

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 214**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2010 PCT/US2010/051008**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2011 WO11041613**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2010 E 10821297 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 2482849**

54 Título: **Inmunoterapia de combinación para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

30.09.2009 US 247438 P

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

12.09.2018

73 Titular/es:

**MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER
CENTER (50.0%)
1275 York Avenue
New York, NY 10021, US y
BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF
TEXAS SYSTEM (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ALLISON, JAMES;
SHARMA, PADMANEE;
QUEZADA, SERGIO, A. y
FU, TIHUI**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 681 214 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

Inmunoterapia de combinación para el tratamiento del cáncer

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a composiciones, vectores y células humanas para su uso en el tratamiento del cáncer que emplea el bloqueo del receptor inhibitor de linfocitos T junto con la estimulación de ICOS.

10

Antecedentes de la invención

La activación óptima de los linfocitos T requiere señales simultáneas a través del receptor de linfocitos T y moléculas coestimuladoras. CD28, la molécula coestimuladora prototípica, tras la interacción con sus ligandos B7-1 y B7-2, desempeña un papel crucial en el cebado inicial de los linfocitos T. Sharpe et al., *Nat. Rev. Immunol.* 2: 203-209 (2002). La expansión de los linfocitos T mediada por CD28 es contrarrestada por otro contra receptor B7-1,2, el antígeno 4 asociado a linfocitos citotóxicos (CTLA-4), que atenúa la proliferación de los linfocitos T activados recientemente. Krummel et al., *J Exp. Med* 183: 2533-2540 (1996); Leach et al., *Science* 271: 1734-1736 (1996). La regulación temporal de la expresión de CD28 y CTLA-4 mantiene un equilibrio entre las señales activadoras e inhibitoras y asegura el desarrollo de una respuesta inmunitaria eficaz, a la vez que protege contra el desarrollo de la autoinmunidad. Se ha demostrado que el bloqueo de las señales inhibitoras mediadas por CTLA-4 potencia las respuestas de los linfocitos T e induce el rechazo tumoral en varios modelos animales y los anticuerpos monoclonales contra CTLA-4 humano han tenido un éxito modesto en ensayos clínicos en seres humanos en curso, incluyendo respuestas completas duraderas en un pequeño subconjunto de pacientes con enfermedad metastásica. Véase, por ejemplo, Korman et al., *Adv. Immunol.* 90: 297-337 (2006).

15

20

25

La identificación y caracterización de miembros adicionales de la familia CD28 y B7 PD-1 (muerte programada-1), PD-L1 (ligando de muerte programada 1 o B7-H1) y PD-L2 (B7-DC) ha añadido mayor complejidad al proceso de activación de linfocitos T y tolerancia periférica en seres humanos. De forma similar a la interacción B7-1,2/CTLA-4, las interacciones de PD-1 con PD-L1 y PD-L2 regulan negativamente las respuestas inmunitarias centrales y periféricas. Fife et al., *Immunol. Rev.* 224: 166-82 (2008). En consecuencia, el bloqueo de PD-1 basado en anticuerpos, como CTLA-4, también se está explorando en ensayos clínicos en seres humanos para el tratamiento del cáncer. Véase, por ejemplo, Berger et al. *Clin. Cancer Res.* 14: 3044-3051 (2008). Sin embargo, al igual que con CTLA-4, aún se necesitan terapias mejoradas.

30

35

El coestimulador inducible (ICOS) es una molécula de superficie específica de linfocitos T que está relacionada estructuralmente con CD28 y CTLA-4. Hutloff et al., *Nature* 397: 263-266 (1999); Dong et al., *Nature* 409: 97-101 (2001). Inicialmente, el papel de ICOS en las respuestas inmunitarias estaba fuertemente relacionado con la producción de citocinas Th2, lo que sugiere que los linfocitos T que expresan ICOS podrían desempeñar un papel en la supresión de respuestas inmunitarias. Ratones con deficiencia de ICOS demostraron una producción disminuida de la citocina Th2 interleucina 10 y la producción de IL-10 por linfocitos T reguladores se ha asociado a la supresión de respuestas de linfocitos T efectores de una manera extrínseca a las células. Yoshinaga et al., *Nature* 402: 827-832 (1999); Kohyama et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 4192-97 (2004). Por el contrario, sin embargo, datos más recientes indicaron que los linfocitos T que expresan ICOS también podrían estar implicados en respuestas autoinmunitarias y el bloqueo de CTLA-4 en pacientes con cáncer de vejiga aumentó la expresión de ICOS en los linfocitos T CD4+, células que después produjeron IFN-gamma y reconocieron el antígeno tumoral. Yu et al. *Nature* 450: 299-303 (2007); Liakou et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 14987-992 (2008). Además, también se ha demostrado que ICOS se asocia a una mayor supervivencia tanto de linfocitos T de memoria efectores como linfocitos T reguladores, demostrando que su relevancia funcional puede no estar restringida a los linfocitos T reguladores. Burmeister et al., *J Immunol.* 180: 77 4-782 (2008). Zuberek et al. (*Cellular Immunology* 2003 volumen 225, n.º 1, p53-63) describen el uso de proteínas de fusión GL50-IgG ligando de ICOS para promover la inmunidad tumoral. El documento WO2016/154177 describe anticuerpos contra ICOS para su uso en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, el papel fisiológico de la señalización de ICOS en el proceso de activación de linfocitos T todavía se está desentrañando. Debido a esta incertidumbre continua, el impacto potencial de la modulación de la señalización de ICOS en el contexto de la terapia contra el cáncer actualmente se desconoce.

40

45

50

55

Greenwald et al. (*Ann. Rev. Immunol.*, vol. 23, págs. 515-548) y Ward et al. (*Int. Rev. Immunol.*, vol. 26, n.º 3-4 págs. 161-196) revisan el mecanismo mediante el cual CTLA-4 y PD-1 proporcionan regulación negativa. Se ha demostrado que PDL1 interactúa con PD-1 y también B7H1 (Keir et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 2008, volumen 26, n.º 1, págs. 677-704).

60

El documento WO2007/113648 desvela anti-CTLA-4 y un agente terapéutico, para su uso en el tratamiento del cáncer. El agente terapéutico se define como una de varias posibilidades, que incluyen moléculas coestimuladoras inmunitarias (por ejemplo, ICOS) y anticuerpos agonistas de las mismas.

65

Sumario de la invención

La presente invención aclara el papel de la señalización de ICOS en la progresión o el tratamiento del cáncer mediante la demostración de que la administración simultánea de un agonista de ICOS junto con el bloqueo del receptor inhibidor de linfocitos T pueden potenciar adicionalmente los efectos antitumorales del bloqueo. En consecuencia, en un primer aspecto, se proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-ICOS agonista para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en la que dicho anticuerpo anti-ICOS agonista es para su uso en combinación con un agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-PD-L1 que bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 e inhibe la señalización de PD-1. Además, se proporciona una composición que comprende un agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-PD-L1 que bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 e inhibe la señalización de PD-1, para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en el que dicho agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T se usa en combinación con un anticuerpo anti-ICOS agonista.

En un segundo aspecto, se proporciona un vector vírico que codifica i) un agente bloqueador de uno o más receptores inhibidores de linfocitos T seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-PD-L1 que bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 e inhibe la señalización de PD-1; y ii) un anticuerpo anti-ICOS agonista, para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un paciente.

En un tercer aspecto, se proporciona el uso de un vector vírico como se define en el segundo aspecto, en la fabricación de una célula de cáncer transfectada o transducida para su uso en el tratamiento del cáncer.

En un cuarto aspecto, se proporciona una célula humana aislada para su uso en un método de tratamiento del cáncer, en la que la célula humana aislada comprende una construcción que codifica i) un agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-PD-L1 que bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 e inhibe la señalización de PD-1 y ii) un anticuerpo anti-ICOS agonista.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra el efecto agonista del anticuerpo anti-ICOS (7E, 17G o C398.4) sobre linfocitos T CD4⁺ murinos en ausencia o presencia de anticuerpo anti-CD3.

La FIG. 2 muestra la correlación inversa en animales sin tratar o animales tratados con anticuerpo anti-CTLA-4 después de tres semanas entre el volumen tumoral (mm³; eje Y) y el porcentaje (%) de expresión de ICOS por linfocitos CD4⁺FOXP³ (eje x).

La FIG. 3 demuestra el porcentaje de supervivencia de animales ICOS⁺/ICOSL⁺ que llevan tumor B16 que no se trataron, animales ICOS⁺/ICOSL⁺ tratados con GVAX y anticuerpo anti-CTLA-4 (9H10), animales ICOS⁺/ICOSL⁺ que no se trataron, animales ICOS⁺/ICOSL⁺ que se trataron con GVAX y anticuerpo anti-CTLA-4 (9H10), animales ICOS⁺/ICOSL⁻ que no se trataron y animales ICOS⁺/ICOSL⁻ tratados con GVAX y anticuerpo anti-CTLA-4 (9H10).

La FIG. 4 muestra el tamaño tumoral (mm³; eje y) 0-50 días después de la exposición al tumor (eje x) en animales tratados con GVAX y anticuerpo anti-CTLA-4 (αCTLA4) o animales tratados con GVAX, anticuerpo anti-CTLA-4 (αCTLA4) y anticuerpo anti-ICOS (αICO).

La FIG. 5 muestra el porcentaje de supervivencia de animales que llevan tumor B16/BL6 que no se trataron, tratados con GVAX, tratados con GVAX y anticuerpo anti-CTLA-4 o tratados con GVAX, anticuerpo anti-CTLA-4 y anticuerpo anti-ICOS.

La FIG. 6 muestra el porcentaje de supervivencia de animales que llevan tumor B16/BL6 que no se trataron, tratados con GVAX y anticuerpo anti-ICOS (7E.17G9), tratados con GVAX y anticuerpo anti-PD-L1 (10F.9G2) o tratados con GVAX, anticuerpo anti-PD-L1 y anticuerpo anti-ICOS.

La FIG. 7 muestra las curvas de crecimiento tumoral individuales de cada animal (columna izquierda), volúmenes tumorales promedio en cada grupo de tratamiento (esquina superior derecha) y curvas de supervivencia de cada grupo de tratamiento (esquina inferior derecha) de animales tratados con células GVAX y B16/BL6 transducidas para expresar Thy1.1 (B16-Thy1.1) o células B16/BL6 transducidas para expresar ICOSL unido a la membrana (B16-mICOSL). Los números en las curvas de crecimiento tumoral individuales indican el porcentaje de ratones sin tumor al final del experimento. Para las curvas de supervivencia, un ratón se consideró muerto cuando el volumen tumoral alcanzó 300 mm³.

La FIG. 8 muestra las curvas de crecimiento tumoral individuales de cada animal (columna izquierda), volúmenes tumorales promedio en cada grupo de tratamiento (esquina superior derecha) y curvas de supervivencia de cada

grupo de tratamiento (esquina inferior derecha) de animales tratados con GVAX y anticuerpo anti-CTLA4 (9H10) solo o en combinación con células B16/BL6 transducidas para expresar ICOSL unido a la membrana (mICOSL). Los números en las curvas de crecimiento tumoral individuales indican el porcentaje de ratones sin tumor al final del experimento. Para las curvas de supervivencia, un ratón se consideró muerto cuando el volumen tumoral alcanzó 300 mm³.

La FIG. 9 muestra curvas de crecimiento tumoral individuales de un primer experimento de B16/BL6 en ratones que no se trataron o tratados con células B16/BL6 transducidas para expresar Thy1.1 (B16-Thy 1.1) en ausencia o presencia de anticuerpo anti-CTLA-4 (9H10) o células B16/BL6 transducidas para expresar ICOSL unido a la membrana (B16-mICOSL) en ausencia o presencia de anticuerpo anti-CTLA-4 (9H10). Los números indican el porcentaje de ratones sin tumor al final del experimento.

La FIG. 10 muestra curvas de crecimiento tumoral individuales de un segundo experimento de B16/BL6 en ratones que no se trataron o tratados con células B16/BL6 transducidas para expresar Thy1.1 (B16-Thy1.1) en ausencia o presencia de anticuerpo anti-CTLA-4 (9H10) o células B16/BL6 transducidas para expresar ICOSL unido a la membrana (B16-mICOSL) en ausencia o presencia de anticuerpo anti-CTLA-4 (9H10). Los números indican el porcentaje de ratones sin tumor al final del experimento.

La FIG. 11 muestra las curvas de supervivencia de cada grupo de tratamiento de B16/BL6 en ratones que no se trataron o tratados con células B16/BL6 transducidas para expresar Thy1.1 (B16-Thy1.1) en ausencia o presencia de anticuerpo anti-CTLA-4 (9H10) o células B16/BL6 transducidas para expresar ICOSL unido a la membrana (B16-mICOSL) en ausencia o presencia de anticuerpo anti-CTLA-4 (9H10).

La FIG. 12A muestra curvas de crecimiento tumoral promedio de B16/BL6 en ratones que no se trataron o tratados con células B16/BL6 transducidas para expresar ICOSL (B16-mICOSL) y/o anticuerpo anti-CTLA-4 (9H10) unido a la membrana. La FIG. 12B muestra las curvas de supervivencia de cada grupo de tratamiento de B16/BL6 en ratones que no se trataron o tratados con células B16/BL6 transducidas para expresar ICOSL (B16-mICOSL) y/o anticuerpo anti-CTLA-4 unido a la membrana (9H10). Para las curvas de supervivencia, un ratón se consideró muerto cuando el volumen tumoral alcanzó 300 mm³.

Descripción detallada

En el presente documento se describe el hallazgo de que la estimulación de la señalización mediada por ICOS, por ejemplo, a través de ligando de ICOS o un anticuerpo agonista, potencia los efectos antitumorales de agentes bloqueadores de receptores inhibidores de linfocitos T tales como CTLA-4 y PD-1. En consecuencia, en el presente documento se proporciona una composición que comprende un agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-PD-L1 que bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 e inhibe la señalización de PD-1, para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente en el que dicho agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T se usa en combinación con un anticuerpo anti-ICOS agonista. En el presente documento también se proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-ICOS agonista para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en el que dicho anticuerpo anti-ICOS agonista es para su uso en combinación con un agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-PD-L1 que bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 e inhibe la señalización de PD-1.

Agentes de bloqueo de receptores inhibidores de linfocitos T/Agentes estimuladores de ICOS

El coestimulador de linfocitos T inducible (ICOS) también se conoce como "AILIM", "CD278" y "MGC39850". La secuencia completa de ADNc de ICOS tiene el número de acceso de GENBANK NM_012092.3 y la secuencia de aminoácidos de ICOS humano tiene el número de acceso de GENBANK NP_036224. ICOS pertenece a la familia de receptores de la superficie celular CD28 y CTLA-4. Forma homodímeros y desempeña un papel importante en la señalización célula-célula, las respuestas inmunitarias y la regulación de la proliferación celular. Sin embargo, el papel de la señalización de ICOS en la mediación de respuestas antitumorales es actualmente desconocido.

Un ligando de ICOS (ICOSL) también se conoce como "B7H2", "GL50", "B7-H2", "B7RP1", "CD275", "ICOSLG", "LICOS", "B7RP-1", "ICOS-L" y "KIAA0653". La secuencia de ADNc completa de ICOSL tiene el número de acceso de GENBANK NM_015259.4 y la secuencia de aminoácidos de ICOSL humano tiene el número de acceso de GENBANK NP_056074.

Los agentes estimuladores de ICOS son moléculas que generalmente se unen al dominio extracelular de ICOS (por ejemplo, ICOSL). Por lo general, la afinidad de unión del agente bloqueador será de al menos aproximadamente 100 μ M. El agente estimulador será sustancialmente no reactivo con moléculas relacionadas con ICOS, tales como CD28 y otros miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas. El agente estimulador utilizado en la presente invención es un anticuerpo anti-ICOS agonista. Como se demuestra en el presente documento, los agentes estimuladores adecuados activan la señalización de ICOS y dan como resultado un aumento correspondiente en la activación de linfocitos T (por ejemplo, proliferación). Véase, por ejemplo, la Figura 1.

Se seleccionan agentes estimuladores de ICOS candidatos por su capacidad de satisfacer estos criterios. Se conocen en la técnica ensayos para determinar la afinidad y la especificidad de unión, incluyendo ensayos competitivos y no competitivos. Los ensayos de interés incluyen ELISA, RIA, citometría de flujo, etc. Los ensayos de unión pueden usar ICOS purificado o semi-purificado o, como alternativa, pueden usar linfocitos T que expresan ICOS, por ejemplo, linfocitos transfectados con una construcción de expresión para ICOS; linfocitos T que se han estimulado a través de entrecruzamiento de CD3 y CD28; la adición de células alógenas irradiadas, etc. Como ejemplo de un ensayo de unión, puede usarse ICOS purificado a un soporte insoluble, por ejemplo, una placa de microtitulación, perlas magnéticas, etc. El agente estimulador candidato y el ligando de ICOS soluble marcado se añaden a las células y, después, los componentes no unidos se eliminan por lavado. La capacidad del agente estimulador para competir con el ligando natural por la unión a ICOS puede determinarse mediante la cuantificación del ligando unido y marcado.

Puede usarse un ensayo funcional que detecte la activación de linfocitos T para confirmar que el agente sea un agente estimulador de ICOS. Por ejemplo, puede estimularse una población de linfocitos T con el agente estimulador candidato en presencia y ausencia de anti-CD3, como se ejemplifica en el presente documento y en la Figura 1. Un agente que estimula ICOS provocará un aumento en la activación de linfocitos T, según se mide mediante, por ejemplo, proliferación de linfocitos T CD4+ y/o progresión del ciclo celular, liberación de IL-2, regulación positiva de CD25 y CD69, etc. Un experto en la materia entenderá que la expresión sobre la superficie de una célula, el empaquetado en un liposoma, la adhesión a una partícula o pocillo, etc. aumentarán la valencia eficaz de una molécula.

Un receptor inhibitor de linfocitos T como se describe en el presente documento incluye cualquier receptor expresado sobre la superficie de linfocitos T que, cuando se active o se una a un ligando, regule negativamente la activación del linfocito T. En otras palabras, el bloqueo del receptor inhibitor de linfocitos T potencia la activación de los linfocitos T y/o las respuestas de linfocitos T efectores. Los receptores inhibidores de linfocitos T y sus ligandos son bien conocidos en la técnica. Un receptor inhibitor de linfocitos T utilizado en la presente invención se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-PD-L1 que bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 e inhibe la señalización de PD-1. Un experto en la materia reconocerá que los ligandos para CTLA-4 incluyen CD80 y CD86. Además, un experto en la materia reconocerá que los ligandos para PD-1 incluyen PD-L1 y PD-L2.

La secuencia de ADNc completa de CTLA-4 humano tiene el número de acceso de GENBANK L15006. La región de los aminoácidos 1-37 es el péptido líder; 38-161 es el dominio de tipo V extracelular; 162-187 es el dominio transmembrana; y 188-223 es el dominio citoplásmico. Se han notificado variantes de la secuencia de nucleótidos, incluyendo una transición de G a A en la posición 49, una transición de C a T en la posición 272 y una transición de A a G en la posición 439. La secuencia de ADNc completa de CTLA-4 de ratón tiene el número de acceso de EMBL X05719 (Brunet et al. (1987) *Nature* 328: 267-270). La región de aminoácidos 1-35 es el péptido líder.

La secuencia de ADNc completa de PD-1 humana tiene el número de acceso de GENBANK NM_005018 y la secuencia de aminoácidos de PD-1 humano tiene el número de acceso de GENBANK NP_005009.1. La región de los aminoácidos 1-20 es el péptido señal y el péptido maduro se encuentra en los aminoácidos 21-288.

Los agentes bloqueadores de un receptor inhibitor de linfocitos T generalmente son moléculas que se unen específicamente al dominio extracelular del receptor inhibitor de linfocitos T o al dominio extracelular del ligando del receptor inhibitor de linfocitos T para evitar la activación del receptor inhibitor de linfocitos T, por ejemplo, mediante el bloqueo de la unión del receptor inhibitor de linfocitos T a su ligando, por ejemplo, CD80, CD86, PD-L1, PD-L2, etc. Por lo general, la afinidad de unión del agente bloqueador será de al menos aproximadamente 100 μ M. Un agente bloqueador será sustancialmente no reactivo con moléculas relacionadas con el receptor inhibitor de linfocitos T, tales como CD28 y otros miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas. Además, los agentes bloqueadores no activan la señalización del receptor inhibitor de linfocitos T. Convenientemente, esto se consigue mediante el uso de moléculas de unión monovalentes o bivalentes. Un experto en la materia entenderá que los siguientes análisis acerca de la reactividad cruzada y la competencia entre diferentes moléculas tienen como objetivo referirse a moléculas que tienen la misma especie de origen, por ejemplo, el receptor inhibitor de linfocitos T humano se une al ligando del receptor inhibitor de linfocitos T humano, etc.

Se seleccionan agentes bloqueadores candidatos por su capacidad de satisfacer estos criterios. Se conocen en la técnica ensayos para determinar la afinidad y la especificidad de unión, incluyendo ensayos competitivos y no competitivos. Los ensayos de interés incluyen ELISA, RIA, citometría de flujo, etc. Los ensayos de unión pueden usar proteína receptora inhibitor de linfocitos T purificada o semi-purificada o, como alternativa, pueden usar linfocitos T que expresan el receptor inhibitor de linfocitos T, por ejemplo, células transfectadas con una construcción de expresión para el receptor inhibitor de linfocitos T; linfocitos T que se han estimulado a través del entrecruzamiento de CD3 y CD28; la adición de células alógenas irradiadas, etc. Como ejemplo de un ensayo de unión, la proteína receptora inhibitor de linfocitos T purificada se une a un soporte insoluble, por ejemplo, una placa de microtitulación, perlas magnéticas, etc. El agente bloqueador candidato y el ligando del receptor inhibitor de linfocitos T soluble marcado se añaden a las células y, después, los componentes no unidos se eliminan por lavado. La capacidad de un agente bloqueador para competir con el ligando por la unión al receptor inhibitor de linfocitos T

se determina mediante la cuantificación del ligando unido marcado.

En general, una molécula de unión monovalente o bivalente soluble no activará la señalización del receptor inhibidor de linfocitos T. Puede usarse un ensayo funcional que detecta la activación de linfocitos T para confirmación. Por ejemplo, una población de linfocitos T puede estimularse con células alógenas irradiadas que expresen el ligando del receptor inhibidor de linfocitos T, en presencia o ausencia del agente bloqueador candidato. Un agente que bloquea la señalización del receptor inhibidor de linfocitos T provocará un aumento en la activación de los linfocitos T, medida mediante la proliferación y la progresión del ciclo celular, la liberación de IL-2, la regulación positiva de CD25 y CD69, etc. Un experto en la materia entenderá que la expresión sobre la superficie de una célula, el empaquetamiento en un liposoma, la adhesión a una partícula o pocillo, etc. aumentarán la valencia eficaz de una molécula.

Un agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T o un agente estimulador de ICOS que se describen en el presente documento pueden ser cada uno individualmente un péptido, una molécula orgánica pequeña, un peptidomimético, ligandos solubles, anticuerpo o similares. En la presente invención, se usan anticuerpos anti-CTLA-4 y anti-PD-L1 como agente bloqueador y anticuerpos anti-ICOS agonistas como agente estimulador. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales; intactos o truncados, por ejemplo, F(ab')₂, Fab, Fv; formas xenógenas, alógenas, singénicas o modificadas de los mismos, por ejemplo, humanizadas, quiméricas, etc.

En muchos casos, el agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T o agente estimulador de ICOS será un anticuerpo o fragmento del mismo. Como referencia, bibliotecas combinatorias proporcionan compuestos distintos de los oligopéptidos que tienen las características de unión necesarias. En general, la afinidad será de al menos aproximadamente 10⁻⁶, más por lo general de aproximadamente 10⁻⁸ M, es decir, afinidades de unión observadas normalmente con anticuerpos monoclonales específicos.

Hay disponibles varios ensayos de selección para agentes bloqueadores de un receptor inhibidor de linfocitos T o agentes estimuladores de ICOS. Los componentes de dichos ensayos incluirán normalmente el receptor inhibidor de linfocitos T (y opcionalmente un agente activador del receptor inhibidor de linfocitos T, por ejemplo, el ligando del receptor inhibidor de linfocitos T) o ICOS, respectivamente. La mezcla de ensayo también comprenderá un agente farmacológico candidato. En general, se procesa una pluralidad de mezclas de ensayo en paralelo con diferentes concentraciones de agente para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Normalmente, una de estas concentraciones sirve como control negativo, es decir, a una concentración de cero o por debajo del nivel de detección.

Convenientemente, en estos ensayos, una o más de las moléculas se unirán a un marcador, donde el marcador puede proporcionar directa o indirectamente una señal detectable. Diversos marcadores incluyen radioisótopos, fluorescentes, quimioluminiscentes, enzimas, moléculas de unión específica, partículas, por ejemplo, partículas magnéticas y similares. Las moléculas de unión específica incluyen pares, tales como biotina y estreptavidina, digoxina y antidigoxina, etc. Para los miembros de unión específica, el miembro complementario normalmente se marcará con una molécula que proporciona detección, de acuerdo con procedimientos conocidos.

Un ensayo de selección de interés se refiere a agentes que interfieren con la activación de un receptor inhibidor de linfocitos T por su ligando o ligandos afines o que activan la señalización de ICOS. La cuantificación de la activación puede conseguirse mediante una serie de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la activación de linfocitos T puede determinarse cuantificando la proliferación celular, la liberación de citocinas, etc.

Otros ensayos de interés se refieren a agentes que bloquean la unión del receptor inhibidor de linfocitos T a su o sus contra receptores o ligando. La mezcla de ensayo comprenderá al menos una porción del contra receptor natural o un oligopéptido que comparta suficiente similitud de secuencia para proporcionar una unión específica y el agente farmacológico candidato. El oligopéptido puede ser de cualquier longitud susceptible a las condiciones y requisitos del ensayo, por lo general de al menos aproximadamente 8 aa de longitud y hasta la proteína de longitud completa o fusión de la misma. El receptor inhibidor de linfocitos T puede unirse a un sustrato insoluble. El sustrato puede hacerse en una amplia diversidad de materiales y formas, por ejemplo, placa de microtitulación, microperla, varilla, partícula de resina, etc. El sustrato se elige para minimizar el fondo y maximizar la relación señal/ruido. La unión puede cuantificarse mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Después de un período de incubación suficiente para permitir que la unión alcance el equilibrio, el soporte insoluble se lava y el marcador restante se cuantifica. Los agentes que interfieren con la unión disminuirán el marcador detectado.

Como referencia, los agentes bloqueadores o estimuladores abarcan numerosas clases químicas, aunque normalmente son moléculas orgánicas, preferentemente compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular de más de 50 y menos de aproximadamente 2.500 Dalton. Los agentes bloqueadores o estimuladores comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, en particular enlaces de hidrógeno, e incluyen normalmente al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo, sulfhidrilo o carboxilo, preferentemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Como referencia, los agentes bloqueadores o estimuladores con frecuencia comprenden estructuras cíclicas de carbono o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Como referencia,

también se encuentran agentes bloqueadores o estimuladores entre biomoléculas que incluyen péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos. En la presente invención, los agentes bloqueadores o estimuladores candidatos son anticuerpos.

5 Los agentes bloqueadores o estimuladores que se describen en el presente documento se obtienen a partir de una amplia diversidad de fuentes que incluyen bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, se dispone de numerosos medios para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia diversidad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos aleatorizados. Como alternativa, hay disponibles o se producen fácilmente bibliotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales. Adicionalmente, se modifican fácilmente bibliotecas y compuestos producidos de manera natural o sintética a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales. Pueden someterse agentes farmacológicos conocidos a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidación para producir análogos estructurales.

15 Puede incluirse una diversidad de otros reactivos en el ensayo de selección. Éstos incluyen reactivos como sales, proteínas neutras, por ejemplo, albúmina, detergentes, etc. que pueden usarse para facilitar la unión proteína-ADN óptima y/o reducir las interacciones no específicas o de fondo. También pueden usarse reactivos que mejoren de otro modo la eficacia del ensayo, tales como inhibidores de proteasa, inhibidores de nucleasas, agentes antimicrobianos, etc.

20 Pueden obtenerse anticuerpos adecuados para su uso como agentes bloqueadores o agentes estimuladores mediante la inmunización de un animal hospedador con péptidos que comprendan todo o una parte del receptor inhibidor de linfocitos T o la proteína ICOS, respectivamente. Los animales hospedadores adecuados incluyen ratón, rata, cabra, hámster, conejo, etc. El origen del inmunógeno proteico puede ser el ratón, el ser humano, la rata, el mono, etc. El animal hospedador generalmente será una especie diferente del inmunógeno, por ejemplo, receptor inhibidor de linfocitos T de ratón utilizado para inmunizar hámsteres, receptor inhibidor de linfocitos T humano para inmunizar ratones, etc. El receptor inhibidor de linfocitos T humano y de ratón contiene tramos altamente conservados en el dominio extracelular (Harper et al. (1991) *J. Immunol.* 147: 1037-1044). Pueden usarse péptidos derivados de dichas regiones altamente conservadas como inmunógenos para generar anticuerpos específicos cruzados.

25 El inmunógeno puede comprender la proteína completa o fragmentos y derivados de la misma. Los inmunógenos preferidos comprenden la totalidad o una parte del dominio extracelular del receptor inhibidor de linfocitos T humano (por ejemplo, los restos de aminoácido 38-161 de CTLA-4 humano) o la proteína ICOS, donde estos restos contienen las modificaciones postraduccionales, tales como la glucosilación, descubiertas en el receptor inhibidor de linfocitos T nativo. Los inmunógenos que comprenden el dominio extracelular se producen en una diversidad de formas conocidas en la técnica, por ejemplo, la expresión de genes clonados usando métodos recombinantes convencionales, el aislamiento de linfocitos T, poblaciones de células clasificadas que expresan altos niveles del inmunógeno, etc.

40 Cuando se desee la expresión de una proteína recombinante o modificada para la producción de un inmunógeno, se usará un vector que codifique la porción deseada del receptor inhibidor de linfocitos T o la proteína ICOS. En general, un vector de expresión se diseñará de modo que el dominio extracelular del receptor inhibidor de linfocitos T o la proteína ICOS estén sobre la superficie de una célula transfectada o, como alternativa, el dominio extracelular se secrete desde la célula. Cuando se ha de secretar el dominio extracelular, la secuencia de codificación para el dominio extracelular se fusionará, en fase de lectura, con secuencias que permiten la secreción, incluyendo un péptido señal. Los péptidos señal pueden ser exógenos o nativos. Una proteína de fusión de interés para la inmunización une el dominio extracelular del receptor inhibidor de linfocitos T con la región constante de una inmunoglobulina. Por ejemplo, una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de un receptor inhibidor de linfocitos T murino o proteína ICOS unida a la región bisagra del dominio Cg1 humano (bisagra-CH2-CH3) puede usarse para inmunizar hámsteres.

55 Cuando el inmunógeno de receptor inhibidor de linfocitos T o de proteína ICOS ha de expresarse sobre la superficie de la célula, la secuencia de codificación para el dominio extracelular se fusionará, en fase de lectura, con secuencias que codifican un péptido que ancla el dominio extracelular en la membrana y una secuencia de señal. Dichas secuencias de anclaje incluyen el dominio transmembrana nativo del receptor inhibidor de linfocitos T o la proteína ICOS o dominios transmembrana de otras proteínas de superficie celular, por ejemplo, CD4, CD8, slg, etc. Pueden usarse células de ratón transfectadas con el gen del receptor de linfocitos T humano o el gen de ICOS humano para inmunizar ratones y generar anticuerpos específicos para la proteína receptora inhibidora de linfocitos T o la proteína ICOS humanas, respectivamente.

60 Se producen anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales. En general, el bazo y/o los ganglios linfáticos de un animal hospedador inmunizado proporcionan una fuente de células plasmáticas. Las células plasmáticas se inmortalizan mediante fusión con células de mieloma para producir células de hibridoma. El sobrenadante de cultivo de hibridomas individuales se selecciona usando técnicas convencionales para identificar aquellos que producen anticuerpos con la especificidad deseada. Los animales adecuados para la producción de

anticuerpos monoclonales frente a la proteína humana incluyen ratón, rata, hámster, etc. Para generar anticuerpos contra la proteína de ratón, el animal generalmente será un hámster, cobaya, conejo, etc. El anticuerpo puede purificarse a partir del sobrenadante de células de hibridoma o fluido de ascitis mediante técnicas convencionales, por ejemplo, cromatografía de afinidad usando el receptor inhibidor de linfocitos T unido a un soporte insoluble, proteína A sefrosa, etc.

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

Para su uso in vivo, en particular para la inyección en seres humanos, es deseable disminuir la antigenicidad del agente bloqueador o agente estimulador. Una respuesta inmunitaria de un receptor contra el agente bloqueador disminuirá potencialmente el período de tiempo durante el cual la terapia es eficaz. Se conocen en la técnica métodos para humanizar anticuerpos. El anticuerpo humanizado puede ser el producto de un animal que tiene genes de región constante de inmunoglobulina humana transgénica (véanse, por ejemplo, las Solicitudes de Patente Internacionales WO 90/10077 y WO 90/04036). Como alternativa, el anticuerpo de interés puede diseñarse por ingeniería genética mediante técnicas de ADN recombinante para sustituir los dominios de bisagra CH1, CH2, CH3 y/o el dominio de región marco conservada con la secuencia humana correspondiente (véase el documento WO 92/02190).

El uso de ADNc de Ig para la construcción de genes de inmunoglobulina quimérica es conocido en la técnica (Liu et al. (1987) *P.N.A.S.* 84: 3439 y (1987) *J. Immunol.*, 139: 3521). El ARNm se aísla de un hibridoma u otra célula que produzca el anticuerpo y se usa para producir ADNc. El ADNc de interés puede amplificarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos (Patentes de los EE.UU. número 4.683.195 y 4.683.202). Como alternativa, se crea una biblioteca y se criba para aislar la secuencia de interés. La secuencia de ADN que codifica la región variable del anticuerpo se fusiona después a secuencias de la región constante humana. Las secuencias de genes de regiones constantes humanas pueden encontrarse en Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, publicación del N.I.H. n.º 91-3242. Hay genes de la región C humana disponibles fácilmente a partir de clones conocidos. La elección del isotipo se guiará por las funciones efectoras deseadas, tales como la fijación del complemento o la actividad en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Los isotipos preferidos son IgG1, IgG3 e IgG4. Puede usarse cualquiera de las regiones constantes de la cadena ligera humana, kappa o lambda. El anticuerpo quimérico humanizado se expresa después mediante métodos convencionales.

Pueden prepararse fragmentos de anticuerpo, tales como Fv, F(ab').sub.2 y Fab por escisión de la proteína intacta, por ejemplo, mediante proteasa o escisión química. Como alternativa, se diseña un gen truncado. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una porción del fragmento F(ab').sub.2. incluiría secuencias de ADN que codifican el dominio CHI y la región bisagra de la cadena H, seguidas de un codón de terminación traduccional para producir la molécula truncada.

Pueden usarse secuencias de consenso de regiones H y L_J para diseñar oligonucleótidos para su uso como cebadores para introducir sitios de restricción útiles en la región J para la unión posterior de segmentos de la región V con segmentos de la región C humana. El ADNc de la región C puede modificarse mediante mutagénesis dirigida al sitio para colocar un sitio de restricción en la posición análoga en la secuencia humana.

Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, YAC, episomas derivados de EBV y similares. Un vector conveniente es uno que codifica una secuencia de inmunoglobulina CH o CL humana funcionalmente completa, con sitios de restricción apropiados diseñados por ingeniería genética de manera que cualquier secuencia VH o VL pueda insertarse y expresarse fácilmente. En dichos vectores, el corte y empalme por lo general ocurre entre el sitio donador de corte y empalme en la región J insertada y el sitio aceptor de corte y empalme que precede a la región C humana y también en las regiones de corte y empalme que se producen dentro de los exones CH humanos. La poliadenilación y la terminación de la transcripción se producen en sitios cromosómicos nativos corriente abajo de las regiones codificantes. El anticuerpo quimérico resultante puede unirse a cualquier promotor fuerte, incluyendo LTR retrovíricos, por ejemplo, promotor temprano SV-40 (Okayama et al., (1983) *Mol. Cell. Bio.* 3: 280), LTR del virus del sarcoma de Rous (Gorman et al. (1982) *P.N.A.S.* 79: 6777) y LTR del virus de la leucemia murina de Moloney (Grosschedl et al. (1985) *Cell* 41: 885); promotores 1g nativos, etc.

En una realización, el agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T es un anticuerpo anti-CTLA-4 que se une al dominio extracelular de CTLA-4 e inhibe la señalización anti-CTLA-4. Los anticuerpos anti-CTLA-4 adecuados para su uso en seres humanos incluyen, por ejemplo, ipilimumab (MDX-010) y tremelimumab (CP 675.206). En el presente documento se describe un agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T que es un anticuerpo anti-PD-1 que bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 e inhibe la señalización de PD-1. Los anticuerpos adecuados para su uso en humanos incluyen, por ejemplo, MDX-1106/ONO-4538 y CT011. En otra realización, el agente bloqueador para un receptor inhibidor de linfocitos T es un anticuerpo anti-B7-H1 (PD-1L) que bloquea la

unión de PD-1 a PD-1L e inhibe la señalización de PD-1. En otra realización, el agente bloqueador para un agente inhibidor de linfocitos T es una combinación de un anticuerpo anti-CTLA4 y/o un anticuerpo anti-B7-H1.

5 El agente estimulador de ICOS es un anticuerpo anti-ICOS que se une al dominio extracelular de ICOS y activa la señalización de ICOS, lo que conduce a un aumento en la activación de linfocitos T, por ejemplo, proliferación. También se describe como referencia un agente estimulador de ICOS que es ICOSL recombinante, que puede ser soluble o puede expresarse sobre la superficie de una célula genéticamente modificada.

10 Vectores víricos que codifican agentes bloqueadores o estimuladores y células que expresan los mismos

10 En una realización, el agente o agentes de bloqueo de uno o más receptores inhibidores de linfocitos T y/o el agente estimulador de ICOS se expresan mediante vectores víricos y células transformadas. Por tanto, en una realización, se proporciona una composición para su uso de acuerdo con el primer aspecto, en la que el agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T y/o el anticuerpo anti-ICOS agonista están codificados por un vector vírico.
 15 Además, en un aspecto, la presente invención proporciona i) un agente bloqueador de uno o más receptores inhibidores de linfocitos T seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-PD-L1 que bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 e inhibe la señalización de PD-1; y ii) un anticuerpo anti-ICOS agonista, para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un paciente. La presente invención también proporciona una célula humana aislada para su uso en un método de tratamiento del cáncer, donde la célula humana aislada comprende una construcción que codifica i) un agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-PD-L1 que bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 e inhibe la señalización de PD-1 y ii) un anticuerpo anti-ICOS agonista.

25 Por tanto, el vector vírico y las células humanas aisladas transformadas de la presente invención expresan anticuerpos anti-receptor de linfocitos T para bloquear la señalización por el receptor inhibidor de linfocitos T seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-PD-L1 que bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 e inhibe la señalización de PD-1 y/o un agente estimulador de ICOS que activa la señalización mediada por ICOS, en la que el agente estimulador es un anticuerpo anti-ICOS. En una realización preferida, el vector vírico o las células humanas que expresan el agente o agentes estimuladores bloqueadores y/o
 30 estimuladores son capaces de expresar el agente o agentes próximos a un tumor, en particular un linfocito infiltrante de tumor.

35 Las células humanas que pueden usarse incluyen células tumorales, células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células dendríticas), células B y linfocitos T. Las células desveladas en el presente documento proporcionan una expresión localizada del agente o agentes bloqueadores y/o estimuladores por células próximas a un tumor. Las células pueden modificarse in vivo o, como alternativa, pueden administrarse células modificadas ex vivo a un paciente mediante una diversidad de métodos, tales como por inyección.

40 En una realización, la célula es una célula tumoral. Para la transformación ex vivo, dichas células tumorales pueden irradiarse para eliminar la capacidad de replicación de la célula, como se conoce en la técnica, manteniendo al mismo tiempo la expresión transitoria del agente o agentes bloqueadores y/o estimuladores después de la administración. Para la transformación in vivo, pueden preferirse vectores de expresión no integradores.

45 En ciertas realizaciones preferidas, la célula tumoral es autóloga o endógena. En el primer caso, la célula tumoral se toma de un paciente, se transfecta o transduce con una construcción que codifica el agente o agentes bloqueadores y/o estimuladores y se reintroduce al paciente, por ejemplo, después de la irradiación. En el último caso, la célula tumoral se transforma in vivo mediante la administración local de una construcción apropiada como se describe en el presente documento.

50 En una realización alternativa, la célula tumoral modificada es alógena. Por tanto, la célula tumoral alógena puede mantenerse en una estirpe celular. En este caso, la célula tumoral puede seleccionarse de la estirpe celular, irradiarse e introducirse en la patente.

55 En otra realización alternativa, las células humanas modificadas son células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas o monocitos. En otra realización alternativa, las células humanas modificadas son linfocitos T.

60 Pueden fabricarse células humanas modificadas capaces de producir el agente o agentes bloqueadores y/o estimuladores mediante la transfección y/o la transducción de las células con un vector de expresión que codifica el agente o agentes bloqueadores y/o estimuladores. Los vectores de expresión para la expresión de un agente bloqueador, un agente estimulador o una combinación de agente o agentes bloqueadores y/o agentes estimuladores pueden fabricarse mediante métodos bien conocidos en la técnica.

65 En diversas realizaciones, el agente o agentes bloqueadores y/o estimuladores pueden administrarse a un paciente en forma de una o más construcciones de ácido nucleico.

En una realización, la construcción comprende un vector retrovírico. Los vectores retrovíricos son capaces de

integrar permanentemente el ADN que codifica el agente o agentes estimuladores y/o bloqueadores en el genoma celular. Por tanto, en el caso de la manipulación ex vivo de células autólogas o alogénas, pueden prepararse estirpes celulares estables que produzcan constitutivamente el agente o agentes bloqueadores y/o estimuladores. En una realización preferida, las células se irradian antes de la administración a un paciente. Las células irradiadas producen el agente o agentes bloqueadores y/o estimuladores durante un período de tiempo limitado.

En una realización, la construcción de expresión comprende un vector SFV, que demuestra altos niveles de expresión transitoria en células de mamífero. El vector SFV se describe, por ejemplo, en Lundstrom, *Expert Opin. Biol. Ther.* 3: 771-777 (2003). Por tanto, en el caso de la manipulación in vivo de células endógenas en un paciente, puede conseguirse la expresión transitoria de altos niveles de agente o agentes bloqueadores y/o estimuladores. Esto es para evitar la expresión constitutiva y la activación permanente de los linfocitos T in vivo.

Se conocen en la técnica sistemas capaces de expresar proteína recombinante in vivo. A modo de ejemplo y no de limitación, el sistema puede usar el sistema de expresión de anticuerpo mediado por 2A desvelado en Fang et al., *Nature Biotech.* 23 (5) 2005 y la Publicación de Patente de los EE.UU. 2005/0003506. Se contemplan otros sistemas conocidos en la técnica y también pueden adaptarse para producir agente o agentes bloqueadores y/o estimuladores in vivo como se describen en el presente documento.

La administración de las células que expresan el agente estimulador y/o bloqueador desveladas en el presente documento puede combinarse con la administración de citocinas que estimulen células presentadoras de antígenos tales como factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de macrófagos 1 (M-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), interleucina 3 (IL-3), interleucina 12 (IL-12), etc. o vacunas celulares capaces de expresar dichas citocinas. En realizaciones preferidas, el agente o agentes bloqueadores y/o estimuladores que expresan células se modifican adicionalmente para expresar dichas citocinas. Se pueden emplear proteínas y/o citocinas adicionales para potenciar la proliferación y secreción de linfocitos T, tales como IL-1, IL-2, B7, anti-CD3 y anti-CD28 simultáneamente o secuencialmente con los agentes bloqueadores para aumentar la respuesta inmunitaria. La presente terapia también puede combinarse con cualquiera de las moléculas o realizarse como se describe en la Patente de los EE.UU. N.º 6.051.227.

Vectores y métodos de transformación

Los vectores de expresión que codifican el agente o agentes bloqueadores y/o estimuladores pueden ser víricos o no víricos. Los vectores víricos son preferidos para su uso in vivo. Los vectores de expresión de la invención comprenden un ácido nucleico que codifica un agente bloqueador de un receptor inhibitorio de linfocitos T o un ácido nucleico que codifica un agente estimulador de ICOS, o un complemento del mismo, unido operativamente a una región de control de la expresión, o complemento de la misma, que es funcional en una célula de mamífero. La región de control de la expresión es capaz de conducir la expresión del agente bloqueador y/o estimulador unido operativamente que codifica el ácido nucleico de modo que el agente bloqueador y/o estimulador se produzca en una célula humana transformada con el vector de expresión.

Las regiones de control de la expresión son polinucleótidos reguladores (a veces denominados en el presente documento elementos), tales como promotores y potenciadores, que influyen en la expresión de un ácido nucleico unido operativamente.

Una región de control de la expresión de un vector de expresión de la invención es capaz de expresar ácido nucleico codificante unido operativamente en una célula humana. En una realización, la célula es una célula tumoral. En una realización, la célula es una célula no tumoral.

En una realización, la región de control de la expresión confiere una expresión regulable a un ácido nucleico unido operativamente. Una señal (a veces denominada un estímulo) puede aumentar o disminuir la expresión de un ácido nucleico unido operativamente a dicha región de control de la expresión. Dichas regiones de control de la expresión que aumentan la expresión en respuesta a una señal con frecuencia se denominan inducibles. Dichas regiones de control de la expresión que disminuyen la expresión en respuesta a una señal con frecuencia se denominan reprimibles. Normalmente, la cantidad de aumento o disminución conferida por dichos elementos es proporcional a la cantidad de señal presente; cuanto mayor es la cantidad de señal, mayor es el aumento o disminución de la expresión.

Se prefieren especialmente para su uso en la presente invención los promotores inducibles capaces de efectuar un alto nivel de expresión transitoriamente en respuesta a una señal. Cuando está en la proximidad de una célula tumoral, una célula transformada con un vector de expresión para el agente o agentes bloqueadores y/o estimuladores que comprende dicha secuencia de control de la expresión se induce para producir transitoriamente un alto nivel de ligando de ICOS mediante la exposición de la célula transformada a una señal apropiada.

Las regiones de control de la expresión inducibles preferidas incluyen las que comprenden un promotor inducible que se estimula con una señal tal como un compuesto químico de molécula pequeña. Pueden encontrarse ejemplos particulares, por ejemplo, en las Patentes de los EE.UU. N.º 5.989.910, 5.935.934, 6.015.709 y 6.004.941.

Las regiones de control de la expresión incluyen secuencias promotoras de longitud completa, tales como elementos promotores y potenciadores nativos, así como subsecuencias o variantes de polinucleótidos que conservan la totalidad o parte de la función de la longitud completa o la no variante. Como se usa en el presente documento, el término "funcional" y variantes gramaticales del mismo, cuando se usan en referencia a una secuencia, subsecuencia o fragmento de ácido nucleico, significa que la secuencia tiene una o más funciones de secuencia de ácido nucleico natural (por ejemplo, secuencia de ácido nucleico no variante o sin modificar).

Como se usa en el presente documento, "enlace operable" se refiere a una yuxtaposición física de los componentes descritos de esta manera para permitirles funcionar de la manera prevista. En el ejemplo de un elemento de control de la expresión en enlace operable con un ácido nucleico, la relación es de manera que el elemento de control modula la expresión del ácido nucleico. Normalmente, una región de control de la expresión que modula la transcripción se yuxtapone cerca del extremo 5' del ácido nucleico transcrito (es decir, "corriente arriba"). Las regiones de control de la expresión también pueden localizarse en el extremo 3' de la secuencia transcrita (es decir, "corriente abajo") o dentro del transcrito (por ejemplo, en un intrón). Los elementos de control de la expresión pueden ubicarse a distancia de la secuencia transcrita (por ejemplo, de 100 a 500, de 500 a 1000, de 2000 a 5000 o más nucleótidos desde el ácido nucleico). Un ejemplo específico de un elemento de control de la expresión es un promotor, que por lo general se ubica en posición 5' de la secuencia transcrita. Otro ejemplo de un elemento de control de la expresión es un potenciador, que puede localizarse en posición 5' o 3' de la secuencia transcrita o dentro de la secuencia transcrita.

Se conocen bien en la técnica sistemas de expresión funcionales en células humanas e incluyen sistemas víricos. En general, un promotor funcional en una célula humana es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a ARN polimerasa de mamífero e iniciar la transcripción corriente abajo (3') de una secuencia codificante de ligando de ICOS en ARNm. Un promotor tendrá una región de iniciación de la transcripción, que por lo general se coloca próxima al extremo 5' de la secuencia de codificación, y normalmente una caja TATA ubicada a 25-30 pares de bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. Se cree que la caja TATA dirige la ARN polimerasa II para comenzar la síntesis de ARN en el sitio correcto. Un promotor también contendrá normalmente un elemento promotor corriente arriba (elemento potenciador), ubicado normalmente dentro de 100 a 200 pares de bases corriente arriba de la caja TATA. Un elemento promotor corriente arriba determina la velocidad a la cual se inicia la transcripción y puede actuar en cualquier orientación. De uso particular como promotores son los promotores de genes víricos de mamíferos, puesto que los genes víricos con frecuencia se expresan altamente y tienen una amplia gama de hospedadores. Los ejemplos incluyen el promotor temprano de SV40, el promotor de LTR de virus de tumor mamario de ratón, el promotor tardío principal de adenovirus, el promotor del virus del herpes simple y el promotor de CMV.

Normalmente, las secuencias de poliadenilación y terminación de la transcripción reconocidas por células de mamífero son regiones reguladoras ubicadas en 3' con respecto al codón de terminación de la traducción y, por tanto, junto con los elementos promotores, flanquean la secuencia codificante. El extremo 3' del ARNm maduro se forma mediante poliadenilación y escisión postraduccionales específicas de sitio. Los ejemplos de señales terminadoras de la transcripción y de poliadenilación incluyen las derivadas de SV40. Los intrones también pueden incluirse en construcciones de expresión.

Existe una diversidad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, sistemas basados en polímeros, DEAE-dextrano, transducción vírica, el método de precipitación de fosfato de calcio, etc. Para la transferencia génica *in vivo*, también pueden usarse varias técnicas y reactivos, incluyendo liposomas; vehículos de entrega basados en polímeros naturales, tales como quitosano y gelatina; también se prefieren vectores víricos para la transducción *in vivo* (por ejemplo, Dzau et al., *Trends in Biotechnology* 11, 205-210 [1993]). En algunas situaciones, es deseable proporcionar un agente de dirección, tal como un anticuerpo o ligando específico para una proteína de membrana de superficie celular tumoral. Cuando se emplean liposomas, pueden usarse proteínas que se unen a una proteína de membrana de superficie celular asociada a endocitosis para dirigir y/o facilitar la captación, por ejemplo, proteínas de cápside o fragmentos de las mismas trópicas para un tipo celular particular, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en la ciclación, proteínas que se dirigen a la localización intracelular y potencian la semivida intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptor se describe, por ejemplo, por Wu et al., *J. Biol. Chem.* 262, 4429-4432 (1987); y Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3410-3414 (1990). Para la revisión de protocolos de terapia génica, véase Anderson et al., *Science* 256, 808-813 (1992).

Cuando sea apropiado, también pueden emplearse agentes de entrega génica tales como, por ejemplo, secuencias de integración. Se conocen en la técnica numerosas secuencias de integración (véase, por ejemplo, Nunes-Duby et al., *Nucleic Acids Res.* 26: 391-406, 1998; Sadwoski, *J. Bacteriol.*, 165: 3413-3417, 1986; Bestor, *Cell*, 122 (3): 322-325, 2005; Plasterk et al., *TIG* 15: 326-332, 1999; Kootstra et al., *Ann. Rev. Pharm. Toxicol.*, 43: 413-439, 2003). Éstas incluyen recombinasas y transposasas. Los ejemplos incluyen Cre (Sternberg y Hamilton, *J. Mol. Biol.*, 150: 467-486, 1981), lambda (Nash, *Nature*, 247, 543-545, 1974), Flp (Broach, et al, *Cell*, 29: 227-234, 1982) R (Matsuzaki et al., *J. Bacteriology*, 172: 610-618, 1990), ϕ C31 (Véase, por ejemplo, Groth et al., *J. Mol. Biol.* 335: 667-678, 2004), bella durmiente, transposasas de la familia mariner (Plasterk et al., citado anteriormente) y componentes para integrar

virus tales como AAV, retrovirus y Antivirus que tienen componentes que proporcionan integración de virus tales como las secuencias LTR de retrovirus o lentivirus y las secuencias ITR de AAV (Kootstra et al., *Ann. Rev. Pharm. Toxicol.*, 43: 413-439, 2003).

5 Vectores víricos

En una realización, el agente bloqueador y/o el anticuerpo anti-ICOS agonista están codificados por un vector de expresión. En una realización, un vector de expresión es un vector vírico. Se conocen muchos vectores víricos útiles para la terapia génica (véase, por ejemplo, Lundstrom, *Trends Biotechnol.*, 21: 117, 122, 2003).

10 Los vectores víricos preferidos incluyen los seleccionados entre el grupo que consiste en Antivirus (LV), retrovirus (RV), adenovirus (AV), virus adenoasociados (AAV) y alfa virus, aunque también pueden usarse otros vectores víricos. Para sus usos in vivo, se prefieren vectores víricos que no se integren en el genoma del hospedador, tales como los alfa virus y los adenovirus, prefiriéndose especialmente los alfa virus. Los tipos preferidos de alfa virus incluyen el virus Sindbis, el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) y el virus del bosque de Semliki (SFV), prefiriéndose especialmente el SFV. Véase, por ejemplo, Lundstrom, *Expert Opin. Biol. Ther.* 3: 771-777, 2003; Afanasieva et al. *Gene Ther.*, 10: 1850-59, 2003. Para sus usos in vitro, se prefieren los vectores víricos que se integran en el genoma del hospedador, tales como retrovirus, AAV y Antivirus.

20 En una realización preferida, el vector vírico proporciona una expresión de alto nivel transitoria en una célula humana transducida.

En una realización, el vector vírico no proporciona la integración del agente bloqueador y/o estimulador que codifica el ácido nucleico en el genoma de una célula humana transducida.

25 En otra realización, el vector vírico proporciona la integración de un agente bloqueador y/o estimulador que codifica ácido nucleico en el genoma de una célula humana transducida.

30 En una realización, la invención proporciona métodos de transducción de una célula humana in vivo, que comprende poner en contacto un tumor sólido in vivo con un vector vírico de la invención.

En otra realización, la invención proporciona métodos de transducción de una célula humana ex vivo, que comprende poner en contacto una célula humana ex vivo con el vector vírico del agente bloqueador y/o estimulador de la invención. En una realización, la célula humana es una célula tumoral. En una realización, la célula humana es alógena. En una realización, la célula tumoral deriva del paciente. En una realización, la célula humana es una célula no tumoral, tal como, por ejemplo, una célula presentadora de antígeno (APC) o un linfocito T.

40 Pueden modificarse capas de partículas víricas para alterar la especificidad y mejorar la dirección celular/tisular, como es bien sabido en la técnica. También pueden entregarse vectores víricos en otros vehículos, por ejemplo, liposomas. Los liposomas también pueden tener restos de dirección unidos a su superficie para mejorar la dirección celular/tisular.

45 La presente solicitud se refiere a una célula humana aislada que expresa el agente bloqueador y/o estimulador, para su uso en un método de tratamiento del cáncer, en la que la célula humana aislada comprende una construcción que codifica i) un agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-PD-L1 que bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 e inhibe la señalización de PD-1 y ii) un anticuerpo anti-ICOS agonista. En ciertas realizaciones, la célula humana expresa el anticuerpo anti-ICOS agonista próximo a una célula tumoral, por ejemplo, en un paciente con cáncer. Por tanto, la célula humana es capaz de la expresión localizada del ligando en una célula tumoral o masa celular tumoral. El anticuerpo anti-ICOS puede activar la señalización de ICOS en células próximas a dicha célula tumoral y/o romper la tolerancia inmunitaria contra un autoantígeno asociado a tumor y estimular una respuesta de linfocitos T autorreactivos a dicha célula tumoral. En una realización preferida, la expresión localizada del anticuerpo anti-ICOS reduce o inhibe las respuestas inmunitarias adversas no deseadas.

55 No es necesario para la práctica de la invención que se entienda el mecanismo de acción. Las células y composiciones para su uso en un método de tratamiento del cáncer descrito en el presente documento proporcionan células humanas próximas a células tumorales o masas de células tumorales. La expresión de los agentes estimuladores de ICOS y, opcionalmente, los agentes bloqueadores de proteínas inhibitoras de linfocitos T o citocinas adicionales en la proximidad de las células tumorales potencia las respuestas inmunitarias antitumorales.

60 Métodos de tratamiento

65 En el presente documento se describe un método de tratamiento de un paciente aquejado de cáncer que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de un agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T y agente estimulador de ICOS. El método descrito en el presente documento se refiere al tratamiento del cáncer. Como se ha definido anteriormente, la presente invención

proporciona composiciones, vectores víricos y una célula humana aislada para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un paciente y el uso del vector vírico en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de cánceres incluyen leucemias y tumores sólidos (por ejemplo, melanomas, carcinomas, sarcomas, linfomas, etc.). Los cánceres sólidos más comunes incluyen cáncer de vejiga, cáncer óseo (osteosarcoma), cáncer colorrectal, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de esófago, linfoma de Hodgkin, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma, mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de piel (melanoma y no melanoma), carcinoma de tejidos blandos, cáncer gástrico, cáncer testicular, cáncer de tiroides y cáncer de endometrio.

Las composiciones farmacéuticas administradas con frecuencia comprenderán adicionalmente uno o más tampones (por ejemplo, solución salina tamponada neutra o solución salina tamponada con fosfato), hidratos de carbono (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa o dextranos), manitol, proteínas, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio, hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado, etc.), bacteriostáticos, agentes quelantes tales como EDTA o glutatión, solutos que hacen que la formulación sea isotónica, hipotónica o débilmente hipertónica con la sangre de un receptor, agentes de suspensión, agentes espesantes, conservantes, aromatizantes, edulcorantes y compuestos colorantes, según corresponda.

Aunque puede emplearse cualquier vehículo adecuado conocido por los expertos en la materia en las composiciones, el tipo de vehículo variará normalmente dependiendo del modo de administración. Las composiciones terapéuticas pueden formularse para cualquier forma de administración apropiada, incluyendo, por ejemplo, la administración oral, nasal, mucosa, rectal, vaginal, tópica, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea e intramuscular.

Para administración parenteral, las composiciones pueden administrarse como dosificaciones inyectables de una solución o suspensión de los agentes bloqueadores de uno o más receptores inhibidores de linfocitos T, el anticuerpo anti-ICOS agonista, un vector de expresión que expresa uno o más agentes bloqueadores de un receptor inhibidor de linfocitos T y/o anticuerpo anti-ICOS agonista, células humanas aisladas transformadas con vectores de expresión que expresan uno o más agentes bloqueadores de un receptor inhibidor de linfocitos T y/o un anticuerpo anti-ICOS agonista o una combinación de los mismos, en un diluyente fisiológicamente aceptable con un vehículo farmacéutico que puede ser un líquido estéril tal como agua estéril apirógena, aceites, solución salina, glicerol, polietilenglicol o etanol. Adicionalmente, pueden estar presentes en las composiciones sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias tamponantes del pH y similares. Otros componentes de las composiciones farmacéuticas son los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, soluciones no acuosas de aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, oleato de etilo y miristato de isopropilo.

Los agentes bloqueadores y/o estimuladores que se describen en el presente documento (que incluyen vectores de expresión y/o células transformadas que expresan dichos agentes bloqueadores y/o estimuladores) pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de dosis múltiples, tales como bolsas de infusión selladas, ampollas o viales. Dichos contenedores normalmente están sellados de manera que se conserve la esterilidad y estabilidad de la formulación hasta su uso. En general, las formulaciones pueden conservarse como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, como se ha indicado anteriormente. Como alternativa, una composición farmacéutica puede conservarse en un estado liofilizado que requiera solamente la adición de un vehículo líquido estéril inmediatamente antes de su uso.

La cantidad administrada al hospedador variará dependiendo de lo que se administra, del propósito de la administración, tal como la profilaxis o la terapia, del estado del hospedador, de la forma de administración, del número de administraciones, del intervalo entre administraciones y similares. Estos pueden determinarse empíricamente por los expertos en la materia y pueden ajustarse para el alcance de la respuesta terapéutica. Los factores que se han de considerar al determinar una dosis apropiada incluyen, entre otros, el tamaño y el peso del paciente, la edad y el sexo del paciente, la gravedad del síntoma, el estadio de la enfermedad, el método de administración del agente, la semivida de los agentes y la eficacia de los agentes. El estadio de la enfermedad que se ha de considerar incluye si la enfermedad es aguda o crónica, la fase recurrente o remitente y la progresividad de la enfermedad.

La determinación de las dosificaciones y tiempos de administración para una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la experiencia de un experto habitual en la materia. Por ejemplo, una dosis eficaz inicial puede estimarse a partir de cultivos celulares u otros ensayos in vitro. Después, puede formularse una dosis en modelos animales para generar una concentración circulante o concentración de tejido, incluyendo la de la CI50 determinada mediante los ensayos de cultivo celular.

Además, la toxicidad y la eficacia terapéutica se determinan generalmente mediante ensayos de cultivo celular y/o usando animales experimentales, normalmente mediante la determinación de una DL50 (dosis letal para el 50 % de la población de ensayo) y DE₅₀ (eficacia terapéutica en el 50 % de la población de ensayo). La directriz se encuentra en trabajos de referencia convencionales, por ejemplo, *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of*

Therapeutics, 10ª ed. (Hardman, J. G. et al., Eds.) McGraw-Hill, Nueva York, NY (2001).

Para los fines de la presente invención, los métodos de administración se eligen dependiendo de la afección que se está tratando y de la composición farmacéutica. La administración del agente o agentes bloqueadores y/o
 5 estimuladores puede realizarse de una diversidad de maneras, incluyendo, pero no limitadas a, la vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular y posiblemente inyección directa a órganos o tumores específicos, aunque se prefiere la administración sistémica. La administración de las composiciones farmacéuticas puede realizarse a través de una sola vía o simultáneamente por varias vías.

10 Las composiciones pueden administrarse una vez al día, algunas o varias veces al día o incluso múltiples veces al día, dependiendo de, entre otras cosas, la indicación que se está tratando y el criterio del médico que prescribe.

La cantidad de agente bloqueador y/o estimulador necesaria para conseguir un efecto terapéutico puede determinarse empíricamente de acuerdo con procedimientos convencionales para el fin particular. En general, para
 15 administrar las células con fines terapéuticos, las células se administran a una dosis farmacológicamente eficaz. "Cantidad farmacológicamente eficaz" o "dosis farmacológicamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para producir el efecto fisiológico deseado o la cantidad capaz de conseguir el resultado deseado, en particular para tratar el trastorno o afección de enfermedad, incluyendo la reducción o eliminación de uno o más síntomas o manifestaciones del trastorno o enfermedad. Como ilustración, la administración de células a un paciente que
 20 padece cáncer proporciona un beneficio terapéutico no solo cuando la afección subyacente se erradica o mejora, sino también cuando el paciente notifica una disminución en la gravedad o duración de los síntomas asociados a la enfermedad, por ejemplo, una disminución en la carga tumoral que incluye células tumorales diseminadas (CTD), una disminución en los células tumorales circulantes, un aumento en la supervivencia sin progresión. El beneficio terapéutico también incluye detener o ralentizar la progresión de la enfermedad o trastorno subyacente,
 25 independientemente de si se produce una mejoría. La dosis farmacológicamente eficaz, como se ha definido anteriormente, también se aplicará a los compuestos terapéuticos utilizados en combinación con las células, como se describe adicionalmente a continuación.

Preferentemente, el efecto dará como resultado un cambio cuantificable de al menos aproximadamente el 10 %, preferentemente al menos el 20 %, el 30 %, el 50 %, el 70 % o incluso el 90 % o más. El beneficio terapéutico
 30 también incluye detener o ralentizar la progresión de la enfermedad o trastorno subyacente, independientemente de si se produce una mejoría. Cuando la combinación de un agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T y un agente estimulador de ICOS se usa con otros protocolos de tratamiento, una cantidad eficaz está en relación con una combinación de componentes y el efecto no se limita a componentes individuales solos.

Una cantidad farmacológicamente eficaz que tratará el cáncer modulará los síntomas normalmente en al menos aproximadamente un 10 %; por lo general al menos aproximadamente un 20 %; preferentemente al menos aproximadamente un 30 %; o más preferentemente al menos aproximadamente un 50 %. Esto dará como resultado,
 40 por ejemplo, cambios estadísticamente significativos y cuantificables en el número de células afectadas. Esto puede ser una disminución en los números de micrometástasis en órganos distantes, una disminución en la enfermedad metastásica recurrente, etc.

Los agentes bloqueadores y estimuladores que se describen en el presente documento pueden combinarse con otros tratamientos antitumorales, por ejemplo, resección quirúrgica, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y
 45 terapia de apoyo (por ejemplo, analgésicos, diuréticos, antidiuréticos, antivíricos, antibióticos, complementos nutricionales, agentes terapéuticos para la anemia, agentes terapéuticos para la coagulación de la sangre, productos terapéuticos óseos y productos terapéuticos psiquiátricos y psicológicos). Dichos otros tratamientos antitumorales, que incluyen el tratamiento con uno o más agentes bloqueadores de uno o más receptores inhibidores de linfocitos T, pueden proporcionarse secuencialmente (por ejemplo, antes o después) o simultáneamente con la administración
 50 del agente estimulador de ICOS.

Ejemplos

Ejemplo 1: Agentes estimuladores de ICOS potencian los efectos antitumorales del anticuerpo anti-CTLA-4 y el anticuerpo anti-PD-L1.
 55

Ejemplo 1.1: Efecto de un agente estimulador de anticuerpo ICOS sobre la proliferación de linfocitos T CD4⁺.

Se prepararon linfocitos T CD4⁺ a partir de bazo de ratones C57BL/6 mediante el kit de selección negativo de linfocitos T CD4⁺ murinos Dynal de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se estimularon cincuenta mil linfocitos T CD4⁺ en una placa de 96 pocillos recubierta previamente con o sin mAb anti-CD3 [0,5 µg/ml] y 2 µg/ml de anti-CD28, 5 µg/ml de mAb anti-ICOS (clones C398.4A y 7E.17G9). Las células se incubaron a 37 °C, en un 5 % de CO₂, durante 72 h y se añadió 1 µci de 3H-timidina a cada pocillo 8 h antes del final del cultivo. La placa se recogió y se analizó para la incorporación de 3H-timidina.
 65

Como se muestra en la FIG. 1, los anticuerpos anti-ICOS potenciaron la proliferación de linfocitos T CD4⁺ en

presencia de anticuerpo anti-CD3.

Ejemplo 1.2: Correlación indirecta entre la expresión de ICOS inducida por anti-CTLA-4 y el crecimiento tumoral

- 5 Se expusieron ratones con 2×10^4 células tumorales B16/F10. Los ratones no se trataron o se trataron. Los animales tratados recibieron 200 μg de anticuerpo anti-CTLA-4 el día 3 y 100 μg de anticuerpo anti-CTLA-4 los días 6, 9, 12, 15, 18 y 21 después de la exposición al tumor. Se controlaron el crecimiento tumoral y los niveles de ICOS sobre linfocitos T efectores $\text{CD4}^+\text{FOXP3}^-$ en la sangre cada tres días.
- 10 Como se muestra en la FIG. 2, las células $\text{CD4}^+\text{FOXP3}^-$ aisladas de animales tratados expresaron niveles aumentados de ICOS. Adicionalmente, la expresión incrementada de ICOS se relacionó indirectamente con la carga tumoral (FIG. 2).

15 **Ejemplo 1.3:** Ratones ICOS⁻ o ICOSL⁻ mostraron una respuesta antitumoral reducida mediada por anticuerpo anti-CTLA-4.

Ratones C57BL/6 de tipo silvestre, ratones C57BL/6 deficientes en ICOS y ratones C57BL/6 deficientes en ligando de ICOS (ICOSL) que llevaban tumores B16/BL6 no se trataron o se trataron por vía subcutánea (el día 3 después de la implantación del tumor) con 1×10^6 B16 productoras de GM-CSF irradiadas (GVAX) y anti-CTLA-4 por vía intraperitoneal (9H10), a una dosificación de 0,2, 0,1 y 0,1 mg los días 3, 5 y 7, respectivamente. Se controló el crecimiento tumoral y se calculó el porcentaje de supervivencia el día 80.

25 Los ratones deficientes de tipo silvestre, los deficientes en ICOS o los deficientes en ICOSL que llevaban tumores y se dejaron sin tratar murieron entre 25 y 41 días después de la implantación del tumor (círculo abierto, triángulo abierto y cuadrado abierto respectivamente). Por el contrario, se observó una supervivencia del 90 % cuando los ratones de tipo silvestre se trataron con GVAX y terapia de combinación anti-CTLA-4 (círculos cerrados). Sorprendentemente, los ratones deficientes en ICOS (triángulos cerrados) y los deficientes en ICOSL (cuadrados cerrados) mostraron una protección significativamente menor después de ser tratados con GVAX y anticuerpo anti-CTLA-4, demostrando un papel clave para esta interacción del par ligando/receptor durante la terapia de combinación GVAX/anti-CTLA-4.

Ejemplo 1.4: Efecto antitumoral potenciado usando GVAX, anticuerpo anti-CTLA-4 y anticuerpo anti-ICOS.

35 Ratones expuestos a 5×10^4 células tumorales B16/BL6 (1) no se trataron, (2) se trataron con 1×10^6 B16 productoras de GM-CSF irradiadas solamente (GVAX; vía subcutánea 3, 6 y 9 días después de la implantación), (2) se trataron con 1×10^6 GVAX irradiado (vía subcutánea 3, 6 y 9 días después de la implantación), 200 μg de anticuerpo anti-CTLA-4 (el día 3 después de la implantación tumoral) y 100 μg de anticuerpo anti-CTLA-4 (los días 6, 9, 13 y 17 después de la implantación del tumor) o (3) se trataron con 1×10^6 GVAX irradiado (3, 6 y 9 días después de la implantación), 200 μg de anticuerpo anti-CTLA-4 (día 3 después de la implantación tumoral), 100 μg de anticuerpo anti-CTLA-4 (los días 6, 9, 13 y 17 después de la implantación del tumor) y 200 μg de anticuerpo anti-ICOS (los días 3, 6, 9, 13 y 17 después de la implantación del tumor). Se controló el crecimiento tumoral y se calculó la supervivencia el día 80.

45 Como se muestra en la FIG. 4, el tratamiento de animales con una combinación de GVAX, anticuerpo anti-CTLA-4 y anticuerpo anti-ICOS dio como resultado un crecimiento tumoral retardado en comparación con el tratamiento de los animales con GVAX y anticuerpo anti-CTLA-4 solamente. Este hallazgo es coherente con el hallazgo de que los ratones tratados con GVAX con anticuerpos anti-CTLA-4 y anti-ICOS presentan mayores tasas de supervivencia en comparación con ratones tratados con GVAX y anticuerpo anti-CTLA4 solamente (Figura 5).

50 **Ejemplo 1.5:** Efecto antitumoral potenciado usando anticuerpos anti-ICOS y anti-PD-LI.

Ratones que llevaban B16/BL6 de tres días no se trataron o se trataron por vía subcutánea (el día 3 después de la implantación del tumor) con 1×10^6 B16 productoras de GM-CSF irradiadas (GVAX) y anticuerpo anti-ICOS por vía intraperitoneal (7E.17G9), anticuerpo anti-PD-LI (10F.9G2) o la combinación a una dosificación de 0,2, 0,1 y 0,1 mg los días 3, 5 y 7 respectivamente. Se controló el crecimiento tumoral y se calculó el porcentaje de supervivencia el día 80.

60 Los ratones tratados con una combinación de GVAX y anticuerpo anti-ICOS o GVAX y anticuerpo anti-PD-LI mostraron tasas de supervivencia malas (Figura 6). Por el contrario, la terapia de combinación usando anticuerpo anti-PD-LI, anticuerpo anti-ICOS y GVAX dio como resultado una supervivencia del 50 %, demostrando un potente efecto sinérgico obtenido con la combinación de anticuerpo anti-ICOS (7E.17G9) con anticuerpo anti-PD-LI (10F.9G2) y GVAX.

Ejemplo 2: Uso de células tumorales que expresan ligando de ICOS como vacuna antitumoral

65 **Ejemplo 2.1**

Ejemplo 2.1.1: Anticuerpos.

Se adquirió anti-CTLA4 (clon 9H10) de Bio X Cell.

5 **Ejemplo 2.1.2:** Estirpes celulares

La estirpe celular de melanoma B16/BL6 altamente oncogénica y poco inmunógena se usó para la exposición tumoral. Se usó GM-CSF que expresa B16/BL6, denominado en el presente documento GVAX, para el tratamiento de ratones que llevan tumores. Se generó B16-Thy1.1 a través de la transducción retroviral de células B16/BL6 con el vector MSCV-IRES-Thy1.1 que fue un regalo del Dr. Leo Lefrancois en la Universidad de Connecticut. Se generó B16-mICOSL a través de la transducción retroviral de células B16/BL6 con el vector MSCV-ICOSL que expresa la longitud completa de ICOSL de ratón (regalo del Dr. William Sha, Universidad de California, Berkeley). Las células GVAX también se transdujeron con el vector MSCV-ICOSL para generar GVAX-mICOSL.

15 **Ejemplo 2.1.3:** Experimentos de exposición y tratamiento de tumores.

Se inyectaron ratones por vía intradérmica en el flanco derecho el día 0 con 50.000 células de melanoma B16/BL6 y se trataron los días 3, 6, 9 y 12 con $7,5 \times 10^5$ GVAX irradiado (150 Gy) mezclado con $7,5 \times 10^5$ B16/BL6Thy1.1 irradiadas (150 Gy) (n = 10) o B16-mICOSL (n = 10) en el flanco izquierdo, en combinación con 100 µg de anti-CTLA4 por vía intraperitoneal (200 µg el día 3). El crecimiento tumoral y el rechazo se controlaron a lo largo del tiempo.

Se inyectaron ratones por vía intradérmica en el flanco derecho el día 0 con 20.000 células de melanoma B16/BL6 y se trataron o no los días 3, 6, 9 y 12 con 1×10^6 GVAX irradiado (150 Gy) (n = 10) o GVAX-mICOSL (n = 10) en el flanco izquierdo, en combinación con 100 µg de anti-CTLA4 por vía intraperitoneal (200 µg el día 3). El crecimiento tumoral y el rechazo se controlaron a lo largo del tiempo.

Se inyectaron ratones por vía intradérmica en el flanco derecho el día 0 con 20.000 células de melanoma B16/BL6 y se trataron o no los días 3, 6, 9 y 12 con 1×10^6 B16/BL6-Thy1.1 irradiadas (150 Gy) (n = 10) o B16-mICOSL (n = 10) en el flanco izquierdo, con o sin 100 µg de anti-CTLA4 pro vía intraperitoneal (200 mg el día 3). El crecimiento tumoral y el rechazo se controlaron a lo largo del tiempo.

Se inyectaron ratones por vía intradérmica en el flanco derecho el día 0 con 20.000 células de melanoma B16/F10 y se trataron o no los días 3, 6, 9 y 12 con 1×10^6 B16-mICOSL irradiadas (150 Gy) (n = 5) en el flanco izquierdo, con o sin 100 µg de anti-CTLA4 por vía intraperitoneal (200 µg el día 3). El crecimiento tumoral y el rechazo se controlaron a lo largo del tiempo.

Ejemplo 2.2: Resultados

40 La vacuna celular B16 que expresaba ICOSL, en ausencia o presencia de GVAX, no aumentó la tasa de protección frente a tumores más allá de la terapia de combinación anterior de GVAX y bloqueo de CTLA-4 (Figuras 7 y 8).

En el entorno sin GM-CSF, la vacuna celular de B16 que expresa ICOSL tiene un efecto sinérgico junto con el bloqueo de CTLA-4 para proporcionar un retraso en el crecimiento tumoral y/o una ventaja global en el rechazo tumoral (FIG. 9-12).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende un anticuerpo anti-ICOS agonista para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en la que dicho anticuerpo anti-ICOS agonista es para su uso en combinación con un agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-PD-L1 que bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 e inhibe la señalización de PD-1.
- 10 2. Una composición que comprende un agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-PD-L1 que bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 e inhibe la señalización de PD-1, para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en la que dicho agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T se usa en combinación con un anticuerpo anti-ICOS agonista.
- 15 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T es un anticuerpo anti-CTLA-4 bloqueador.
- 20 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T es un anticuerpo anti-PD-L1 que bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 e inhibe la señalización de PD-1.
- 25 5. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T y el anticuerpo anti-ICOS agonista son para la administración simultánea o secuencial a un paciente.
- 30 6. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T y/o el anticuerpo anti-ICOS agonista están codificados por un vector vírico.
- 35 7. Un vector vírico que codifica i) un agente bloqueador de uno o más receptores inhibidores de linfocitos T seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-PD-L1 que bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 e inhibe la señalización de PD-1; y ii) un anticuerpo anti-ICOS agonista, para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un paciente.
- 40 8. Uso de un vector vírico como se define en la reivindicación 7, en la fabricación de una célula de cáncer transfectada o transducida para el tratamiento del cáncer.
9. Una célula humana aislada para su uso en un método de tratamiento del cáncer, en la que la célula humana aislada comprende una construcción que codifica i) un agente bloqueador de un receptor inhibidor de linfocitos T seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-PD-L1 que bloquea la unión de PD-1 a PD-L1 e inhibe la señalización de PD-1 y ii) un anticuerpo anti-ICOS agonista.

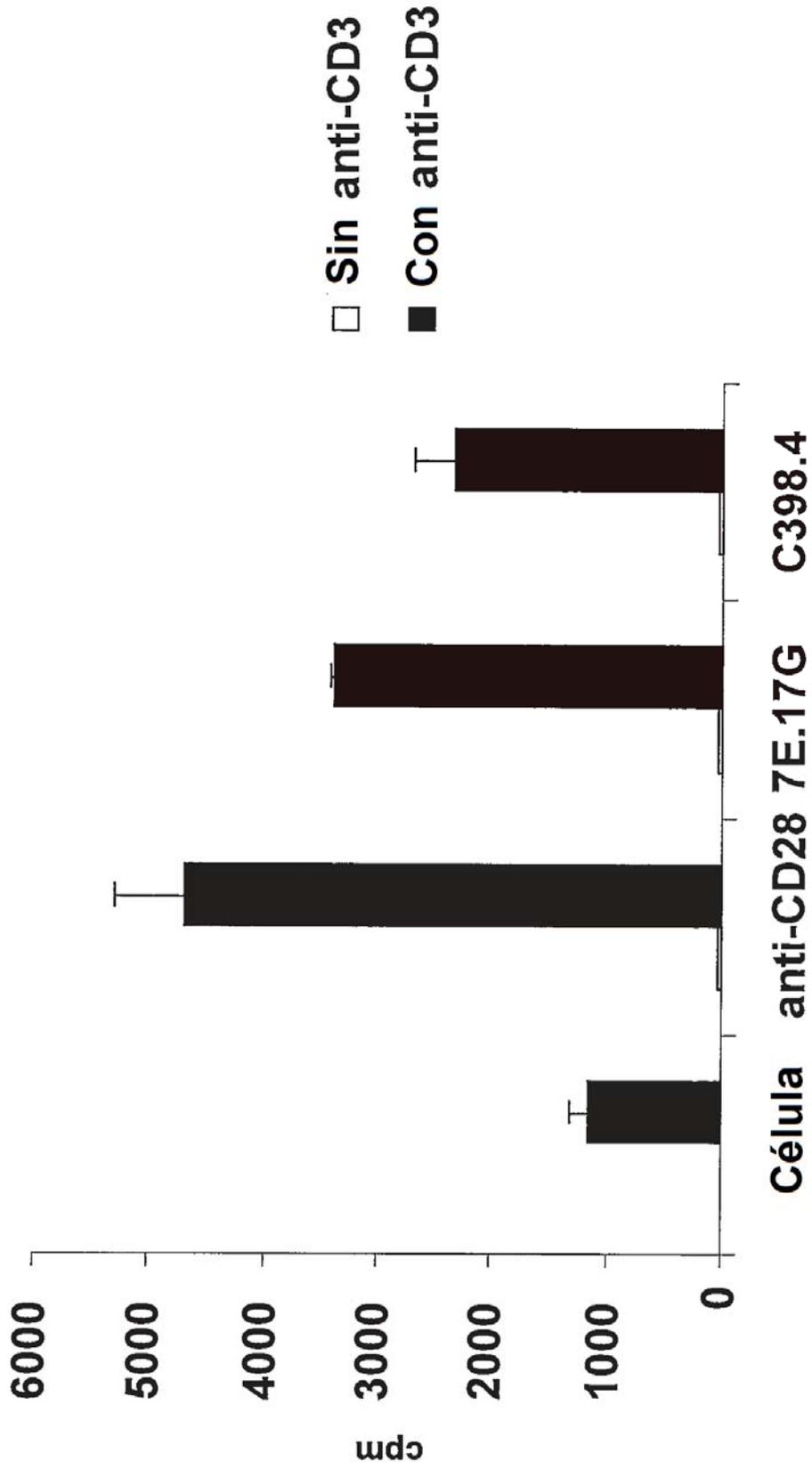


FIG. 1

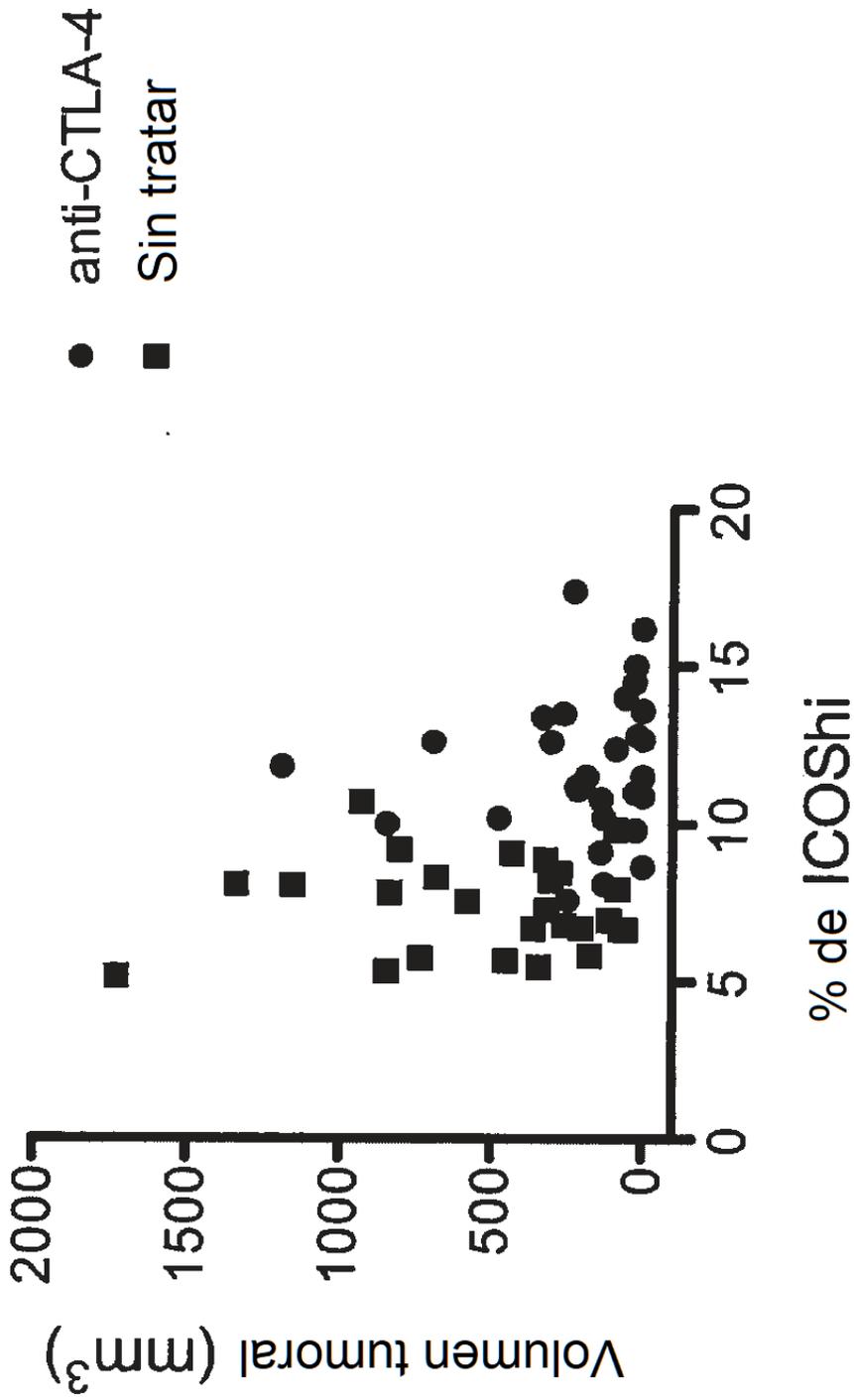


FIG. 2

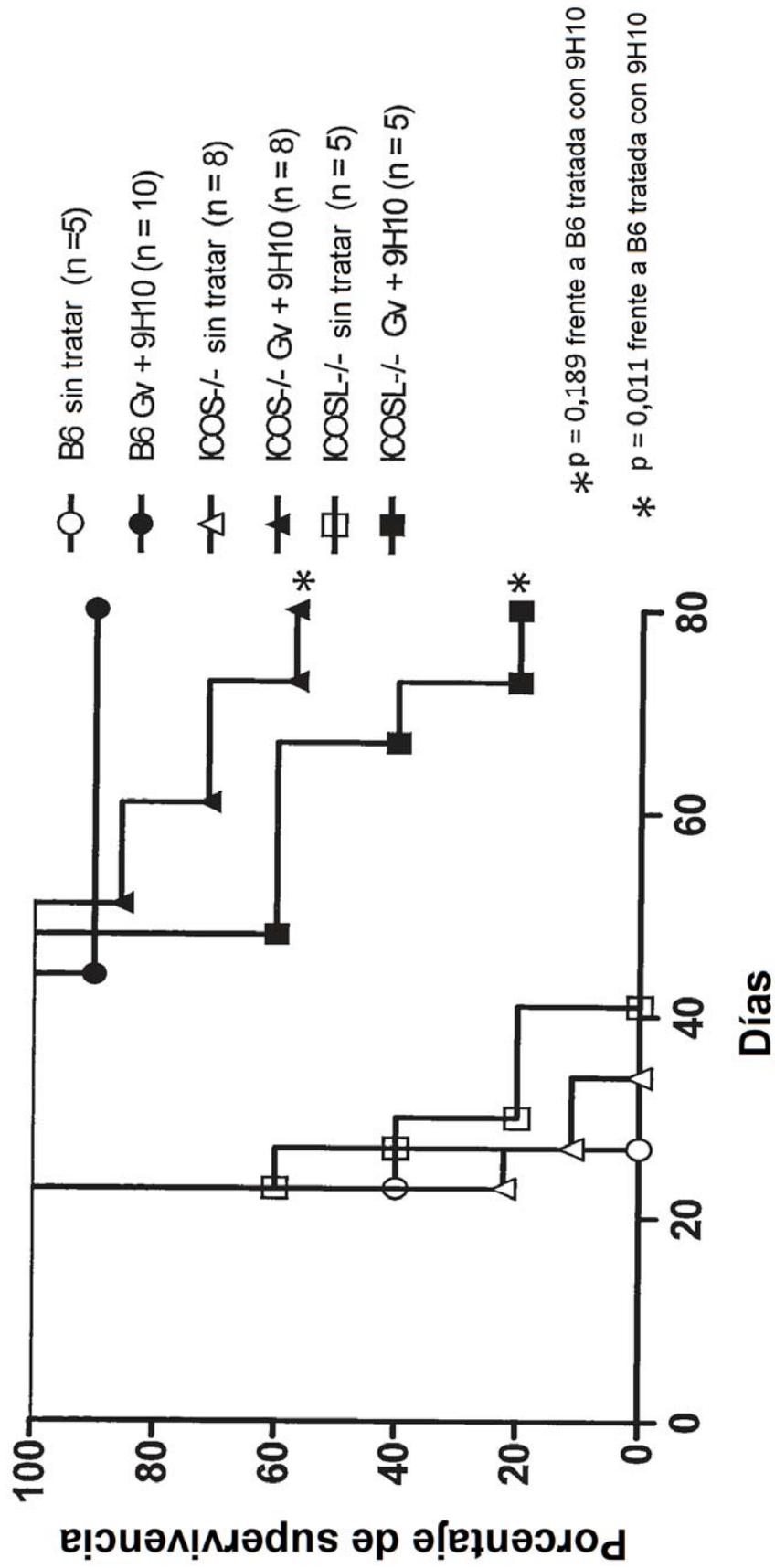


FIG. 3

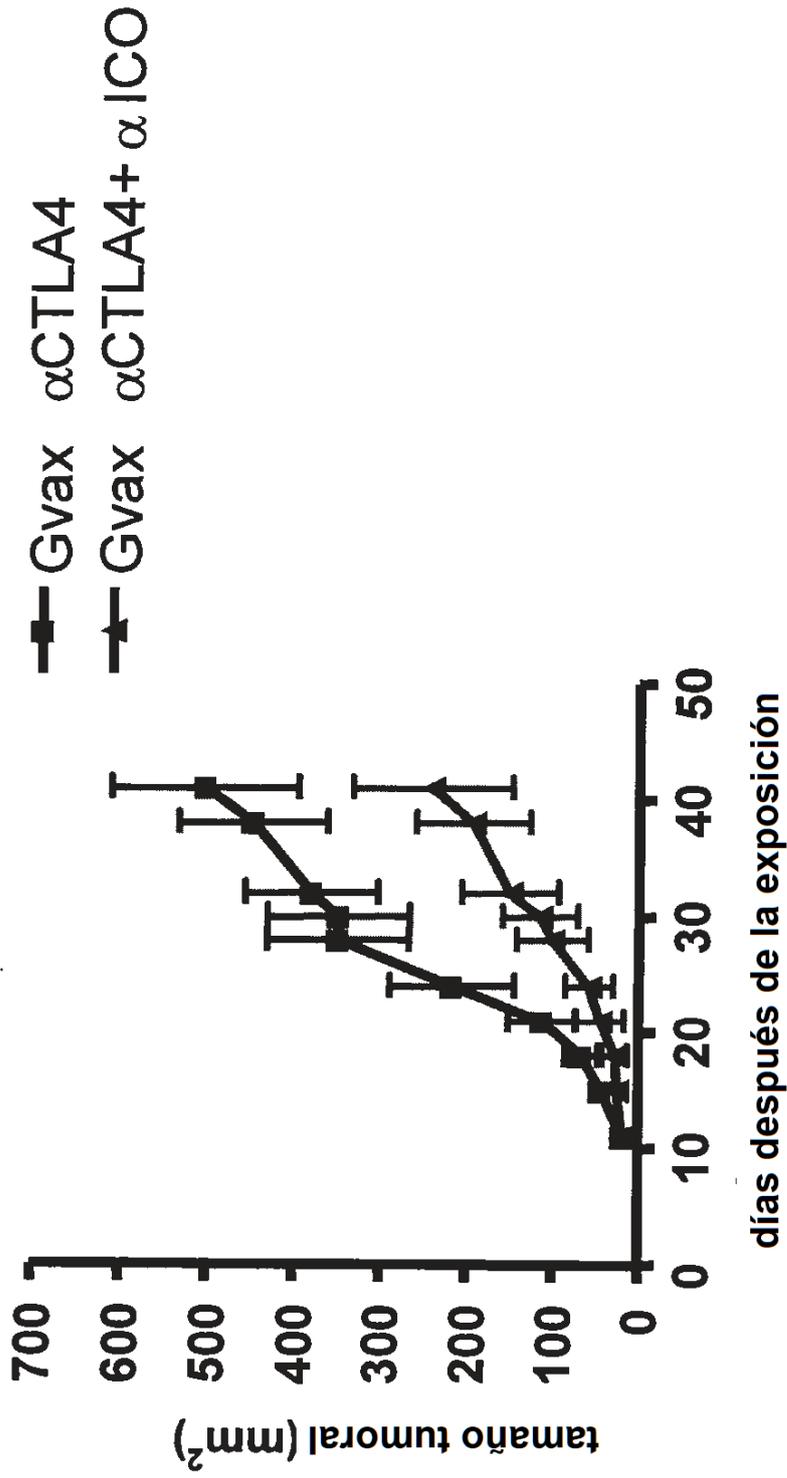


FIG. 4

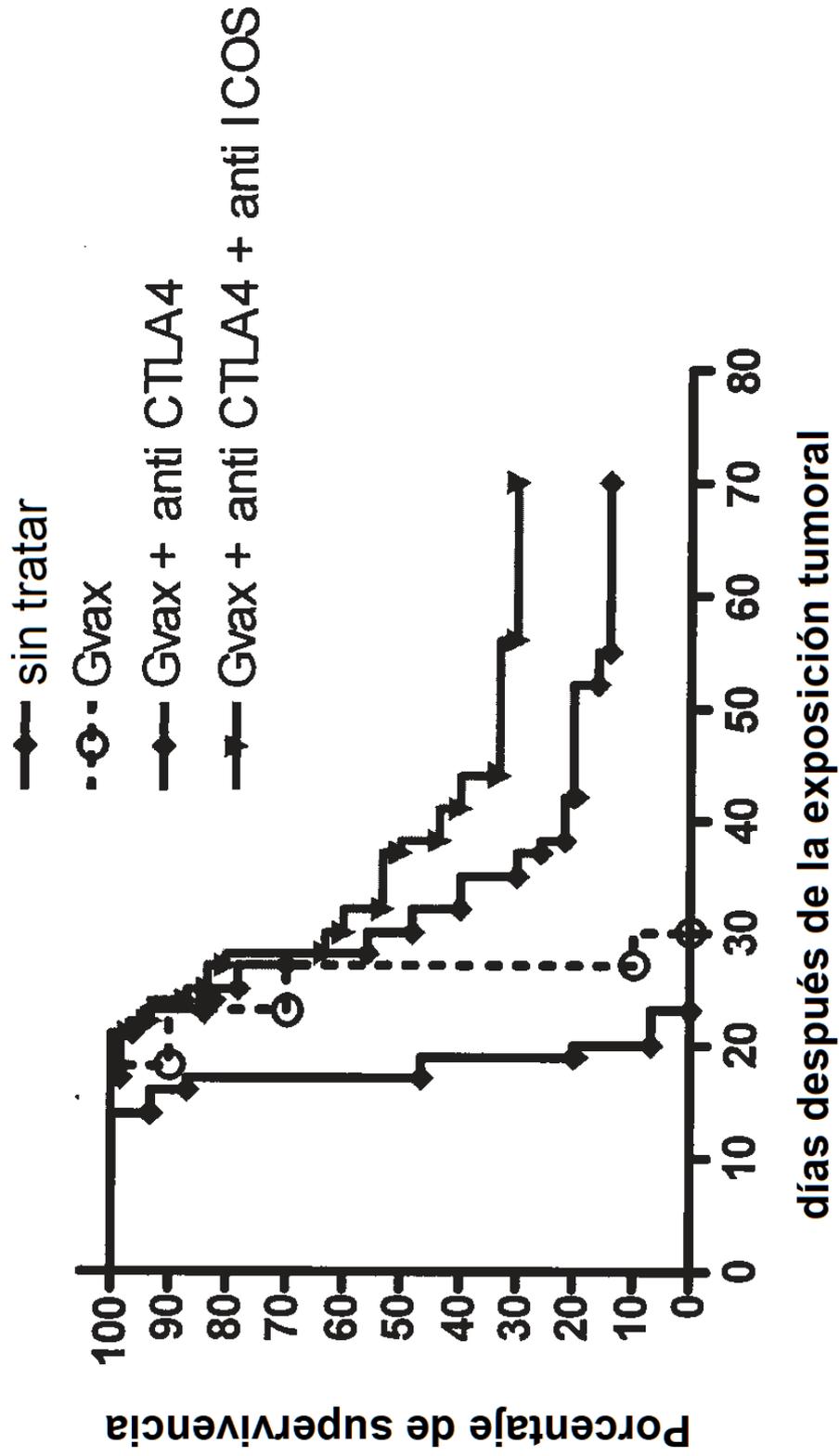


FIG. 5

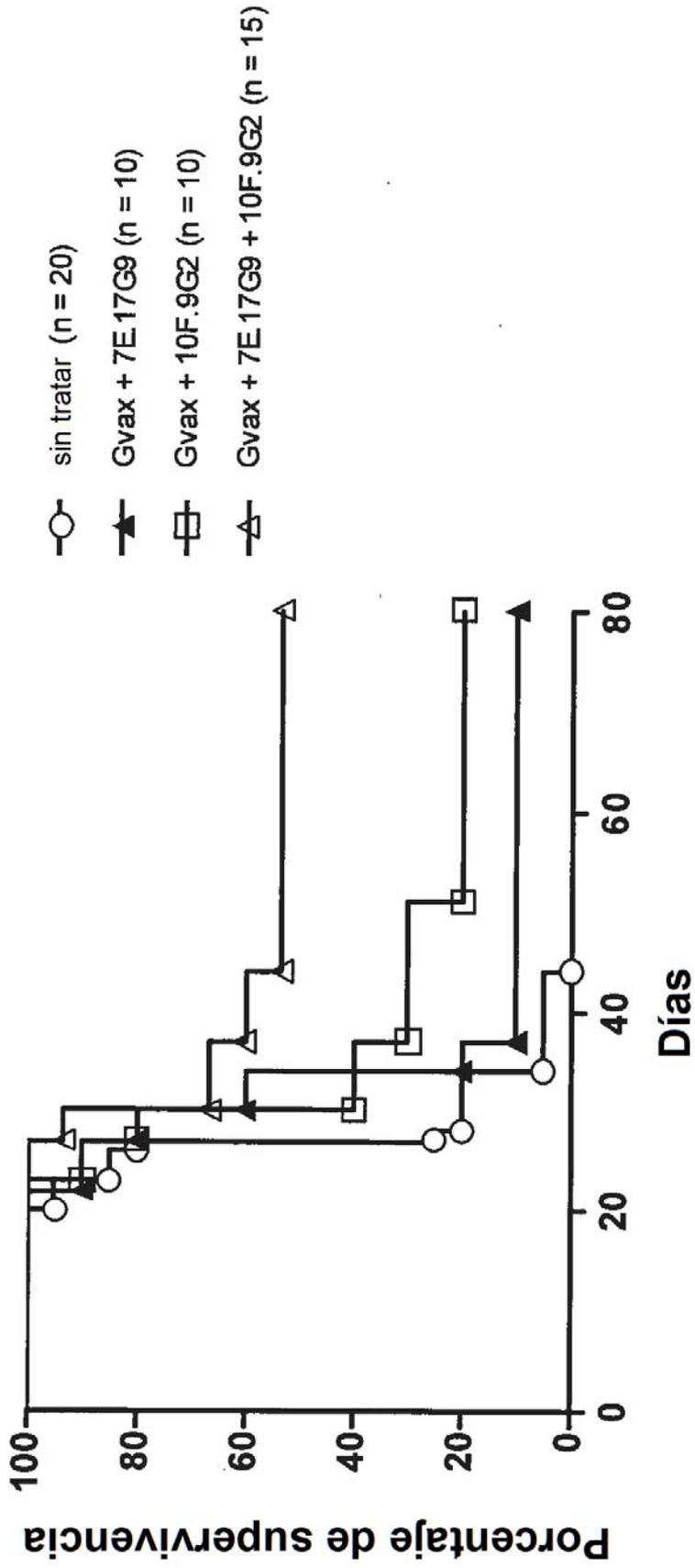


FIG. 6

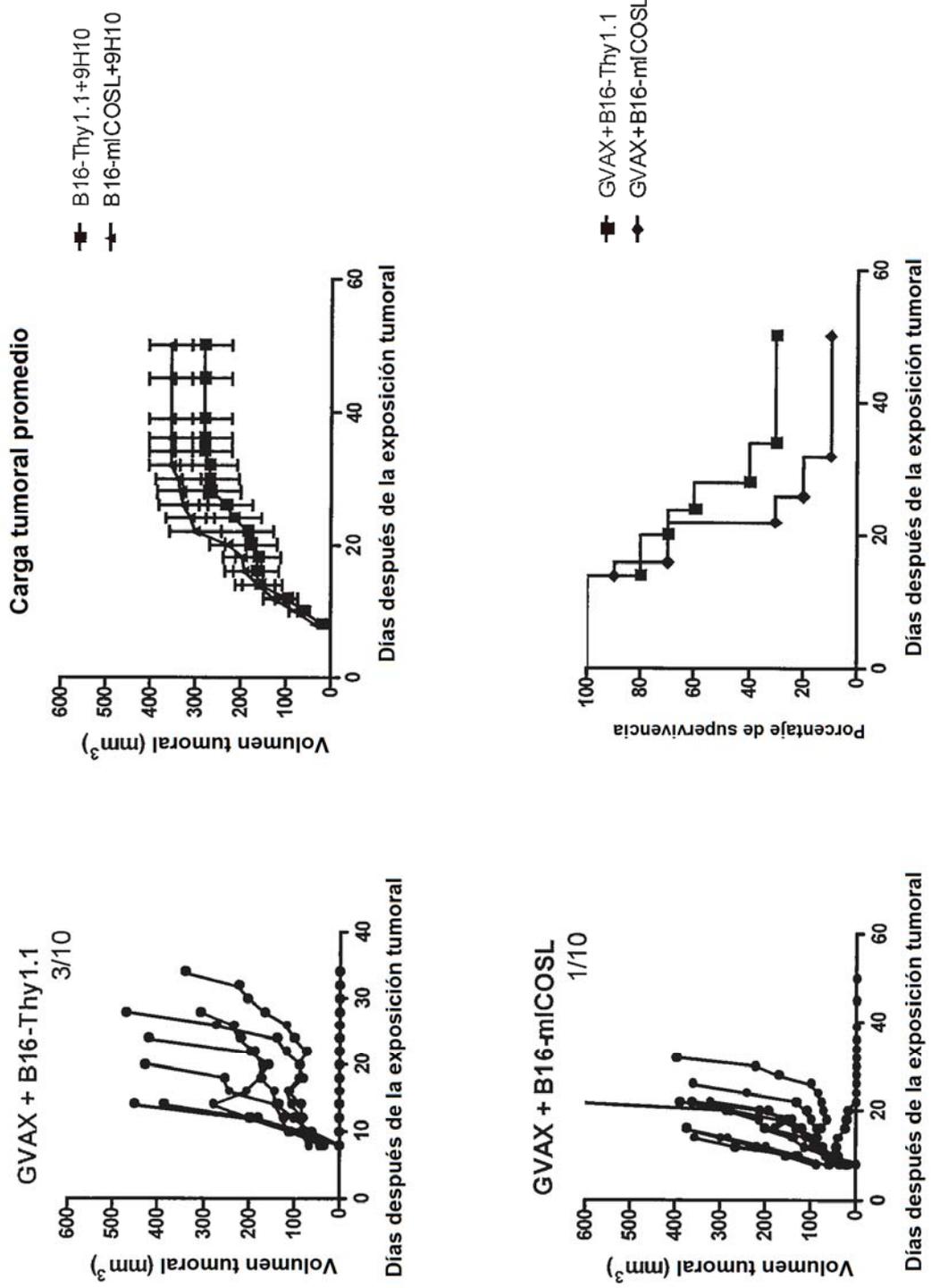


FIG. 7

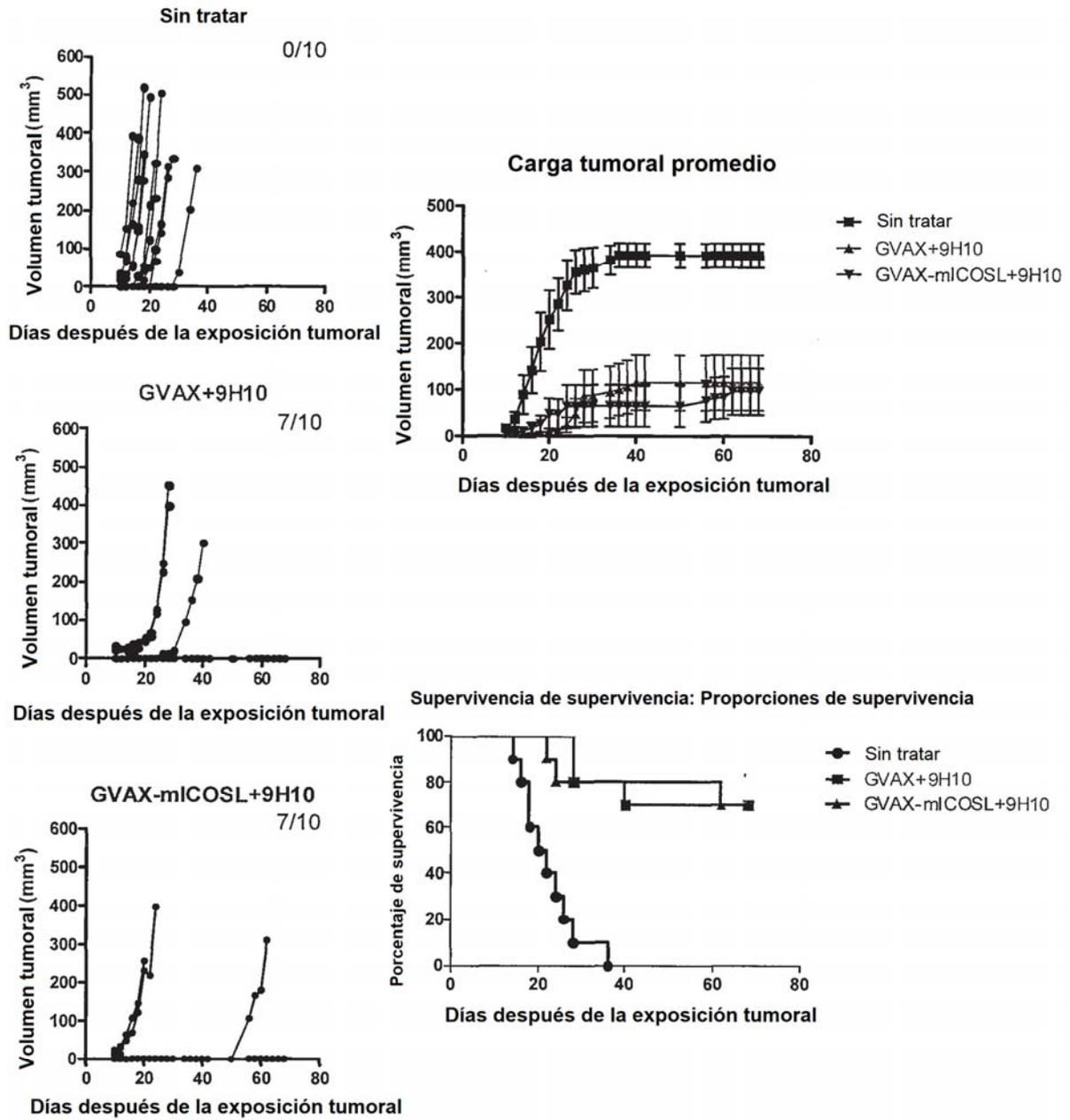


FIG. 8

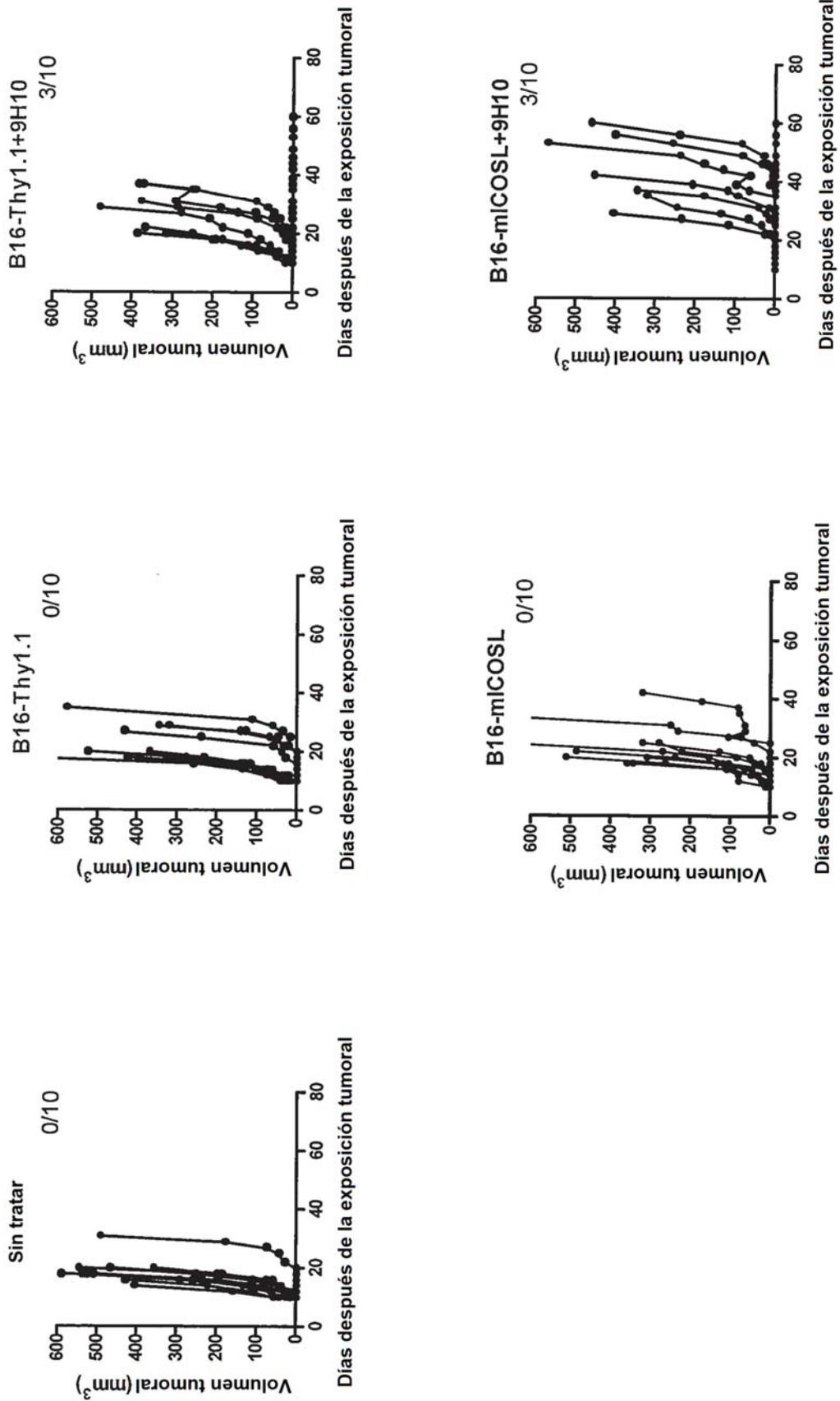


FIG. 9

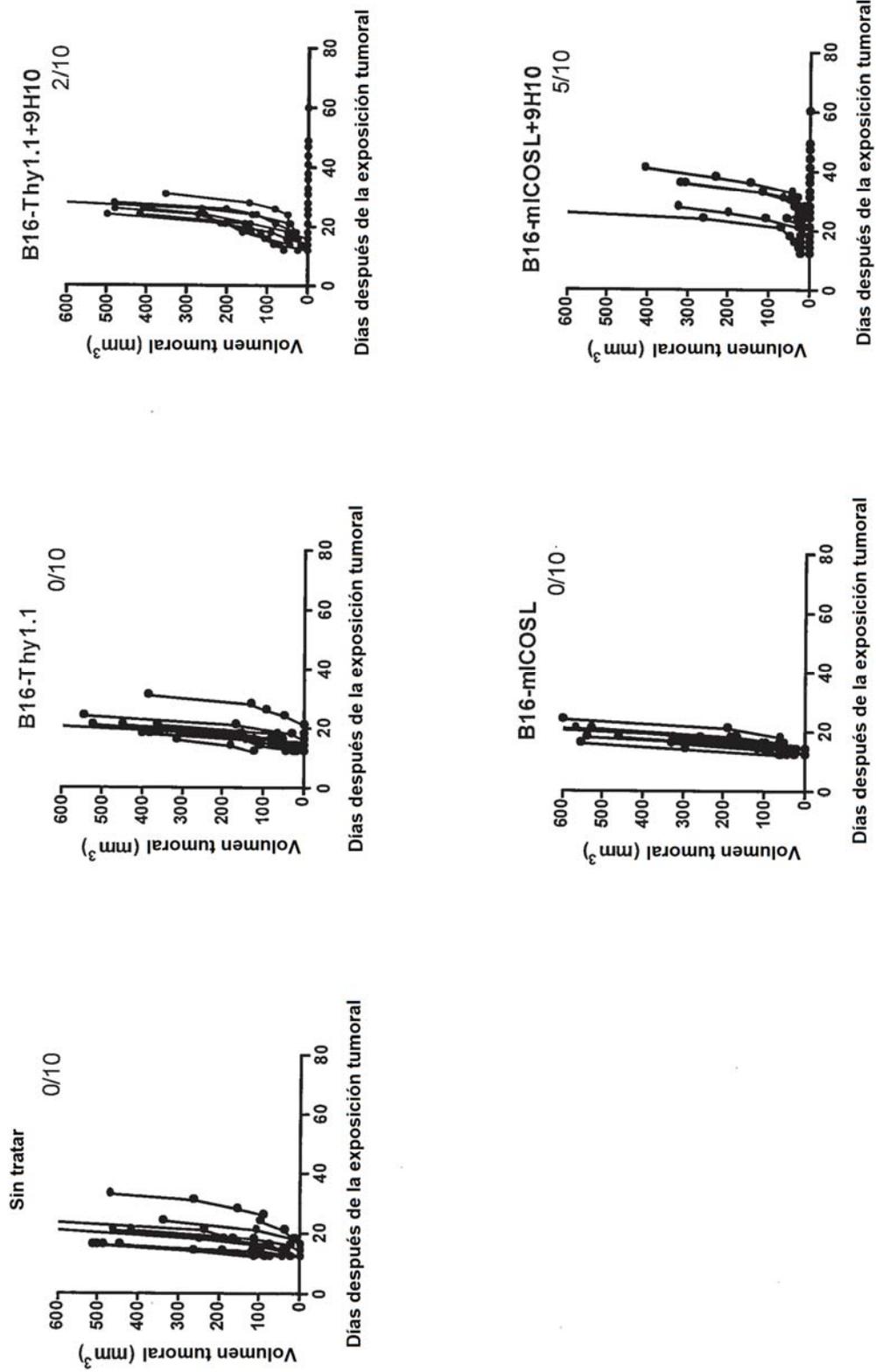


FIG. 10

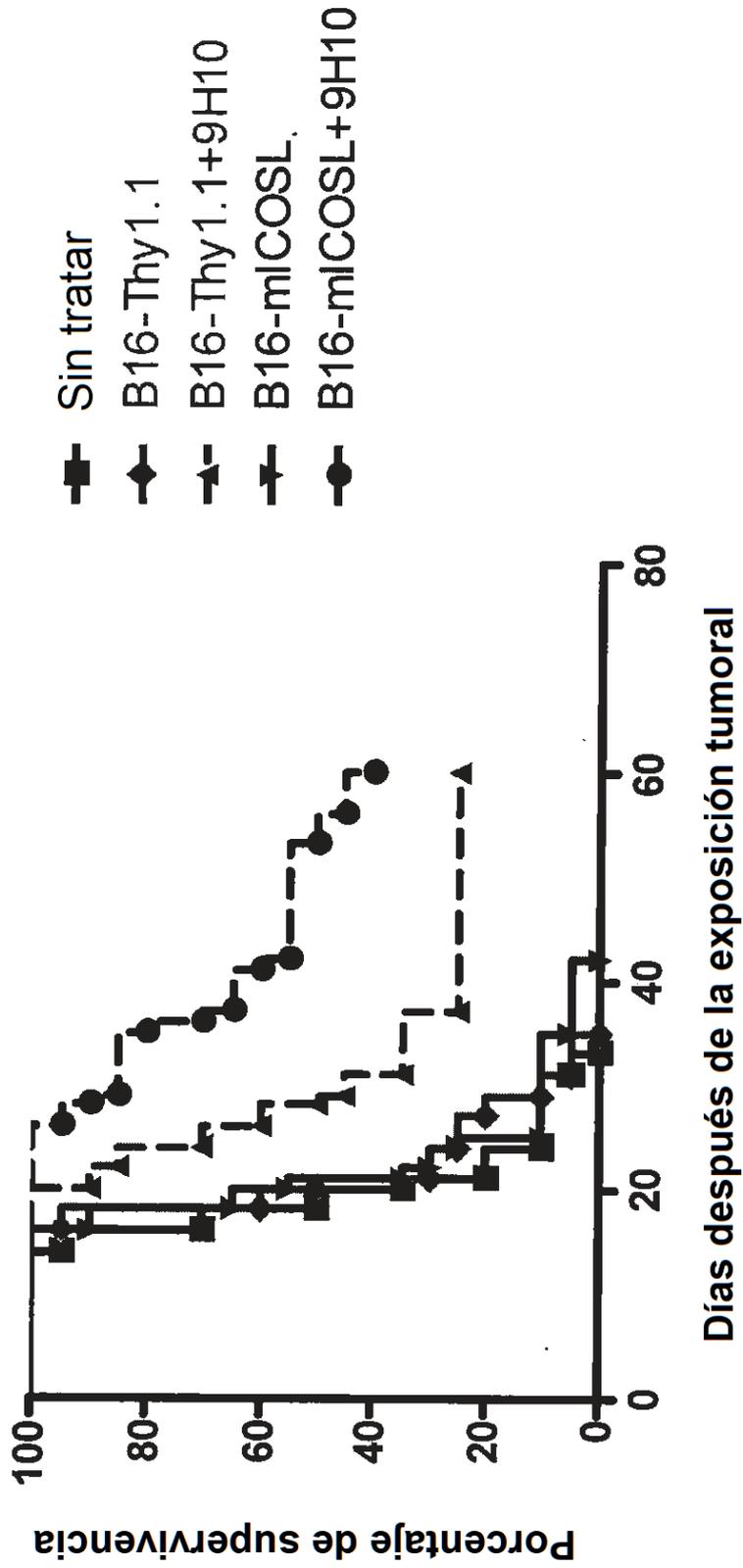


FIG. 11

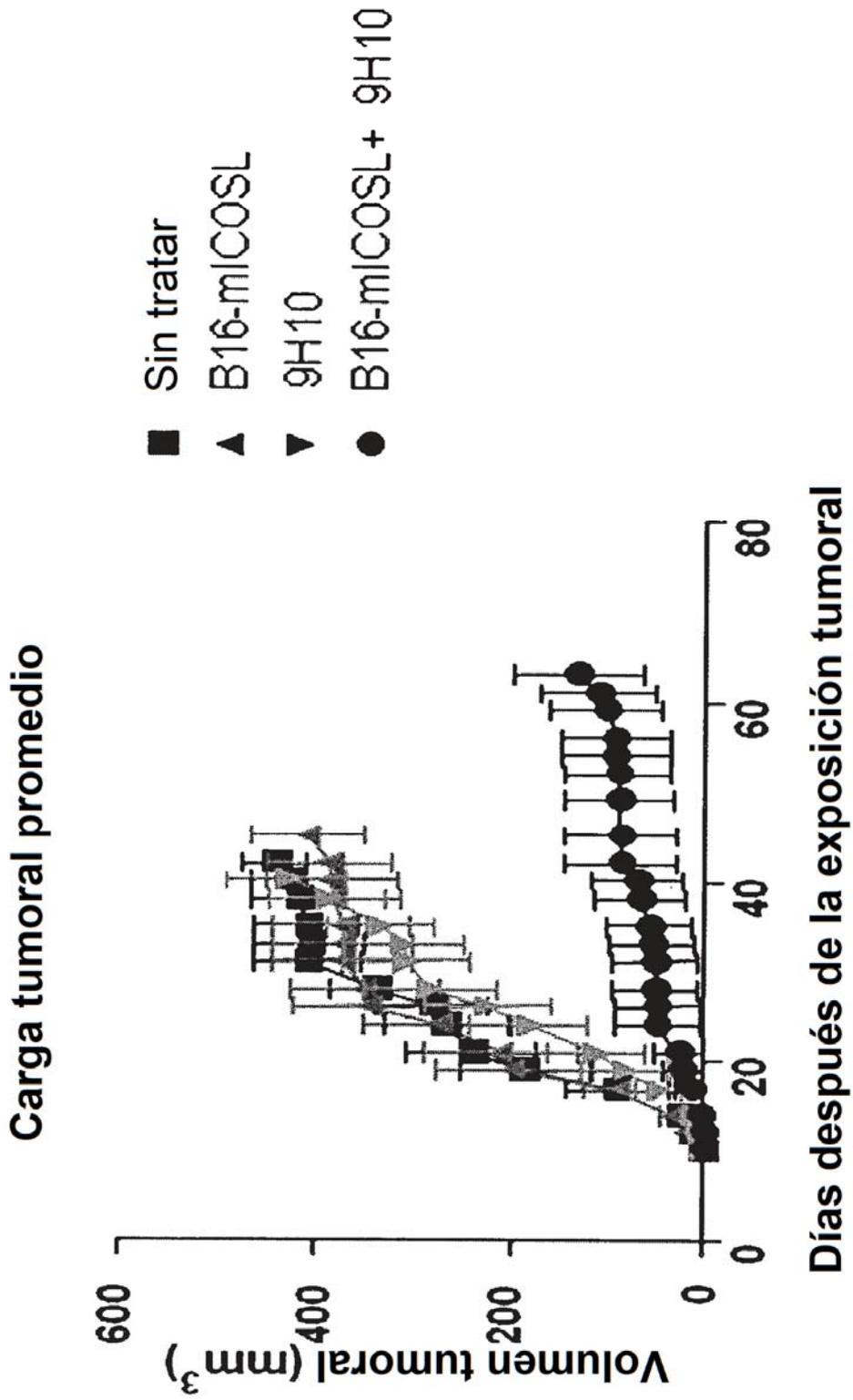


FIG. 12A

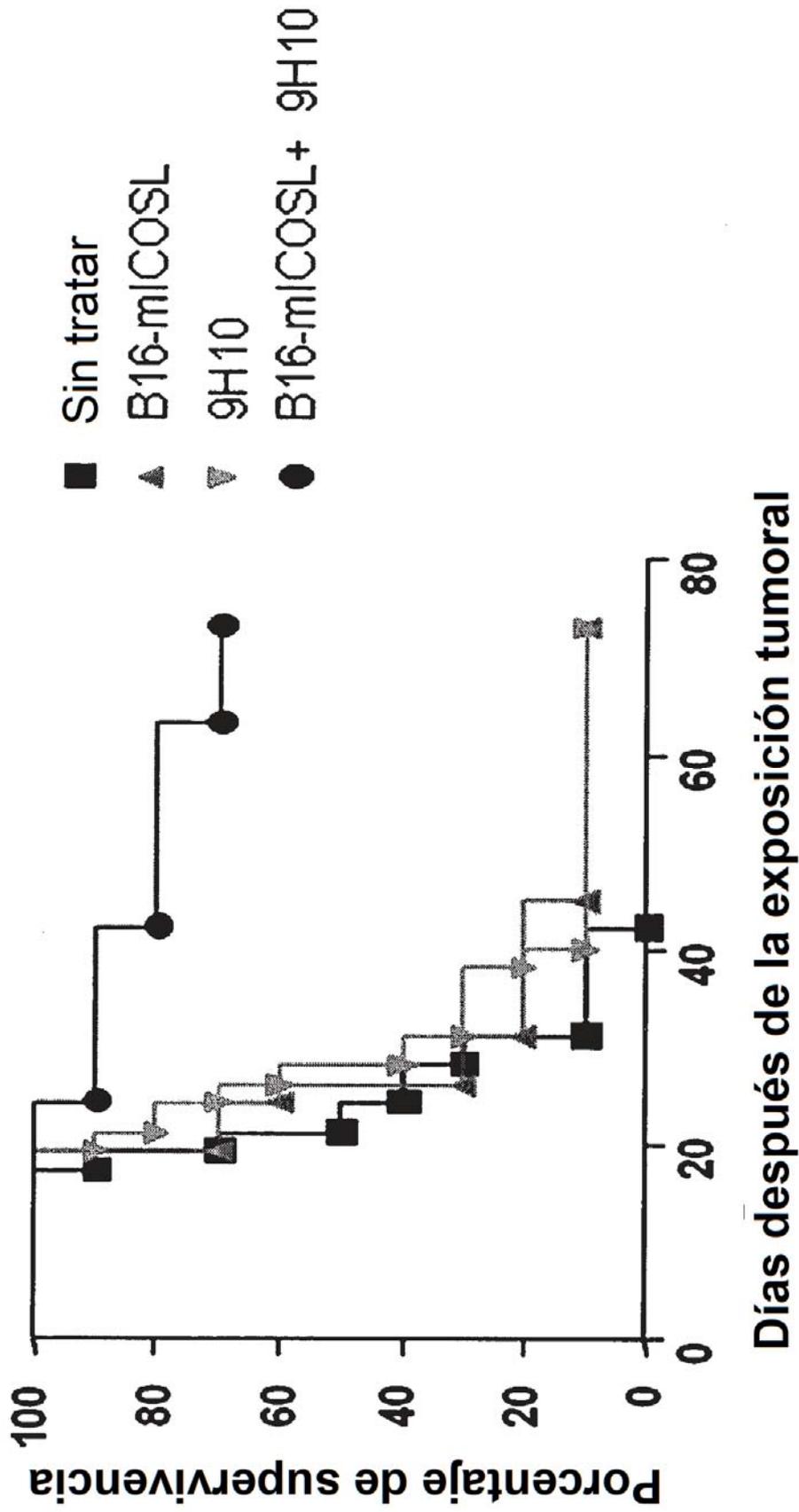


FIG. 12B