

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 914**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2012** **PCT/EP2012/055735**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012** **WO12131004**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2012** **E 12713670 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016** **EP 2691419**

54 Título: **Anticuerpos dirigidos contra lcos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

31.03.2011 EP 11305380

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.05.2017

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (20.0%)**

101, rue de Tolbiac

75013 Paris, FR;

INSTITUT JEAN PAOLI & IRÈNE CALMETTES

(20.0%);

UNIVERSITÉ D'AIX MARSEILLE (20.0%);

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON I (20.0%) y

CENTRE LÉON BÉRARD (20.0%)

72 Inventor/es:

FAGET, JULIEN;

CAUX, CHRISTOPHE;

MENETRIER-CAUX, CHRISTINE;

NUNES, JACQUES y

OLIVE, DANIEL

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 612 914 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

Anticuerpos dirigidos contra ICOS y usos de los mismos

5 **Sector de la técnica**

La invención se refiere a anticuerpos dirigidos contra ICOS y usos de los mismos.

10 **Estado de la técnica**

En varios cánceres, el establecimiento de una respuesta de linfocitos T inmunosupresores se correlaciona con un mal pronóstico y progresión de la enfermedad.

15 Entre los diferentes efectores celulares implicados en el establecimiento de tolerancia inmunitaria, el subconjunto de linfocitos T reguladores CD4⁺ (Treg) está especializado en la supresión del otro linfocito T (Tconv), además de la función dendrítica. Dicha supresión puede correlacionarse con una mala tasa de supervivencia del paciente que padece cáncer, especialmente cáncer de mama.

20 Se ha mostrado que grandes cantidades de IL-10 y bajas cantidades de IFN γ producido por linfocitos T CD4⁺ están asociados a capacidad reducida de linfocitos T citotóxicos CD8⁺, proliferación de linfocitos T más baja y participan en la diferenciación de monocitos en macrófagos inmunosupresores de tipo M2c, relacionados con el macrófago asociado a tumores (TAM).

25 Los inventores informaron previamente que los linfocitos T CD3⁺CD4⁺ de memoria que engloban grandes cantidades de Treg (Ta-Treg) infiltraron tumores de mama primarios. La infiltración de tumores de mama primarios por Ta-Treg y DC plasmacitoides (pDC) están ambos asociados a mal pronóstico y mala supervivencia del paciente que padece tumores de mama.

30 Los inventores confirmaron además que los mecanismos inmunosupresores que implican a Treg se observan en la mayoría de los cánceres e infecciones crónicas. Estos mecanismos supresores previenen una respuesta inmunitaria eficiente contra el cáncer e infección viral crónica.

35 Actualmente, los Treg son elegidos como diana en cánceres e infecciones crónicas usando terapia de células, mAb anti-CD25 o quimioterapia de baja dosis. Sin embargo, dichas estrategias no proporcionaron resultados aceptables.

Además, se ha informado que Treg podría tener una función importante en enfermedades asociadas a o producidas por una respuesta inmunitaria excesiva.

40 Sin embargo, actualmente no hay estrategia disponible y eficiente para tratar enfermedades asociadas a Treg. Así, todavía hay una gran necesidad para proporcionar estrategias terapéuticas eficientes que se dirijan a enfermedades que implican a Treg.

45 Nanji Salaiman et al. (American Journal of Transplantation, vol 4, Abril de 2004, páginas 526-536) describen múltiples terapias de combinación que implican el bloqueo de la coestimulación de ICOS/B7RP-1 (ICOS-L) que facilitan la supervivencia de aloinjertos de islotes a largo plazo.

Objeto de la invención

50 Sorprendentemente, los inventores han mostrado que la interacción entre ICOS y su ligando desempeña una función fundamental en la activación, proliferación y función supresora de Treg en algunos cánceres mediante la interacción con células dendríticas plasmacitoides (pDC). Entonces concentraron su esfuerzo en generar anticuerpos específicos con efectos antagonistas y agonistas.

55 Los anticuerpos antagonistas son eficientes para tratar una enfermedad o una afección asociada a la supresión mediada por Treg de la respuesta inmunitaria. Los anticuerpos agonistas son eficaces para tratar una enfermedad o una afección asociada a o producida por una respuesta inmunitaria excesiva.

Así, la presente invención se refiere a un anticuerpo dirigido contra ICOS o un derivado del mismo que:

- neutraliza la interacción de ICOS en Treg inhibiendo la fijación entre ICOS y ICOS-L; y
- anula la proliferación de Treg inducida por pDC.

En el contexto de la presente invención, dicho anticuerpo también puede llamarse "anticuerpo antagonista".

65 La invención se refiere además a un anticuerpo dirigido contra ICOS, en la que dicho anticuerpo está seleccionado

del grupo que consiste en Icos 145-1 e Icos 314-8, respectivamente obtenibles del hibridoma depositado en la "Collection Nationale de Cultures de Microorganismes" (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia), según los términos del Tratado de Budapest, el 2 de julio de 2009 con los números de acceso CNCM 1-4179 y CNCM I-4180.

También se describe un anticuerpo antagonista dirigido contra ICOS según la invención o un derivado del mismo para su uso como un medicamento. La divulgación se refiere además a un anticuerpo antagonista dirigido contra ICOS según la invención para su uso para tratar cánceres o infecciones crónicas.

La presente divulgación se refiere además a un anticuerpo dirigido contra ICOS o un derivado del mismo que:

- induce la producción de IL-10 e IFN γ ;
- induce la proliferación de linfocitos T CD4+;
- reduce la proliferación de Tconv, y
- aumenta la función inmunosupresora de Treg.

En el contexto de la presente divulgación, dicho anticuerpo también puede llamarse "anticuerpo agonista".

La divulgación también se refiere a un anticuerpo dirigido contra ICOS, en la que dicho anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en Icos 53-3, Icos 88-2 e Icos 92-17, respectivamente obtenibles del hibridoma depositado en la "Collection Nationale de Cultures de Microorganismes" (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia), según los términos del Tratado de Budapest, el 2 de julio de 2009 con los números de acceso CNCM I-4176, CNCM I-4177, CNCM I-4178.

La divulgación se refiere a un anticuerpo agonista según la invención o un derivado del mismo para su uso como un medicamento. La divulgación también se refiere a un anticuerpo agonista para su uso para tratar enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplante o una enfermedad de injerto contra huésped.

Descripción detallada de la invención

Definición

Como se usa en el presente documento, los términos "**ICOS**" o "**coestimulante de linfocitos T inducibles**" se refieren a una glucoproteína homodimérica transmembranaria de 55 a 60 kDa que presenta un dominio tipo IgV en su parte extracelular y una tirosina dentro de un motivo YMFM en su parte citoplásmica. Se ha mostrado que la interacción de ICOS con su ligando induce la fosforilación de la tirosina en la parte citoplásmica de ICOS. Dicha fosforilación es responsable del reclutamiento de la subunidad reguladora de p85 PI3K, que activa la vía de señalización PI3K/AKT.

También se describe que la interacción de ICOS induce la expresión de CD40L en la superficie celular. CD40L se conoce por tener un importante efecto en la cooperación entre linfocitos T y linfocitos B.

Se ha encontrado que ICOS se expresa, tras la activación de TCR, en linfocitos T convencionales (subconjuntos CD4+, CD8+ de Tconv), además de en Treg. Los inventores mostraron que dicha activación era más importante en pacientes que padecían melanoma o cáncer de mama.

Como se usa en el presente documento, los términos "**ICOSL**", "**ICOS-L**" y "**B7-H2**" se refieren a un ligando de ICOS. Dicho ligando está presente en células linfoides tales como linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, además de en células no linfoides tales como células endoteliales o epiteliales. La interacción de ICOS tiene una función importante en la activación de linfocitos, e induce la proliferación y supervivencia de linfocitos T, especialmente Treg.

Como se usa en el presente documento, el término "**JICOS 1**" se refiere a una línea celular específica que expresa ICOS.

Como se usa en el presente documento, un "**anticuerpo monoclonal**" en sus diversas formas gramaticales se refiere a una población de anticuerpos que contiene solo una especie de anticuerpo que combina sitios capaces de inmunorreactar con un epítipo particular. Así, un anticuerpo monoclonal normalmente muestra una única afinidad de unión por cualquier epítipo con el que inmunorreacta. Un anticuerpo monoclonal puede, por tanto, contener una molécula de anticuerpo que tiene una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpo, cada uno inmunoespecífico para un epítipo diferente, por ejemplo un anticuerpo monoclonal biespecífico. Aunque históricamente un anticuerpo monoclonal se produjo por immortalización de una línea celular secretora de inmunoglobulinas clonalmente puras, también puede prepararse una población monoclonalmente pura de moléculas de anticuerpo por los métodos de la presente invención. Los métodos de laboratorio de preparación de anticuerpos monoclonales son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow et al., 1988). Los anticuerpos

monoclonales (mAb) pueden prepararse inmunizando TXAS mutado purificado en un mamífero, por ejemplo un ratón, rata, ser humano y mamíferos similares. Las células productoras de anticuerpo en el mamífero inmunizado se aíslan y se fusionan con células de mieloma o de heteromieloma para producir células híbridas (hibridoma). Las células de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales se utilizan como una fuente del anticuerpo monoclonal deseado. Este método convencional de cultivo de hibridomas se describe en Kohler y Milstein (1975). Aunque los mAb pueden producirse por cultivo de hibridomas, la invención no debe limitarse así. También se contempla el uso de mAb producidos expresando un ácido nucleico clonado de un hibridoma de la presente invención. Es decir, el ácido nucleico que expresa las moléculas secretadas por un hibridoma de la presente invención puede transferirse a otra línea celular para producir un transformante. El transformante es genotípicamente distinto del hibridoma original, pero también es capaz de producir moléculas de anticuerpo de la presente invención, que incluyen fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de anticuerpo completo, correspondientes a aquellas secretadas por el hibridoma. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.642.334 a Reading; publicación PCT N.º; publicaciones de patente europea N.º 0239400 a Winter et al. y N.º 0125023 a Cabilly et al. También se contemplan técnicas de generación de anticuerpos que no implican inmunización tales como, por ejemplo, usando tecnología de presentación en fagos para examinar bibliotecas intactas (de animales no inmunizados); véase Barbas et al. (1992), y Waterhouse et al. (1993).

Como se usa en el presente documento, la expresión **"anticuerpo anti-ICOS"** se refiere a un anticuerpo monoclonal dirigido contra ICOS, preferentemente obtenido usando ICOS-Fc recombinante como inmunógeno.

Como se usa en el presente documento, la expresión **"derivado de un anticuerpo"** se refiere a un anticuerpo que comprende las 6 CDR de dicho anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, la expresión **"mAb 53.3"** o **"Icos 53-3"** se refiere a un anticuerpo monoclonal dirigido contra ICOS depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009 bajo el número de acceso CNCN I-4176. Dicho anticuerpo es un agonista de ICOS. La expresión **"un derivado de mAb 53.3"** se refiere a un anticuerpo anti-ICOS que comprende las 6 CDR de mAb 53.3.

Como se usa en el presente documento, la expresión **"mAb 88.2"** o **"Icos 88-2"** se refiere a un anticuerpo monoclonal dirigido contra ICOS depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009 bajo el número de acceso CNCN I-4177. Dicho anticuerpo es un agonista de ICOS. Los inventores han mostrado que usar dicho anticuerpo en presencia de IL-2 favorece la proliferación de Treg y la secreción de IL-10. La expresión **"un derivado de mAb 88.2"** se refiere a un anticuerpo anti-ICOS que comprende las 6 CDR de mAb 88.2.

Las 6 CDR de mAb 88.2 son como en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1

	Secuencia de ADN	Secuencia de aminoácidos
H-CDR1	GGCTACAGTTTCACCAGCTACTGGATAAAC (SEQ ID NO:17)	GYSFTSYWIN (SEQ ID NO:23)
H-CDR2	AATATTTATCCTTCTGATAGTTATACTAACTA CAATCAAATGTTCAAGGAC (SEQ ID NO:18)	NIYPSDSYTNYNQMFKD (SEQ ID NO:24)
H-CDR3	TGGAATCTTTCTTATTACTTCGATAATACTA CTACTTGGACTAC (SEQ ID NO:19)	WNLSYYFDNNYYLDY (SEQ ID NO:25)
L-CDR1	AGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCATAGTAATGG CAACACTTACTTGTAT (SEQ ID NO:20)	RSSKSLLSHNGNTYLY (SEQ ID NO:26)
L-CDR2	CGGATGTCCAACCTTGCCTCA (SEQ ID NO:21)	RMSNLAS (SEQ ID NO:27)
L-CDR3	ATGCAACATCTAGAATATCCGTGGACG (SEQ ID NO:22)	MQHLEYPWT (SEQ ID NO:28)

Como se usa en el presente documento, la expresión **"mAb 92.17"** o **"Icos 92-17"** se refiere a un anticuerpo monoclonal dirigido contra ICOS depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009 bajo el número de acceso CNCN I-4178. Dicho anticuerpo es un agonista de ICOS. La expresión **"un derivado de mAb 92.17"** se refiere a un anticuerpo anti-ICOS que comprende las 6 CDR de mAb 92.17.

Como se usa en el presente documento, la expresión **"mAb 145.1"** o **"Icos 145-1"** se refiere a un anticuerpo monoclonal dirigido contra ICOS depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009 bajo el número de acceso CNCN I-4179. Dicho anticuerpo es un antagonista de ICOS. La expresión **"un derivado de mAb 145.1"** se refiere a un anticuerpo anti-ICOS que comprende las 6 CDR de 145-1 mAb.

Como se usa en el presente documento, la expresión **"mAb 314.8"** o **"Icos 314-8"** se refieren a un anticuerpo

monoclonal dirigido contra ICOS depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009 bajo el número de acceso CNCM I-4180. Los inventores han mostrado que usar dicho anticuerpo bloquea la secreción de IL-10 por Tconv. Dicho anticuerpo es un antagonista de ICOS y está altamente adaptado para prevenir la función de expansión y supresora de linfocitos T reguladores mediada por células dendríticas en cáncer tal como cáncer de mama. La expresión **"un derivado de mAb 314.8"** se refiere a un anticuerpo anti-ICOS que comprende las 6 CDR de mAb 314.8.

Las 6 CDR de mAb 314.8 son como en la Tabla 2 a continuación:

Tabla 2

	Secuencia de ADN	Secuencia de aminoácidos
H-CDR1	GGCTACACCTTCACCACCTACTGGATGCA C (SEQ ID NO:1)	GYTFTTYWMH (SEQ ID NO:7)
H-CDR2	GAGATTGATCCTTCTGATAGTTATGTTAA CTACAATCAAACTTTAAGGGC (SEQ ID NO:2)	EIDPSDSYVNYNQNFKG (SEQ ID NO:8)
H-CDR3	TTTGATTAC (SEQ ID NO:3)	FDY (SEQ ID NO:9)
L-CDR1	AGGTCTAGTAAGAGTCCCCTGCATAGTAA CGGCAACATTTACTTATAT (SEQ ID NO:4)	RSSKSPLHSNGNIYLY (SEQ ID NO:10)
L-CDR2	CGGATGTCCAACCTTGCCCTCA (SEQ ID NO:5)	RMSNLAS (SEQ ID NO:11)
L-CDR3	ATGCAACATCTAGAATATCCGTACACG (SEQ ID NO:6)	MQHLEYPYT (SEQ ID NO:12)

Como se usa en el presente documento, la expresión **"un anticuerpo de la divulgación"** se refiere a:

- un anticuerpo dirigido contra ICOS capaz de neutralizar la interacción de ICOS en Treg inhibiendo la fijación entre ICOS y ICOS-L y de suprimir la proliferación de Treg inducida por células dendríticas plasmacitoides, es decir, un anticuerpo antagonista; además de
- un anticuerpo dirigido contra ICOS capaz de inducir la producción de IL-10 e IFN γ , para inducir la proliferación de linfocitos T CD4 $^{+}$; para reducir la proliferación de Tconv y para aumentar la función inmunosupresora de Treg, es decir, un anticuerpo agonista.

Dicha expresión también engloba cualquier derivado de dichos anticuerpos.

Preferentemente, los anticuerpos de la invención se eligen de mAb 145.1 y mAb 314.8 y los derivados de los mismos.

Como se usa en el presente documento, la expresión **"anticuerpo antagonista dirigido contra ICOS"** se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a ICOS sin desencadenar una respuesta celular similar a la respuesta inducida por ICOS que existe de forma natural. La expresión **"los anticuerpos antagonistas de la invención"** se refiere a mAb 145.1, mAb 314.8 y derivados de los mismos.

Como se usa en el presente documento, la expresión **"anticuerpo agonista dirigido contra ICOS"** se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a ICOS y desencadenar una respuesta celular similar a la respuesta inducida por ICOS que existe de forma natural. Dicho anticuerpo así imita la acción de ICOS. La expresión **"el anticuerpo agonista de la divulgación"** se refiere a mAb 53.3, mAb 88.2, mAb 92.17 y derivados de los mismos.

Como se usa en el presente documento, las expresiones **"célula presentadora de antígenos"** y **"APC"** se refieren a una clase de células inmunitarias capaces de internalizar y procesar un antígeno, de manera que determinantes antigénicos se presentan sobre la superficie de la célula como complejos asociados a MHC, de un modo capaz de ser reconocidos por el sistema inmunitario (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos limitados a MHC clase I y/o linfocitos T colaboradores limitados a MHC clase II). Las dos propiedades requeridas que permiten que una célula funcione como una APC son la capacidad para procesar antígenos endocitosados y la expresión de productos génicos de MHC. Ejemplos de APC incluyen células dendríticas (DC), fagocitos mononucleares (por ejemplo macrófagos), linfocitos B, células de Langerhans de la piel y, en seres humanos, células endoteliales.

Como se usa en el presente documento, las expresiones **"Treg"** y **"linfocitos T reguladores"** se refieren a una población específica de linfocitos T que tiene la capacidad de suprimir de forma dominante la proliferación de linfocitos T respondedores *in vitro* e inhibir enfermedades autoinmunitarias. Los Treg participan como contribuyentes importantes en el fallo definitivo de las respuestas inmunitarias antitumorales en seres humanos. Por ejemplo, en cáncer de ovario, los Treg suprimen los linfocitos T específicos de tumor y altos números de Treg asociados a tumor están asociados a tiempo de supervivencia reducida. Los inventores han mostrado que los Treg inhiben selectivamente la respuesta inmunitaria del huésped y así contribuyen a la progresión del cáncer, especialmente en

cáncer de mama. Los Treg se identificaron originalmente como una población de células CD4⁺CD25⁺, pero también se caracterizan por la expresión del factor de transcripción de la familia forkhead, FoxP3.

Los inventores han mostrado que los Treg proliferan *in situ* dentro de tejido de cáncer de un paciente y expresan los marcadores de la superficie de la célula ICOS y CD39, en comparación con Treg extraídos de sangre del mismo paciente.

Por oposición, el término "**Tconv**" se refiere a linfocitos T distintos de Treg. El término "Tconv" incluye así linfocitos T que funcionan eliminando el antígeno (por ejemplo, produciendo citocinas que modulan la activación de otras células o por actividad citotóxica). Este término incluye linfocitos T colaboradores (por ejemplo, linfocitos Th1 y Th2) y linfocitos T citotóxicos. A este respecto, los linfocitos T colaboradores expresan preferentemente CD4 y expresan niveles bajos e indetectables de CD25. Los linfocitos CTL expresan preferentemente CD8 y niveles bajos e indetectables de CD4. Preferentemente, un linfocito no Treg no expresa CD4 ni CD25. Preferentemente, un linfocito no Treg no expresa FoxP3.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "**linfocitos T reguladores asociados a tumor**" y "**Ta-Treg**" se refieren a linfocitos T reguladores asociados a tumores, por ejemplo a tumores de mama. Los inventores han mostrado de hecho que Ta-Treg están presentes en los infiltrados linfoides de tejido tumoral mamario y presentan un impacto negativo en la supervivencia del paciente que padece cáncer de mama.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "**células dendríticas plasmacitoides**" y "**pDC**" se refieren a células inmunitarias innatas que circulan en la sangre y se encuentran en órganos linfoides periféricos. Constituyen un grupo de células que pertenecen al grupo de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP).

Como se usa en el presente documento, las expresiones "**células dendríticas plasmacitoides asociadas a tumor**" y "**Ta-pDC**" se refieren a células dendríticas plasmacitoides asociadas a tumores, por ejemplo tumores de mama. Los inventores han mostrado que Ta-pDC son capaces de inducir la proliferación de Ta-Treg bajo la dependencia de la co-estimulación de ICOS/ICOSL.

Como se usa en el presente documento, los términos "**IL-10**" e "**interleucina-10**" se refieren a un factor de inhibición de la síntesis de citocinas humanas (CSIF), que es una citocina antiinflamatoria. Esta citocina se produce principalmente por monocitos y a un menor grado por linfocitos. Esta citocina tiene efectos pleiotrópicos en la inmunorregulación e inflamación. Regula por disminución la expresión de citocinas Th1, antígenos de clase II de MHC. También potencia la supervivencia de linfocitos B, proliferación y producción de anticuerpos. Esta citocina puede bloquear la actividad de NF-κB, y participa en la regulación de la vía de señalización JAK-STAT.

Como se usa en el presente documento, los términos "**IFNγ**" e "**interferón-gamma**" se refieren a una proteína dimérica con subunidades de 146 aminoácidos. La importancia de IFN-γ en el sistema inmunitario es el resultado en parte de su capacidad para inhibir la replicación viral directamente, y, lo que es más importante, de sus efectos inmunoestimulantes e inmunomoduladores. IFNγ se produce predominantemente por linfocitos citolíticos espontáneos (NK) y linfocitos T citolíticos espontáneos (NKT) como parte de la respuesta inmunitaria innata, y por linfocitos T efectores de linfocitos T citotóxicos (CTL) CD4 y CD8 una vez se desarrolla inmunidad específica de antígeno.

Como se usa en el presente documento, los términos "**tratar**" o "**tratamiento**" significan invertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o afección al que se aplica tal término, o uno o más síntomas de tal trastorno o afección.

Está prevista una "**cantidad terapéuticamente eficaz**" para una cantidad mínima de agente activo que es necesaria para conferir beneficio terapéutico a un sujeto. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad que induce, mejora o produce de otro modo una mejora en los síntomas patológicos, progresión de la enfermedad o afecciones fisiológicas asociadas a una enfermedad o que mejora la resistencia a un trastorno.

Como se usa en el presente documento, el término "**prevención**" se refiere a aliviar que la enfermedad o afección se produzca en un sujeto que todavía no ha sido diagnosticado con que la tiene. Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" indica un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferentemente, un sujeto según la invención es un ser humano.

El término "**cáncer**" incluye tumores malignos de los diversos sistemas de órganos, tales como que afectan el pulmón, mama, tiroides, linfoides, gastrointestinales y vías genitourinarias, además de adenocarcinomas que incluyen tumores malignos tales como la mayoría de los cánceres de colon, carcinoma de células renales, cáncer de próstata y/o tumores testiculares, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer del intestino delgado y cáncer del esófago.

El término "**enfermedad asociada a Treg**" debe considerarse que engloba cualquier enfermedad o trastorno o

estado en el que la modulación de números de Treg y/o actividad puede proporcionar un efecto beneficioso. Este término engloba:

- enfermedades y afecciones asociadas a la supresión mediada por Treg de una respuesta inmunitaria del sujeto,
- enfermedades y afecciones asociadas a o producidas por una excesiva respuesta inmunitaria.

Como se usa en el presente documento, la expresión **"enfermedades y afecciones asociadas a la supresión mediada por Treg de la respuesta inmunitaria"** son enfermedades y afecciones producidas por la supresión por Treg de la proliferación de células inmunomoduladoras tales como linfocito T específico de tumor. Como se mencionó previamente, los inventores han mostrado que Treg están asociados a un mal diagnóstico y tasa de supervivencia en un paciente que padece cáncer.

Ejemplos no limitantes de enfermedades y afecciones asociadas a la supresión mediada por Treg de un sistema inmunitario del sujeto son cáncer e infecciones crónicas.

Como se usa en el presente documento, **"enfermedades y afecciones asociadas a o producidas por una excesiva respuesta inmunitaria"** son, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplante o una enfermedad de injerto contra huésped.

Esta expresión engloba además afecciones inflamatorias, tales como trastorno inflamatorio del sistema nervioso (por ejemplo, esclerosis múltiple), enfermedad inflamatoria de la mucosa (por ejemplo, enfermedad inflamatoria del intestino, asma o amigdalitis), enfermedad inflamatoria de la piel (por ejemplo, dermatitis, psoriasis o hipersensibilidad por contacto), artritis autoinmune (por ejemplo, artritis reumatoide).

Como se usa en el presente documento, el término **"respuesta inmunitaria"** se refiere a la acción concertada de linfocitos, células presentadoras de antígenos, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citocinas y complemento) que producen daño selectivo a, destrucción de o eliminación del cuerpo de un sujeto de células cancerosas, células tumorales metastásicas, melanoma maligno, patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células normales o tejidos de un sujeto.

Como se usa en el presente documento, una **"enfermedad autoinmunitaria"** es una enfermedad o un trastorno que surge de y se dirige contra los propios tejidos de un individuo.

Anticuerpos antagonistas de la invención

Se ha mostrado que ICOS-L, que es un ligando específico de ICOS, se expresa en células dendríticas plasmacitoides. Los inventores han mostrado que Treg asociados a tumor estuvieron en estrecho contacto con células dendríticas plasmacitoides asociadas a tumor, que indica que una interacción tal permite la interacción de ICOS con ICOS-L en tumores.

Mostraron además que la interacción ICOS/ICOS-L *in situ* conduce a la regulación por disminución de ICOS-L en la membrana de Ta-pDC. Los inventores han desarrollado un anticuerpo antagonista dirigido contra ICOS y mostraron que la adición de dicho anticuerpo anula totalmente la regulación por disminución de ICOS-L en pDC, que es responsable de la activación y proliferación de Ta-Treg.

Los inventores han mostrado que el anticuerpo antagonista según la invención neutraliza la interacción de ICOS en Treg y anula su expansión inducida por pDC. Más exactamente, dicho anticuerpo anula la proliferación de Treg y la secreción de IL-10 inducida por la interacción ICOS/ICOSL.

Los anticuerpos antagonistas de la invención son así altamente apropiados para anular la respuesta inmunosupresora implicada en el mecanismo patológico. Así, son útiles para tratar enfermedades y afecciones asociadas a la supresión mediada por Treg de la respuesta inmunitaria.

La invención se refiere así a un anticuerpo dirigido contra ICOS y derivados del mismo que:

- neutraliza la interacción de ICOS en Treg inhibiendo la fijación entre ICOS y ICOS-L; y
- anula la proliferación de Treg inducida por célula dendrítica plasmacitoide.

En una realización, dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En una realización, dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

En una realización, dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

Por **"neutralizar la interacción de ICOS en Treg"** se indica que el anticuerpo interfiere con la cooperación entre

ICOS y su ligando ICOS-L.

Por **"anular la proliferación de Treg"** se indica que una disminución significativa, preferentemente una detención total, de la proliferación de Treg se observa en un tejido diana, preferentemente un tejido tumoral, en comparación con un tejido de control, preferentemente un tejido no tumoral, más preferentemente sangre.

La invención se refiere además a un anticuerpo dirigido contra ICOS, en el que dicho anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en lcos 145-1 e lcos 314-8, respectivamente obtenibles del hibridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009 con los números de acceso CNCM 1-4179 y CNCM I-4180 y derivados de los mismos.

La invención también se refiere a un anticuerpo que comprende las 6 CDR de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en lcos 145-1 e lcos 314-8, respectivamente obtenibles del hibridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009 con los números de acceso CNCM 1-4179 y CNCM I-4180 y derivados de los mismos.

La invención también se refiere a un anticuerpo que comprende las 6 CDR de la Tabla 2 anterior.

En otra realización, la invención se refiere a un anticuerpo derivado de uno de los anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en lcos 145-1 e lcos 314-8, respectivamente obtenibles del hibridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009 con los números de acceso CNCM 1-4179 y CNCM I-4180.

Uso terapéutico de anticuerpos antagonistas de la invención

Neutralizando la interacción de ICOS en Treg y anulando la proliferación de Treg, los anticuerpos antagonistas de la invención son altamente apropiados para su uso para tratar enfermedades y afecciones asociadas a la supresión mediada por Treg de la respuesta inmunitaria, por ejemplo cánceres e infecciones crónicas. Dichos anticuerpos pueden así usarse para restaurar una inmunidad antitumoral.

La invención, por tanto, se refiere al anticuerpo antagonista dirigido contra ICOS según la invención o un derivado del mismo para su uso como un medicamento.

La invención se refiere además al anticuerpo antagonista dirigido contra ICOS según la invención o un derivado del mismo para su uso para tratar una enfermedad o una afección asociada a la supresión mediada por Treg de la respuesta inmunitaria.

En una realización preferida, dicha enfermedad o una afección asociada a la supresión mediada por Treg de la respuesta inmunitaria es una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cánceres e infecciones crónicas.

De hecho, los inventores han mostrado que los anticuerpos antagonistas de la invención están adaptados para modular números de Treg y/o actividad de manera que supriman el efecto inmunosupresor relacionado con aquellos Treg. Por tanto, dichos anticuerpos antagonistas representan una estrategia altamente prometedora para tratar enfermedades asociadas a una supresión del sistema inmunitario tal como cáncer e infecciones crónicas.

Ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, linfoma maligno humano, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer de huesos, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer oral, cáncer de esófago, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, cáncer de estómago, cáncer testicular y cáncer de piel.

Ejemplos de infecciones crónicas incluyen, pero no se limitan a, infecciones virales, bacterianas, parasíticas o fúngicas tales como hepatitis crónica, infecciones de pulmón, infecciones de las vías respiratorias inferiores, bronquitis, gripe, neumonía y enfermedades de transmisión sexual. Ejemplos de infecciones virales incluyen, pero no se limitan a, hepatitis (VHA, VHB, VHC), herpes simple (VHS), herpes zóster, VPH, gripe, SIDA y complejo relacionado con el SIDA, varicela, resfriado común, infección por citomegalovirus (CMV), viruela, fiebre del Colorado por garrapatas, fiebre del dengue, fiebre hemorrágica del Ébola, enfermedad de pies y boca, fiebre de Lassa, sarampión, fiebre hemorrágica de Marburgo, mononucleosis infecciosa, paperas, norovirus, poliomiелitis, leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML), rabia, rubeola, SARS, encefalitis viral, gastroenteritis viral, meningitis viral, neumonía viral, enfermedad del Nilo Occidental y fiebre amarilla.

Ejemplos de infecciones bacterianas incluyen, pero no se limitan a, neumonía, meningitis bacteriana, cólera, difteria, tuberculosis, carbunco, botulismo, brucelosis, campilobacteriosis, tifus, gonorrea, listeriosis, enfermedad de Lyme, fiebre reumática, pertussis (tosferina), plaga, salmonelosis, fiebre escarlata, shigelosis, sífilis, tétanos, tracoma, tularemia, fiebre tifoidea e infecciones de las vías urinarias.

Ejemplos de infecciones parasíticas incluyen, pero no se limitan a, malaria, leishmaniosis, tripanosomiasis, enfermedad de Chagas, criptosporidiosis, fascioliasis, filariasis, infecciones amebicas, giardiasis, infección por lombriz intestinal, esquistosomiasis, teniasis, toxoplasmosis, triquinosis y tripanosomiasis. Ejemplos de infecciones

fúngicas incluyen, pero no se limitan a, candidiasis, aspergilosis, coccidioidomicosis, criptococcosis, histoplasmosis y pie de atleta.

En una realización preferida de la invención, la invención se refiere a los anticuerpos antagonistas dirigidos contra ICOS según la invención o un derivado de los mismos para su uso para tratar cáncer. Preferentemente, dicho cáncer está seleccionado de linfoma maligno humano, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino y cáncer de mama. Lo más preferentemente, dicho cáncer es cáncer de mama.

La invención también se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad o una afección asociada a la supresión mediada por Treg de la respuesta inmunitaria es una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cánceres e infecciones crónicas, preferentemente cánceres e infecciones crónicas, preferentemente cánceres, en la que dicho método comprende la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo antagonista dirigido contra ICOS según la invención o un derivado del mismo.

Anticuerpos agonistas dirigidos contra ICOS

Se ha encontrado que la interacción de ICOS se asocia a una respuesta de linfocitos T inmunosupresores. De hecho, se ha descrito que dicha interacción reduce la producción de IL-10 e IFN γ y reduce la proliferación de linfocitos T CD4 $^{+}$.

Por tanto, como se prueba por los inventores, un anticuerpo agonista de ICOS proporciona el efecto opuesto y es beneficioso para tratar enfermedades asociadas a o producidas por una excesiva respuesta inmunitaria. La divulgación se refiere así a un anticuerpo dirigido contra ICOS o un derivado del mismo que:

- induce la producción de IL-10 e IFN γ ;
- induce la proliferación de linfocitos T CD4 $^{+}$;
- reduce la proliferación de Tconv, y
- aumenta la función inmunosupresora de Treg.

Por "**inducir la producción de IL-10 e IFN γ** " se indica que se observa un aumento significativo de la producción de IL-10 e IFN γ .

Por "**inducir la proliferación de linfocitos T CD4 $^{+}$** " se indica que se observa un aumento significativo de la proliferación de linfocitos T CD4 $^{+}$ en un tejido diana, preferentemente un tejido tumoral, en comparación con un tejido de control, preferentemente un tejido no tumoral, más preferentemente sangre.

Por "**reducir la proliferación de Tconv**" se indica que se observa una disminución significativa de la proliferación de Tconv en un tejido diana, preferentemente un tejido tumoral, en comparación con un tejido de control, preferentemente un tejido no tumoral, más preferentemente sangre.

Por "**aumentar la función inmunosupresora de Treg**" se indica que se observa un aumento significativo de la actividad supresora de Treg.

En una realización, dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En una realización, dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

En una realización, dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

La divulgación se refiere además a un anticuerpo dirigido contra ICOS, en la que dicho anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en Icos 53-3, Icos 88-2 e Icos 92-17, respectivamente obtenibles del hibridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009 con los números de acceso CNCM I-4176, CNCM I-4177, CNCM I-4178 y derivados de los mismos.

La divulgación también se refiere a un anticuerpo que comprende las 6 CDR de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en Icos 53-3, Icos 88-2 e Icos 92-17, respectivamente obtenibles del hibridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009 con los números de acceso CNCM I-4176, CNCM I-4177, CNCM I-4178.

La divulgación también se refiere a un anticuerpo que comprende las 6 CDR de la Tabla 1 anterior.

En otra realización, la divulgación se refiere a un derivado anticuerpo de uno de los anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en Icos 53-3, Icos 88-2 e Icos 92-17, respectivamente obtenibles del hibridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009 con los números de acceso CNCM I-4176, CNCM I-4177, CNCM I-4178.

Uso terapéutico de anticuerpos agonistas

La divulgación también se refiere al anticuerpo agonista dirigido contra ICOS para su uso como un medicamento.

5 También se describe un anticuerpo agonista dirigido contra ICOS para su uso para tratar una enfermedad o una afección asociada a o producida por una excesiva respuesta inmunitaria.

También se describe un anticuerpo agonista dirigido contra ICOS para su uso para tratar una enfermedad autoinmunitaria, rechazo de trasplante o una enfermedad de injerto contra huésped.

10 En una realización particular, dicha enfermedad autoinmunitaria está seleccionada del grupo que consiste en artritis reumatoide (AR), diabetes mellitus dependiente de insulina (diabetes de tipo 1), esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico (LES), esclerodermia, síndrome de Sjogren, pénfigo vulgar, penfigoide, enfermedad de Addison, espondilitis anquilosante, anemia aplásica, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, celiaquía, dermatomiositis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, leucopenia idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática, infertilidad masculina, enfermedad mixta de tejido conjuntivo, miastenia grave, anemia perniciosa, uveítis facogénica, cirrosis biliar primaria, mixedema primario, síndrome de Reiter, síndrome del hombre rígido, tirotoxicosis, colitis ulcerativa y granulomatosis de Wegener.

20 En otra realización, la divulgación también se refiere al anticuerpo agonista dirigido contra ICOS para su uso para tratar un trastorno inflamatorio seleccionado del grupo que consiste en trastorno inflamatorio del sistema nervioso tal como esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria de la mucosa tal como enfermedad inflamatoria del intestino, asma o amigdalitis, enfermedad inflamatoria de la piel tal como dermatitis, psoriasis o hipersensibilidad por contacto, y artritis autoinmune tales como artritis reumatoide.

25 La divulgación también se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad o una afección asociada a o producida por una excesiva respuesta inmunitaria, preferentemente una enfermedad autoinmunitaria, un rechazo de trasplante, una enfermedad de injerto contra huésped, o un trastorno inflamatorio, en la que dicho método comprende la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo agonista dirigido contra ICOS.

Secuencia de ácidos nucleicos que codifica un anticuerpo de la invención

35 Otra realización de la invención se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un anticuerpo de uno de los anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en mAb 145.1, mAb 314.8 y derivados de los mismos.

En una realización particular, la invención se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio VH o el dominio VL de uno de los anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en mAb 145.1, mAb 314.8 y derivados de los mismos.

40 Normalmente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o de ARN, que puede incluirse en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o un vector viral.

45 Los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo por el que una secuencia de ADN o de ARN (por ejemplo, un gen extraño) pueden introducirse en una célula huésped, de manera que transformen el huésped y promuevan la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Así, otro objetivo de la invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico de la invención. Tales vectores pueden comprender elementos reguladores, tales como un promotor, potenciador, terminador y similares, para producir o dirigir la expresión de dicho anticuerpo tras la administración a un sujeto.

50 Ejemplos de promotores y potenciadores usados en el vector de expresión para la célula de animal incluyen promotor temprano y potenciador de SV40, promotor de LTR y potenciador del virus de la leucemia de ratón de Moloney, promotor y potenciador de cadena H de la inmunoglobulina y similares.

55 Puede usarse cualquier vector de expresión para la célula de animal, mientras que un gen que codifica la región C del anticuerpo humano pueda insertarse y expresarse. Ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107, pAGE103, pHSG274, pPCR, pSG1 beta d2-4- y similares. Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos replicantes que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integrativos, tales como por ejemplo pUC, pcDNA, pBR, y similares. Otros ejemplos de vector viral incluyen vectores de virus adenoviral, retroviral, del herpes y AAV. Tales virus recombinantes pueden producirse por técnicas conocidas en la técnica, tales como por transfección de células de encapsidación o por transfección transitoria con plásmidos colaboradores o virus. Ejemplos típicos de células de encapsidación de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GEnv+, células 293, etc. Protocolos detallados para producir tales virus recombinantes defectuosos en la replicación pueden encontrarse, por ejemplo, en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877, US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 y WO 94/19478.

65 Otro objetivo de la presente invención se refiere a una célula que ha sido transfectada, infectada o transformada por

un ácido nucleico y/o un vector según la invención. El término "transformación" significa la introducción de un gen "extraño" (es decir, extrínseco o extracelular), secuencia de ADN o ARN a una célula huésped, de manera que la célula huésped exprese el gen introducido o la secuencia para producir una sustancia deseada, normalmente una proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducido. Una célula huésped que recibe y expresa el ADN o ARN introducido ha sido "transformado". Los ácidos nucleicos de la invención pueden usarse para producir un anticuerpo de la invención en un sistema de expresión adecuado. El término "sistema de expresión" significa una célula huésped y vector compatible bajo condiciones adecuadas, por ejemplo para la expresión de una proteína codificada por ADN extraño llevado por el vector e introducido a la célula huésped.

Sistemas de expresión comunes incluyen células huésped de *E. coli* y vectores plasmídicos, células huésped de insecto y vectores de baculovirus, y células huésped de mamífero y vectores. Otros ejemplos de células huésped incluyen, sin limitación, células procariotas (tales como bacterias) y células eucariotas (tales como células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, etc.). Ejemplos específicos incluyen levaduras de *E. coli*, *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, líneas celulares de mamífero (por ejemplo, células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.), además de cultivos de células de mamífero primarios o establecidas (por ejemplo, producidos a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Ejemplos también incluyen célula SP2/0-Ag14 de ratón (ATCC CRL1581), célula P3X63-Ag8.653 de ratón (ATCC CRL1580), célula CHO en la que un gen de dihidrofolato reductasa (denominado en lo sucesivo "gen DHFR") es defectuoso, célula YB2/3HL.P2.G11.16Ag, 2O de rata (ATCC CRL1662, denominado en lo sucesivo "célula YB2/0"), y similares.

La presente invención también se refiere a un método de producción de una célula huésped recombinante que expresa un anticuerpo según la invención, comprendiendo dicho método las etapas de:

- (i) introducir *in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico recombinante o un vector como se ha descrito anteriormente en una célula huésped competente,
- (ii) cultivar *in vitro* o *ex vivo* la célula huésped recombinante obtenida, y
- (iii) opcionalmente, seleccionar las células que expresan y/o secretan dicho anticuerpo. Tales células huésped recombinantes pueden usarse para la producción de anticuerpos de la invención.

Composición farmacéutica según la invención

La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención.

Por tanto, un anticuerpo de la invención puede combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

"Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra no deseada cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, según convenga. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga sólida, semi-sólida o líquida no tóxica, diluyente, material de encapsulamiento o auxiliar de formulación de cualquier tipo.

La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosificación y el régimen naturalmente dependen de la afección que va a tratarse, la gravedad de la enfermedad, la edad, peso y sexo del paciente, etc.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para una administración tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular, y similares.

Preferentemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Éstas pueden ser en particular soluciones salinas estériles isotónicas (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio, y similares, o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

Las dosis usadas para la administración pueden adaptarse en función de diversos parámetros, y en particular en función del modo de administración usado, de la patología relevante, o alternativamente de la duración deseada del tratamiento. Para preparar composiciones farmacéuticas, una cantidad eficaz del anticuerpo puede disolverse o dispersarse en un vehículo farmacéuticamente aceptable o medio acuoso. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Pueden prepararse soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables

en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Un anticuerpo de la invención puede formularse en una composición en una forma neutra o de sal. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Sales formadas con los grupos carboxilo libres también puede derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales.

La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos.

La prevención de la acción de microorganismos puede provocarse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico.

La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración.

Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado a vacío y liofilización que dan un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

También se contempla la preparación de soluciones más concentradas o altamente concentradas para inyección directa, donde se prevé el uso de DMSO como disolvente para producir penetración extremadamente rápida, administrando altas concentraciones de los agentes activos a una pequeña área de tumor.

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de un modo compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Para administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe ser adecuadamente tamponada, si fuera necesario, y el diluyente líquido convertirse primero en isotónico con solución salina suficiente o glucosa.

Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos para aquellos expertos en la materia en vista de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación podría disolverse en 1 ml de solución isotónica de NaCl y tanto añadirse a 1000 ml de líquido de hipodermocclisis como inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente se producirá alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que está tratándose. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

Los anticuerpos de la invención pueden formularse dentro de una mezcla terapéutica para comprender aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, o aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, o aproximadamente 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis o así. También puede administrarse dosis múltiples. Además de los compuestos formulados para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración por vía oral; cápsulas de liberación con el tiempo; y cualquier otra forma actualmente usada.

En ciertas realizaciones, se contempla el uso de liposomas y/o nanopartículas para la introducción de anticuerpos en

células huésped. La formación y uso de liposomas y/o nanopartículas son conocidos para aquellos expertos en la materia.

Las nanocápsulas pueden generalmente atrapar compuestos de una forma estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debido a la sobrecarga polimérica intracelular, tales partículas ultrafinas (de tamaño aproximadamente 0,1 μm) se diseñan generalmente usando polímeros capaces de ser degradados *in vivo*. Nanopartículas de poli(cianoacrilato de alquilo) biodegradables que cumplen estos requisitos se contemplan para su uso en la presente invención, y tales partículas pueden ser fácilmente preparadas.

Se forman liposomas a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y espontáneamente forman vesículas bicapa concéntricas multilaminares (también llamadas vesículas multilaminares (MLV)). Las MLV tienen generalmente diámetros de 25 nm a 4 μm . La sonicación de MLV produce la formación de pequeñas vesículas unilaminares (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una solución acuosa en el núcleo. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

Método de producción de anticuerpos de la invención

Los anticuerpos de la invención pueden producirse por cualquier técnica conocida en la técnica, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, tanto sola como en combinación.

Conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la materia puede producir fácilmente dichos anticuerpos, por técnicas convencionales para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse usando el muy conocido método en fase sólida, preferentemente usando un aparato de síntesis de péptidos comercialmente disponible (tal como aquel fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Alternativamente, los anticuerpos de la invención pueden sintetizarse por técnicas de ADN recombinante muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden obtenerse como productos de expresión de ADN después de la incorporación de las secuencias de ADN que codifican los anticuerpos en vectores de expresión y la introducción de tales vectores en huéspedes eucariotas o procariotas adecuados que expresarán los anticuerpos deseados, a partir de los cuales pueden aislarse después usando técnicas muy conocidas.

En particular, la invención se refiere además a un método de producción de un anticuerpo de la invención, método que comprende las etapas que consiste en:

- (i) cultivar una célula huésped transformada según la invención en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho anticuerpo; y
- (ii) recuperar el anticuerpo expresado.

En otra realización particular, el método comprende las etapas de:

- (i) cultivar el hibridoma depositado como CNCM I-4179, o CNCM I-4180 en condiciones adecuadas para permitir la expresión del anticuerpo; y
- (ii) recuperar el anticuerpo expresado.

Los anticuerpos de la invención se separan adecuadamente del medio de cultivo por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tal como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

En una realización particular, el anticuerpo quimérico humano de la presente invención puede producirse obteniendo secuencias nucleicas que codifican el dominio VL y VH como se describen previamente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo quimérico humano insertándolas en un vector de expresión para la célula de animal que tiene genes que codifican CH de anticuerpo humano y CL de anticuerpo humano, y expresando la secuencia codificante introduciendo el vector de expresión en una célula de animal. Como dominio CH de un anticuerpo quimérico humano, puede ser cualquier región que pertenezca a la inmunoglobulina humana, pero aquellas de clase IgG son adecuadas y también puede usarse una cualquiera de las subclases que pertenecen a la clase IgG, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Por tanto, como CL de un anticuerpo quimérico humano, puede ser cualquier región que pertenezca a Ig, y pueden usarse aquellas de clase kappa o clase lambda. Métodos de producción de anticuerpos quiméricos implican ADN recombinante convencional y las técnicas de transfección génica son muy conocidas en la técnica (véanse los documentos de patente US5.202.238; y US5.204.244).

El anticuerpo humanizado de la presente invención puede producirse obteniendo secuencias de ácidos nucleicos que codifican dominios CDR, como se ha descrito previamente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo humanizado insertándolas en un vector de expresión para célula de animal que tiene genes que codifican (i) una región constante de la cadena pesada idéntica a la de un anticuerpo humano y (ii) una región constante de la cadena ligera idéntica a la de un anticuerpo humano, y expresando los genes introduciendo el vector de expresión en una célula de animal.

El vector de expresión de anticuerpo humanizado puede ser tanto de un tipo en el que un gen que codifica una cadena pesada del anticuerpo y un gen que codifica una cadena ligera del anticuerpo existen en vectores separados como de un tipo en el que ambos genes existen en el mismo vector (tipo tándem). Con respecto a la facilidad de construcción de un vector de expresión de anticuerpo humanizado, la facilidad de introducción en células de animales, y el equilibrio entre los niveles de expresión de las cadenas H y L de anticuerpo en células de animales, se prefiere el vector de expresión de anticuerpo humanizado de tipo tándem. Ejemplos de vector de expresión de anticuerpo humanizado de tipo tándem incluyen pKANTEX93 (documento WO 97/10354), pEE18 y similares.

Métodos de producción de anticuerpos humanizados basados en técnicas de ADN recombinante y de transfección génica convencionales son muy conocidos en la técnica. Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación PCT WO91/09967; patentes de EE.UU. N.º 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), inactivación o acondicionamiento superficial (documentos EP 592.106; EP 519.596) y barajado de cadenas (patente de EE.UU. N.º 5.565.332). La tecnología de ADN recombinante general para la preparación de tales anticuerpos también es conocida (véanse la solicitud de patente europea EP 125023 y la solicitud de patente internacional WO 96/02576).

Fab de la presente invención puede obtenerse tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con ICOS con una proteasa, papaína. Por tanto, Fab puede producirse insertando ADN que codifica Fab del anticuerpo en un vector para el sistema de expresión procariota, o para el sistema de expresión eucariota, e introduciendo el vector en un procariota o eucariota (según convenga) para expresar Fab.

F(ab')₂ de la presente invención puede obtenerse tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con ICOS con una proteasa, pepsina.

Por tanto, F(ab')₂ puede producirse uniendo Fab' descrito más adelante mediante un enlace tioéter o un enlace disulfuro.

Fab' de la presente invención puede obtenerse tratando F(ab')₂ que reacciona específicamente con ICOS humano con un agente reductor, ditiotreitól. Por tanto, Fab' puede producirse insertando ADN que codifica el fragmento Fab' del anticuerpo en un vector de expresión para procariota, o un vector de expresión para eucariota, e introduciendo el vector en un procariota o eucariota (según convenga) para realizar su expresión.

scFv de la presente invención puede producirse obteniendo ADNc que codifica los dominios VH y VL como se describió previamente, construyendo ADN que codifica scFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procariota, o un vector de expresión para eucariota, y entonces introduciendo el vector de expresión en un procariota o eucariota (según convenga) para expresar scFv. Para generar un fragmento scFv humanizado, puede usarse una tecnología muy conocida llamada injerto de CDR, que implica seleccionar las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un fragmento scFv de donante, e injertarlas en una región estructural del fragmento scFv humano de estructura tridimensional conocida (véanse, por ejemplo, los documentos WO98/45322; WO 87/02671; US5.859.205; US5.585.089; US4.816.567; EP0173494).

Se contemplan modificación (modificaciones) de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede desearse mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se sabe que cuando un anticuerpo humanizado se produce por injerto simple de solo CDR en VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano en FR de VH y VL de un anticuerpo humano, la actividad de unión al antígeno se reduce en comparación con la del anticuerpo original derivado de un animal no humano. Se considera que varios restos de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo no humano, no solo en CDR sino también en FR, están directamente o indirectamente asociados a la actividad de unión al antígeno. Por lo tanto, la sustitución de estos restos de aminoácidos con diferentes restos de aminoácidos derivados de FR de VH y VL del anticuerpo humano reduciría la actividad de unión.

Con el fin de resolver el problema, en anticuerpos injertados con CDR humanas, se han hecho intentos por identificar, entre las secuencias de aminoácidos de FR de VH y VL de anticuerpos humanos, un resto de aminoácido que esté directamente asociado a la unión al anticuerpo, o que interaccione con un resto de aminoácido de CDR, o que mantenga la estructura tridimensional del anticuerpo y que esté directamente asociado a la unión al antígeno. La reducida actividad de unión al antígeno podría aumentarse reemplazando los aminoácidos identificados con restos de aminoácidos del anticuerpo original derivado de un animal no humano.

Pueden hacerse modificaciones y cambios en la estructura de los anticuerpos de la presente invención, y en las secuencias de ADN que las codifican, y todavía obtener una molécula funcional que codifica un anticuerpo con características deseables. Al hacer cambios en las secuencias de aminoácidos, puede considerarse el índice hidropático del aminoácido. La importancia del índice hidropático del aminoácido en conferir función biológica interactiva en una proteína es generalmente entendida en la materia. Se acepta entonces que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos,

antígenos, y similares.

A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en su características de hidrofobia y de carga, éstos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Otra realización de la presente invención también engloba variantes conservativas de función de los anticuerpos de la presente invención.

"Variantes conservativas de función" son aquellas en las que un resto de aminoácido dado en una proteína o enzima ha sido cambiado sin alterar la conformación y función globales del polipéptido, que incluyen, pero no se limitan a, sustitución de un aminoácido con uno que tiene propiedades similares (tal como, por ejemplo, polaridad, potencial del enlace de hidrógeno, ácido, básico, hidrófobo, aromático, y similares).

Aminoácidos distintos de aquellos indicados como conservados pueden diferenciarse en una proteína de manera que el porcentaje de similitud de secuencias de proteínas o de aminoácidos entre cualesquiera dos proteínas de función similar pueda variar y pueda ser, por ejemplo, del 70 % al 99 % como se determina según un esquema de alineamiento tal como por el método de Cluster, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN.

Una "variante conservativa de función" también incluye un polipéptido que tiene al menos el 60 % de identidad de aminoácidos como se ha determinado por los algoritmos BLAST o FASTA, preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 85 %, todavía preferentemente al menos el 90 %, e incluso más preferentemente al menos el 95 %, y que tiene las mismas propiedades o funciones o sustancialmente similares a la proteína nativa o parental con la que se compara. Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando más del 80 %, preferentemente más del 85 %, preferentemente más del 90 % de los aminoácidos son idénticos, o más de aproximadamente el 90 %, preferentemente más del 95 %, son similares (funcionalmente idénticas) con respecto a la longitud completa de la secuencia más corta. Preferentemente, se identifican secuencias similares u homólogas por alineamiento usando, por ejemplo, el programa de compilación GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Versión 7, Madison, Wisconsin), o cualquiera de los algoritmos de comparación de secuencias tales como BLAST, FASTA, etc.

Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin pérdida de actividad apreciable. Como la capacidad interactiva y naturaleza de una proteína define la actividad funcional biológica de la proteína, pueden hacerse ciertas sustituciones de aminoácidos en una secuencia de proteínas, y, por supuesto, en su secuencia codificante de ADN, mientras que, sin embargo se obtiene una proteína con propiedades similares. Así se contempla que pueden hacerse diversos cambios en las secuencias de anticuerpos de la invención, o secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos anticuerpos, sin pérdida apreciable de su actividad biológica.

Se sabe en la técnica que ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos que tienen un índice hidropático o puntuación similar y todavía producen una proteína con actividad biológica similar, es decir, todavía obtienen una proteína biológica funcionalmente equivalente. Como se explica resumidamente anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente, por tanto, en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobia, hidrofilia, carga, tamaño, y similares.

Sustituciones a modo de ejemplo que tienen en consideración diversas de las anteriores características son muy conocidas para aquellos expertos en la materia e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina. Otro tipo de modificación de aminoácidos del anticuerpo de la invención puede ser útil para alterar el patrón de glucosilación original del anticuerpo.

Por "alterar" se indica delecionar uno o más restos de hidrato de carbono encontrados en el anticuerpo, y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glucosilación de anticuerpos normalmente está unida en N. "Unida en N" se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias de tripéptidos asparagina-X-serina y asparaginas-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido, excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un posible sitio de glucosilación. La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos anteriormente descritas (para sitios de glucosilación unidos en N). Otro tipo de modificación covalente implica acoplar químicamente o enzimáticamente glucósidos al anticuerpo. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren la producción del anticuerpo en una célula huésped que tenga capacidades de glucosilación para la glucosilación unida a N u O. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el (los) azúcar(es) puede unirse a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como aquellos de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como aquellos de serina, treonina o

hidroxiprolina, (e) restos aromáticos tales como aquellos de fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina. Por ejemplo, tales métodos se describen en el documento WO87/05330.

La eliminación de cualquier resto de hidrato de carbono presente en el anticuerpo puede llevarse a cabo químicamente o enzimáticamente. La desglucosilación química requiere la exposición del anticuerpo al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento produce la escisión de la mayoría o todos de los azúcares, excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras que deja el anticuerpo intacto.

La escisión enzimática de restos de hidrato de carbono en anticuerpos puede lograrse por el uso de una variedad de endo- y exo-glucosidasas.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende unir el anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, en la manera expuesta en las patentes de EE.UU. N.º 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337. También puede desearse modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo para potenciar la citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede lograrse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativamente o adicionalmente, el (los) resto(s) de cisteína puede(n) introducirse en la región Fc, permitiendo así la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener capacidad de internalización mejorada y/o elevada destrucción de células mediada por el complemento y/o citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) (Caron PC. et al. J Exp Med. 1992 Oct 1;176(4):1191-5 y Shopes B. J Immunol. 1992 May 1;148(9):2918-22).

Método de diagnóstico

La presente invención también se refiere a un método de diagnóstico de un elevado riesgo de recaída o muerte prematura en un paciente con cáncer de mama. De hecho, como se muestra en el Ejemplo 3, la presencia de un alto número de linfocitos Treg ICOS⁺ está asociada a progresión libre supervivencia o supervivencia global más baja para pacientes con cáncer de mama.

Así, la invención se refiere a un método de diagnóstico de un elevado riesgo de recaída o muerte prematura en un paciente con cáncer de mama, que comprende la etapa de cuantificar células Treg ICOS positivas (ICOS⁺) en una muestra de dicho paciente. Si dicho número es alto, por ejemplo superior a 1,7 células ICOS⁺/mancha si se usa el método del Ejemplo 3 y la Figura 9, entonces hay un elevado riesgo de recaída o muerte prematura en dicho paciente con cáncer de mama.

La invención también se refiere a un método de selección de pacientes susceptibles que están tratándose por inmunoterapia anti-ICOS, que comprende la etapa de cuantificar células Treg ICOS positivas en una muestra de dicho paciente. Dicha inmunoterapia puede ser anticuerpos anti-ICOS de la invención.

Dicha muestra puede proceder de una biopsia. Dicha cuantificación de células Treg ICOS⁺ puede realizarse gracias a anticuerpos anti-ICOS, especialmente gracias a uno cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente.

Tratamiento en el modelo de tumor mamario pre-clínico

Como se muestra en el Ejemplo 6, el tratamiento de un modelo murino establecido de tumor mamario con un anticuerpo anti-ICOS murino de rata neutralizante sustituto (17G9, IgG2b), reduce la progresión tumoral, reforzando el potencial de tratamiento con anticuerpos anti-ICOS neutralizantes de la invención para favorecer la regresión tumoral en la subpoblación de pacientes con alta detección de Treg ICOS⁺ en su tumor de mama primario.

La invención se ilustrará adicionalmente en vista de las siguientes figuras y ejemplo.

Descripción de las figuras

Figura 1: Ta-Treg expresan fuertemente ICOS, se co-localizan con Ta-pDC y proliferan *in situ* pero no proliferan *in vitro*.

A- Se tiñeron secciones congeladas de tumor con Ab anti-ICOS (verde) y Ab Ki67 (marrón) y Ab anti-murino secundario conjugado con HRP y se revelaron respectivamente con HistoGreen y DAB (aumentos 10x y 40x para el recuadro insertado)).

B- (Expresión de Ki67) Se analizó por citometría de flujo multicolor en Treg (CD4⁺CD127⁻CD25^{alto}) y Tconv (CD4⁺CD127⁺CD25^{bajo/-}) dentro de tumor primario (Ta-Treg, Ta-Tconv) o sangre emparejada (Treg, Tconv).

C- Treg y Tconv purificados de tanto tumor primario como sangre sana se cultivaron en una placa de fondo en U de 96 pocillos en presencia de 500 UI/ml de IL-2. El número de células se cuantificó cada 4 días por conteo.

D-F Se tiñeron secciones congeladas de tumor con Ab anti-CD3 (marrón) y se contratiñeron con hematoxilina (azul) (10x y 40x en el recuadro insertado) (D); Ab CD3 (verde) y BDCA2 (marrón) (20x y 40x en el recuadro insertado) (E); Ab FoxP3 (marrón) y BDCA2 (verde) (20x y 40x en el recuadro insertado) (F).

Figura 2: El bloqueo de ICOS e ICOS-L anula la secreción de IL-10 durante la activación mediada por pDC de linfocitos T sin interferir fuertemente en el co-cultivo de MoDC/T. Se co-cultivaron pDC purificadas y activadas con R848 o MoDC durante 5 días con linfocitos T CD4⁺ de memoria alógenos en presencia de Ab de Ctrl, anti-ICOS (314.8) o anti-ICOS-L (MIH12). En el día 5, se cuantificaron IL-10 e IFN γ por ELISA en sobrenadantes de co-cultivo de pDC/T (A) y co-cultivo de MoDC/T (B).

Figura 3: La co-estimulación de ICOS y CD3 favorece la proliferación de Treg y de Tconv, además de IL-10, pero no la secreción de IFN γ en presencia de IL-2 exógena.

A/B- Treg o Tconv clasificados por FACS producidos a partir de amígdala se cultivaron durante 5 días solos o con perlas recubiertas con mAb agonista CD3/IgG, CD3/88.2, CD3/CD28 en presencia de IL-2 (n=3). La proliferación se evaluó por incorporación de [³H]-timidina (A). Se midieron los niveles de IL-10 e IFN γ por ELISA en el sobrenadante de cultivo (B).

C- Linfocitos TaT CD4⁺ clasificados de tumor se cultivaron durante 5 días con perlas recubiertas con anti-CD3/IgG; anti-CD3/88.2 o anti-CD3/antiCD28 en presencia de IL-2 exógena (100 UI/ml). Las concentraciones de IL-10 e IFN γ en el sobrenadante se cuantificaron por ELISA.

Figura 4: La interacción de ICOS bloquea la IL-2 inducida por CD28 y, por consiguiente, reduce la proliferación y secreción de IFN γ

A- Linfocitos T de memoria CD4⁺ marcados con CFSE se cultivaron durante 5 días con las diferentes perlas solas o en presencia de concentración escalonada de rhIL-2 exógena (20 UI/ml y 100 UI/ml) y la proliferación se evaluó por dilución de CFSE por citometría de flujo.

B- IL-2 se detectó por ELISA después de 5 días cultivo con las diferentes perlas sin IL-2 exógena.

C- Linfocitos T de memoria CD4⁺ de sangre de donantes sanos se cultivaron durante 5 días con las diferentes perlas solas o en presencia de IL-2 exógena (100 UI/ml). Las secreciones de IL-10 e IFN γ se cuantificaron por ELISA.

Figura 5: Ausencia de expresión de ICOS-L en líneas celulares de tumor de mama y dilaceraciones de tumor de mama primario

A- Se evaluó la expresión de ICOS-L por citometría de flujo en suspensiones de líneas celulares epiteliales de tumor de mama recogidas en PBS-EDTA en ausencia de tripsina para evitar el deterioro de Ag.

B- Se evaluó la expresión de ICOS-L en células tumorales (células CD45-) después de 48 h de cultivo en presencia de Ab de control (línea discontinua) o Ab anti-ICOS (314.8) (línea continua).

Figura 6: El tratamiento de tumores mamarios Neu15 primarios con un Ab anti-ICOS anti-ratón de rata sustituto (17G9, IgG2b) ralentiza el crecimiento tumoral.

Figura 7:

A: Los números de linfocitos Treg son elevados dentro de cáncer de cuello uterino primario.

B: Los linfocitos Treg ICOS⁺ son elevados dentro de cáncer de cuello uterino primario.

Figura 8: Aumento de Treg que expresan ICOS en linfoma no Hodgkin (NHL)

HD Enfermedad de Hodgkin

FL Linfoma folicular

DLBCL Linfoma difuso de linfocitos B grandes

MCL Linfoma de células del manto

MZL Linfoma de la zona marginal

Figura 9: La presencia de linfocitos Treg ICOS⁺ dentro de tumores de mama primarios tiene un impacto negativo sobre la supervivencia

Se probaron 120 muestras de tumor primario incorporadas en parafina con seguimiento clínico de 10 años para su expresión de ICOS usando un Ab policlonal de conejo anti-ICOS comercial. La media de células ICOS⁺ se evaluó en seis manchas diferentes. Para realizar el análisis estadístico se usó la mediana como corte para tener grupos equilibrados.

Se muestra el impacto de la expresión de ICOS según la presencia de ICOS en el tumor primario sobre la supervivencia global (A) o progresión libre supervivencia (B).

EJEMPLO**EJEMPLO 1: Caracterización de los anticuerpos según la invención****5 MATERIAL Y MÉTODOS****I. Biología celular****1 - Selección / Purificación de células***** Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica**

Se aislaron CMSP (células mononucleares de sangre periférica) de trasplante de células madre periféricas de voluntarios sanos (Etablissement Français du sang, Marsella, Francia) por gradiente de Lymphoprep (Abcys). En tubos: se depositan 2 / 3 de sangre gota a gota sobre 1 / 3 de Lymphoprep y se centrifugan durante 20 minutos a 2000 rpm a 20 °C sin aceleración para no alterar el gradiente. Después de la centrifugación, las células mononucleares se recuperan y se lavan dos veces en PBS 1 % de FCS (suero de ternero fetal) + heparina durante 20 min a 1000 rpm a 20 °C.

Entonces, las células se usaron inmediatamente o se congelaron a -80 °C a 50.10⁶ células / ml en RPMI 1640, 50 % de FCS, 10 % de DMSO (sulfóxido de dimetilo). Después de 24 h, las células se transfieren a nitrógeno para la preservación.

***Selección negativa de CD4**

Se purificaron linfocitos T CD4⁺ de CMSP. Después de descongelarlas, las células se lavaron y se diluyeron en 40 µl de tampón de clasificación (PBS 0,5 % de BSA EDTA 2 mM) para 10.10⁶ células. Se usó el kit MACS human CD4 + T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec): se añaden 10 µl de una solución de anticuerpos monoclonales conjugados con biotina (marcado primario) y la mezcla se incubó durante 10 min a 4 °C con agitación.

Las células se ponen entonces en contacto con 20 µl de perlas magnéticas acopladas con anti-biotina (marcado secundario) durante 15 min a 4 °C con agitación. Después de lavar con clasificación de tampón, las células se clasificaron en Automacs (Miltenyi). Entonces se aísla la fracción negativa agotada en linfocitos T CD4 + marcados. Esto da una población de CD4⁺ puras de aproximadamente el 95 %.

2 - Activación y cultivo celular*** Pre-activación con perlas CD3 / CD28 y entonces estimulación con mAb**

Los linfocitos T CD4⁺ se ponen a la concentración de 10⁶ células / ml de RPMI, 10 % de FCS, en presencia de perlas CD3 / CD28 (Dynabeads, Invitrogen) (1 célula / 1 perla) y se incuban durante 48 h a 37 °C. Las células se separan entonces de las perlas con un imán y reposan en Dynal Biotech durante la noche en RPMI 10 % de FCS a una concentración de 10⁶ células/ml.

Por otra parte, los mAb anti-CD3 (OKT3), anti-ICOS (ICOS 88-2) y mAb de IgG1 de control (Sigma) se recubrieron sobre una placa plana de 96 pocillos durante la noche a 4 °C. Los pocillos se recubren con 50 ng/ml de anti-CD3 complementado con 20 µg/ml en otros mAb PBS 1 x 100 µl/pocillos. Al día siguiente, la placa se lava con PBS, se satura dos horas con PBS, 5 % de FCS (200 µl por pocillo). Los linfocitos T CD4⁺ con el CFSE previamente incorporado (véase abajo) se distribuyen sobre la placa recubierta a una tasa de 2105 células / 200 µl de medio / pocillo y se incuban durante 72 h a 37 °C. A las 48 h, los sobrenadantes se recogieron y a las 72 h las células se recogieron para analizar la proliferación por citometría de flujo (Figura 4).

*** Activación por APC artificiales**

Se lavaron perlas magnéticas (Dynabeads M-450 Epoxy, Invitrogen) en tampón fosfato de sodio 0,1 M y luego se incubaron con mAb anti-CD3 (OKT3) a una concentración inferior a la óptima de 1 mg/1.10⁷ perlas que representaba el 5 % de los mAb acoplados con las perlas, con los mAb anti-CD28 o ICOS (ICOS 88-2 o CD28.2), (2 µg / 1.10⁷ perlas, 10 %). Estas APC artificiales se incubaron con mAb con rotación lenta durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se realizan dos lavados en PBS 0,1% de BSA. Las APC artificiales se distribuyen sobre una perla para una célula en una placa redonda de 96 pocillos sobre la que se depositaron 2.10⁵ linfocitos T CD4⁺ / 200 µl por pocillo y entonces se incubaron durante 72 h a 37 °C. Los linfocitos T CD4⁺ han incorporado previamente el CFSE. A las 48 h, se recogieron sobrenadantes y a las 72 h las células se recogieron para analizar la proliferación por citometría de flujo.

3 - Proliferación celular

La proliferación de linfocitos va seguida de CFSE (diacetato de carboxifluoresceína-succinimidil éster) (Molecular Probes, Invitrogen). CFSE es permeable a las células y no fluorescente. Cuando entra en la célula, las esterasas escinden los grupos acetato que llegan a ser fluorescentes mientras que la célula llega a ser impermeable.

La característica de CFSE es la de ser compartido equitativamente en cada célula recién formada en cada división. Emite en la radiación verde, que permite el análisis simultáneo del número, posición y la etapa de diferenciación de las células, siendo la intensidad de fluorescencia por célula proporcional a la concentración de CFSE. Para marcar las células con CFSE, la suspensión de células se diluye en 1X PBS frío. Añadir CFSE: 5 μ M a $10 \cdot 10^6$ células. Las células se ponen entonces en un baño de agua a 37 °C.

Después de 8 a 10 minutos de agitación, las células se dispusieron rápidamente sobre hielo para detener la reacción. Las células se centrifugan entonces dos veces con 2 ml de PBS 1X. Finalmente, se recogen en el volumen deseado de RPMI 10 % de FCS para cultivo. La proliferación se determina gracias a citometría de flujo.

II - Citometría de flujo

Se diluyen células CD4+ con 30 % de BSA PBS (50 μ l/pocillo) en una placa de 96 pocillos durante 10 minutos a 4 °C para saturar sitios no específicos. Entonces se incuban durante 30 minutos a 4 °C en la oscuridad, con los anticuerpos deseados acoplados a un fluorocromo.

Después de dos lavados en PBS 1 X 1 % de BSA 0,02 % de azida (centrifugación 2100 rpm, 3 min a 4 °C), las células se fijaron en 200 μ l de PBS 2 % de formaldehído y se dispusieron en un citómetro de flujo (FACS Canto, BD Biosciences). Los resultados se analizan gracias al software FlowJo.

III - ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción)

Se recogen sobrenadantes de cultivo de linfocitos T CD4+ a las 48 h y se guardan a -20 °C para un ensayo en IL-10, IFN γ y TNF α .

RESULTADOS

1- Caracterización de mAb anti-ICOS

Los inventores desarrollaron 5 Ab anti-ICOS. Su isotipo se ensayó por ELISA. Para obtener un análisis indirecto de su afinidad por su receptor, los mAb se probaron usando transfectantes estables que expresaban ICOS. Células JICOS.1 estuvieron en presencia de un intervalo cada vez mayor de mAb anti-ICOS marcados con una sonda acoplada a un fluorocromo (PE-GAM: anti-ratón-PE de cabra) y el análisis se hizo gracias a flujo de citometría.

Así, fue posible determinar la DE50, es decir, la concentración de mAb que satura el 50 % de los sitios. Los mAb con la DE50 más baja son aquellos con la afinidad aparente más alta.

Entonces, los inventores probaron la capacidad de mAb anti-ICOS para inhibir la unión de ICOS-L (una forma recombinante de dominio Fc de IgG1 humana) llevado por la célula JICOS.1.

Usaron un gradiente de concentración de mAb anti-ICOS y revelaron la fijación a Fc de ICOS L gracias a una sonda acoplada a un fluorocromo (GAH-PE: anti-PE humano de cabra). El análisis se hizo por citometría de flujo. Los inventores determinaron así la DI50, es decir, la dosis que inhibe el 50 % de la unión de ICOS L-Fc sobre ICOS.

Cuanto más pequeña sea DI50, más mAb compite fácilmente con Fc de ICOS recombinante.

Los inventores demostraron así que ICOS R 314-8 e ICOS R 53-3 tienen una alta afinidad por su sitio de unión (DE 50 <0,5 μ g/ml) y un potencial de bloqueo significativo (DI50 <1 mg/ml).

El anticuerpo ICOS R 314-8 se eligió, por tanto, para acoplarse al fluorocromo Alexa Fluor 647 y se usó en análisis de citometría de flujo.

2 - Los mAb anti-ICOS se diferencian en su capacidad para inducir la producción de IL-10 por linfocito T CD4+ activado

Los inventores probaron la capacidad de los mAb para actuar de agonistas de anticuerpo, es decir, de ser capaces de tener la misma acción que el ligando natural de ICOS, usando pruebas funcionales. El parámetro estudiado fue la secreción de IL-10, ya que ICOS induce la producción de IL-10 por LT.

Se probó el potencial agonista de los mAb anti-ICOS sobre linfocitos T CD4⁺, que se pre-activaron con perlas CD3/CD28 durante 48 h y se distribuyeron sobre una placa donde el mAb anti-CD3 se recubrió para continuar la estimulación junto con los diversos mAb anti-ICOS.

- 5 Los sobrenadantes de cultivo se ensayaron entonces durante 48 h para IL-10 y se comparó la secreción de IL-10 inducida por los diferentes mAb anti-ICOS basándose en la secreción de IL-110 inducida por un mAb anti-ICOS comercialmente disponible (ICOS c)

- 10 Los mAb anti-ICOS 53-3, 88-2 y 92-17 aumentaron significativamente la secreción por IL-10 de CD4⁺ y así son anticuerpos agonistas. En relación con los mAb anti-ICOS 145-1 y 314-8, no se detectó aumento significativo en la producción de IL-10.

- 15 Los inventores mostraron finalmente que los mAb anti-ICOS 53-3, 88-2 y 92-17 son mejores agonistas que los anti-ICOS comercialmente disponibles. De hecho, si uno considera el mAb anti-ICOS comercialmente disponible como referencia, el mAb anti-ICOS 88-2 produce elevada secreción de IL-10 de + 61 %, mAb anti-ICOS 92-17 de + 20 % y mAb anti-ICOS 53-3 de + 14 %.

Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

mAb	Isotipo	[DE] 50 (µg/ml)	[DI] 50 (µg/ml)	Efecto agonista
ICOS 88-2	IgG1- L	1,60	17	+++
ICOS 314-8	IgG1- K	0,06	0,29	-

20

EJEMPLO 2: Uso de un "anticuerpo antagonista de la invención y un anticuerpo agonista de la invención

MATERIAL Y MÉTODOS

Inmunohistoquímica

- 30 Se tiñeron secciones de tumor de mama primario congelado con anti-FOXP3 de ratón, o anti-Ki67 y se revelaron usando el kit de peroxidasa de anti-Ig de ratón ImmPRESS (Abcys, París, Francia) según las instrucciones del proveedor y DAB. Entonces, se añadió el segundo anticuerpo primario (anti-ICOS de ratón (53.3), anti-CD3, anti-BDCA2 y se reveló con el kit ImmPRESS kit e HistoGreen (Abcys). La especificidad de la tinción se evaluó usando controles de isotipo de ratón en lugar del primer o el segundo anticuerpo primario.

Purificación de células mononucleares de tumores de mama, amígdalas y sangre sana

- 35 Se purificaron células mononucleares (CMN), de sangre periférica sana obtenida de EFS o de dilaceración enzimática de tumores de mama primarios o muestras de amígdalas, por centrifugación en gradiente de densidad Ficoll.

Análisis fenotípico de subconjuntos de pDC y linfocitos T

- 40 Para el amplio análisis fenotípico, se identificaron pDC entre las CMN totales como células CD4⁺CD123⁺ usando FITC o PE anti-CD 123 y PE-Cy5 anti-CD4 y anticuerpos acoplados a PE contra CD40, CD86 o ICOSL. Los linfocitos T se identificaron como células CD3⁺CD4⁺. Se identificaron Treg tanto por el fenotipo multi-color CD4⁺CD127⁻CD25^{alto} como para su expresión de FoxP3 después de seleccionarse en linfocitos T CD3⁺CD4⁺.

- 45 La proliferación de Ta-Treg y Ta-Tconv o su homólogo de sangre se evaluó por análisis multicolor permitiendo la caracterización de Treg CD4⁺ (CD127⁻CD25^{alto}) y Tconv (CD4⁺CD127⁺CD25^{Bajo/-}) asociada a tinción de Ab Ki67.

- 50 El análisis de citometría de flujo se realizó en un FACScan (BD Biosciences) o un ADP Cyan (Beckman Coulter) y los datos se analizaron con el software Cell Quest Pro (BD Biosciences) o FlowJo (Treestar).

Purificación de pDC

- 55 Se purificaron pDC de CMN enriquecidos linaje (Lin)-negativo por tanto clasificación de células activadas magnéticamente usando el kit de microperlas CD304/BDCA-4 o agotamiento negativo usando el kit de aislamiento de pDC (Miltenyi Biotec)) como por clasificación con FACS® (citómetro de flujo FACSVantage SE™ DiVa, BD Biosciences) como células Lin⁻CD4⁺CD11c⁻. La pureza fue rutinariamente >98 %.

Generación in vitro de DC derivadas de monocitos (MoDC)

- 60 Se obtuvieron MoDC de monocitos purificados de sangre después de 7 días de diferenciación en GM-CSF (100 ng/ml) + IL-4 (50 UI/ml) (Schering Plough, Kenilworth EE.UU.).

Purificación de linfocitos T de memoria CD4⁺ y Treg

Se obtuvieron linfocitos T CD4⁺ de memoria (>95 % de pureza) a partir de CMN después del agotamiento magnético que incluye Ab anti-CD45RA, como se describió (Gobert et al, 2009). Treg CD4⁺CD25^{alto}CD127⁻ y linfocitos T CD4⁺ convencionales CD4⁺CD25⁻CD127^{bajo/+} se clasificaron por FACS® a partir de linfocitos T CD4⁺ de memoria purificados (pureza >98%).

Para seguir su proliferación *in vitro*, se tiñeron linfocitos T CD4⁺ de memoria purificados en el día 0 con CFSE. Se seleccionaron células viables por exclusión con DAPI o reactivo Live and Dead en caso de permeabilización celular (se seleccionaron 200.000 y 5.000 eventos mínimos en la población de células totales y en células purificadas, respectivamente).

Co-cultivos de DC-linfocitos T

Se cultivaron linfocitos T CD4⁺ de memoria alógenos, linfocitos Treg o Tconv CD4⁺ a 3 x 10⁴ a 5 x 10⁴ células en medio completo con IL-2 (100 UI/ml) y TApDC altamente purificadas, pDC sanas o MoDC que se pre-activaron durante 24 h con IL-3, GM-CSF (10 ng/ml) en presencia de R848. La adición de linfocitos T en subconjuntos de DC pre-activadas se hizo por triplicado en placas de fondo redondo de 96 pocillos a una relación de 1:5 (DC/linfocitos T) y se co-cultivaron durante 5 días. La proliferación se evaluó tanto por dilución de CFSE en experimentos que analizan la expresión de FoxP3 como por síntesis de ADN analizado por captación de ³H-TdR.

El impacto de la interacción de ICOS/ICOSL se evaluó mediante la adición de Ab de ctrl, Ab anti-ICOS comercial (ISA-3) o patentado (314.8) o anti-ICOSL (MIH12) en los cultivos. Para evaluar la secreción de citocinas por linfocitos T por ELISA, las células se co-cultivaron con pDC o TApDC, y los sobrenadantes se recogieron en el día 5, se centrifugaron y se guardaron a -20 °C.

Estimulación de Tconv y Treg con perlas artificiales

Se produjeron APC artificiales como se describió en el Ejemplo 1. Se cultivaron Treg (3x10⁴) o Tconv (1x10⁵) clasificados de amígdala o linfocitos Ta-T CD4⁺ (1x10⁵) purificados de tumores durante 5 días con perlas artificiales a una relación 1:1 (APC artificial: linfocito T) en presencia de IL-2 (100 UI/ml) en 96 pocillos de fondo en U bajo 200 µl. La proliferación se evaluó tanto por dilución de CFSE como por análisis de ADN analizado por captación de ³H-TdR.

Detección de citocinas en sobrenadantes de cultivos de linfocitos T por ELISA

Se cuantificaron por ELISA IL-10, IFNγ e IL-2 en sobrenadantes de cultivo de 5 días usando kits comerciales de Bender Medsystems según las instrucciones del fabricante.

RESULTADO

Los datos presentados a continuación pretenden analizar el impacto de dos anticuerpos contra ICOS (es decir, mAb de bloqueo 314.8; mAb agonista 88.2) desarrollados por los inventores con el fin de validar

- i) el bloqueo de ICOS por el mAb antagonista 314.8 como un nuevo fármaco candidato prometedor para suprimir la respuesta inmunosupresora observada en cáncer de mama; y
- ii) la interacción de ICOS por el mAb agonista 88.2 en linfocitos T CD4⁺ para favorecer la amplificación de Treg que sería de interés en el campo de la autoinmunidad.

Ta-Treg que expresan altamente ICOS están presentes dentro de agregados linfoides en tumores de mama primarios y proliferan in situ

Los inventores han demostrado previamente la presencia de linfocitos T reguladores asociados a tumor (Ta-Treg) que expresan CD25^{alto} y FoxP3 en tumores de mama primarios dentro de agregados linfoides que se correlacionan con un mal pronóstico y riesgo elevado de metástasis (Gobert et al., 2009). Estos Ta-Treg representan del 15 % al 25 % de linfocitos TaT CD4⁺ totales, son altamente activados ya que expresan ICOS, CD39, GITR y HLA-DR y suprimen la proliferación de Ta Tconv y la secreción de citocinas (IL-2, IFNγ).

Estos Ta-Treg proliferan dentro del entorno del tumor de mama primario *in situ* (Gobert et al., 2009) como se demuestra por tanto la presencia de Ki67 que co-expresa Treg ICOS⁺ en secciones congeladas de tumor (Figura 1A) como la proporción más alta de células K167⁺ dentro de Ta-Treg purificado y Treg de sangre (respectivamente 8 % y 4 %) en comparación con Ta-Tconv y Tconv (3 % y 0,3 % respectivamente) (Figura 1B).

A diferencia de estos resultados *in vivo*, los inventores demostraron que la estimulación *in vitro* de Ta-Treg purificados con perlas expandidas (perlas recubiertas con anti-CD3 y anti-CD28 agonistas) no es capaz de favorecer la amplificación de Ta-Treg a diferencia de la observada con Ta-Tconv purificados o Treg o Tconv purificados de

sangre de donantes sanos (Figura 1C).

Los inventores supusieron entonces que la interacción de ICOS era esencial para la proliferación y funciones de Ta-Treg.

A) Uso de un "anticuerpo antagonista de la invención"

Bloqueo de la interacción ICOS/ICOS-L mediante el mAb antagonista para ICOS (314.8) Ta-Treg interaccionan in situ con Ta-pDC dentro de agregados linfoides en carcinoma de mama primario

Varios estudios informaron de la expresión de ICOS-L, el ligando específico de ICOS, en pDC (Janke et al., 2006). Usando inmunohistoquímica en secciones congeladas de tumor, los inventores observaron que linfocitos T Ta-CD3⁺ presentes dentro de los agregados linfoides que rodean el tumor están en interacción con Ta-pDC BDCA2⁺ (Figura 1D y 1E). Una tinción doble con Ab para FoxP3 y BDCA2 reveló que Ta-Treg están en estrecho contacto con Ta-pDC en estos agregados linfoides, sugiriendo que esta interacción favorecerá la interacción de ICOS por ICOS-L en tumores (Figura 1F).

Ta-pDC se activan pero no expresaron ICOS-L como posible consecuencia de la interacción de ICOS/ICOS-L in situ

Después de la purificación de la desagregación tumoral, Ta-pDC muestran un fenotipo activado ya que expresan de forma regulada por incremento niveles de CD86 y CD40 en comparación con pDC de sangre sana y de sangre de pacientes correspondientes. Como se informó por varios grupos (Ito et al., 2007; Janke et al., 2006), pDC de sangre sana recién aislada expresan bajos niveles de ICOS-L, que es fuertemente no regulado después de la exposición de IL-3 o ligación TLR7/8, que no se observa en otros subconjuntos de DC (mDC, MoDC). De forma interesante, contrastando con su estado activado (CD86⁺CD40⁺), Ta-pDC carecen de expresión de ICOS-L de membrana. A diferencia, las pDC de sangre de pacientes emparejados recién aislada o pDC de sangre sana expresan ICOS-L. Después de un periodo de cultivo de 24 h en IL-3 o tras la ligación TLR7/8, Ta-pDC clasificados readquieren una fuerte expresión de ICOS-L demostrando su capacidad para modular esta expresión de ICOS-L (datos no mostrados). Entre los linfocitos CD3⁺ TaT, ICOS se expresa fuertemente en Ta-Treg (69,9 % MFI: 361) a diferencia de TaTconv (23 % MFI: 83) o TaCD8⁺ (2 % MFI: 50). Estos resultados indican que *in situ* la interacción ICOS/ICOS-L conduce a la regulación de ICOS-L por disminución en la membrana de Ta-pDC.

El bloqueo de la interacción ICOS/ICOS-L mediante mAb antagonista anti-ICOS (314.8) suprime la regulación por disminución de ICOS-L en pDC

Para probar esta hipótesis, linfocitos T de sangre sana se cultivaron con pDC activadas por TLR7 purificadas de amígdala. Los inventores observaron después del periodo de cultivo de 24 h con elevada relación T:pDC una regulación por disminución de ICOS-L dependiente de la dosis en pDC. De forma interesante, la adición del mAb agonista de los presentes inventores contra ICOS (314.8) anula totalmente esta regulación por disminución de ICOS-L en pDC, resultado que no se reproduce usando anticuerpo anti-ICOS comercial (ISA-3) (datos no mostrados).

Los resultados demuestran interacciones Ta-pDC y Ta-Treg mediante ICOS/ICOS-L e indican que la ligación de ICOS podría estar implicada en la activación y proliferación de Ta-Treg.

Co-cultivo de linfocitos T CD4⁺, además de Treg purificados con pDC activadas, pero no proliferación de Treg inducidos por MoDC que se bloquean con 314.8

Para probar la capacidad de interacciones ICOS/ICOS-L para inducir la amplificación de Treg, los inventores cultivaron linfocitos T CD4⁺ de memoria total con pDC activadas por TLR7/8 (R848) alógenas purificadas de sangre sana o mDC. Entre los linfocitos T CD4⁺ purificados, el 3,5 % expresaron FoxP3 (datos no mostrados). Después de 5 días de co-cultivo con pDC, la proporción de células que expresan FoxP3, correspondiente a Treg, asciende al 12,3 % y la adición del Ab 314.8 bloquea el 80 % de este enriquecimiento en células FoxP3^{alto}. A diferencia, el co-cultivo de linfocitos T CD4⁺ con mDC activadas no fue capaz de favorecer una subpoblación de FoxP3^{alto} distinta entre linfocitos T CD4⁺, y la adición de 314.8 no tiene efecto significativo (6,3 % al 8 %).

Se obtuvieron resultados similares con linfocitos T CD4⁺ purificados de tumor. Ta-Treg Foxp3⁺ representan el 9 % de los linfocitos TaT CD4⁺ recién purificados (datos no mostrados). Su co-cultivo con pDC activadas con R848 aumenta la proporción de Ta-Treg al 14,5 %, mientras que la adición de 314.8 conduce a una disminución de la proporción de Ta-Treg al 4,5 %, por debajo del nivel inicial.

Poblaciones de Treg o Tconv purificadas clasificadas por FACS teñidas con CFSE se cultivaron con pDC activadas con R848 o MoDC activadas con LPS para analizar su capacidad de proliferación por citometría de flujo (dilución de expresión de CFSE). Primero, los inventores observaron que en ausencia de IL-2 exógeno, que MoDC activadas no inducen la proliferación de Treg purificados, mientras que Tconv proliferan fuertemente. A diferencia, el co-cultivo con pDC activadas es capaz de inducir una fuerte proliferación de tanto Treg como Tconv purificados.

La adición de mAb anti-ICOS 314.8 reduce fuertemente la proliferación Treg y de Tconv cuando se usan pDC como APC mientras que la proliferación de Tconv no varía en co-cultivos con MoDC. En este experimento, el bloqueo de ICOS o ICOS-L con anticuerpos comerciales (mAb ISA-3 o mAb MIH-12) no afecta ni la proliferación de Treg ni de Tconv en co-cultivos pDC/T.

Estos datos demuestran que el mAb anti-ICOS 314.8 neutraliza la interacción de ICOS en Treg y anula su expansión inducida por pDC.

El bloqueo de ICOS y ICOS-L anula las secreciones de IL-10 durante la activación de linfocitos T mediada por pDC sin interferir fuertemente en co-cultivo de MoDC/T.

El mAb 314.8 también reduce la proliferación de Tconv en respuesta a la estimulación de pDC activadas. Los inventores determinaron el impacto de 314.8 sobre la secreción de IFN γ e IL-10 por ELISA durante Tconv y pDC alógenas activadas por R848 (Figura 2A) o y co-cultivos de MoDC activadas por LPS (Figura 2B). En estos entornos, la secreción de IL-10 se anula totalmente por el mAb 314.8 (217 +/- 31 pg/ml en control y 13 +/- 6 pg/ml con 314.8). Mientras que la secreción de IFN γ se reduce ligeramente tras la adición de mAb 314.8 en co-cultivos con pDC (32 % de reducción 507 +/- 53 pg/ml en condición de control y 341 +/- 73 pg/ml con 314.8) (Figura 2A). En co-cultivos de Tconv/MoDC la inhibición de ICOS conduce a secreciones ligeramente elevadas de IL-10 e IFN γ (Figura 2B).

B) Uso de un anticuerpo agonista según la invención

Uso del mAb agonista anti-ICOS (88.2) para imitar la interacción de ICOS

Para perfeccionar su entendimiento sobre las funciones de ICOS en Treg y Tconv, los inventores generaron un modelo de APC artificiales usando perlas recubiertas con mAb agonistas que conducían a la señalización de CD3 (OKT3); CD28 (CD28.2) y/o ICOS (88.2, Tabla 1) en linfocitos T purificados.

La interacción de ICOS con un mAb agonista (88.2) en Treg indujo su proliferación y su capacidad para secretar altas cantidades de IL-10

Primero, los inventores observaron que Treg de donantes sanos proliferan en respuesta a perlas anti-CD3/88.2 en presencia de IL-2 exógena (Figura 3A). Como se informó previamente (Simpson et al., 2010; Ito et al., 2008) tras la activación mediante TCR y la interacción de ICOS en presencia de IL-2, tanto subpoblaciones de Tconv como de Treg purificadas secretan altas cantidades de IL-10 (311 +/- 22 pg/ml y 426 +/- 48 pg/ml, respectivamente) y bajos niveles de IFN γ (205 +/- 8 pg/ml y 381 +/- 12 pg/ml). Este resultado contrasta con datos obtenidos usando las perlas anti-CD3/anti-CD28. En este modelo, Tconv secretan grandes cantidades de IFN γ (1213 +/- 72 pg/ml) y bajos niveles de IL-10 (69 +/- 58 pg/ml) mientras que Treg secretan IL-10 y bajos niveles de IFN γ (422 +/- 36 pg/ml y 305 +/- 31 pg/ml, respectivamente) (Figura 3B).

Experimentos similares con linfocitos T purificados de tumor demostraron que linfocitos TaT CD4⁺ producen niveles similares de IL-10 en respuesta a ICOS y CD28 mientras que los niveles de IFN γ son más débiles en respuesta a ICOS en comparación con la interacción de CD28 (Figura 3C).

La interacción de ICOS bloquea la IL-2 inducida por CD28 y por consiguiente reduce la proliferación y secreción de IFN γ

Mientras que los linfocitos T de memoria CD4⁺ proliferan en respuesta a la estimulación anti-CD3/anti-CD28 independientemente de IL-2 exógena, no se observa proliferación en respuesta a la estimulación anti-CD3/88.2 (Figura 4A). La adición de hIL-2 rescata esta proliferación en un modo dependiente de la dosis. De forma interesante, la co-interacción de ICOS y CD28 en ausencia de IL-2 reduce significativamente la proliferación de linfocitos T de memoria CD4⁺ en comparación con solo la interacción de CD28, y esto es completamente rescatado en presencia de 100 UI/ml de IL-2. De forma interesante, la ligación de ICOS mediante mAb 88.2 anula la secreción de IL-2 detectada con estimulación de anti-CD3/anti-CD28 (Figura 4B). Tomados conjuntamente, esto argumenta en favor de una secreción de IL-2 espontánea reducida cuando ICOS y CD28 co-interaccionan en comparación con la interacción única de CD28, sugiriendo una función inhibidora de ICOS en la secreción de IL-2 inducida por CD28.

Además, incluso en presencia de IL-2 exógena, los inventores observaron una reducción del 50 % de IFN γ producida por Tconv, cuando ICOS y CD28 son provocados en comparación con perlas anti-CD3/anti-CD28 (Figura 4C).

A diferencia, mientras que la secreción de IL-10 es estrictamente dependiente de IL-2 cuando las células se activan bajo provocación de ICOS, como se describe previamente (Ito 2008, Paulos 2010), la adición de señal de ICOS no afecta la secreción de IL-10 inducida por anti-CD3/anti-CD28 (Figura 4C).

Todos juntos, estos resultados demuestran que la ligación de ICOS redujo la capacidad de anti-CD3/anti-CD28 para favorecer la polarización de Th1 (mediante la reducida producción de IFN γ), pero mantiene la producción de IL-10

favoreciendo el desarrollo de un entorno inmunosupresor.

La interacción de ICOS mediante mAb 88.2 aumentó la función supresora de Treg

Para evaluar que la interacción de ICOS puede asociarse a una respuesta de linfocitos T inmunosupresores, los inventores establecieron ensayos de supresión en ausencia de IL-2 exógena para comparar la eficiencia de perlas anti-CD3/anti-CD28/IgG y anti-CD3/anti-CD28/88.2. La adición de la señalización de ICOS (88.2) aumenta fuertemente la función supresora de Treg en comparación con anti-CD3/anti-CD28/IgG1 (51 % de inhibición en la condición un Treg para 4 Tconv anti-CD3/anti-CD28/88.2 en comparación con 21 % de inhibición con anti-CD3/anti-CD28/IgG). En conjunto, estos resultados demuestran que la interacción de ICOS favorece una respuesta de linfocitos T inmunosupresores que podría resultar tanto de una elevada sensibilidad de Tconv a la supresión como de una capacidad supresora de Treg más fuerte.

EJEMPLO 3: Análisis del impacto pronóstico de la detección de linfocitos ICOS⁺ Treg dentro de tumores de mama primarios

Se probaron 120 muestras de tumor primario incorporado en parafina con seguimiento clínico de 10 años para su expresión de ICOS usando un Ab policlonal de conejo anti-ICOS comercial (Spring Biosciences). Se cuantificaron células ICOS⁺ en cegado doble en 6 duplicados diferentes para cada tumor y la media de los resultados se compiló (datos no mostrados). Para realizar el análisis estadístico los inventores usaron la mediana como valor de corte para tener grupos equilibrados.

En el análisis unifactorial los inventores demuestran que la presencia de células ICOS⁺ (>1,66 células ICOS⁺ / mancha) se correlacionó con alto grado de tumor (p=0,007), la expresión del receptor de estrógenos por células tumorales (p=0,018), subtipos moleculares A/B luminales (p<0,001) y ausencia de la expresión en exceso de Her2/neu (p=0,035).

Se investigó el impacto de la detección de células ICOS⁺ dentro de tumores de mama primarios sobre la supervivencia global (OS) o progresión libre supervivencia (PFS).

Aunque se observaron 6/59 muertes en el grupo ICOS⁻, 14/61 pacientes fallecieron en ICOS⁺ demostrando el valor pronóstico significativo de la detección de ICOS⁺ en OS (valor de p de la prueba del orden logarítmico = 0,0465) (**Figura 9A**). Análisis similares realizados en PFS demostraron que las células ICOS⁺ se asociaron a una peor supervivencia global, con progresión en 11/59 en el grupo de ICOS⁻, mientras que 20/61 pacientes progresaron en el grupo de ICOS⁺ (p=0,0285) (**Figura 9B**).

EJEMPLO 4: Confirmación de la existencia de interacción *in situ* de pDC con Treg ICOS⁺ en el entorno del tumor

Co-cultivo *ex vivo* de dilaceraciones de células tumorales en presencia de mAb anti-ICOS 314.8 o Ab de Ctrl durante 48 h en presencia de IL-3 (20 ng/ml). Al final del periodo de cultivo, la expresión de ICOS-L en pDC se observa solo en presencia del mAb anti-ICOS 314.8 y no con Ab de control, demostrando entonces que la regulación por disminución de ICOS-L en pDC está mediada por una interacción con células ICOS⁺ (datos no mostrados).

EJEMPLO 5: Células de tumor de mama epiteliales de tanto líneas celulares establecidas como muestras tumorales frescas no expresan ICOS-L, a diferencia de células tumorales de melanoma o glioma incluso después del cultivo *ex vivo* con el anticuerpo anti-ICOS 314.8

Se recogieron líneas de células tumorales epiteliales de mama en PBS-EDTA para prevenir la degradación asociada a tripsina de Ag y las células se tiñeron con anticuerpo anti-ICOS-L para evaluar la expresión en la superficie celular por citometría de flujo. Ninguna de las líneas celulares probadas fue positiva para ICOS-L (**Figura 5A**). Se realizaron análisis similares en desagregaciones de tumor primario cultivadas 48 h en presencia de Ab anti-ICOS (314.8) o Ab de control más IL-3 (20 ng/ml) (**Figura 5B**).

EJEMPLO 6: Impacto de un Ab anti-ICOS anti-ratón de rata sustituto (17G9, IgG2b) en el crecimiento de tumor mamario en un modelo de tumor mamario singénico

Se obtuvo modelo de tumor mamario de ratón en ratones FVB hembra 28-35 días después de la inyección ortotópica de la línea celular Neu 15. Los tumores generados parecen estar significativamente infiltrados por Ta-pDC activados, TATreg ICOSalto y TATconv en reposo.

La inyección del anticuerpo 17G9 (50 µg/ml) por vía intraperitoneal tres veces a la semana desde el día 11 después de la implantación del tumor produce un tamaño de tumor Neu15 reducido en momentos de tiempo tardíos en comparación con la inyección de Ab de control (LTF2, IgG2b) (p=0,053) (**Figura 6**).

EJEMPLO 7: A: Los números de células Treg son elevados dentro de cáncer de cuello uterino primario

Se obtuvieron muestras cervicales de pacientes tanto con displasia (CIN2/3, n=18) como cáncer (n=14). Se usó tejido cervical normal como control (n= 11). Se obtuvieron muestras por tanto disociaciones enzimáticas como físicas. Después de lavar, las células mononucleares se incubaron con mAb marcados y los Treg enumerados como linfocitos T CD127^{bajo}CD25^{brillante}CD4⁺. Se representa el porcentaje de Treg dentro del subconjunto de CD4⁺. Treg aumentó dentro de las muestras de cáncer de cuello uterino en comparación con tejido normal y displasia. Por lo tanto, este aumento está asociado al desarrollo de cáncer (**Figura 7A**).

B: Las células Treg ICOS⁺ son elevadas dentro de cáncer de cuello uterino primario.

Se obtuvieron muestras cervicales de pacientes tanto con displasia (CIN2/3, n=5) como cáncer (n=12). Se usó tejido cervical normal como control (n= 5). Las muestras se obtuvieron por tanto disociación enzimática como física. Después de lavar células mononucleares, se incubaron con mAb marcados usando los mAb para ICOS y Treg enumerados. Se representa el porcentaje de Treg ICOS dentro del subconjunto de CD4⁺. Treg ICOS⁺ están presentes dentro de tejidos con solo una tendencia a su aumento en cáncer de cuello uterino debido a los números limitados de muestras analizadas (**Figura 7B**).

EJEMPLO 8: Aumento de ICOS que expresa Treg en linfoma no Hodgkin (NHL)

Los inventores han analizado los números de Treg y la expresión de ICOS en Treg en muestras LNH. Se recogieron células de linfoma fresco provocadas de ganglios linfáticos de 45 pacientes con consentimiento informado. Las muestras de linfoma se corresponden con enfermedad Hodgkin (HD, n= 11), linfoma folicular (FL, n=13), linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL, n=10), linfoma de células del manto (MCL, n=5) y linfoma de la zona marginal (MZL, n= 6). La detección de linfocitos Treg se realizó por incubación durante 20 min a 4 °C con anti-ICOS-PE (Becton Dickinson™), anti-CD3-ECD, anti-CD4-Pacific Blue (Beckman Coulter®), anti-CD127 FITC, anti-CD25 APC-Cy7 y el kit LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain (Invitrogen™). Después de la tinción, cada preparación de células se lavó dos veces en PBS, se fijó con 2 % de paraformaldehído y se analizó en un citómetro de flujo FACS LSR2 (Becton Dickinson™). Los datos se analizaron usando el software FlowJo (TreeStar™). Treg aumentaron en todas las muestras de linfoma, excepto HD. La mayoría de los Treg presentaron una elevada expresión de ICOS en comparación con ganglios linfáticos de control (**Figura 8**).

EJEMPLO 9: Secuenciación de Icos 314.8 (CNCM I-4180)

Se extrajo ARN total de células de hibridoma congeladas proporcionadas y se sintetizó ADNc. Entonces, se realizó RT-PCR para amplificar las regiones variables (cadenas pesadas y ligeras) del mAb. Las regiones variables de mAb de las cadenas pesadas y ligeras se clonaron en un vector de clonación por separado, luego las secuencias obtenidas se analizaron para deducir las secuencias del mAb.

Materiales

Células de hibridoma ICOS 314.8 (CNCM I-4180); TRIzol® Plus RNA Purification System (Invitrogen, Cat. N.º: 15596-026); SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Cat. N.º: 18080-051).

Métodos

Extracción de ARN total

Se aisló ARN total de las células de hibridoma según el manual técnico de TRIzol® Plus RNA Purification System. El ARN total se comprobó por electroforesis en gel.

RT-PCR

El ARN total se transcribió de forma inversa en ADNc usando cebador de sentido contrario específico de isotipo o cebador universal y el procedimiento completo fue según el manual técnico de SuperScript™ III First-Strand Synthesis System. El fragmento de anticuerpo se amplificará según el protocolo de operación estándar del método RACE de GenScript.

Clonación de genes de anticuerpo

Se clonaron productos de PCR diana de genes de anticuerpo en el vector de clonación por separado según procedimientos de clonación molecular estándar.

Cribado y secuenciación

Se empleó cribado de colonias para cribar clones con inserciones de tamaños correctos, y se secuenciaron no menos de diez colonias positivas independientes para cada fragmento de anticuerpo.

Resultados y análisis

Extracción de ARN total

Se ejecutó ARN total de la muestra junto con el marcador de ADN DL3000 en una electroforesis en gel de 1,5 % de agarosa/GelRed TM.

Producto de PCR de genes de anticuerpo

Se ejecutaron 4 µl de productos de PCR de cada muestra junto con el marcado de ADN DL3000 en una electroforesis en gel de 1,5 % de agarosa/GelRed TM.

Resultados y análisis de secuenciación

Los resultados de secuenciación son del siguiente modo. Las secuencias de ADN consenso y secuencias de aminoácidos correspondientes se enumeran a continuación:

Cadena pesada: Secuencia de ADN (426 pb): Secuencia conductora-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGGGATGGCGCTGTATCATCTCTTCTTGGTATCAACAGCTACAGGTGTCCACTCC
AGGTCC
AACTACAGCAGCCTGGGACTGAACTTATGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGC
TTCTGGCTACACCTTCACCACCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTT
GAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTCTGATAGTTATGTTAACTACAATCAAACTTTAAGGGCA
AGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATACAGCTCAGCAGCCTGACATC
TGAGGACTCTGCGGTCTATTTTTGTGCGAGATCCCCTGATTACTACGGTACTAGTCTTGCTGG
TTTGATTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTACA (SEQ ID NO:13)

Cadena pesada: Secuencia de aminoácidos (142 AA): Secuencia conductora-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MGWRCIILFLVSTATGVHS
QVQLQPGTELMKPGASVKLSCKASGYTF
FTTYWMHWVKQRPQGQL
EWIGEIDPSDSYVNYNQNFKGKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYFCARSPDYGTSLAW
FDYWGQGLVTVST (SEQ ID NO:14)

Cadena ligera: Secuencia de ADN (396 pb): Secuencia conductora-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGAGGTGCCTAGCTGAGTTCCTGGGGCTGCTTGTGCTCTGGATCCCTGGAGTCAATTGGG
GATA
TTGTGATGACTCAGGCTGCACCTCTGTACCTGTCACTCCTGGAGAGTCAGTATCCATCTCCTG
CAGGTCTAGTAAGAGTCCCCTGCATAGTAACGGCAACATTTACTTATAT
TGGTTCCTGCAGAGG
CCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGATATATCGGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACA
GGTTCAGTGGCAGTGGGTGAGGAACCTTTACACTGAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGA
TGTGGGTGTTTATTACTGTATGCAACATCTAGAATATCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAG
CTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:15)

Cadena ligera: Secuencia de aminoácidos (132 AA): Secuencia conductora-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MRCLAEFLGLLVLPVIG
DIIVMTQAAPSVPVTPGESVSI
SCRSSKSP
PLHSNGNIYLYWFLQR
PGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSTFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTK
LEIK (SEQ ID NO:16)

Así, las secuencias de ICOS 314.8 (CNCM I-4180) pueden resumirse del siguiente modo:

	Secuencia de ADN	Secuencia de aminoácidos
H-CDR1	GGCTACACCTTCACCACCTACTGGATGCA C (SEQ ID NO:1)	GYTFTTYWMH (SEQ ID NO:7)
H-CDR2	GAGATTGATCCTTCTGATAGTTATGTTAA CTACAATCAAACTTTAAGGGC (SEQ ID NO:2)	EIDPSDSYVNYNQNFKG (SEQ ID NO:8)
H-CDR3	TTTGATTAC (SEQ ID NO:3)	FDY (SEQ ID NO:9)
L-CDR1	AGGTCTAGTAAGAGTCCCCTGCATAGTAA CGGCAACATTTACTTATAT (SEQ ID NO:4)	RSSKSPLHSNGNIYLY (SEQ ID NO:10)
L-CDR2	CGGATGTCCAACCTTGCCTCA (SEQ ID NO:5)	RMSNLAS (SEQ ID NO:11)
L-CDR3	ATGCAACATCTAGAATATCCGTACACG (SEQ ID NO:6)	MQHLEYPYT (SEQ ID NO:12)

EJEMPLO 10: Secuenciación de Icos 88.2 (CNCM I-4177)

- 5 Se extrajo ARN total de células de hibridoma congeladas proporcionadas y se sintetizó ADNc. Entonces, se realizó RT-PCR para amplificar las regiones variables (cadenas pesadas y ligeras) del mAb. Las regiones variables de mAb de las cadenas pesadas y ligeras se clonaron en un vector de clonación por separado, luego se analizaron las secuencias obtenidas para deducir las secuencias del mAb.

10 Materiales

Células de hibridoma ICOS 88.2 (CNCM I-4177); TRIzol® Plus ARN Purification System (Invitrogen, Cat. N.º: 15596-026); SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Cat. N.º: 18080-051).

15 Métodos

Extracción de ARN total

- 20 Se aisló ARN total de las células de hibridoma según el manual técnico de TRIzol® Plus ARN Purification System. El ARN total se comprobó por electroforesis en gel.

RT-PCR

- 25 El ARN total se transcribió de forma inversa en ADNc usando cebador de sentido contrario específico de isotipo o cebador universal y el procedimiento completo fue según el manual técnico de SuperScript™ III First-Strand Synthesis System. El fragmento de anticuerpo se amplificará según el protocolo de operación estándar del método RACE de GenScript.

Clonación de genes de anticuerpo

- 30 Se clonaron productos de PCR diana de genes de anticuerpo en el vector de clonación por separado según procedimientos de clonación molecular estándar.

Cribado y secuenciación

- 35 Se empleó cribado de colonias para cribar clones con inserciones de tamaños correctos, y se secuenciaron no menos de diez colonias positivas independientes para cada fragmento de anticuerpo.

Resultados y análisis

- 40 **Extracción de ARN total**

Se ejecutó ARN total de la muestra junto con el marcador de ADN DL3000 en una electroforesis en gel de 1,5 % de agarosa/GelRed TM.

- 45 **Producto de PCR de genes de anticuerpo**

Se ejecutaron 4 µl de productos de PCR de cada muestra junto con el marcado de ADN DL3000 en una electroforesis en gel de 1,5 % de agarosa/GelRed TM.

50

Resultados y análisis de secuenciación

Los resultados de secuenciación son del siguiente modo. Las secuencias de ADN consenso y secuencias de aminoácidos correspondientes se enumeran a continuación:

5 **Cadena pesada: Secuencia de ADN (429 pb): Secuencia conductora-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4**

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCAGGTCC
 AACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGC
 TTCTGGCTACAGTTTCACCAGCTACTGGATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTT
 GAGTGGATCGGAAATATTTATCCTTCTGATAGTTATACTAACTACAATCAAATGTTCAAGGACA
 AGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAACACAGCCTACATGCAGCTCACCAGCCCGACATC
 TGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGATGGAATCTTTCTTATTACTTCGATAATAACTAC
TACTTGGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:29)

10 **Cadena pesada: Secuencia de aminoácidos (143 AA): Secuencia conductora-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4**

MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYSFTSYWINWVKQRPQGGL
 EWIGNIYPSDSYTNYNQMFKDKATLTVDKSSNTAYMQLTSPTSEDSAVYYCTRWNLSYYFDNNY
YLDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:30)

15 **Cadena ligera: Secuencia de ADN (396 pb): Secuencia conductora-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4**

ATGAGGTGCCTAGCTGAGTTCCTGGGGCTGCTTGTGCTCTGGATCCCTGGAGCCATTGGGGATA
 TTGTGATGACTCAGGCTGCACCCTCTGTACCTGTCACTCCTGGAGAGTCAGTATCCATCTCCTG
CAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTATTGGTTCCTGCAGAGG
 CCAGGCCAGTCTCCTCAACTCCTGATATATCGGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACA
 GGTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGAAGTCTTTCACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGA
 TGTGGGTGTTTATTACTGTATGCAACATCTAGAATATCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAG
 CTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:31)

20 **Cadena ligera: Secuencia de aminoácidos (132 AA): Secuencia conductora-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4**

MRCLAIEFLGLLVLPWIPGAIGDIVMTQAAPSVPTPGESVSI SCRSSKSLLSHNGNTYLYWFLQR
 PGQSPQLLIYRMSNLASGVDPDRFSGSGSFTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPWTFGGGTK
 LEIK (SEQ ID NO:32)

Así, las secuencias de ICOS 88.2 (CNCM I-4177) pueden resumirse del siguiente modo:

	Secuencia de ADN	Secuencia de aminoácidos
H-CDR1	GGCTACAGTTTCACCAGCTACTGGATAAAC (SEQ ID NO:17)	GYSFTSYWIN (SEQ ID NO:23)
H-CDR2	AATATTTATCCTTCTGATAGTTATACTAACTA CAATCAAATGTTCAAGGAC (SEQ ID NO:18)	NIYPSDSYTNYNQMFKD (SEQ ID NO:24)
H-CDR3	TGGAATCTTTCTTATTACTTCGATAATACTA CTACTTGGACTAC (SEQ ID NO:19)	WNLSYYFDNNYYLDY (SEQ ID NO:25)
L-CDR1	AGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCATAGTAATGG CAACACTTACTTGTAT (SEQ ID NO:20)	RSSKSLLSHNGNTYLY (SEQ ID NO :26)
L-CDR2	CGGATGTCCAACCTTGCCTCA (SEQ ID NO:21)	RMSNLAS (SEQ ID NO :27)
L-CDR3	ATGCAACATCTAGAATATCCGTGGACG (SEQ ID NO:22)	MQHLEYPWT (SEQ ID NO :28)

25

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> INSERM INSTITUT JEAN PAOLI & IRENE CALMETTES Universite d'Aix-Marseille	
	<120> Anticuerpos dirigidos contra ICOS y usos de los mismos	
10	<130> BCT120046QT	
	<150> EP11305380.5 <151> 31-03-2011	
15	<160> 32	
	<170> PatentIn versión 3.5	
20	<210> 1 <211> 30 <212> ADN <213> <i>Mus musculus</i>	
25	<400> 1 ggctacacct tcaccaccta ctggatgcac	30
30	<210> 2 <211> 51 <212> ADN <213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 2 gagattgatc cttctgatag ttatgttaac tacaatcaaa actttaaggg c	51
35	<210> 3 <211> 9 <212> ADN <213> <i>Mus musculus</i>	
40	<400> 3 tttgattac 9	
45	<210> 4 <211> 48 <212> ADN <213> <i>Mus musculus</i>	
50	<400> 4 agggttagta agagtcccct gcatagtaac ggcaacattt acttatat	48
55	<210> 5 <211> 21 <212> ADN <213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 5 cggatgtcca accttgccctc a	21
60	<210> 6 <211> 27 <212> ADN <213> <i>Mus musculus</i>	
65	<400> 6 atgcaacatc tagaatatcc gtacacg	27
	<210> 7	

ES 2 612 914 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 5 <400> 7
 Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Met His
 1 5 10
 <210> 8
 10 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 8
 15 Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Val Asn Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 9
 <211> 3
 20 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 9
 Phe Asp Tyr
 25 1
 <210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> *Mus musculus*
 <400> 10
 Arg Ser Ser Lys Ser Pro Leu His Ser Asn Gly Asn Ile Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15
 35 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 40 <400> 11
 Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 45 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 50 <400> 12
 Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

ES 2 612 914 T3

<210> 13
 <211> 426
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 13

atgggatggc gctgtatcat cctcttcttg gtatcaacag ctacaggtgt ccactcccag	60
gtccaactac agcagcctgg gactgaactt atgaagcctg gggcttcagt gaagctgtcc	120
tgcaaggctt ctggctacac cttcaccacc tactggatgc actgggtgaa gcagaggcct	180
ggacaaggcc ttgagtggat cggagagatt gatccttctg atagttatgt taactacaat	240
caaaacttta agggcaaggc cacattgact gtagacaaat cctccagcac agcctacata	300
cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt tttgtgcgag atcccctgat	360
tactacggta ctagtcttgc ctggtttgat tactggggcc aagggactct ggtcactgtc	420
tctaca	426

10

<210> 14
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 14

ES 2 612 914 T3

Met Gly Trp Arg Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ser Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Met Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Thr Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Val Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Asn Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Ile Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Pro Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu Ala Trp
115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr
130 135 140

<210> 15
<211> 396
<212> ADN
<213> *Mus musculus*
<400> 15

atgagggtgcc tagctgagtt cctggggctg cttgtgctct ggatccctgg agtcattggg 60
gatattgtga tgactcaggc tgcaccctct gtacotgtca ctccctggaga gtcagtatoc 120
atctcctgca ggtctagtaa gagtcccctg catagtaacg gcaacattta cttatattgg 180
ttcctgcaga ggccaggcca gtctcctcag ctccctgatat atcggatgtc caaccttgcc 240
tcaggagtcc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggaa ctactttcac actgaaaatc 300
agtagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgta tgcaacatct agaatatccg 360
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 396

<210> 16
<211> 132
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 16

ES 2 612 914 T3

Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
 1 5 10 15

Gly Val Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro
 20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
 35 40 45

Pro Leu His Ser Asn Gly Asn Ile Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Thr Phe
 85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys
 130

5 <210> 17
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 17
 ggctacagtt tcaccagcta ctggataaac 30

15 <210> 18
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 18
 aatattatc ctctgatag ttactaac tacaatcaaa tgtcaagga c 51

25 <210> 19
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 19
 tggaatctt ctattactt cgataataac tactacttgg actac 45

ES 2 612 914 T3

<210> 20
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 5
 <400> 20
 aggtctagta agagtctcct gcatagtaat ggcaacactt actgtgat 48
 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 10
 <400> 21
 cggatgtcca acctgcctc a 21
 <210> 22
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 15
 <400> 22
 atgcaacatc tagaatatcc gtggacg 27
 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 20
 <400> 23
 Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn
 1 5 10
 <210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25
 <400> 24
 Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Met Phe Lys
 1 5 10 15
 Asp
 <210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 30
 <400> 25
 Trp Asn Leu Ser Tyr Tyr Phe Asp Asn Asn Tyr Tyr Leu Asp Tyr
 1 5 10 15
 <210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 35
 <400> 26

ES 2 612 914 T3

		Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr	
		1 5 10 15	
5	<210> 27 <211> 7 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i> <400> 27		
10		Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser	
		1 5	
15	<210> 28 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i> <400> 28		
20		Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Trp Thr	
		1 5	
25	<210> 29 <211> 429 <212> ADN <213> <i>Mus musculus</i> <400> 29		
		atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactcccag	60
		gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggcttcagt gaagctgtcc	120
		tgcaaggctt ctggctacag tttcaccagc tactggataa actgggtgaa gcagaggcct	180
		ggacaaggcc ttgagtggat cggaaatatt tctccttctg atagttatac taactacaat	240
		caaatgttca aggacaaggc cacattgact gtagacaaat cctccaacac agcctacatg	300
		cagctcacca gcccgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtacaag atggaatctt	360
		tcttattact tcgataataa ctactacttg gactactggg gccaaaggcac cactctcaca	420
		gtctctctca	429
30	<210> 30 <211> 143 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i>		
35	<400> 30		

ES 2 612 914 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Met Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Thr Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Trp Asn Leu Ser Tyr Tyr Phe Asp Asn Asn Tyr
115 120 125

Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 31
<211> 396
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 31

atgagggtgcc tagctgagtt cctggggctg cttgtgctct ggatccctgg agccattggg 60
gatattgtga tgactcaggc tgcaccctct gtacctgtca ctccctggaga gtcagtatcc 120
atctcctgca ggtctagtaa gagtctcctg catagtaatg gcaacactta cttgtattgg 180
ttcctgcaga ggccaggcca gtctcctcaa ctccctgatat atcggatgtc caaccttgcc 240
tcaggagtcc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggaa ctgctttcac actgagaatc 300
agtagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgta tgcaacatct agaatatccg 360
tggaaggttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 396

<210> 32
<211> 132
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 32

ES 2 612 914 T3

Met	Arg	Cys	Leu	Ala	Glu	Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	Val	Leu	Trp	Ile	Pro	1	5	10	15
Gly	Ala	Ile	Gly	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Pro	20	25	30	
Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Ser	Val	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	35	40	45	
Leu	Leu	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Leu	Gln	Arg	50	55	60	
Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met	Ser	Asn	Leu	Ala	65	70	75	80
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Phe	85	90	95	
Thr	Leu	Arg	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	100	105	110	
Cys	Met	Gln	His	Leu	Glu	Tyr	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	115	120	125	
Leu	Glu	Ile	Lys	130															

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo dirigido contra ICOS, en el que dicho anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en Icos 145-1 e Icos 314-8, respectivamente obtenibles del hibridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009 con los números de acceso CNCM I-4179 y CNCM I-4180.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo neutraliza la interacción de ICOS en Treg y anula la proliferación de Treg inducida por células dendríticas plasmacitoides.

3. Un anticuerpo dirigido contra ICOS, en el que dicho anticuerpo tiene las siguientes 6 CDR:

	Secuencia de aminoácidos
H-CDR1	GYTFTTYWMH (SEQ ID NO:7)
H-CDR2	EIDPSDSYVNYNQNFKG (SEQ ID NO:8)
H-CDR3	FDY (SEQ ID NO:9)
L-CDR1	RSSKSPLHSNGNIYLY (SEQ ID NO :10)
L-CDR2	RMSNLAS (SEQ ID NO :11)
L-CDR3	MQHLEYPYT (SEQ ID NO :12)

4. Un anticuerpo según la reivindicación 3, en el que las secuencias nucleotídicas que codifican las 6 CDR son las siguientes:

	Secuencia de ADN
H-CDR1	GGCTACACCTTCACCACCTACTGGATGCA C (SEQ ID NO:1)
H-CDR2	GAGATTGATCCTTCTGATAGTTATGTTAA CTACAATCAAACTTTAAGGGC (SEQ ID NO:2)
H-CDR3	TTTGATTAC (SEQ ID NO:3)
L-CDR1	AGGTCTAGTAAGAGTCCCCTGCATAGTAA CGGCAACATTTACTTATAT (SEQ ID NO:4)
L-CDR2	CGGATGTCCAACCTTGCCCTCA (SEQ ID NO:5)
L-CDR3	ATGCAACATCTAGAATATCCGTACACG (SEQ ID NO:6)

5. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso como un medicamento.

6. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o una afección asociada a la supresión mediada por Treg de la respuesta inmunitaria.

7. El anticuerpo según la reivindicación 6, en el que dicha enfermedad o afección está seleccionada de cánceres e infecciones crónicas.

8. El anticuerpo según la reivindicación 7, en el que dicho cáncer es uno seleccionado de linfoma maligno humano, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino y cáncer de mama.

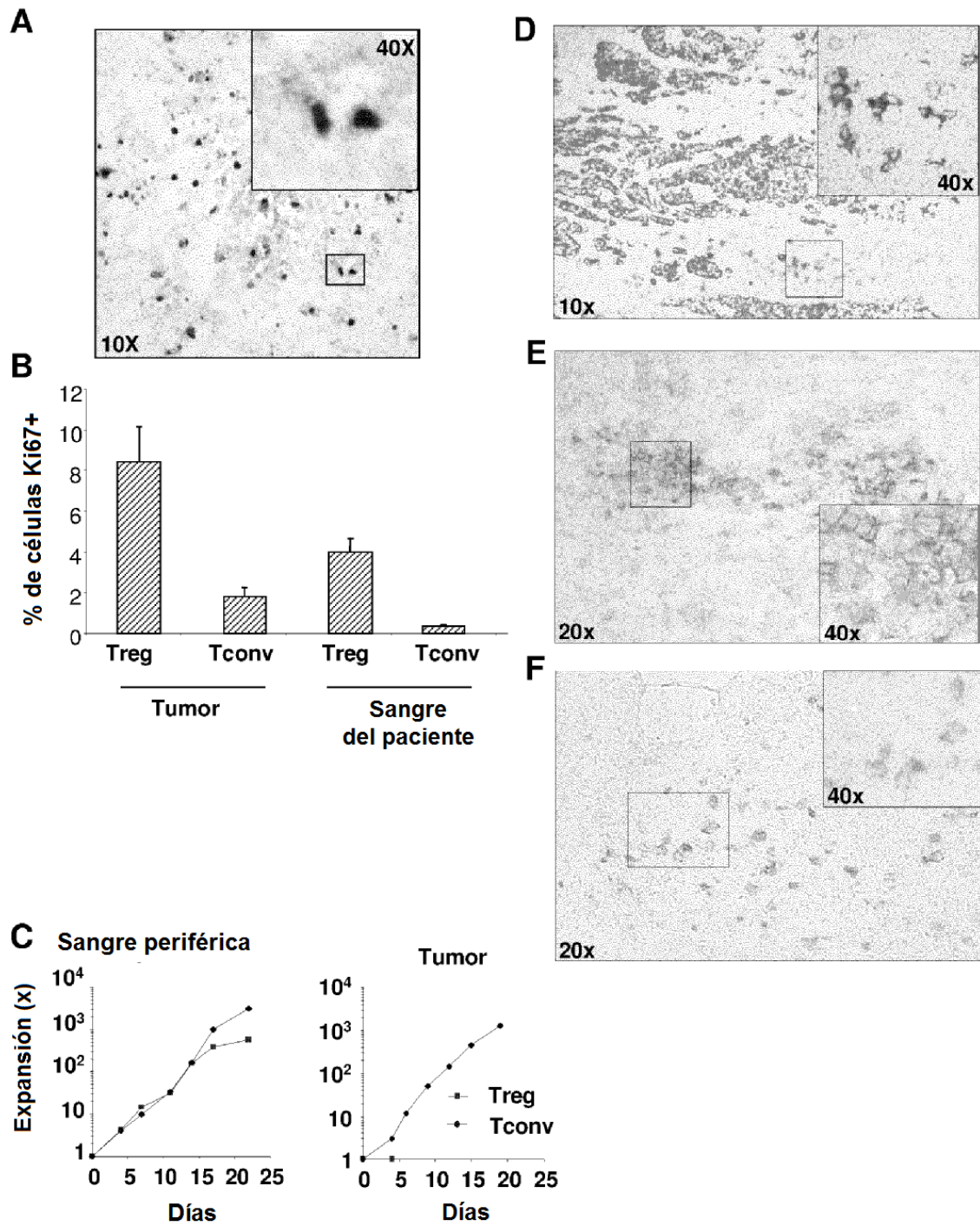


Figura 1

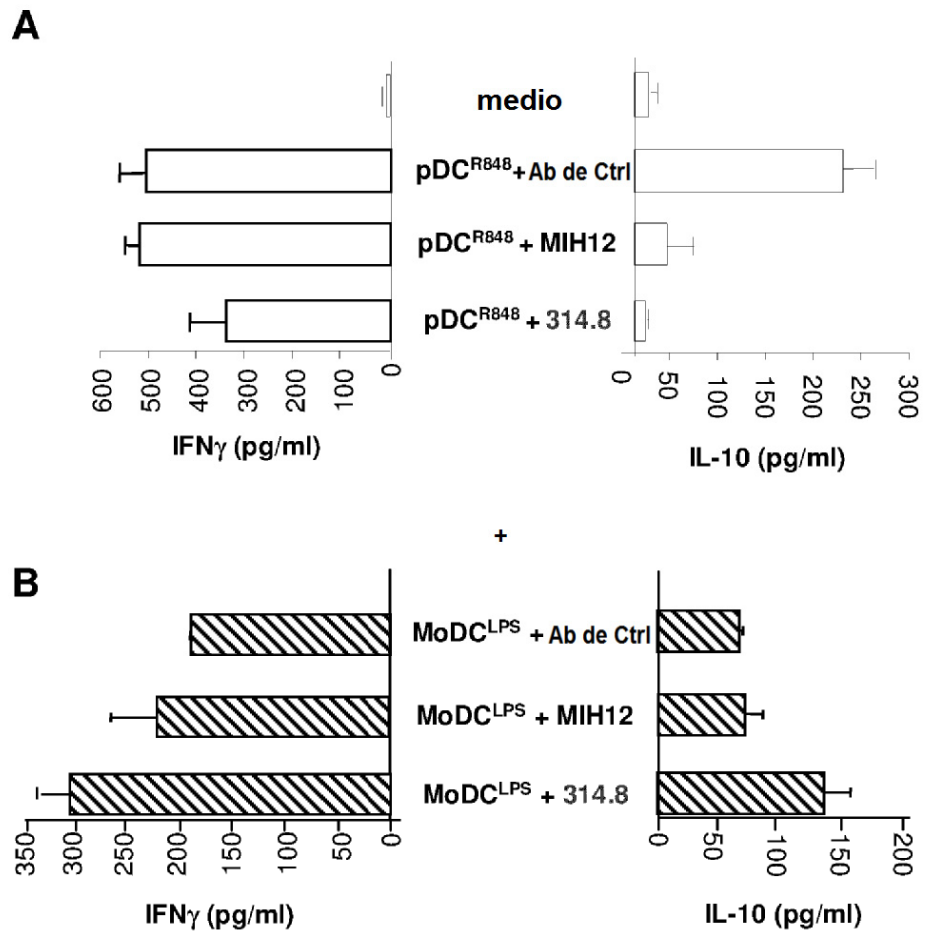


Figura 2

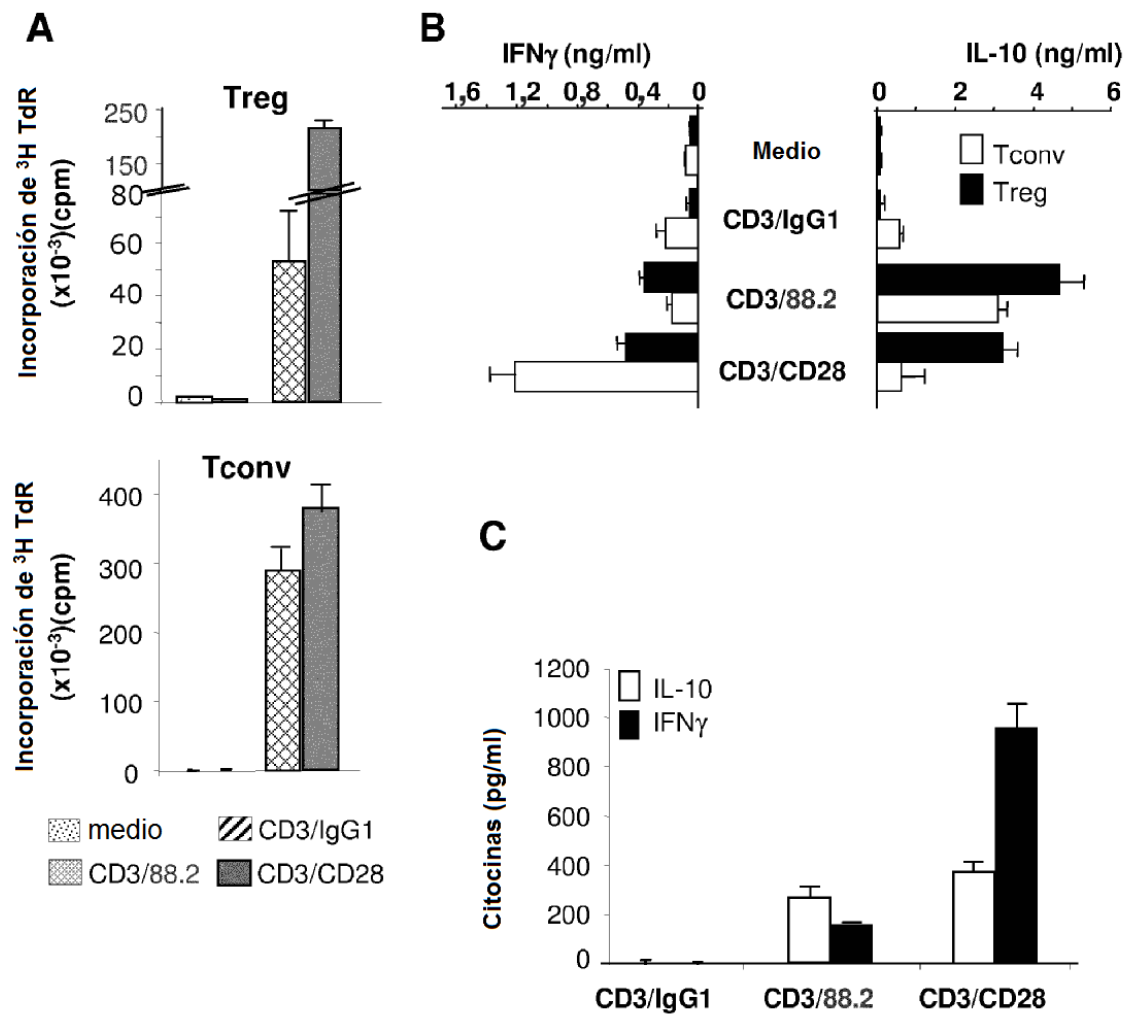


Figura 3

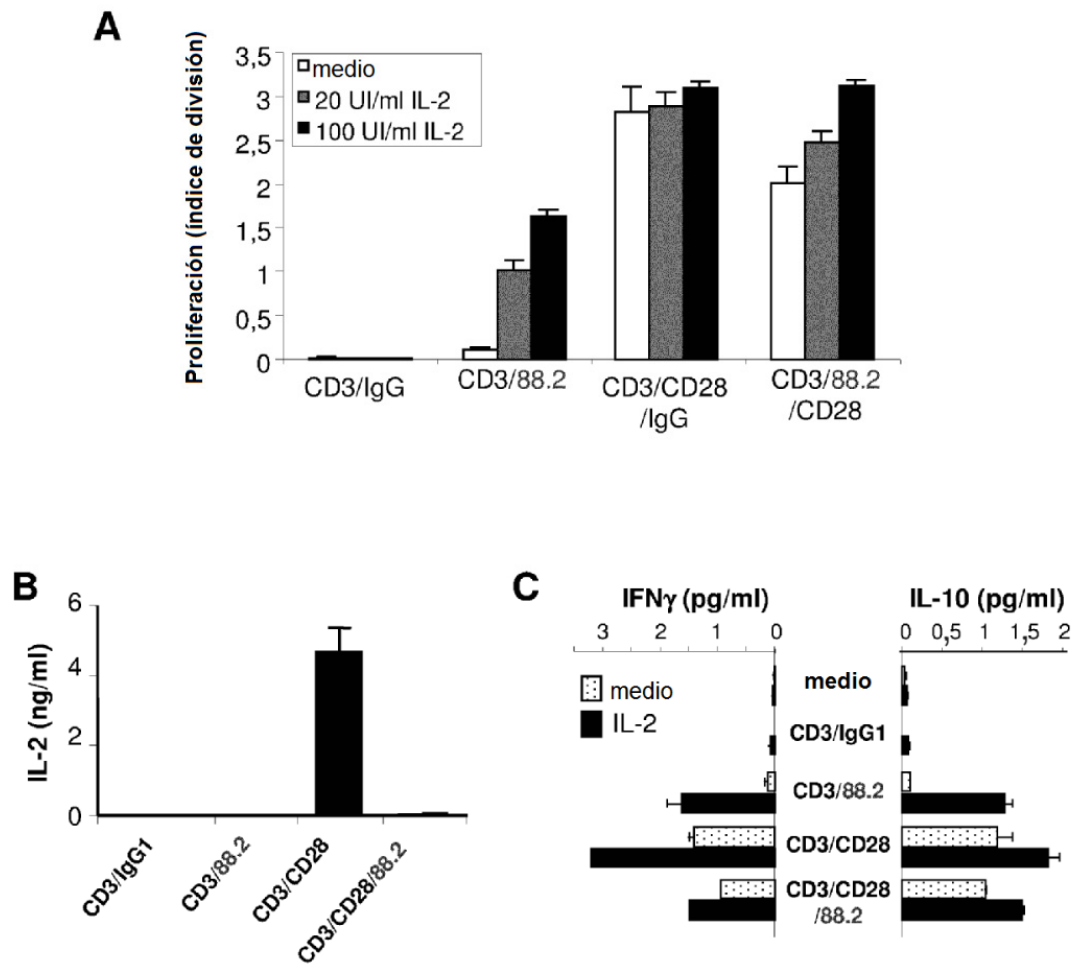
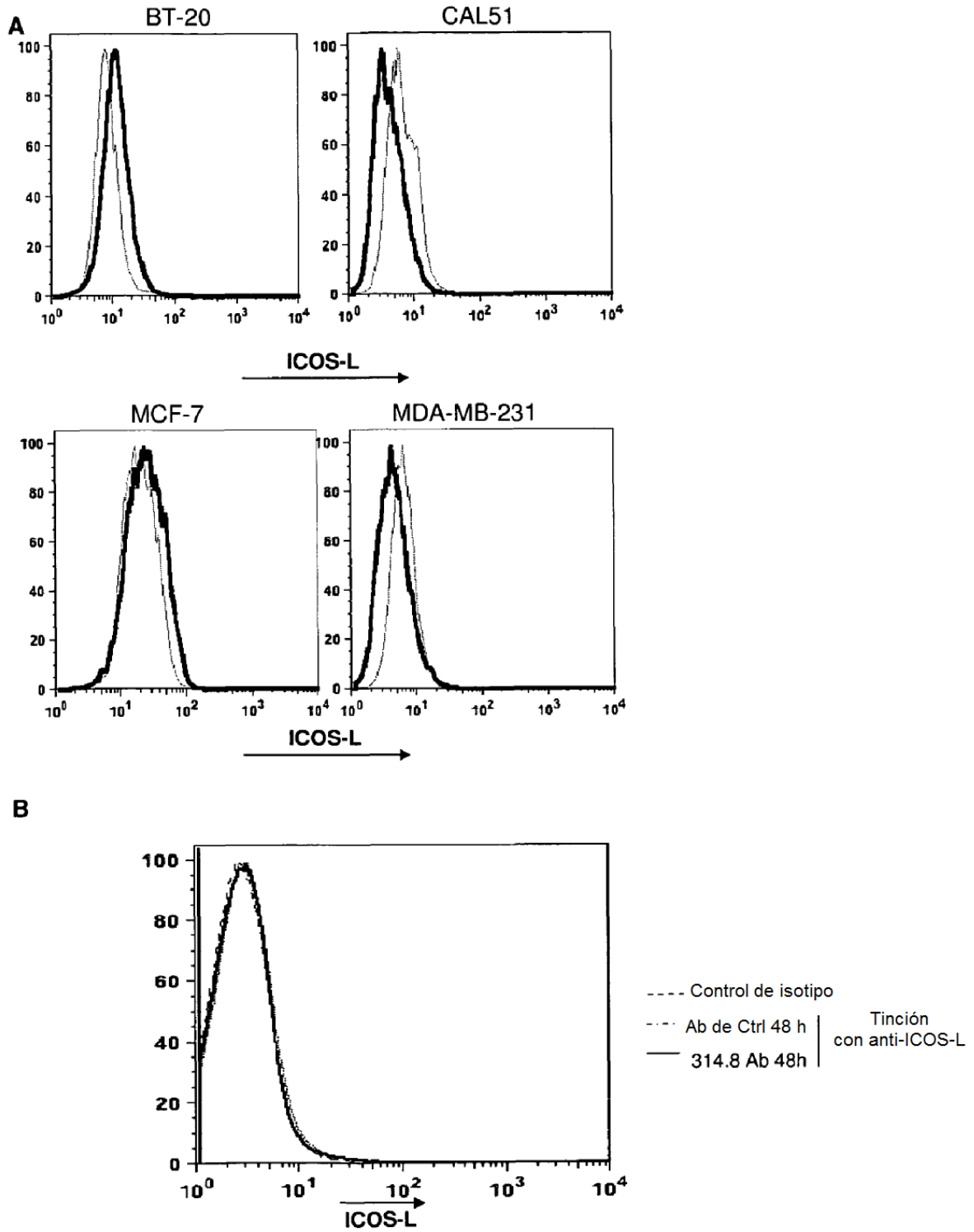


Figura 4

Figura 5



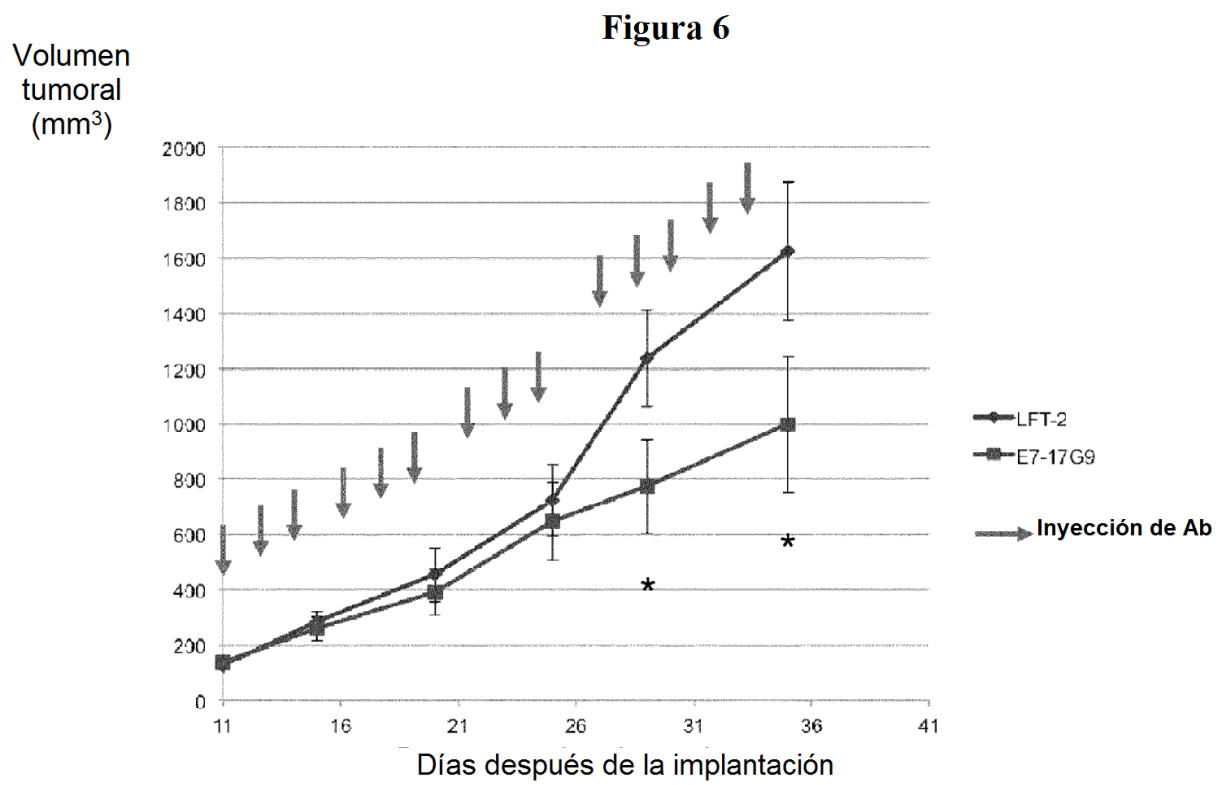
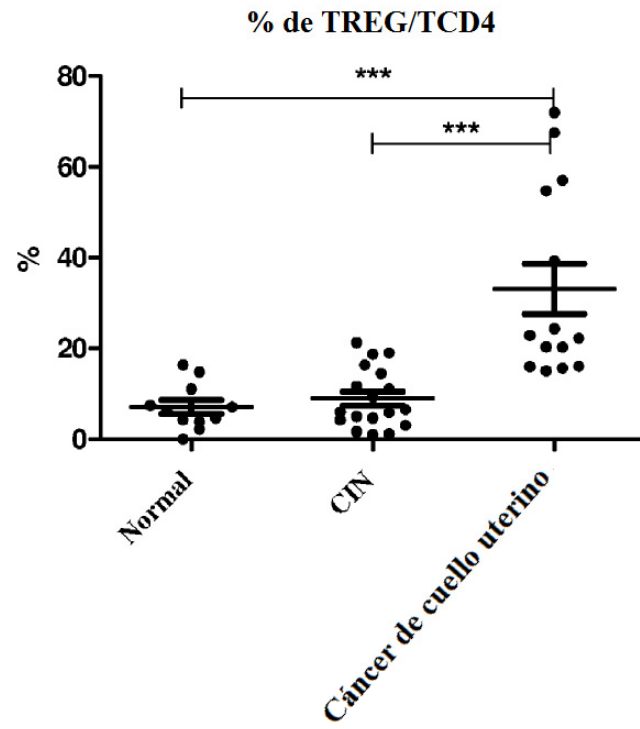


Figura 7

A



B

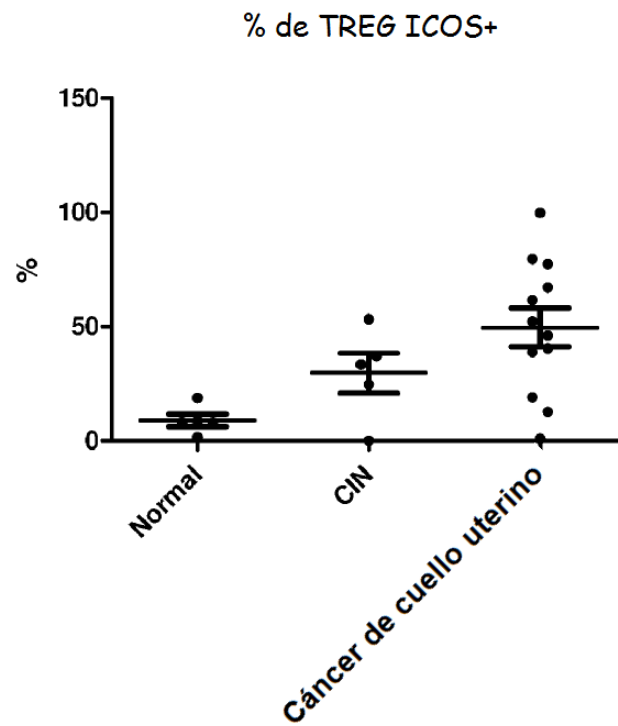


Figura 8

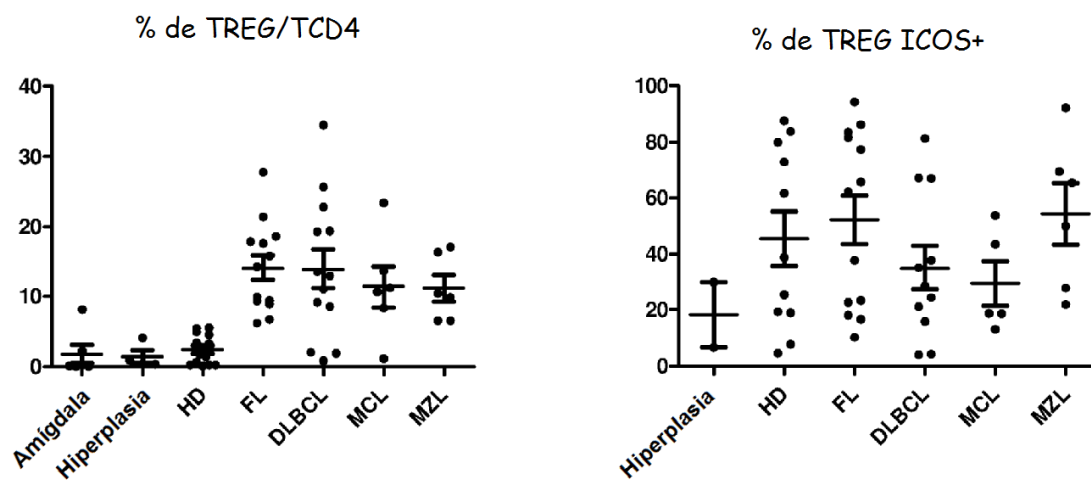


Figura 9

