultivos coestimulados con anti-CD28 produjeron un aumento de células viables después de 42 horas, con un rendimiento total de aproximadamente el 300% a las 78 horas. La estimulación con anti-CD3 más anti-CTLA-4 no dio lugar a un incremento de las células muertas sobre el observado en cultivos no estimulados o en cultivos estimulados con anti-CD3 solo. Tampoco hubo un incremento en la recuperación de células muertas de cultivos estimulados con anti-CTLA-4 en presencia de anti-CD3 y anti-CD28 sobre el de cultivos estimulados por anti-CD3 y anti-CD28. A lo largo del periodo de cultivo la recuperación de células viables fue de hecho superior al de cultivos no estimulados o cultivos estimulados con anti-CD3 solo. Estos datos indican que la reticulación de CTLA-4 no induce la muerte celular tal como se detecta a nivel de permeabilidad de membrana.

25

[0151] Como medición más directa y sensible de la muerte celular y el estado del ciclo celular, se utilizó tinción con yoduro de propidio de células permeabilizadas para medir el contenido de ADN en varias etapas en los cultivos. Cada cultivo se inició con cantidades idénticas de células, y se analizaron fracciones iguales de los cultivos con el fin de realizar una comparación de la cantidad absoluta de células recuperadas en poblaciones G₀/G₁, S/G₂ y subdiploides. Los resultados se presentan en la figura 9. La recuperación total de las células fue esencialmente del 100% de la entrada o superior bajo todas las condiciones de estimulación. Más de un 99% de las células de entrada fueron G₀/G_r. En cultivos no estimulados, el número de células con cantidades subdiploides de ADN indicativo de apoptosis aumentó hasta ligeramente más de un 50% del total durante la evolución del periodo de cultivo. Se observó un patrón similar en cultivos estimulados con anti-CD3 solo, aunque se obtuvieron cantidades ligeramente más elevadas de células en S/G₂. En cultivos coestimulados con anti-CD28, hubo un incremento significativo en el número de células en S/G₂ ya a partir de 20 horas, y este número aumentó progresivamente durante el periodo de ensayo. Los perfiles de ADN de células estimuladas con anti-CD3 junto con anti-CTLA-4 fueron esencialmente los mismos que cultivos no estimulados o estimulados con anti-CD3 a lo largo del periodo de ensayo sin diferencias significativas en el número de células apoptóticas. Sin embargo, hubo significativamente menos células en S/G₂ en cultivos estimulados con anti-CD3 solo. Los cultivos se estimularon con anti-CTLA-4 y anti-CD3 más anti-CD28 y presentaban cantidades similares o incluso menores de células en la población subdiploide que cualquiera de las otras condiciones a lo largo del periodo de cultivo. Por tanto, no existe evidencia de la inducción de muerte celular apoptótica por reticulación de anti-CTLA-4 en ningún momento durante el transcurso de la activación. El principal efecto de la reticulación de CTLA-4 sobre células estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28 es una inhibición del incremento en células viables totales, especialmente en aquellas en S/G₂. Conjuntamente, estos resultados indican que la unión de CTLA-4 inhibe la progresión del ciclo celular, y una detención de células en G₀/G₁.

50 **[0152]** *La unión a CTLA-4 inhibe parcialmente la inducción de la expresión de cadena alfa del receptor de IL-2.* Otra marca distintiva de la activación de células T es la sobrerregulación de la expresión de CD25, la cadena alfa del receptor de IL-2. Se utilizó citometría de flujo para evaluar la expresión de CD25 en células T bajo condiciones de coestimulación de CD28 con y sin la unión a concomitante a CTLA-4. La estimulación de células T con anti-CD3 solo dio lugar a la inducción de la expresión de CD25 en aproximadamente el 60% de las células T en 24 horas. La coestimulación con anti-CD28 aumentó esta expresión con respecto a tanto el número de células positivas como el nivel de expresión a las 24 horas, y la expresión se aumentó adicionalmente a las 60 horas de cultivo. Cuando se unió también el CTLA-4, la expresión de CD25 fue expresada por una fracción menor de las células (47% frente a 80%) y el nivel promedio de expresión fue mucho menor a las 24 horas (índice de fluorescencia promedio 162 frente a 194) y a las 60 horas (MFI 332 frente a 669) en relación con cultivos coestimulados con anti-CD28. Estos datos demuestran que la unión a CTLA-4 inhibe la sobrerregulación de CD25 a lo largo de la activación.

60 **[0153]** *La unión a CTLA-4 inhibe parcialmente la expresión del marcador CD69 de activación temprana.* Cd69 es un marcador temprano y transitorio de la activación de células T. Se realizó un análisis cinético de los efectos de la unión de CD28 y CTLA-4 en la inducción de la expresión de CD69. A las 12 horas, CD69 fue expresado por más de un 50% de células T activadas con CD3 solo o coestimuladas con anti-CD28, aunque menos de un 15% de células coestimuladas también sometidas a unión a CTLA-4 fueron positivas. A las 24 horas, la expresión de CD69 fue detectable, aunque en un patrón heterogéneo, en más de un 75% de células estimuladas con CD28. En este punto,

65

menos de un 45% de las células en las que también se había unido CTLA-4, se redujeron la CD69 expresada y el nivel de expresión. Antes de 36 horas, la expresión de CD69 había vuelto a esencialmente los niveles de reposo en todos los cultivos. La coestimulación de CD28 aumenta y prolonga la expresión de CD69, mientras que la unión a CTLA-4 inhibe la sobreexpresión inicial de CD69. Este resultado concuerda con la observación de que los niveles de CD69 resultaron ser constitutivamente elevados en células T aisladas de ratones deficientes en CTLA-4 y proporciona una evidencia adicional que sugiere un papel de CTLA-4 en la prevención de la inducción temprana de la activación de células T.

[0154] Estos datos demuestran que CTLA-4 media en la inhibición de la proliferación y la producción de IL-2 por células T en reposo en ausencia de muerte celular mediada por CTLA-4. La recuperación de células viables y no viables de cultivos inhibidos por anti-CTLA-4 es similar a la observada en cultivos de anticuerpo de control o estimulados con anti-CD3. No hay acumulación de células con cantidades subdiploides de ADN asociado con la muerte celular apoptótica incluso 1-2 días después de observar primero los efectos inhibidores de la reticulación de CTLA-4 a nivel de proliferación y producción de IL-2. Finalmente, la reticulación de CTLA-4 detiene a las células T en una fase G0/G1 del ciclo celular. Conjuntamente, estos datos muestran claramente que la inhibición de la proliferación de células T y la secreción de IL-2 por CTLA-4 pueden tener lugar en ausencia de muerte celular. Una implicación importante de los datos presentados aquí es que CTLA-4 puede tener un papel en la regulación de las respuestas de células T en etapas tempranas en este proceso. Nuestros datos no revelan una terminación abrupta de las respuestas en acción, sino más bien una inhibición y retrasos de los sucesos asociados con la progresión de la activación de células T.

[0155] Los resultados anteriores demuestran que el tratamiento de la presente invención con agentes de bloqueo de CTLA-4 aumenta la respuesta de las células T a la estimulación antigénica. El crecimiento de las células tumorales in vivo disminuye ampliamente en presencia de los agentes de bloqueo de la presente invención. Los efectos se observan contra tumores de tipo natural no manipulados. Los agentes de bloqueo de CTLA-4 no sólo representan una nueva estrategia a la terapia tumoral, sino que, eliminando señales inhibitorias potencialmente competidoras, puede ser una complementación particularmente útil a otras estrategias terapéuticas que implican el mecanismo coestimulador. El cambio de clase por células productoras de inmunoglobulinas, una medición de la ayuda de células T, aumenta ampliamente. La respuesta de las células T a la inmunización con antígenos peptídicos también se incrementa ampliamente mediante el tratamiento con los agentes de la presente invención.

EJEMPLO 8

Efectividad contra un tumor establecido

[0156] SA1 es un fibrosarcoma. Tal como se muestra en la figura 10, el bloqueo de CTLA-4 utilizando 10^0 µg de anticuerpo anti-CTLA-4 por dosis es eficaz incluso cuando se retrasaba 7 ó 14 días después de la implantación del tumor. Esto indica que el bloqueo de CTLA-4 puede ser eficaz en el tratamiento de tumores establecidos.

EJEMPLO 9

Sinergia con agente estimulante de la respuesta inmune

[0157] SM 1 es un carcinoma mamario que es escasamente inmunogénico. Es resistente al rechazo por transfección con B7. Sin embargo, se ha obtenido cierta inhibición del crecimiento utilizando B7 e IFNg. En el experimento mostrado en la figura 11, los ratones recibieron s.c. implantes de células tumorales SM 1 no modificadas y los tratamientos indicados en los días 0, 3 y 6. Tal como se muestra, el tratamiento con anti-CTLA-4 (10^0 µg/dosis) por sí mismos no tenía efecto en el crecimiento del tumor. La inmunización en un punto contralateral con células transducidas GM-CSF irradiadas tampoco tenía efecto. Sin embargo, la combinación de los dos dio lugar a un rechazo completo en 4 de 5 ratones. Esto demuestra claramente que el bloqueo de CTLA-4 puede ser sinérgico con GM-CSF, y probablemente otras linfoquinas, para obtenerle rechazo del tumor.

EJEMPLO 10

Bloqueo de CTLA-4 retrasado

[0158] RENCA es un tumor escasamente inmunogénico de crecimiento lento. Tal como se muestra en la figura 12, el bloqueo de CTLA-4 (100 µg de anticuerpo anti-CTLA-4 por dosis) es sólo escasamente eficaz cuando se inicia en el momento de implantación del tumor. Sin embargo, es bastante eficaz si se inicia 9 días después de la implantación del tumor. Esto sugiere que la generación de residuos tumorales de una masa tumoral relativamente grande es importante como agente para estimular una respuesta inmune para obtener un rechazo eficaz. Esto sugiere que el bloqueo de CTLA-4 se podría utilizar en el momento, o poco después, de la radiación o quimioterapia.

EJEMPLO 11

65

El bloqueo de CTLA-4 aumenta la inmunogenicidad de fragmentos tumorales

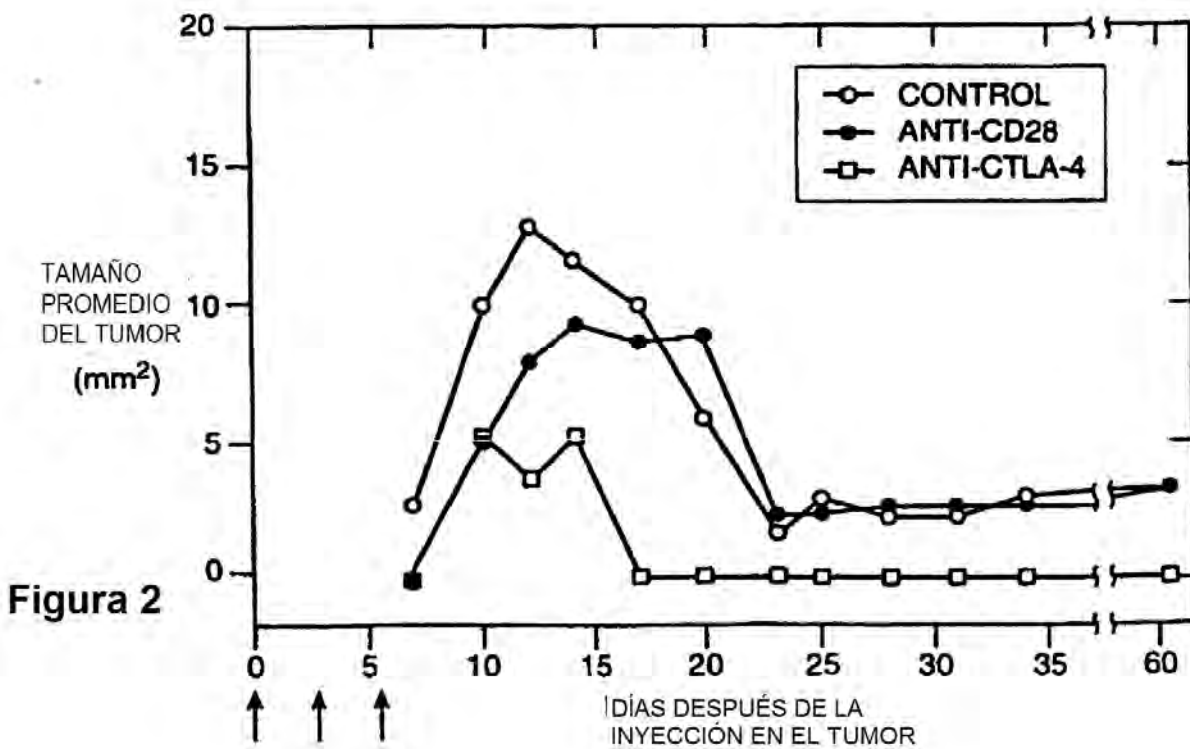
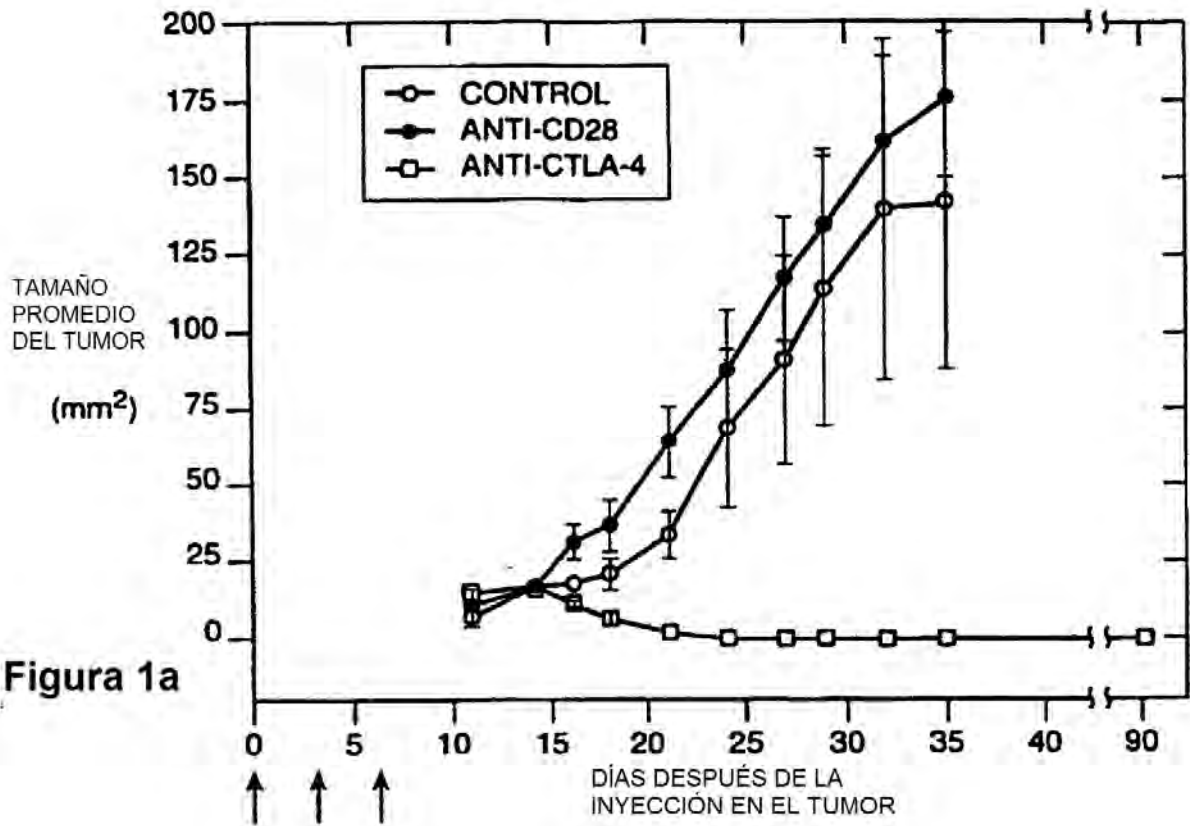
- [0159]** B16 es un melanoma muy poco inmunogénico que es resistente al rechazo inducido por la expresión de B7. Se han explorado formas de atacarlo mediante el bloqueo de CTLA-4. En el experimento mostrado en la figura 13, los ratones recibieron s.c. implantes de células tumorales no modificadas y los tratamientos indicados en los días 0, 3 y 6. El bloqueo de CTLA-4 por sí solo (100 µg 9H10/dosis) no tenía efecto, ni la inmunización con células B16 irradiadas en un punto contralateral. Sin embargo, el tratamiento con ambos mostró una inhibición pequeña, pero significativa y reproducible, del crecimiento tumoral, aunque no se obtuvo una curación.
- 10 **[0160]** Esta estrategia también se utilizó en un dispositivo de inmunización protectora. En el experimento mostrado en la figura 14, los ratones fueron inmunizados con células b116 irradiados con o sin el bloqueo de CTLA-4 (100 µg 9H10/dosis) y con o sin microesferas de gelatina que contienen citoquinas (que contienen 50 ng de interferón y 60 ng de GM-CSF). Los ratones se reestimularon con células tumorales vivas no modificadas dos semanas después. Los ratones inmunizados con células irradiadas con agentes de bloqueo de CTLA-4 mostraron un crecimiento tumoral significativamente dificultoso en comparación con ratones que recibieron células irradiadas solas. El mejor efecto protector se obtuvo con microesferas que contienen citoquinas junto con agentes de bloqueo de CTLA-4.
- 15 **[0161]** Conjuntamente, estos datos indicaron que el bloqueo de CTLA-4 puede aumentar las estrategias de inmunización que utilizan una inmunización activa con células tumorales o fragmentos tumorales modificados, y que puede tener un efecto sinérgico con citoquinas.
- 20

LISTADO DE SECUENCIAS

- [0162]**
- 25 <110> The Regents of The University of California
 <120> Bloqueo de la subregulación de linfocitos T asociada con la señalización de CTLA-4
 <130> SMW/FP6563779
- <140> EP
- 30 <141> 1996-12-04
- <150> 96942901.8
 <151> 1996-12-04
- 35 <150> PCT/US96/19375
 <151> 1996-12-04
- <150> US 08/566,853
 <151> 1995-12-04
- 40 <150> US 08/646,605
 <151> 1996-05-08
- <160> 2
- 45 <210> 1
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 50 <220>
 <223> Cebador
- <400> 1
- 55 T T A C T C T A C T C C C T G A G G A G C T C A G C A C A T T T G C C
- <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
- 60 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Cebador
- <400> 2
- 65 T A T A C T T A C C A G A A T C C G G G C A T G G T T C T G G A T C A

REIVINDICACIONES

1. Agente de bloqueo CTLA-4 que es un anticuerpo anti-CTLA-4 o fragmento del mismo para utilizar en un método de tratamiento combinado de un tumor con una terapia linfotóxica que es quimioterapia o radioterapia, en el que en el método la terapia linfotóxica se administra antes o después de la terapia con anti-CTLA-4.
2. Anticuerpo anti-CTLA-4 o fragmento del mismo para utilizar, según la reivindicación 1, en el que en el método la terapia linfotóxica se administra antes de la terapia con anti-CTLA-4.
- 10 3. Anticuerpo anti-CTLA-4 o fragmento del mismo para utilizar, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la terapia linfotóxica es quimioterapia.
4. Anticuerpo anti-CTLA-4 o fragmento del mismo para utilizar, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la terapia linfotóxica es radioterapia.
- 15 5. Anticuerpo anti-CTLA-4 o fragmento del mismo para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el método de tratamiento comprende además la administración combinada de una citoquina que estimula las células presentadoras de antígenos.
- 20 6. Anticuerpo anti-CTLA-4 o fragmento del mismo para utilizar, según la reivindicación 5, en el que la citoquina es GM-CSF, M-CSF, G-CSF o IL-12.
7. Anticuerpo anti-CTLA-4 o fragmento del mismo para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el método de tratamiento comprende además la administración combinada de una proteína o citoquina que aumenta la proliferación y secreción de células T.
- 25 8. Anticuerpo anti-CTLA-4 o fragmento del mismo para utilizar, según la reivindicación 7, en el que la proteína o citoquina es IL-1, IL-2, B7, anti-CD3 y anti-CD28.
- 30 9. Anticuerpo anti-CTLA-4 o fragmento del mismo para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el anticuerpo anti-CTLA-4 es un anticuerpo monoclonal.



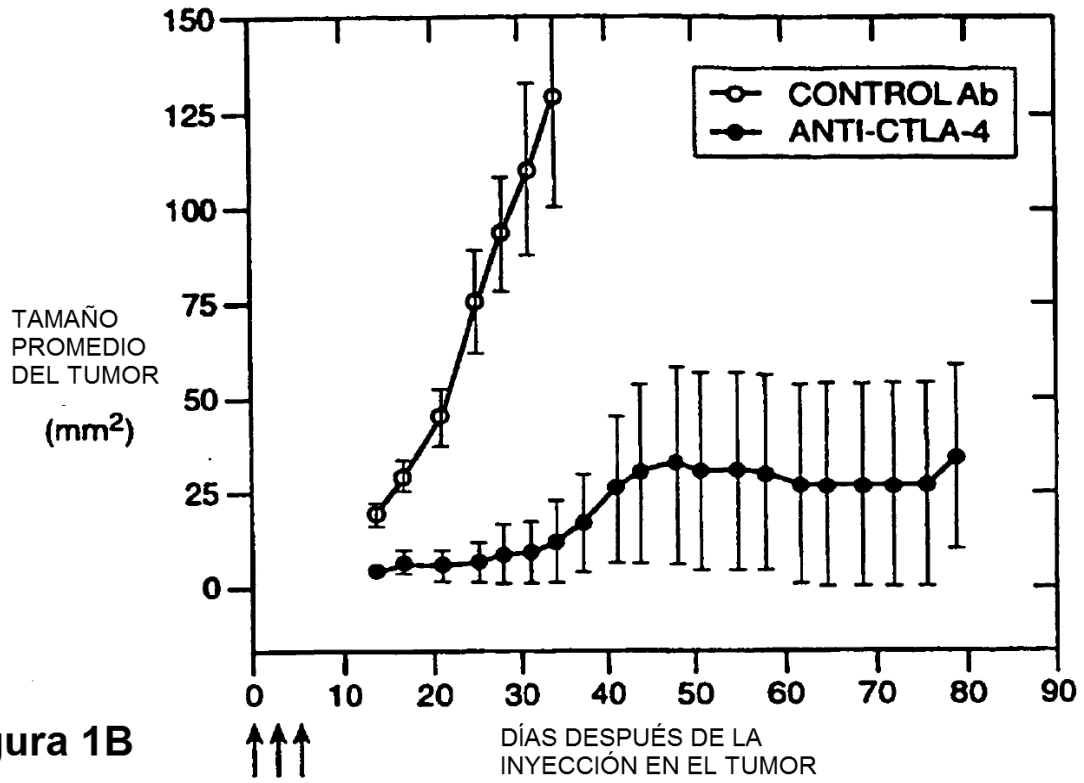


Figura 1B

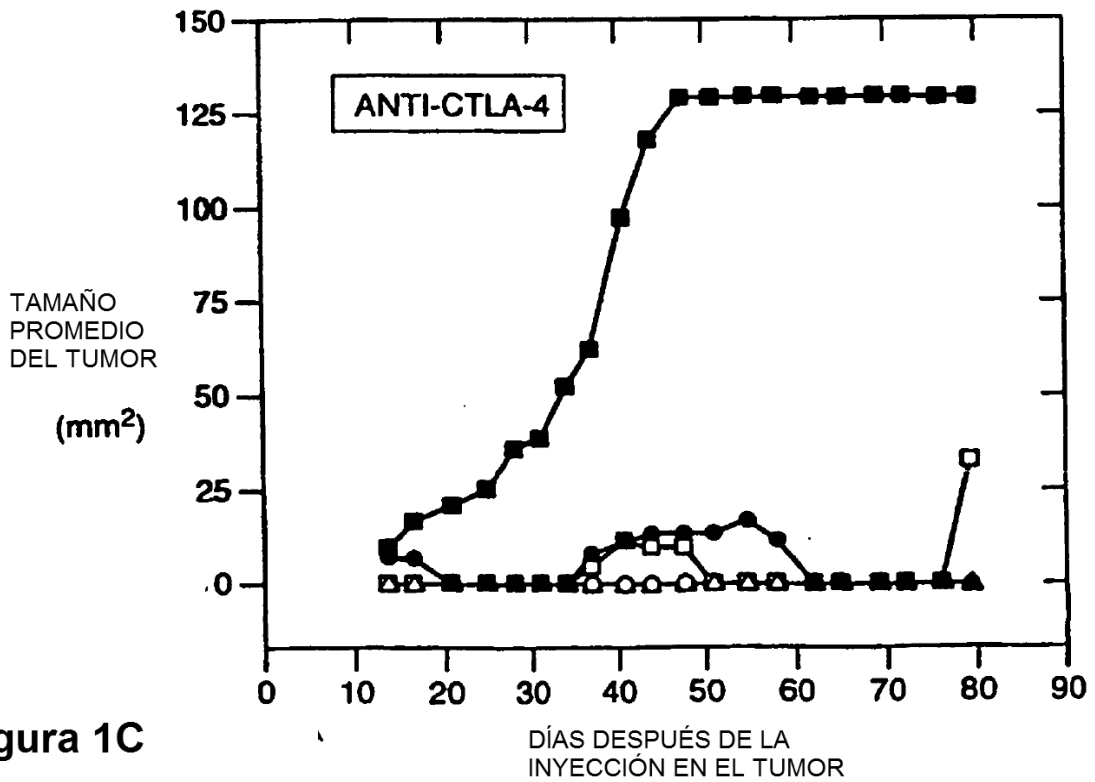
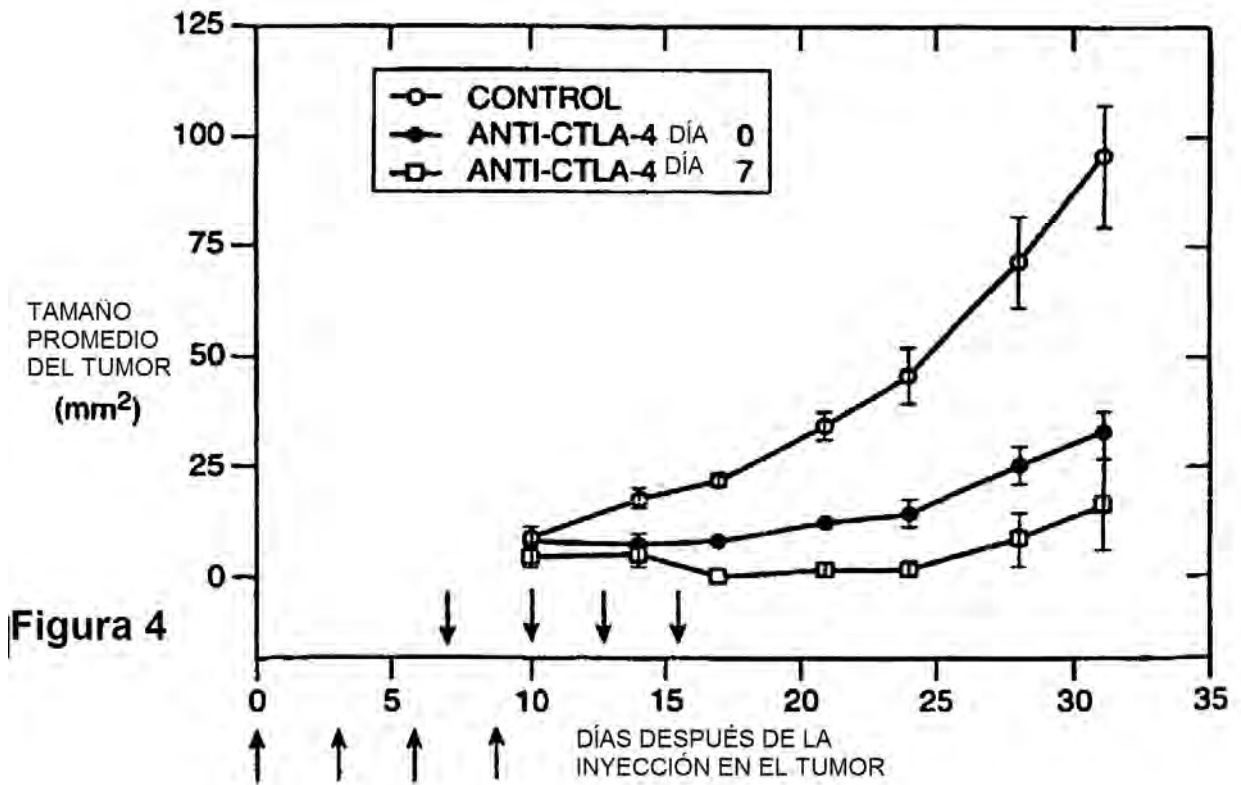
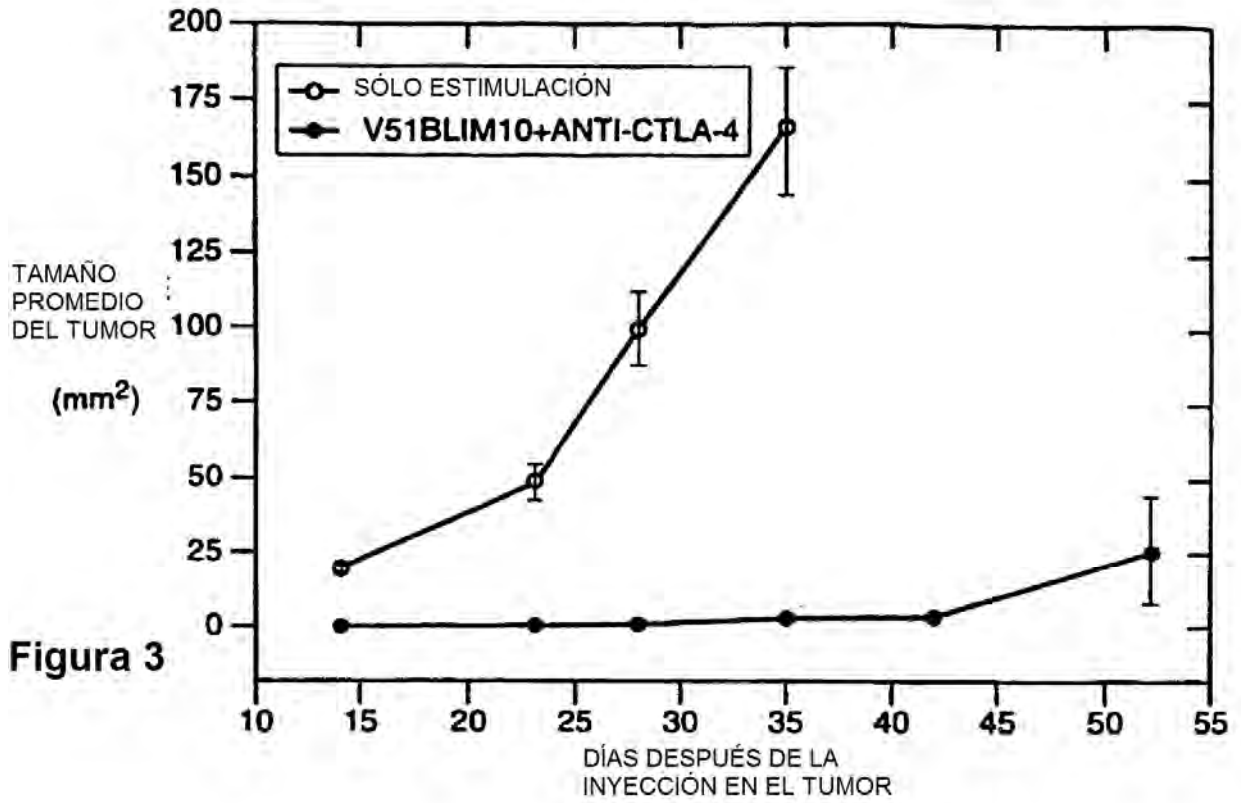
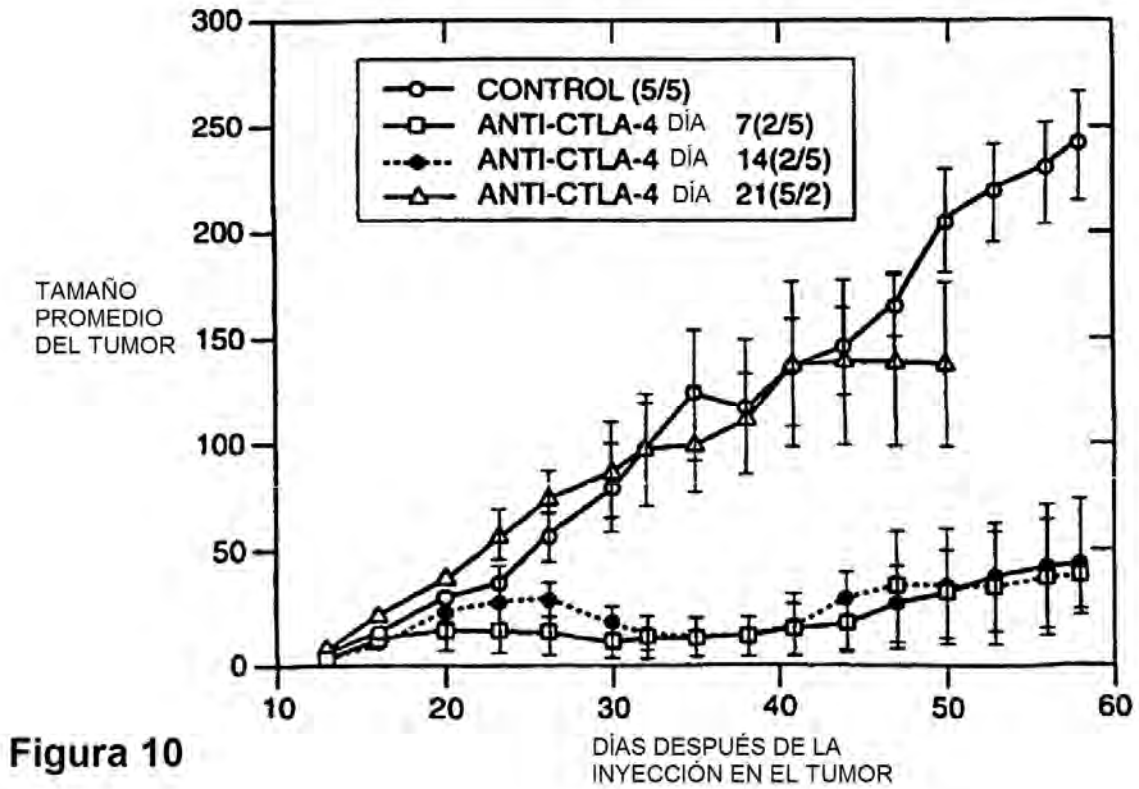
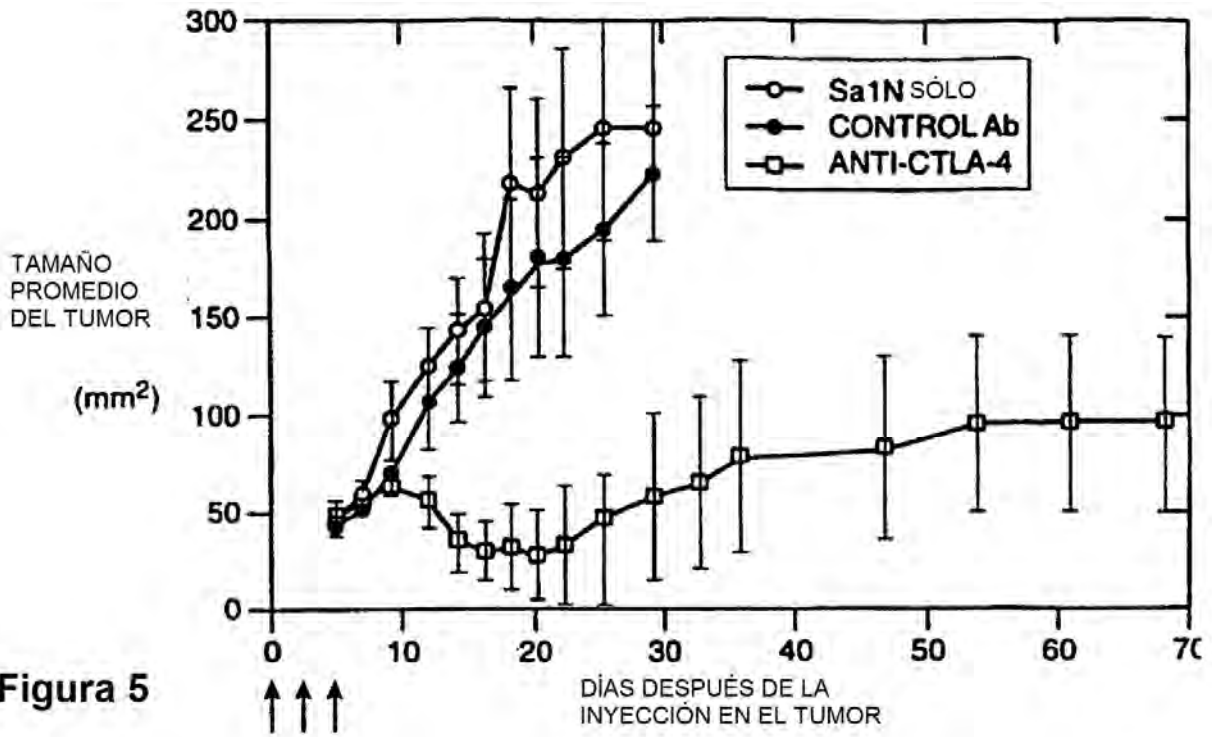


Figura 1C





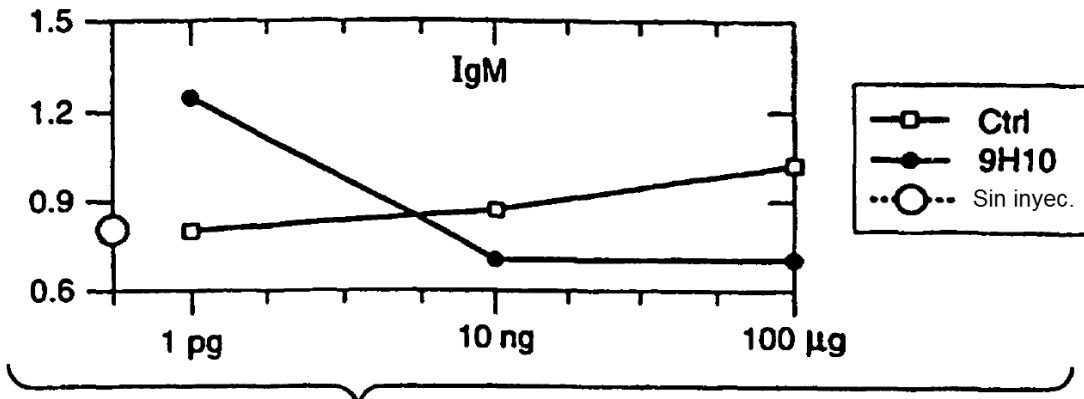


Figura 6A

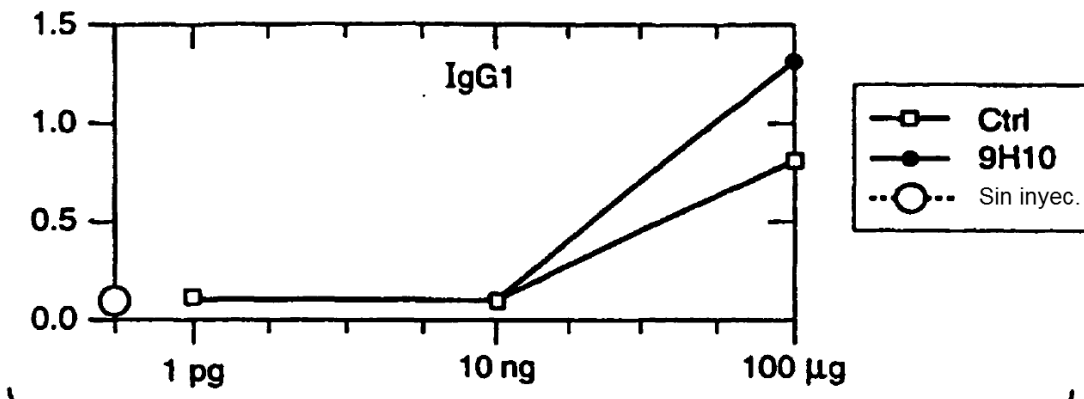


Figura 6B

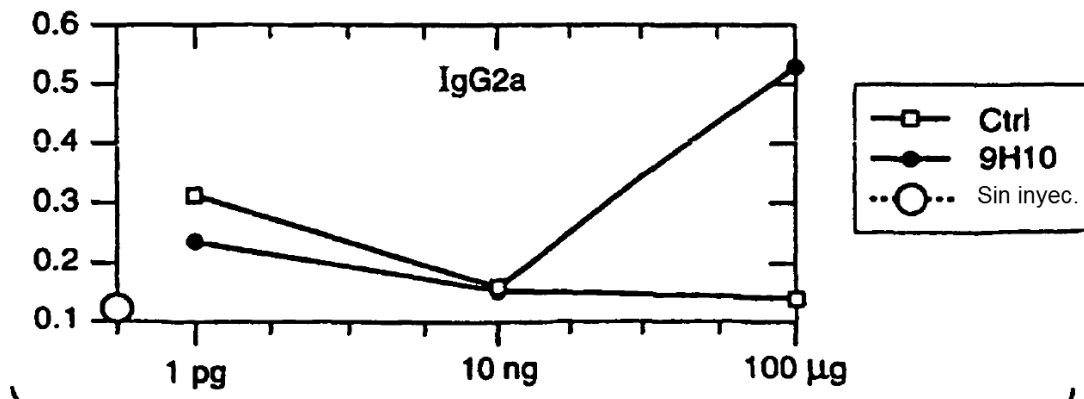


Figura 6C

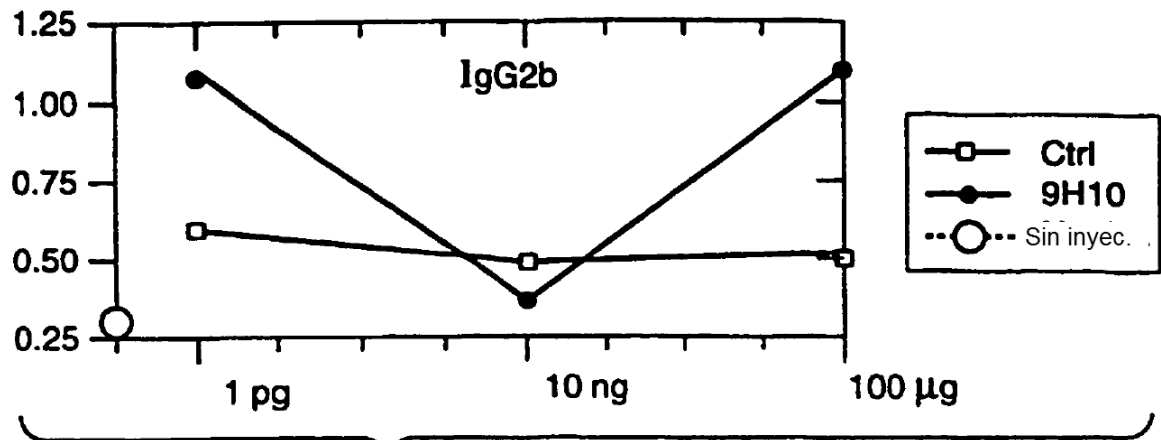


Figura 6D

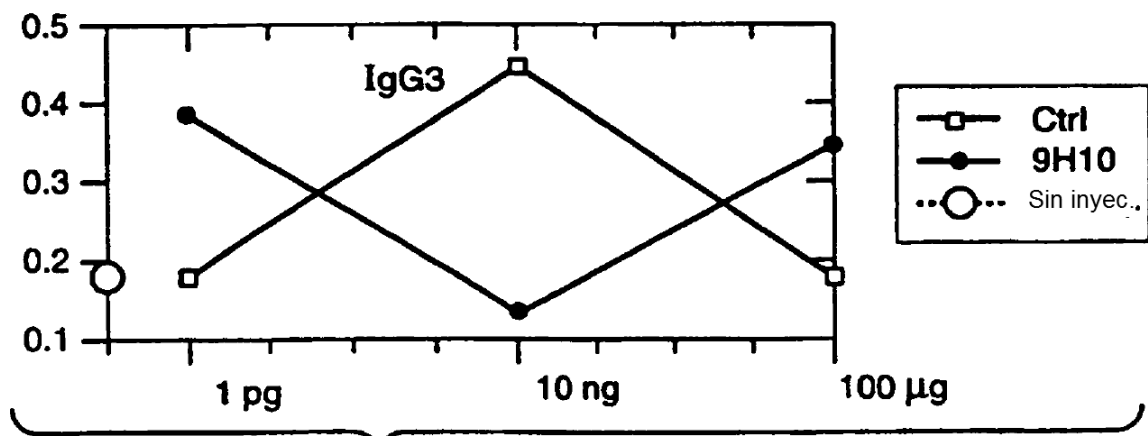


Figura 6E

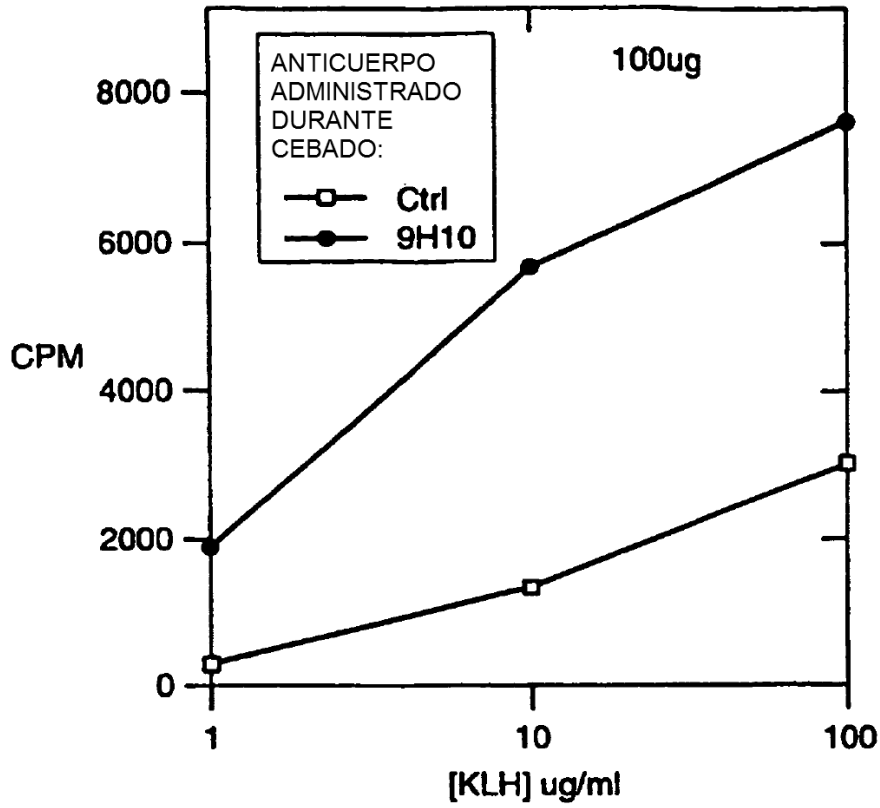


Figura 7A

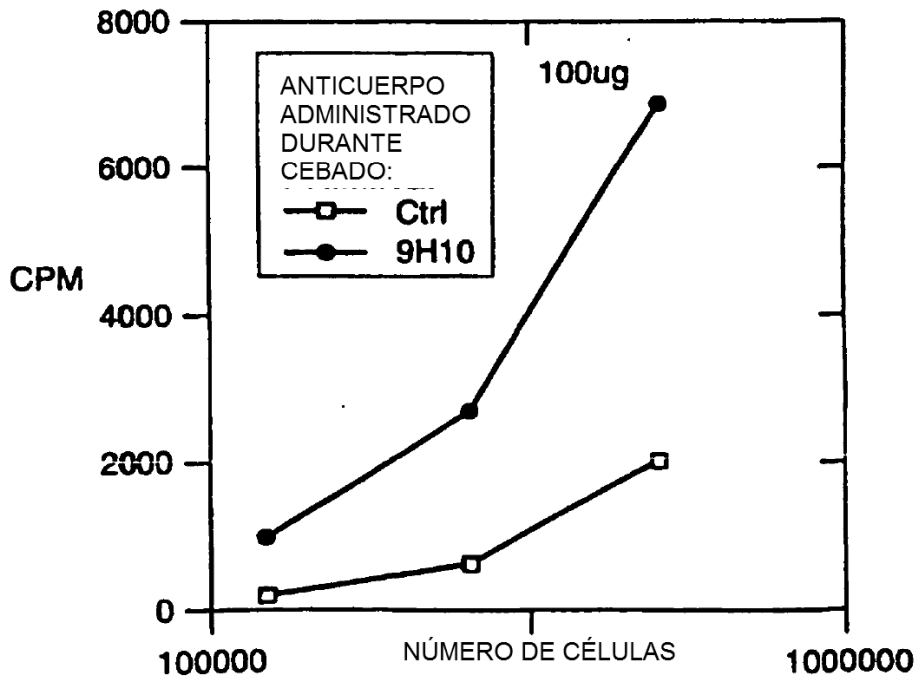


Figura 7B

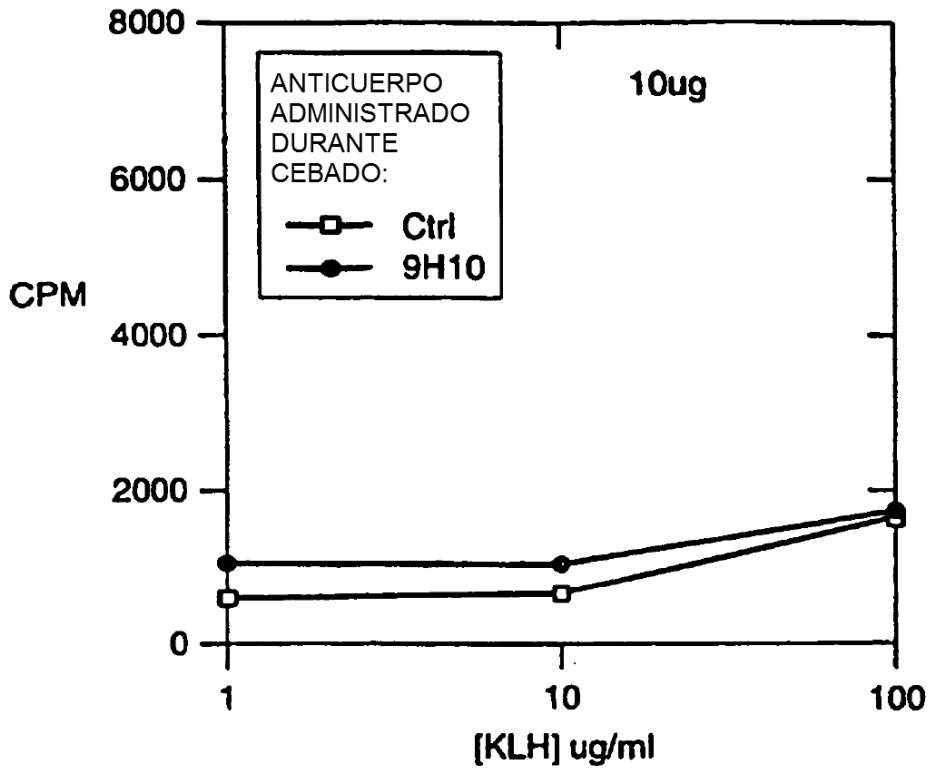


Figura 7C

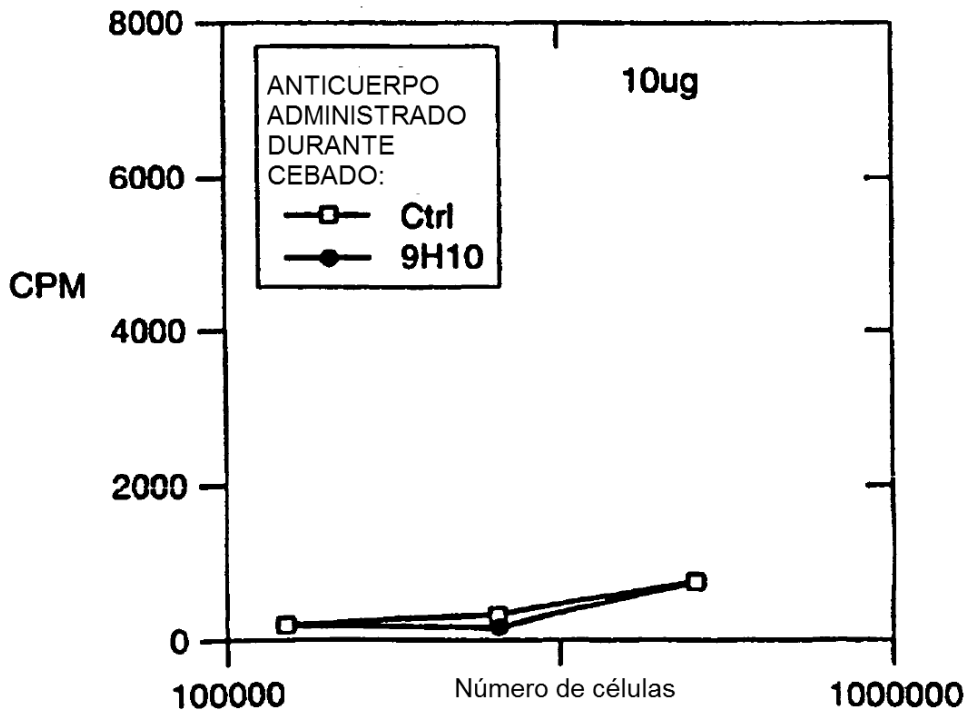


Figura 7D

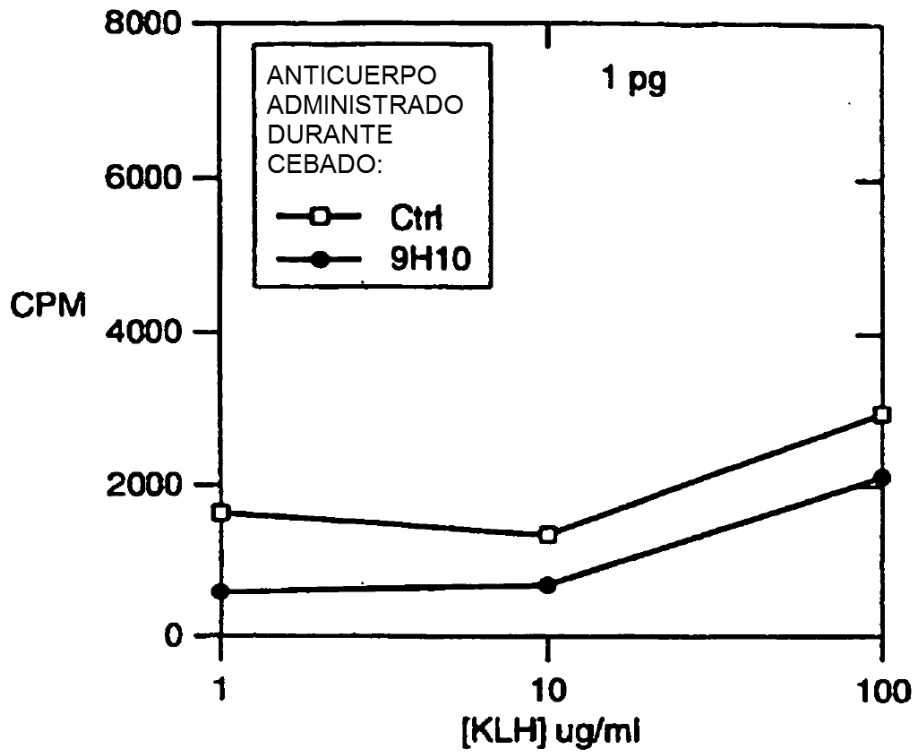


Figura 7E

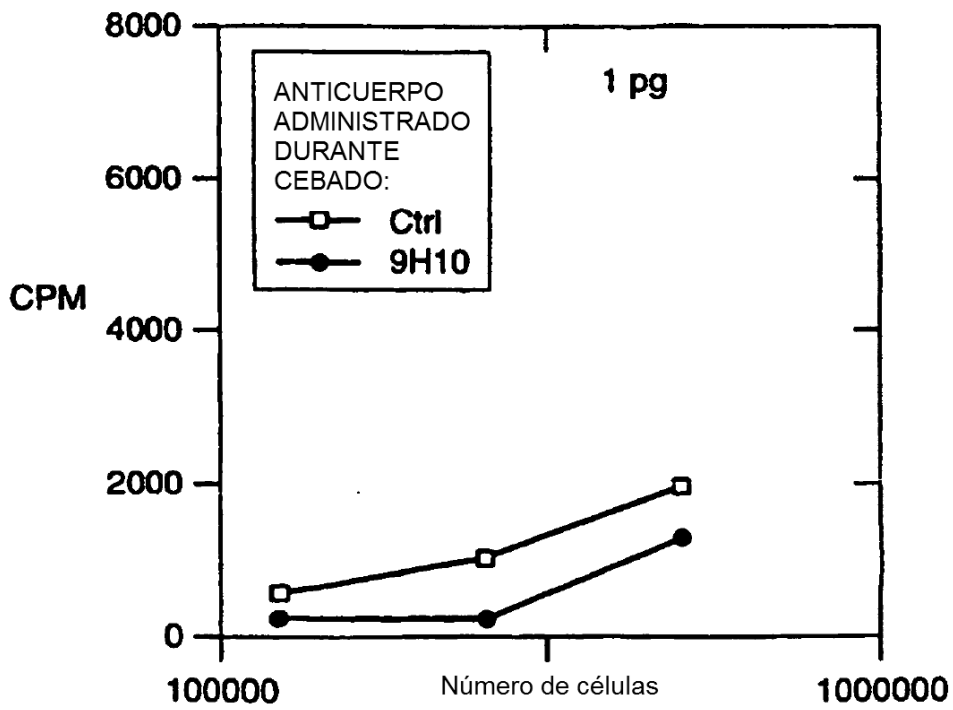


Figura 7F

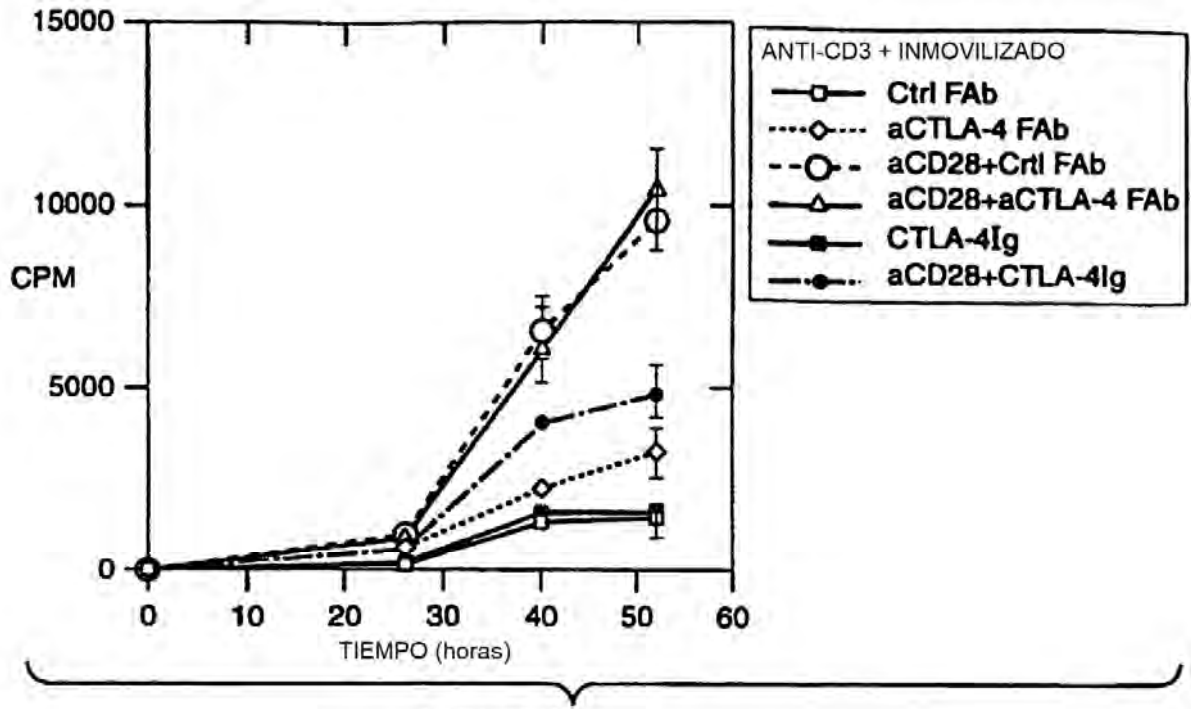


Figura 8A

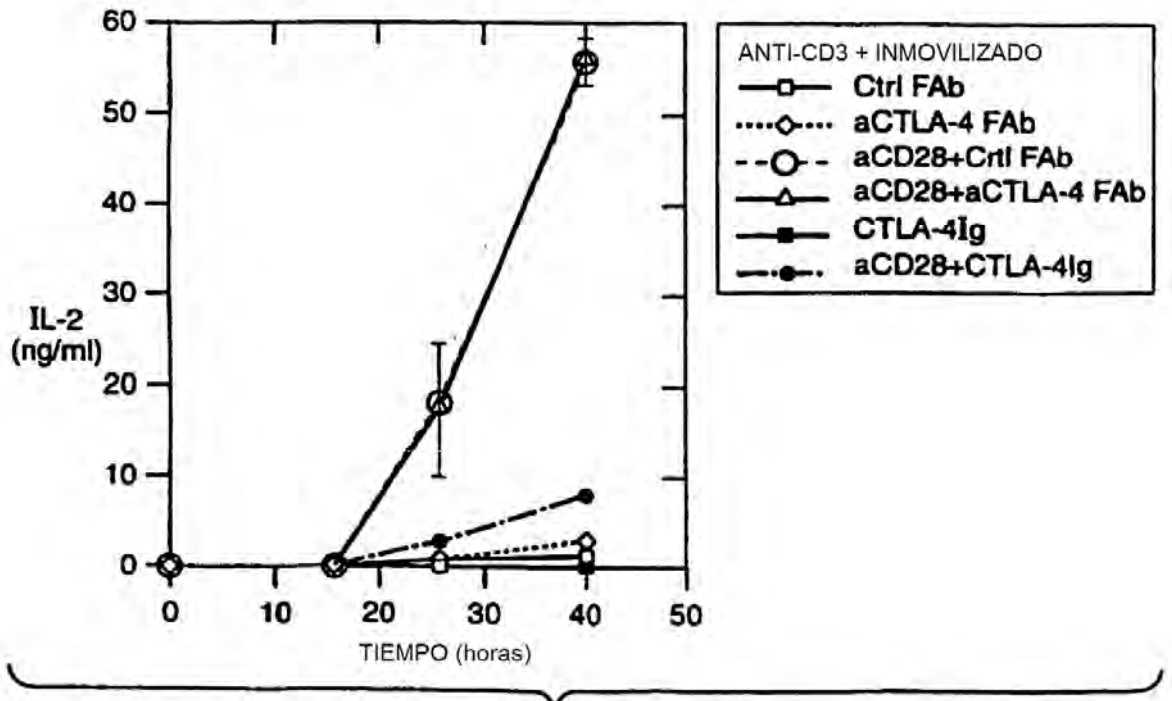


Figura 8B

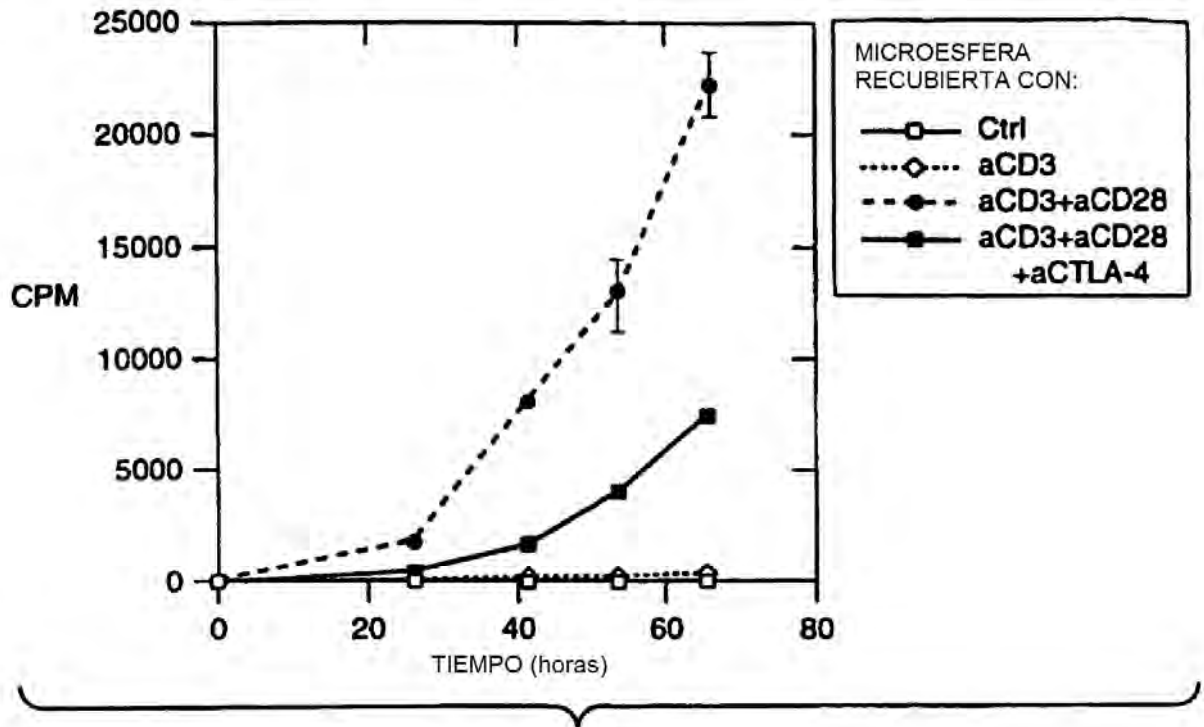


Figura 8C

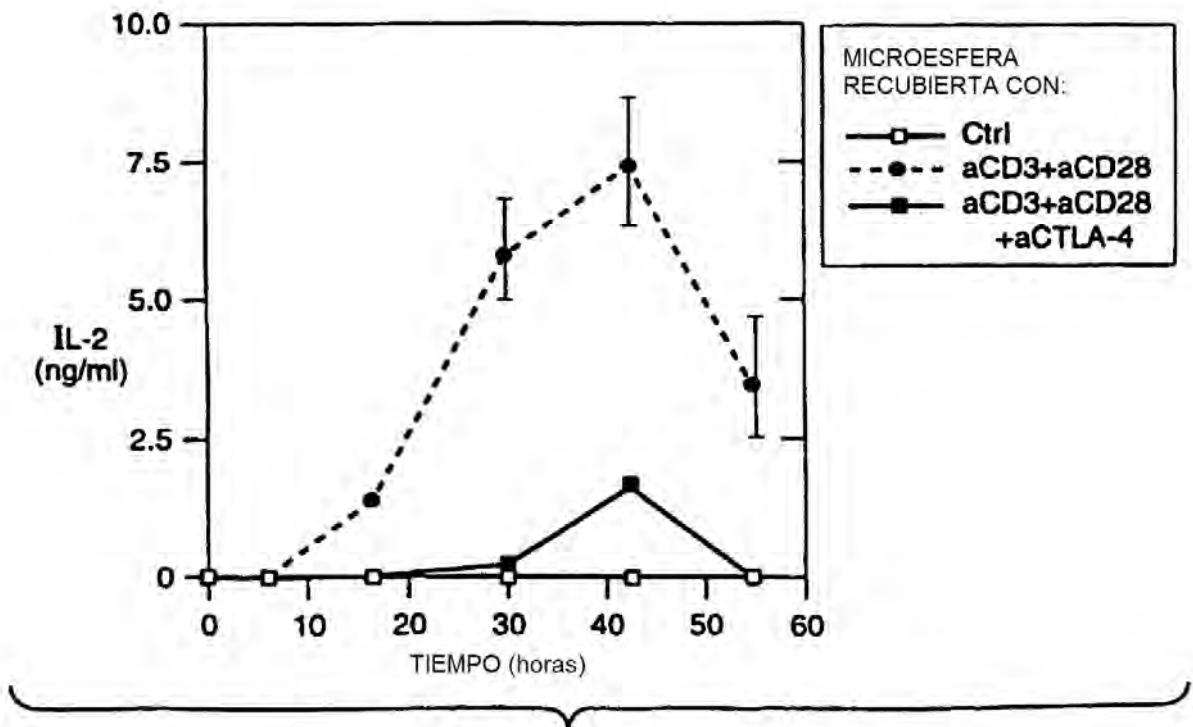


Figura 8D

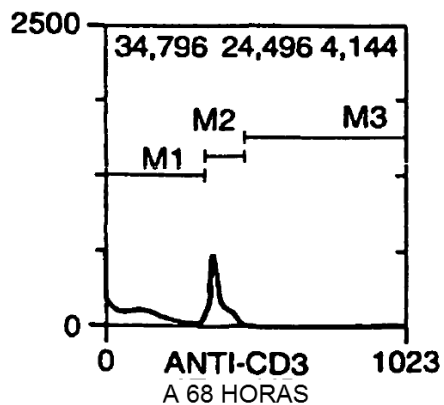
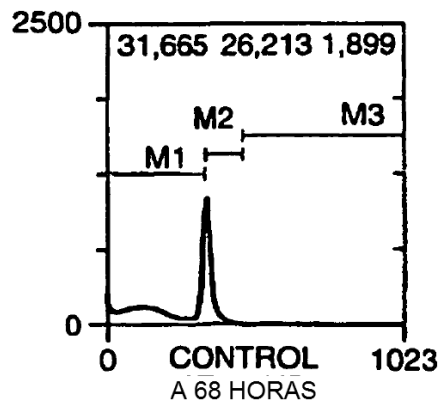
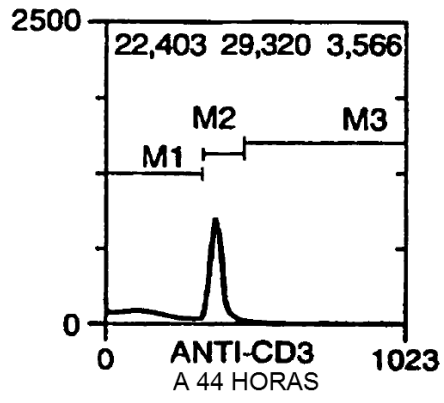
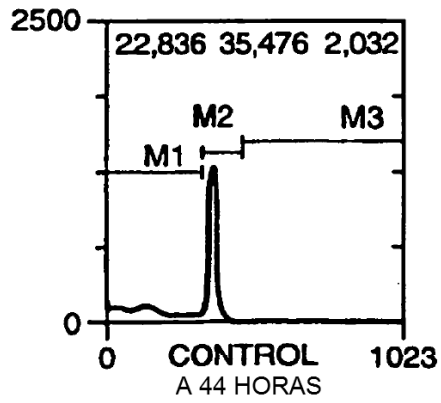
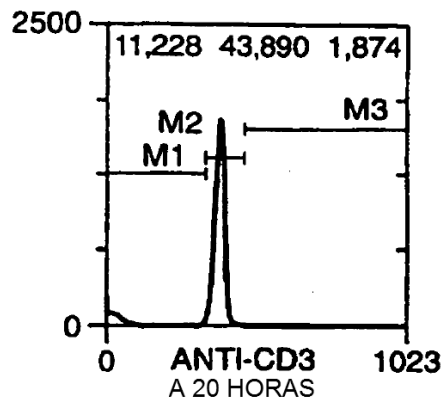
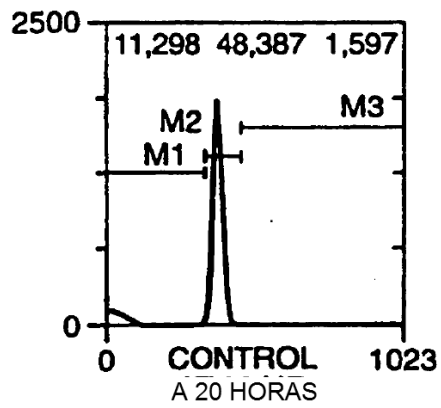
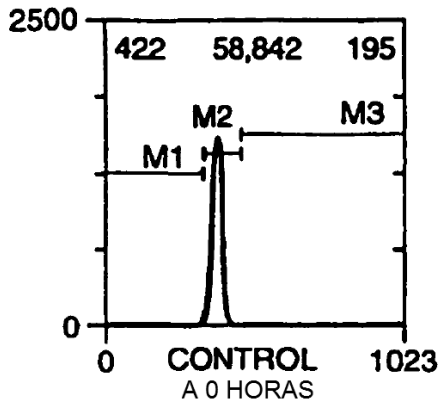


Figura 9A

Figura 9B

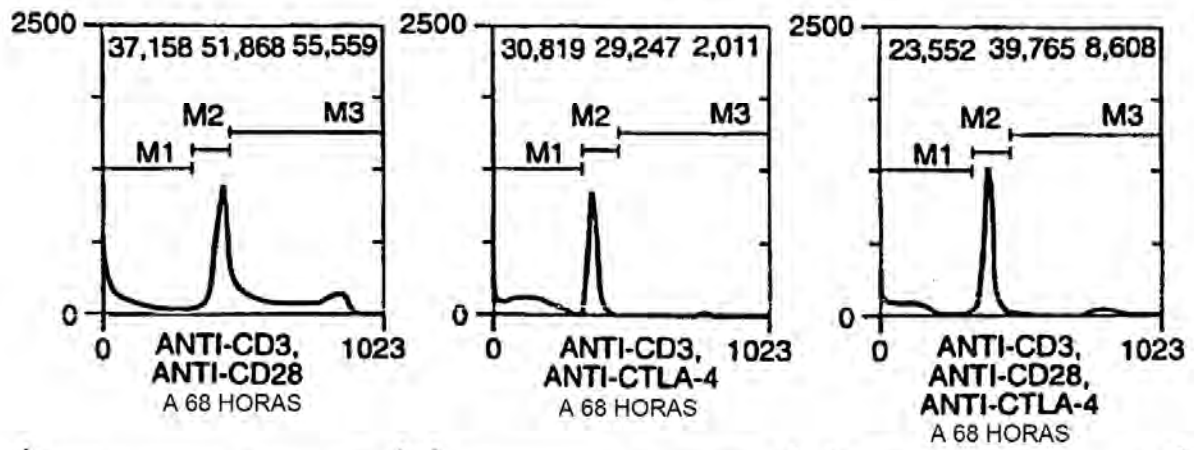
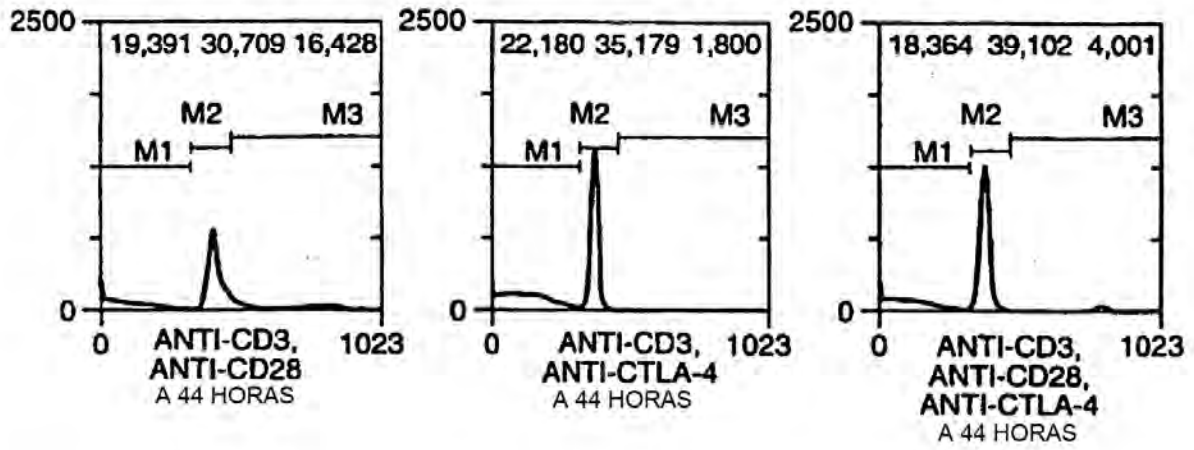
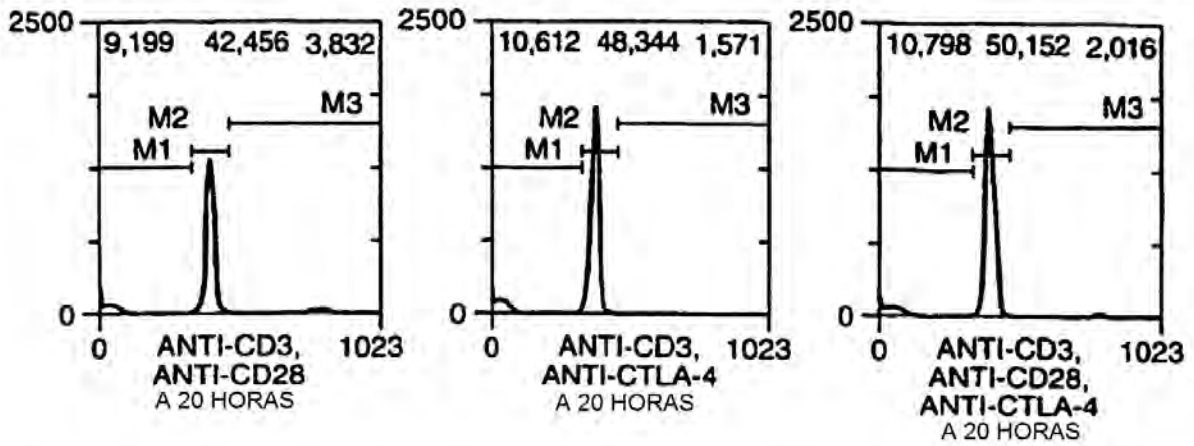


Figura 9C

Figura 9D

Figura 9E

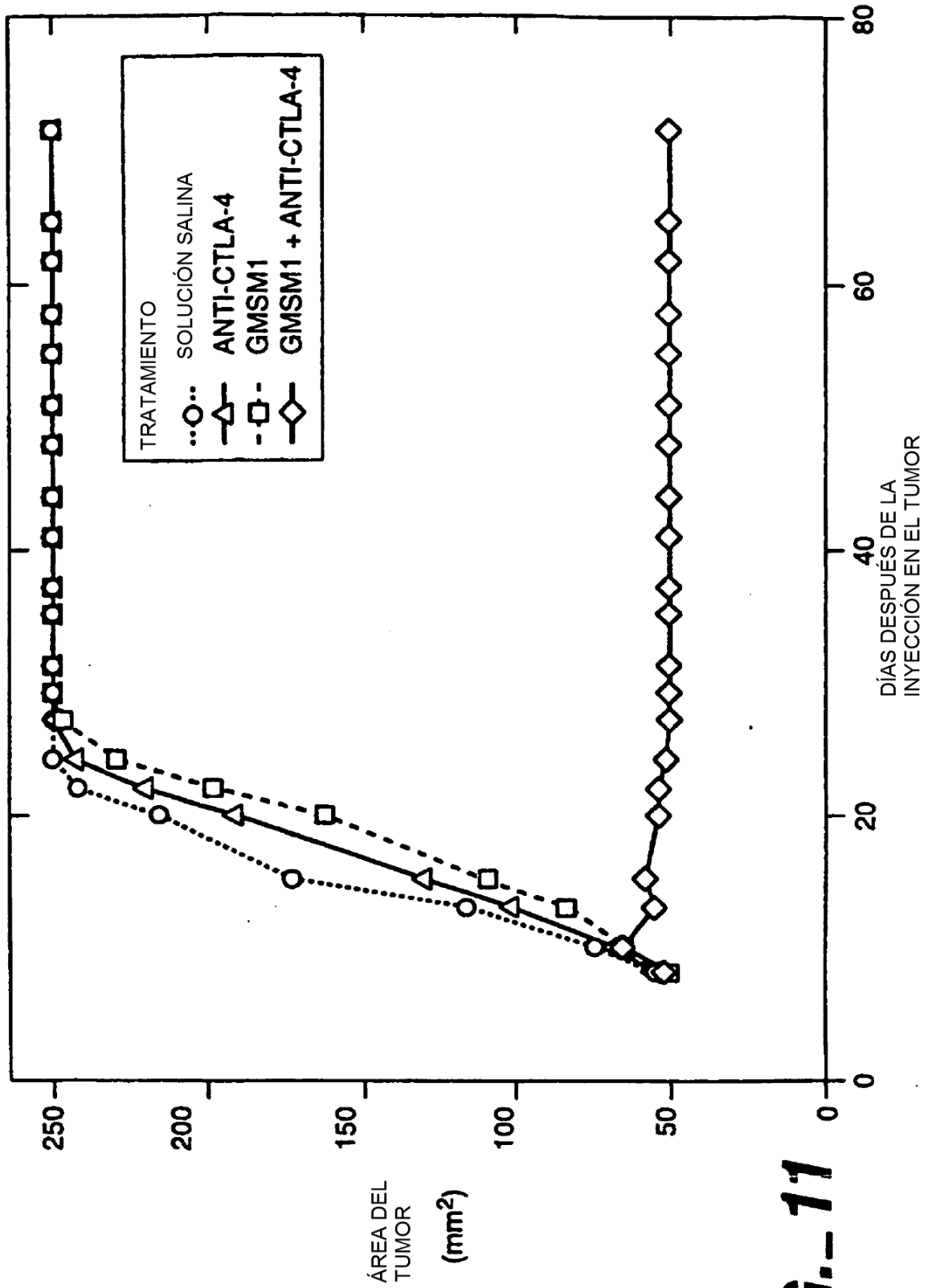


FIG.- 11

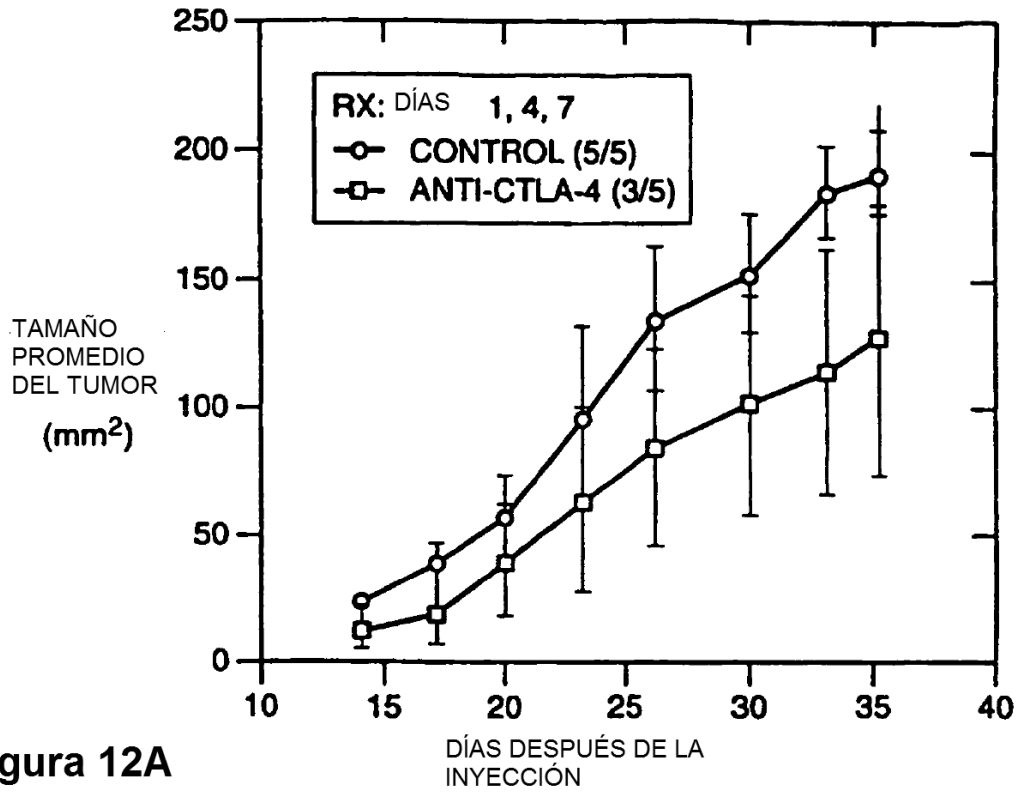
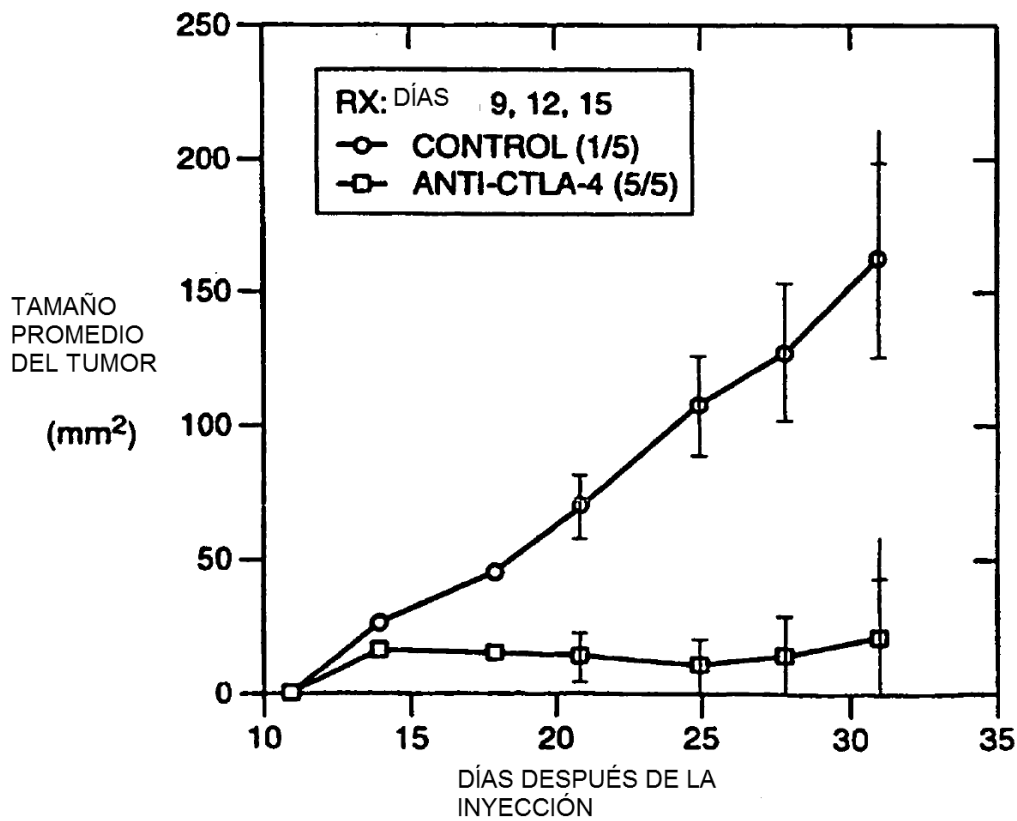


Figura 12A



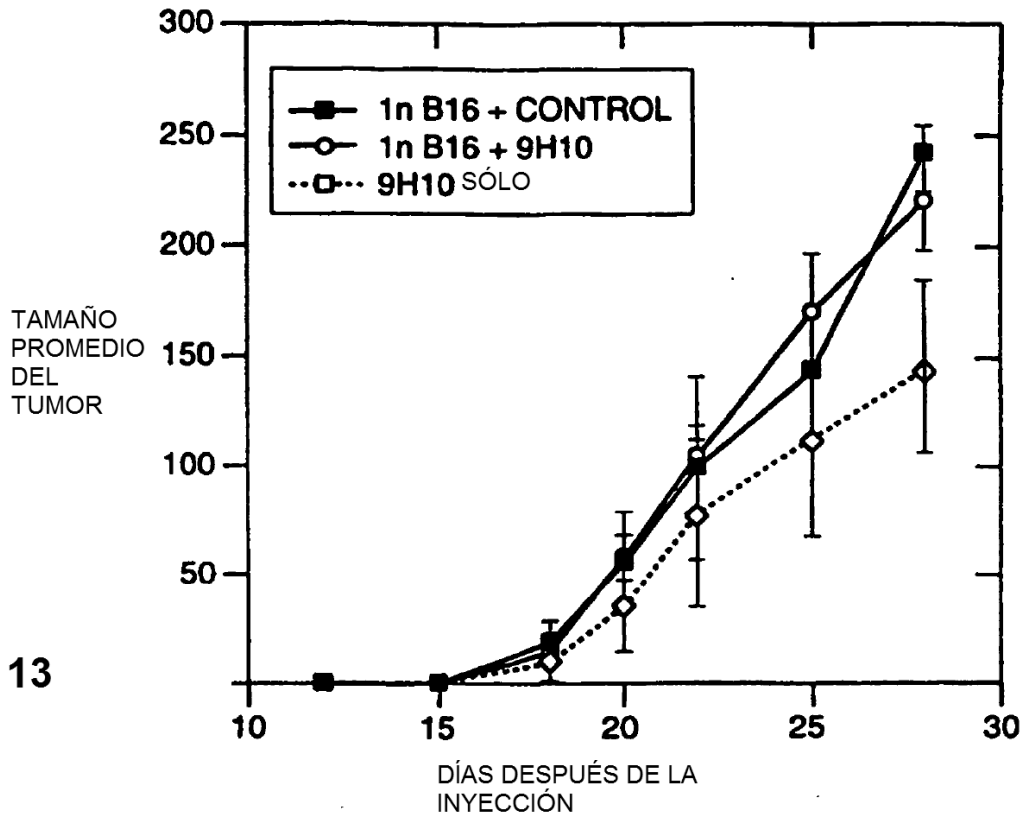


Figura 13

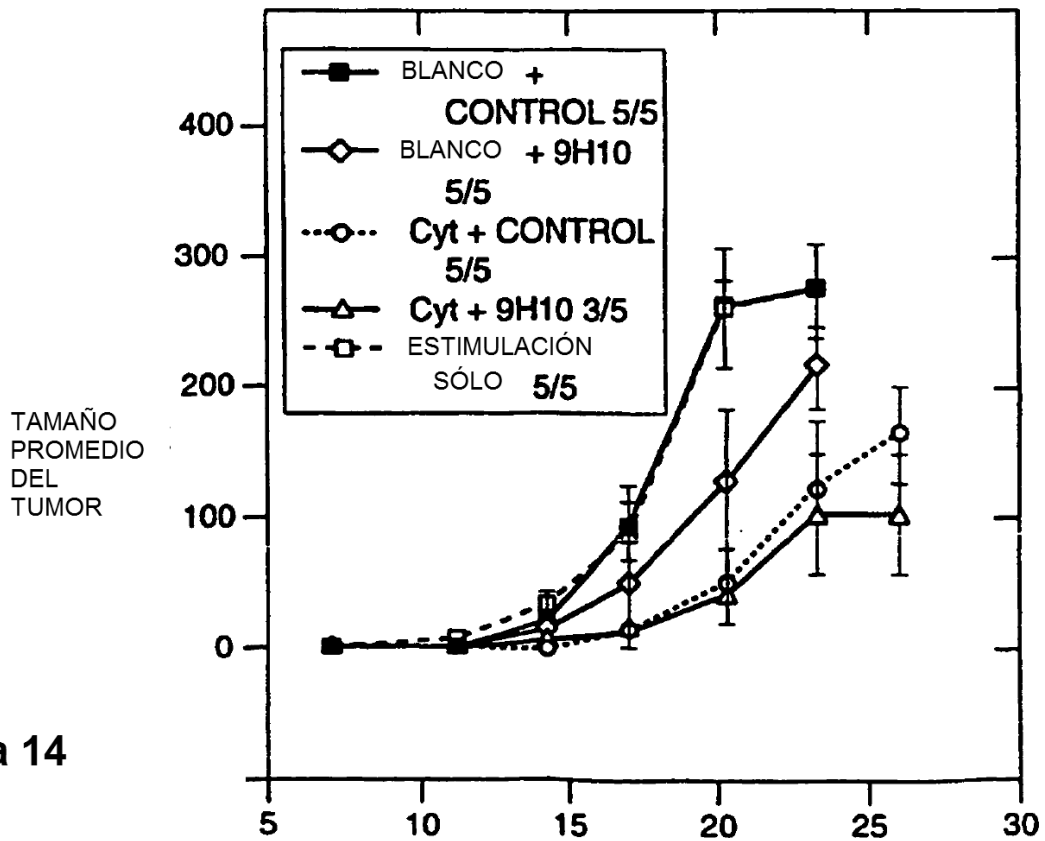


Figura 14