

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 406**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2008** **E 16170401 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019** **EP 3124046**

54 Título: **Terapias de combinación que emplean moléculas de enlazamiento a G1TR**

30 Prioridad:

12.07.2007 US 959246 P

30.10.2007 US 1021

05.05.2008 US 126431

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

30.07.2020

73 Titular/es:

G1TR, INC. (100.0%)

55 Cambridge Parkway, Suite 102

Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

ROSENZWEIG, MICHAEL;

PONATH, PAUL y

PONTE, JOSE F.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 776 406 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

Terapias de combinación que emplean moléculas de enlazamiento a GTR

Solicitudes relacionadas

- 5 Esta solicitud reivindica prioridad para las solicitudes provisionales de los EE. UU., USSN 60/959,246, presentada el 12 de julio de 2007, titulada "Combination Therapies Employing GTR Binding Molecules", USSN 61/001,021, presentada el 30 de octubre de 2007, titulada "Combination Therapies Employing GTR Binding Molecules", y USSN 61/126,431, presentada el 5 de mayo de 2008, titulada "Combination Therapies Employing GTR Binding Molecules".

Antecedentes de la invención

- 10 El cáncer es uno de los problemas de salud más prevalentes en el mundo hoy, afectando aproximadamente uno de cada cinco individuos en los Estados Unidos. Rutinariamente se emplea una variedad de agentes quimioterapéuticos para combatir el cáncer. Desafortunadamente, muchos de estos fármacos tienen alguna toxicidad en las dosis en las cuales son efectivos contra los tumores. Además, la resistencia a la quimioterapia es una causa principal de fallos en el tratamiento contra el cáncer. Se han desarrollado estrategias para mejorar el tratamiento contra el cáncer a lo largo de los años, pero hay todavía necesidad por terapias efectivas. Los métodos para potenciar los efectos antitumorales de las quimioterapias serán útiles para tratar o reducir el avance, severidad o efectos de la neoplasia en sujetos (por ejemplo humanos).

Resumen de la invención

- 20 La invención está definida por las reivindicaciones anexas. La presente invención está basada, al menos en parte, en el descubrimiento de que las terapias de combinación que emplean una molécula de enlazamiento a GTR, por ejemplo, un anticuerpo anti-GTR, y al menos un agente adicional, el cual no es una molécula de enlazamiento a GTR (por ejemplo, un agente quimioterapéutico) son más efectivas en el tratamiento y/o prevención del cáncer y/o reducción del tamaño de ciertos tumores que la administración de un agente o agentes sin una molécula de enlazamiento a GTR. Además, en una realización, una terapia de combinación de la invención tiene un perfil de seguridad mejorado. Por ejemplo, en una realización, puesto que la terapia de combinación de la invención es más efectiva, al menos uno de los agentes puede ser utilizado a una dosis inferior que la requerida para su eficacia cuando se utiliza solo.

- 30 De acuerdo con lo anterior, en un aspecto la presente invención provee un anticuerpo de enlazamiento a GTR, o un fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo, para uso en un método para reducir el tamaño de un tumor en un sujeto, comprendiendo el método administrar dicho anticuerpo de enlazamiento a GTR, o dicho fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo, y uno o más ciclos de al menos un agente adicional al sujeto, de tal forma que se reduce el tamaño del tumor, en donde el anticuerpo de enlazamiento a GTR, o el fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo, actúa como un agonista de GTR; en donde el al menos un agente adicional es Gemcitabina; en donde el tumor es un tumor de colon o adenocarcinoma de colon; y en donde el anticuerpo de enlazamiento a GTR, o el fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo, actúa sinérgicamente con el agente quimioterapéutico o tiene un efecto aditivo con el agente quimioterapéutico.

- 35 En una realización, el al menos un agente adicional se administra al sujeto antes de la administración de la molécula de enlazamiento a GTR, o un fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo. En otra realización, el al menos un agente adicional es administrado al sujeto de manera concomitante con la molécula de enlazamiento a GTR, o fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo. En aún otra realización, el al menos un agente adicional es administrado al sujeto después de la administración de la molécula de enlazamiento a GTR, o del fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo.

- 40 En una realización, el anticuerpo de enlazamiento a GTR, o fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo, es un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo del mismo. En una realización, el anticuerpo de enlazamiento a GTR, o fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo, es un anticuerpo humano o fragmento de anticuerpo del mismo. En una realización, el anticuerpo humanizado comprende los CDRs mostrados en SEQ ID NOS: 1, 2 o 3, 4, 5, 6 o 7. En otra realización, la molécula de enlazamiento a GTR es un anticuerpo quimérico o fragmento de anticuerpo del mismo.

En una realización, el tumor está en una etapa seleccionada del grupo consistente de Etapa I, Etapa II, Etapa III y Etapa IV.

- 50 En una realización, el tumor tiene al menos aproximadamente 0.5 mm x 0.5 mm. En otra realización, el tumor tiene al menos aproximadamente 1 mm x 1 mm. En aún otra realización, el tumor tiene un volumen de al menos aproximadamente 100 mm³. En una realización, el tumor es metastásico.

En una realización, la administración de un anticuerpo de enlazamiento a GTR, o un fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo, y al menos un agente quimioterapéutico da como resultado una inhibición del tamaño tumoral en al menos aproximadamente 42% hasta al menos aproximadamente 90%.

En una realización, el tumor es un tumor establecido al inicio del tratamiento. En otra realización, el tumor es un tumor secundario al inicio del tratamiento.

Breve descripción de los dibujos

5 La figura 1 representa una gráfica que muestra el efecto de un análogo de nucleósido, gemcitabina (Gemzar) (80 mg/kg), en combinación con el anticuerpo anti-GITR, 2F8 (0.4 mg), sobre el volumen tumoral en el transcurso del tratamiento en comparación con el efecto de la gemcitabina sola, 2F8 solo y un control de vehículo.

10 La figura 2 representa una gráfica que muestra el efecto del análogo de nucleósido, gemcitabina (Gemzar) (80 mg/kg), en combinación con el anticuerpo anti-GITR, 2F8 (0.4 mg), sobre un tiempo de supervivencia medio (curva de supervivencia de Kaplan-Meier) con el transcurso del tratamiento en comparación con el efecto de la gemcitabina sola, 2F8 solo y un control de vehículo.

La figura 3 representa una gráfica que muestra el efecto del análogo de nucleósido, gemcitabina (Gemzar) (80 mg/kg), en combinación con el anticuerpo anti-GITR, 2F8 (0.4 mg), sobre el número de tumores metastásicos en el transcurso del tratamiento en comparación con el efecto de la gemcitabina sola, 2F8 solo y un control de vehículo.

15 La figura 4 representa una gráfica que muestra el efecto de un agente que afecta la formación de microtúbulos, paclitaxel (Taxol®), (10 mg/kg), en combinación con el anticuerpo anti-GITR, 2F8 (0.4 mg), volumen tumoral con el transcurso del tratamiento en comparación con el efecto del paclitaxel solo, 2F8 solo, y control de vehículo.

La figura 5 representa una gráfica que muestra el efecto del agente alquilante; ciclofosfamida (Cytoxan) (150 mg/kg), en combinación con el anticuerpo anti-GITR, 2F8 (0.4 mg), sobre el volumen tumoral durante el transcurso del tratamiento en comparación con el efecto de la ciclofosfamida sola, y un control de vehículo.

20 La figura 6 representa una gráfica que muestra el efecto del análogo nucleótido, fluorouracilo (5-FU) (75 mg/kg), en combinación con el anticuerpo anti-GITR, 2F8 (0.4 mg), sobre el volumen tumoral con el transcurso del tratamiento en comparación con el efecto del fluorouracilo solo, y un control de vehículo.

25 La figura 7 representa una gráfica que muestra el efecto del inhibidor de topoisomerasa II, doxorubicina (Adriamicyna) (5 mg/kg), en combinación con el anticuerpo anti-GITR, 2F8 (0.4 mg), sobre el volumen tumoral con el transcurso del tratamiento en comparación con el efecto de fluorouracilo solo, un control de vehículo.

La figura 8 representa una gráfica que muestra el efecto del agente alquilante, ciclofosfamida (Cytoxan) (150 mg/kg), en combinación con el anticuerpo anti-GITR, 2F8 (0.4 mg), sobre el volumen tumoral con el transcurso del tratamiento en comparación con el efecto de la ciclofosfamida sola, y un control de vehículo.

Descripción detallada

30 La presente divulgación provee, en parte, métodos y kits para el tratamiento de cáncer. Más específicamente, se ha demostrado que la terapia de combinación que emplea una molécula de enlazamiento a GITR, por ejemplo, un anticuerpo anti-GITR, y al menos un agente adicional, el cual no es una molécula de enlazamiento a GITR (por ejemplo, un agente quimioterapéutico) es más efectiva en la reducción del tamaño de ciertos tumores que cualquier agente solo. El gen (GITR) relacionado con la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) inducido por
35 glucocorticoides, también conocido como miembro 18 de la superfamilia de receptores de TNF (TNFRSF18) es una proteína transmembrana tipo I con homología con los miembros de la familia del receptor de TNF (Nocentini G, et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94:6216-21; Gurney AL, et al. (1999) Curr Biol 9:215-8). El GITR se expresa a bajos niveles en células T CD4+ y CD8+ en reposo y se sobreexpresa después de la activación de la células T. La unión de GITR provee una señal coestimuladora que potencia la proliferación de células T tanto CD4+ como CD8+ y funciones efectoras, (Kohm AP, et al. (2004) J Immunol 172:4686-90; Kanamaru F, et al. (2004) J Immunol 172:7306-14; Ronchetti S, et al. (2004) Eur J Immunol 34:613-22; Tone M, et al. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100:15059-64; Stephens GL, et al. (2004) J Immunol 2004;173:5008-20). Además, el GITR se expresa constitutivamente a altos niveles en células T reguladoras. Aunque el GITR ha demostrado previamente potencial a respuestas inmunes a
40 ciertos antígenos proteínicos, no se había demostrado previamente que potenciara los efectos antitumorales de agentes utilizados para combatir el, cáncer.

Con el fin de que la presente invención pueda ser entendida más fácilmente, se definen primero ciertos términos.

I. Definiciones

Por conveniencia, antes de una descripción adicional de la presente invención, se definen aquí ciertos términos empleados en las especificaciones, ejemplos y reivindicaciones anexas.

50 Las formas singulares “un”, “una, uno” y “el/la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.

El término “administrar” incluye cualquier método de suministro de una composición farmacéutica o agente terapéutico en el sistema de un sujeto a una región particular en o sobre un sujeto. Las expresiones “administración sistémica”,

“administrado por vía sistémica”, “administración periférica” y “administrado periféricamente” tal como se utiliza aquí indica la administración de un compuesto, fármaco u otro material de forma no directa en el sistema nervioso central, tal como entra en el sistema del sujeto y, así, este está sujeto a metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea. “Administración parenteral” y “administrado por vía parenteral” indica modos de administración diferentes a administración entérica y tópica, usualmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal e intraesternal.

El término “receptor de TNF inducido por glucocorticoide” (abreviado aquí como “GITR”), también conocido como superfamilia 18 de receptor de TNF (TNFRSF18), TEASR, y 312C2, tal como se utilizan aquí, se refieren a miembros de la familia de factor de necrosis tumoral/receptor de factor de crecimiento de nervios. El GITR es una proteína transmembrana tipo I de 241 aminoácidos caracterizada por tres seudorrepeticiones de cisteína en el dominio extracelular y protege específicamente la apoptosis inducida por receptores de células T, aunque no protege células de otras señales apoptóticas, incluyendo el disparo de Fas, tratamiento con dexametasona o irradiación UV (Nocentini, G, et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 94:6216-6222). Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos del GITR humano (hGITR), de las cuales hay tres variantes de empalme, son conocidos y pueden encontrarse, por ejemplo, en los números de acceso a GenBank Nos. gi:40354198, gi:23238190, gi:23238193, y gi:23238196.

El término “molécula de enlazamiento” tal como se utiliza aquí incluye moléculas que contienen al menos un sitio de enlazamiento a antígeno que se enlaza específicamente a su diana. Por ejemplo, una molécula de enlazamiento puede comprender un sitio de enlazamiento de antígeno de inmunoglobulina o la porción de una molécula ligando que es responsable por el enlazamiento al receptor.

La molécula de enlazamiento puede comprender al menos dos sitios de enlazamiento. La molécula de enlazamiento puede comprender dos sitios de enlazamiento. Las moléculas de enlazamiento pueden comprender tres sitios de enlazamiento. La molécula de enlazamiento puede comprender cuatro sitios de enlazamiento.

El término “molécula de enlazamiento a GITR” se refiere a una molécula que comprende al menos un sitio de enlazamiento a GITR. Ejemplos de moléculas de enlazamiento a GITR incluyen, pero no se limitan a, moléculas de enlazamiento descritas, por ejemplo, en US20070098719, US20050014224, o WO05007190, o moléculas de enlazamiento que comprenden CDRs definidos en una de US20070098719, US20050014224, o WO05007190. En otra realización, una molécula de enlazamiento a GITR puede comprender una o más de los CDRs definidos en SEQ ID NOs.: 1, 2 o 3, 4, 5, 6, o 7. [SEQ ID NO.: 1 (GFSLSSTSGMGV (cadena pesada CDR1)), SEQ ID NO.: 2 (HIWWDDDKYYNPSLKS (HC CDR2N)), SEQ ID NO.: 4 (TRRYFPFAY (HC CDR3)), SEQ ID NO.: 5 (KASQNVGTNV A (Cadena liviana CDR1)), SEQ ID NO.: 6 (SASYRYS (LC CDR2)), SEQ ID NO.: 7 (QQYNTDPLT (LC CDR3)), y SEQ ID NO.: 3 (HIWWDDDKYYQPSLKS (HC CDR2Q))]. Una molécula de enlazamiento puede comprender 1 CDR. Una molécula de enlazamiento puede comprender 2 CDRs. Una molécula de enlazamiento puede comprender 3 CDRs. Una molécula de enlazamiento puede comprender 4 CDRs. Una molécula de enlazamiento puede comprender 5 CDRs. Una molécula de enlazamiento puede comprender todos los 6 CDRs. Moléculas de enlazamiento a GITR de ejemplo incluyen también moléculas de enlazamiento a GITR disponibles comercialmente, tales como MAB689, disponible en R&D Systems.

Por “se enlaza específicamente” se entiende que las moléculas de enlazamiento exhiben enlazamiento esencialmente de fondo a moléculas diferentes a GITR. Una molécula de enlazamiento aislada que se enlaza específicamente a GITR, sin embargo, puede tener reactividad cruzada a moléculas de GITR de otra especie.

Tal como se usa aquí, el término molécula de enlazamiento incluye, anticuerpos (incluyendo anticuerpos de longitud completa), anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmento f(ab'), fragmentos producidos por una genoteca de expresión de Fab, fragmentos de enlazamiento a epítipo de cualquiera de los anteriores, y formas genéticamente modificadas de anticuerpos (esto es, moléculas que comprenden sitios de enlazamiento derivados de moléculas de anticuerpos), por ejemplo, moléculas de scFv o moléculas que comprenden la molécula de scFv, en tanto exhiban la actividad deseada, por ejemplo, enlazamiento a GITR. Las moléculas de enlazamiento a GITR se pueden enlazar a GITR sobre células T y células dendríticas. Las moléculas de enlazamiento a GITR pueden ser caracterizadas por uno o más de: enlazamiento a hGITR con alta afinidad, actividad agónica a GITR (por ejemplo, en la presencia de un agente estimulador, por ejemplo, CD3), y respuestas crecientes a los efectores humorales y/o de células T.

Las moléculas de enlazamiento de la invención son moléculas de “anticuerpo” o “inmunoglobulina”, por ejemplo, moléculas de anticuerpo o inmunoglobulina de origen natural o moléculas de anticuerpo manipuladas genéticamente que se enlazan a antígeno de manera similar a las moléculas de anticuerpo. Tal como se utiliza aquí, el término “inmunoglobulina” incluye un polipéptido que tiene una combinación de dos cadenas pesadas y dos livianas posea o no alguna inmunorreactividad específica relevante. “Anticuerpos” se refiere a tales ensamblajes que tienen actividad inmunorreactiva a un antígeno. Antígenos e inmunoglobulinas comprenden cadenas livianas y pesadas, con y sin un enlace covalente intercadena entre ellas. Las estructuras de inmunoglobulina básicas en sistemas vertebrados son

bien entendidas relativamente.

El término genérico “inmunoglobulina” comprende cinco clases distintas de anticuerpos que pueden ser distinguidos bioquímicamente. Todas las cinco clases de anticuerpos están claramente dentro del alcance de la presente invención. Con respecto a IgG, las inmunoglobulinas comprenden dos cadenas de polipéptidos liviana idénticas de peso molecular de aproximadamente 23.000 Daltons, y dos cadenas pesadas idénticas de peso molecular de 53.000-70.000. Las cuatro cadenas están unidas por puentes disulfuro en una configuración en “Y” en donde las cadenas livianas encierran las cadenas pesadas partiendo en la boca de “Y” y continuando a través de la región variable.

Tanto las cadenas livianas como las cadenas pesadas están divididas en regiones de homología estructural y funcional. Los términos “constante” y “variables” se utilizan funcionalmente. En este aspecto, será evidente que los dominios variables de las porciones de cadena tanto livianas (VL) como pesadas (VH) determinan el reconocimiento y especificidad del antígeno. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena liviana (CL) y de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas importantes tales como secreción, movilidad transplacentaria, enlazamiento al receptor Fc, enlazamiento de complemento, y similares. Por convención la numeración de los dominios de la región constante se incrementa a medida que se hacen más distantes del sitio de enlazamiento al antígeno o del terminal amino del anticuerpo. El terminal N es una región variable y el terminal C es una región constante; los dominios CH3 y CL comprenden realmente los terminales carboxi de la cadena pesada y liviana, respectivamente.

Las cadenas livianas son clasificadas como kappa o lambda (K , λ). Cada clase de cadena pesada puede enlazarse con una cadena liviana kappa o lambda. En general, las cadenas liviana y pesada están enlazadas covalentemente una con otra, y las porciones de “cola” de las dos cadenas pesadas están enlazadas una con otra por enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas son generadas por hibridomas, células B o células huésped manipuladas genéticamente. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos van desde un terminal N en los extremos en tenedor de la configuración Y al terminal C en la parte inferior de cada cadena. Los experimentados en el arte apreciarán que las cadenas pesadas son clasificadas como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, (γ , μ , α , δ , ϵ) con algunas subclases entre ellas (por ejemplo, $\gamma 1 - \gamma 4$). Es la naturaleza de esta cadena que determine la “clase” del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulinas (isotipos) por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ o IgA₁, etc., están bien caracterizadas y son conocidas por conferir especialización funcional. Las versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente discernibles para la persona experimentada a la vista de la divulgación presente y, de acuerdo con lo anterior, están dentro del alcance de la presente invención.

La región variable permite que el anticuerpo reconozca selectivamente y se enlace específicamente a epítopos sobre antígenos. Esto es, el dominio V_L y el dominio V_H de un anticuerpo se combina para formar la región variable que define un sitio de enlazamiento tridimensional al antígeno. Esta estructura de anticuerpo cuaternaria forma el sitio de enlazamiento a antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de enlazamiento al antígeno está definido por tres regiones determinantes complementarias (CDRs) en cada una de las cadenas V_H y V_L.

El término “anticuerpo”, tal como se utiliza aquí, incluye anticuerpos completos, por ejemplo, de cualquier isotipo (IgG, IgA, IgM, IgE, etc.), e incluye fragmentos de enlazamiento a antígeno de los mismos. Anticuerpos de ejemplo incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos y anticuerpos multivalentes. Los anticuerpos pueden ser fragmentados utilizando técnicas convencionales. Así, el término anticuerpo incluye segmentos de porciones escindidas proteolíticamente o preparadas por vía recombinante de una molécula de anticuerpo que son capaces de enlazarse activamente a cierto antígeno. Ejemplos no limitantes de fragmentos de enlazamiento a antígenos proteolíticos y/o recombinantes incluyen Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, y anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos (sFv) que contienen un dominio V[L] y/o V[H] unido por un enlazante peptídico.

Las moléculas de enlazamiento de la invención pueden comprender una cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD o IgA e IgY), clase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Las moléculas de enlazamiento pueden tener tanto una cadena pesada como una liviana.

Un “antígeno” es una entidad (por ejemplo, una entidad proteinácea o péptido) a la cual se enlaza específicamente una molécula de enlazamiento.

El término “epítipo” o “determinante antigénico” se refiere a un sitio sobre un antígeno al cual una molécula de enlazamiento se enlaza específicamente. Los epítopos pueden ser formados a partir de aminoácidos contiguos o de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente por exposición a solventes desnaturizantes mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario típicamente se pierden en el tratamiento con solventes desnaturizantes. Un epítipo incluye típicamente al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítopos incluyen, por ejemplo, cristalografía por rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping

Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

Las moléculas de enlazamiento que reconocen el mismo epítipo pueden ser identificadas en un inmunoensayo sencillo que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear el enlazamiento de otro anticuerpo a una antígeno diana, esto es, un ensayo de enlazamiento competitivo. El enlazamiento competitivo es determinado en un ensayo en el cual la molécula de enlazamiento que está siendo probada inhibe el enlazamiento específico de una molécula de enlazamiento de referencia a un antígeno común, tal como GITR. Se conocen numerosos tipos de ensayo de enlazamiento competitivo, por ejemplo: radioinmunoensayo en fase sólida directo o indirecto (RIA); ensayo de competición en sándwich por inmunoensayo enzimático directo o indirecto en fase sólida (EIA) (véase, Stahl et al., Methods in Enzymology 9:242 (1983)); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (véase Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614 (1986)); ensayo marcado directo en fase sólida, ensayo en sándwich marcado directo en fase sólida (véase Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA con marcación directa en fase sólida utilizando marcador 1-125 (véase Morel et al., Mol. Immunol. 25(1):7 (1988)); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (Cheung et al., Virology 176:546 (1990)); y RIA marcado directo (Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32:77 (1990)). Típicamente, tal ensayo involucra el uso de un antígeno purificado enlazado a una superficie sólida o células que portan cualquiera de estos, una molécula de enlazamiento de prueba no marcada y una molécula de enlazamiento de referencia marcada. La inhibición competitiva es medida determinando la cantidad de marcador enlazado a la superficie sólida o células en la presencia de la molécula de enlazamiento de prueba. Usualmente la molécula de enlazamiento de prueba está presente en exceso. Usualmente, cuando una molécula de enlazamiento competente está presente en exceso, inhibirá el enlazamiento específico de una molécula de enlazamiento de referencia a un antígeno común en al menos 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70% 70-75% o más.

Un epítipo también es reconocido por células inmunológicas, por ejemplo, células B y/o células T. El reconocimiento celular de un epítipo puede ser determinado por ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente del antígeno, determinada por la incorporación de ³H-timidina, por la secreción de citoquina, por la secreción de anticuerpos, o por la mortandad dependiente de antígenos (ensayo de linfocitos T citotóxicos).

El término "molécula de enlazamiento monoclonal" tal como se utiliza aquí se refiere a una molécula de enlazamiento obtenida a partir de una población de moléculas de enlazamiento sustancialmente homogéneas. Las moléculas de enlazamiento monoclonal son altamente específicas, estando dirigidas contra un sitio antigénico individual. Además, en contraste con las preparaciones de moléculas de enlazamiento policlonales que típicamente incluyen diferentes moléculas dirigidas contra diferentes determinantes (epítopos), cada molécula de enlazamiento monoclonal está dirigida contra un determinante individual sobre el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter de la molécula de enlazamiento obtenida a partir de una población sustancialmente homogénea de moléculas de enlazamiento y no debe considerarse como requirente de la producción de la molécula de enlazamiento por algún método en particular. Por ejemplo, las moléculas de enlazamiento monoclonales para ser usadas de acuerdo con la presente invención pueden ser hechas por el método del hibridoma, descrito inicialmente por Kohler, et al., Nature 256:495 (1975), o también puede hacerse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567). Las "moléculas de enlazamiento monoclonales" también pueden ser aisladas a partir de genotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson, et al., Nature 352:624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol Biol. 222:581-597 (1991), por ejemplo.

El término "molécula de enlazamiento quimérica" se refiere a una molécula de enlazamiento que comprende secuencias de aminoácidos derivadas de especies diferentes. Las moléculas de enlazamiento quiméricas pueden ser construidas, por ejemplo, mediante ingeniería genética, enlazando segmentos de genes moleculares pertenecientes a diferentes especies.

Las moléculas de enlazamiento monoclonales aquí incluyen específicamente moléculas de enlazamiento "quiméricas" en las cuales una porción de la cadena pesada y/o liviana es idéntica con su homóloga a secuencias correspondientes en moléculas de enlazamiento derivadas de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, en donde el resto de la cadena o cadenas es idéntico con su homólogo a secuencias correspondientes en moléculas de enlazamiento derivadas de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales moléculas de enlazamiento, en tanto exhiban la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567; y Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)) por ejemplo, que se enlazan a GITR, por ejemplo GITR humano (hGITR) e incrementan las respuestas efectoras y/o humores T.

Las formas "humanizadas" de moléculas de enlazamiento no humanas (por ejemplo, murínicas) son anticuerpos que contienen secuencias mínimas derivadas de moléculas de enlazamiento no humanas. Para la mayor parte, las moléculas de enlazamiento humanizadas son moléculas de enlazamiento humana (molécula de enlazamiento aceptora/receptora) en la cual los residuos CDR de la región hipervariable son reemplazados por residuos CDR de una región hipervariable de una especie no humana (molécula de enlazamiento donante) tal como ratón, rata, conejo o primates no humanos que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco Fv (FR) de la molécula de enlazamiento humana son alterados, por ejemplo, reemplazados o sustituidos con residuos no donantes (por ejemplo, residuos de la línea germinal), o retromutados a residuos humanos donantes correspondientes. Adicionalmente, las moléculas de enlazamiento humanizadas pueden comprender residuos que no se encuentran en la molécula de enlazamiento receptora o en la molécula de enlazamiento donante.

- Estas modificaciones se hacen generalmente para refinar de manera adicional el rendimiento de la molécula de enlazamiento. En general, la molécula de enlazamiento humanizada comprenderá sustancialmente todos o al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una molécula de enlazamiento no humana y todas o sustancialmente todas las regiones
- 5 FR son aquellas de una secuencia de molécula de enlazamiento humana. La molécula de enlazamiento humanizada comprenderá también opcionalmente al menos una porción de una región constante de molécula de enlazamiento (Fc), típicamente aquella de una molécula de enlazamiento humana. Para detalles adicionales, véase Jones, et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann, et al., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).
- 10 El término "multiespecífica" incluye moléculas de enlazamiento que tienen especificidad para uno o más antígenos diana. Tales moléculas tienen más de un sitio de enlazamiento donde cada sitio de enlazamiento se enlaza específicamente (por ejemplo, inmunorreacciona con) una molécula diana diferente o un sitio antigénico diferente sobre la misma diana.
- 15 Una molécula de enlazamiento multiespecífica puede ser una molécula biespecífica (por ejemplo, anticuerpo, minicuerpo, anticuerpo eliminado de dominio, o proteína de fusión) que tiene especificidad de enlazamiento por al menos dos dianas, por ejemplo, más de una molécula diana o más de un epítipo sobre la misma molécula diana.
- En una realización, las formas modificadas de anticuerpos pueden hacerse a partir de un anticuerpo precursor o progenitor completo usando técnicas conocidas en el arte. Técnicas de ejemplo son discutidas en más detalle más abajo. En realizaciones particularmente preferidas tanto las regiones variables como constantes de los polipéptidos
- 20 de la invención son humanas. En una realización, pueden hacerse anticuerpos completamente humanos usando técnicas que son conocidas en el arte. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos completamente humanos contra un antígeno específico administrando el antígeno a un animal transgénico que ha sido modificado para producir tales anticuerpos en respuesta a un reto antigénico, pero cuyos loci endógenos han sido inhabilitados. Técnicas de ejemplo que pueden ser utilizadas para hacer anticuerpos están descritas en las Patentes de los Estados Unidos: 6,150,584;
- 25 6,458,592; 6,420,140. Otras técnicas, tales como el uso de genotecas, son conocidas en el arte.
- En una realización, una molécula de enlazamiento de la invención es una molécula de anticuerpo modificada o sintética. En una realización, una molécula de enlazamiento de la invención comprende toda o una porción de (por ejemplo al menos un sitio de enlazamiento a antígeno a partir de, al menos una forma de CDR) un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, o un anticuerpo producido por vía recombinante.
- 30 El sitio de enlazamiento al antígeno y las porciones de cadena pesada no necesitan ser derivados de la misma molécula de inmunoglobulina. En este aspecto, la región variable puede ser derivada a partir de cualquier tipo de animal que pueda ser inducido para elevar una respuesta humoral y generar inmunoglobulinas contra el antígeno deseado. Como tal, la región variable de los polipéptidos, por ejemplo, puede ser de origen mamífero, por ejemplo, puede ser humana, murínica, de rata, de primate no humano (tal como monos cynomolgus, macacos, etc.), lupínico,
- 35 camélido (por ejemplo, de camellos, llamas y especies relacionadas). En otra realización, la región variable puede ser condrictioide en su origen (por ejemplo, de tiburones).
- En una realización, las moléculas de enlazamiento de la invención son anticuerpos modificados. Tal como se utiliza aquí, el término "manipulado" o "anticuerpo modificado" incluye formas sintéticas de anticuerpos que son alteradas de tal forma que no se presentan de manera natural, por ejemplo, anticuerpos que no comprenden cadenas pesadas
- 40 completas (tales como, por ejemplo, anticuerpos o minicuerpos con dominios eliminados); formas multiespecíficas de anticuerpos (por ejemplo, biespecíficas, triespecíficas, etc.) alteradas para enlazarse a dos o más antígenos diferentes o a epítopos diferentes sobre un antígeno individual; moléculas de cadena pesada unidas a moléculas de scFv y similares. Las moléculas de scFv son conocidas en el arte y están descritas, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 5,892,019. Además, el término "manipulado" o "anticuerpo modificado" incluye formas multivalentes de anticuerpos (por ejemplo, trivalentes, tetravalentes, etc., anticuerpos que se enlazan a tres o más copias del mismo antígeno o diferentes antígenos o diferentes epítopos sobre el mismo antígeno).
- 45 En una realización, el término "anticuerpo modificado" de acuerdo con la presente invención incluye inmunoglobulinas, anticuerpos o fragmentos inmunorreactivos o formas recombinantes de los mismos, en los cuales al menos una porción de uno más de los dominios de región constante han sido eliminadas o alteradas de alguna otra manera (por ejemplo, mutadas) de tal manera que provean características de química deseadas tales como la capacidad de dimerizar de manera no covalente, capacidad incrementada para localizarse en el sitio de un tumor, o vida media en suero alterada cuando se compara con un anticuerpo completo no alterado de aproximadamente la misma inmunogenicidad.
- 50 En una realización, las moléculas de enlazamiento de la invención pueden ser modificadas para reducir su inmunogenicidad utilizando técnicas reconocidas por el arte. Por ejemplo, los anticuerpos o polipéptidos de la invención pueden ser anticuerpos humanizados, desinmunizados o quiméricos. Estos tipos de anticuerpos son derivados de un anticuerpo no humano, típicamente un anticuerpo murínico, que retiene o sustancialmente retiene las propiedades de enlazamiento a antígeno del anticuerpo progenitor, pero que es menos inmunogénico en humanos. Esto puede lograrse por diversos métodos, incluyendo (a) injerto de los dominios variables no humanos completos
- 55

sobre regiones constantes humanas para generar anticuerpos quiméricos; (b) injerto de al menos una parte de una o más de las regiones determinantes de complementariedad no humanas (CDRs) en un marco humano y regiones constante con o sin retención de los residuos de marco críticos; o (c) trasplante de los dominios variables no humanos completos, pero “ocultándolo” con una sección similar a humana por reemplazo de residuos de superficie. Tales métodos están divulgados en Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851-5 (1984); Morrison et al., Adv. Immunol. 44:65-92 (1988); Verhoeyen et al., Science 239: 1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28: 489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun. 31: 169-217 (1994), y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,585,089, 5,693,761 y 5,693,762.

El término “agente quimioterapéutico” utilizado indistintamente aquí con “agente para quimioterapia” y “agente antineoplásico”, se refiere a una sustancia que inhibe o evita la viabilidad y/o función de células y/o causa la destrucción de células (muerte celular), y/o ejerce efectos antineoplásicos/antiproliferativos, por ejemplo, evita directa o indirectamente el desarrollo, maduración y dispersión de células tumorales neoplásicas. El término también incluye agentes tales que causan un efecto citostático solamente y no un mero efecto citotóxico. Tal como se utiliza aquí, el término agentes quimioterapéuticos incluye agentes antiangiogénicos, inhibidores de la tiroxina quinasa, inhibidores de la proteína quinasa A, miembros de la familia de citoquinas, e isotopos radioactivos.

Agentes quimioterapéuticos son preferiblemente compuestos químicos naturales o sintéticos. Hay grandes números de agentes químicos antineoplásicos disponibles en el uso comercial, en la evaluación clínica y en el desarrollo preclínico que pueden ser utilizados en las terapias de combinación de la invención (discutidas más abajo).

El término “biológico” o “agente biológico” se refiere a cualquier agente farmacéuticamente activo hecho a partir de organismos vivos y/o sus productos que está previsto para uso como un agente terapéutico, por ejemplo, toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal. En una realización de la invención, agentes biológicos que pueden ser utilizados en combinación con una molécula de enlazamiento a G1TR incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, anticuerpos, moléculas de ácidos nucleicos, por ejemplo moléculas de ácidos nucleicos antisentido, polipéptidos o proteínas. Tales agentes biológicos pueden ser administrados en combinación con una molécula de enlazamiento a G1TR por administración del agente biológico, por ejemplo, antes de la administración de la molécula de enlazamiento a G1TR, concomitantemente con la molécula de enlazamiento a G1TR, o después de la molécula de enlazamiento a G1TR.

El término “terapia de combinación”, tal como se utiliza aquí, se refiere a un régimen terapéutico que comprende, por ejemplo, una molécula de enlazamiento a G1TR y al menos una molécula adicional que no se enlaza a G1TR, por ejemplo, un agente quimioterapéutico. La molécula de enlazamiento a G1TR y el al menos un agente adicional pueden ser formulados para administración separado o pueden ser formulados para administración conjunta. En una realización, el al menos un agente adicional no es una molécula hacia la cual se desea una respuesta inmune, por ejemplo, no es una vacuna.

El término “cáncer” o “neoplasia” se refiere en general a un neoplasma o crecimiento espontáneo o proliferación de células malignas. Las células cancerosas frecuentemente están en la forma de un tumor, pero tales células también pueden existir dentro de un sujeto, o pueden ser células cancerosas no tumorigénicas, tales como las células de leucemia. Tal como se utiliza aquí, el término “cáncer” incluye cánceres premalignos así como malignos.

Tal como se utiliza aquí, un “tumor establecido” es un tumor sólido de tamaño suficiente tal que los nutrientes, esto es el oxígeno, no pueden permear al centro del tumor desde la vasculatura del sujeto por osmosis y, por lo tanto el tumor requiere su propio suministro vascular para recibir nutrientes.

En una realización, los métodos objetivos se utilizan para tratar un tumor vascularizado. El término “tumor vascularizado” incluye tumores que tienen las marcas de vasculatura establecida. Tales tumores son identificados por su tamaño y/o por la presencia de marcadores asociados con vasos sanguíneos o angiogénesis. En una realización, el tumor tiene al menos aproximadamente 0.5 mm x 0.5 mm. En otra realización, el tumor tiene al menos aproximadamente 1 mm x 1 mm. En aún otra realización, el tumor tiene un volumen de aproximadamente al menos 100 mm³. En otra realización, el tumor tiene un volumen de al menos aproximadamente 200 mm³. En otra realización, el tumor tiene un volumen de al menos aproximadamente 300 mm³. En otra realización, el tumor tiene un volumen de al menos aproximadamente 400 mm³. En otra realización, el tumor tiene un volumen de al menos aproximadamente 500 mm³. En una realización, el tumor es suficientemente grande para ser encontrado por palpación utilizando técnicas de imágenes reconocidas en el arte.

En otra realización, los métodos objeto se utilizan para tratar un tumor sólido que no es quiescente y experimenta activamente un crecimiento exponencial. En otra realización, los métodos objetivos se utilizan para tratar un tumor pequeño, tal como una micrometástasis, por ejemplo, un tumor detectable solamente por examen histológico pero no por otras técnicas.

El término “cantidad efectiva” se refiere a aquella cantidad de terapia de combinación que es suficiente para producir un resultado deseado en una célula o tumor cancerosos, incluyendo, pero no limitándose a, por ejemplo, reducir el tamaño del tumor y/o reducir el volumen del tumor de un tumor sólido, bien sea *in vitro* o *in vivo*. En una realización de la invención, una cantidad efectiva de una terapia de combinación es la cantidad que da como resultado una

inhibición del tamaño tumoral en más de aproximadamente 10%, más de aproximadamente 20%, más de aproximadamente 30%, más de aproximadamente 35%, más de aproximadamente 42%, más de aproximadamente 43%, más de aproximadamente 44%, más de aproximadamente 45%, más de aproximadamente 46%, más de aproximadamente 47%, más de aproximadamente 48%, más de aproximadamente 49%, más de aproximadamente 50%, más de aproximadamente 51 %, más de aproximadamente 52%, más de aproximadamente 53%, más de aproximadamente 54%, más de aproximadamente 55%, más de aproximadamente 56%, más de aproximadamente 57%, más de aproximadamente 58%, más de aproximadamente 59%, más de aproximadamente 60%, más de aproximadamente 65%, más de aproximadamente 70%, más de aproximadamente 75%, más de aproximadamente 80%, más de aproximadamente 85%, más de aproximadamente 90%, más de aproximadamente 95%, o más de aproximadamente 100%.

El término también incluye aquella cantidad de una terapia de combinación que es suficiente para alcanzar un resultado clínico deseado, incluyendo pero no limitándose a, por ejemplo, prevención de la recurrencia, mejora de la enfermedad, estabilización de un paciente, prevención o retardo del desarrollo de metástasis, o prevención o ralentización de la progresión del cáncer en un paciente. Una cantidad efectiva de la terapia de combinación puede determinarse con base en una administración de cada uno de los agentes o administración repetida de al menos uno de los agentes de la terapia. Los métodos de detección y medición de los indicadores anteriores son conocidos para las personas de experiencia normal en el arte. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a la medición de la reducción en la carga tumoral, reducción en el tamaño del tumor, reducción del volumen del tumor, reducción en la proliferación de tumores secundarios, vascularización disminuida de un tumor sólido, alteración en la expresión de genes en el tejido tumoral o tejido adyacente, presencia o ausencia de biomarcadores, involucración de los nódulos linfáticos, grado histológico, detección de la carencia de recurrencia de un tumor, una rata reducida de crecimiento tumoral, metabolismo de células tumorales reducido, y/o grado nuclear.

En una realización de la invención, se determina la carga tumoral. "Carga tumoral" también denominada como "carga del tumor", se refiere a la cantidad de material tumoral distribuido a través del cuerpo. La carga tumoral se refiere al número total de células cancerosas o al tamaño total de los tumores, a través del cuerpo, incluyendo nódulos linfáticos y médula ósea. La carga tumoral puede ser determinada por una variedad de métodos conocidos en el arte, tales como, por ejemplo, medición de las dimensiones de los tumores al retirarlos del sujeto, por ejemplo, utilizando calibradores, o mientras están en el cuerpo utilizando técnicas de generación de imágenes, por ejemplo, ultrasonido, barrido óseo, barridos por tomografía computarizada (CT) o por imágenes de resonancia magnética (MRI).

En una realización de la invención, se determina el tamaño del tumor. El término "tamaño del tumor" se refiere al tamaño total del tumor que puede ser medido como la longitud y anchura de un tumor. El tamaño del tumor puede ser determinado por una variedad de métodos conocidos en el arte, tales como, por ejemplo, medición de las dimensiones de los tumores al retirarlo del sujeto, por ejemplo utilizando calibradores, o mientras están en el cuerpo utilizando técnicas de imágenes, por ejemplo, barrido óseo, ultrasonido, barridos por CT o MRI.

En una realización de la invención, el tamaño del tumor se determina determinando el peso del tumor. En una realización el peso del tumor se determina midiendo la longitud del tumor, multiplicando por el cuadrado de la anchura del tumor y dividiendo esta suma por 2.

En una realización de la invención, el tamaño del tumor se determina determinando el volumen el tumor. El término "volumen del tumor" se refiere al tamaño total del tumor, que incluye el tumor mismo más nódulos linfáticos afectados si es aplicable. El volumen del tumor puede ser determinado mediante una variedad de métodos conocidos en el arte, tales como, por ejemplo, midiendo las dimensiones de los tumores al retirarlos del sujeto por ejemplo, usando calibradores, o mientras están en el cuerpo utilizando técnicas de generación de imágenes, por ejemplo, ultrasonido, barridos por CT o MRI, y calculando el volumen utilizando ecuaciones basadas, por ejemplo, en el diámetro del eje z, o sobre formas estándar tales como esfera, elipsoide o cubo. En una realización, el volumen tumoral (mm^3) es calculado a partir de un elipsoide elongado a partir de mediciones dimensionales del tumor: volumen de tumor (mm^3) = $(\text{longitud por anchura}^2 [\text{LxW}^2] \div 2)$. Asumiendo la densidad unitaria, el volumen de tumor es convertido a peso del tumor (esto es, $1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ mg}$).

El término "vascularización de un tumor sólido" se refiere a la formación de vasos sanguíneos en un tumor sólido. La vascularización tumoral puede ser determinada mediante una variedad de métodos conocidos en el arte, tales como, por ejemplo, por análisis inmunohistoquímico de especímenes de biopsia o por técnicas de generación de imágenes tales como sonografía del tumor, angiografía, CT o barridos de MRI magnética.

El término "% T/C" es el porcentaje del peso medio del tumor del grupo de tratamiento (T) dividido por el peso del tumor medio del grupo de control (C) multiplicado por 100. Un valor de % T/C de 42% o menos se considera indicativo de actividad significativa por el National Cancer Institute (USA).

El término "% de inhibición" con respecto a T/C es calculado sustrayendo el %T/C de 100.

El término "estadísticamente significativo" o "significado estadístico" se refiere a la probabilidad de que un resultado haya ocurrido por casualidad, dado que una variable independiente no tiene efecto, o, que una hipótesis nula presumida es verdad. El significado estadístico puede ser determinado obteniendo un "valor P" (P) el cual se refiere

al valor de probabilidad. El valor p indica qué tan probablemente es que el resultado obtenido por el experimento sea debido únicamente a casualidad. En una realización de la invención, el significado estadístico puede ser determinado por la obtención del valor p de la prueba T de una muestra con dos colas. Un valor p de menos de 0.5 se considera estadísticamente significativo, esto es, no se debe probablemente solo a la casualidad. Alternativamente un valor de estadísticamente significativo puede estar entre aproximadamente 0.05 hasta aproximadamente 0.04; entre aproximadamente 0.04 hasta aproximadamente 0.03; entre aproximadamente 0.03 hasta aproximadamente 0.02; entre aproximadamente 0.02 hasta aproximadamente 0.01. Rangos intermedios a los valores citados anteriormente, por ejemplo, también se consideran como parte de esta invención. En ciertos casos, el valor p puede ser menor de 0.01. El valor p puede ser utilizado para determinar si hay o no una reducción significativa estadísticamente en el tamaño del tumor y/o cualquier incremento estadísticamente significativo en la supervivencia cuando se utiliza terapia de combinación para tratar un sujeto que tiene un tumor.

“Tratar cáncer” o “tratar un sujeto que tiene cáncer” incluye la inhibición de la replicación de las células cancerosas, la inhibición de la dispersión del cáncer, reducción en el tamaño tumoral, disminución o reducción del número de células cancerosas en el cuerpo y/o mejora o alivio de los síntomas del cáncer. Un tratamiento se considera terapéutico si hay un descenso en la mortalidad y/o morbilidad, y puede llevarse a cabo profilácticamente o terapéuticamente.

Un “paciente” o “sujeto” o “huésped” se refiere bien sea a un ser humano o a un animal no humano.

En las siguientes subsecciones se describen en mayor detalle diversos aspectos de la invención.

II. Moléculas de enlazamiento a GITR

Las moléculas de enlazamiento para uso en los métodos de la invención incluyen moléculas de enlazamiento que se enlazan específicamente a GITR y actúan como un agonista de GITR (como se demuestra, por ejemplo, mediante la respuesta de células T efectoras incrementada y/o inmunidad humoral incrementada), tales como, por ejemplo, aquellas moléculas de enlazamiento descritas en US20070098719, US20050014224 y WO05007190.

En una realización, la molécula de enlazamiento a GITR es un anticuerpo anti-GITR. Diversas formas de anticuerpos anti-GITR pueden hacerse utilizando técnicas de ADN recombinante (Winter and Milstein, Nature, 349, pp.293-99 (1991)).

En ciertas realizaciones, la molécula de enlazamiento GITR puede ser un anticuerpo policlonal. Por ejemplo, pueden generarse anticuerpos en mamíferos por inyecciones subcutáneas o intraperitoneales múltiples del antígeno relevante y un adyuvante. Esta inmunización provoca típicamente una respuesta inmune que comprende la producción de anticuerpos reactivos al antígeno a partir de esplenocitos o linfocitos activados. Los anticuerpos resultantes pueden ser recolectados del suero del animal para proveer preparaciones policlonales.

Las moléculas de enlazamiento quiméricas y/o humanizadas (esto es, inmunoglobulinas quiméricas y/o humanizadas) específicas para GITR también son adecuadas para uso en los métodos de la invención. Las moléculas de enlazamiento quiméricas y/o humanizadas tiene la misma o similar especificidad de afinidad de enlazamiento como las de ratón u otras moléculas de enlazamiento no humanas que proveen el material de partida para la construcción de una molécula de enlazamiento quimérica humanizada.

Una molécula de enlazamiento quimérica es aquella cuyos genes de cadena liviana y pesada han sido contruidos, típicamente por manipulación genética, a partir de segmentos genéticos de inmunoglobulina pertenecientes a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes de una molécula de enlazamiento monoclonal de ratón pueden ser unidos a segmentos constantes (C) humanos, tales como IgG1 o IgG4. Se prefiere el isotipo IgG1 humano. Una molécula de enlazamiento quimérica de ejemplo es así una proteína híbrida consistente del dominio V o de enlazamiento a antígeno de una molécula de enlazamiento de ratón y el dominio C o efector de una molécula de enlazamiento humana.

En una realización, una molécula de enlazamiento adecuada para uso en los métodos de la invención comprende una región variable humanizada de la molécula de enlazamiento 6C8. En una realización, una molécula de enlazamiento de la invención comprende al menos una región variable de una molécula de enlazamiento 6C8 humanizada, por ejemplo, una región variable de una cadena liviana o una cadena pesada.

Como se estableció más arriba, el término “molécula de enlazamiento humanizada” se refiere a una molécula de enlazamiento que comprende al menos una cadena que comprende residuos del marco de región variable derivados a partir de una cadena de molécula de enlazamiento humana (denominada como el anticuerpo aceptor o molécula de enlazamiento) y al menos una región determinante de complementariedad derivada de una molécula de enlazamiento de ratón (denominada como anticuerpo donante o molécula de enlazamiento). Las moléculas de enlazamiento humanizadas pueden ser producidas utilizando tecnología de ADN recombinante. Véase por ejemplo, Hwang, W.Y.K., et al. (2005) Methods 36:35; Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1989), 86:10029-10033; Jones et al., Nature, (1986), 321:522-25; Riechmann et al., Nature, (1988), 332:323-27; Verhoeven et al., Science, (1988), 239:1534-36; Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1989), 86:3833-37; Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 6,180,370, Selick et al., WO 90/07861, y Winter, US 5,225,539. Las regiones constantes, si están presentes, son derivadas también preferiblemente a partir de una inmunoglobulina

humana.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo humanizado es 6C8 humanizado o un fragmento de anticuerpo del mismo, como se describe, incluyendo la secuencia de nucleótidos y aminoácidos del mismo, en US20070098719. En una realización, el anticuerpo humanizado comprende uno o más de los CDRs mostrados en SEQ ID NOs.: 1, 2 o 3, 4, 5, 6, o 7. En una realización, el anticuerpo humanizado comprende los CDRs 1, 2 o 3, 4, 5, 6 y 7.

Las moléculas de enlazamiento humanizadas exhiben preferiblemente una afinidad de enlazamiento específica para un antígeno de al menos 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} o 10^{12} M⁻¹. Usualmente el límite superior de afinidad de enlazamiento de las moléculas de enlazamiento humanizadas para antígeno está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco de aquel de la inmunoglobulina donante. Frecuentemente el límite inferior de la afinidad de enlazamiento también está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco de aquella de la inmunoglobulina donante. Alternativamente, la afinidad de enlazamiento puede ser comparada con la de una molécula de enlazamiento humanizada que no tiene sustituciones (por ejemplo, una molécula de enlazamiento que tiene CDRs donantes y FRs aceptores, pero no sustituciones FR). En tales casos, el enlazamiento de la molécula de enlazamiento optimizada (con sustituciones) es preferiblemente al menos dos a tres veces más grande, o tres a cuatro veces más grande, que la de la molécula de enlazamiento no sustituida. Para hacer comparaciones, la actividad de las diversas moléculas de enlazamiento puede ser determinada, por ejemplo, por BI-ACORE (esto es, resonancia de plasmón en superficie utilizando reactivos no marcados) o ensayos de enlazamiento competitivos.

En ciertas realizaciones, una molécula de enlazamiento a G1TR es un anticuerpo quimérico. En una realización, un anticuerpo quimérico de la invención puede ser un anticuerpo 6C8 quimérico el cual está descrito en la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. US20070098719.

En ciertas realizaciones, una molécula de enlazamiento a G1TR es un anticuerpo monoclonal. En una realización, un anticuerpo monoclonal de la invención puede ser un anticuerpo 6C8 humanizado el cual también está descrito en la Publicación de Patente de los Estados Unidos No US20070098719.

En otra realización, una molécula de enlazamiento de la invención comprende al menos un CDR derivado de una molécula de enlazamiento a G1TR humana murínica, por ejemplo, una molécula de enlazamiento 6C8. En otra realización, una molécula de enlazamiento de la invención comprende al menos un CDR (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 CDRs) derivada de una molécula de enlazamiento a G1TR de rata, por ejemplo, una molécula de enlazamiento 2F8. Tal como se utiliza aquí el término "derivado de" una proteína designada se refiere al origen del polipéptido. En una realización, el polipéptido o secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido de partida particular es una secuencia de CDR o secuencia relacionada a la misma. En otra realización, el polipéptido o secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido de partida en particular es una secuencia marco (FR) o una secuencia relacionada con la misma. En una realización, la secuencia de aminoácidos que es derivada de un polipéptido de partida en particular no es contigua.

Por ejemplo, en una realización, uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDRs son derivados de un anticuerpo 6C8 murínico. En una realización, una molécula de enlazamiento de la invención incluye al menos un CDR de cadena liviana o pesada de un anticuerpo 6C8 murínico. En otra realización, una molécula de enlazamiento de la invención comprende al menos dos CDRs de un anticuerpo 6C8 murínico. En otra realización, una molécula de enlazamiento de la invención comprende al menos tres CDRs de un anticuerpo 6C8 murínico. En otra realización, una molécula de enlazamiento usada en el método de la invención comprende al menos cuatro CDRs de un anticuerpo 6C8 murínico. En otra realización, una molécula de enlazamiento usada en el método de la invención comprende al menos cinco CDRs de un anticuerpo 6C8 murínico. En otra realización, una molécula de enlazamiento de la invención comprende al menos seis CDRs de un anticuerpo 6C8 murínico.

En una realización, una molécula de enlazamiento de la invención comprende un polipéptido o una secuencia de aminoácidos que es esencialmente idéntica a la del anticuerpo 6C8, o una porción de la misma, por ejemplo, un CDR, en donde la porción consiste de al menos 3-5 aminoácidos, y al menos 5-10 aminoácidos, al menos 10-20 aminoácidos, al menos 20-30 aminoácidos, o al menos 30-50 aminoácidos, o que de alguna otra manera es identificable para una persona de experiencia normal en el arte por tener su origen en la secuencia de partida.

En otra realización, el polipéptido o secuencia de aminoácidos que se deriva a partir de un polipéptido de partida particular o secuencia de aminoácidos que comparte una identidad de secuencia de aminoácidos que es aproximadamente 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, con un anticuerpo 6C8 o una porción del mismo (por ejemplo, un CDR) o que de alguna otra manera es identificable por una persona de experiencia normal en el arte por tener su origen en la secuencia de partida.

También se entenderá por una persona de experiencia normal en el arte que una molécula de enlazamiento anti-G1TR para uso en los métodos de la invención puede ser modificada de tal manera que varíe en secuencia de aminoácidos con respecto a la molécula de la cual fue derivada. Por ejemplo, sustituciones en nucleótidos o aminoácidos que llevan a sustituciones conservadoras, o cambios en residuos de aminoácidos "esenciales" puede hacerse (por ejemplo en CDR y/o residuos de marco) y mantener, incrementar o hacer disminuir la capacidad para enlazarse a G1TR, por ejemplo, G1TR humano.

Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una variante no natural de un polipéptido puede ser creada introduciendo una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la molécula de enlazamiento tal que una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos sean introducidas en la proteína codificada. Las mutaciones pueden ser introducidas por técnicas estándar, tales como la mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis mediada por PCR. En una realización, las sustituciones de aminoácidos conservadoras se hacen en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales. Una "sustitución de aminoácidos conservadora" es aquella en la cual el residuo de aminoácido es reemplazado con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han identificado en el arte familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, un residuo de aminoácido no esencial en un polipéptido de molécula de enlazamiento puede ser reemplazado con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. En otra realización, una línea de aminoácidos puede ser reemplazada con una línea estructuralmente similar que difiere en orden y/o composición de los miembros de la familia de cadena lateral.

Alternativamente, en otra realización, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia de codificación de la molécula de enlazamiento.

Moléculas de enlazamiento preferidas para uso en los métodos de la invención comprenden secuencias de aminoácidos marco y de región constante derivadas de una secuencia de aminoácidos humana. Sin embargo, las moléculas de enlazamiento pueden comprender secuencias de regiones marco y/o constantes derivadas de otras especies de mamíferos. Por ejemplo, una región marco de primate (por ejemplo, un primate no humano), una porción de cadena pesada, y/o una porción bisagra pueden ser incluidas en las moléculas de enlazamiento objetivo. En una realización, uno o más aminoácidos murínicos pueden estar presentes en la región marco de un polipéptido de enlazamiento, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de marco de primate humano o no humano puede comprender una o más sustituciones y/o retromutaciones de aminoácidos en las cuales el residuo de aminoácidos murínico correspondiente está presente. Las moléculas de enlazamiento preferidas de la invención son menos inmunogénicas que el anticuerpo murínico 6C8 de partida.

La preparación de anticuerpos monoclonales es un proceso bien conocido (Kohler et al., 256:495 (1975)) en el cual los linfocitos de vida relativamente corta, o mortales de un mamífero que ha sido inyectado con antígenos son fusionados en una línea celular tumoral inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma), produciendo así células híbridas o "hibridomas" que son tanto inmortales como capaces de producir el anticuerpo genéticamente codificado de la célula B. Los híbridos resultantes son segregados en cepas genéticas sencillas por selección, dilución y recrecimiento con cada cepa individual que comprende genes específicos para la formación de un anticuerpo individual. Producen anticuerpos que son homogéneos contra un antígeno deseado y, en referencia a su porcentaje genético puro son denominados "monoclonales".

Las células de hibridoma preparadas así son sembradas y cultivadas en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma progenitoras no fusionadas. Los experimentados en el arte apreciarán que los reactivos, líneas celulares y medios para a formación, selección y crecimiento de hibridomas están disponibles comercialmente de un número de fuentes y los protocolos estandarizados están bien establecidos. En general, el medio de cultivo en el cual las células de hibridoma se cultivan se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales contra el antígeno deseado. Preferiblemente, la especificidad de enlazamiento de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridomas se determina por inmunoprecipitación o por cualquier ensayo *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzima (ELISA). Después de que se han identificado células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden ser subclonados imitando los procedimientos de dilución y cultivados por métodos estándar (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp 59-103 (Academic Press, 1986)). Será evidente adicionalmente que los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden ser separados del medio de cultivo, fluido ascitis o suero por procedimientos de purificación convencionales tales como, por ejemplo, proteína-A, cromatografía en hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis o afinidad.

En otra realización, el ADN que codifica un anticuerpo monoclonal deseado puede ser aislado y secuenciado fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de enlazarse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y liviana de los anticuerpos murínicos). Las células de hibridoma aisladas y subclonadas sirven como fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede ser colocado en vectores de expresión, los cuales son transfectados entonces en células huésped procariontas o eucariontas tales como células de *E. coli*, células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra manera no producen inmunoglobulinas. Más particularmente, el ADN aislado (el cual puede ser modificado como se describe aquí) puede ser utilizado para clonar secuencias de regiones constantes y variables para manufacturar anticuerpos tal como se describe en Newman et al., Patente de los Estados Unidos No. 5,658,570, presentada el 25 de enero de 1995. Esencialmente, esto conlleva a la extracción de ARN de

las células seleccionadas, conversión a ADNc y amplificación por PCR utilizando cebadores específicos para Ig. Los cebadores adecuados para este propósito también están descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 5,658,570. Tal como será discutido en más detalle más adelante, las células transformadas que expresan el anticuerpo deseado pueden ser cultivadas en cantidades relativamente grandes para proveer suministros clínicos y comerciales de la inmunoglobulina.

Los expertos en el arte también apreciarán que el ADN que codifican anticuerpos o fragmentos de anticuerpos también pueden ser derivados de genotecas de fagos de anticuerpos, por ejemplo, utilizando el fago pd o la tecnología de fagémido Fd. Se establecen métodos de ejemplo, por ejemplo en EP 368 684 B1; Patente de Estados Unidos 5,969,108, Hoogenboom, H.R. and Chames. 2000. Immunol. Today 21:371; Nagy et al. 2002. Nat. Med. 8:801; Huie et al. 2001. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:2682; Lui et al. 2002. J. Mol. Biol. 315:1063. Varias publicaciones (por ejemplo Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992)) han descrito la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad por reordenamiento de cadena, así como por infección combinacional y recombinación *in vivo* como estrategia para la construcción de genotecas de fagos grandes. En otra realización, puede utilizarse el despliegue ribosómico para reemplazar bacteriófagos como plataforma de despliegue (véase, por ejemplo, Hanes et al. 2000. Nat. Biotechnol. 18:1287; Wilson et al. 2001 .Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:3750; o Irving et al. 2001 J. Immunol. Methods 248:31. En aún otra realización, las genotecas de superficie celular pueden ser cribadas en busca de anticuerpos (Boder et al. 2000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:10701; Daugherty et al. 2000 J. Immunol. Methods 243:211. Tales procedimientos proveen alternativas a las técnicas de hibridoma tradicionales para el aislamiento y clonación subsecuente de anticuerpos monoclonales.

Aún otras realizaciones de la presente invención comprenden la generación de anticuerpos humanos o sustancialmente humanos en animales no humanos, tales como animales transgénicos que alojan uno o más transgenes de inmunoglobulina humana. Tales animales pueden ser usados como fuentes de esplenocitos para producir hibridomas, tal como se describe en las Patentes de los Estados Unidos 5,569,825, WO00076310, WO00058499 y WO00037504.

Aun otro medio altamente eficiente para generar anticuerpos recombinantes es divulgado por Newman, Biotechnology, 10: 1455-1460 (1992). Específicamente, esta técnica da como resultado la generación de anticuerpos primatizados que contienen dominios variables de mono y secuencias constantes humanas. Además, esta técnica esta también descrita en las Patentes de los Estados Unidos de asignación común Nos. 5,658,570; 5,693,780 y 5,756,096.

En otra realización, pueden seleccionarse linfocitos por micromanipulación y aislarse los genes variables. Por ejemplo, pueden aislarse células mononucleares de sangre periférica a partir de un mamífero inmunizado y cultivadas durante aproximadamente 7 días *in vitro*. Los cultivos pueden ser cribados para IgGs que satisfaga los criterios de criba. Las células de pozos positivos pueden ser aisladas. Pueden aislarse células B que producen Ig individual por FACS o identificándolas en un ensayo en placa hemolítico mediado por complemento. Las células B que producen Ig pueden ser micromanipuladas en un tubo y los genes Vh y V1 pueden ser amplificados utilizando, por ejemplo, RT-PCR. Los genes de VH y VL pueden ser clonados en un vector de expresión de anticuerpos y transfectados en células (por ejemplo células eucariotas o procariotas) para su expresión.

Alternativamente, las líneas celulares que producen anticuerpos pueden ser seleccionadas y cultivadas usando técnicas bien conocidas para persona experimentada en el arte. Tales técnicas están descritas en una variedad de manuales de laboratorio y publicaciones primarias. En este aspecto, se describen técnicas adecuadas para su en la invención como se describen a continuación se describen en Current Protocols in Immunology, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991).

Los dominios de región variable y constante pueden ser obtenidos a partir de fuentes existentes (por ejemplo, de uno o más de los anticuerpos anti-GITR descritos aquí) y pueden ser incorporados en una molécula de enlace modificado de la invención. Por ejemplo, para clonar anticuerpos, el ARNm puede ser aislado de células de hibridoma, bazo o linfa, sometido a transcripción reversa en ADN, y los genes del anticuerpo pueden ser amplificados por PCR. El PCR puede ser iniciado por cebadores de región constante de consenso o por cebadores más específicos basados en las secuencias de cadena de ADN pesadas y livianas y de aminoácidos publicadas. El PCR también puede ser usado para aislar clones de ADN que codifican las cadenas livianas y pesadas del anticuerpo. En este caso la genotecas pueden ser cribadas por cebadores de consenso o sondas homólogas más grandes, tales como sondas de región constante de ratón. Conjuntos de cebadores numerosos adecuados por amplificación de genes de anticuerpos son conocidos en el arte (por ejemplo, cebadores 5' basados en la secuencia N terminal de anticuerpos purificados (Benhar and Pastan. 1994. Protein Engineering 7:1509); amplificación rápida de extremos de ADNc (Ruberti, F. et al., J. Immunol. Methods 173:33); secuencias guía de anticuerpo (Larrick et al., 1989 Biochem. Biophys. Res. Commun. 160:1250); o basados en secuencias de aminoácidos de marco de la región variable conocidos de las bases de datos Kabat (Kabat et al. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. Bethesda, MD:JS Dep. Health Hum. Serv. 5th ed.) o V (por ejemplo, Orlandi et al. 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833; Sblattero et al. 1998. Immunotechnology 3:271; o Krebber et al. 1997. J. Immunol. Methods 201:35). Los dominios de región constante pueden ser seleccionados con una función efectora particular (o con carencia de una función efectora particular) o con una modificación particular para reducir la inmunogenicidad. Los dominios variables y constantes pueden ser clonados, por ejemplo, usando la reacción en cadena de polimerasa y cebadores que son seleccionados para amplificar el dominio de interés. Los métodos de amplificación por PCR están descritos en detalle en las Patentes de los Estados

Unidos Nos. 4,683,195; 4,683,202; 4,800,159; 4,965,188; y en, por ejemplo, "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" Innis et al. eds., Academic Press, San Diego, CA (1990); Ho et al. 1989: Gene 77:51; Horton et al. 1993. Methods Enzymol. 217:270).

Alternativamente, los dominios V pueden ser obtenidos a partir de genotecas de secuencias de genes V a partir de un animal de selección. Las genotecas que expresan combinaciones de dominios aleatorios, por ejemplo, dominios de VH y VL, pueden ser cribadas con un antígeno deseado para identificar elementos que tienen características de enlazamiento deseadas. Los métodos de tales cribas son bien conocidos en el arte. Por ejemplo, pueden clonarse repertorios de genes de anticuerpos en un vector de expresión de bacteriófago [lambda] (Huse, WD et al. 1989. Science 247:1275). Además, células (Boder and Wittrup. 1997. Nat. Biotechnol. 15:553; Daugherty, P. et al. 2000. J. Immunol. Methods. 243:211; Francisco et al. 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10444; Georgiou et al. 1997. Nature Biotechnology 15:29) o virus (por ejemplo, Hoogenboom, HR. 1998 Immunotechnology 4:1 Winter et al. 1994. Annu. Rev. Immunol. 12:433; Griffiths, AD. 1998. Curr. Opin. Biotechnol. 9:102) que expresan anticuerpos sobre su superficie pueden ser cribados. El despliegue ribosómico también puede ser utilizado para cribar genotecas de anticuerpos (Hanes J., et al. 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14130; Hanes, J. and Pluckthun. 1999. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 243:107; He, M. and Taussig. 1997. Nucleic Acids Research 25:5132).

Las genotecas preferidas para cribar son genotecas de genes V humanos. Los dominios VL y VH de una fuente no humana también pueden ser utilizados. En una realización, tales dominios V no humanos pueden ser alterados para reducir su inmunogenicidad utilizando técnicas reconocidas en el arte.

Las genotecas pueden ser originales, de sujetos inmunizados, o semisintéticas (Hoogenboom, H.R. and Winter. 1992. J. Mol. Biol. 227:381; Griffiths, AD, et al. EMBO J. 13:3245; de Kruif, J. et al. 1995. J. Mol. Biol. 248:97; Barbas, C.F., et al. 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4457).

Además, las secuencias de muchos dominios V y C de anticuerpos son conocidas y tales dominios pueden ser sintetizados utilizando métodos bien conocidos en el arte. En una realización, pueden hacerse mutaciones a dominios de inmunoglobulina para crear una genoteca de moléculas de ácido nucleico que tienen heterogeneidad mayor (Thompson, J., et al. 1996. J. Mol. Biol. 256:77; Lamminmaki, U. et al. 1999. J. Mol. Biol. 291:589; Caldwell, R.C. and Joyce GF. 1992. PCR Methods Appl. 2:28; Caldwell RC and Joyce GF. 1994. PCR Methods Appl. 3:S136. Los procedimientos de criba estándar pueden ser utilizados para seleccionar variantes de alta afinidad. En otra realización, pueden hacerse cambios a secuencias VH y VL para incrementar o disminuir la actividad del anticuerpo, por ejemplo, utilizando información obtenida a partir de estructuras cristalinas utilizando técnicas conocidas en el arte.

Los sitios de reconocimiento de antígeno o regiones variables completas pueden ser derivados de uno más cuerpos progenitores. Los anticuerpos progenitores pueden incluir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de origen natural, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos adaptados a partir de anticuerpos de origen natural, anticuerpos construidos de *novio* utilizando secuencias de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos conocidos por ser específicos para GTR. Las secuencias que pueden ser derivadas de anticuerpos progenitores incluyen regiones de cadena variable pesada y/o liviana y/o CDRs, regiones marco u otras porciones de los mismos.

En una realización, la molécula de enlazamiento a GTR es un anticuerpo humanizado. Para hacer anticuerpos humanizados, los animales son inmunizados con el antígeno deseado, los anticuerpos correspondientes son aislados, y la porción de las secuencias de región variables responsables por el enlazamiento al antígeno específico es retirada. Las regiones de enlazamiento a antígeno derivadas del animal son clonadas entonces en la posición apropiada de genes de anticuerpos humanos en los cuales las regiones de enlazamiento al antígeno han sido eliminadas. Véase, por ejemplo, Jones, P. et al. (1986), Nature 321, 522-525 o Tempest et al. (1991) Biotechnology 9, 266-273. También, pueden utilizarse ratones transgénicos, u otros mamíferos para expresar anticuerpos humanizados. Tal humanización puede ser parcial o completa. Los anticuerpos humanizados minimizan el uso de secuencias heterólogas (interespecie) en anticuerpos humanos, y son menos proclives a provocar respuestas inmunes en el sujeto tratado.

En una realización, una molécula de enlazamiento de la invención comprende o consiste de un fragmento de enlazamiento a antígeno de un anticuerpo. El término "fragmento de enlazamiento a antígenos" se refiere a un fragmento de polipéptido de una inmunoglobulina o anticuerpo que se enlaza a un antígeno o compete con el antígeno intacto (esto es, con el antígeno intacto del cual fueron derivadas) para enlazamiento al antígeno (esto es, enlazamiento específico). Tal como se utiliza aquí, el término "fragmento" de una molécula de anticuerpo incluye fragmentos de enlazamiento a antígenos de anticuerpos, por ejemplo, una cadena liviana (VL) de anticuerpo, una cadena pesada (VH) de anticuerpo, un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab, y un fragmento Fd, un fragmento Fv y un fragmento de anticuerpo de dominio (DAb) sencillo. Los fragmentos pueden ser obtenidos, por ejemplo, a través de tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo intacto o completo o de una cadena de anticuerpo o por medios recombinantes.

En una realización, una molécula de enlazamiento de la invención es un anticuerpo manipulado o modificado. Las formas manipuladas de anticuerpos incluyen, por ejemplo, minicuerpos, diacuerpos, diacuerpos fusionados a moléculas CH₃, anticuerpos tetravalentes, intradiacuerpos (por ejemplo, Jendreyko et al. 2003. J. Biol. Chem. 278:47813), anticuerpos biespecíficos, proteínas de fusión (por ejemplo, proteínas de fusión de citoquina de anticuerpos) o anticuerpos biespecíficos. Otras inmunoglobulinas (Ig) y ciertas variantes de la misma están descritas,

por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 4,745,055; EP 256,654; Faulkner et al., *Nature* 298:286 (1982); EP 120,694; EP 125,023; Morrison, J. *Immun.* 123:793 (1979); Kohler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2197 (1980); Raso et al., *Cancer Res.* 41:2073. (1981); Morrison et al., *Ann. Rev. Immunol.* 2:239 (1984); Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851 (1984); EP 255,694; EP 266,663; y WO 88/03559.

5 También son conocidas cadenas de inmunoglobulinas resurtidas. Véase por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,444,878; WO 88/03565; y EP 68,763 y referencias citadas en ella.

En una realización, los anticuerpos modificados de la invención son minicuerpos. Los minicuerpos son moléculas diméricas constituidas de dos cadenas de polipéptidos que comprenden cada una molécula de ScFv (un polipéptido sencillo que comprende uno o más sitios de enlazamiento a antígeno, por ejemplo, un dominio VL enlazado por un

10 enlazante flexible a un dominio VH fusionado a un dominio CH3 a través de un péptido de conexión.

Las moléculas ScFv pueden ser construidas en una orientación VH-enlazante-VL o en orientación VL-enlazante-VH.

La bisagra flexible que enlaza los dominios VL y VH que constituyen el sitio de enlazamiento al antígeno comprende preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 50 residuos de aminoácidos. Un péptido de conexión de ejemplo para este propósito es (Gly4Ser)³ (Huston et al. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879). En

15 el arte se conocen otros péptidos de conexión.

Los métodos para hacer anticuerpos de cadena sencilla son bien conocidos en el arte, por ejemplo, Ho et al. 1989. *Gene* 77:51; Bird et al. 1988 *Science* 242:423; Pantoliano et al. 1991. *Biochemistry* 30:10117; Milenic et al. 1991. *Cancer Research* 51:6363; Takkinen et al. 1991. *Protein Engineering* 4:837.

Los minicuerpos pueden hacerse por construcción de un componente ScFv y conectando el componente péptido-CH3 utilizando métodos descritos en arte (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,837,821 o WO 94/09817A1). Estos componentes pueden ser aislados de plásmidos separados como fragmentos de restricción y luego ligados y reclonados en un vector apropiado. El ensamblaje apropiado puede ser verificado por digestión por

20 restricción y análisis de secuencia de ADN.

Los diacuerpos son similares a moléculas scFv, pero usualmente tienen un enlazante de residuos de aminoácidos corto (menor de 10 y preferiblemente 1-5) que conecta ambos dominios V, tal que los dominios VL y VH en la misma cadena de polipéptidos no puedan interactuar. En vez de ello, el dominio VL y VH de una cadena de polipéptidos interactúa con el dominio VH y VL (respectivamente) sobre una segunda cadena de polipéptidos (WO 02/02781). En una realización, una molécula de enlazamiento de la invención es un diacuerpo fusionado a al menos una porción de

25 cadena pesada. En una realización preferida, una molécula de enlazamiento usada en el método de la invención es un diacuerpo fusionado a un dominio CH3.

Otras formas de anticuerpos modificados también están dentro del alcance de la presente invención (por ejemplo, WO 02/02781 A1; 5,959,083; 6,476,198 B1; US 2002/0103345 A1; WO 00/06605; Byrn et al. 1990. *Nature*. 344:667-70; Chamow and Ashkenazi. 1996. *Trends Biotechnol.* 14:52).

En una realización, una molécula de enlazamiento a GTR de la invención es modificada para alterar uno o más sitios de glicosilación o modificada por una o más otras sustituciones de aminoácidos que no alteran uno o más sitios de glicosilación. Por ejemplo, puesto que la secuencia de aminoácidos Asn-X-(Ser/Thr) es una secuencia de consenso putativo para un sitio de glicosilación que puede afectar la producción de la molécula de enlazamiento, puede hacerse una sustitución conservadora de una glutamina (Gln) por una asparagina (Asn).

35

En una realización, una molécula de enlazamiento de la invención comprende una región constante de inmunoglobulina, es sabido en el arte que la región constante media varias funciones efectoras. Por ejemplo, el enlazamiento del componente C1 del complemento a moléculas de enlazamiento activa el sistema de complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y lisis de patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y puede estar involucrada en la hipersensibilidad autoinmune. Adicionalmente, las moléculas de enlazamiento se enlazan a células sobre la región Fc de la molécula de enlazamiento que se enlaza a un receptor de FC (FcR) sobre una célula. Hay una serie de receptores Fc que son específicos para diferentes clases de moléculas de enlazamiento, incluyendo IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). El enlazamiento de la molécula de enlazamiento a los receptores Fc sobre las superficies celulares provoca una serie de respuestas biológicas importantes y diversas que incluye engolfamiento y destrucción de partículas recubiertas con molécula de enlazamiento, eliminación de complejos inmunes, lisis de

40 células diana recubiertas con moléculas de enlazamiento por células asesinas (llamada citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos, o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de producción de inmunoglobulina.

En una realización, las funciones efectoras pueden ser eliminadas o reducidas, por ejemplo, utilizando una región constante de una molécula de enlazamiento a IgG4, la cual es considerada como incapaz de agotar las células diana, o de hacer variantes Fc, en donde los residuos en la región crítica Fc para las funciones efectoras son mutados utilizando técnicas conocidas en el arte, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 5,585,097. Por ejemplo, la eliminación o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de región constante puede reducir el enlazamiento al receptor de Fc de la molécula de enlazamiento modificada circulante incrementando

55

por lo tanto la localización del tumor. Adicionalmente, las sustituciones de aminoácidos para eliminar los sitios de glicosilación potenciales sobre los Fc puede reducir el sitio de enlazamiento a Fc (véase, por ejemplo, Shields, et al. (2001) J Biol Chem 276:6591). En una realización, se hace una sustitución N297A. En otra realización, se hace una sustitución L235A y una L237A. En aún otra realización, se hace una sustitución de L234A y una L235A. En otra realización, se hace una sustitución E233P. En otra realización, se hace una sustitución L234V. En otra realización, se hace una sustitución L235A. En otra realización, se elimina C236. En otra realización, se hace una sustitución P238A. En otra realización, se hace una sustitución D265A. En otra realización, se hace una sustitución N297A. En otra realización, se hace una sustitución A327Q. En otra realización, se hace una sustitución P329A. Las posiciones de aminoácidos antes citadas se basan en el sistema de numeración de EU (véase, por ejemplo, Kabat, et al. (1991) Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th edition, United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda).

En otros casos puede ser que las modificaciones de la región constante consistentes con la divulgación moderen el enlazamiento del complemento y/o reduzcan la vida media en suero. Puede utilizarse aún otras modificaciones de la región constante para modificar los enlaces disulfuro o las unidades estructurales oligosacárido que permiten la localización potenciada debido a la especificidad al antígeno o flexibilidad en la molécula de enlazamiento incrementadas. De manera más general, los experimentados en el arte entenderán que las moléculas de enlazamiento modificadas tal como se describe aquí pueden ejercer una serie de efectos sutiles que pueden o pueden no ser apreciados fácilmente. Sin embargo el perfil fisiológico, biodisponibilidad y otros efectos de químicos resultantes de las modificaciones, tales como localización tumoral, biodistribución y vida media en suero, pueden ser medidos fácilmente y cuantificados utilizando técnicas inmunológicas bien conocidas sin experimentación innecesarias.

En una realización, una molécula de enlazamiento de la invención puede ser derivada o enlazada a otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). De acuerdo con lo anterior, una molécula de enlazamiento de la invención incluye formas derivadas y de alguna otra forma modificadas de las moléculas de enlazamiento a G1TR descritas aquí, incluyendo moléculas de inmunoadhesión. Por ejemplo, una molécula de enlazamiento de la invención puede ser enlazada funcionalmente (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra forma) a una o más entidades moleculares, tales como otra molécula de enlazamiento (por ejemplo, un anticuerpo de scFv, un anticuerpo específico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente quimioterapéutico (por ejemplo, tal como se describen aquí), un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que pueden mediar en la asociación de la molécula de enlazamiento con otra molécula (tal como una región central de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

En una realización, una molécula de enlazamiento de la invención es modificada con polietilen glicol. La "PEGilación" incrementa el tiempo de residencia y reduce la inmunogenicidad *in vivo*. Por ejemplo, Knauf et al., J. Biol. Chem., 263: 15064 15070 (1988) reportaron un estudio del comportamiento farmacodinámico en ratas de diversas especies modificadas con glicerol polioxilado y polietilen glicol de interleucina-2. Delgado et al., Br. J. Cancer, 73: 175 182 (1996), Kitamura et al., Cancer Res., 51: 4310 4315 (1991), Kitamura et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 171: 1387 1394 (1990), y Pedley et al., Br. J. Cancer, 70: 1126 1130 (1994) reportaron estudios que caracterizan eliminación en sangre y retoma en tejido de ciertos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de antígenos antitumorales derivados con PEG de bajo peso molecular (5 kD). Zapata et al., FASEB J. 9: A1479 (1995) reportó que un PEG de bajo peso molecular (5 o 10 kD) unidos a un grupo sulfhidrilo en la región bisagra de un fragmento Fab' redujo la eliminación en comparación con la molécula de Fab' original.

Un tipo de molécula de enlazamiento derivada es producida por entrecruzamiento de dos o más moléculas de enlazamiento (del mismo tipo o de tipos diferentes, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Los entrecruzadores adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tiene dos grupos distintivamente reactivos separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, m-maleimidobenzoi-N-hidroxisuccinimida éster) u homobifuncionales (por ejemplo, disuccinimidil suberato). Tales enlazantes están disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Una molécula de enlazamiento de la invención puede ser preparada por expresión recombinante de genes de cadenas livianas y pesadas de inmunoglobulina en una célula huésped. Para expresar una molécula de enlazamiento de manera recombinante, una célula huésped es transfectada con uno o más vectores de expresión recombinantes que portan fragmentos de ADN que codifican las cadenas liviana y pesada de inmunoglobulina de la molécula de enlazamiento de tal manera que las cadenas liviana y pesada son expresadas en la célula huésped y, preferiblemente, secretadas hacia el medio en el cual las células huésped son cultivadas, medios desde el cual puede recuperarse una molécula de enlazamiento. Se utilizan metodologías de ADN recombinante estándar para obtener genes de cadenas pesada y liviana de anticuerpos para, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinantes e introducir los vectores en células huésped, tales como las descritas en Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F.M. et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989) y en la Patente de los Estados Unidos No. 4,816,397 de Boss, *et al.*

Para expresar una molécula de enlazamiento de la invención, ADN que codifican cadenas livianas y pesadas de longitud parcial o completa pueden ser insertadas en vectores de expresión de tal forma que los genes estén enlazados operativamente a las secuencias de control transcripcional y de traducción utilizando métodos bien conocidos en el

arte. En este contexto el término “enlazado operativamente” significa que un gen de molécula de enlazamiento está ligado a un vector de tal manera que las secuencias de control transcripcional y de traducción dentro del vector sirven a su función prevista de regular la transcripción y traducción del gen de la molécula de enlazamiento. En una realización, el vector de expresión y las secuencias de control de expresión son seleccionados para ser compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de cadena liviana de la molécula de enlazamiento y el gen de cadena pesada de la molécula de enlazamiento pueden ser insertados en un vector separado o, más típicamente, ambos genes son insertados en el mismo vector de expresión. Los genes de la molécula de enlazamiento pueden ser insertados en el vector de expresión por métodos estándar (por ejemplo, ligación de sitio de restricción complementarios sobre el fragmento del gen y vector de la molécula de enlazamiento, o ligación en extremo como si no hay presentes sitios de restricción). Antes de la inserción de las secuencias de cadenas livianas o pesadas de la molécula de enlazamiento, el vector de expresión puede portar ya secuencias de región constante de la molécula de enlazamiento. Por ejemplo, una metodología para convertir las secuencias VH y VL a genes de la molécula de enlazamiento de longitud completa es insertarlos en los vectores de expresión que ya codifica las regiones constantes de la cadena pesada y constante de la cadena liviana; respectivamente, de forma que el segmento VH está enlazado operativamente a los segmentos CH dentro del vector y el segmento VL está enlazado operativamente al segmento CL dentro del vector. Adicional o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señalización que facilita la secreción de la cadena de la molécula de enlazamiento desde una célula huésped. El gen de la cadena de la molécula de enlazamiento puede ser clonado en el vector de tal manera que el péptido de señalización está enlazado en marco al terminal amino del gen de la cadena de la molécula de enlazamiento. El péptido de señalización puede ser un péptido de señalización de inmunoglobulina o un péptido de señalización heterólogo (esto es, un péptido de señalización de una proteína no inmunoglobulina). Además de los genes de la cadena de la molécula de enlazamiento, los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena de la molécula de enlazamiento en una célula huésped. El término “secuencia reguladora” incluye promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de la cadena de la molécula de enlazamiento. Tales secuencias reguladoras están descritas, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Será evidente para los experimentados en el arte que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de las secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la selección de la célula huésped que va a ser transformada, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células huésped de mamíferos incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión proteínica en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tales como el promotor/potenciador de CMV), virus 40 de simio (SV40) (tales como el promotor/potenciador SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor principal tardío de adenovirus (AdMLP) y polioma. Para una descripción adicional de elementos reguladores virales, y secuencias de los mismos, véanse, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,168,062 de Stinski, Patente de los Estados Unidos No. 4,510,245 de Bell et al., y Patente de los Estados Unidos No. 4,968,615 de Schaffner, et al.

Además de los genes de cadena de la molécula de enlazamiento y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de la replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las cuales el vector ha sido introducido (véase por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,399,216, 4,634,665 y 5,179,017, todas de Axel et al.). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la cual el vector ha sido introducido. Genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped dhfr con selección/amplificación por metotrexato) y el neogén (para selección de G418).

Para la expresión de las cadenas liviana y pesada, los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y liviana de la molécula de enlazamiento es transfectada a una célula huésped por técnicas estándar. Las diversas formas del término “transfección” están previstas para abarcar una amplia variedad de técnicas utilizadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Es posible expresar una molécula de enlazamiento de la invención tanto en células huésped procariotas como eucariotas, expresión de moléculas de enlazamiento en células eucariotas, y lo más preferiblemente células huésped de mamífero, es lo más preferido porque tales células eucariotas, y en particular las células de mamífero, probablemente más que las células procariotas se ensamblan y secretan una molécula de enlazamiento apropiadamente plegada e inmunológicamente activa. De manera común, los vectores de expresión contienen marcadores de selección (por ejemplo, resistencia a la ampicilina, resistencia a la higromicina, resistencia a la tetraciclina o resistencia a la neomicina) para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, por ejemplo, Itakura et al., Patente de los Estados Unidos 4,704,362).

La *E. coli* es un huésped procariota particularmente útil para clonar los polinucleótidos (por ejemplo, secuencias de ADN) de la presente invención. Otros huéspedes microbianos adecuados para el uso incluyen bacilos, tales como el *Bacillus subtilis*, y otras enterobacteriáceas, tales como *Salmonella*, *Serratia* y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos huéspedes procariotas, se pueden hacer también vectores de expresión, los cuales típicamente contienen

secuencias de control de expresión compatibles con la célula huésped (por ejemplo, un origen de replicación). Además, cualquier número de una variedad de promotores bien conocidos estará presente, tales como el sistema promotor de la lactosa, un sistema promotor de triptófano (trp), un sistema promotor de beta-lactamasa, o un sistema promotor del fago lambda. Los promotores típicamente controlaran la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tendrán secuencias del sitio de enlazamiento a ribosoma y similares, para iniciar y completar la transcripción y la traducción.

Otros microbios, tales como levaduras, también son útiles para la expresión. El *Saccharomyces* es una levadura huésped preferida, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de expresión (promotores), un origen de replicación, secuencias de terminación y similares según se desee. Los promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas. Promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

Además de los microorganismos, puede utilizarse también un cultivo de células de tejido de mamíferos para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, polinucleótidos que codifican moléculas de enlazamiento). Véase Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987). Las células eucariotas son preferidas realmente, puesto que una serie de líneas celulares huésped adecuadas capaces de secretar proteínas heterólogas (por ejemplo, moléculas de enlazamiento intactas) han sido desarrolladas en el arte, e incluyen líneas celulares CHO, diversas líneas celulares Cos; células HeLa, líneas celulares de mieloma, o células B transformadas o hibridomas. Preferiblemente, las células son no humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de expresión, tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador (Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986)), y sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de enlazamiento de ribosoma, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias terminadoras transcripcionales. Secuencias de control de expresión preferidas son promotores derivados de genes de inmunoglobulina, SV40, adenovirus, virus de papiloma bovino, citomegalovirus y similares. Véase Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992).

Alternativamente, las secuencias de codificación de la molécula de enlazamiento pueden ser incorporadas en transgenes para la introducción en el genoma de un animal transgénico y una expresión subsecuente en la leche del animal transgénico (véase, por ejemplo, Deboer et al., US 5,741,957, Rosen, US 5,304,489, y Meade et al., US 5,849,992). Transgenes adecuados incluyen secuencias de codificación para cadenas liviana y/o pesada en enlazamiento operable con un promotor y potenciador de un gen específico de glándula mamaria, tal como caseína o beta lactoglobulina.

Células huésped de mamíferos preferidas para expresar las moléculas de enlazamiento recombinantes de la invención incluyen ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células dhfrCHO, descritas en Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, utilizada con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de la molécula de enlazamiento en células huésped de mamífero, las moléculas de enlazamiento son producidas cultivando las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión de la molécula de enlazamiento en la célula huésped o, más preferiblemente, la secreción de la molécula de enlazamiento en el medio de cultivo en el cual se hacen crecer las células huésped. Las moléculas de enlazamiento pueden ser recuperadas del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteína estándar.

Los vectores que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés (por ejemplo, las secuencias que codifican la cadena pesada y liviana de la molécula de enlazamiento y la secuencia de control de expresión) pueden ser transferidas a la célula huésped por métodos bien conocidos, los cuales varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo, la transfección por cloruro de calcio es utilizada comúnmente para células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, biolística o transfección basada en virus pueden ser utilizados para otros huéspedes celulares. (Véase en general Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 2nd ed., 1989). Otros métodos usados para transformar células de mamíferos incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación y microinyección (véase en general Sambrook et al., supra). Para la producción de animales transgénicos, los transgenes pueden ser microinyectados en oocitos fertilizados, o pueden ser incorporados en el genoma de células madre embrionarias, y los núcleos de tales células transferidos a oocitos enucleados.

Cuando se clonan cadenas pesadas y livianas sobre vectores de expresión separados, los vectores son cotransfectados para obtener la expresión y ensamblaje de inmunoglobulinas intactas. Una vez expresadas, las moléculas de enlazamiento enteras, sus dímeros, cadenas livianas y pesadas individuales, u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención pueden ser purificadas de acuerdo con procedimientos estándar del arte, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía de columna, purificación por HPLC, electroforesis en gel y similares (véanse en general Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982)). Se prefieren moléculas de enlazamiento sustancialmente puras de al menos aproximadamente 90 a 95% de homogeneidad, y las más preferidas son de 98 a 99% o más de homogeneidad, para usos farmacéuticos.

Las células huésped también pueden ser utilizadas para producir porciones de moléculas de enlazamiento intactas,

tales como fragmentos de Fab o moléculas de scFv. Se entenderá que variaciones sobre el procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifica bien sea la cadena liviana o la cadena pesada (pero no ambas) de una molécula de enlazamiento de esta invención.

- 5 La tecnología de ADN recombinante también puede ser usada para eliminar alguna parte o todo el ADN que codifica cualquiera o ambas cadenas liviana y pesada que no es necesario para el enlazamiento a GITR. Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas de ADN truncadas también son abarcadas por una molécula de enlazamiento de la invención. Además, pueden producirse moléculas de enlazamiento difuncionales en las cuales una cadena pesada y una liviana son una molécula de enlazamiento de la invención y la otra cadena pesada y liviana son
- 10 específicas para un antígeno diferente a GITR por entrecruzamiento de una molécula de enlazamiento de la invención con una segunda molécula de enlazamiento por métodos de entrecruzamiento químico estándar.

III Agentes adicionales

El agente adicional para uso en las terapias de combinación de la invención puede ser un agente quimioterapéutico.

Los agentes quimioterapéuticos pertenecen en general a diversas clases que incluyen, por ejemplo:

- 15 1. Inhibidores de topoisomerasa II (antibióticos citotóxicos) tales como las antraciclinas/antracenedionas, por ejemplo, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina y nemorubicina, las antraquinonas, por ejemplo, mitoxantrona y losoxantrona, y las podofilotoxinas, por ejemplo, etopósido y tenipósido.
2. Agentes que afectan la formación de microtúbulos (inhibidores mitóticos), tales como alcaloides vegetales (por ejemplo, un compuesto que pertenece a la familia de moléculas alcalinas que contienen nitrógeno derivadas de plantas
- 20 que son biológicamente activas y citotóxicas); por ejemplo, taxanos, por ejemplo, paclitaxel y docetaxel, y los alcaloides vinca, por ejemplo, vinblastina, vincristina y vinorelbina, y derivados de podofilotoxina;
3. Agentes alquilantes, tales como mostazas de nitrógeno, compuestos de etilenimina, sulfonatos de alquilo y otros compuestos con una acción alquilante tales como nitrosoureas, dacarbazina, ciclofosfamida, ifosfamida y melfalan;
4. Antimetabolitos (inhibidores de nucleósidos), por ejemplo folatos, por ejemplo ácido fólico, fluoropirimidinas, análogos de purina o pirimidina tales como 5-fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina, metotrexato y edatrexato;
- 25 5. Puntos inhibidores de topoisomerasa I, tales como topotecan, irinotecan, y 9-nitrocamptotecina, y derivados de camptotecina; y
6. Compuestos/complejos de platino, tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino.

- 30 Agentes quimioterapéuticos de ejemplo para uso en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, amifostina (etiol), cisplatino, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, mecloretamina (mostaza de nitrógeno), estreptozocina, ciclofosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), doxorubicina (adriamycina), doxorubicina lipo (doxil), gemcitabina (gemzar), daunorubicina, daunorubicina lipo (dauxonome), procarbazona, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato; 5-fluorouracilo (5-FU), vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleucina, asparaginasa, busulfan, carboplatino, cladribina, camptotecina, CPT-11, 10-hidroxi-7-etil-
- 35 camptotecina (SN38), dacarbazina, S-I capecitabina, ftorafur, 5'-desoxifluorouridina, UFT, eniluracilo, dosoxicidina, 5-azacitosina, 5-azadesoxicitosina, alopurinol, 2-cloro adenosina, trimetrexato, aminopterina, metilen-10-desazaaminopterina (MDAM), oxaplatino, picoplatino, tetraplatino, satraplatino, platino-DACH, ormaplatino, CI-973, JM-216, y análogos de los mismos, epirubicina, etopósido fosfato, 9-aminocamptotecina, 10,11-metilendioxicamptotecina, carenitecina, 9-nitrocamptotecina, TAS 103, vindesina, L-fenilalanina mostaza, ifosfamidomefosfamida, perfosfamida, trofosfamida carmustina, semustina, epotilonas A-E, tomudex, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, amsacrina, etopósido fosfato, carenitecina, aciclovir, valaciclovir, ganciclovir, amantadina, rimantadina, lamivudina, zidovudina, bevacizumab, trastuzumab, rituximab, 5-fluorouracilo, capecitabina, pentostatina, trimetrexato, cladribina, floxuridina, fludarabina, hidroxiurea, ifosfamida, idarrubicina, mesna, irinotecan, mitoxantrona, topotecan, leuprolide, megestrol, melfalan, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa,
- 40 pentostatina, pipobroman, plicamicina, estreptozocina, tamoxifen, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucil, cisplatino, doxorubicina, paclitaxel (taxol) y bleomicina, y combinaciones de los mismos, los cuales son fácilmente evidentes para una persona experimentada en el arte, con base en el estándar apropiado de cuidado para un tumor o cáncer en particular.

- 50 En una realización, un agente quimioterapéutico para uso en las terapias de combinación de la invención, se selecciona del grupo consistente de Gemzar, 5-FU, Vincristina, Vinblastina, Adriamicina, Cisplatino, Taxol, Talidomida, Velcade; metotrexato, citarabina, fludarabina, hidroxiurea, daunorubicina, etopósido, mitoxantrona, clorambucil, ciclofosfamida, melfalan, tiotepa, bleomicina, dacarbazina, L-asparaginasa, y procarbazona.

- 55 En una realización, un agente quimioterapéutico es un inhibidor de topoisomerasa II. En otra realización, un agente quimioterapéutico es un agente que afecta la formación de microtúbulos. En otra realización, un agente quimioterapéutico es un agente alquilante. En otra realización, un agente quimioterapéutico es un inhibidor de

topoisomerasa I. En otra realización, un agente quimioterapéutico es un compuesto/complejo de platino. En otra realización, un agente quimioterapéutico es una hormona, análogo hormonal y/o complejo hormonal. En otra realización, un agente quimioterapéutico es una enzima, proteína, péptido, anticuerpo policlonal y/o monoclonal. En una realización, el agente quimioterapéutico para uso en los métodos de la invención es un antimetabolito.

- 5 El término “antimetabolito” se refiere a una sustancia que es estructuralmente similar a un intermedio natural crítico (metabolito) en una ruta bioquímica que lleva a la síntesis de ADN o ARN que se utiliza por el huésped en esa ruta, pero que actúa para inhibir la terminación de esa ruta (esto es, síntesis de ADN o ARN). Más específicamente, los antimetabolitos típicamente funcionan por (1) competición con metabolitos para el sitio catalítico regulador de una enzima llave en la síntesis de ADN o ARN, o (2) sustituto para un metabolito incorporado normalmente en ADN o ARN, y por lo tanto que produce un ADN o ARN que no puede soportar la replicación. Las categorías principales de antimetabolito incluyen (1) análogos del ácido fólico, que son inhibidores de la dihidrofolato reductasa (DHFR); (2) análogos de la purina, que imitan las purinas naturales (adenina o guanina) pero son estructuralmente diferentes de tal manera que inhiben competitiva o irreversiblemente el procesamiento nuclear de ADN o ARN; y (3) análogos de pirimidina, que imitan las pirimidinas naturales (citosina, timidina y uracilo), pero son estructuralmente diferentes de manera que inhiben competitiva o irreversiblemente el procesamiento nuclear de ADN o ARN. Ejemplos no limitantes de antimetabolitos de esta invención son 5-fluorouracilo, floxuradina, tioguanina, citarabina, fludarabina, 6-mercaptapurina, metotrexato, gemcitabina, capecitabina, pentostatina, timetrexato y cladribina.

En una realización, el antimetabolito es el análogo de nucleósido gemcitabina. En otra realización, el antimetabolito es el análogo de nucleósido fluorouracilo.

- 20 Tal como se utiliza aquí, un “agente que afecta la formación de microtúbulos” o “inhibidor mitótico” es un agente que perturba la polimerización de microtúbulos. Los inhibidores mitóticos trabajan interfiriendo con y deteniendo la mitosis (usualmente durante la fase M del ciclo celular), de tal manera que la célula no se dividirá más. En una realización, un agente que afecta la formación de microtúbulos es paclitaxel (Taxol®).

- 25 Tal como se utiliza aquí, un “agente alquilante” es un agente que entrecruza las nucleobases guanina en el ADN haciendo que las cadenas sean incapaces de desenrollarse y separarse. Puesto que esto es necesario en la replicación del ADN, las células no pueden dividirse más. En una realización, un agente alquilante es ciclofosfamida, también conocida como citofosfano. La ciclofosfamida es un profármaco.

En otra realización, un agente adicional para uso en terapias de combinación de la invención es un agente biológico.

- 30 Los agentes biológicos (también llamados biológicos) son los productos de un sistema biológico, por ejemplo un organismo, célula o sistema recombinante. Ejemplos de tales agentes biológicos incluyen moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ácido nucleicos antisentido), interferones, interleucinas, factores estimuladores de colonia, anticuerpos, por ejemplo anticuerpos monoclonales, agentes antiangiogénesis, y citoquinas. Más adelante se discuten en más detalle agentes biológicos de ejemplo y en general pertenecen a diversas clases incluyendo, por ejemplo

- 35 1. Hormonas, análogos hormonales, y complejos hormonales, por ejemplo, estrógenos y análogos de estrógenos, progesterona, análogos de progesterona y progestinas, andrógenos, adrenocorticosteroides, antiestrógenos, antiandrógenos, antitestosteronas, inhibidores esteroideos adrenales, y hormonas antiluteinizantes; y

2. Enzimas, proteínas, péptidos, anticuerpos policlonales y/o monoclonales, tales como interleucinas, interferones, factor estimulador de colonias, etc.

- 40 En una realización, el agente biológico es un interferón. Los interferones (IFN) son un agente de tipo biológico que de manera natural se presenta en el cuerpo. Los interferones también son producidos en el laboratorio y son suministrados a pacientes con cáncer en terapia biológica. Han demostrado mejorar la manera en que el sistema inmune del paciente con cáncer actúa contra las células cancerosas. Los interferones pueden trabajar directamente sobre las células cancerosas para ralentizar su crecimiento, o pueden hacer que las células cancerosas cambien a células con comportamiento más normal. Algunos interferones pueden estimular las células asesinas naturales (NK), células T y macrófagos –tipo de glóbulos blancos en la corriente sanguínea que ayudan a combatir las células cancerosas.

- 45 En una realización, el agente biológico es interleucina. Las interleucinas (IL) estimulan el crecimiento y actividad de muchas células inmunes. Son proteínas (citoquinas y quimioquinas) que se presentan de manera natural en el cuerpo, pero también pueden hacerse en el laboratorio. Algunas interleucinas estimulan el crecimiento y la actividad de células inmunes, tales como linfocitos, los cuales trabajan para destruir células cancerosas.

- 50 En otra realización, el agente biológico es un factor estimulador de colonias. Los factores estimuladores de colonias (CSFs) son proteínas dadas a los pacientes para estimular a las células madre dentro de la médula ósea para producir más células sanguíneas. El cuerpo necesita constantemente nuevos glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas, especialmente cuando el cáncer está presente. Se suministran las CSFs, junto con quimioterapia, para ayudar a disparar el sistema inmune. Cuando los pacientes con cáncer reciben quimioterapia, la capacidad de la médula ósea para producir nuevas células sanguíneas se suprime, haciendo a los pacientes más susceptibles a desarrollar la infección. Las partes del sistema inmune no pueden funcionar sin células sanguíneas, así que los factores

estimuladores de colonia estimulan las células madre de la médula ósea para producir glóbulos blancos, plaqueta y glóbulos rojos. Con una producción adecuada de células, otros tratamientos contra el cáncer pueden continuar habilitando a los pacientes para recibir de manera segura dosis más altas de quimioterapia.

En otra realización, el agente biológico es un anticuerpo. Los anticuerpos, anticuerpos monoclonales, son agentes, producidos en el laboratorio, que se enlazan a las células cancerosas. Cuando los agentes que destruyen el cáncer son introducidos en el cuerpo, buscan los anticuerpos y matan las células cancerosas. Los agentes anticuerpos monoclonales no destruyen las células saludables. Los anticuerpos monoclonales alcanzan su efecto terapéutico a través de diversos mecanismos. Pueden tener efectos directos en la producción de apoptosis o muerte celular programada. Pueden bloquear los receptores del factor de crecimiento, deteniendo de manera efectiva la proliferación de células tumorales. En células que expresan anticuerpos monoclonales, pueden generar la formación de anticuerpos anti-idiotipo.

Ejemplos de anticuerpos que pueden ser utilizados en el tratamiento de combinación de la invención incluyen anticuerpos anti-CD20, tales como, pero no limitándose a, cetuximab, tositumomab, rituximab, e Ibritumomab. Los anticuerpos anti-HER2 también pueden ser utilizados en combinación con un anticuerpo anti-GITR para el tratamiento de cáncer. En una realización, el anticuerpo anti-HER2 es trastuzumab (Herceptin). Otros ejemplos de anticuerpos que pueden ser usados en combinación con un anticuerpo anti-GITR para el tratamiento del cáncer incluye anticuerpos anti-CD52 (por ejemplo, Alemtuzumab), anticuerpos anti-CD-22 (por ejemplo, Epratuzumab), y anticuerpos anti-CD33 (por ejemplo, Gemtuzumab ozogamicina). También pueden utilizarse anticuerpos anti-VEGF en combinación con un anticuerpo anti-GITR para el tratamiento de cáncer. En una realización, el anticuerpo anti-VEGF es bevacizumab. En otras realizaciones, el agente biológico es un anticuerpo que es un anticuerpo anti-EGFR, por ejemplo cetuximab. Otro ejemplo es el anticuerpo antiglicoproteína 17-IA edrecolomab.

En otra realización, el agente biológico es una citoquina. La terapia con citoquina utiliza proteínas (citoquinas) para ayudar a que el sistema inmune de un sujeto reconozca y destruya aquellas células que son cancerosas. Las citoquinas son producidas de manera natural en el cuerpo por el sistema inmune, pero también pueden ser producidas en el laboratorio. Esta terapia es usada con melanoma avanzado y con terapia adyuvante (terapia dada después o además del tratamiento primario contra el cáncer). La terapia con citoquina alcanza todas las partes del cuerpo para matar células cancerosas y evitar que los tumores crezcan.

En otra realización, el agente biológico es una proteína de fusión. También pueden usarse proteínas de fusión. Por ejemplo, el Apo2L/TRAIL humano recombinante (Genentech) puede ser utilizado en terapia de combinación. El Apo2/TRAIL es el primer receptor proapoptótico dual agonista diseñado para activar ambos receptores proapoptóticos DR4 y DR5, los cuales están involucrados en la regulación de la apoptosis (muerte celular programada).

En una realización, el agente biológico es una molécula de ácido nucleico antisentido. Las moléculas de ácido nucleico antisentido pueden ser usadas también en los métodos de la invención. Tal como se utiliza aquí, un ácido nucleico "antisentido" comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un ácido nucleico "en sentido" que codifica una proteína, por ejemplo, complementario a la cadena de codificación de una molécula de ADNc de doble cadena, complementaria a una secuencia de ARNm o complementaria a la cadena de codificación de un gen. De acuerdo con lo anterior, un ácido nucleico antisentido puede formar un enlace de hidrógeno con un ácido nucleico en sentido.

En una realización, un agente biológico es una molécula de ARNsi, por ejemplo, de una molécula que potencia la angiogénesis, por ejemplo bFGF, VEGF y EGFR. En una realización, un agente biológico que inhibe la angiogénesis media el iARN. El ARN de interferencia (iARN) es una técnica de silenciamiento genético direccionada postranscripcional que utiliza ARN de doble cadena (ARNds) para degradar el ARN mensajero (ARNm) que contiene la misma secuencia que el ARNds (Sharp, P.A. and Zamore, P.D. 287, 2431-2432 (2000); Zamore, P.D., et al. Cell 101, 25-33 (2000). Tuschl, T. et al. Genes Dev. 13, 3191-3197 (1999); Cottrell TR, and Doering TL. 2003. Trends Microbiol. 11:37-43; Bushman F.2003. Mol Therapy. 7:9-10; McManus MT and Sharp PA. 2002. Nat Rev Genet. 3:737-47). El proceso ocurre cuando una ribonucleasa endógena escinde el ARNds más largo en ARNs mas corto, por ejemplo de 21 o 22 nucleótidos de longitud, denominados ARNs pequeños de interferencia o ARNsi. Los segmentos de ARN más pequeños median entonces en la degradación del ARNm diana. Los kits para la síntesis de iARN están disponibles comercialmente por ejemplo, de New England Biolabs o Ambion. En una realización uno o más de las químicas descritas aquí para uso en el ARN antisentido pueden emplearse moléculas que median el iARN.

El uso de ácidos nucleicos antisentido para subregular la expresión de una proteína particular en una célula es bien conocido en el arte (véase, por ejemplo, Weintraub, H. et al., Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986; Askari, F.K. and McDonnell, W.M. (1996) N. Eng. J. Med. 334:316-318; Bennett, M.R. and Schwartz, S.M. (1995) Circulation 92:1981-1993; Mercola, D. and Cohen, J.S. (1995) Cancer Gene Ther. 2:47-59; Rossi, J.J. (1995) Br. Med. Bull. 51:217-225; Wagner, R.W. (1994) Nature 372:333-335). Una molécula de ácido nucleico antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la cadena de codificación de otra molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ARNm) y concordantemente es capaz de formar un puente de hidrógeno con la cadena de codificación de la otra molécula de ácido nucleico. Las secuencias antisentido complementarias a una secuencia de un ARNm pueden ser complementarias a una secuencia encontrada en la región de codificación del ARNm, la región 5' o 3' no traducida del ARNm o una región que hace puente con la

región de codificación y una región no traducida (por ejemplo, en la unión de la región no traducida 5' y la región de codificación). Adicionalmente, un ácido nucleico antisentido puede ser complementario en secuencia a una región reguladora del gen que codifica el ARNm, por ejemplo una secuencia de iniciación de la transcripción o un elemento regulador. Preferiblemente, un ácido nucleico antisentido está diseñado de tal manera que sea complementario a una región precedente o de barrido del codón de iniciación sobre la cadena de codificación o en la región no traducida 3' de un ARNm.

Dada las secuencias de cadena de codificación de una molécula que potencia la angiogénesis, los ácidos nucleicos antisentido de la invención pueden ser diseñados de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases de Watson y Crick. La molécula de ácido nucleico antisentido puede ser complementaria a la región de codificación completa del ARNm, pero más preferiblemente es un oligonucleótido que es antisentido a solamente a una porción de la región de codificación o no codificación del ARNm. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede ser complementado de la región que circunda el sitio de iniciación de la traducción del ARNm. Un oligonucleótido antisentido puede tener, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos de longitud. Un ácido nucleico antisentido de la invención puede ser construido utilizando síntesis química y reacciones de ligación enzimáticas utilizando procedimientos conocidos en el arte. Por ejemplo, un ácido nucleico antisentido (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) puede ser sintetizado químicamente utilizando nucleótidos de origen natural o nucleótidos diversamente modificados diseñados para incrementar la estabilidad biológica de las moléculas o para incrementar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos antisentido y en sentido, por ejemplo, pueden utilizarse derivados de fosforioato y nucleótidos sustituidos con acridina. Ejemplos de nucleótidos codificados que pueden ser utilizados para generar el ácido nucleico antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-chlorouracilo, 5-iodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxi)metil uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosileosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilenqueosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, ácido uracil-5-oxiacético metiléster, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina. Para inhibir la expresión en células, pueden utilizarse uno o más oligonucleótidos antisentido. Alternativamente, el ácido nucleico antisentido puede ser producido biológicamente utilizando un vector de expresión en el cual se ha subclonado un ácido nucleico en una orientación antisentido (esto es, ARN transcrito desde el ácido nucleico insertado será de una orientación antisentido a un ácido nucleico diana de interés, descrito adicionalmente en la siguiente subsección).

En aún otra realización, la molécula de ácido nucleico antisentido de la invención es una molécula de ácido nucleico α -anomérica. Una molécula de ácido α -anomérica forma híbridos de doble cadena específicos con ARN complementario en el cual, al contrario de las unidades β usuales, las cadenas corren paralelas una a otra (Gaultier et al. (1987) *Nucleic Acids. Res.* 15:6625-6641). La molécula de ácido nucleico antisentido puede comprender también un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:6131-6148) o un análogo ARN-ADN quimérico (Inoue et al. (1987) *FEBS Lett.* 215:327-330).

En otra realización, un ácido nucleico antisentido de la invención es un compuesto que media el iARN. Los agentes interferentes de ARN, incluyen pero no se limitan a, moléculas de ácido nucleico que incluye moléculas de ARN que son homólogas al gen o secuencia genómica diana, "ARN corto de interferencia" (ARNsi), ARN de "horquilla corta" o "horquilla pequeña" (ARNsh), y moléculas pequeñas que interfieren con o inhiben la expresión de un gen diana por interferencia por ARN (iARN). La interferencia por ARN es una técnica de silenciamiento de genes direccionada, postrascriptional que utiliza ARN de cadena doble (ARNds) para degradar el ARN mensajero (ARNm) que contiene la misma secuencia que el ARNds (Sharp, P.A. and Zamore, P.D. 287, 2431-2432 (2000); Zamore, P.D., et al. *Cell* 101, 25-33 (2000). Tuschl, T. et al. *Genes Dev.* 13, 3191-3197 (1999)). El proceso ocurre cuando una ribonucleasa endógena escinde el ARNds más largo en ARNs más cortos, de 21 o 22 nucleótidos de longitud, denominados ARN de interferencia pequeños o ARNsi. Los segmentos de ARN más pequeños median entonces la degradación del ARNm. Los kits para síntesis de iARN están disponibles comercialmente, por ejemplo, de New England Biolabs y Ambion. En una realización pueden emplearse una o más de las químicas descritas más arriba para uso en ARN antisentido.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican moléculas que, por ejemplo, inhiben angiogénesis, pueden ser introducidas en el sujeto en una forma adecuada para la expresión de la proteína codificada en las células del sujeto en los métodos de la invención. Moléculas de ejemplo que inhiben angiogénesis, incluyen, pero no se limitan a TSP-1, TSP-2, IFN- α , IFN- γ , angiostatina, endostina, tumastatina, canstatina, VEGF, PEDF, vasohibina, y el fragmento de 16 kDa de prolactina 2-metoxiestradiol (véase, Kerbel (2004) *J. Clin Invest* 114:884, para revisión).

Por ejemplo, una secuencia de ADNc de longitud completa o parcial es clonada en un vector de expresión recombinante y el vector es transfectado en una célula que utiliza técnicas de bloqueo molecular estándar. El ADNc puede ser obtenido, por ejemplo, por amplificación utilizando la reacción en cadena de polimerasa (PCR) o cribando una genoteca de ADNc apropiada. Las secuencias de nucleótidos del ADNc pueden ser utilizadas para el diseño de cebadores de PCR que permiten la amplificación de un ADNc por métodos de PCR estándar o por el diseño de una sonda de hibridación que puede ser utilizada para cribar una genoteca de ADNc utilizando métodos de hibridación

estándar. Después del asilamiento o amplificación del ADNc, el fragmento de ADN es introducido en un vector de expresión adecuado.

Los agentes biológicos de ejemplo para uso en los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, gefitinib (Iressa), anastrozol, dietilestilbesterol, estradiol, premarina, raloxifeno, progesterona, noretinodrel, estisterona, 5 dimestisterona, acetato de megestrol, acetato de medroxiprogesterona, caproato de hidroxiprogesterona, noretisterona, metiltosterona, testosterona, dexametasona, prednisona, cortisol, solumedrol, tamoxifen, fulvestrant, toremifeno, aminoglutetimida, testolactona, droloxifeno, anastrozol, bicalutamida, flutamida, nilutamida, goserelina, flutamida, leuprolide, triptorelina, aminoglutetimida, mitotano, goserelina, cetuximab, erlotinib, imatinib, tositumomab, alemtuzumab, trastuzumab, gemtuzumab, rituximab, lbritumomab tiuxetan, bevacizumab, denileucina difitox, 10 daclizumab, interferón alfa, interferón beta, anti-4-1 BB, anti-4-1 BBL, anti-CD40, anti-CD154, anti- OX40, anti-OX40L, anti-CD28, anti-CD80, anti-CD86, anti-CD70, anti-CD27, anti- HVEM, anti-LIGHT, anti-GITRL, anti-CTLA-4, OX40L soluble, 4-1BBL soluble, CD154 soluble, GITRL soluble, LIGHT soluble, CD70 soluble, CD80 soluble, CD86 soluble, CTLA4-Ig soluble, GVAX®, y combinaciones de los mismos que son fácilmente evidentes para una persona de experiencia en el arte con base en el estándar apropiado de cuidado para un tumor o cáncer en particular. Las formas 15 adecuadas de agentes pueden ser hechas, por ejemplo, como proteínas de fusión, enlazando operativamente el agente con, por ejemplo, una región Ig-Fc.

Debería anotarse que más de un agente adicional, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, puede ser administrado en combinación con una molécula de enlazamiento a GTR, los agentes adicionales administrados incluyen gemcitabina. Por ejemplo, 20 en una realización pueden administrarse gemcitabina y otro agente quimioterapéutico en combinación con una molécula de enlazamiento de GTR. En otra realización, puede administrarse gemcitabina, un agente biológico y una molécula de enlazamiento a GTR.

Pueden utilizarse diversas formas de los agentes biológicos. Estos incluyen, sin limitación, formas tales como moléculas proforma, moléculas no cargadas, complejos moleculares, sales, éteres, ésteres, amidas y similares, los cuales se activan biológicamente cuando se implantan, inyectan o se insertan de alguna otra manera en el tumor.

IV. Métodos terapéuticos

Se divulgan además métodos para administrar al sujeto una terapia de combinación de la invención.

En una realización, el tumor es seleccionado del grupo consistente de tumores en Etapa I, Etapa II, Etapa III y Etapa IV. La etapa de un tumor se determina fácilmente por una persona de experiencia en el arte utilizando métodos reconocidos en el arte de la determinación de etapas, tal como el tamaño del tumor, el número de los nódulos linfáticos u otros tejidos a los cuales el tumor ha hecho metástasis, análisis microscópicos, análisis histológicos, etc. 30

En una realización de la invención, las terapias de combinación objetivos se utilizan para tratar tumores establecidos, por ejemplo, tumores de tamaño suficiente tal que los nutrientes no pueden permear más el centro del tumor desde la vasculatura del sujeto por osmosis y por lo tanto el tumor requiere su propio suministro vascular para recibir nutrientes, esto es, un tumor vascularizado. En otra realización, las terapias de combinación objetivo se utilizan para tratar, por 35 ejemplo, inhibir el establecimiento de un tumor secundario, por ejemplo metástasis, y/o reducir el tamaño de un tumor, por ejemplo, un tumor establecido, y/o un tumor secundario, por ejemplo una metástasis.

En una realización, una terapia de combinación se utiliza para tratar un tumor que tenga dimensiones de al menos aproximadamente 1 mm x 1 mm. En otra realización de la invención, se utiliza una terapia de combinación para tratar un tumor que tiene al menos 0.5 mm x 0.5 mm. En otras realizaciones de la invención el tumor tiene un volumen de al 40 menos aproximadamente 100 mm³. En otra realización una terapia de combinación de la invención es utilizada para tratar un tumor que es lo suficientemente grande para ser encontrado por palpación o por técnicas de generación de imágenes bien conocidas en el arte, tales como MRI, ultrasonido o barrido por CAT.

En ciertas realizaciones de la invención, los métodos objetivo dan como resultado la inhibición del tamaño tumoral en más de aproximadamente 10%, más de aproximadamente 20%, más de aproximadamente 30%, más de 45 aproximadamente 35%, más de aproximadamente 42%, más de aproximadamente 43%, más de aproximadamente 44%, más de aproximadamente 45%, más de aproximadamente 46%, más de aproximadamente 47%, más de aproximadamente 48%, más de aproximadamente 49%, más de aproximadamente 50%, más de aproximadamente 51%, más de aproximadamente 52%, más de aproximadamente 53%, más de aproximadamente 54%, más de aproximadamente 55%, más de aproximadamente 56%, más de aproximadamente 57%, más de aproximadamente 58%, más de aproximadamente 59%, más de aproximadamente 60%, más de aproximadamente 65%, más de 50 aproximadamente 70%, más de aproximadamente 75%, más de aproximadamente 80%, más de aproximadamente 85%, más de aproximadamente 90%, más de aproximadamente 95%, o más de aproximadamente 100%. En una realización, la administración de una molécula de enlazamiento a GTR, o de un fragmento de enlazamiento a antígeno de la misma, y al menos un agente quimioterapéutico da como resultado un porcentaje de T/C de aproximadamente 55 42% o más.

En una realización, las terapias de combinación de la invención tienen un efecto sinérgico. Un "efecto sinérgico" de dos compuestos es aquel el efecto de la combinación de los dos agentes es mayor que la suma de sus efectos individuales y es estadísticamente diferente de los controles y de los fármacos individuales. En otra realización,

las terapias de combinación de la invención tienen un efecto aditivo. Un "efecto aditivo" de dos compuestos es aquel en el cual el efecto de la combinación de los dos agentes es la suma de sus efectos individuales y es estadísticamente diferente tanto de los controles y de los fármacos individuales.

La molécula de enlazamiento a G1TR puede ser administrada de manera conveniente por ejemplo por inyección (subcutánea, intravenosa, etc.), administración oral, inhalación, aplicación transdérmica o administración rectal. Dependiendo de la ruta de administración, el compuesto activo puede ser recubierto en un material para proteger el compuesto de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto. Para ejemplo, para administrar el agente por otra vía de administración diferente a la parenteral, puede ser deseable recubrir, o coadministrar el agente con un material para evitar su inactivación.

En general, el al menos un agente adicional que va a ser administrado en combinación con la molécula de enlazamiento a G1TR será administrado a través de la ruta por la cual es administrado rutinariamente que cuando se utiliza solo. Se entenderá que la molécula de enlazamiento a G1TR y el al menos un agente adicional no necesitan ser administrados a través de la misma ruta.

Una terapia de combinación de la presente invención puede ser administrada por una variedad de métodos conocidos en el arte, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, el modo/ruta de administración preferido es inyección o infusión intravenosa. Tal como será apreciado por el experto en el arte, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo puede ser preparado con un vehículo que protegerá el compuesto contra liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilen acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son conocidos en general por los experimentados en el arte. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

En ciertas realizaciones, una molécula de enlazamiento de la invención puede ser administrada oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) puede estar incluido también dentro de una cápsula de gelatina dura o blanda, comprimido en tabletas, o incorporado directamente en la dieta del sujeto. Para administración terapéutica oral, los compuestos pueden ser incorporados con excipientes y utilizados en la forma de tabletas ingeribles, tabletas bucales, tabletas sublinguales, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, gofres y similares. Para administrar un compuesto de la invención por formas diferentes a la administración parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con un material para evitar su inactivación.

En ciertas realizaciones, el método comprende la administración parenteral de una cantidad efectiva de una molécula de enlazamiento a G1TR y un segundo agente a un sujeto. En una realización, el método comprende la administración intraarterial de una molécula de enlazamiento a G1TR y al menos un agente quimioterapéutico a un sujeto. En otras realizaciones, el método comprende administrar una cantidad efectiva de una molécula de enlazamiento a G1TR y al menos un agente quimioterapéutico directamente al suministro de sangre arterial de un tumor en un sujeto. En una realización, los métodos comprenden administrar una cantidad efectiva de una molécula de enlazamiento a G1TR y al menos un agente quimioterapéutico directamente al suministro de sangre arterial del tumor canceroso utilizando un catéter. En realizaciones donde el catéter se utiliza para administrar una molécula de enlazamiento a G1TR y al menos un agente quimioterapéutico, la inserción del catéter puede ser guiada por u observada por fluoroscopia u otro método conocido en el arte mediante el cual la inserción del catéter puede ser observada y/o guiada. En otra realización, el método comprende quimioembolización. Por ejemplo un método de quimioembolización comprende bloquear un vaso que alimenta el tumor canceroso con una composición compuesta de un material similar a una resina mezclado con una base oleosa (por ejemplo, alcohol polivinílico en etiodol) y uno o más agentes quimioterapéuticos. En todavía otras realizaciones, el método comprende la administración sistémica de una molécula de enlazamiento a G1TR y al menos un agente quimioterapéutico a un sujeto.

En general, la terapia de quimioembolización o de inyección intraarterial o intravenosa directa utilizando composiciones farmacéuticas de la presente invención se lleva a cabo típicamente de manera similar, independientemente del sitio. En resumen, una angiografía (un mapa de camino de los vasos sanguíneos) o más específicamente en ciertas realizaciones, una arteriografía, del área que va a ser embolizada pueden ser llevadas a cabo inyectando medios de contraste radioopacos a través de un catéter insertado en una arteria o vena (dependiendo del sitio que va a ser embolizado o inyectado) a medida que se toma un rayos X. El catéter puede ser insertado bien sea por vía percutánea o por cirugía. El vaso sanguíneo puede ser embolizado entonces haciendo refluir composiciones farmacéuticas de la presente invención a través del catéter, hasta que se observa que el flujo se detiene. La oclusión puede ser confirmada repitiendo el angiograma. En realizaciones en donde se utiliza inyección directa, el vaso sanguíneo es infundido entonces con una composición farmacéutica de la invención en la dosis deseada.

La terapia por embolización da como resultado generalmente la distribución de composiciones que contienen inhibidores a través de los intersticios del tumor o masa vascular que va a ser tratada. El volumen físico de las partículas embólicas que taponan el lumen arterial da como resultado la oclusión del suministro de sangre. Además de este efecto, la presencia de un factor antiangiogénico evita la formación de nuevos vasos sanguíneos para proveer

el tumor o la masa vascular, potenciando el efecto de debilitación del corte del suministro sanguíneo. La administración intraarterial, intravenosa o inyección directa da como resultado en general la distribución de composiciones que contienen inhibidores a través de los intersticios del tumor o masa vascular que van a ser tratados también. Sin embargo, no se espera en general que el suministro sanguíneo se ocluya con este método.

En un aspecto de la presente invención, los tumores primarios o secundarios pueden ser tratados utilizando la terapia de embolización o inyección directa intraarterial o intravenosa. En resumen, se inserta un catéter a través de la arteria femoral o braquial y se hace avanzar hacia, por ejemplo, la arteria hepática, guiándolo a través del sistema arterial bajo guía fluoroscópica. El catéter se hace avanzar hacia el árbol de la arteria hepática tanto como sea necesario para permitir un bloqueo completo de los vasos sanguíneos que alimentan el tumor, a la vez que modera tanto como sea posible las ramificaciones arteriales que alimentan las estructuras normales. Idealmente está será una ramificación de segmento de la arteria hepática, pero podría ser la arteria hepática completa distal al origen de la arteria gastroduodenal, o incluso múltiples arterias separadas, requerirán ser bloqueadas dependiendo del alcance del tumor y su suministro de sangre individual. Una vez que la posición deseada del catéter es alcanzada, la arteria es embolizada inyectando composiciones (como se describió más arriba) a través del catéter arterial hasta que el flujo en la arteria que va a ser bloqueada cesa, preferiblemente después de observación durante 5 minutos. La oclusión de la arteria puede ser confirmada inyectando un medio de contraste radioopaco a través del catéter y demostrando por fluoroscopia o rayos X que el vaso que estaba lleno previamente con el contraste ya no lo está. En realizaciones donde se utiliza inyección directa, la arteria es infundida inyectando composiciones (como se describe más arriba) a través del catéter arterial en una dosis deseada. El mismo procedimiento puede ser repetido con cada arteria de alimentación para ser ocluida.

Con respecto a la dosificación, debe anotarse que las cantidades de dosificación, número de ciclos administrados, y la secuencia de administración pueden variar con la severidad de la condición que va a ser aliviada. Debe entenderse adicionalmente que para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos pueden ser ajustados con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que está administrando o supervisando la administración de las composiciones. Típicamente, la dosificación será determinada utilizando técnicas conocidas por una persona experimentada en el arte. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del agente, o el éster, sal o amida del mismo, la ruta de administración, el tiempo de administración, la rata de excreción o metabolismo del compuesto en particular que está siendo empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con el compuesto particular empleado, la edad, sexo, peso, condición salud general, estado de la enfermedad, la capacidad de la molécula de enlazamiento para disparar una respuesta deseada en el individuo, y la historia médica previa del paciente que está siendo tratado, y factores similares bien conocidos en las artes médicas.

Los regímenes de dosificación pueden ser ajustados para proveer la respuesta deseada óptima. Por ejemplo, un bolo sencillo puede ser administrado, pueden administrarse varias dosis divididas con el tiempo o la dosis puede ser reducida o incrementada proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. En una realización, pueden formularse uno o más de los agentes que van a ser administrados como una composición parenteral en formas de dosificación unitarias para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación tal como se utiliza aquí se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que van a ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitaria de la invención están dictadas por y son directamente dependientes de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico que se va a alcanzar, y (b) las limitaciones inherentes en el arte de componer tal compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Un médico o veterinario que tenga experiencia normal en el arte podrá determinar y prescribir fácilmente la cantidad efectiva de cada uno de los agentes de la terapia de combinación objetivo. Por ejemplo, el médico o veterinario podría administrar al menos un agente adicional a la dosis a la cual sería administrada al sujeto si fuera a ser administrada sola, o como parte de una terapia de combinación que no emplea una molécula de enlazamiento a G1TR. Tales protocolos de dosificación reconocidos por el arte pueden ser determinados por el experto en la técnica sin experimentación indebida.

El uso combinado de una molécula de enlazamiento a G1TR y al menos un agente quimioterapéutico tal como se describe aquí, pueden reducir la dosificación requerida para cualquier agente individual. De acuerdo con lo anterior, en una realización, la dosis de al menos un agente adicional puede ser inferior que la requerida con el fin de alcanzar el efecto terapéutico deseado cuando el agente va a ser administrado solo.

Con respecto a las moléculas de enlazamiento a G1TR, una persona de experiencia normal en el arte también será capaz de determinar fácilmente una dosis óptima. Por ejemplo, un anticuerpo anti-G1TR puede ser administrado a una dosis de entre aproximadamente 50 mg/kg y aproximadamente 0.05 mg/kg. En una realización, un anticuerpo anti-G1TR puede ser administrado a una dosis entre aproximadamente 40 mg/kg y aproximadamente 0.1 mg/kg. En otra realización, un anticuerpo anti-G1TR puede ser administrado a una dosis de entre aproximadamente 30 mg/kg y aproximadamente 0.5 mg/kg. En todavía otra realización, un anticuerpo anti-G1TR puede ser administrado a una dosis de entre aproximadamente 20 mg/kg y aproximadamente 1 mg/kg. Los rangos intermedios a los valores antes citados

también se consideran como parte de esta invención. En aun otra realización, un anticuerpo anti-GITR puede ser administrado a una dosis de entre aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 5 mg/kg. Por ejemplo, dosis de ejemplo incluyen: aproximadamente 0.06, aproximadamente 0.07, aproximadamente 0.08, aproximadamente 0.09, aproximadamente 0.1, aproximadamente 0.2, aproximadamente 0.3, aproximadamente 0.4, aproximadamente 0.5, aproximadamente 0.6, aproximadamente 0.7, aproximadamente 0.8, aproximadamente 0.9, aproximadamente 1, aproximadamente 1.5, aproximadamente 2, aproximadamente 2.5, aproximadamente 3, aproximadamente 3.5, aproximadamente 4, aproximadamente 4.5, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, o aproximadamente 40 mg/kg. Hay que anotar que las dosificaciones y rangos de dosificación definidos aquí son solamente de ejemplo y no pretenden limitar el alcance o práctica de la composición reivindicada.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden ser utilizados para formular un rango de dosificación para uso en humanos por ejemplo, determinando la dosis a la cual no ocurren efectos adversos en, por ejemplo, un ratón, y determinando la dosificación equivalente en humanos (véase, por ejemplo, www.fda.gov/cber/gdlns/dose.htm). La dosificación de cualquier suplemento, o alternativamente de cualquier componente del mismo, cae preferiblemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la ED50 (dosis efectiva media) con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. Para agentes de la presente invención, la dosis terapéuticamente efectiva puede ser estimada inicialmente a partir de ensayos con cultivos celulares. Una dosis puede ser formulada en modelos animales para alcanzar un rango de concentración en plasma circulante que incluye la IC50 (esto es, la concentración del compuesto de prueba que alcanza una media inhibición máxima de los síntomas) según se determina en cultivo celular. Tal información puede ser utilizada para determinar más exactamente las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma pueden ser medidos, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento.

Alternativamente, la dosificación de la invención objetivo puede ser determinada por referencia a las concentraciones en plasma de la composición. Por ejemplo, puede usarse la concentración en plasma máxima (C_{max}) y el área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo de tiempo 0 hasta infinito (AUC(0-4)). Las dosificaciones para la presente invención incluyen aquellas que producen los valores anteriores para C_{max} y AUC (0-4) y otras dosificaciones resultantes en valores más grandes o más pequeños para estos parámetros.

El tiempo preciso de administración y la cantidad de cualquier compuesto en particular que produce el tratamiento más efectivo en un paciente dado dependerá de la actividad, farmacocinética y biodisponibilidad de un compuesto particular, condición fisiológica del paciente (incluyendo edad, sexo, tipo y etapa de la enfermedad, condición física general, respuesta a una dosificación dada y tipo de medicación), ruta de administración y similares. Las guías presentadas aquí pueden ser utilizadas para optimizar el tratamiento, por ejemplo, determinando el tiempo y/o cantidad de administración óptimos, lo cual requiere no más de una experimentación rutinaria consistente en la monitorización del sujeto y ajuste de la dosificación y/o temporización.

En una realización, el al menos un agente de enlazamiento a no GITR de la terapia de combinación se administra a un sujeto antes de la administración de la molécula de enlazamiento a GITR. La molécula de enlazamiento a no GITR puede ser administrada una vez o más de una vez al paciente. En casos de administración repetida, la molécula de enlazamiento a no GITR puede ser administrada diariamente, en días alternativos, semanalmente, mensualmente, o de acuerdo con otra programación. Un tratamiento de ejemplo conlleva a la administración en dosificaciones múltiples durante un período prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses.

De la misma manera, una molécula de enlazamiento a GITR de la invención puede ser administrada una vez o más de una vez a un sujeto. En casos de administración repetida, la molécula de enlazamiento a GITR puede ser administrada diariamente, en días alternativos, semanalmente, mensualmente o de acuerdo con otra programación. Un tratamiento de ejemplo conlleva a la administración en múltiples dosificaciones durante un período prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses.

En casos donde la molécula de enlazamiento a no GITR es administrada antes o después de la administración de la molécula de enlazamiento a GITR, los intervalos entre la administración de los agentes pueden ser, por ejemplo, minutos, horas, días, semanas o meses.

Una terapia de combinación de la invención que comprende una molécula de enlazamiento a GITR y al menos un agente adicional puede incluir opcionalmente la administración de agentes o regímenes de tratamiento adicionales, por ejemplo, cirugía, terapia de radiación, que son efectivos en el tratamiento del cáncer. Agentes adicionales preferidos son aquellos que son reconocidos en el arte y administrados rutinariamente para tratar un trastorno en particular.

Mientras que el sujeto está siendo tratado, la salud del paciente puede ser monitorizada midiendo uno o más de los índices relevantes en momentos predeterminados, por ejemplo, durante un período de 24 horas. El tratamiento, incluyendo suplemento, cantidades, tiempos de administración y formulación, puede ser optimizado de acuerdo con los resultados de tal monitorización. El paciente puede ser reevaluado periódicamente para determinar el grado de mejora midiendo los mismos parámetros, ocurriendo la primera de tales reevaluaciones típicamente al final de las cuatro semanas desde el inicio de la terapia, y ocurriendo reevaluaciones subsecuentes cada cuatro a ocho semanas durante

la terapia y luego cada tres meses después de la misma. La terapia puede continuar durante varios meses o incluso años, con un mínimo de un mes como longitud típica de terapia para humanos. Los ajustes de las cantidades de agente administrado y posiblemente del tiempo de administración pueden hacerse con base en estas reevaluaciones.

En una realización, la molécula de enlazamiento a G1TR y el segundo agente son conjugados utilizando métodos conocidos en el arte.

V. Kits

También se divulgan kits y artículos de manufactura para uso en los métodos divulgados aquí. Se divulgan composiciones farmacéuticas o empacadas o kits para administrar la molécula de enlazamiento a G1TR y un segundo agente usado en la invención para el tratamiento del cáncer. El kit o artículo de manufactura puede comprender una molécula de enlazamiento a G1TR, e instrucciones para administración para el tratamiento del cáncer en combinación con al menos un agente adicional, por ejemplo, un agente quimioterapéutico. El kit puede comprender un segundo contenedor que comprende al menos un agente adicional para uso en una terapia de combinación con la molécula de enlazamiento a G1TR. Las instrucciones pueden describir cómo, por ejemplo, las diferentes dosis de la molécula de enlazamiento a G1TR y al menos un agente quimioterapéutico serán administrados a un sujeto para un tratamiento, por vía intravenosa, o cuando, por ejemplo en la semana 0 y semana 2.

El empaque o kit puede contener alternativamente la molécula de enlazamiento a G1TR y puede ser promovido para uso, bien sea dentro del paquete o a través de información acompañante, para los usos o tratamiento de los trastornos descritos aquí. Los agentes farmacéuticos empacados o kits pueden incluir adicionalmente un agente quimioterapéutico (tal como se describe aquí) empacado o copromovido con instrucciones para utilizar el segundo agente, por ejemplo, un agente quimioterapéutico, con un primer agente; por ejemplo, una molécula de enlazamiento a G1TR.

Por ejemplo, un kit puede comprender un material de empaque, una o más moléculas de enlazamiento a G1TR y al menos un agente quimioterapéutico tal como se describió más arriba y opcionalmente una etiqueta o inserto de empaque. También se divulga un kit que comprende una o más moléculas de enlazamiento a G1TR y al menos un agente quimioterapéutico y uno o más dispositivos para lograr la administración de tales composiciones. Por ejemplo, un kit puede comprender una composición farmacéutica que comprende una molécula de enlazamiento a G1TR y un catéter para lograr una inyección intraarterial directa de la composición en un tumor sólido. Los kits incluyen opcionalmente componentes accesorios tales como un segundo contenedor que comprende un regulador farmacéuticamente aceptable e instrucciones para usar la composición.

La invención es ilustrada adicionalmente mediante los siguientes ejemplo, los cuales no deben considerarse como limitantes. Los ejemplos que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones son solo para fines ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1: La combinación de una molécula de enlazamiento a G1TR y un análogo de nucleósido hace disminuir la carga tumoral e incrementa el tiempo de supervivencia en un modelo animal de carcinoma de colon.

Se inyectaron ratones en el flanco con 1×10^5 células CT26 y se dividieron en grupos. Un grupo de ratones de control fue no tratado. El grupo de ratones que recibieron Gemzar fue tratado con 80 mg/kg de Gemzar en el día 15. Un grupo de ratones recibieron anticuerpo anti-G1TR (2F8) solo a una dosis de 0.4 mg (I.P.) en los días 15, 16 y 17. El grupo de ratones que recibieron Gemzar + 2F8 recibieron 80 mg/kg de Gemzar en el día 15 y 0.4 mg de 2F8 (I.P.) en el día 16.

El tamaño de los tumores y la supervivencia de los ratones fueron monitorizados. Se utilizó el software GraphPad Prism 4 para representar gráficamente las curvas de supervivencia Kaplan-Meier y para confirmar los tiempos de supervivencia medios para los grupos. Los tumores fueron medidos utilizando calibradores, y el tamaño del tumor fue calculado utilizando la fórmula $(L \times W^2)/2$.

La carga tumoral en ratones tratados con la combinación de Gemzar y 2F8 fue reducida en comparación con la carga tumoral de ratones tratados con vehículo, Gemzar solo o 2F8 solo (figura 1).

Además, como se muestra en la figura 2, la supervivencia media para los ratones de control IgG2a y los ratones tratados con la molécula de enlazamiento a G1TR sola fue de 24 días. La supervivencia media fue de 31 días para los ratones tratados con Gemzar solo. Todos los ratones tratados con Gemzar más 2F8 estaban vivos todavía en el día 31 y los tumores eran moderados en tamaño.

En un segundo estudio, se inyectaron ratones en la vena de la cola con 1×10^5 células CT26 y los tumores se dejaron establecer en el pulmón durante 10 días. Los animales fueron divididos entonces en grupos. Un grupo de ratones de control no fue tratado. El grupo de ratones que recibió Gemzar fue tratado con 80 mg/kg de Gemzar en el día 15. Un grupo de ratones recibió anticuerpo anti-G1TR (2F8) solo a una dosis de 0.4 mg (I.P.) en los días 15, 16 y 17. El grupo de ratones que recibieron Gemzar + 2F8 recibieron 80 mg/kg de Gemzar en el día 15 y 0.4 mg de 2F8 (I.P.) en el día 16. El número de tumores fue establecido en el día 22.

Como se muestra en la figura 3, el número de tumores en ratones tratados con la combinación de Gemzar y 2F8 fue reducido en comparación con el número de tumores en ratones tratados con vehículo, Gemzar solo o 2F8 solo.

Ejemplo de referencia 2: La combinación de una molécula de enlazamiento a G1TR y un agente que afecta la formación de microtúbulos hizo disminuir la carga tumoral en un modelo animal de melanoma.

5 Se inyectaron ratones en el flanco con 12×10^3 células de melanoma B16 y se dividieron en grupos. Un grupo de ratones de control no fue tratado. El grupo de ratones que recibió Taxol[®] fue tratado con 10 mg/kg de Taxol[®] en el día 20 cuando los tumores tenían aproximadamente 100 mm³. Un grupo de ratones recibió anticuerpo anti-G1TR (2F8) solo a una dosis de 0.4 mg (I.P.) en el día 21. El grupo de ratones que recibió Taxol[®] + 2F8 recibió 10 mg/kg de Taxol[®] en el día 20 y 0.4 mg de 2F8 (I.P.) en el día 21.

10 Se monitorizó el tamaño de los tumores y la supervivencia de los ratones. Los tumores fueron medidos utilizando calibradores, y el tamaño del tumor fue calculado utilizando la fórmula $(L \times W^2)/2$.

Como se muestra en la figura 4, la carga tumoral en los ratones tratados con la combinación de Taxol[®] y 2F8 fue reducido en comparación con la carga tumoral de ratones tratados con vehículo, Taxol[®] solo o 2F8 solo.

Ejemplo de referencia 3: La combinación de una molécula de enlazamiento a G1TR y un agente alquilante hace disminuir la carga tumoral en un modelo animal de carcinoma de colon.

15 Se inyectaron ratones por vía subcutánea con 1×10^5 células CT26 y se dividieron en grupos. Un grupo de ratones de control no fue tratado. El grupo de ratones que recibieron Cytoxan fue tratado con 150 mg/kg de Cytoxan en el día 13. Un grupo de ratones recibieron anticuerpo anti-G1TR (2F8) solo a una dosis de 0.4 mg (I.P.) en el día 14. El grupo de ratones que recibieron Cytoxan + 2F8 recibieron 150 mg/kg de Cytoxan[®] en el día 13 y 0.4 mg de 2F8 (I.P.) en el día 14.

Se monitorizó el tamaño de los tumores y la supervivencia de los ratones. Los tumores fueron medidos utilizando calibradores, y el tamaño del tumor fue calculado usando la fórmula $(L \times W^2)/2$.

Como se muestra en la figura 5, la carga tumoral en ratones tratados con la combinación de Cytoxan y 2F8 fue reducido en comparación con la carga tumoral de ratones tratados con vehículo o Cytoxan solo.

25 **Ejemplo de referencia 4:** Un modelo animal de carcinoma de colon tratado con la combinación de una molécula de enlazamiento a G1TR y un agente alquilante o un análogo de nucleósido desarrolla una respuesta de memoria robusta a las células CT26.

Los ratones tratados como se indicó arriba en los Ejemplos 1 y 4 que habían tenido remisión completa de sus tumores fueron utilizados en estudios donde fueron inyectados con 3×10^5 células CT26 IV (4 ratones) o 10^5 células CT26 en su flanco izquierdo y 10^6 células RENCA en su flanco derecho (4 ratones). Se utilizaron ratones intactos a CT26 como controles. Todos los 4 ratones tratados con la combinación rechazaron el reto de las células CT26 y 2/4 rechazaron completamente las células RENCA. En el estudio IV, se hizo resección de los pulmones 14 días después de la infección de las células, se tiñeron con tinta India y se fijaron con solución de Fekete y se analizaron en cuanto a la presencia de tumores. El análisis de pulmones de todos los 4 animales no mostró signos visibles de tumores.

35 **Ejemplo de referencia 5:** La combinación de una molécula de enlazamiento a G1TR y un antimetabolito hace disminuir la carga tumoral en un modelo animal de carcinoma de colon.

Se inyectaron ratones por vía subcutánea con 1×10^5 células CT26 y se dividieron en grupos. Un grupo de ratones de control no se trató. El grupo de ratones que recibieron fluorouracilo (5-FU) fue tratado con 75 mg/kg de 5-FU en el día 10. El grupo de ratones que recibió 5-FU + 2F8 recibieron 75 mg/kg de 5-FU en el día 10 y 0.4 mg de 2F8 (I.P.) en el día 11.

40 Se monitorizaron el tamaño de los tumores y la supervivencia de los ratones. Los tumores fueron medidos utilizando calibradores, y el tamaño del tumor fue calculado usando la fórmula $(L \times W^2)/2$.

Como se muestra en la figura 6, la carga tumoral en ratones tratados con la combinación de 5-FU y 2F8 fue reducida en comparación con la carga tumoral de ratones tratados con el vehículo o 5-FU solo.

45 **Ejemplo de referencia 6:** La combinación de una molécula de enlazamiento a G1TR y un antibiótico citotóxico hace disminuir la carga tumoral en un modelo animal de carcinoma de colon.

Se inyectaron ratones por vía subcutánea con 1×10^5 células CT26 y se dividieron en grupos. Un grupo de ratones de control no fue tratado. El grupo de ratones que recibieron doxorubicina (Adriamicina) fue tratado con 5 mg/kg de doxorubicina en el día 10. El grupo de ratones que recibieron doxorubicina + 2F8 recibieron 5 mg/kg de doxorubicina en el día 10 y 0.4 mg de 2F8 (I.P.) en el día 11.

50 Se monitorizaron el tamaño de los tumores y la supervivencia de los ratones. Los tumores fueron medidos utilizando calibradores, y el tamaño del tumor fue calculado usando la fórmula $(L \times W^2)/2$.

Como se muestra en la figura 7, la carga tumoral de los ratones tratados con la combinación de doxorubicina y 2F8 fue reducida en comparación con la carga tumoral de ratones tratados con vehículo o doxorubicina sola.

Ejemplo de referencia 7: La combinación de una molécula de enlazamiento a GITR y un agente alquilante hace disminuir la carga tumoral en un modelo animal de melanoma.

- 5 Se inyectaron ratones por vía subcutánea con 1×10^4 células de melanoma B16 y se dividieron en grupos. Un grupo de ratones de control no fue tratado. El grupo de ratones que reciben Cytoxan fue tratado con 150 mg/kg de Cytoxan en el día 13. Un grupo de ratones recibió anticuerpo anti-GITR (2F8) solo a una dosis de 0.4 mg (I.P.) en el día 14. El grupo de ratones que recibió Cytoxan + 2F8 recibió 150 mg/kg de Cytoxan® en el día 13 y 0.4 mg de 2F8 (I.P.) en el día 14.
- 10 Se monitorizaron el tamaño de los tumores y la supervivencia de los ratones. Los tumores fueron medidos usando calibradores, y el tamaño del tumor fue calculado usando la fórmula $(L \times W^2)/2$.

Como se muestra en la figura 8, la carga tumoral en ratones tratados con la combinación de Cytoxan y 2F8 fue reducida en comparación con la carga tumoral de ratones tratados con vehículo o Cytoxan solo.

Equivalentes

- 15 Los experimentados en el arte reconocerán, o serán capaces de establecer utilizando no más que experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas aquí.

Listado de secuencias

<110> PONATH, PAUL ROSENZWEIG, MICHAEL PONTE, F. JOSE

<120> Terapias de combinación que emplean moléculas de enlazamiento a GITR

- 20 <130> P114604EPPC01

<140> Concurrentemente con la presente

<141> Concurrentemente con la presente

- 25 <150> 60/959,246

<151> 2007-07-12

<150> 61/001,021

- 30 <151> 2007-10-30

<150> 61/126,431

<151> 2008-05-05

- 35 <160> 7

<170> Patent In Ver. 3.3

<210> 1

- 40 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

5

<400> 1

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly
1 5 10

10 <210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 2

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

20 <210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 3

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Gln Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 4

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 4

Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr
1 5

<210> 5

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

10 <400> 5

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
1 5 10

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 6

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

20

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 7

Gln Gln Tyr Asn Thr Asp Pro Leu Thr
1 5

30

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo de enlazamiento a GITR, o un fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo, para uso en un método para reducir el tamaño del tumor, comprendiendo el método administrar una terapia de combinación que comprende dicho anticuerpo de enlazamiento a GITR, o dicho fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo, y uno o más ciclos de al menos un agente adicional, a un sujeto que tiene un tumor, de tal manera que se reduce el tamaño del tumor;
- 5 en donde el anticuerpo de enlazamiento a GITR o el fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo actúa como un agonista de GITR;
- en donde el al menos un agente adicional es Gemcitabina; y
- 10 en donde el anticuerpo de enlazamiento a GITR o el fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo actúa de manera sinérgica con el agente quimioterapéutico, o tiene un efecto aditivo con el agente quimioterapéutico,
- en donde el tumor es un tumor de colon o adenocarcinoma de colon.
2. El anticuerpo de enlazamiento a GITR, o fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo, para uso como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el método comprende además administrar un agente biológico al sujeto, preferiblemente en donde el agente biológico se selecciona de gefitinib (Iressa), anastrozol, dietilestilbestrol, estradiol, premarin, raloxifeno, progesterona, noretinodrel, esthisterona, dimethisterona, acetato de megestrol, acetato de medroxiprogesterona, caproato de hidroxiprogesterona, norethisterona, metilttestosterona, testosterona, dexamtasona, prednisona, Cortisol, solumedrol, tamoxifen, fulvestrant, toremifeno, aminoglutetimida, testolactona, droloxifeno, anastrozol, bicalutamida, flutamida, nilutamida, goserelina flutamida, leuprolide, triptorelin, aminoglutetimida, mitotano, goserelina, cetuximab, erlotinib, imatinib, Tositumomab, Alemtuzumab, Trastuzumab, Gemtuzumab, Rituximab, Ibritumomab tiuxetan, Bevacizumab, Denileukin difitox, Daclizumab, interferon alfa, interferon beta, anti-4-1BB, anti-4-1BBL, anti-CD40, anti-CD154, anti-OX40, anti-OX40L, anti-CD28, anti-CD80, anti-CD86, anti-CD70, anti-CD27, anti-HVEM, anti-LIGHT, anti-GITRL, anti-CTLA-4, OX40L soluble, 4-1BBL soluble, CD 154 soluble, GITRL soluble, LIGHT soluble, CD70 soluble, CD80 soluble, CD86 soluble, CTLA4-Ig soluble, y combinaciones de los mismos.
- 15 3. El anticuerpo de enlazamiento a GITR, o fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo, para uso como se reivindica en la reivindicación 2, en donde el agente biológico es un anticuerpo.
4. El anticuerpo de enlazamiento a GITR, o fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo, para uso como se reivindica en la reivindicación 3, en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-CTLA4.
5. El anticuerpo de enlazamiento a GITR, o fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo, para uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo de enlazamiento a GITR o el fragmento de enlazamiento a antígeno es un anticuerpo humanizado o un fragmento de enlazamiento a antígeno humanizado de un anticuerpo.
- 30 6. El anticuerpo de enlazamiento a GITR, o fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo, para uso como se reivindica en la reivindicación 5, en donde el anticuerpo humanizado o el fragmento de enlazamiento a antígeno humanizado comprende las CDR mostradas en SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 5, 6 y 7 o en SEQ ID NOs: 1, 3, 4, 5, 6 y 7.
7. El anticuerpo de enlazamiento a GITR, o fragmento de enlazamiento a antígeno del mismo, para uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo de enlazamiento a GITR o el fragmento de enlazamiento a antígeno es un anticuerpo quimérico o un fragmento de enlazamiento a antígeno quimérico de un anticuerpo.

40

Figura 1

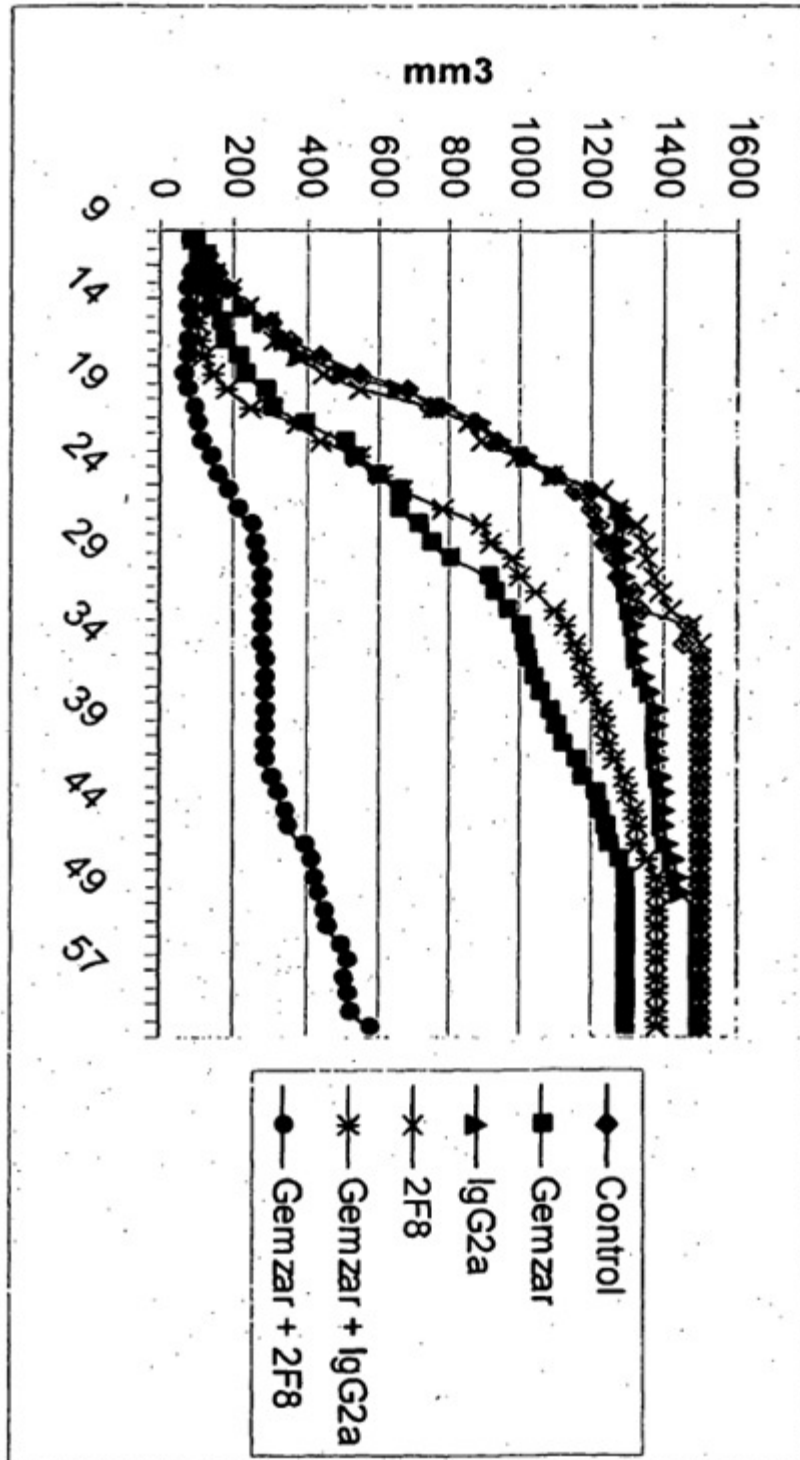
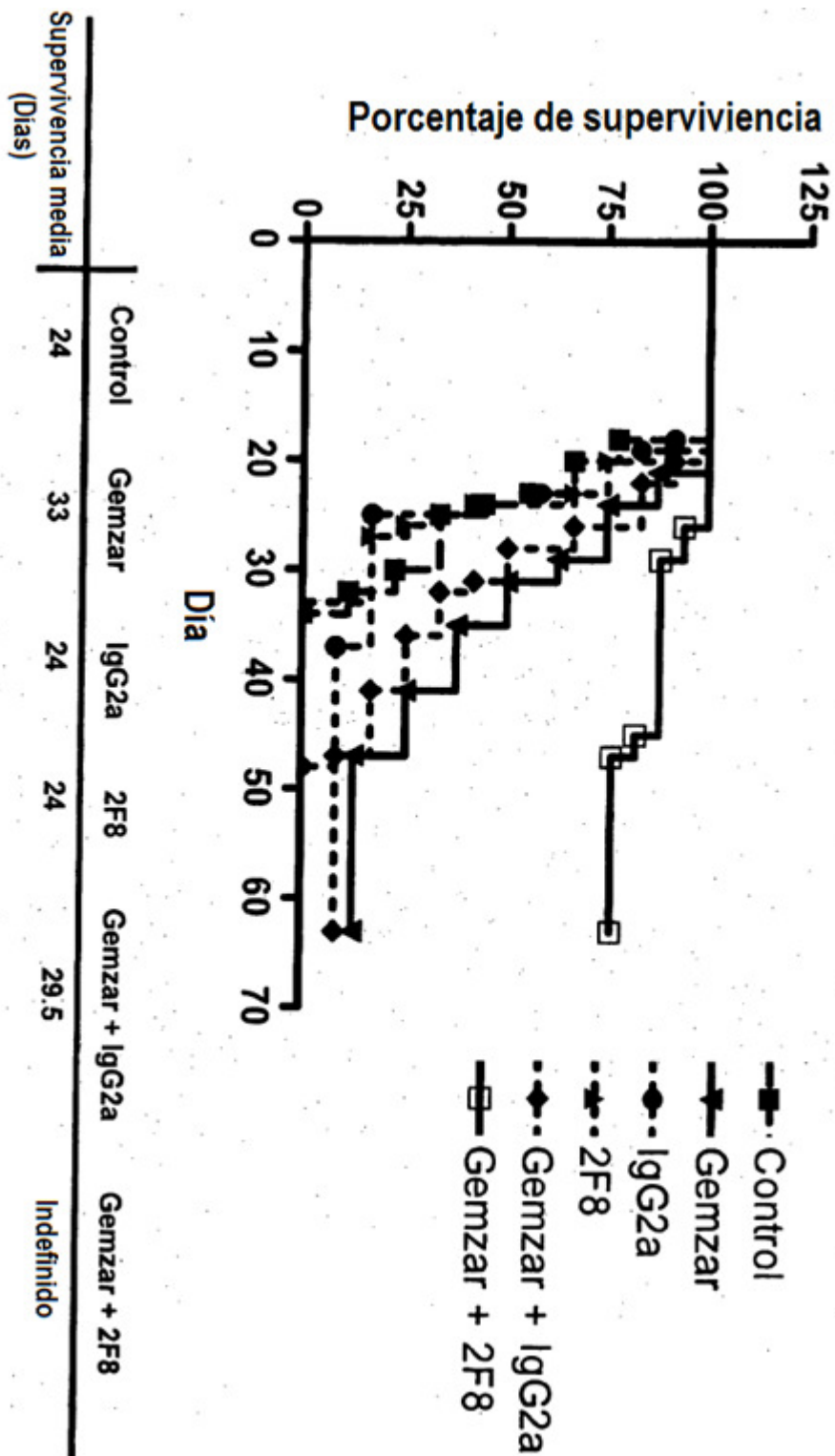


Figura 2



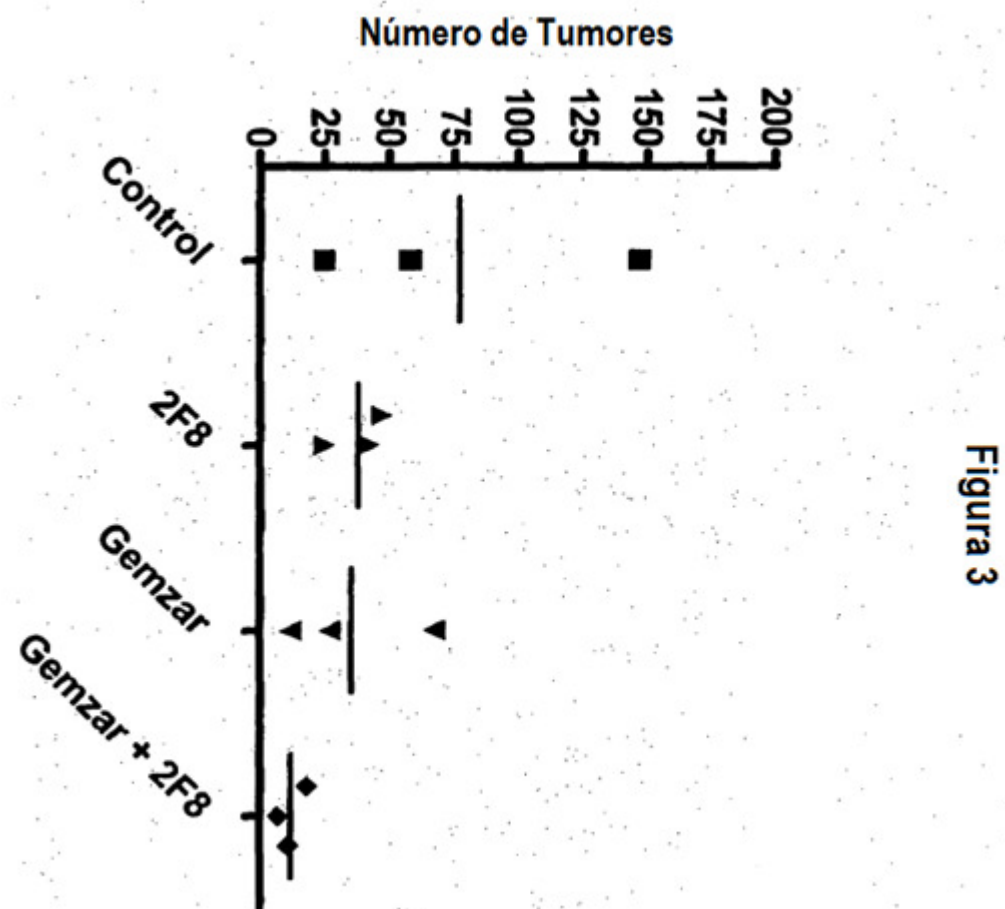


Figura 3

Figura 4

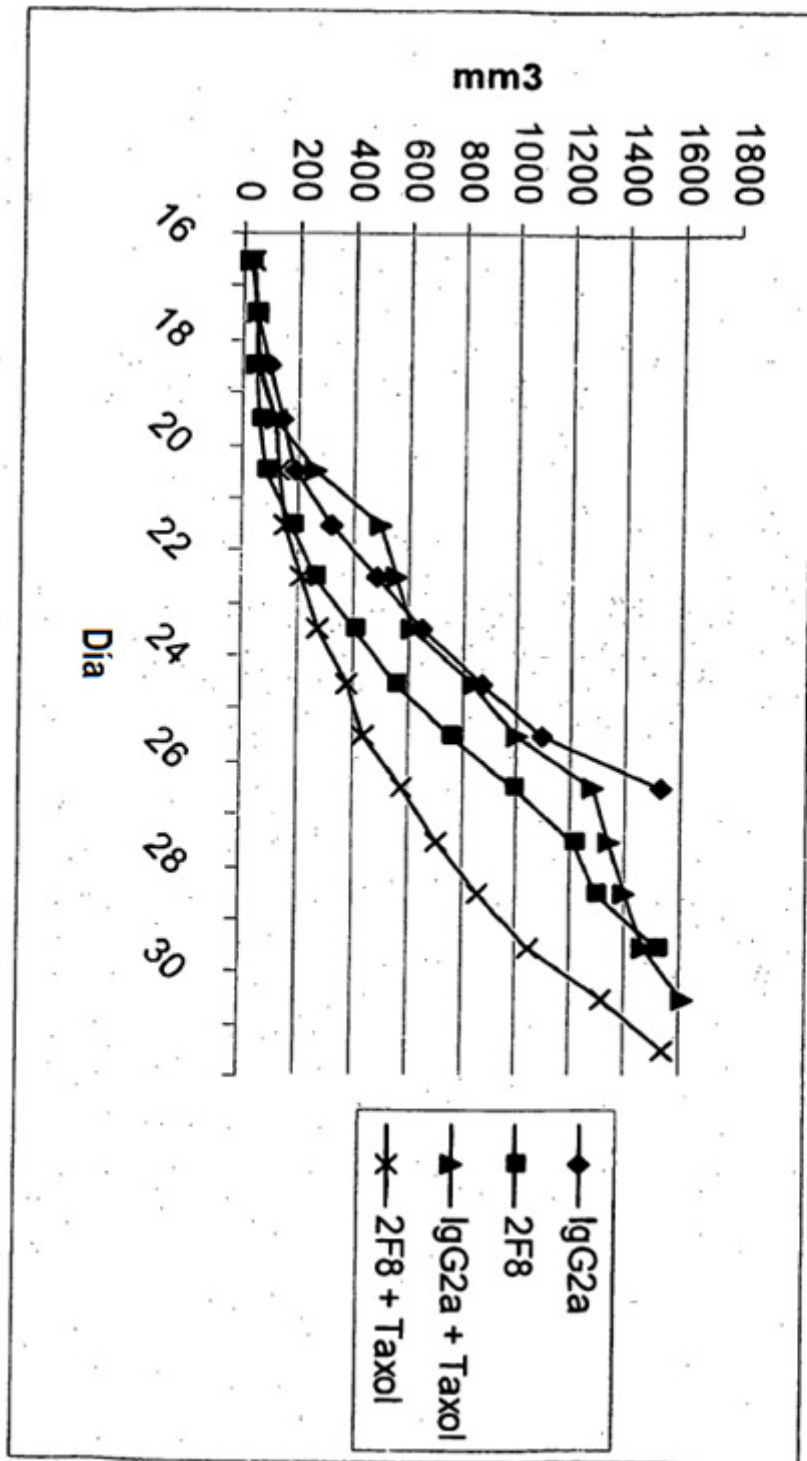


Figura 5

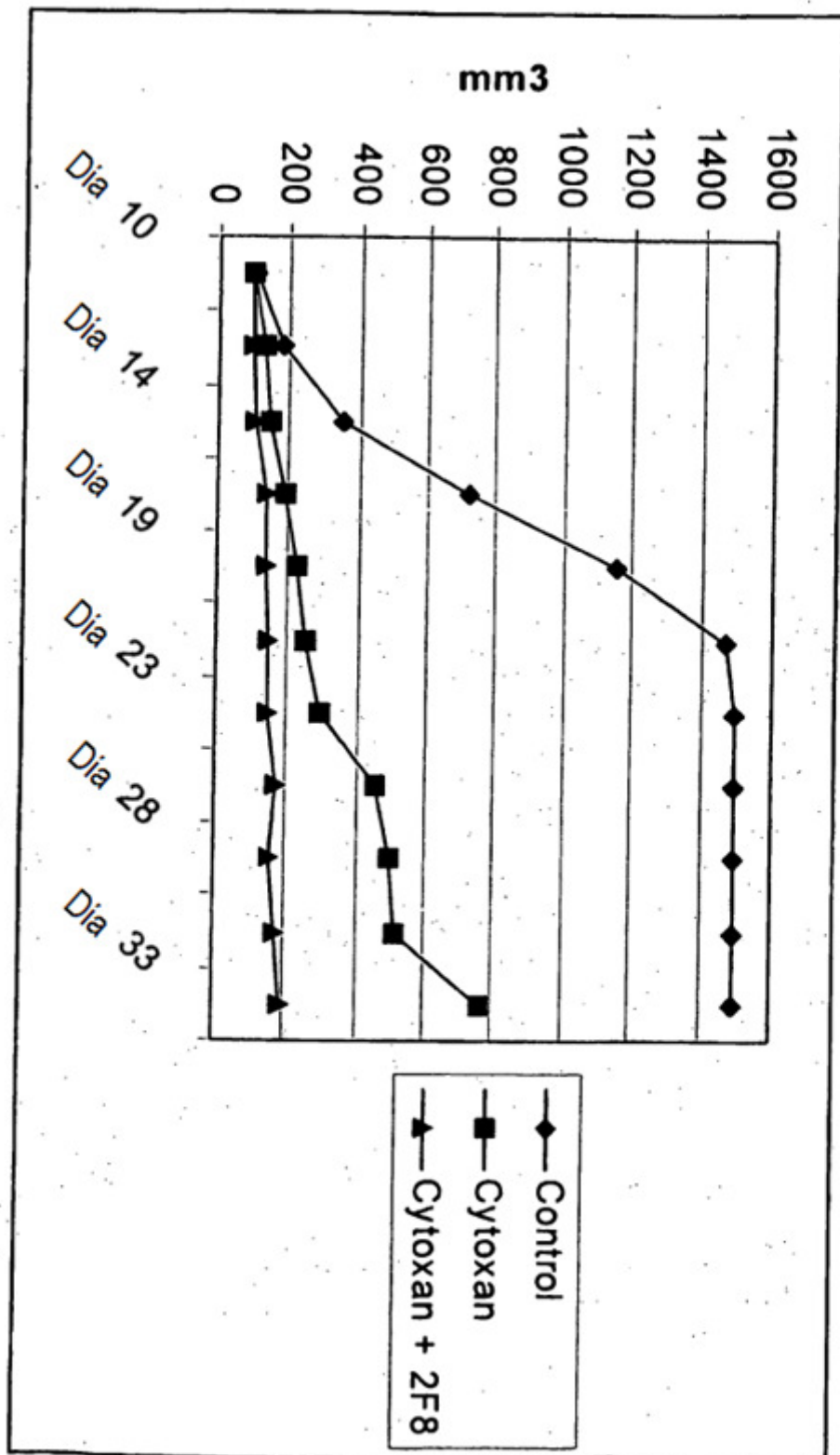


Figura 6

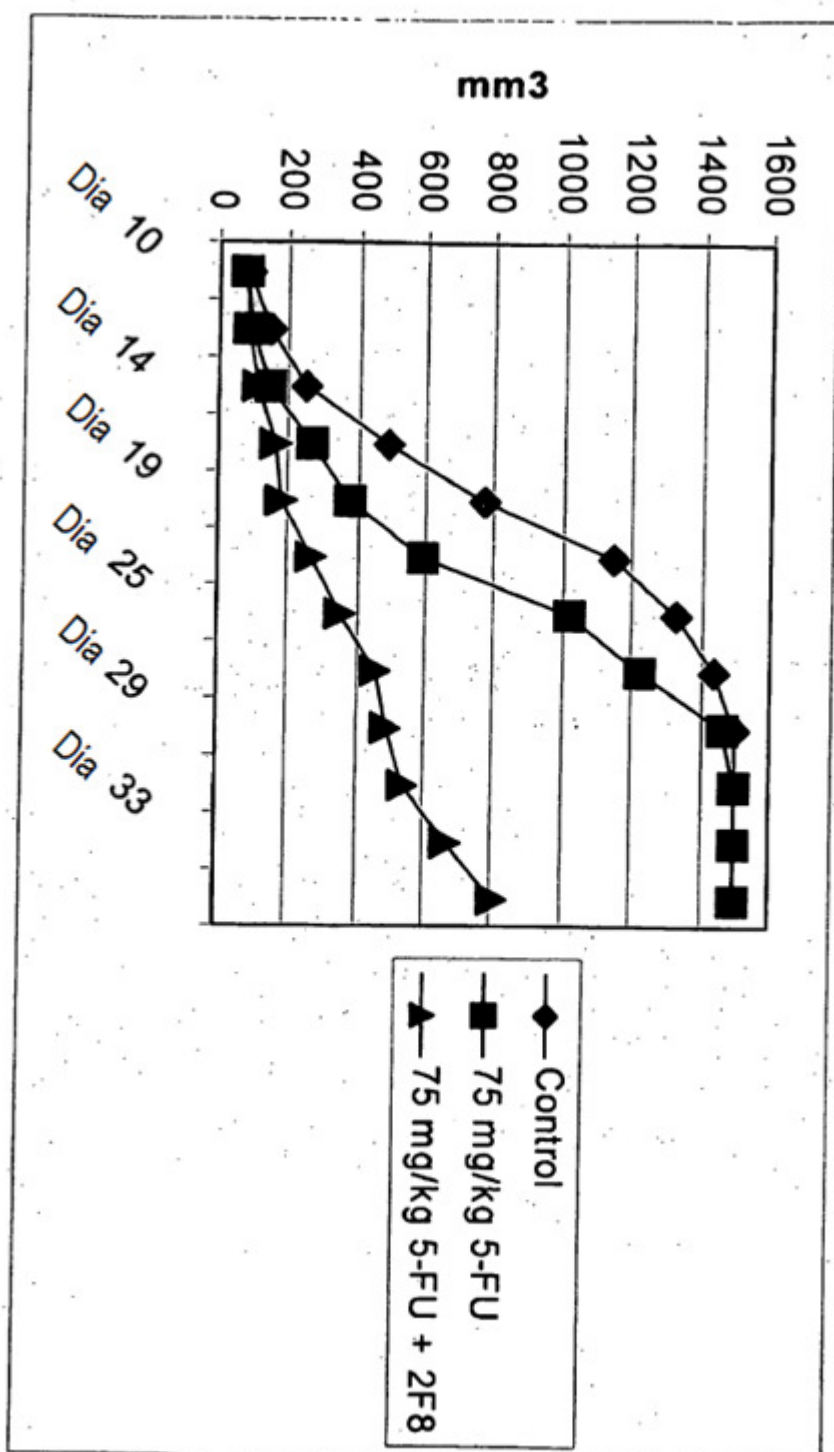


Figura 7

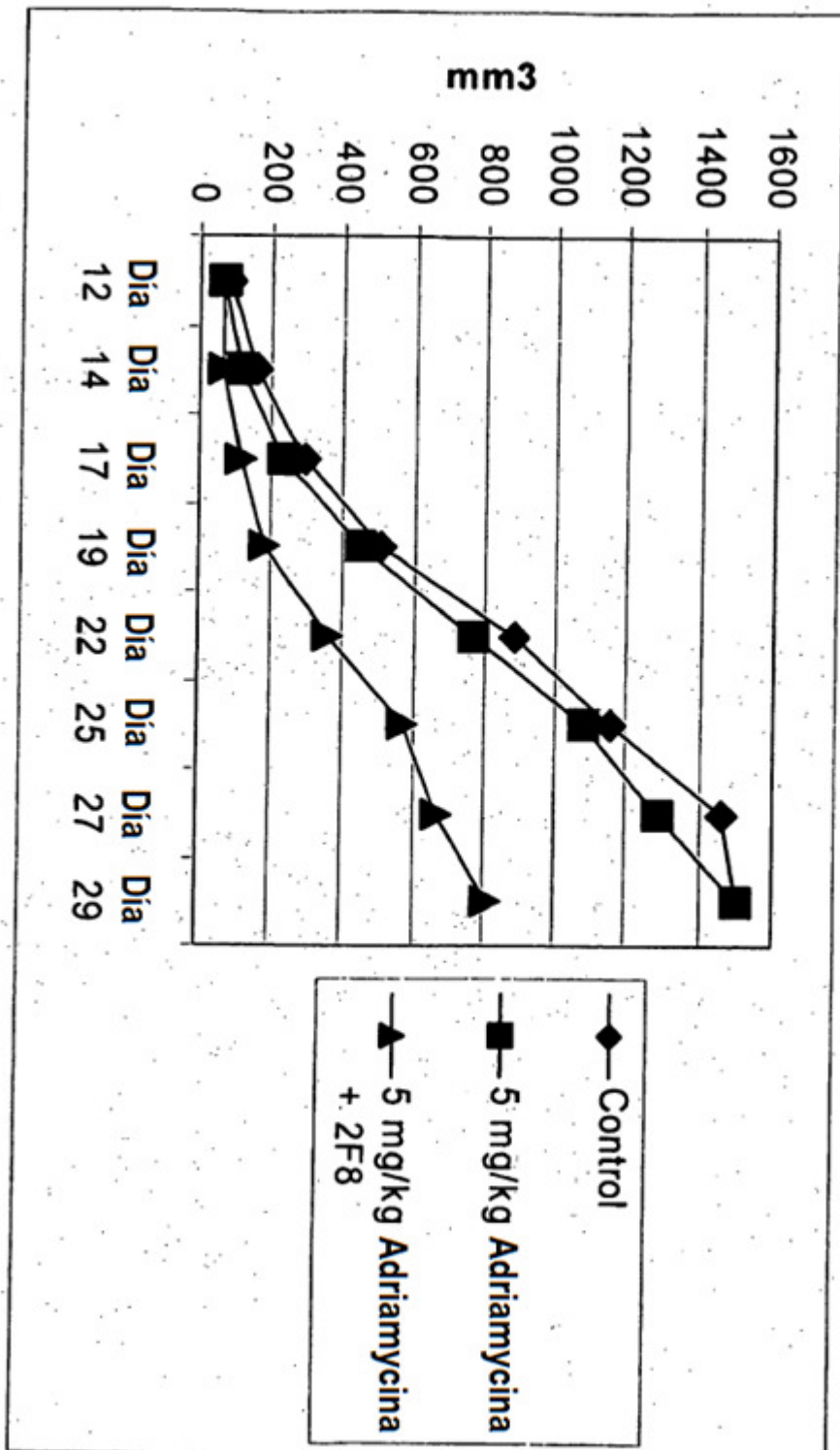


Figura 8

Modelo de Melanoma B16

