

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 936**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2015 PCT/JP2015/083855**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2016 WO16088791**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2015 E 15866302 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 3229025**

54 Título: **Método para evaluar el efecto terapéutico de un agente antineoplásico que tiene un anticuerpo anti-CD4 como principio activo**

30 Prioridad:

02.12.2014 JP 2014243858

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

26.02.2020

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF TOKYO (50.0%)
3-1, Hongo 7-chome, Bunkyo-ku
Tokyo 113-8654, JP y
IDAC THERANOSTICS, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MATSUSHIMA, KOUJI;
UEHA, SATOSHI;
ITO, SATORU;
YOKOCHI, SHOJI y
ISHIWATA, YOSHIRO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 744 936 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para evaluar el efecto terapéutico de un agente antineoplásico que tiene un anticuerpo anti-CD4 como principio activo

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para hacer una prueba a un efecto terapéutico de un fármaco antineoplásico que comprende como principio activo un anticuerpo anti-CD4 o un fármaco antineoplásico que actúa de forma selectiva en un punto de control inmunitario.

10

Antecedentes de la técnica

Desde la aparición de los fármacos con diana específica molecular, se cree que, para maximizar los efectos de los fármacos, incluyendo los fármacos de anticuerpos, la utilización de información para la selección de los sujetos a los que se administrarán los fármacos o para la optimización de sus dosis, es eficaz. Como un ejemplo famoso, se sabe que la expresión de la molécula her2/neu puede constituir una ayuda para la selección de pacientes con cáncer de mama a las que se les administrará Herceptin (fármaco de anticuerpo anti-her2/neu) (documento no patente 1), y por lo tanto, en la aprobación de la AMA se instruye que las pruebas inmunohistológicas del nivel de expresión de la molécula her2/neu en el diagnóstico patológico de un tejido canceroso son indispensables para la prescripción del fármaco. Se han notificado varios casos similares, y estos fármacos están aumentando año tras año. Dichos índices se denominan diagnóstico con fines terapéuticos (biomarcadores en sentido amplio). Además, se sabe que un agente terapéutico para melanoma metastásico (vemurafenib) es altamente eficaz en pacientes que tienen una mutación V600E en el gen BRAF (documento no patente 2) y, por lo tanto, la administración del agente a pacientes que tienen esta mutación ha sido recomendada en los últimos años. Además, cuando se prescribe un inhibidor de ALK (crizotinib, ceritinib) a pacientes con cáncer de pulmón no microcítico en quienes la quinasa se activa constantemente como consecuencia de la fusión entre el gen ALK y otro gen debido a la translocación del gen ALK, la presencia o la ausencia de la translocación del gen ALK se determina de antemano (documentos no patente 3 y 4). Esto también corresponde al diagnóstico con fines terapéuticos. Desafortunadamente, está quedando claro que la prueba del gen de fusión ALK tiene el problema de que, dado que la posición de la fusión por escisión varía ligeramente, su detección por RT-PCR con un solo ajuste de cebador no siempre es exitosa.

15

20

25

30

Los enfoques respaldados por el concepto anterior se han aprovechado en la prescripción de fármacos de anticuerpos como fármacos de diagnóstico con fines terapéuticos, y la autoridad ha aprobado dichos enfoques. Existen las siguientes combinaciones: expresión de her2/neu Herceptin, expresión de EGFR (anti-EGFR) cetuximab y expresión de CCR4 (anti-CCR4) Poteligeo. Sin embargo, en los casos de prescripción de cetuximab, el nivel de expresión de EGFR en realidad no refleja el efecto, y se ha revelado que una mutación del gen K-ras presente aguas abajo de la señal de EGFR en realidad refleja el efecto (documento no patente 5) También en el tratamiento con Herceptin, casi la mitad de los pacientes a los que se les prescribió el fármaco mostraron recurrencia/resistencia al fármaco (documento no patente 6) y, por lo tanto, se requiere una mejora desde el punto de vista de si los niveles de expresión de las moléculas dirigidas de los fármacos con diana específica molecular pueden o no ser simplemente indicadores para maximizar las ventajas en los pacientes.

35

40

Por ejemplo, en los últimos años, se ha demostrado que los fármacos de anticuerpos que ejercen sus efectos, especialmente en el sistema inmunitario, son eficaces en el tratamiento de tumores y cánceres en términos del rendimiento (en particular, el efecto de prolongación de la vida) en ensayos clínicos, y la autoridad gubernamental les dio la aprobación de fabricación. Entre estos fármacos, por ejemplo, cuando la AMA aprobó un anticuerpo anti-CTLA-4 (ipilimumab), no se produjo una discusión importante sobre los biomarcadores. Por el contrario, para la prescripción de un anticuerpo anti-PD-1 (nivolumab; Opdivo) aprobado por el Ministerio de Salud y Bienestar en julio de 2014, la tinción histológica llevada a cabo en ensayos clínicos, en función del escenario en el que se evalúa el grado de expresión de la molécula PD-L1, que es un ligando de la molécula del receptor PD-1, en tejidos de pacientes con cáncer puede ser eficaz. Numerosas empresas están trabajando en el desarrollo de los fármacos de anticuerpos mencionados anteriormente y en el diagnóstico con fines terapéuticos de los mismos. En este proceso, han surgido varios problemas. Se utiliza un anticuerpo anti-PD-L1 en la tinción de tejidos. Los estudios se llevan a cabo utilizando diferentes anticuerpos anti-PD-L1, pero existe una variación en la efectividad evaluada de este modo, posiblemente debido a las diferencias en la reactividad entre los anticuerpos. Se han señalado varios problemas, como la heterogeneidad causada por el hecho de que las muestras son tejidos, y los posibles resultados de falsos negativos en relación con el muestreo. En vista de lo anterior, se exige un método de análisis de sangre con el que es más probable asegurar la homogeneidad de las muestras, pero en realidad no ha habido biomarcadores que hayan demostrado ser satisfactorios.

45

50

55

60

Desafortunadamente, el diagnóstico con fines terapéuticos descrito anteriormente (biomarcadores) simplemente proporciona información sobre la selección de los sujetos a tratar, y aún no puede ser un índice para supervisar si los fármacos están produciendo o no sus efectos. Además, los índices que son más preferidos en los sitios clínicos son índices que permiten el análisis basado en pruebas sanguíneas en lugar de índices a nivel de tejido. Se ha informado de varios de los llamados biomarcadores, pero los biomarcadores demandados principalmente en sitios

65

clínicos todavía no se han proporcionado hasta ahora.

Dado que Poteligeo (anticuerpo anti-CCR4) es prescrito para la leucemia de tipo de células T, la muestra que se someterá a ensayo en este caso es una muestra de células sanguíneas, que es relativamente homogénea. Sin embargo, en los cánceres sólidos, el método más común es la tinción de tejidos. En los últimos años, según la información de que el dominio extracelular (dominio extracelular; DEC) de la molécula her2/neu se escinde y libera en el torrente sanguíneo, ha sido posible la investigación del nivel/grado de expresión de her2/neu mediante una prueba sanguínea que actúa de forma selectiva en el DEC (documentos no patente 7 a 10) como una alternativa a la prueba mediante la tinción tisular de la molécula inmovilizada en la superficie celular. Sin embargo, esto aún se debe mejorar.

Los últimos fármacos carcinostáticos, que incluyen no solo los fármacos carcinostáticos tradicionales, tales como inhibidores de la síntesis de ADN e inhibidores de la síntesis de proteínas, sino también los fármacos con diana específica molecular que se han desarrollado recientemente, actúan de forma selectiva directamente sobre moléculas tales como antígenos de membrana y enzimas expresadas en células tumorales. En cambio, los fármacos de anticuerpos utilizados en nuevas inmunoterapias tumorales están atrayendo la atención en los últimos años. La mayoría de los anticuerpos de punto de control inmunitario, tales como anticuerpos anti-PD-1 analizados por ello, no actúan de forma selectiva sobre moléculas expresadas en células tumorales, sino sobre moléculas expresadas en células inmunocompetentes. Por lo tanto, se puede decir que la búsqueda de biomarcadores ahora es más difícil. El antecedente que hace que la situación sea aún más complicada es que, de manera similar a un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1 también exhibe un efecto inhibidor del crecimiento tumoral. Es decir, es ante todo razonable investigar el nivel de expresión de la molécula PD-1 en el sistema inmunocítico para la prescripción del anticuerpo anti-PD-L1. Cuando un anticuerpo anti-PD-1 y un anticuerpo anti-PD-L1 están disponibles comercialmente al mismo tiempo, ¿cuáles de los índices pueden ser realmente biomarcadores apropiados?

Hay un grupo que estudió el mecanismo de supervisión inmunitaria contra los tumores para investigar si el mecanismo inmunitario innato en el cuerpo humano tiene la capacidad de reconocer y distinguir tumores, que son células generadas por la alteración de las células autólogas. El grupo notificó, como resultado, que los tumores expresan antígenos tumorales con los que las células tumorales se pueden distinguir de las células normales, y que esos antígenos son moléculas dirigidas por linfocitos. Por ejemplo, se notifica que el análisis del exoma tumoral, que es una técnica especial que utiliza secuenciación de próxima generación, se realizó para revelar que la molécula llamada espectrina- $\beta 2$ está dirigida por células T CD8⁺ (documento no patente 11). Tal molécula también puede ser un biomarcador. De manera similar, mediante el análisis del exoma de un tejido tumoral de un paciente en el que un anticuerpo anti-CTLA-4 fue eficaz, se descubrió una mutación genética dirigida por células T CD8⁺ (documento no patente 12). Por lo tanto, dicho producto génico mutante también puede ser un biomarcador. También puede ser posible inferir que, además de los biomarcadores reconocidos por células T CD8⁺, que se deducen en función de la información del lado del tumor, las moléculas responsables de la regulación funcional de las células T CD8⁺ también pueden ser biomarcadores. Es decir, las moléculas reguladoras funcionales como las expresadas en las células T que tienen actividad CTC también pueden ser biomarcadores. Sin embargo, la brecha tecnológica es aún demasiado grande para aplicar una técnica de secuenciación de próxima generación para el diagnóstico clínico general.

Se propone, como se ha descrito anteriormente, que una posible causa del estado inmunocomprometido de los pacientes con cáncer es la presencia de un grupo de células que expresan moléculas de punto de control inmunitario. El reciente interés se ha enfocado en los métodos en los que las funciones de dicho grupo de células se suprimen o eliminan para crear condiciones en las que las células y las moléculas que tienen actividad citolítica contra los tumores pueden funcionar, controlando así los cánceres y los tumores. También se puede decir que la búsqueda de biomarcadores es aún más difícil debido al complicado mecanismo. Teniendo en cuenta el hecho de que se requiere la búsqueda de biomarcadores que reflejen los efectos terapéuticos en lugar de los biomarcadores para ser utilizados simplemente como criterio para determinar si se prescriben fármacos o no, existe una mayor dificultad.

Documento(s) de la técnica anterior

Documento(s) no patente

Documento no patente 1: Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, *et al.* The New England Journal of Medicine. 2001; 344(11): 783-92.

Documento no patente 2: Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, *et al.* The New England Journal of Medicine. 2011; 364(26): 2507-16.

Documento no patente 3: Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, *et al.* The New England Journal of Medicine. 2010; 363(18): 1693-703.

Documento no patente 4: Shaw AT, Kim DW, Mehra R, Tan DS, Felip E, Chow LQ, *et al.* The New England Journal of Medicine. 2014; 370(13): 1189-97.

Documento no patente 5: Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, *et al.* Cancer Research. 2006; 66(8): 3992-5.

Documento no patente 6: Liedtke C, Kiesel L. Maturitas. 2012; 73(4): 288-94.

Documento no patente 7: Finn RS, Gagnon R, Di Leo A, Press MF, Arbushites M, Koehler M. *Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009; 27(33): 5552-8.

Documento no patente 8: Lennon S, Barton C, Banken L, Gianni L, Marty M, Baselga J, *et al.* *Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009; 27(10): 1685-93.

5 Documento no patente 9: Sias PE, Kotts CE, Vetterlein D, Shepard M, Wong WL. *Journal of Immunological Methods*. 1990; 132(1): 73-80.

Documento no patente 10: Carney WP, Bernhardt D, Jasani B. *Biomarkers in Cancer*. 2013; 5: 31-9.

Documento no patente 11: Matsushita H, Vesely MD, Koboldt DC, Rickert CG, Uppaluri R, Magrini VJ, *et al.* *Nature*. 2012; 482(7385): 400-4.

10 Documento no patente 12: van Rooij N, van Buuren MM, Philips D, Velds A, Toebes M, Heemskerk B, *et al.* *Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013; 31(32): e439-42.

Sumario de la invención

15 Problemas a resolver por la invención

La invención se define en las reivindicaciones anexas.

20 Los presentes inventores descubrieron que la inhibición del crecimiento de un cáncer sólido es posible simplemente eliminando por lo general las células positivas para CD4 que están causando un fenómeno de inmunodeficiencia en un ratón con cáncer, incluso sin actuar de forma selectiva sobre una molécula de punto de control inmunitario. Al usar un anticuerpo anti-CD4 que tiene una alta actividad citotóxica, se pueden eliminar las células positivas para CD4 en el cuerpo. Se reveló además que la eliminación de células positivas para CD4 promueve la infiltración de células positivas para CD8 que muestran actividad citolítica en el tumor y provoca la liberación de esas células en la sangre. Además, el uso combinado de un anticuerpo anti-CD4 y un anticuerpo de punto de control inmunitario produce un efecto inhibidor del crecimiento tumoral más notable, así como un excelente efecto de prolongación de la vida.

30 Si un índice simple para la evaluación apropiada de la eficacia de un fármaco está disponible de antemano, es posible considerar la revisión de la dosis, el uso combinado de otro medio terapéutico, cambiar a otro medio terapéutico o similares cuando no se puede encontrar ningún efecto terapéutico. Por ejemplo, dicha información hace posible considerar iniciar el uso combinado de un anticuerpo de punto de control inmunitario o, cuando ya se usa en combinación, cambiar el tipo de anticuerpo de punto de control inmunitario que se utilizará en combinación. Asimismo, cuando se pudo encontrar un efecto terapéutico después de comenzar un tratamiento farmacológico antineoplásico, pero la inducción de una población particular de células T se volvió insuficiente a partir de entonces, se puede considerar de manera similar la revisión de la dosis o similar.

40 Por lo tanto, especialmente en el manejo de un sistema tan complicado, se exige un índice para la evaluación de la eficacia de un fármaco antineoplásico que refleje la interacción compleja en lugar de un biomarcador que se utilizará simplemente para la selección del paciente. Un objetivo de la presente invención es proporcionar un medio que permita la supervisión de un efecto antineoplásico de un anticuerpo anti-CD4 o un fármaco antineoplásico que actúa de forma selectiva sobre un punto de control inmunitario.

45 Medios para resolver los problemas

50 Como resultado de un estudio intensivo para buscar biomarcadores para la supervisión del efecto antineoplásico de un anticuerpo anti-CD4, los presentes inventores descubrieron que, en un cuerpo vivo con cáncer al que se le administró un anticuerpo anti-CD4, las células T positivas para CD8 que expresan moléculas superficiales particulares crecen y destruyen las células tumorales para suprimir el cáncer, es decir, que el efecto antineoplásico del anticuerpo anti-CD4 se puede controlar investigando si las células T positivas para CD8 que expresan las moléculas superficiales particulares son o no inducidas. Los presentes inventores también descubrieron que el mismo método puede usarse para supervisar un efecto antineoplásico mediante únicamente el uso de un anticuerpo de punto de control inmunitario, así como un efecto antineoplásico mediante el uso combinado de un anticuerpo anti-CD4 y un anticuerpo de punto de control inmunitario, completando así la presente invención

60 Es decir, la presente invención proporciona un método para probar un efecto terapéutico de la terapia contra el cáncer con al menos un fármaco antineoplásico seleccionado entre fármacos antineoplásicos que comprenden como principio activo un anticuerpo anti-CD4, fármacos antineoplásicos que comprenden como principio activo un antagonista para una molécula de punto de control inmunitario inhibidora y fármacos antineoplásicos que comprenden como principio activo un agonista para una molécula de punto de control inmunitario coestimuladora, comprendiendo dicho método investigar la expresión de:

(1) al menos un receptor de punto de control inmunitario;

(2) CD8; y

65 (3) al menos una molécula de superficie celular seleccionada entre el grupo que consiste en CD44 y CD45RO;

en células T usando una muestra procedente de un paciente que recibió dicho al menos un fármaco antineoplásico, en el que la inducción de una población de células T que es positiva para dicha molécula de punto de control inmunitario mencionada en (1) anterior y positiva para CD8, y que muestra una alta expresión de CD44 y/o una alta expresión de CD45RO, indica que dicho fármaco antineoplásico produce un efecto terapéutico en dicho paciente.

5

Efecto de la invención

Por la presente invención, se proporcionan un medio que permite la supervisión de un efecto terapéutico de un fármaco antineoplásico. De acuerdo con el método de la presente invención, un efecto terapéutico de una terapia contra el cáncer que usa un fármaco antineoplásico que comprende un anticuerpo anti-CD4 como principio activo, un fármaco antineoplásico que actúa de forma selectiva sobre una molécula de punto de control inmunitario (por ejemplo, un fármaco antineoplásico que comprende un anticuerpo de punto de control inmunitario como un principio activo), o una combinación de estos puede evaluarse mediante una prueba usando una muestra sanguínea, que muestra una menor variación entre las muestras y que asegura una mayor homogeneidad.

10

Breve descripción de los dibujos

[Fig. 1] La Fig. 1 muestra la actividad de CCDA de un anticuerpo humanizado anti-CD4 IT1208 contra células positivas para CD4 en células mononucleares de sangre periférica humana medidas usando un kit de ensayo disponible comercialmente.

20

[Fig. 2] La Fig. 2 muestra el volumen tumoral en cada grupo de ratones C57BL/6 trasplantados con la estirpe celular B16F10. Se calculó el volumen del tumor (diámetro corto x diámetro corto x diámetro largo x $\pi/6$) a partir del diámetro del tumor sólido medido en el día 16. Diferencia significativa con respecto al grupo de control del tumor (sin administración de anticuerpos: α CD4-, mAbs-): *, p <0,05; **, p <0,01; ***, p <0,001. Diferencia significativa con respecto al grupo en el que se administró solo un anticuerpo anti-CD4 (clon GK1.5) (α CD4 +, mAbs-): #, p <0,05. Diferencia significativa entre cada grupo en el que se administró solo un anticuerpo de punto de control inmunitario (α CD4-, mAbs +) y un grupo en el que se usó un anticuerpo anti-CD4 en combinación (α CD4+, mAbs+): ††, p <0,001.

25

[Fig. 3] La Fig. 3 muestra el resultado de la investigación del volumen tumoral en ratones con tumor B16F10 a los que se les administró solamente un anticuerpo anti-CD4 o un anticuerpo anti-CD8, o estos anticuerpos se administraron en combinación. Diferencia significativa con respecto al grupo de control tumoral (sin administración de anticuerpos: α CD4-, mAbs-): **, p <0,01. Diferencia significativa entre cada grupo en el que se administró solo un anticuerpo de punto de control inmunitario (α CD4-, mAbs+) y un grupo en el que se usó un anticuerpo anti-CD4 en combinación (α CD4+, mAbs+): ††, p <0,01.

30

[Fig. 4] A cada ratón trasplantado con un tumor B16F10 se le administró por vía intravenosa un anticuerpo anti-CD45.2 marcado con colorante fluorescente (clon 104) para teñir las células positivas para CD45 que circulan en la sangre periférica de antemano (método de tinción intravascular (TIV)). Tres minutos después, se extirpó el tumor y se soltó el tejido tumoral, seguido de la separación de una población de células ricas en linfocitos. Primero, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-CD45 (clon 30-F11) que era diferente del anticuerpo anti-CD45.2, así como con un anticuerpo anti-CD11b (clon M1/70), anticuerpo anti-CD19 (clon 1D3), anticuerpo anti-NK1.1 (clon PK136) y anticuerpo anti-CD8 (clon 53-6.7), para la identificación de linfocitos que fueron positivos para CD45 (linfocitos) y negativos para anti-CD45.2 en el tejido parenquimal tumoral (no intravascular) (CD45+ TIV CD45.2-). Entre estos, una población de células T CD8+ en el tejido parenquimal tumoral que era CD11b- CD19-NK1.1- CD8+ se analizó por citometría de flujo (A, B). Es más, para la población de células T CD8+, el análisis de la expresión de PD-1 y CD137 (D, E) se realizó mediante tinción con un anticuerpo anti-PD-1 (clon RMP1-30) y un anticuerpo anti-CD137 (clon 17B5) inmediatamente después de la separación, o el análisis de la expresión de IFN γ y TNF α (F, G) se realizó mediante tinción con un anticuerpo anti-IFN γ (clon XMG1.2) y un anticuerpo TNF α (clon MP6-XT22) después del cultivo de estimulación con PMA e ionomicina. Los valores mostrados en los gráficos de citometría de flujo (A, D, F) indican las frecuencias medias en la población parental. B, E y G muestran gráficos de barras que muestran las frecuencias de las células T CD8+, y las células PD-1+ CD137+ o células IFN γ + TNF α + entre las células T CD8+. Los datos muestran la media \pm error estándar para cuatro individuos de ratones. Se muestra un resultado representativo de al menos cuatro experimentos independientes. ***, diferencia significativa en p<0,01.

35

40

45

50

[Fig. 5] La Fig. 5 muestra el resultado de la inmunotinción de un tejido tumoral en un ratón con tumor B16F10 al que se le administró un anticuerpo anti-CD4, dicha inmunotinción se realizó usando un anticuerpo anti-CD8 marcado con fluorescencia y un anticuerpo anti-LNGFR.

55

[Fig. 6-1] La Fig. 6-1 muestra el resultado de la investigación por citometría de flujo de las relaciones de células PD-1+, células CD137+ y células CD44^{al} en la población de células T CD8+ en la sangre periférica de ratones con tumor B16F10 a los que se les administró uno o ambos de un anticuerpo anti-CD4 y un anticuerpo de punto de control inmunitario (anticuerpo anti-PD-L1 o anticuerpo anti-PD-1).

60

[Fig. 6-2] (B y E) El resultado de la investigación de la relación de células CD44^{al} PD-1+, células PD1+ CD137+, o células CD44^{al} CD137+ en la población de células T CD8+ en la sangre periférica de ratones con tumor B16F10 a los cuales se les administró solo uno o ambos de un anticuerpo anti-CD4 y un anticuerpo de punto de control inmunitario (anticuerpo anti-PD-L1 o anticuerpo anti-PD-1). (C y F) La intensidad media de fluorescencia (IMF) de la expresión de PD-1 en células CD8+ CD44^{al} PD-1+ en la sangre periférica. B a D muestran los datos obtenidos cuando se administró el anticuerpo anti-PD-L1, y E a G muestran los datos obtenidos cuando se administró el

65

anticuerpo anti-PD-1. Los datos muestran la media \pm error estándar para cuatro individuos de ratones. Se muestra un resultado representativo de dos experimentos independientes. *, P <0,05; **, P <0,01; ***, P <0,001. [Fig. 7] La Fig. 7 muestra el resultado del análisis cuantitativo por RT-PCR de la expresión de varios genes en el tejido tumoral en ratones con tumor B16F10 a los que se les administró solo un anticuerpo anti-CD4, a los que se les administró solo un anticuerpo de punto de control inmunitario (anticuerpo anti-PD-1 o el anticuerpo anti-PD-L1), o a los que se les administró un anticuerpo anti-CD4 + anticuerpo de punto de control inmunitario (anticuerpo anti-PD-1 o anticuerpo anti-PD-L1) en combinación. A muestra los datos obtenidos cuando se administró el anticuerpo anti-PD-L1, y B muestra los datos obtenidos cuando se administró el anticuerpo anti-PD-1.

10 Modo para llevar a cabo la invención

El paciente a ser tratado por el método de la presente invención es un paciente que recibe una terapia contra el cáncer mediante la administración de al menos un fármaco antineoplásico seleccionado entre fármacos antineoplásicos que comprenden como principio activo un anticuerpo anti-CD4, fármacos antineoplásicos que comprenden como principio activo un antagonista para una molécula inhibidora del punto de control inmunitario, y fármacos antineoplásicos que comprenden como principio activo un agonista para una molécula coestimuladora del punto de control inmunitario. En la presente descripción, un fármaco antineoplásico que comprende como principio activo un anticuerpo anti-CD4 puede denominarse "fármaco antineoplásico anti-CD4". Un fármaco antineoplásico que comprende como principio activo un antagonista de una molécula inhibidora del punto de control inmunitario, o un fármaco antineoplásico que comprende como principio activo un agonista para una molécula coestimuladora del punto de control inmunitario, puede denominarse "fármaco antineoplásico del punto de control inmunitario".

En el método de la presente invención, se investiga la expresión de las siguientes moléculas de superficie celular (1) a (3) en células T usando una muestra procedente de un paciente al que se le administró al menos un fármaco antineoplásico descrito anteriormente.

(1) Al menos un receptor de punto de control inmunitario

(2) CD8

(3) Al menos una molécula de superficie celular seleccionada entre el grupo que consiste en CD44 y CD45RO.

Cuando se detecta la inducción de una población de células T que es positiva para el receptor del punto de control inmunitario (1) y positiva para CD8, y que muestra una alta expresión de CD44 y/o una alta expresión de CD45RO, se puede considerar que el fármaco antineoplásico está produciendo un efecto terapéutico en el paciente. Dado que todas las células T expresan CD3, la población de células T que se utilizará como índice del efecto terapéutico del fármaco antineoplásico en el método de la presente invención es, por supuesto, positivo para CD3.

La expresión "molécula de punto de control inmunitario" incluye receptores y ligandos que funcionan como un punto de control inmunitario. Los puntos de control inmunitarios son el mecanismo de escape inmunitario para evitar que el inmunitario ataque su propio cuerpo. Los receptores del punto de control inmunitario están presentes en las células T e interactúan con los ligandos del punto de control inmunitario expresados en las células presentadoras de antígeno. Las células T reconocen un antígeno presente en la molécula del CMH y se activan para generar una reacción inmunitaria, mientras que una interacción entre el receptor y el ligando del punto de control inmunitario que ocurre al mismo tiempo con lo anterior controla la activación de las células T. Los receptores del punto de control inmunitario incluyen receptores coestimuladores y receptores inhibitorios, y la activación de las células T y la reacción inmunitaria están controladas por un equilibrio entre ambos receptores.

En los casos en que la molécula a la que se dirige el fármaco antineoplásico del punto de control inmunitario sea un receptor del punto de control inmunitario, el receptor del punto de control inmunitario (1) puede ser igual o diferente de la molécula a la que se dirige dicho fármaco antineoplásico.

Los ejemplos específicos del receptor del punto de control inmunitario (1) incluyen al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en PD-1, CD137, TIM-3, CTLA-4, BTLA, LAG-3, OX40 y GITR. Los ejemplos específicos preferidos del receptor del punto de control inmunitario (1) incluyen al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en PD-1, CD137 y TIM-3. Se puede investigar la expresión de dos o más, o tres o más de los receptores del punto de control inmunitario descritos anteriormente. La positividad de cualquier clase de receptor de punto de control inmunitario (1) puede juzgarse como indicativo de la eficacia terapéutica. Se notifica que CD137 se expresa en células T CD8⁺ reactivas a tumores también en humanos, y se notifica que TIM-3 muestra una cinética de expresión similar a la de CD137 tras la estimulación de células T. Por lo tanto, en la presente invención, TIM-3 puede ser un ejemplo específico preferido del receptor del punto de control inmunitario (1) de forma similar a CD137. Todos los informes en este campo han sido análisis de células que se infiltran en tejidos cancerosos, y no ha habido ningún informe que muestre que un efecto terapéutico pueda ser indicado claramente por un nivel sanguíneo.

Se sabe que la población de células T CD3⁺, CD8⁺ y CD44^{al} en ratón son células efectoras o de memoria. Es bien sabido que, en relación con la identificación de una subpoblación de células T que se convertirán en células efectoras o de memoria en humanos, el CD44 murino puede considerarse como una molécula equivalente en el sentido de que CD44 murino es una alternativa al CD45RO humano. Por lo tanto, en los casos en que un paciente

humano debe ser sometido a examen, la expresión de CD45RO solo puede investigarse en lugar de CD44. Sin embargo, en humanos, CD44 solo puede investigarse, o tanto CD44 como CD45RO pueden investigarse.

5 Las células T CD8⁺ incluyen tres subconjuntos, a saber, células no activadas, células efectoras y células de memoria, y las células de memoria se pueden dividir en dos subconjuntos, a saber, células de memoria central y células de memoria efectoras. Dado que las células T CD8⁺ de memoria central y las células T CD8⁺ de memoria efectoras muestran activación específica de antígeno, éstas producen instantáneamente citotoxicidad, y esta última muestra una actividad más fuerte. Por lo tanto, en la presente invención, se prefiere especialmente investigar si se induce o no una población de células T CD8⁺ de memoria efectoras que sean positivas para el receptor del punto de control inmunitario (1) descrito anteriormente.

15 Se sabe que las células CD8⁺ de memoria efectoras muestran una disminución de la expresión de factores de adhesión tales como CCR7 y CD62L, y que las células T CD8⁺ de la memoria efectoras son negativas para CD45RA (Uchiyama *et al.*, Bulletin of School of Health Sciences, Faculty of Medicine, Niigata University, 10(3), 19-28, 2013-03; Hiroshi Takata y Masafumi Takiguchi, Journal of Immunology, 2006, 177: 4330-4340; y similares). Por lo tanto, en la presente invención, la expresión de uno cualquiera o más de CD45RA, CD62L y CCR7 en células T puede investigarse adicionalmente. Cuando se detecta la inducción de una población de células T negativas para CD45RA, se puede considerar que el fármaco antineoplásico es terapéuticamente eficaz. Cuando se detecta la inducción de una población de células T que muestran una baja expresión de CD62L, se puede considerar que el fármaco antineoplásico es terapéuticamente eficaz. Cuando se detecta la inducción de una población de células T negativas para CCR7, se puede considerar que el fármaco antineoplásico es terapéuticamente eficaz. Puede investigarse la expresión de cualesquiera dos (es decir, CD45RA y CD62L; CD45RA y CCR7; o CD62L y CCR7) de los marcadores, o puede investigarse la expresión de los tres marcadores.

25 Al igual que la muestra procedente de un paciente, se puede usar preferentemente una muestra sanguínea. Se prefieren las muestras sanguíneas ya que aseguran una mayor homogeneidad entre las muestras que las muestras de tejido. Sin embargo, en el método de la presente invención, también se puede usar como muestra un tejido tumoral recogido por biopsia o similares.

30 Se puede investigar si crece o no una población de células T que tiene un patrón particular de expresión de moléculas de superficie celular en el cuerpo del paciente, por ejemplo, mediante los siguientes métodos.

(a) Análisis por citometría de flujo de una muestra procedente del paciente.

35 (b) Las células CD8⁺ en una muestra procedente del paciente se capturan utilizando un soporte en el que se inmoviliza un anticuerpo anti-CD8. Después del lavado, las células capturadas reaccionan al mismo tiempo con una pluralidad de anticuerpos marcados preparados mediante la unión de sustancias marcadoras que emiten diferentes señales, respectivamente, a una pluralidad de anticuerpos contra las moléculas de superficie celular a medir, y se miden/analizan simultáneamente las señales individuales.

40 (c) Una muestra procedente del paciente se trata previamente con una enzima apropiada tal como proteasa para escindir las moléculas de la superficie celular en sus porciones madre, y las moléculas liberadas de la superficie celular se miden mediante ELISA múltiple.

(d) Los ARNm de las moléculas de superficie celular se someten a medición múltiple por RT-PCR.

45 En términos del análisis por citometría de flujo mencionado en (a), el método de análisis *per se* es un método convencional bien conocido, y también se describe concretamente en los siguientes Ejemplos. Los anticuerpos contra las moléculas de superficie celular mencionadas en (1) a (3) también son conocidos y están disponibles comercialmente. Mediante el uso de tales anticuerpos conocidos, se puede llevar a cabo el análisis por citometría de flujo.

50 Más específicamente, por ejemplo, a partir de una muestra de sangre extraída del paciente, los linfocitos pueden extraerse mediante un método convencional, tal como el método de centrifugación por gravedad específica, y luego pueden reaccionar con anticuerpos marcados (generalmente se usan anticuerpos marcados con fluorescencia) contra moléculas de superficie celular a analizar, seguido de un análisis de los linfocitos reaccionados utilizando un citómetro de flujo. Al igual que los colorantes fluorescentes para anticuerpos para citometría de flujo, se han desarrollado y están disponibles comercialmente diversos colorantes fluorescentes que emiten fluorescencias que tienen diferentes longitudes de onda respecto a la misma longitud de onda de excitación. Mediante el uso de anticuerpos marcados con tales colorantes fluorescentes, se puede detectar simultáneamente una pluralidad de moléculas de superficie celular.

60 El análisis también puede llevarse a cabo sin usar linfocitos distintos. Es decir, una sangre extraída a la que se añade un anticoagulante se puede teñir de la misma forma que con los anticuerpos marcados, y los eritrocitos se pueden eliminar por hemólisis, seguido de un análisis de linfocitos utilizando un citómetro de flujo.

65 Si bien la expresión de las moléculas de superficie celular varía entre las células, entre las diferentes etapas de diferenciación y entre las diferentes etapas de activación, las células inmunocompetentes incluyen una cantidad de poblaciones celulares relativamente homogéneas (subpoblaciones) en cada una de las cuales la intensidad de

expresión de cada molécula se fija dentro de un intervalo estrecho. En los casos en que no hay expresión, es decir, en los casos en que la intensidad de la expresión está en el nivel de fondo, la célula se describe como negativa (o -) en términos de la expresión. Por ejemplo, dicha célula puede describirse como CD8⁻. En los casos en que una célula muestra una expresión claramente más alta que una célula negativa, la célula se describe como positiva (o +). Por ejemplo, dicha célula puede describirse como CD8⁺.

Por otra parte, en los casos en que las células que incluyen una pluralidad de subpoblaciones se analizan mediante citómetro de flujo, se puede encontrar una pluralidad de intensidades de expresión incluso si se expresan las mismas moléculas de superficie celular. Estas subpoblaciones no se pueden distinguir entre sí en una gráfica unidimensional, pero se pueden distinguir entre sí mediante el desarrollo en una gráfica bidimensional.

En los casos en que se traza una subpoblación que tiene la intensidad de expresión más alta, una subpoblación negativa y una subpoblación que tiene la intensidad de expresión intermedia, la primera subpoblación se describe como alta (al, alta expresión), y la última subpoblación se describe como baja (ba, baja expresión). Por ejemplo, dicha subpoblación puede describirse como CD44^{al} o CD44^{ba}. Si no hay diferencia en la función entre una subpoblación baja y una subpoblación negativa, ambas pueden denominarse convencionalmente como Baja. Por ejemplo, una subpoblación negativa para la expresión de CD44 es CD44⁻. Tanto CD44^{al} como CD44^{ba} son CD44⁺, ya que estas muestran una expresión positiva.

Por otra parte, en los casos en que hay varias poblaciones celulares homogéneas en cada una de las cuales la intensidad de expresión de cada molécula se fija dentro de un intervalo estrecho, y donde tienen una asociación una a una con sus funciones, son oficialmente reconocidas como subpoblaciones. Por ejemplo, las células T CD44^{al} CD8⁺ son células T de memoria CD8⁺, y las células T CD44^{ba} son células T no activadas. Además, cuando una pluralidad de moléculas de superficie celular se analizan en combinación mediante citometría de flujo, se puede llevar a cabo una clasificación más compleja de un gran número de subpoblaciones.

En la presente invención, los términos "positivo", "negativo", "alta expresión" y "baja expresión", como se usan en relación con la expresión de diversas moléculas de superficie celular, poseen los significados descritos anteriormente.

Dado que varios anticuerpos contra las moléculas de superficie celular de (1) a (3) se conocen como se ha descrito anteriormente, el método (b) también se puede llevarse a cabo utilizando sustancias de marcado apropiadas. Los ejemplos de la sustancia marcadora incluyen cromóforos y tintes fluorescentes que tienen diferentes longitudes de onda de emisión. Qdot (marca registrada), que está disponible comercialmente, y similares también se pueden usar preferentemente. Cuando se usan tintes que tienen diferentes longitudes de onda de excitación, la medición simultánea se puede realizar mediante irradiación con luces de excitación que tienen las diferentes longitudes de onda. El soporte usado para la inmovilización del anticuerpo anti-CD8 puede ser un soporte comúnmente usado para la inmovilización de anticuerpos o antígenos con el fin de simplificar la separación B/F en métodos de inmunoensayo conocidos. Los ejemplos del soporte incluyen, entre otros, placas y perlas magnéticas. Al igual que la muestra procedente de un paciente, se puede usar preferentemente una muestra sanguínea.

En el método (c), una muestra procedente de un paciente debe someterse a un tratamiento previo para escindir las moléculas de superficie celular que se medirán lejos de la superficie celular. Tal pretratamiento puede llevarse a cabo seleccionando y usando una enzima apropiada que sea capaz de escindir cada molécula de la superficie celular lejos de las células. Por ejemplo, CD44 puede ser escindido por ADAM17, que es una metaloproteasa. La muestra pretratada puede someterse a ELISA múltiple. Al igual que una muestra procedente de un paciente, una muestra sanguínea puede usarse preferentemente también en este método.

Dado que se conoce el RT-PCR múltiple *per se*, y también se conocen las secuencias de ARNm de las moléculas de superficie celular que se medirán en la presente solicitud, el método (d) puede llevarse a cabo usando cebadores diseñados adecuadamente. También en este método, una muestra sanguínea puede usarse preferentemente como una muestra procedente de un paciente.

También en los métodos (b) a (d), una muestra sanguínea puede usarse preferentemente como una muestra procedente de un paciente. La expresión de cada molécula de superficie celular se puede determinar como positiva, negativa, alta o baja en función de un valor medido dependiendo de cada método de medición. Por ejemplo, "positivo" significa que la molécula se expresa, "negativo" significa que la molécula no se expresa (expresada en un nivel de fondo o inferior). Además, de acuerdo con el valor medido, la alta expresión y la baja expresión se pueden distinguir entre sí.

La inducción de una población de células T que tiene un patrón particular de expresión de moléculas de superficie celular, o un aumento en dicha población de células T, significa que la población de células T detectada en un paciente después de la administración de un fármaco antineoplásico es superior a la del paciente antes de la administración del fármaco antineoplásico. Por lo tanto, habitualmente, cuando se lleva a cabo la presente invención, también se puede extraer una muestra del paciente antes de la administración de al menos un fármaco antineoplásico seleccionado entre fármacos antineoplásicos anti-CD4 y fármacos antineoplásicos de punto de

control inmunitario, y la muestra extraída puede ser sometida a análisis de la población de células T. Después de que la administración del fármaco antineoplásico haya comenzado, las muestras pueden ser extraídas periódicamente del paciente y pueden ser sometidas al análisis.

5 El paciente al cual se aplica el método de la presente invención es un mamífero que es normalmente humano.

10 El fármaco antineoplásico que comprende como principio activo un anticuerpo anti-CD4 es un fármaco antineoplásico para un cáncer sólido que se desarrolló como resultado de un estudio intensivo por los presentes inventores. Este fármaco antineoplásico cancela el entorno inmunocomprometido en un cáncer sólido mediante la
 15 eliminación de las células positivas para CD4 involucradas en la inmunosupresión, para promover la destrucción de las células cancerígenas por los CTC (células T) positivas para CD8, produciendo así un efecto terapéutico. Además, el fármaco antineoplásico también puede prevenir la metástasis y la recurrencia del cáncer sólido. En la presente invención, la expresión "fármaco antineoplásico" incluye la supresión de la generación (iniciación, metástasis y recurrencia) del cáncer y la supresión de su crecimiento. En consecuencia, el "fármaco antineoplásico" incluye agentes terapéuticos, agentes profilácticos, agentes supresores de metástasis y agentes supresores de recurrencia para el cáncer.

20 Específicamente, el fármaco antineoplásico que comprende un anticuerpo anti-CD4 como principio activo comprende cualquiera de los siguientes como principio activo. Ambos pueden usarse en combinación. En la presente descripción, los principios activos (i) y (ii) pueden denominarse en adelante colectivamente "componente anti-CD4".

25 (i) Un anticuerpo anti-CD4 que tiene una alta actividad citotóxica.
 (ii) Un anticuerpo anti-CD4 o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende un componente citotóxico unido al mismo.

30 Cuando un paciente al cual se aplica el método de prueba de la presente invención es humano, en ambos casos de (i) y (ii), el anticuerpo anti-CD4 es normalmente un anticuerpo contra CD4 humano, y es un anticuerpo quimérico de tipo humano, un anticuerpo humanizado (preparado trasplantando la región CDR de un anticuerpo derivado no humano a la región correspondiente de un anticuerpo humano), o un anticuerpo humano (el mismo anticuerpo que un anticuerpo producido en el cuerpo del humano, que se prepara usando un animal no humano o una estirpe celular humana).

35 Los anticuerpos de actividad citotóxica incluyen la actividad de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (actividad CCDA) y la actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (actividad CDC). En los casos en que el componente anti-CD4 pertenezca al (1) anterior, el anticuerpo anti-CD4 puede tener cualquiera de la actividad CCDA y la actividad CDC. Es necesario usar un anticuerpo que tenga una alta actividad citotóxica que pueda ejercer una capacidad suficientemente alta para destruir las células positivas para CD4.

40 La expresión "alta actividad citotóxica" en el contexto de la actividad CCDA significa que un anticuerpo tiene una mayor actividad CCDA que el anticuerpo anti-CD4 conocido 6G5 o CE9.1 que se sabe que tiene una actividad de CCDA, cuando la actividad CCDA contra las células que expresan CD4 se mide por un método de medición conocido. En el contexto de la actividad CDC, el término significa que un anticuerpo tiene una actividad CDC más fuerte que el anticuerpo anti-CD4 conocido OKT4 que se sabe que tiene actividad CDC, cuando la actividad CDC
 45 contra las células que expresan CD4 se mide en un sistema experimental que utiliza los mismos complementos mediante un método de medición conocido.

50 Los métodos para medir la actividad CCDA y la actividad CDC de los anticuerpos se conocen y describen, p. ej., en Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993), y sus kits están disponibles comercialmente. Se puede evaluar si un anticuerpo dado tiene o no una actividad citotóxica más alta que los anticuerpos anti-CD4 conocidos, utilizando un kit comercialmente disponible. Un ejemplo específico de medición de la actividad citotóxica usando un kit disponible comercialmente se describe en los Ejemplos a continuación. El nivel de la actividad CCDA del anticuerpo anti-CD4 también se puede evaluar, como se describe en los Ejemplos a continuación, mezclando células mononucleares de sangre periférica humana con el anticuerpo anti-CD4, permitiendo que la reacción continúe a 37 °C durante varias
 55 horas, realizando un análisis por citometría de flujo para medir la relación de células CD3⁺ a células CD8⁺ en la solución de reacción, y luego comparando el valor de medición obtenido con un valor de medición obtenido usando un anticuerpo anti-CD4 que no tiene actividad CCDA o un anticuerpo anti-CD4 descrito anteriormente.

60 Preferentemente, un anticuerpo anti-CD4 que tiene una alta actividad citotóxica tiene una actividad CCDA que es 10 veces o más, más preferentemente 100 veces o más superior que la actividad CCDA del anticuerpo anti-CD4 conocido 6G5 y/o CE9.1, o tiene una actividad CDC que es 10 veces o más, más preferentemente 100 veces o más superior que la actividad CDC del anticuerpo anti-CD4 conocido OKT4. Como se usa en la presente memoria, la expresión "10 veces o más" significa, por ejemplo, que la concentración mínima de anticuerpos a la que un anticuerpo dado exhibe una actividad citotóxica contra una cierta cantidad de células es una décima parte o menos
 65 de la del anticuerpo conocido que se ha descrito anteriormente. En cuanto a la afinidad del anticuerpo anti-CD4 a CD4, la actividad de unión del anticuerpo K_D puede ser de aproximadamente 1×10^{-9} M o menos.

Se puede preparar un anticuerpo anti-CD4 que tiene una alta actividad citotóxica, por ejemplo, a partir de un anticuerpo monoclonal anti-CD4 preparado por un método conocido o a partir de un anticuerpo anti-CD4 conocido ya establecido, aumentando la citotoxicidad del anticuerpo por un método conocido en la técnica. En los casos en que se conoce un anticuerpo anti-CD4 que reconoce específicamente CD4 expresado en la superficie celular y tiene una citotoxicidad fuerte, dicho anticuerpo puede usarse como un principio activo del agente de la presente invención. Por ejemplo, el documento WO 2010/074266 desvela un anticuerpo anti-CD4 que tiene una mayor actividad CCDA que los anticuerpos anti-CD4 convencionales.

Un método *per se* para producir un anticuerpo monoclonal es un método convencional bien conocido en la técnica. Por ejemplo, cuando se lleva a cabo el método de hibridoma bien conocido, se puede obtener un anticuerpo monoclonal anti-CD4 inmunizando a un animal (excepto humano) con una proteína CD4 o un fragmento apropiado de la misma (la región extracelular, p. ej., una región del extremo N-terminal al 394º aminoácido de CD4), recogiendo células productoras de anticuerpos tales como células de bazo o linfocitos del animal inmunizado, fusionando las células productoras de anticuerpos con células de mieloma para preparar hibridomas, detentando un hibridoma que produce un anticuerpo que se une a la proteína CD4, haciendo crecer el hibridoma y luego recogiendo un anticuerpo anti-CD4 del sobrenadante del cultivo. La secuencia génica, la secuencia de aminoácidos, la estructura espacial y similares de CD4 se han depositado en bases de datos públicas con los números de acceso de, por ejemplo, M12807 en GenBank de CNIB. La proteína CD4 o un fragmento apropiado de la misma para usar como inmunógeno puede prepararse fácilmente basándose en dicha información de secuencia de acuerdo con métodos de ingeniería genética bien conocidos.

Los métodos para preparar un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano también se han establecido como métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo humano anti-CD4 puede prepararse usando fragmentos de secuencia CDR que aseguran el reconocimiento de CD4 preparado por el método de modificación de casete.

También se conocen métodos para aumentar la citotoxicidad de un anticuerpo, y se puede usar cualquiera de estos métodos. Un ejemplo de los métodos conocidos se describe a continuación.

Un método para aumentar la actividad CCDA es la tecnología POTEILLIGENT (marca registrada), en la cual se elimina la fucosa (fucosa central) contenida en las cadenas de azúcar presentes en la región Fc del anticuerpo (Yamane-Ohnuki N, Satoh M, Production of therapeutic antibodies with controlled fucosylation, MAbs2009; 1: 230-236). La enzima que añade fucosa central está codificada por el gen llamado FucT-8 (Fut-8). Por lo tanto, las moléculas de anticuerpos con actividad CCDA mejorada pueden obtenerse expresando el gen que codifica un anticuerpo recombinante en células de animales con un gen desactivado Fut-8 (Yamane-Ohnuki N, *et al.*, Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity, Biotechnol Bioeng 2004; 87: 614-622).

Otro ejemplo conocido del método para aumentar la actividad CCDA es un método en el que se bloquea la donación de sustrato de fucosa. Sin embargo, este método elimina la totalidad de la fucosa, incluyendo fucosa central, y por lo tanto no es específica de la fucosa central. Por lo tanto, la tecnología POTEILLIGENT (marca registrada) descrita anteriormente es más preferida.

Todavía otro ejemplo del método para aumentar la actividad CCDA es un método en el que se convierten las cadenas de azúcar presentes en la región Fc del anticuerpo. En este método, se evita la adición de fucosa central mediante la introducción de GlcNAc en la región de la cadena de azúcar ramificada de tipo antena mediante la manipulación del gen GnT-III (M. Schuster *et al.*, (M. Schuster *et al.*, Improved effector functions of a therapeutic monoclonal Lewis Y-specific antibody by glycoform engineering, Cancer Res 2005; 65: 7934-7941). También se puede usar un anticuerpo anti-CD4 que tiene una actividad CCDA mejorada preparada por dicho método.

Un ejemplo conocido del método para mejorar la actividad CDC es la tecnología COMPLEGENT (marca registrada), en la que una parte del isotipo IgG1 se combina con la secuencia del isotipo IgG3 para aumentar la actividad CDC (Natsume A, In M, Takamura H, *et al.* Engineered antibodies of IgG1/IgG3 mixed isotype with enhanced cytotoxic activities, Cancer Res. 2008; 68: 3863-3872).

Otro ejemplo conocido es la tecnología AccretaMab (marca registrada), en la que la tecnología POTEILLIGENT (marca registrada) y la tecnología COMPLEGENT (marca registrada) descritas anteriormente se emplean en conjunto para aumentar fuertemente la actividad citotóxica de un anticuerpo (Natsume A, *et al.*, Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC, Drug Des Devel Ther. 2009; 3: 7-16). También se puede usar un anticuerpo anti-CD4 en el que tanto la actividad CCDA como la actividad CDC se incrementan mediante dicho método.

En los casos en que se usa un anticuerpo anti-CD4 al que se une un componente citotóxico, el anticuerpo no necesita tener una actividad citotóxica alta, puesto que el componente citotóxico daña a las células positivas para

CD4. También se puede usar un fragmento de anticuerpo que retiene la capacidad de unión a CD4 (fragmento de unión a antígeno), que comprende un componente citotóxico unido al mismo.

5 En la presente invención, el componente citotóxico significa una sustancia que tiene una actividad para destruir células vivas, e incluye sustancias biológicas tóxicas, sustancias químicas y sustancias radiactivas.

10 El fragmento de unión al antígeno puede ser cualquier fragmento de anticuerpo siempre que retenga la capacidad de unión (reactividad antígeno-anticuerpo) al antígeno correspondiente de su anticuerpo original. Los ejemplos específicos del fragmento de unión a antígeno incluyen, entre otros, Fab, F(ab')₂ y scFv. Fab y F(ab')₂ pueden obtenerse, como es bien sabido, por tratamiento de un anticuerpo monoclonal con una proteasa tal como papaína o pepsina. Los métodos para preparar scFv (fragmento de región variable de cadena sencilla) también son bien conocidos. Por ejemplo, se puede obtener scFv extrayendo ARNm de un hibridoma preparado como se ha descrito anteriormente, preparando ADNc monocatenario, realizando PCR usando cebadores específicos para la cadena P y la cadena L de inmunoglobulina para amplificar el gen de la cadena P y el gen de la cadena L de inmunoglobulina, vinculando estos usando un enlazador, dando un sitio(s) apropiado(s) de enzimas de restricción al producto resultante, introduciendo el producto en un vector plasmídico, transformando *E. coli* con el vector resultante para permitir la expresión de scFv, y luego recuperando el scFv expresado de *E. coli*.

20 Como se ha descrito anteriormente, el método de prueba de la presente invención se usa para evaluar un efecto terapéutico de una terapia contra el cáncer con al menos un fármaco antineoplásico seleccionado entre fármacos antineoplásicos anti-CD4 y fármacos antineoplásicos de punto de control inmunitario. Es decir, el método de prueba se usa para evaluar un efecto terapéutico de una terapia contra el cáncer mediante la administración única de un fármaco antineoplásico anti-CD4 o un fármaco antineoplásico del punto de control inmunitario, la administración combinada de una pluralidad de fármacos antineoplásicos del punto de control inmunitario o la administración combinada de un fármaco antineoplásico anti-CD4 y uno o más fármacos antineoplásicos del punto de control inmunitario. Sin embargo, el paciente al cual se aplica la presente invención también puede recibir un tratamiento combinado con otra terapia contra el cáncer. Por ejemplo, al menos uno seleccionado entre sustancias que tienen una acción para estimular la inmunidad celular o activar las células CN, y la terapia con células inmunitarias puede usarse adicionalmente en combinación con la administración.

30 Las células cancerígenas expresan un ligando para un receptor de punto de control inmunitario inhibitorio y escapan del ataque de las células T citotóxicas que utilizan el receptor. Por lo tanto, la administración de un antagonista contra el receptor inhibitorio puede evitar que las células cancerígenas utilicen el mecanismo de punto de control inmunitario, facilitando así la destrucción de las células cancerígenas por las células T CD8⁺. Además, la administración de un agonista contra un receptor del punto de control inmunitario coestimulador puede mejorar la reacción inmunitaria, por lo que también se puede facilitar la destrucción de las células cancerígenas por las células T CD8⁺. Los fármacos antineoplásicos de punto de control inmunitario que han recibido la aprobación de fabricación, como el anticuerpo anti-PD-1 y el anticuerpo anti-PD-L1, ya están presentes y son conocidos.

40 El término "antagonista" incluye diversas sustancias que interfieren con la activación del receptor inducida por la unión entre el receptor y el ligando. Los ejemplos de los mismos incluyen sustancias que interfieren con la unión entre el receptor y el ligando al unirse al receptor, y sustancias que interfieren con la unión entre el receptor y el ligando al unirse al ligando.

45 Por ejemplo, "un antagonista contra una molécula inhibitoria del punto de control inmunitario" puede ser un anticuerpo antagonista que se une a una molécula inhibitoria del punto de control inmunitario (receptor inhibitorio o su ligando), un polipéptido soluble que está diseñado basado en un ligando inhibitorio del punto de control inmunitario y no activa el receptor, o un vector capaz de expresar dicho polipéptido, o similares. Los ejemplos de la molécula inhibitoria del punto de control inmunitario incluyen receptores tales como PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3 y BTLA, y ligandos como PD-L1 (ligando para PD-1), PD-L2 (ligando para PD-1), CD80 (ligando para CTLA-4), CD86 (ligando para CTLA-4), GAL9 (ligando para TIM-3) y HVEM (ligando para BTLA). Los métodos para producir un anticuerpo y los métodos para producir un polipéptido mediante síntesis química o procedimiento de ingeniería genética son métodos convencionales bien conocidos en la técnica, y un experto puede preparar un antagonista contra una molécula inhibitoria del punto de control inmunitario como se ha descrito anteriormente mediante métodos convencionales.

60 "Un agonista contra una molécula coestimuladora de punto de control inmunitario" puede ser un anticuerpo agonista que se une a un receptor coestimulador de punto de control inmunitario, un polipéptido soluble que está diseñado basado en un ligando coestimulador de punto de control inmunitario y tiene un efecto para activar el receptor, o un vector capaz de expresar el polipéptido, o similares. Los ejemplos de la molécula coestimuladora de punto de control inmunitario incluyen receptores tales como CD137, OX40 y GITR, y ligandos tales como CD137L (ligando para CD137), OX40L (ligando para OX40) y TNFSF18 (ligando para GITR).

65 En los casos en que el componente anti-CD4 se usa en combinación con un anticuerpo contra una molécula de punto de control inmunitario, los ejemplos específicos preferidos del anticuerpo antagonista descrito anteriormente incluyen un anticuerpo anti-PD-1, anticuerpo anti-CTLA-4, anticuerpo anti-LAG-3, anticuerpo anti-TIM-3 y un

anticuerpo anti-BTLA, que se unen a un receptor para inhibir la unión de un ligando al receptor, y los ejemplos específicos preferidos del anticuerpo agonista descrito anteriormente incluyen un anticuerpo anti-CD137, anticuerpo anti-OX40 y un anticuerpo anti-GITR, que se unen a un receptor para estimular una vía de señalización aguas abajo. Los ejemplos específicos preferidos del anticuerpo también incluyen un anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-PD-L2, anticuerpo anti-CD80, anticuerpo anti-CD86, anticuerpo anti-GAL9 y un anticuerpo anti-HVEM, cuyos anticuerpos se unen a un ligando para un receptor inhibidor de punto de control inmunitario para inhibir la unión del ligando al receptor. El número del anticuerpo contra una molécula de punto de control inmunitario (anticuerpo de punto de control inmunitario) utilizado en combinación con el componente anti-CD4 no está restringido. Se puede usar un anticuerpo de punto de control inmunitario, o se pueden usar dos anticuerpos de punto de control inmunitario, o se pueden usar tres o más anticuerpos de punto de control inmunitario, en combinación con el componente anti-CD4.

Entre los anticuerpos descritos anteriormente, un anticuerpo preferido que puede usarse preferentemente junto con el componente anti-CD4 puede ser al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-PD-1 antagonista, anticuerpo anti-CTLA-4 antagonista, anticuerpo anti-LAG-3 antagonista, anticuerpo anti-TIM-3 antagonista, anticuerpo anti-BTLA antagonista, anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-PD-L2, anticuerpo anti-CD137 agonista, anticuerpo anti-OX40 agonista y un anticuerpo anti-GITR agonista; más preferentemente, al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-PD-1 antagonista, anticuerpo anti-CTLA-4 antagonista, anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-PD-L2, anticuerpo anti-CD137 agonista y un anticuerpo anti-OX40 agonista, o al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-LAG-3 antagonista, anticuerpo anti-TIM-3 antagonista, anticuerpo anti-BTLA antagonista y un anticuerpo anti-GITR agonista.

Los ejemplos especialmente preferidos incluyen al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-PD-1 antagonista, un anticuerpo anti-PD-L1 y un anticuerpo anti-PD-L2. Se puede obtener un efecto antineoplásico muy notable simplemente usando el componente anti-CD4 en combinación con al menos uno seleccionado entre un anticuerpo antagonista anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1 y un anticuerpo anti-PD-L2, y se puede obtener un efecto terapéutico aún mayor combinando adicionalmente con uno o más de otros antagonistas o agonistas del punto de control inmunitario o similares (los ejemplos preferidos incluyen un anticuerpo anti-CD137 agonista, un anticuerpo anti-OX40 agonista, un anticuerpo anti-CTLA-4 antagonista y similares).

Los ejemplos especialmente preferidos del anticuerpo usado en combinación con el componente anti-CD4 también incluyen un anticuerpo anti-CTLA-4 antagonista. Un anticuerpo anti-CTLA-4 antagonista solo puede usarse en combinación con el componente anti-CD4, o uno o más de otros antagonistas o agonistas del punto de control inmunitario o similares (los ejemplos preferidos incluyen un anticuerpo anti-PD-1 antagonista, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-PD-L2, un anticuerpo anti-CD137 agonista, un anticuerpo anti-OX40 agonista y similares) se pueden combinar adicionalmente con lo anterior, por lo que se puede obtener un efecto terapéutico aún mayor.

Los ejemplos especialmente preferidos del anticuerpo usado en combinación con el componente anti-CD4 incluyen además un anticuerpo anti-CD137 antagonista. Un anticuerpo anti-CD137 agonista solo puede usarse en combinación con el componente anti-CD4, o uno o más de otros antagonistas o agonistas del punto de control inmunitario o similares (los ejemplos preferidos incluyen un anticuerpo anti-PD-1 antagonista, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-PD-L2, un anticuerpo anti-CTLA-4 antagonista y similares) se pueden combinar adicionalmente con lo anterior, por lo que se puede obtener un efecto terapéutico aún mayor.

Ya se han desarrollado anticuerpos contra algunas de las moléculas de punto de control inmunitario, y tales anticuerpos conocidos se pueden usar de manera especialmente preferible. Los ejemplos específicos de la combinación preferida de anticuerpos incluyen una combinación de tres componentes: el componente anti-CD4, un anticuerpo anti-PD-1 antagonista y un anticuerpo anti-CTLA-4 antagonista; y una combinación de tres componentes: el componente anti-CD4, un anticuerpo anti-PD-L1 y un anticuerpo anti-CTLA-4 antagonista, pero una combinación de anticuerpos no está limitada a los mismos.

Los ejemplos de otras sustancias que se pueden usar en combinación con el componente anti-CD4 incluyen sustancias que tienen una acción para estimular la inmunidad celular o activar células CN (citofíticas naturales), como IFN- α/β , IL-12, GM-CSF, y varias quimiocinas (p. ej., CCL10, CCL5, RANTES, MIP-1). El uso combinado de estas sustancias con el componente anti-CD4 puede facilitar aún más la destrucción de las células cancerígenas por parte del sistema inmunitario.

La terapia celular inmunitaria es un método terapéutico para atacar las células cancerígenas utilizando células inmunitarias autólogas. Las células inmunitarias se extraen de la sangre o el tejido canceroso recogido o extraído de un paciente con cáncer, y cultivadas *in vitro* para proliferar y activarlas. Las células inmunitarias se recuperan y se administran al mismo paciente para atacar las células cancerígenas en el cuerpo del paciente. La terapia celular inmunitaria que se puede usar en combinación con el componente anti-CD4 no está limitada, y se puede usar cualquiera de las terapias celulares conocidas usadas convencionalmente para tratar el cáncer. Los ejemplos de la terapia con células inmunitarias incluyen, entre otros, terapia con TIL en la que los linfocitos presentes en un tejido tumoral (linfocitos infiltrantes de tumor) se aíslan, proliferan y luego se administran; terapia con LAK en la que los linfocitos que contienen principalmente células CN se extraen de un paciente, proliferan y luego se administran; la

5 terapia con CTC en la que se estimulan los linfocitos usando linfocitos y células cancerígenas extraídas de un paciente para proliferar CTC específicos para las células cancerígenas del paciente, y luego se administran CTC; y terapia de transferencia de células T (receptor de antígeno quimérico; CAR-T) en la que se transfieren las células T producidas por modificación genética. También se puede obtener un efecto terapéutico aún mayor mediante el uso combinado del componente anti-CD4 y la terapia con células inmunitarias.

10 La expresión "uso combinado" de ciertos ingredientes o fármacos eficaces, o la expresión "usado en combinación" significa que una pluralidad de principios activos se administran de manera concurrente, secuencial o por separado a un paciente. Se pueden proporcionar una pluralidad de principios activos para usar en combinación como formulaciones separadas. En los casos en que se administran simultáneamente, se puede contener una pluralidad de principios activos en una sola formulación.

15 La vía de administración del componente anti-CD4 puede ser oral o parenteral, y se prefiere la administración parenteral tal como la administración intramuscular, la administración subcutánea, la administración intravenosa o la administración intraarterial. El componente anti-CD4 puede administrarse localmente en la vecindad del tejido canceroso sólido, o puede administrarse en un ganglio linfático regional en la vecindad del cáncer sólido, y se prefiere la administración sistémica. Las vías de administración descritas anteriormente también se aplican a otras sustancias usadas en combinación con el componente anti-CD4.

20 El componente anti-CD4 se puede administrar en cualquier dosis siempre que sea eficaz para tratar la terapia del cáncer sólido. La dosis eficaz se selecciona apropiadamente según el tamaño del tumor, los síntomas, la edad y el peso corporal del paciente, y similares. La dosis del componente anti-CD4 puede ser, pero no se limita a, aproximadamente 0,001 mg/kg a 1000 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0,01 mg/kg a 100 mg/kg, en términos del peso del principio activo por día por 1 kg de peso corporal del paciente. La dosis descrita anteriormente puede administrarse a un paciente una vez o dividida en pocas o varias veces en un día. Durante el periodo de tratamiento, el componente anti-CD4 puede administrarse una vez, o diariamente durante unos o varios días, o puede administrarse varias veces cada pocos o varios días, cada pocas o varias semanas, o cada pocos o varios meses.

30 La dosis del antagonista contra la molécula de punto de control inmunitario también se selecciona apropiadamente dependiendo del tamaño del tumor, síntomas y similares. Por lo general, se obtiene un efecto deseable al aumentar la dosis total y la frecuencia de administración del antagonista más que las del componente anti-CD4. En los casos en que un anticuerpo contra la molécula de punto de control inmunitario se usa como antagonista, el anticuerpo puede ser dado a un paciente a una dosis de 1/5 a 5 veces la dosis del componente anti-CD4 por administración única, y con una frecuencia de 3 a 10 veces o más la frecuencia de administración del componente anti-CD4. La administración del antagonista puede continuarse a largo plazo. En los casos en que la administración única del componente anti-CD4 y algunas o varias administraciones de antagonista se usan en combinación, la administración del antagonista puede iniciarse antes, al mismo tiempo o después de la administración del componente anti-CD4. Cuando se usa un agonista contra la molécula de punto de control inmunitario en combinación con un componente anti-CD4, la dosis, etc. del agonista puede ser la misma que la del antagonista.

40 Otras sustancias y terapias que pueden usarse en combinación con el componente anti-CD4 pueden usarse de la misma manera que cuando se usan solas en la terapia contra el cáncer. También es posible reducir la dosis, la frecuencia de administración, el periodo de dosificación, etc. de los fármacos, ya que se obtiene un mayor efecto gracias al uso combinado con el componente anti-CD4.

45 El componente anti-CD4 y otras sustancias que pueden usarse en combinación con el mismo pueden formularse mezclándose apropiadamente con aditivos tales como vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables que sean adecuados para la vía de administración empleada. Los ejemplos de la formulación incluyen preparaciones orales tales como comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos y jarabes; y preparaciones parenterales tales como inhalantes, soluciones de inyección, supositorios y soluciones. Los métodos y aditivos de formulación que pueden usarse son bien conocidos en el campo de la formulación de productos farmacéuticos, y pueden usarse cualquiera de los métodos y aditivos.

50 Cuando el logro de un efecto terapéutico podría confirmarse mediante el método de la presente invención, el tratamiento eficaz, la prevención de metástasis y/o la prevención de la recurrencia del cáncer es/son posible(s) mediante la continuación de la administración del fármaco antineoplásico que se ha llevado a cabo para el paciente. La expresión "efecto terapéutico" incluye un efecto preventivo de metástasis y un efecto preventivo de recurrencia. Por ejemplo, si un paciente está siendo tratado mediante la administración combinada de un fármaco antineoplásico anti-CD4 y un fármaco antineoplásico de punto de control inmunitario, se puede obtener un efecto terapéutico deseado al continuar la administración combinada.

60 Cuando no se puede encontrar ningún efecto terapéutico, se puede considerar la revisión de la dosis del fármaco antineoplásico, el uso combinado de otro medio terapéutico, el cambio a otro medio terapéutico o similar. Por ejemplo, es posible considerar comenzar el uso combinado de un fármaco o fármacos antineoplásicos del punto de control inmunitario si el paciente ha estado recibiendo solamente la administración de un fármaco antineoplásico anti-CD4, o considerar cambiar el tipo o la dosis del fármaco antineoplásico de punto de control inmunitario si el

paciente ya ha estado recibiendo la administración combinada. Además, cuando se pudo encontrar un efecto terapéutico después de comenzar un tratamiento farmacológico antineoplásico, pero la inducción de una población particular de células T se volvió insuficiente a partir de entonces, se puede considerar de manera similar la revisión de la dosis o similar.

5

Ejemplos

La presente invención se describe a continuación mediante Ejemplos más concretos. Sin embargo, la presente invención no se limita a los Ejemplos descritos a continuación.

10

1. Preparación de anticuerpo humanizado anti-CD4 que tiene alta actividad CCDA

De acuerdo con el método descrito en el documento WO 2010/074266, se preparó un anticuerpo humanizado anti-CD4 humano IT1208 que tiene una actividad CCDA mejorada (en la que HV2 y LV0 descritos en el documento WO 2010/074266 están contenidos como la región variable; subtipo, IgG1). La actividad de unión del anticuerpo medida con Biacore T100 fue K_D (nM) <0,009, lo que indica una alta actividad de unión.

15

La medición de la actividad CCDA de IT1208 se llevó a cabo en las siguientes condiciones, de acuerdo con el protocolo para un kit de ensayo de actividad CCDA vendido por Promega. Después de mezclar suavemente 12.500 CMSP procedentes de un individuo sano, anti-CD4mAb (IT1208) y 75.000 células efectoras de bioensayo CCDA contenidas en el kit Promega, las células se cultivaron en una incubadora de CO₂ a 37 °C durante 6 horas. El reactivo luminiscente reactivo Bio-Glo se añadió al cultivo, y el cultivo continuó a temperatura ambiente durante 20 minutos, seguido de la medición de quimioluminiscencia utilizando un lector de placa de luminiscencia.

20

Los resultados se muestran en la Fig. 1. IT1208 mostró actividad CCDA a 1 nM o más, y la actividad luego aumentó de forma dependiente de la concentración para alcanzar el valor máximo a 50 nM. En los casos de Rituximab (antiCD20), que se usó como anticuerpo de control, la concentración a la que comenzó a encontrarse la actividad CCDA fue de 10 nM o más, y la concentración a la que se alcanzó el valor máximo fue de 1 μM o más.

25

2. Mecanismo de acción del efecto antitumoral mediante el uso del anticuerpo anti-CD4 solo, el uso del anticuerpo del punto de control inmunitario solo o el uso combinado del anticuerpo anti-CD4 + anticuerpo del punto de control inmunitario

30

La estirpe celular de melanoma de ratón B16F10 (5 x 10⁵ células/ratón) se trasplantó subcutáneamente en el abdomen derecho de ratones C57BL/6 (hembras, 7 semanas de edad), y la administración de anticuerpos se realizó como se describe a continuación (Día 0 = día del trasplante de células cancerígenas).

35

Tabla 1

| | |
|---|---|
| Grupo de control negativo | No se administra ningún anticuerpo. |
| Solo grupo anti-CD4 | Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg; GK1.5) se administra por vía intraperitoneal dos veces el día 5 y el día 9. |
| Solo grupo anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-OX40 o anti-CTLA-4 | Un anticuerpo anti-PD-L1 (10F.9G2, fabricado por BioXcell), un anticuerpo anti-PD-L2 (TY25, fabricado por BioXcell), un anticuerpo anti-OX40 (OX-86, anticuerpo agonista; fabricado por BioXcell), o un anticuerpo anti-CTLA-4 (9D9, anticuerpo antagonista; fabricado por BioXcell) se administra por vía intraperitoneal a una dosis de 0,2 mg el día 4, día 8, día 14 y día 18, cuatro veces en total. |
| Grupo de combinación anti-CD4 + anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-OX40 o anti-CTLA-4 | Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg) se administra por vía intraperitoneal dos veces el día 5 y el día 9, y se administra un anticuerpo anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-OX40 o anti-CTLA-4 a una dosis de 0,2 mg el día 4, día 8, día 14 y día 18, cuatro veces en total. |
| Solo grupo anti-CD8 | Un anticuerpo anti-CD8 (0,2 mg; YTS169.4) se administra por vía intraperitoneal dos veces el día 5 y el día 9. |
| Grupo de combinación anti-CD4 + anti-CD8 | Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg; GK1.5) se administra por vía intraperitoneal dos veces el día 5 y el día 9, y un anticuerpo anti-CD8 (0,2 mg; YTS169.4) se administra por vía intraperitoneal dos veces el día 5 y el día 9. |

La Fig. 2 muestra el volumen del tumor en cada grupo de ratones C57BL/6 (solo grupo anti-CD4, solo grupo de anticuerpo de punto de control inmunitario y grupo combinado de estos anticuerpos) trasplantados con la estirpe celular B16F10. Se calculó el volumen del tumor (diámetro corto x diámetro corto x diámetro largo x π/6) a partir del diámetro del tumor sólido medido el día 16.

40

El anticuerpo anti-CD4 inhibió significativamente el crecimiento del tumor sólido de melanoma B16 a aproximadamente 1/3 en relación con el del grupo de control (Dunnett; nivel de significancia, p <0,01). Aquí,

45

basándose en la observación del efecto inhibitor del crecimiento tumoral mediante el uso de únicamente cada agente, se muestra claramente que el anticuerpo anti-CD4 tiene un mejor efecto inhibitor que los otros anticuerpos del punto de control inmunitario cuando se usa solo.

5 Cuando el anticuerpo anti-PD-L1, el anticuerpo anti-PD-L2, el anticuerpo anti-OX40 y el anticuerpo anti-CTLA-4 se administraron individualmente, se pudo observar una inhibición significativamente más fuerte del crecimiento en relación con el crecimiento en el grupo de control (Dunnett; nivel de significancia, $p < 0,01$), aunque la inhibición fue más débil que la del anticuerpo anti-CD4. Cuando el anticuerpo anti-CD4 se usó en combinación con el anticuerpo anti-PD-L1, el anticuerpo anti-PD-L2, el anticuerpo anti-OX40 o el anticuerpo anti-CTLA-4, el crecimiento del tumor sólido de melanoma B16 fue más fuertemente inhibido que en los grupos en los que los anticuerpos se administraron individualmente sin la administración del anticuerpo anti-CD4. Los promedios en los grupos de anticuerpos de punto de control inmunitario solo fueron significativamente diferentes de los promedios en los grupos de combinación anti-CD4 (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,05$ o $p < 0,01$). Por ende, los efectos sinérgicos de las combinaciones se hicieron evidentes. En particular, el volumen tumoral promedio en el grupo de combinación anti-CD4 + anti-PD-L1 fue significativamente diferente al del solo grupo anti-CD4 (nivel de significancia, 5 %; Dunnett). Por lo tanto, se mostró un notable efecto sinérgico por el uso combinado del anticuerpo anti-CD4 y el anticuerpo anti-PD-L1.

20 La figura 3 muestra el resultado del estudio sobre el uso combinado de un anticuerpo anti-CD4 y un anticuerpo anti-CD8. El volumen del tumor se calculó de la misma manera como se ha descrito anteriormente. La Fig. 3B muestra el resultado de la comparación del volumen del tumor en el día 15.

25 Como se muestra en la Fig. 3, la administración del anticuerpo anti-CD8 junto con el anticuerpo anti-CD4 provocó la desaparición completa de la acción antitumoral del anticuerpo anti-CD4. Quedó claro que las células T positivas para CD8, es decir, las células T citotóxicas (CTC), contribuyen en gran medida al mecanismo de acción del anticuerpo anti-CD4.

30 Los ratones C57BL/6 en cada grupo trasplantado con la estirpe celular B16F10 se sacrificaron el día 14 y se extrajo el tumor. Desde la parte del tejido tumoral, se separaron los linfocitos intratumorales y se analizaron los linfocitos distintos utilizando un citómetro de flujo. Parte del tejido tumoral restante se usó para la preparación de secciones de tejido. El procedimiento fue el siguiente.

35 En cada ratón se inyectó por vía intravenosa un anticuerpo anti-CD45.2, y el tejido tumoral se separó 3 minutos después. El tejido tumoral se cortó con tijeras y luego se trató con colagenasa, seguido de la obtención de linfocitos intratumorales por el método de centrifugación por gravedad específica.

40 Los linfocitos intratumorales se tñeron con un anticuerpo anti-CD45, anticuerpo anti-CD11b, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-NK1.1 y anticuerpo anti-CD8, y la población de células T $CD8^+$ en el tejido parenquimal tumoral que es $CD11b^- CD19^- NK1.1^- CD8^+$ (en lo sucesivo, esta población se denomina células T $CD8^+$) contenida en los linfocitos en el tejido parenquimal tumoral ($CD45^+ TIV CD45.2^-$) se analizó por citometría de flujo. Además, se realizó la tinción con un anticuerpo anti-CD45, anticuerpo anti-CD11b, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-NK1.1, anticuerpo anti-CD8, anticuerpo anti-PD-1 y anticuerpo anti-CD137 para analizar $PD-1^+ CD137^+$ células T $CD8^+$.

45 Además, las células T $CD8$ se sometieron a cultivo de estimulación con PMA e ionomicina, y se tñeron con un anticuerpo anti-IFN γ y un anticuerpo anti-TNF α , para analizar IFN γ + TNF α + células T $CD8^+$.

50 Antes de la tinción con los anticuerpos descritos anteriormente, los receptores Fc se bloquearon con un anticuerpo anti-CD16/CD32 de ratón (clon 2.4G2, BioXcell). La medición se realizó con Gallios (Beckman Coulter), seguido de un análisis con el software FlowJo (versión 9.7.5; FlowJo, LLC). Las células muertas se eliminaron mediante tinción con yoduro de propidio (PI).

55 El tejido tumoral se embebió en el compuesto Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek) y se congeló en nitrógeno líquido. Se prepararon secciones de tejido con un espesor de 6 μm , y luego se sometieron a un bloqueo de reacción no específica usando Blocking One (Nacalai Tesque, Inc.), seguido de tinción con un anticuerpo anti-CD8, anticuerpo anti- $\Delta hLNGFR$ (forma truncada del receptor del factor de crecimiento nervioso con baja afinidad humano) y yoduro de propidio. Posteriormente, las secciones de tejido se incorporaron usando el reactivo Prolong Gold (Life Technologies), y se observaron imágenes de inmunotinción usando un microscopio confocal SP5 (Leica Microsystems).

60 Como se muestra en la Fig. 4B, el anticuerpo anti-CD4 potencia significativamente las células para $CD8$ intratumorales 27 veces en relación con las del grupo de control (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,01$). Además, las células $PD-1^+ CD137^+ T CD8^+$ y las células IFN $\gamma^+ TNF\alpha^+ T CD8^+$ también aumentaron 2,7 veces y 3,2 veces, respectivamente (Fig. 4E, G) Es decir, se produjo especialmente un aumento de células $CD8^+ CD44^{al} CD62L^{ba} PD-1^+ CD137^+$ en respuesta a la depleción de las células positivas para $CD4$ por el anticuerpo anti-CD4 en los ratones.

65 Por otra parte, el análisis de las secciones de tejido tumoral por el método inmunohistológico reveló un aumento

evidente en las células positivas para CD8 intratumorales debido a la administración del anticuerpo anti-CD4 (Fig. 5).

3. Mecanismo de acción del efecto antitumoral mediante únicamente el uso del anticuerpo anti-CD4, únicamente el uso del anticuerpo anti-PD-1 o el anticuerpo anti-PD-L1, o el uso combinado del anticuerpo anti-CD4 + anticuerpo anti-PD-1 o anticuerpo anti-PD-L1

La estirpe celular de melanoma de ratón B16F10 (5×10^5 células/ratón) se trasplantó subcutáneamente en el abdomen derecho de ratones C57BL/6 (hembras, 7 semanas de edad), y la administración de anticuerpos se realizó como se describe a continuación (día 0 = día del trasplante de células cancerígenas).

Tabla 2

| | |
|--|---|
| Grupo de control negativo | No se administra ningún anticuerpo |
| Solo grupo anti-CD4 | Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg; GK1.5) se administra por vía intraperitoneal dos veces el día 5 y el día 9. |
| Solo grupo anti-PD-1 o anti-PD-L1 | Un anticuerpo anti-PD-1 (J43, fabricado por BioXcell) o anticuerpo anti-PD-L1 (10F.9G2, fabricado por BioXcell) se administra por vía intraperitoneal a una dosis de 0,2 mg el día 4, día 8, día 14 y día 18, cuatro veces en total. |
| Grupo de combinación anti-CD4 + anti-PD-1 o anti-PD-L1 | Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg; GK1.5) se administra por vía intraperitoneal dos veces el día 5 y el día 9, y un anticuerpo anti-PD-1 (J43, fabricado por BioXcell) o un anticuerpo anti-PD-L1 (10F.9G2, fabricado por BioXcell) se administra por vía intraperitoneal a una dosis de 0,2 mg el día 4, día 8, día 14 y día 18, cuatro veces en total. |

De los ratones de cada grupo, se extrajeron muestras de sangre el día 14, y las relaciones de células PD-1⁺, células CD44^{al} y células CD137⁺ entre células CD8⁺ en la sangre fueron investigadas por análisis de citometría de flujo. El procedimiento fue el siguiente.

Se extrajo sangre de cada ratón y se obtuvieron linfocitos de sangre periférica por el método de centrifugación por gravedad específica. Los linfocitos de sangre periférica se tiñeron con un anticuerpo anti-CD45, anticuerpo anti-CD11b, anticuerpo anti-CD19, anticuerpo anti-NK1.1, anticuerpo anti-CD8, anticuerpo anti-CD44 (clon IM7) y anticuerpo anti-PD-1, y se sometió a análisis de citometría de flujo de células de sangre periférica PD-1⁺ CD44^{al} T CD8⁺. Además, la tinción con un anticuerpo anti-CD45, anticuerpo anti-CD11b, anticuerpo anti-CD 19, anticuerpo anti-NK1.1, anticuerpo anti-CD8, anticuerpo anti-CD44 y anticuerpo CD137 se llevó a cabo para analizar las células de sangre periférica CD137⁺ CD44^{al} T CD8⁺.

Antes de la tinción con los anticuerpos descritos anteriormente, los receptores Fc se bloquearon con un anticuerpo anti-CD16/CD32 de ratón (clon 2.4G2, BioXcell). La medición se realizó con Gallios (Beckman Coulter), seguido de un análisis con el software FlowJo (versión 9.7.5; FlowJo, LLC). Las células muertas se eliminaron mediante tinción con yoduro de propidio.

Los resultados se muestran en la Fig. 6. Se demostró notablemente que la administración única de un anticuerpo anti-CD4, la administración combinada de un anticuerpo anti-CD4 y un anticuerpo anti-PD-1, o la administración combinada de un anticuerpo anti-CD4 y un anticuerpo anti-PD-L1 (clon 10F.9G2) aumentó las células PD-1⁺ CD44^{al} T CD8⁺, las células CD137⁺ CD44^{al} T CD8⁺, y las células PD-1⁺ CD137⁺ T CD8⁺.

De entre los ratones de cada grupo, el tumor se extirpó el día 14 y se extrajo el ARNm intratumoral, seguido de la investigación de los niveles de expresión de los siguientes genes mediante RT-PCR cuantitativa. TNF- α (Tnf), IFN- γ (Ifng), Cxcl10, Cd274, Fasl, Prfl y granzima (Gzmb).

Los resultados se muestran en la Fig. 7. Podría confirmarse que la administración del anticuerpo anti-CD4 provocó una alta expresión de moléculas humorales, tales como IFN- γ y granzima, producidas por células efectoras que incluyen células T citotóxicas. Con esto, se sugirió con insistencia el siguiente mecanismo de acción: eliminación de células positivas para CD4 \rightarrow activación de células positivas para CD8 y mejora de su infiltración tisular \rightarrow efecto antitumoral en células por células efectoras activadas (CTC y similares).

REIVINDICACIONES

1. Un método para probar un efecto terapéutico de una terapia contra el cáncer con al menos un fármaco antineoplásico seleccionado entre fármacos antineoplásicos que comprenden como principio activo un anticuerpo anti-CD4, fármacos antineoplásicos que comprenden como principio activo un antagonista de una molécula inhibidora del punto de control inmunitario y fármacos antineoplásicos que comprenden como principio activo un agonista de una molécula coestimuladora de punto de control inmunitario, comprendiendo dicho método investigar la expresión de:
- 5
- 10 (1) al menos un receptor de punto de control inmunitario seleccionado entre el grupo que consiste en PD-1, CD137 y TIM-3;
(2) CD8; y
(3) al menos una molécula de superficie celular seleccionada entre el grupo que consiste en CD44 y CD45RO;
- 15 en células T usando una muestra sanguínea procedente de un paciente que recibió dicho al menos un fármaco antineoplásico, en donde la inducción de una población de células T que es positiva para dicha molécula de punto de control inmunitario mencionada en (1) anterior y positiva para CD8, y que muestra una alta expresión de CD44 y/o alta expresión de CD45RO, indica que dicho fármaco antineoplásico produce un efecto terapéutico en dicho paciente.
- 20
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además investigar la expresión de CD45RA en células T, en donde dicha población de células T es negativa para CD45RA.
- 25
3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además investigar la expresión de CD62L en células T, en donde dicha población de células T muestra una baja expresión de CD62L.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además investigar la expresión de CCR7 en células T, en donde dicha población de células T es negativa para CCR7.
- 30
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho análisis de expresión se lleva a cabo mediante análisis por citometría de flujo.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho fármaco antineoplásico que comprende como principio activo un anticuerpo anti-CD4 es un fármaco antineoplásico que comprende como principio activo un anticuerpo anti-CD4 que tiene una alta actividad citotóxica o un anticuerpo anti-CD4 o fragmento de unión a antígeno del mismo, anticuerpo o fragmento que comprenden un componente citotóxico unido al mismo.
- 35
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha molécula inhibidora de punto de control inmunitario es al menos una seleccionada entre el grupo que consiste en PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, BTLA, PD-L1, PD-L2, CD80, CD86, GAL9 y HVEM, y dicha molécula coestimuladora de punto de control inmunitario es al menos una seleccionada de entre el grupo que consiste en CD137, OX40, GITR, CD137L, OX40L y TNFSF18.
- 40
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho antagonista y dicho agonista son cada uno un anticuerpo contra una molécula de punto de control inmunitario.
- 45
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo contra una molécula de punto de control inmunitario es al menos uno seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-PD-1 antagonista, anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-PD-L2, anticuerpo anti-CD137 agonista, anticuerpo anti-OX40 agonista y anticuerpo anti-CTLA-4 antagonista.
- 50
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que es un método para probar un efecto terapéutico de una terapia contra el cáncer con un fármaco antineoplásico que comprende como principio activo un anticuerpo anti-CD4.
- 55
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que es un método para probar un efecto terapéutico de una terapia contra el cáncer mediante el uso combinado de un fármaco antineoplásico que comprende como principio activo un anticuerpo anti-CD4 y al menos un fármaco antineoplásico que comprende como principio activo un anticuerpo contra una molécula de punto de control inmunitario.
- 60

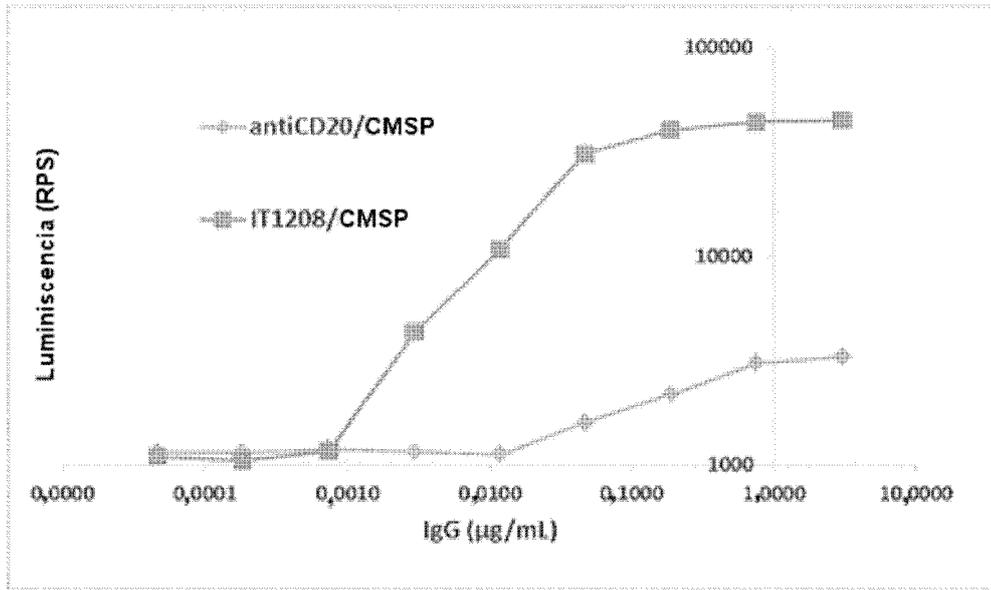


Fig.1

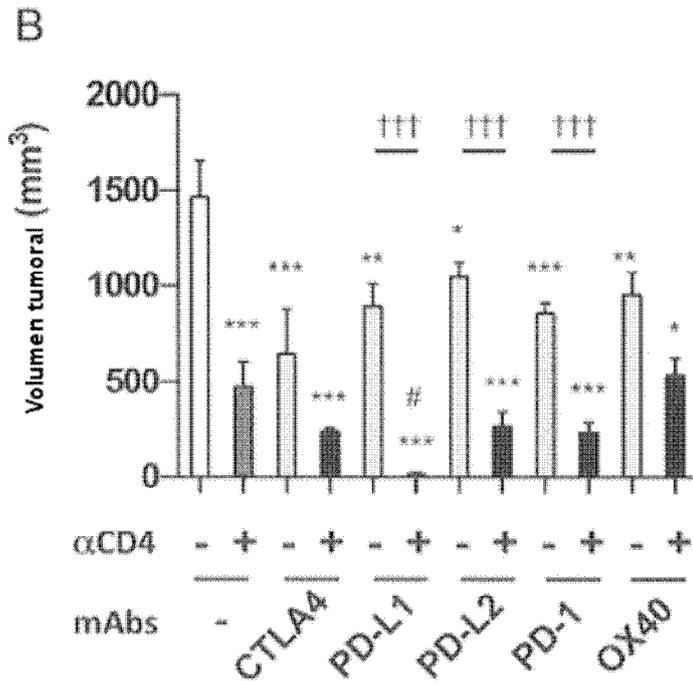


Fig.2

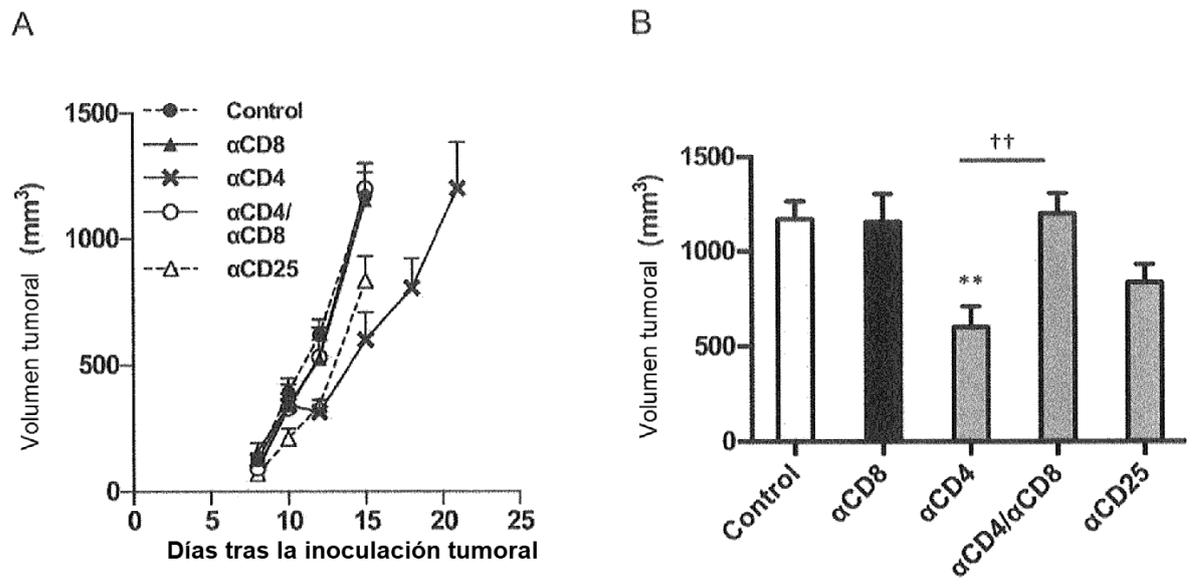


Fig.3

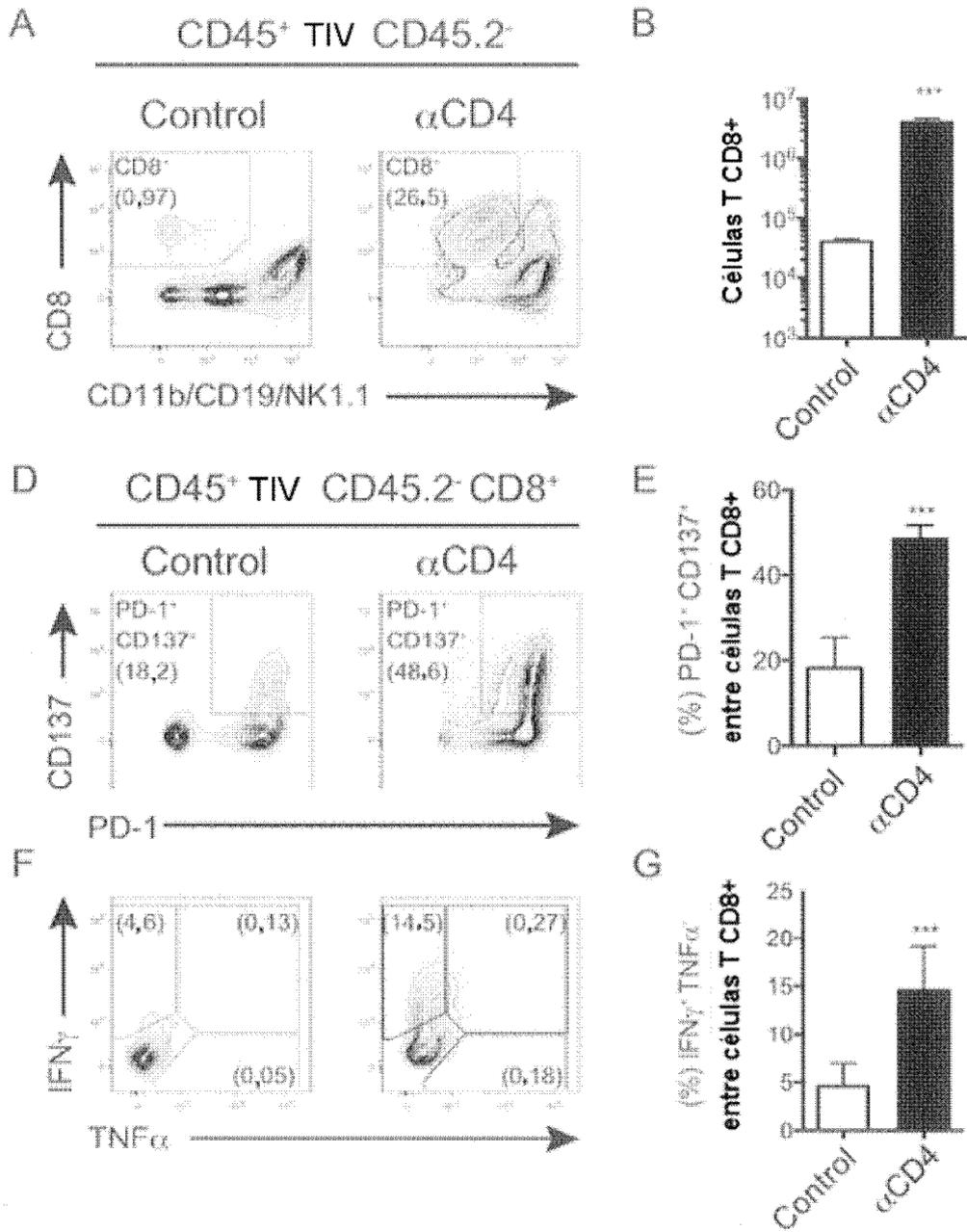


Fig.4

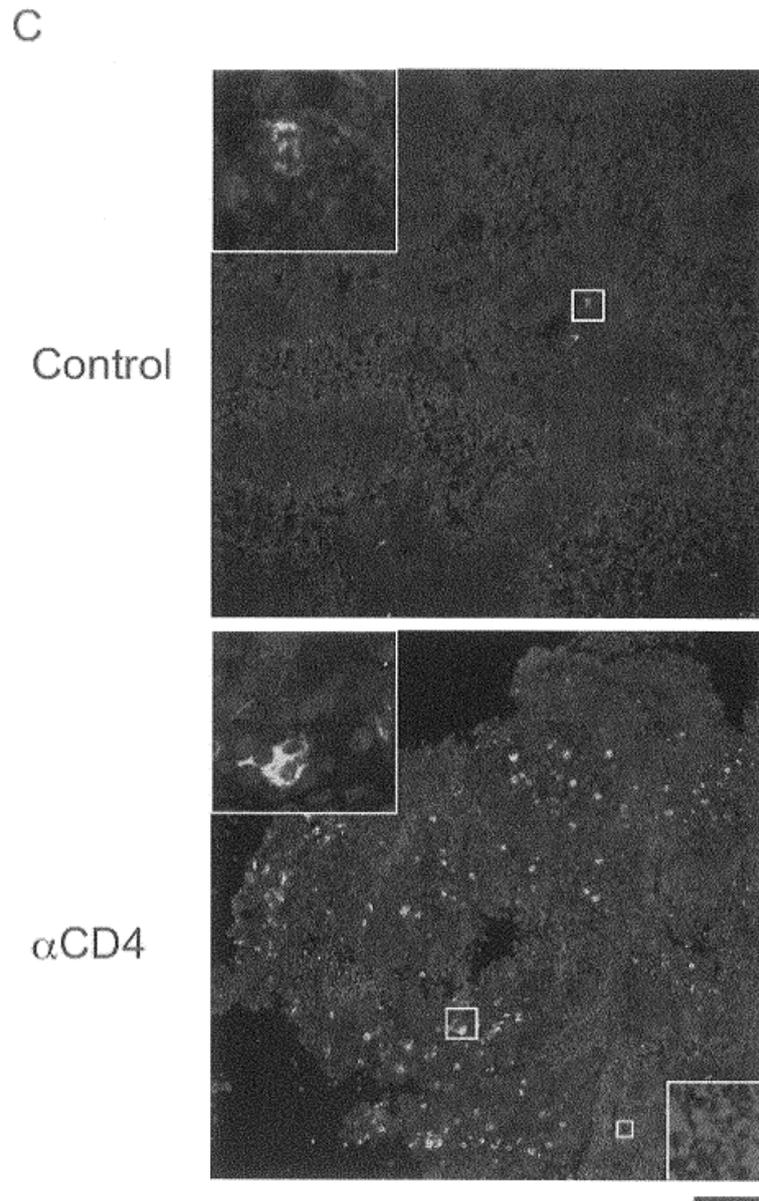


Fig.5

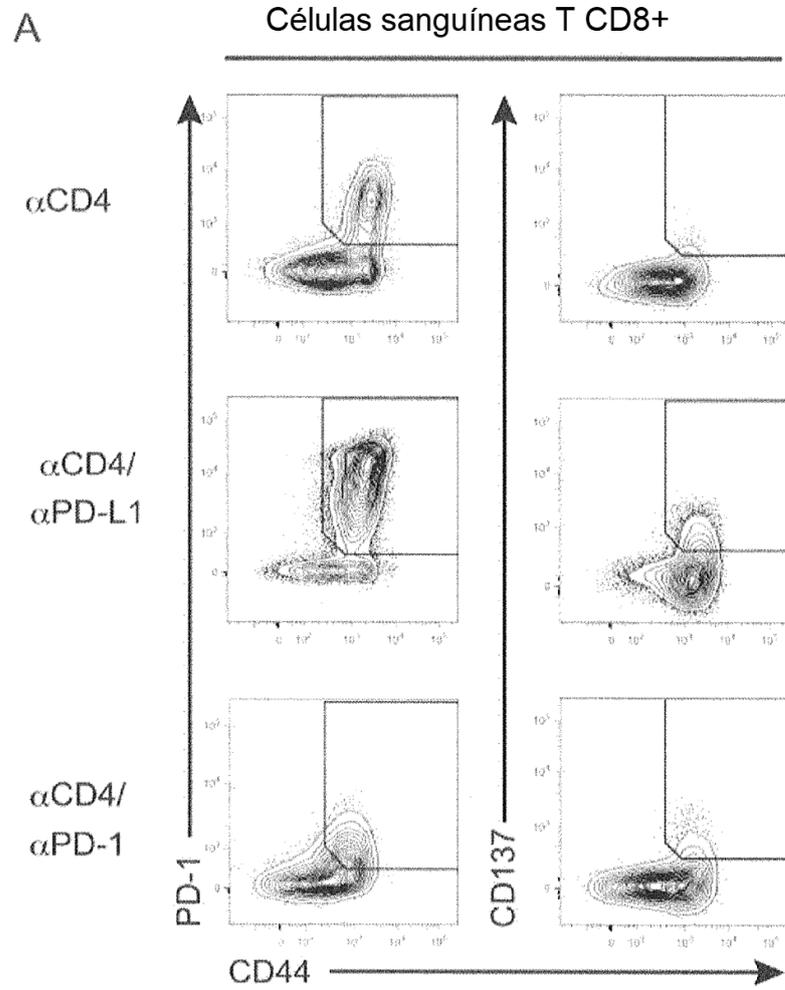


Fig.6-1

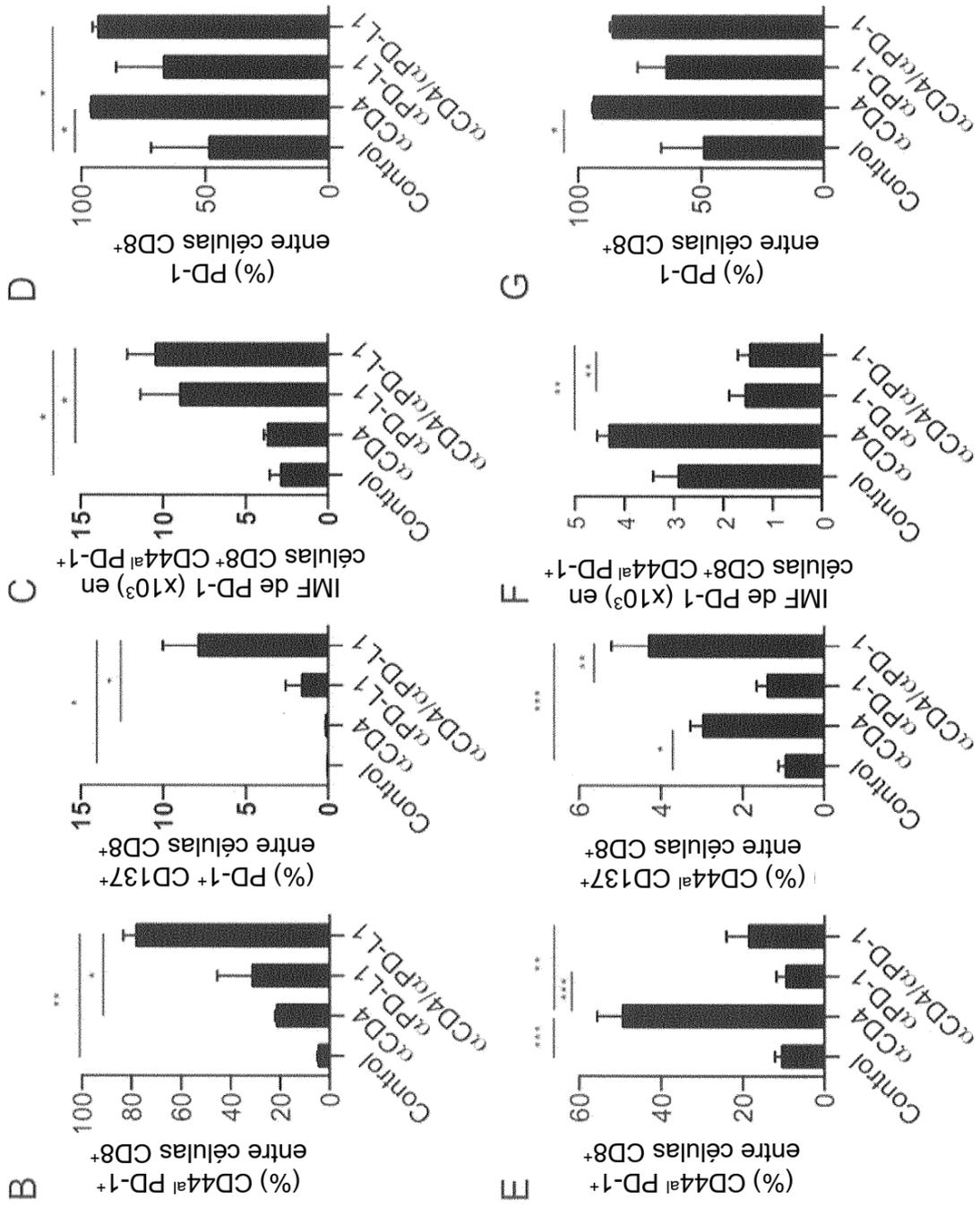


Fig.6-2

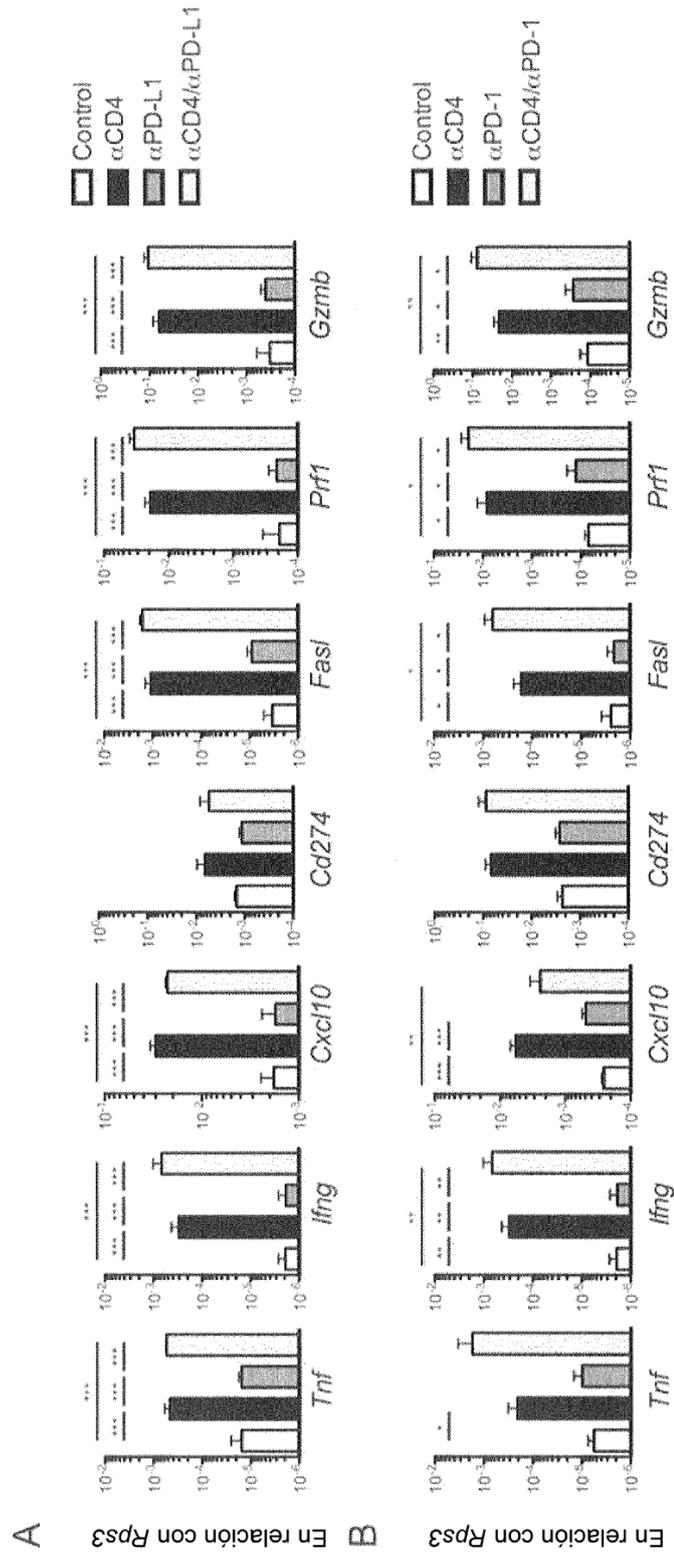


Fig.7