

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 926**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2018 PCT/JP2018/012644**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2018 WO18181425**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2018 E 18775737 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3431105**

54 Título: **Composición medicinal para tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

29.03.2017 JP 2017065603

27.09.2017 JP 2017185935

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

03.08.2020

73 Titular/es:

SHIONOGI & CO., LTD. (50.0%)

1-8, Doshomachi 3-chome, Chuo-ku, Osaka-shi

Osaka 541-0045, JP y

OSAKA UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

YOSHIDA, TETSUYA;

KIDANI, YUJIRO;

MATSUMOTO, MITSUNOBU;

KANAZAWA, TAKAYUKI;

SHINONOME, SATOMI;

HOJO, KANJI;

OHKURA, NAGANARI;

SAKAGUCHI, SHIMON;

TANAKA, ATSUSHI;

WADA, HISASHI;

KAWASHIMA, ATSUNARI y

NONOMURA, NORIO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 776 926 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

Composición medicinal para tratamiento del cáncer

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para tratamiento de cáncer que comprende un anticuerpo contra CCR8.

Antecedentes de la técnica

Los potentes mecanismos de regulación negativa, incluyendo inmunosupresión, mediados por linfocitos T reguladores (linfocitos Treg) en el microentorno del tumor son importantes obstáculos para el tratamiento de tumores (bibliografía no patente 1).

10 Por ejemplo los linfocitos Treg CD4 positivos que se infiltran en el tumor pueden ser capaces de inhibir fuertemente la respuesta inmune antitumor y pueden convertirse en un importante obstáculo para un tratamiento contra el cáncer eficaz.

15 Se ha demostrado suficientemente la inmunosupresión de tumor mediada por linfocitos Treg FoxP3 positivos CD4 positivos en modelos de tumor animales. Se ha reseñado que el agotamiento de linfocitos Treg sistémico (incluyendo intratumoral) produce un efecto antitumoral, en donde el agotamiento de aproximadamente 50% de linfocitos Treg infiltrantes de tumor no es eficaz (bibliografía no patente 2).

20 Se ha reseñado que el aumento de la relación de linfocitos Treg CD4 positivos CD25 positivos (población celular que incluye linfocitos Treg) con respecto a la población de linfocitos T CD4 positivos total en seres humanos se detecta intratumoralmente en pacientes con diversos cánceres, incluyendo tumores de pulmón, mama y ovario, y la relación de abundancia se correlaciona negativamente con las probabilidades de supervivencia de los pacientes (bibliografías no patente 3 a 8).

25 Se ha confirmado que el agotamiento de linfocitos Treg CD4 positivos CD25 positivos de tumores utilizando un anticuerpo anti-CD25 produce un efecto antitumoral. Sin embargo, este agotamiento no es específico para los linfocitos Treg, ya que CD25 se expresa en la superficie celular de los linfocitos Treg CD4 positivos CD25 positivos, así como linfocitos T efectores recién activados. Asimismo, la administración de un anticuerpo anti-CD25 a ratones produce un efecto antitumoral limitado. Se ha demostrado en diversos modelos de tumor que únicamente la administración de anticuerpo antes de la inoculación de tumor presenta un efecto terapéutico, mientras que la administración del anticuerpo tras el injerto de tumor en ratones raramente produce un efecto terapéutico. El efecto antitumoral se atenuó en el caso de iniciar la administración de un anticuerpo anti-CD25 el día 1 tras el trasplante, y se observó raramente en el caso de iniciar la administración de un anticuerpo anti-CD25 en el día 2 tras el trasplante o más adelante (bibliografía no de patente 9).

35 Hasta la fecha, se han llevado a cabo análisis de la eficacia del fármaco administrando anticuerpos a ratones con el propósito de agotar linfocitos Treg. No obstante, existen pocos informes que demuestren un efecto antitumoral. Por lo tanto, es muy difícil confirmar un efecto terapéutico antitumoral producido por agotamiento de linfocitos Treg mediante la administración de anticuerpo antes de la inoculación (Bibliografía no patente 10).

40 CCR8, anteriormente denominado CY6, CKR-L1 o TER1, es una proteína receptora de quimiocinas CC de transmembrana 7 acoplada a proteína G expresada en el timo, el bazo, etc. Un gen que codifica esta proteína reside en el cromosoma humano 3p21. CCR8 humano consiste en 355 aminoácidos (bibliografía no patente 11). CCL1 es conocido como un ligando endógeno para CCR8 (bibliografía no patente 12). ADNc CCR8 humano está constituido por la secuencia de nucleótidos representada por GenBank ACC No. M_005201.3, y ADNc CCR8 de ratón está constituido por la secuencia de nucleótidos representada por GenBank ACC No. NM_007720.2.

La bibliografía no de patente 13 describe que se reguló positivamente un número de citocinas y genes de receptor de quimiocina, sobre todo de forma notable CCR8, en linfocitos Treg residentes en tumor en comparación con los residentes en tejido normal.

45 La bibliografía de patente 1 describe métodos y composiciones relacionados con el diagnóstico, tratamiento o prevención de cáncer utilizando un agente que interactúa con linfocitos T reguladores infiltrantes de tumor (TITR). Se proporciona ejemplos con anticuerpos anti-CD30 y anticuerpos anti CCR8.

Lista de citas**Bibliografía no patente**

50 [Bibliografía no patente 1]

Nat. Rev. Immunol., 2006, Vol. 6, No. 4, p. 295-307

[Bibliografía no patente 2]

Eur. J. Immunol., 2010, Vol. 40, p. 3325-3335

[Bibliografía no patente 3]

J. Clin. Oncol., 2006, Vol. 24, p. 5373-5380

5 [Bibliografía no patente 4]

Nat. Med., 2004, Vol. 10, p. 942-949

[Bibliografía no patente 5]

J. Clin. Oncol., 2007, Vol. 25, p. 2586-2593

[Bibliografía no patente 6]

10 Cancer, 2006, Vol. 107, p. 2866-2872

[Bibliografía no patente 7]

Eur. J. Cancer, 2008, Vol. 44, p. 1875-1882

[Bibliografía no patente 8]

Cell. Mol. Immunol. 2011, Vol. 8, p. 59-66

15 [Bibliografía no patente 9]

Cancer Res., 1999 Jul 1; Vol. 59, No. 13, p. 3128-33

[Bibliografía no patente 10]

Cancer Res., 2010, Vol. 70, No. 7, p. 2665-74

[Bibliografía no patente 11]

20 J. Immunol., 1996, Vol. 157, No. 7, p. 2759-63

[Bibliografía no patente 12]

J. Biol. Chem., 1997, Vol. 272, No. 28, p. 17251-4

[Bibliografía no patente 13]

Immunity, 2016, 455, p. 1122-1134

25 **[Bibliografía de patente 1]**

Publicación internacional WO 2018/112032

Compendio de la invención

Problema técnico

30 Un objeto de la presente invención es activar la inmunidad inhibiendo la inmunosupresión medida por linfocitos Treg o similares y proporcionar una composición farmacéutica para tratamiento de cáncer a través de este mecanismo.

Solución al problema

35 Los autores de la presente invención han llevado a cabo exhaustivos estudios y, en consecuencia, han completado la presente invención al haber observado que los linfocitos Treg infiltrantes de tumor y las células de macrófago infiltrantes de tumor expresan específicamente CCR8, y la administración de un anticuerpo contra CCR8 disminuye los recuentos celulares de los linfocitos Treg infiltrantes de tumor y las células de macrófago infiltrantes de tumor, e inhibe el crecimiento del tumor.

40 Específicamente, la presente invención proporciona anticuerpos contra CCR8 que tienen actividad ADCC para su uso en un método de tratamiento de un cáncer, tal como se define en las reivindicaciones. La invención proporciona asimismo: anticuerpos anti-PD-1 o anticuerpos anti-PD-L1 para su uso en combinación con anticuerpos anti-CCR8 de la invención; medicamentos para su uso en tratamiento de cáncer; combinaciones de un anticuerpo anti-CCR8 de la

invención y un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1 para su uso en métodos de tratamiento de cáncer; todo tal como se define en las reivindicaciones.

Efectos ventajosos de la invención

5 Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la presente invención es muy útil farmacéuticamente para el tratamiento de cánceres.

Breve descripción de los dibujos

10 [Figura 1] La Figura 1 muestra los resultados de análisis FACS en linfocitos T CD3+ CD4+ infiltrantes de tumor de cáncer de riñón. Se tiñeron una molécula CD25 y una molécula FoxP3 cada una de ellas con un anticuerpo y se evaluaron en cuanto a sus índices de expresión. Se observó que las células que expresaban CD25 expresaban también FoxP3.

15 [Figura 2] La Figura 2 muestra los resultados del análisis de citometría de flujo en la intensidad de expresión de CD45RA y CD25 en células mononucleares de sangre periférica (en adelante, se hace referencia a ellas como PBMC) del mismo paciente. Se fraccionaron linfocitos T CD3+ CD4+ en 6 fracciones (Fr1 a Fr6) tal como se muestra en el dibujo, según los niveles de expresión CD45RA y CD25 y se recuperaron células de cada fracción utilizando un clasificador. Los valores numéricos representan la relación de abundancia celular (%) de cada fracción. En este caso, las fracciones de Treg son Fr1 y Fr2.

20 [Figura 3] La Figura 3 muestra los resultados de análisis de citometría de flujo en la Intensidad de expresión de CD45RA y CD25 en células infiltrantes de tumor de cáncer de riñón. Se fraccionaron linfocitos T CD3+ CD4+ infiltrantes de tumor en 4 fracciones (Fr2 a Fr5) tal como se muestra en el dibujo según los niveles de expresión de CD45RA y CD25 y se recuperaron células de cada fracción utilizando un clasificador. Los valores numéricos representan la relación de abundancia celular (%) de cada fracción.

25 [Figura 4] La Figura 4 muestra los resultados de la realización de análisis ARN-Seq de células en cada una de las fracciones de las Figuras 2 y 3 y el estudio de si cualquiera de estas fracciones contenía linfocitos Treg en función de los niveles de expresión de ARNm de genes FoxP3 e IKZF2 expresados específicos de Treg. Las ordenadas representan un nivel de expresión de ARNm relativo tras la normalización. Se observó la fuerte expresión intratumoral de ambos genes en Fr2 y Fr3. La fuerte expresión de IL-2 o IFN γ , que se expresa en células efectoras, se observó en Fr4 y Fr5.

30 [Figura 5] La Figura 5 muestra los resultados del análisis en una región de desmetilación específica de Treg (chrX, 49118000-49118500, hg19) en un locus de gen FoxP3 en cada fracción. Se observó que la mayoría de los linfocitos T CD3+ CD4+infiltrantes de tumor en las fracciones Fr2 y Fr3 eran linfocitos Treg.

[Figura 6] La Figura 6 muestra los resultados del análisis del nivel de expresión de ARNm de CCR8 en cada fracción de la misma manera que en la Figura 4. Las fracciones de linfocitos Treg infiltrantes de tumor Fr2 y Fr3 presentaron la fuerte expresión de CCR8, en donde la expresión se observó raramente en linfocitos Treg en células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

35 [Figura 7] La Figura 7 muestra los resultados de análisis de citometría de flujo en células HEK293 que expresan CCR8 de ratón. Se transfectaron células HEK293 con un vector de expresión pcDNA3.4 que tenía un inserto del gen CCR8 de ratón y seleccionado con fármaco utilizando G418. En cuanto al grado de expresión de CCR8 de ratón, se confirmó la expresión con un anticuerpo de CCR8 anti-ratón marcado con PE. Se utilizaron células HEK293 transfectadas con un vector pcDNA3.4 vector y seleccionadas del mismo modo que se ha mencionado como control negativo. Se observó que casi todas las células expresaban CCR8 de ratón.

[Figura 8] La Figura 8 muestra que un anticuerpo de CCR8 anti-ratón (SA214G2) tiene la capacidad de activar una ruta de señalización necesaria para citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC).

[Figura 9] La Figura 9 muestra que el anticuerpo de CCR8 anti-ratón (SA214G2) tiene actividad ADCC.

45 [Figura 10] La Figura 10 muestra que el anticuerpo de CCR8 anti-ratón (SA214G2) tiene actividad de inhibición del influjo de calcio intracelular mediada por CCR8. Se utilizó un anticuerpo de control de isotipo como control negativo.

[Figura 11] La Figura 11 muestra que el anticuerpo de CCR8 anti-ratón (SA214G2) no reconoce células CT26. Se utilizó un anticuerpo de control de isotipo como control negativo.

50 [Figura 12] La Figura 12 muestra los resultados de la administración de un anticuerpo de control el día 3 tras el trasplante a tres ratones BALB/c en los que se habían trasplantado células CT26 de línea celular de cáncer colorrectal de ratón, la extirpación de los tumores los días 4 o 7 tras la administración y el análisis de la proporción de linfocitos Treg presentes en ellos utilizando citometría de flujo.

[Figura 13] La Figura 13 muestra los resultados del análisis de la proporción de linfocitos Treg CCR8+ utilizando un citómetro de flujo en el mismo experimento que en la Figura 12.

5 [Figura 14] La Figura 14 muestra los resultados del análisis de la proporción de células CCR8-positivas en células de macrófago CD11b+ Gr1+ CD206+ M2 intratumorales utilizando un citómetro de flujo. En ambos casos, se observó que del 40 al 50% de las células eran células de macrófago M2 CCR8 positivas.

[Figura 15] La Figura 15 muestra el flujo de un experimento de administración del anticuerpo de CCR8 anti-ratón (SA214G2) o un anticuerpo de control de isotipo el día 3 tras el trasplante a ratones BALB/c en los que se habían trasplantado células CT26 de línea celular de cáncer colorrectal, extirpando los tumores el día 7 o 10 tras el trasplante y examinando las relaciones de abundancia de linfocitos T y las células de macrófago presentes en ellos.

10 [Figura 16] La Figura 16 muestra la relación entre células CD25+ FoxP3+ y células CD45+ CD4+ el día 7 tras el trasplante (d7) o 10 (d10).

[Figura 17] La Figura 17 muestra la proporción de células de macrófago CD11b+ F4/80+ el día 7 tras el trasplante (d7).

[Figura 18] La Figura 18 muestra la relación de abundancia de células IA/IE-positivas (IA/IE+) o IA/IE-negativas (IA/IE-) el día 7 tras el trasplante (d7).

15 [Figura 19] La Figura 19 muestra el flujo de un experimento de administración del anticuerpo de CCR8 anti-ratón (SA214G2) o un anticuerpo de control de isotipo (anti-KLH de rata) en una sola dosis de 400 µg/ratón el día 3 tras el trasplante (d3) a ratones BALB/c en los que se trasplantaron células CT26 de línea celular de cáncer colorrectal y midiendo un tamaño de tumor cada 3 o 4 días desde el día 7 tras el trasplante (d7) hasta el día 21 (d21).

20 [Figura 20] La Figura 20 muestra los resultados de la medición del tamaño de tumor sólido de cada individuo tras la inoculación y el cálculo del volumen de tumor.

[Figura 21] La Figura 21 muestra el volumen de tumor medio de cada grupo de ratones en cada punto en el tiempo tras la inoculación. Se muestra también la desviación típica. El nivel de significación *** representa $p < 0,001$, y el nivel de significación ** representa $p < 0,01$ (prueba-t).

25 [Figura 22] Se trasplantaron 2×10^5 células Colon26 de línea celular de cáncer colorrectal por vía intracutánea en el dorso de cada uno de los ratones BALB/c. El día 3 tras el trasplante (d3) se administró un anticuerpo de CCR8 anti-ratón (SA214G2) o un anticuerpo de control de isotipo en una sola dosis de 400 µg/ratón. Se midió un volumen de tumor cada 3 a 4 días el día 3 tras el trasplante (d3) hasta el día 18 (d18). Se muestra el volumen de tumor medio de cada grupo en cada punto en el tiempo tras la inoculación.

30 [Figura 23] El gráfico muestra la intensidad de fluorescencia media (IFM) de cada individuo en el análisis FACS. Las líneas horizontales centrales representan la IFM media de 14 casos y las líneas verticales representan las desviaciones típicas. El nivel de significación *** representa $P < 0,001$.

35 [Figura 24] La Figura 24 muestra un gráfico basado en el individuo de la relación de células que presentaron señales CCR8 positivas (porcentaje de positividad) igual o superior al nivel de fondo obtenido en un anticuerpo de control de isotipo, para linfocitos T CD3+ CD4+ FoxP3+ o linfocitos T CD3+ CD4+ FoxP3- dentro de tumores de cáncer de riñón humano de 14 casos. Las líneas horizontales centrales representan el porcentaje medio de positividad de los 14 casos, y las líneas verticales representan las desviaciones típicas.

40 [Figura 25] La Figura 25 muestra una curva de Kaplan-Meier en cuanto a la probabilidad de supervivencia de cada grupo obtenida dividiendo a partes iguales los pacientes con carcinoma de célula renal de célula clara en 2 grupos con alta expresión (Alta) y con baja expresión (baja) en función de los niveles de expresión de ARNm de CCR8 de células intratumorales a través del uso de la base de datos del Atlas de Genoma de Cáncer (TCGA). Las ordenadas representan la probabilidad de supervivencia y las abscisas representan el número de meses. Los valores numéricos representan el número de individuos en cada grupo. El valor P representa el valor del ensayo log-rango.

[Figura 26] La Figura 26 muestra los resultados del análisis de pacientes de cáncer de próstata del mismo modo que en la Figura 25.

45 [Figura 27] La Figura 27 muestra los resultados del análisis de pacientes con cáncer de vejiga del mismo modo que en la Figura 25.

[Figura 28] La Figura 28 muestra que el anticuerpo de CCR8 anti-ratón no reconoce ni células MethA ni células LM8, como en la Figura 11. Se utilizó un anticuerpo de control de isotipo (Isotipo) como control negativo.

50 [Figura 29] Se trasplantaron por vía intracutánea 3×10^5 células LM8 de línea celular de osteosarcoma en el dorso de cada uno de los ratones C3H/He. El día 3 tras el trasplante (d3), se administró anticuerpo de CCR8 anti-ratón (SA214G2) o un anticuerpo de control de isotipo (anticuerpo de control) en una sola dosis de 400 µg/ratón. Se midió un volumen de tumor cada 3 o 4 días desde los días 7 a 35 tras la inoculación de tumor. Se muestra el volumen de

tumor medio de cada grupo en cada punto en el tiempo tras la inoculación. Se muestra también una desviación típica. El nivel de significación *** representa $p < 0,001$, el nivel de significación ** representa $p < 0,01$, y el nivel de significación * representa $p < 0,05$ (prueba-t).

- 5 [Figura 30] se trasplantaron por vía intracutánea 1×10^5 células MethA en el dorso de cada uno de los ratones Balb/c. El día 3 tras el trasplante, se administró anticuerpo de CCR8 anti-ratón (SA214G2) o un anticuerpo de control de isotipo (anticuerpo de control) a una sola dosis de 400 $\mu\text{g}/\text{mouse}$. Se midió un volumen de tumor cada 3 o 4 días desde los días 11 a 21 tras la inoculación de tumor. Se muestra el volumen de tumor medio de cada grupo en cada punto en el tiempo tras la inoculación. El nivel significación * representa $p < 0,05$ (prueba-t).
- 10 [Figura 31] Se trasplantaron por vía intracutánea 1×10^5 células EMT6 de línea celular de cáncer de mama en el dorso de cada uno de los ratones Balb/c. Los días 3 y 10 tras la inoculación, se administraron 100 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de anticuerpo de CCR8 anti-ratón (SA214G2) o un anticuerpo de control de isotipo (anticuerpo de control). Se midió un volumen de tumor cada 3 o 4 días desde los días 4 a 22 tras la inoculación de tumor. Se muestra el volumen de tumor medio de cada grupo en cada punto en el tiempo tras la inoculación. El nivel de significación *** representa $p < 0,001$, el nivel de significación ** representa $p < 0,01$ (prueba-t).
- 15 [Figura 32] Se trasplantaron 2×10^5 células Colon26 de línea celular colorrectal en el dorso de cada uno de los ratones Balb/c. Los días 3 y 10 tras la inoculación, se administró un anticuerpo de control de isotipo (anticuerpo isotipo), el anticuerpo de CCR8 anti-ratón (SA214G2) o un anticuerpo anti-PD-1 (RMP1-14) a 400 $\mu\text{g}/\text{mouse}$. Se midió un volumen de tumor cada 3 o 4 días desde los días 3 a 24 tras la inoculación de tumor. Se muestra el volumen de tumor medio de cada grupo en cada punto en el tiempo tras la inoculación.
- 20 [Figura 33] Se trasplantaron por vía intracutánea 4×10^5 células RAG de línea celular derivada de cáncer de riñón de ratón en el dorso de cada uno de los ratones BALB/c. 6 días después de la inoculación de tumor, se les administraron por vía intraperitoneal 100 μg (100 μL) de un anticuerpo de control de isotipo, el anticuerpo de CCR8 anti-ratón o un anticuerpo PD-1 anti-ratón (anticuerpo anti-PD-1). Se midió un volumen de tumor cada 3 o 4 días desde los días 6 a 21 tras la inoculación de tumor. Se muestra el volumen de tumor medio de cada grupo en cada punto en el tiempo tras la inoculación.
- 25 [Figura 34] Se trasplantaron por vía intracutánea 2×10^5 células Colon26 de línea celular de cáncer colorrectal en el dorso de cada uno de los ratones BALB/c. Los días 3 y 10 tras la inoculación de tumor, se administraron el anticuerpo de CCR8 anti-ratón (SA214G2) o un anticuerpo de control de isotipo (anticuerpo de control) en 400 $\mu\text{g}/\text{ratón}$. 24 días tras la inoculación del tumor, se recuperó cada órgano del ratón y se midió su peso. Se muestra la media de 10 casos en cada grupo.
- 30 [Figura 35] Se trasplantaron por vía intracutánea 1×10^5 células EMT6 de línea celular de cáncer de mama de ratón en el dorso de cada uno de los ratones BALB/c. Se les administró por vía intravenosa anticuerpo de CCR8 anti-ratón los días 3 y 10 tras la inoculación de tumor y un anticuerpo PD-1 anti-ratón por vía intravenosa los días 8 y 13 tras la inoculación de tumor. Se administró por vía intravenosa un anticuerpo de control de isotipo a un grupo de control los días 3 y 10 tras la inoculación de tumor. Se midió el volumen de tumor cada 3 a 4 días desde los días 6 a 27 tras la inoculación. Se muestra el volumen de tumor medio de cada grupo en cada punto en el tiempo tras la inoculación.
- 35 [Figura 36] La Figura 36 muestra la proporción de un individuo portador de tumor superior a 50 mm^3 o inferior en cada punto en el tiempo tras la inoculación en cada grupo en el mismo experimento que la Figura 35.
- 40 [Figura 37] Se trasplantaron por vía intracutánea $4,5 \times 10^5$ células RAG de línea celular derivada de cáncer de riñón de ratón en el dorso de cada uno de los ratones BALB/c. 8 y 15 días tras la inoculación, se administraron por vía intravenosa 100 μL de solución salina fisiológica, anticuerpo de CCR8 anti-ratón o un anticuerpo PD-1 anti-ratón, o el anticuerpo de CCR8 anti-ratón y el anticuerpo PD-1 anti-ratón. Se midió un volumen de tumor cada 3 a 4 días desde los días 8 a 33 tras la inoculación de tumor. Se muestra el volumen de tumor medio de cada grupo en cada punto en el tiempo tras la inoculación.
- 45 [Figura 38] Se trasplantaron por vía intracutánea 2×10^5 células CT26 en el dorso de cada ratón de tipo silvestre o ratón con deficiencia homocigótica del gen CCR8 h del linaje Balb/c ($N = 5$). Tras la inoculación, se administró por vía intravenosa un anticuerpo de control de isotipo o el anticuerpo de CCR8 anti-ratón. Se midió un volumen de tumor cada 3 a 4 días tras la inoculación de tumor. El diagrama de la izquierda muestra el volumen de tumor medio del ratón de tipo silvestre en cada grupo en cada punto en el tiempo tras la inoculación y el diagrama de la derecha muestra el volumen de tumor medio de los ratones con deficiencia homocigótica del gen CCR8 en cada grupo en cada punto en el tiempo tras la inoculación.
- 50

Descripción de las realizaciones

La composición farmacéutica de la presente invención comprende un anticuerpo contra CCR8 tal como se define en las reivindicaciones.

5 El CCR8 de la presente invención incluye los derivados de ratones, ratas, hámsters, cobayas, perros, cerdos y mamíferos primates incluyendo monos y seres humanos. Se prefiere CCR8 humano.

10 El anticuerpo contra CCR8 puede ser cualquiera entre un anticuerpo derivado de ser humano, un anticuerpo derivado de ratón, un anticuerpo derivado de rata, un anticuerpo derivado de conejo y un anticuerpo derivado de cabra, siempre y cuando el anticuerpo se una a CCR8. El anticuerpo contra CCR8 puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal del mismo y puede ser cualquiera entre un anticuerpo completo, un fragmento de anticuerpo (p.ej., un fragmento F(ab')₂, Fab', Fab o Fv), un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano completo. Se prefiere un anticuerpo derivado de ser humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano completo.

15 El anticuerpo de la presente invención se puede producir según un método de producción de anticuerpo o antisuero conocido en la técnica utilizando una proteína de longitud completa o una proteína parcial de CCR8 como antígeno. Deseablemente, el anticuerpo de la presente invención se une a CCR8 expresado en la superficie de la célula. Por lo tanto, la proteína parcial es deseablemente una región extracelular de CCR8. Estos antígenos pueden prepararse a través de métodos de expresión y purificación de proteína conocidos en la técnica.

Entre los ejemplos de antígenos, distintos a los descritos anteriormente, adecuados para la preparación del anticuerpo contra CCR8 se incluyen células forzadas a expresar CCR8 a través de un vector de expresión o similar, vectores de plásmido de expresión de CCR8 y vectores de virus de expresión de CCR8 (vectores de adenovirus, etc.).

20 El anticuerpo policlonal se puede producir a través de un método conocido en la técnica. El anticuerpo policlonal se puede producir por ejemplo por inmunización de un animal apropiado con una proteína antigénica o una mezcla de las mismas con una proteína portadora y recogiendo un producto que contiene un anticuerpo contra la proteína antigénica del animal inmunizado, seguido de la separación y purificación del anticuerpo. Entre los ejemplos de animales utilizados se incluyen generalmente ratones, ratas, ovejas, cabras, conejos y cobayas. Para potenciar la capacidad para producir anticuerpos, se puede administrar un adyuvante de Freund o un adyuvante de Freund incompleto junto con la proteína antigénica. En general, la administración se lleva a cabo un total de aproximadamente 3 a 10 veces, normalmente una vez cada aproximadamente 2 semanas. El anticuerpo policlonal puede recogerse de la sangre, fluido ascítico, o similares del animal inmunizado a través del método descrito. Se puede medir una titulación de anticuerpo policlonal en antisuero mediante ELISA. La separación y purificación del anticuerpo policlonal se puede llevar a cabo según un método de separación de inmunoglobulina y purificación, por ejemplo, un método de purificación utilizando una fase sólida de unión a antígeno o un absorbente activo como proteína A o proteína G, un método de precipitación de proteínas por adición de sal, un método de precipitación con alcohol, un método de precipitación isoelectrónica, electroforesis, un método de adsorción y desorción utilizando un intercambiador iónico, un método de ultracentrifugación o un método de filtración.

35 El anticuerpo monoclonal se puede preparar a través de un método de producción general conocido. Específicamente, se inmunosensibiliza a un mamífero, preferiblemente un ratón, una rata, un hámster, una cobaya, o un conejo con el antígeno de la presente invención, si es necesario junto con adyuvante de Freund por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa, a través de la almohadilla de la pata o intraperitoneal de una a varias veces. Normalmente, la inmunización se realiza de una a 4 veces cada aproximadamente 1 a 21 días desde la inmunización inicial y se pueden obtener células que producen anticuerpos del mamífero inmunosensibilizado 1 a 10 días después de la inmunización final. El número de inmunizaciones y el intervalo de tiempo pueden cambiarse apropiadamente según las propiedades, etc., del inmunógeno utilizado.

45 Se pueden preparar hibridomas que secretan el anticuerpo monoclonal según el método de Kohler y Milstein (Nature, 1975, vol. 256, p. 495-497) y un método equivalente a éste. Específicamente, se pueden preparar los hibridomas por fusión celular de células que producen anticuerpo contenidas en el bazo, el ganglio linfático, la médula ósea o las anginas, etc., preferiblemente, el bazo, obtenidos de un mamífero inmunosensibilizado tal como se ha mencionado, preferiblemente con células de mieloma derivadas de ratón, rata, cobaya, hámster, conejo o mamífero (p.ej., ser humano), más preferiblemente, derivadas de ratón, rata o ser humano que carecen de la capacidad para producir anticuerpos análogos.

50 En general, se puede utilizar una línea celular establecida obtenida de ratones, por ejemplo, P3-U1, NS-1, SP-2, 653, X63 o AP-1, como las células de mieloma para su uso en la fusión de células.

55 Se rastrea un clon de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal cultivando los hibridomas, por ejemplo, en una placa de microtitulación, midiendo la reactividad de un sobrenadante de cultivo en un pocillo donde se observa el crecimiento, utilizándose el antígeno de la presente invención en la inmunosensibilización de ratón mencionada a través de un método de medición como RIA, ELISA o FACS, y seleccionado un clon que produce el anticuerpo monoclonal que presenta la unión específica a antígeno o hapteno. Normalmente, se utiliza además un método que implica la inmovilización del antígeno en una fase sólida y la detección de un anticuerpo en un sobrenadante de cultivo

- que se une al mismo utilizando un anticuerpo secundario marcado con un material radiactivo, un material fluorescente, una enzima, o similar. En el caso de utilizar células que expresan antígeno, se añade el sobrenadante de cultivo de hibridoma a las células y después se puede hacer reaccionar con él un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente, seguido de la medición de la intensidad de fluorescencia de las células utilizando un aparato de detección de fluorescencia, como citómetro de flujo para detectar un anticuerpo monoclonal capaz de unirse al antígeno de la presente invención sobre las membranas de las células.
- El anticuerpo monoclonal se puede producir a partir del hibridoma seleccionado cultivando el hibridoma *in vitro* o cultivando el hibridoma en el fluido ascítico, o similar, de un ratón, una rata, una cobaya, un hámster o un conejo, etc., preferiblemente, un ratón o una rata, más preferiblemente, un ratón y aislando el anticuerpo monoclonal del sobrenadante de cultivo obtenido o el fluido ascítico del mamífero. Para el cultivo *in vitro*, se cultiva el hibridoma, se mantiene y se conserva con arreglo a diversas condiciones, como puedan ser las características del tipo de célula que se vaya a cultivar, el propósito del análisis y la investigación y el método de cultivo y puede cultivarse utilizando un medio nutriente conocido, tal como se utiliza para producir anticuerpos monoclonales en un sobrenadante de cultivo o todos los medios nutrientes inducidos y preparados a partir de un medio basal conocido.
- Entre los ejemplos de medio basal se incluyen medios con bajo contenido en calcio como medio Ham' F12, medio MCDB153 y medio MEM con bajo contenido en calcio, y medios con alto contenido en calcio como medio MCDB104, medio MEM, medio D-MEM, medio RPMI1640, medio ASF104 y medio RD. El medio basal puede contener, por ejemplo, suero, hormona, citocina y/o diversas sustancias inorgánicas u orgánicas, según el propósito.
- El anticuerpo monoclonal puede aislarse y purificarse, por ejemplo, sometiendo el sobrenadante de cultivo o el fluido ascítico mencionados a cromatografía de intercambio iónico con sulfato de amonio saturado, (DEAE o DE52, etc.) o cromatografía de columna de afinidad utilizando una columna anti-inmunoglobulina, una columna de proteína A o similar.
- Se puede utilizar un anticuerpo recombinante obtenido por clonación de un gen de anticuerpo a partir de células que producen anticuerpo, por ejemplo, hibridomas, integrando el gen de anticuerpo en un vector apropiado y transfectando un hospedador con este vector, seguido de la producción mediante el uso de una técnica de recombinación genética como el anticuerpo de la presente invención (p.ej. Carl et al., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTICUERPOS, publicado en 1990).
- Específicamente, se aísla el ARNm que codifica la región variable (región V) del anticuerpo desde hibridomas que producen el anticuerpo de interés o inmunocitos que producen el anticuerpo, por ejemplo, células de linfocitos sensibilizados inmortalizados con un oncogén, o similar. Para el aislamiento de ARNm, se prepara ARN total a través de un método conocido en la técnica, como por ejemplo, un método de ultracentrifugación con guanidina (Chirgwin, J.M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299), y se prepara el ARNm utilizando un equipo de reactivos de purificación de ARNm (fabricado por Pharmacia Inc.) o similar.
- Se sintetiza el ADNc de la región V del anticuerpo a partir del ARNm obtenido utilizando transcriptasa inversa. La síntesis de ADNc se puede llevar a cabo utilizando el equipo de reactivos de Síntesis de ADNc de primera cadena de Transcriptasa Inversa AMV o similar. Se puede utilizar para la síntesis de ADNc y amplificación el equipo de reactivos 5'-Ampli FINDER RACE (fabricado por Clontech Laboratories, Inc) y 5'-RACE basado en PCR (Frohman, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, Vol. 85, p. 8998, etc.). Se purifica el fragmento de ADN de interés a partir del producto de PCR obtenido y se liga con el ADN de vector. Se prepara además un vector recombinante del mismo. Se transfecta *E. coli* o similar con el vector recombinante y se selecciona una colona para preparar el vector recombinante deseado. La secuencia de nucleótidos del ADN de interés se confirma a través de un método conocido en la técnica, por ejemplo, método desoxi.
- Siempre y cuando se obtenga con éxito el ADN que codifica la región V del anticuerpo de interés, se liga este ADN a ADN que codifica la región C constante de anticuerpo (región C) y se integra el resultante en un vector de expresión. Alternativamente, se puede integrar el ADN que codifica la región V del anticuerpo en un vector de expresión que contiene el ADN de la región C del anticuerpo. Para producir el anticuerpo utilizado en la presente invención, se integra el gen de anticuerpo en un vector de expresión, de tal modo que el gen de anticuerpo se exprese bajo el control de una región de control de expresión, por ejemplo potenciador/promotor. A continuación, se pueden transformar las células hospedadoras con este vector de expresión para expresar el anticuerpo.
- Para la expresión del gen de anticuerpo, se puede integrar por separado el ADN que codifica la cadena pesada (cadena H) y el ADN que codifica la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo en vectores de expresión, con los cuales se cotransforma un hospedador, o se puede integrar el ADN que codifica la cadena H y el ADN que codifica la cadena L en un solo vector de expresión, con el cual se transforma un hospedador (véase la publicación internacional WO94/11523).
- Se puede utilizar también lo que se conoce como técnica de despliegue de fagos (Nature Biotechnology 23, 1105 (2005)) como método, aparte de los que se han descrito, para preparar el anticuerpo de la presente invención. Específicamente, por ejemplo, se despliega una genoteca de anticuerpos preparada a través de un método conocido en la técnica utilizando linfocitos B humanos o animales (p.ej., conejo, ratón, rata o hámster) como material o una

genoteca de anticuerpos completamente sintetizada por selección e ingeniería a partir de una secuencia de línea de gérmenes humanos o animales, por ejemplo, en bacteriófagos, *E. coli*, levadura o superficie de células animales o liposomas. A este respecto, entre los ejemplos de la forma del anticuerpo para su despliegue en la superficie de la célula se incluyen moléculas IgG, moléculas IgM, fragmentos Fab y fragmentos Fv monocatenarios (scFv).

5 El gen del fragmento de anticuerpo así obtenido puede combinarse con una región correspondiente de un gen de anticuerpo IgG a través de un método conocido en la técnica para obtener un gen de anticuerpo. A continuación, se puede integrar el gen así obtenido en un vector apropiado con el que se transfecta un hospedador, seguido de la producción del anticuerpo mediante el uso de una técnica de recombinación genética (p.ej., Carl et al., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTICUERPOS, publicado en 1990).

10 El anticuerpo de la presente invención incluye anticuerpos obtenidos artificialmente por ingeniería con el propósito, por ejemplo, de reducir xenoantigenicidad contra seres humanos, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos completos.

15 El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo conjugado en el que se une el anticuerpo con cualquiera entre varias moléculas, tales como polietilenglicol (PEG), sustancias radiactivas, toxinas y cadenas de azúcar. Dicho anticuerpo conjugado puede obtenerse modificando químicamente el anticuerpo obtenido. El método para modificar el anticuerpo ha sido establecido ya en la técnica. El anticuerpo según la presente invención también abarca estos anticuerpos conjugados.

20 El anticuerpo de la presente invención abarca un anticuerpo que tiene una región Fc unida con cadenas de azúcar ligadas a N-glucósido que están desprovistas de una fucosa unida con N-acetilglucosamina en sus términos reductores. Entre los ejemplos del anticuerpo que tiene una región Fc unida con cadenas de azúcar unidas a N-glucósido que están desprovistas de una fucosa unida a N-acetilglucosamina en sus términos reductores se incluyen anticuerpos preparados mediante el uso de células CHO deficientes en gen α 1,6-fucosiltransferasa (Publicaciones internacionales Nos. WO 2005/035586 y WO 02/31140). El anticuerpo de la presente invención que tiene una región Fc unida a cadenas de azúcar ligadas a N-glucósido que están desprovistas de una fucosa unida con N-acetilglucosamina en sus términos reductores tiene alta actividad ADCC.

25 El anticuerpo de la presente invención se puede fusionar en su término N o término C con una proteína adicional (Clinical Cancer Research, 2004, 10, 1274-1281). Los especialistas en la materia pueden seleccionar apropiadamente la proteína para su fusión.

30 El fragmento de anticuerpo es una porción del anticuerpo de la presente invención antes mencionado y significa un fragmento que tiene actividad de unión específica de CCR8 como en el anticuerpo. Entre los ejemplos de fragmento de anticuerpo se pueden incluir específicamente Fab, F(ab')₂, Fab', anticuerpo monocatenario (scFv), anticuerpo estabilizado con disulfuro (dsFv), fragmento de región V dimerizado (diacuerpo) y péptidos que contienen CDR- (Expert Opinion on Therapeutic Patents, Vol. 6, No. 5, p. 441-456, 1996).

35 Alternativamente, el anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo biespecífico que tiene dos determinantes antigénicos diferentes y se une a diferentes antígenos.

40 La actividad ADCC (citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo) significa actividad *in vivo* de células de tumor dañinas, o similar, activando células efectoras a través de la unión de la región Fc del anticuerpo unido con un antígeno de superficie celular, o similar, sobre las células de tumor o similar a un receptor Fc presente en la superficie de célula efectora. Entre los ejemplos de células efectoras se incluyen linfocitos citolíticos naturales y macrófagos activados.

El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo que tiene actividad ADCC contra células que expresan CCR8 ya que este anticuerpo puede agotar linfocitos Treg o células de macrófago. Ya tenga o no dicha actividad ADCC un anticuerpo, se puede medir por ejemplo a través de un método descrito en los ejemplos mencionados más adelante.

45 El anticuerpo contra CCR8 de la presente invención es un anticuerpo neutralizante de CCR8. El anticuerpo neutralizante de CCR8 significa un anticuerpo que tiene actividad de neutralización contra CCR8. Ya tenga o no un anticuerpo actividad neutralizante contra CCR8, se puede determinar midiendo la presencia o ausencia de supresión del efecto fisiológico de CCL1 sobre CCR8. Entre sus ejemplos se incluyen, pero no se limitan a, la medición de la unión de CCL1 a CCR8, la migración de células que expresan CCR8 mediante CCL1, el aumento del nivel de Ca⁺⁺ intracelular mediante CCL1 y la variación de la expresión de un gen sensible a estimulación con CCL1. Esto se puede determinar a través del método descrito en los ejemplos mencionados más adelante.

El anticuerpo contra CCR8 de la presente invención tiene preferiblemente un efecto de agotar los linfocitos Treg infiltrantes de tumor. Ya tenga o no el anticuerpo de la presente invención el efecto de agotar linfocitos Treg infiltrantes de tumor, se puede determinar por ejemplo a través del método descrito en los ejemplos mencionados más adelante.

55 El anticuerpo contra CCR8 de la presente invención preferiblemente tiene un efecto de agotar las células de macrófago infiltrantes de tumor. Ya tenga o no el anticuerpo de la presente invención el efecto de agotar células de macrófago

infiltrantes de tumor, se puede determinar por ejemplo a través del método descrito en los ejemplos mencionados más adelante.

5 El anticuerpo de la presente invención es útil como composición farmacéutica. Siendo así, la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la presente invención se puede administrar por vía oral o parenteral y sistémica o localmente. Por ejemplo, se puede seleccionar como administración parenteral una inyección intravenosa como infusión, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, administración transnasal o inhalación.

10 El "cáncer" para la "composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer" de la presente invención incluye todos los cánceres sólidos y cánceres de la sangre. Específicamente, entre sus ejemplos se incluyen cáncer de mama, cáncer del cuerpo uterino, cáncer del cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago (adenocarcinoma gástrico), cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de bazo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer esofágico, cáncer de vejiga, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, linfoma no-Hodgkin, cáncer urotelial, sarcoma, carcinoma de células sanguíneas (leucemia, linfoma, etc.), carcinoma del conducto biliar, carcinoma de la vesícula biliar, carcinoma de tiroides, cáncer de próstata, carcinoma testicular, carcinoma tímico y hepatocarcinoma. Preferiblemente, entre sus ejemplos se incluyen cáncer de mama, cáncer del cuerpo uterino, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de riñón y sarcoma y, más preferiblemente, entre sus ejemplos se incluyen cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón y sarcoma.

15 El "cáncer" para la "composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer" de la presente invención es preferiblemente un cáncer que expresa un antígeno específico de tumor.

20 El "cáncer" descrito en la presente memoria descriptiva significa no solamente tumores malignos epiteliales, como cáncer de ovario y cáncer de estómago, sino también tumores malignos no epiteliales, incluyendo cánceres hematopoyéticos, como leucemia linfocítica crónica y linfoma de Hodgkin. En la presente memoria descriptiva, pueden utilizarse indistintamente términos como "cáncer", "carcinoma", "tumor" y "neoplasma" unos con otros sin diferenciarse entre ellos.

25 El anticuerpo contra CCR8 de la presente invención puede administrarse como fármaco concomitante en combinación con un fármaco adicional para:

(1) complementar y/o potenciar el efecto terapéutico de la composición farmacéutica de la presente invención.

(2) mejorar la farmacocinética y la absorción de la composición farmacéutica de la presente invención y reducir su dosis, y/o

30 (3) reducir la reacción adversa de la composición farmacéutica de la presente invención.

35 Es posible administrar el fármaco concomitante del anticuerpo contra CCR8 de la presente invención y un fármaco adicional en forma de un fármaco de combinación que contiene los ingredientes en una preparación o se puede administrar en forma de preparaciones por separado. Esta administración como preparaciones por separado incluye la administración simultánea y administración escalonada. Para la administración escalonada, se puede administrar primero el anticuerpo de la presente invención y administrarse después el fármaco adicional, o se puede administrar primero el fármaco adicional y administrarse después el compuesto de la presente invención. Los métodos de administración correspondientes pueden ser iguales o diferentes.

40 Entre los ejemplos del fármaco adicional que se puede utilizar en combinación con el anticuerpo contra CCR8 de la presente invención se incluyen anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 y anticuerpos anti-CTLA-4. Se prefiere un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1 y es más preferible un anticuerpo anti-PD-1.

En la presente invención, entre los ejemplos de anticuerpo anti-PD-1 se incluyen nivolumab y pembrolizumab.

En la presente invención, entre los ejemplos de anticuerpo anti-PD-L1 se incluyen atezolizumab, avelumab y durvalumab.

45 En la presente invención, entre los ejemplos de anticuerpo anti-CTLA-4 se incluye ipilimumab.

50 Se espera que el paciente objeto de la composición farmacéutica de la presente invención sea un paciente de cáncer o un paciente del que se sospecha que tiene cáncer. La dosis eficaz se selecciona en el intervalo de 0,01 mg a 100 mg por kg de peso corporal por dosis. Alternativamente, se puede seleccionar la dosis entre 5 y 5000 mg, preferiblemente de 10 a 500 mg, por paciente. Sin embargo, la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la presente invención o un fragmento de anticuerpo de la misma no está limitada a estas dosis. Asimismo, el período de dosificación puede seleccionarse apropiadamente según la edad y los síntomas del paciente. La composición farmacéutica de la presente invención puede contener además un vehículo o aditivo farmacéuticamente aceptable dependiendo de la ruta de administración. Entre los ejemplos de dicho vehículo o aditivo se incluyen agua, disolventes

orgánicos farmacéuticamente aceptables, colágeno, polialcohol vinílico, polivinilpirrolidona, alginato de sodio, dextrano hidrosoluble, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, caseína, diglicerina, propilenglicol, polietilenglicol, vaselina, albúmina de suero humano (HSA), manitol, sorbitol, lactosa y tensioactivos aceptables como aditivos farmacéuticos. El aditivo utilizado se selecciona apropiadamente o en combinación entre los que se han descrito según la forma de dosificación, si bien el aditivo no está limitado a ellos.

A continuación, se describirá la presente invención específicamente haciendo referencia a ejemplos. Sin embargo, la presente invención no queda limitada con los ejemplos que se dan a continuación. Se aplicaron los métodos descritos en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory) como enfoques de manipulación genética a no ser que se especifique lo contrario.

[Ejemplo 1]

Extracción y análisis de PBMC y células infiltrantes de tumor de cáncer de riñón

Se llevó a cabo el siguiente análisis utilizando una porción de tejidos de tumor primario extirpados por tratamiento quirúrgico de pacientes con carcinoma de célula renal de célula clara (ccRCC) (3 casos) que no habían sido tratados pre-operativamente con ningún agente anticáncer, radiación o similar. Tras la medición del peso del tumor, se cortaron masas de tumor en 2 mm cuadrados con tijeras y se prepararon homogeneizados de tejido de tumor utilizando un equipo de reactivos de disociación de tumor (130-095-929, Miltenyi Biotec) humano y disociador gentleMACS(TM) (Miltenyi Biotec, 130-093-235) según el protocolo adjunto al equipo de reactivos. Se pasaron los homogeneizados a través de un tamiz celular de 70 μ m y se sometieron a tratamiento de hemólisis, seguido de la eliminación de los restos y las células muertas en una solución de 30% Percoll en PBS para obtener células individuales de tejido de tumor.

Se separaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) del mismo paciente de la sangre periférica a través del método de centrifugación de gradiente de densidad utilizando Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Japan Corp.). Después de la medición del recuento celular, se trataron las células intratumorales y PBMC separadas con Human TruStain FcX(TM) (BioLegend, Inc., 422-301) y equipo de reactivos Zombie NIR(TM) Fixable Viability (BioLegend, Inc., 423105) según los protocolos adjuntos y se tiñeron 30 minutos en hielo. A continuación, se lavaron las células una vez con 2% FCS/HEPES/HBSS y después se tiñeron con los siguientes anticuerpos de marcado según los protocolos adjuntos a los anticuerpos marcadores.

Se tiñó la superficie celular de las células infiltrantes de tumor por reacción durante 30 minutos en hielo utilizando un anticuerpo anti-CD3 (BioLegend, Inc., Clon UCHT1), un anticuerpo anti-CD4 (BioLegend, Inc., Clon OKT4), y un anticuerpo anti-CD25 (BioLegend, Inc., Clon BC96). Se lavaron las células dos veces con 2% FCS/HEPES/HBSS y después se fijaron y se permeabilizaron con membrana utilizando Foxp3/conjunto de tampón de tinción de factor de transcripción (eBioscience, Inc., 00-5523-00) según el protocolo adjunto al equipo de reactivos. Se tiñó además FoxP3 utilizando un anticuerpo anti-FoxP3 marcado con PE (eBioscience, Inc., Clon PCH010). Se lavaron las células una vez con una solución de lavado adjuntada al equipo de reactivos y a continuación se analizaron por citometría de flujo (BD Biosciences, BD LSRFortessa). Se confirmó que prácticamente todos los linfocitos T CD4+ CD25+ dentro de los tumores ccRCC expresaban FoxP3, un marcador de linfocitos Treg (Figura 1).

A continuación, se tiñeron células infiltrantes de tumor y las PBMC descritas con un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD45RA (BD Biosciences, Clon HI100) y un anticuerpo anti-CD25. Se desarrollaron linfocitos T CD3+ CD4+ bidimensionalmente en función de los niveles de expresión de CD45RA y CD25. Los resultados acerca de PBMC se muestran en la Figura 2 y los resultados acerca de células infiltrantes de tumor se muestran en la Figura 3. Se fraccionaron células infiltrantes de tumor en 4 fracciones entre células fuertemente positivas (Fr2), células débilmente positivas (Fr3) y células negativas (Fr4 y Fr5), tal como se muestra en la Figura 1C con intensidad de expresión de CD3+ CD4+ CD45RA- y CD25 como índice utilizando un clasificador de células (FACSARIA II), y se recuperaron las células contenidas en cada fracción. Asimismo, se desarrollaron bidimensionalmente PBMC, como las células infiltrantes de tumor y se fraccionaron en Fr1 a Fr6 tal como se muestra en la Figura 2 con intensidad de expresión de CD45RA y CD25 como índice, y se recuperaron las células contenidas en cada fracción.

[Ejemplo 2]**Separación de ARN de células fraccionadas y análisis de secuencia de ADNc**

Se sometieron a lisis células separadas y recuperadas de cada fracción en tampón RLT (Qiagen N.V.), y se extrajo el ARN total utilizando Agencourt RNAClean XP (Beckman Coulter, Inc.). Se preparó el ARN recuperado en ADNc utilizando el equipo de reactivos para secuenciación SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA (Clontech Laboratories, Inc.) y se preparó una genoteca utilizando el equipo KAPA Hyper Prep de illumina (Kapa Biosystems, Inc.). Para la síntesis de ADNc y la preparación de la genoteca se llevó a cabo de forma constante el control de calidad utilizando un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Inc.) para confirmar que estos procedimientos estaban exentos de problemas. Se tituló la genoteca de ADNc acabada utilizando Plataformas Illumina de equipos de cuantificación de genotecas KAPA (Kapa Biosystems, Inc.). A continuación, se llevó a cabo la secuenciación de ADN mediante lecturas de extremos apareados, utilizando Hiseq 4000 (Illumina, Inc.) para obtener 20.000.000 lecturas o más de una secuencia los datos de 100 pares de base o más por muestra (archivo Fastq).

Se analizaron los datos en bruto (archivo Fastq) por FastQC, y se eliminaron secuencias adaptadoras y secuencias de repetición utilizando CutAdapt. Se aparearon pares de cada lectura de extremos apareados utilizando el programa cmpfastq_pe. Se utilizó hg38 como secuencia de referencia en la cartografía del genoma y se cartografiaron las lecturas en el genoma, en un escenario de defecto, utilizando el programa TOPHAT2 que tenía Bowtie 2. Las lecturas cartografiadas fueron clasificadas por secuencia utilizando un programa SAMtools y se hizo el recuento utilizando un programa HTSEQ. Se normalizaron los datos del recuento utilizando un programa Deseq 2. Entre las fracciones obtenidas, se confirmó una fracción que contenía linfocitos Treg a través del siguiente método.

Se sabe que los linfocitos Treg expresan constitutivamente genes FoxP3 y Ikzf2 como genes marcadores y que raramente secretan IFN γ o IL2 incluso cuando se activan por estimulación. Ya contengan o no linfocitos Treg, se puede confirmar hasta cierto punto examinando los niveles de expresión de estos genes. Como resultado del examen de los niveles de expresión de estos genes en cuanto a cada fracción de las células infiltrantes de tumor y las PBMC en función de los datos de la secuencia de ARN antes descrita, se observó que Ikzf2 y FoxP3 estaban expresados específicamente en Fr2 y Fr3 de las células infiltrantes de tumor y Fr2 de las PBMC y raramente se expresaban en otras fracciones (Figura 4). Asimismo, se observó que IFN γ (IFN-gamma) e IL2 se expresaban específicamente en Fr4 y Fr5 de las células infiltrantes de tumor y Fr4 y Fr5 de células PBMC y no se expresaban en otras fracciones (Figura 4). En conclusión, se observó que los linfocitos Treg estaban contenidos en Fr2 y Fr3 de las células infiltrantes de tumor y Fr2 de las PBMC y no estaban contenidas en otras fracciones.

[Ejemplo 3]**Medición de la tasa de desmetilación de la región FoxP3**

La tasa de desmetilación de una región FoxP3 sirve como índice para determinar con precisión la proporción de linfocitos Treg. Por lo tanto, se estudiaron las células en Fr2 a Fr5 de las células infiltrantes de tumor de cáncer de riñón obtenidas, tal como se ha descrito anteriormente, en cuanto a la tasa de desmetilación de la región FoxP3. Una región desmetilada en una manera específica de linfocito Treg reside (chrX, 49118000-49118500, hg19) en una región CpG particular dentro del primer intrón del gen FoxP3. Las células contenidas en cada fracción de las células infiltrantes de tumor pueden analizarse en cuanto a la desmetilación de esta región para verificar si la fracción obtenida esta vez consiste solamente en linfocitos Treg u otras células coexisten con ellos también.

Se recuperó cada fracción (Fr2, Fr3, Fr4, y Fr5) de los linfocitos T CD4⁺ infiltrantes de tumor y se recuperó el ADN de genoma mediante el uso de método de extracción con fenol. Se trató el ADN del genoma con bisulfito utilizando el equipo de reactivos MethylEasy Xceed (Human Genetic Signatures) y se sometió la región de intrón 1 de FOXP3 (chrX, 49118000-49118500, hg19), una región de desmetilación específica de linfocitos Treg a PCR con amplicón. Se detectó la metilación de ADN utilizando una sonda fluorescente FAM específica de ADN metilado y una sonda fluorescente VIC específica de desmetilación y el sistema de PCR digital en 3D QuantStudio (Applied Biosystems, Inc.). Tras la PCR con amplicón, se hizo el recuento del índice de emisiones de luz desde las sondas fluorescentes FAM y VIC y se calculó la tasa de metilación de ADN a partir de la relación entre estos índices de emisiones de fluorescencia y se utilizaron como tasa de metilación de cada fracción (Fr2 a Fr5).

Como resultado, 95% o más de las secuencias CpG dentro de la región de intrón 1 de FOXP3 (chrX, 49118000-49118500) estaban desmetiladas en las células contenidas en Fr2 y Fr3 de las células infiltrantes de tumor, mientras que las tasas de desmetilación de Fr4 y Fr5 fueron 50% o menos. En conclusión, se observó que casi todas las células contenidas en Fr2 y Fr3 eran linfocitos Treg (Figura 5).

[Ejemplo 4]**Identificación de CCR8**

Para identificar un gen de un grupo específicamente expresado en los linfocitos Treg (Fr2 de las células infiltrantes de tumor), se llevó a cabo el análisis de agrupamiento jerárquico sobre los datos de expresión genética en la fracción de

linfocitos T CD4+ derivados de PBMC del mismo paciente que el de cada fracción de linfocitos T CD4+ derivados de tumor. Se identificó CCR8 como un gen que se expresaba en Fr2 de los linfocitos Treg y raramente se expresaba en Fr5 y Fr4 derivado de tumor y Fr5 derivado de PBMC (Figura 6).

[Ejemplo 5]

5 Preparación de células forzadas a expresar CCR8 de ratón

Se insertó ORF de longitud completa de CCR8 de ratón (en adelante, también se hace referencia como mCCR8) en un vector de expresión (pcDNA3.4) para construir plásmido pcDNA3.4-mCCR8. Se cambió la secuencia de nucleótidos para que tuviera codones con alta frecuencia de uso en mamíferos sin cambiar los aminoácidos. Se transfectaron células HEK293 con pcDNA3.4 o el plásmido de expresión pcDNA3.4-mCCR8 utilizando Lipofectamina 3000 y se seleccionaron con fármaco a una concentración de geneticina (G418) de 1 mg/ml durante 2 semanas.

Se disociaron las células supervivientes con tripsina y se lavaron con medio DMEM/10% FCS. A continuación, se añadió un anticuerpo anti-mCCR8 marcado con PE (clon SA214G2) diluido 1/200 y se hizo reaccionar sobre hielo durante 30 minutos. A continuación, se lavaron las células una vez con DMEM/10% FCS para marcar mCCR8 expresado sobre la superficie celular. Se enriqueció una población celular que expresaba mCCR8 por clasificación utilizando un clasificador de células (FACSARIA II). Se cultivó la población de células positivas a 37°C durante 2 semanas en una incubadora de CO₂ en presencia de DMEM/10% FCS (medio que contenía 1 mg/ml G418). Para las células transformadas con pcDNA3.4, solamente se realizó la selección de fármaco y no se realizó la clasificación. Para confirmar la expresión, se tiñeron ambas células con anticuerpo de CCR8 anti-ratón marcado con anti-PE disponible en el comercio (clon SA214G2) y se analizaron utilizando un citómetro de flujo (FACSARIA II). Se muestran los resultados (Figura 7). Se observó la expresión de mCCR8 en el 99% o más de las células transformadas con pcDNA3.4-mCCR8 en comparación con las células transformadas con pcDNA3.4.

[Ejemplo 6]

Estudio de la capacidad de un anticuerpo de CCR8 anti-ratón (SA214G2) de estimular FcyR

Se evaluó un anticuerpo de CCR8 anti-ratón (clon SA214G2, adquirido de BioLegend, Inc.) en cuanto a su capacidad para estimular FcgR, necesario para su actividad ADCC, utilizando un equipo de reactivos mFcyRIV ADCC Reporter Bioassays Core (Promega Corp.). Este equipo de reactivos indica la activación de FcyR en células efectoras por el nivel de expresión de gen luciferasa ligado al gen luciferasa dirección 3' de promotor NFAT en las células. La activación de señales FcyR se puede cuantificar cuantificando su nivel de expresión.

A continuación, se describirán brevemente los procedimientos. Se mezclaron 1 x 10⁵ células/pocillo de células diana HEK293 que expresan mCCR8- (células diana) disociadas con tripsina con células efectoras que expresan FcyR unidas al equipo de reactivos en una relación de 1:1.5 en una placa de 96 pocillos. Inmediatamente después del mezclado de células, se añadió el anticuerpo contra mCCR8. Se estableció la concentración en 33 ug/ml a 0,033 ug/ml, tal como se muestra en la Figura 8 (N = 2). Solamente se utilizaron las células efectoras como control negativo. 14 horas después de la adición del anticuerpo, se recuperaron las células y se midió la actividad de luciferasa (Figura 8). Se muestra una media de N = 2.

Como resultado, no se observó la actividad de luciferasa en ninguna de las concentraciones de anticuerpo para el control negativo, mientras que se observó actividad dependiente de la concentración de anticuerpo en el grupo de adición de célula diana. Las ordenadas representan un valor relativo de la intensidad de luminiscencia. Tal como se observa en la Figura 8, el valor de actividad máxima fue aproximadamente 6.000 unidades de luz relativa (U.L.R) y el valor EC50 (aproximadamente 3.500 U.L.R) fue aproximadamente 0,1 µg/ml (líneas en el dibujo). Estos resultados demuestran que el anticuerpo de CCR8 anti-ratón (SA214G2) puede activar FcyRIV.

[Ejemplo 7]

Medición de actividad ADCC

Se evaluó el anticuerpo de anti-mCCR8 (SA214G2) en cuanto a su actividad citotóxica utilizando células HEK293 que expresan mCCR8 preparadas en el ejemplo 5.

Se separó el bazo de un ratón C57BL/6 y se recuperaron células del bazo a través de un tamiz celular. Se lavaron las células y después se hicieron reaccionar con un anticuerpo anti-CD49b (clon DX5) biotinilado a 4°C durante 30 minutos. Después del lavado, se purificaron células NK utilizando microperlas de estreptavidina (Miltenyi Biotec) y se utilizaron como células efectoras. Se tiñeron las células HEK293 que expresan CCR8 de ratón con Cell Trace Violet (CTV) (Thermo Fisher Scientific Inc., C34557) a una concentración final de 2,5 uM y se utilizaron como células diana. Se mezclaron estas células en una relación entre células efectoras y células diana = 5:1 (recuento de células efectoras: 2,5 x 10⁵ células) en una placa de 96 pocillos (200 µL/pocillo). Se añadió anticuerpo de CCR8 anti-ratón o el anticuerpo de control de isotipo (IgG2b de rata, clon RTK4530) a una concentración final de 1 µg/ml, seguido de cultivo durante toda la noche en una incubadora de CO₂ a 37°C. A continuación, se añadió anexina V marcada con PE (Annexin V-PE, Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. (MBL), 4696-100) diluida 1/100 según el protocolo adjunto y se tiñeron

las células a 37°C durante 30 minutos y a continuación, se lavó una vez. Se analizó la proporción entre anexina V y células apoptóticas positivas en las células diana teñidas con CTV utilizando un citómetro de flujo. Se llevó a cabo el ensayo por triplicado (N = 3) y se muestra una media y su desviación típica. Se muestra un ejemplo típico de dos experimentos similares (Figura 9). La adición del anticuerpo de CCR8 anti-ratón en comparación con el anticuerpo de control de isotipo aumentó significativamente la proporción de células anexina V positivas en las células diana aproximadamente 6 veces. En conclusión, se observó que el anticuerpo de CCR8, anti-ratón (SA214G2) tenía actividad ADCC.

Ejemplo 8

Medición de la actividad neutralizante contra CCR8

Se evaluó el anticuerpo de CCR8 anti-ratón (SA214G2) en cuanto a su actividad neutralizante contra CCR8 con influjo de calcio intracelular mediado por CCL1 de ratón (ligando de CCR8 de ratón) como índice utilizando células HEK293 que expresan CCR8 de ratón de forma estable.

Se utilizaron los siguientes reactivos en la medición de calcio.

HEPES (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., CAS. NO. 7365-45-9).

15 HBSS (+) sin rojo fenol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

Fluo 3-AM (cat F023, Dojindo Laboratories)

Probenecid (CAS -No: 57-66-9, Nacalai Tesque, Inc.)

Pluronic F127 (P3000MP; Life Technologies Corp.)

20 Tampón 10 mM HEPES/HBSS/0,1% BSA (se añadieron HEPES (concentración final: 10 mM) y BSA (concentración final: 0,1%) a HBSS)

Se disolvieron Fluo 3-AM y Pluronic F127 en concentraciones finales de 4 µmol/L y 0,04%, respectivamente, en tampón 10 mM HEPES/HBSS. Se suspendieron las células en esta solución y se incubaron a 37°C durante 1 hora de modo que las células absorbieran Fluo 3-AM. A continuación, se lavaron las células tres veces con solución 10 mM de HEPES/HBSS/0,1% de BSA y se suspendieron a una concentración celular de 2×10^5 células/ml en solución 10 mM de HEPES/HBSS/0,1% de BSA que contenía 1,25 µM probenecid. A continuación, se incubaron las células a 37°C durante 10 minutos en una incubadora de CO₂. Se añadió además el anticuerpo de anti-mCCR8 (SA214G2) o un anticuerpo de control de isotipo (Clon LTF-2, Bio X Cell) al mismo a una concentración de 5 µg/ml. Las células se incubaron adicionalmente a 37°C durante 20 minutos.

30 Se colocaron 2 ml de la solución de las células en una cubeta de vidrio de cuarzo y se cargaron en un espectrofotómetro HITACHI F7000 con la temperatura de una sala de medición preestablecida a 35°C. Las condiciones de medición fueron como se describe a continuación.

Longitud de onda de excitación: 508,0 nm, longitud de onda de fluorescencia (medición): 527,0 nm, hendidura del lado de excitación: 5 nm, hendidura del lado de fluorescencia: 5 nm, tensión del fotomultiplicador: 950 V, respuesta: 0,5 s.

35 Se incubaron las células con agitación utilizando un agitador durante aproximadamente 30 segundos hasta que se estabilizó la longitud de onda de fluorescencia. Cuando se estabilizó la longitud de onda, se añadió CCL1 de ratón a una concentración final de 50 nM (4 µL) para comenzar la medición. Como resultado de la medición, se observó que la administración del anticuerpo de anti-mCCR8 de antemano suprime casi por completo el influjo de calcio intracelular mediado por mCCL1 (Figura 10). No se observó dicha supresión con la adición del anticuerpo de control. Los huecos en los gráficos se derivaron de la apertura y el cierre de la cubierta del instrumento para administrar el agonista para las células. En conclusión, se observó que el anticuerpo de anti-mCCR8 (SA214G2) tenía actividad neutralizante contra CCR8 de ratón.

Ejemplo 9

Confirmación de la expresión de mCCR8 en CT26

45 Se cultivaron células CT26 en una placa de 6 pocillos y se eliminó la solución de cultivo cuando las células confluyeron en aproximadamente 50%. Se añadieron 5 ml de 10 mM EDTA/PBS y se incubaron las células a 37°C durante 5 minutos. Como resultado, se disociaron casi todas las células, se suspendieron utilizando una pipeta y se pudieron separar así en células casi individuales. Se lavaron dos veces las células con D-MEM/FCS al 10%, se suspendieron en D-MEM/FCS al 10% y se tiñeron en hielo con LIVE/DEAD® el equipo de reactivos Fixable Near IR Dead Cell Stain (Thermo Fisher Scientific Inc., L34975) y un anti-mCCR8 marcado con APC (SA214G2) o un anticuerpo de control de isotipo marcado con APC. 1 hora después, se lavaron las células tres veces con D-MEM/FCS al 10% y se analizaron en cuanto a la tasa de expresión de mCCR8 utilizando un citómetro de flujo (FACSCanto II). Se estableció un fondo

utilizando el anticuerpo de control de isotipo y se calcularon la proporción de células positivas (P6) iguales o mayores que el nivel de fondo y la mediana de fluorescencia APC (Figura 11). Como resultado, no se observó diferencia en la mediana de la intensidad de fluorescencia de APC y raramente se observaron células positivas (0,2%). En conclusión, las células CT26 no fueron reconocidas por el anticuerpo de CCR8 anti-m, y se confirmó que las células CT26 no expresaban mCCR8.

Ejemplo 10

Confirmación de la expresión de CCR8 en células infiltrantes de tumor utilizando células CT26 de línea celular de cáncer colorrectal

Se trasplantaron por vía intracutánea 3×10^5 células CT26 (50 μ L) en el dorso de cada ratón Balb/c (7 semanas, hembra) (N = 3). En el día 3 tras el trasplante, se administraron por vía intraperitoneal 400 μ g de un anticuerpo anti-KLH de rata (hemocianina de lapa californiana, clon LTF-2) (IgG2b). En los días tras la administración 4 (4d) y 7 (7d), se recuperaron tumores de los 3 individuos (N = 3). Se cortaron las masas tumorales de las células CT26 con unas tijeras y se prepararon las células infiltrantes de tumor utilizando equipos de reactivos comercialmente disponibles (Tumor Dissociation Kit, mouse, Miltenyi Biotec and gentleMACS™ Dissociator, Miltenyi Biotec, cat. 130-095-929) según a los protocolos adjuntos a los equipos de reactivos.

Se pasaron las células preparadas a través de un tamiz celular de 70 μ m y después se lavaron dos veces con 10 mM HEPES/HBSS/FBS al 2%. A continuación, se trataron las células con una solución de lisis de eritrocitos (Miltenyi Biotec) durante 5 minutos para eliminar los eritrocitos y se lavaron dos veces más con FCS al 2% (suero bovino fetal)/tampón 10 mM HEPES/HBSS. Se dividieron las células infiltrantes de tumor en dos partes, una de las cuales se usó en la identificación de linfocitos Treg y la otra en la identificación de células mieloides (macrófagos). Se tiñeron las células utilizando el método y los anticuerpos indicados a continuación. Los anticuerpos, los reactivos de tinción y los tampones de ensayo utilizados fueron como se describe a continuación.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos.

(Conjunto de anticuerpos para confirmación de linfocitos T)

FoxP3 anti-ratón/rata PE (clon FJK-16s), eBioscience, Inc.

CD4 anti-ratón PerCP/Cy5.5 (clon RM4-5), eBioscience, Inc.

CD8a anti-ratón FITC (clon 5H10-1), BioLegend, Inc.

CD25 anti-ratón Bv421 (clon PC61), BioLegend, Inc.

CD45 anti-ratón Bv510 (clon 30-F11), BioLegend, Inc.

CCR8 anti-ratón AF647 (clon SA214G2), BioLegend, Inc.

Control de isotopo AF647 (clon RTK4530), BioLegend, Inc. (control CCR8-negativo).

(Conjunto de anticuerpos para confirmación de células de macrófago y mieloides)

CCR8 anti-ratón AF647 (clon SA214G2), BioLegend, Inc.

Control de isotipo AF647 (clon RTK4530), BioLegend, Inc. (control CCR8-negativo)

CD45 anti-ratón Bv510 (clon 30-F11), BioLegend, Inc.

Gr-1 anti-ratón FITC (clon RB6-8C5), BioLegend, Inc.

F4/80 anti-ratón Bv421 (clon BM8), BioLegend, Inc.

CD11b anti-ratón PECy7 (clon M1/70), BioLegend, Inc.

MHC clase II IA/IE PerCP/Cy5.5 Anti-ratón (clon M5/114.15.2), BioLegend, Inc.

CD206 anti-ratón PE (clon C068C2), BioLegend, Inc.

(Otros reactivos utilizados)

Equipo de reactivos Zombie NIR Fixable Viability (cat no. 423106), BioLegend, Inc.

Conjunto de tampones BD Pharmingen Transcription Factor (cat no. 562574)

Tampón BD Pharmingen Lysing Buffer (cat no. 555899)

HBSS(-), Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 084-08345

FCS (HyClone Laboratories Inc., cat no. SH30070.03)

5 El método de tinción fue el siguiente: se tiñeron las células infiltrantes en hielo durante 30 minutos utilizando un reactivo del equipo de reactivos Zombie NIR Fixable Viability. Se lavaron las células una vez con FCS al 2%/10 mM HEPES/HBSS. Después, se tiñeron los linfocitos Treg y CCR8 positivos con anticuerpo anti-CD45 marcado con Bv510, CD4 anti-ratón marcado con PerCP/Cy5.5, CD8 anti-ratón marcado con FITC, CD25 anti-ratón marcado con Bv421 y anticuerpo de CCR8 anti-ratón marcado con AF647- (o anticuerpo de control de isotipo marcado con AF647). Se tiñeron las células monocíticas con anticuerpo anti-CD45 marcado con Bv510, Gr-1 anti-ratón FITC, CD11b anti-ratón PECy7, F4/80 anti-ratón Bv421, MHC clase 2 (IA/IE) marcado con PerCP/Cy5.5 y anticuerpo CD206 anti-ratón marcado con PE.

10 La tinción se realizó en hielo durante 30 minutos. Se lavaron las células dos veces con 2% FCS/HEPES/HBSS y después se fijaron utilizando un equipo de reactivos comercialmente disponible (equipo de reactivos de tinción FoxP3, eBioscience, Inc.) según el protocolo adjunto, y se tiñó FoxP3 intracelular utilizando un anticuerpo anti-FoxP3 marcado con PE. Se lavaron las células con un tampón fijado al equipo de reactivos y después se analizaron utilizando un citómetro de flujo.

15 Se analizaron los linfocitos T CD45+ CD4+. Se determinó una región de células negativas en los linfocitos T CD45+ CD4+ mediante tinción con un anticuerpo de control de isotipo, y se usaron células positivas para los anticuerpos CD25 anti-ratón y FoxP3 anti-ratón como linfocitos Treg para calcular la frecuencia de presencia 4 días después de la administración. (7 días después de la inoculación) y 7 días después de la administración (10 días después de la inoculación). Como resultado, aproximadamente el 23% (4d) y aproximadamente el 30% (7d) de los linfocitos T CD45+ CD4+ dentro de los tumores de ratón fueron células CD25+ FoxP3+ (Figura 12).

20 A continuación, se analizó la expresión de CCR8 en los linfocitos T CD45+ CD4+ CD25+ FoxP3+. Se determinó una región de células negativas en los linfocitos T CD45+ CD4+ CD25+ FoxP3+ por tinción con un anticuerpo de control de isotipo y se utilizaron células positivas para un anticuerpo de CCR8 anti-ratón como linfocitos Treg CCR8+ para calcular la frecuencia de presencia 4 días después de la administración (7 días después de la inoculación) y 7 días después de la administración (10 días después de la inoculación) (Figura 13). Como resultado, aproximadamente el 50% (4d) y aproximadamente el 67% (7d) de los linfocitos T CD45+ CD4+ CD25+ FoxP3+ dentro de los tumores de ratón fueron células CCR8+ (Figura 13).

25 En cuanto a las células mieloides, se separó la población mieloides en células CD45+ y FSC/SSC utilizando un citómetro de flujo y se analizó la proporción de células CCR8+ en las células CD11b+ Gr1+ CD206+. Como resultado, se observó que 40 a 50% de las células tanto 7 días después de la inoculación (4 días después de la administración) como 10 días después de la inoculación (7 días después de la administración) fueron CCR8 positivas (Figura 14). Asimismo, se midió del mismo modo al mencionado la tasa de expresión de CCR8 en células CD45+ CD11b+ F4/80+ (N = 3) como una población de células de macrófagos diferente a ella. Como resultado, se confirmó que el 45,3% (desviación típica: ± 8,2%) de las células expresaban CCR8 en el día 10 tras el trasplante (7d). A partir de estos resultados, se observó que al menos los linfocitos T CD4+ CD25+ FoxP3+ y los macrófagos CD11b+ Gr1+ CD206+ (llamados macrófagos M2) como células infiltrantes de tumor expresaban CCR8.

Ejemplo 11

40 Estudio del efecto de agotamiento de linfocitos Treg infiltrantes de tumor o células de macrófago infiltrantes de tumor mediante la administración de anticuerpo anti-mCCR8

45 Se trasplantaron por vía intracutánea 3×10^5 células CT26 (50 μ l) en el dorso de cada ratón Balb/c (7 semanas, hembra). 3 días después de la inoculación, se administraron 400 μ g (volumen de líquido: 400 μ L) de un anticuerpo CD198 anti-ratón (CCR8) de rata (clon SA214G2, BioLegend, Inc.) o un anticuerpo de control de isotipo (Clon LTF-2) en la vena caudal (cada grupo N = 3). 7 días después de la inoculación del tumor (4 días después de la administración del anticuerpo) y 10 días después de la inoculación del tumor (7 días después de la administración del anticuerpo), se recuperaron los tumores y se prepararon y analizaron las células infiltrantes del tumor (Figura 15).

Se recuperaron los linfocitos Treg infiltrantes de tumor de la misma manera que en el ejemplo 10. Los anticuerpos utilizados fueron los mismos que en el ejemplo 10,

50 En primer lugar, se tiñeron las células infiltrantes en hielo durante 30 minutos utilizando el equipo de reactivos Zombie NIR Fixable Viability. Se lavaron las células una vez con 2% FCS /10 mM HEPES/HBSS y después se tiñeron con anticuerpo anti-CD45 marcado con Bv510, CD4 anti-ratón marcado con PerCP/Cy5.5, anticuerpo CD8 anti-ratón marcado con FITC, CD25 anti-ratón marcado con Bv421 y anticuerpo de CCR8 anti-ratón marcado con AF647 (o anticuerpo de control de isotipo marcado con AF647). Se realizó la tinción en hielo durante 30 minutos. Se lavaron las células dos veces con FCS/HEPES/HBSS al 2% y después se fijaron utilizando un equipo de reactivos comercialmente disponible (equipo de reactivos de tinción FoxP3, eBioscience, Inc.) según el protocolo adjunto y se tiñó FoxP3

55

intracelular utilizando un anticuerpo anti-FoxP3 marcado con PE. Se lavaron las células con un tampón unido al equipo de reactivos y después se analizaron utilizando un citómetro de flujo.

Se utilizaron células CD45+ CD4+ FoxP3+ CD25+ como linfocitos Treg de ratón. Se determinó una región de células negativas en los linfocitos Treg por tinción con un anticuerpo de control de isotipo marcado con AF647 y se usaron las células positivas para un anticuerpo de CCR8 anti-ratón marcado con AF647 en comparación con el control como células CCR8 positivas para calcular su frecuencia.

Como resultado, tal como se muestra en la FIG. 16, el porcentaje de positividad de los linfocitos T CD45+ CD4+ CD25+ FoxP3+ (linfocitos Treg) en los ratones a los que se administró el anticuerpo de CCR8 anti-ratón (SA214G2) fue aproximadamente del 80% 7 días después de la inoculación del tumor (4 días después de la administración del anticuerpo) y aproximadamente el 40% 10 días después de la inoculación del tumor (7 días después de la administración del anticuerpo 7) (Figura 16) cuando la proporción de linfocitos T CD45+ CD4+ CD25+ FoxP3+ intratumorales (linfocitos Treg) en los ratones a los que se había administrado el anticuerpo isotipo se definió como 100% (10 días después de la inoculación del tumor). El nivel de significación ** fue $P < 0,01$ (prueba t). Estos resultados mostraron que aproximadamente el 60% de las linfocitos Treg infiltrantes de tumor fueron agotados por el anticuerpo anti-CCR8 7 días después de la administración del anticuerpo anti-CCR8.

De la misma manera a la expuesta, se separaron células infiltrantes de tumor de los tumores en el día 7 tras el trasplante (d7), y entre las células CD45+, se separó una población mieloide en FSC/SSC (a la que se hace referencia como FSC/SSC+), seguido de análisis de las células CD11b+ F4/80+ en las células. F4/80 (Ly719) es un marcador de macrófagos y monocitos maduros de ratón. Tal como se muestra en la FIG. 17, la relación de abundancia de células CD11b+ F4/80+ disminuyó en el grupo de administración de anticuerpos anti-mCCR8 (N = 3) en comparación con el control de isotipo (N = 3) (prueba t; $P = 0,062$). El gráfico muestra la relación de abundancia de células F4/80+ en una población de células mononucleares CD45+ FSC/SSC+.

La relación de abundancia de células IA/IE positivas o clase 2 (IA/IE) negativas en las células F4/80+ mostradas en la FIG. 17 se muestra además en cuanto a las moléculas de clase 2 de MHC (antígeno de histocompatibilidad tumoral). Tal como se muestra en la FIG. 18, en el grupo de administración de anticuerpo anti-mCCR8 (N = 3) en comparación con el control de isotipo (N = 3), el grupo negativo IA/IE presentó una tendencia decreciente y el grupo IA/IE positivo disminuyó significativamente (prueba t; nivel de significación *; $P < 0,05$). En conclusión, se descubrió que la población de monocitos/macrófagos intratumorales CT26 de ratón o una parte de la población tenía un menor recuento de células intratumorales.

Ejemplo 12

Evaluación del efecto antitumoral de la administración de anticuerpos anti-mCCR8 utilizando CT26 derivadas de cáncer colorrectal

Se trasplantaron por vía intracutánea 3×10^5 células CT26 derivadas de cáncer colorrectal (50 μ l) en el dorso de cada ratón Balb/c (7 semanas de vida, hembra). 3 días después de la inoculación del tumor, se administraron por vía intravenosa 400 μ g (400 μ L) de un anticuerpo CD198 anti-ratón (CCR8) de rata (clon SA214G2, BioLegend, Inc.) (N = 10). Se administró un anticuerpo de control de isotipo a un control (N = 10). Se midieron los volúmenes de tumor cada 3 a 4 días a partir de 8 días después de la inoculación del tumor (5 días después de la administración de anticuerpos). Se calculó el volumen del tumor (mm^3) según el eje mayor (mm) \times eje menor (mm) \times eje menor (mm)/2 (Figura 19).

Como resultado, no se observó ninguna diferencia significativa en el grupo de administración de anti-mCCR8 en comparación con el grupo de administración de anticuerpos de control de isotipo el día 7 tras el trasplante, mientras que el volumen de tumor del grupo de administración de anticuerpo anti-mCCR8 disminuyó significativamente a los 11, 14, 17 y 21 días después de la inoculación del tumor (nivel de significación: ***; $P < 0,001$ en los días 11 y 14, **; $P < 0,01$ en los días 17 y 21). Asimismo, en el grupo de administración de anticuerpos CCR8 anti-ratón, el volumen del tumor disminuyó el día 14 tras el trasplante o más adelante, y los tumores desaparecieron casi completamente en el día 17 (los datos individuales se muestran en la Figura 20, y los datos medios se muestra en la Figura 21). A partir de estos resultados se concluyó que la administración de anticuerpo anti-mCCR8 suprimió las funciones de mCCR8, expresadas en Treg y monocitos/macrófagos señalados como células inmunosupresoras, o eliminó (agotó) estas células de expresión a través de la actividad ADCC del anticuerpo, de modo que se potenció la inmunidad contra el tumor, lo cual conllevó la regresión y desaparición de los tumores.

Tal como se ha reseñado ya en mucha bibliografía, etc., en el caso de administrar un anticuerpo específico para CD25 de ratón (anti-CD25), un marcador de linfocitos Treg de ratón, a ratones y agotar así los linfocitos Treg de ratón, la administración antes de la inoculación del tumor presenta un efecto antitumoral débil y la administración el día 2 tras el trasplante o más adelante no presenta ningún efecto antitumoral. Se llevó a cabo asimismo la administración del anticuerpo anti-CD25 el día 3 tras el trasplante utilizando el mismo sistema de células CT26 que el utilizado esta vez, pero no se observó ningún efecto antitumoral. A partir de estos resultados, se concluyó que el anticuerpo anti-mCCR8 tiene una eficacia como fármaco más fuerte que la del anticuerpo anti-CD25.

Ejemplo 13

A continuación, se evaluó anti-PD-1 (clon RMP1-14, Bio X Cell), un anticuerpo específico para la PD-1 de ratón, en cuanto a su eficacia como fármaco utilizando CT26 y se estudió comparativamente con CCR8anti-m. Se trasplantaron por vía intracutánea 2×10^5 células CT26 derivadas de cáncer colorrectal (50 μ L) en el dorso de cada ratón Balb/c (7 semanas de vida, hembra). Se administró el anticuerpo anti-PD-1 (200 μ g/cabeza, ip) un total de tres veces cada 3 a 4 días desde el día 7 tras el trasplante.

Como resultado, se observó un efecto antitumoral en el grupo al que se administró el anticuerpo anti-PD-1 (N = 8) en comparación con un grupo que recibió un anticuerpo de control de isotipo (N = 8). El volumen de tumor medio y la desviación típica del control de isotipo fueron $601,7 \pm 378,1 \text{ mm}^3$, $956,3 \pm 467,7 \text{ mm}^3$ y $1528,4 \pm 774,1 \text{ mm}^3$ a los 14, 17 y 20 días después de la inoculación del tumor, respectivamente, mientras que el volumen de tumor medio y la desviación típica del grupo de administración de anticuerpos anti-PD-1 fueron $175,3 \pm 42,6 \text{ mm}^3$, $174,7 \pm 55,8 \text{ mm}^3$ y $209,6 \pm 99,8 \text{ mm}^3$ a los 14, 17 y 20 días después de la inoculación del tumor, respectivamente. El anticuerpo anti-PD-1 suprimió significativamente el aumento en el volumen del tumor en comparación con el control en todos los días 14, 17 y 20 después de la inoculación del tumor. Sin embargo, un individuo cuyo tumor desapareció completamente fue 1 de cada 8 ratones en el período de observación (hasta el día 20 tras el trasplante). Por otro lado, se observó la desaparición completa de los tumores en los 10 casos en el mismo período que el anterior mediante la administración de anticuerpos de CCR8anti-m. A partir de estos resultados, se concluyó que el anticuerpo de anti-mCCR8 tiene una eficacia farmacológica más fuerte que la del anticuerpo anti-PD-1 en el método de administración estándar.

Ejemplo 14

Confirmación de presencia o ausencia de inducción de enfermedad autoinmune en ratones a los que se administra anticuerpo anti-mCCR8

A continuación, se evaluaron los estados de los ratones del ejemplo 12 hasta el día 18 tras la administración. No se observó ninguna diferencia significativa en el peso corporal de este período entre el grupo de administración de anticuerpo de control y el grupo de administración de anticuerpo anti-CCR8. No se observó piloerección en ninguno de los dos grupos. Se diseccionó a estos ratones el día 18 tras la administración. Si bien se estudió la presencia o ausencia de alargamiento del ganglio linfático y el tracto intestinal en el grupo de administración de anti-CCR8, en comparación con el control, no se observó el alargamiento, sin ninguna diferencia entre los grupos. De estos hallazgos, se concluyó que no se había observado ningún signo de enfermedad autoinmune en el período en el que se ejerció el efecto antitumoral en los ratones a los que se administró anticuerpo anti-CCR8. Los documentos reseñan que, en general, si se agota Treg de todo el cuerpo de un ratón hasta el punto de que se induce un efecto antitumoral, se induce enfermedad autoinmune severa en torno al día 14 tras el agotamiento. Esto es un punto de interés para la inmunoterapia tumoral incluyendo terapia de supresión Treg. Los resultados obtenidos esta vez mostraron que no se indujo ninguna enfermedad autoinmune ni siquiera el día 18 tras la administración de anticuerpo en los ratones en los que se observó un fuerte efecto de inmunidad anti-tumor mediante la administración de anticuerpo anti-CCR8. Una de las explicaciones de ello es la baja expresión de CCR8 de ratón y humano en PBMC, el bazo y el ganglio linfático en comparación con los tejidos tumorales según los informes. Sin embargo, ninguno de estos informes anteriores afirma si se induce o no una enfermedad autoinmune agotando o inhibiendo la funcionalidad de linfocitos Treg que expresan CCR8 en estos tejidos periféricos. En este punto, se observó por primera vez que estos enfoques no inducen ninguna enfermedad autoinmune. Es posible que no se espere este efecto de hallazgos anteriores.

Ejemplo 15

Evaluación del efecto antitumoral de la administración de anticuerpos anti-mCCR8 utilizando Colon-26 derivadas de cáncer colorrectal

Se trasplantaron por vía intracutánea 2×10^5 células Colon-26 derivadas de cáncer colorrectal (50 μ L) en el dorso de cada ratón Balb/c (7 semanas de vida, hembra). 3 días después de la inoculación del tumor, se administraron por vía intravenosa 400 μ g (400 μ L) de un anticuerpo de CCR8 anti-ratón de rata (clon SA214G2, BioLegend, Inc.) (N = 10). Se administró un anticuerpo de control de isotipo a un control (N = 10). Se midieron volúmenes de tumor cada 3 a 4 días a partir de 3 días después de la inoculación del tumor (5 días después de la administración de anticuerpos). Se calculó el volumen del tumor (mm^3) según el eje mayor (mm) \times eje menor (mm) \times eje menor (mm)/2. El punto en el tiempo en el que el tumor alcanzó un volumen del criterio de valoración (800 mm^3) se utilizó como criterio de valoración de cada animal. Como resultado, se suprimió el aumento en el volumen del tumor en el grupo de administración de anti-mCCR8 en comparación con el grupo de administración de anticuerpos de control de isotipo a los 14 y 18 días después de la inoculación del tumor. El volumen de tumor medio el día 14 fue de $451,3 \text{ mm}^3$ (desviación típica: $\pm 177,5 \text{ mm}^3$) en el grupo de administración de anticuerpos de control de isotipo y $322,6 \text{ mm}^3$ (desviación típica: $\pm 146,0 \text{ mm}^3$) en el grupo de administración de anticuerpos anti-CCR8. Los individuos que tuvieron un volumen de tumor de 350 mm^3 o mayor el día 14 fueron 9 de cada 10 casos en el grupo de control de isotipo y 4 de cada 10 casos en el grupo de administración anti-mCCR8. Hubo una diferencia significativa con $P = 0,019$ en la prueba de chi-cuadrado de Pearson en cuanto a esta forma segregada. Por lo tanto, se observó la diferencia en el número de individuos cuyo volumen de tumor alcanzó 350 mm^3 el día 14. Asimismo, el volumen de tumor medio en el día 18 tras el trasplante fue de $874,7 \text{ mm}^3$ (desviación típica: $\pm 269,2 \text{ mm}^3$) en el grupo de administración de anticuerpo de control de isotipo y

585,4 mm³ (desviación típica: ± 401,7 mm³) en el grupo de administración de anticuerpos anti-CCR8 (Figura 22). Los individuos que tuvieron un volumen de tumor de 600 mm³ o mayor el día 18 fueron de 9 de cada 10 casos en el grupo de control de isotipo y, por otro lado, 4 de cada 10 casos en el grupo de administración de anti-mCCR8. Hubo una diferencia significativa con P = 0,019 en la prueba de chi-cuadrado de Pearson en cuanto a esta forma segregada. Por lo tanto, se observó la diferencia en el número de individuos cuyo volumen de tumor alcanzó los 600 mm³ el día 18. Además, el punto en el tiempo en el que el volumen del tumor alcanzó los 800 mm³ fue preestablecido como criterio de valoración. No se observaron individuos que se consideraron muertos con un volumen de tumor superior a 800 mm³ en ninguno de los grupos hasta el día 14 y fueron 7 de cada 10 casos en el grupo de control de isotipo y 3 de 10 casos en el grupo de anticuerpos anti-CCR8 el día 18. Como resultado del estudio de una diferencia en la probabilidad de supervivencia el día 18 mediante la prueba de chi-cuadrado de Pearson, hubo una diferencia significativa en la probabilidad de supervivencia con P = 0,025.

No se observó ningún efecto antitumoral en un grupo de administración anti-PD-1 (clon RMP1-14, Bio X Cell) en comparación con un grupo al que se administró un anticuerpo de control de isotipo en un experimento similar utilizando la misma línea celular que anteriormente. En conclusión, el anticuerpo anti-mCCR8 presentó un mayor efecto antitumoral en las células Colon26 resistentes a anticuerpos anti-PD-1.

Ejemplo 16

Análisis de la expresión de CCR8 en células infiltrantes de cáncer de riñón humano

Se analizó la expresión de CCR8 en células infiltrantes de tumor de cáncer de riñón humano de 14 casos. Los antecedentes de los 14 pacientes con cáncer de riñón fueron 11 hombres y 3 mujeres en cuanto al sexo, una mediana de edad de 68,5 años y estadios patológicos de T1A para 6 pacientes, T1B para 2 pacientes, T3A para 5 pacientes y T3b para 1 paciente. Específicamente, se aislaron células infiltrantes de tumor primario de cáncer de riñón de los 14 pacientes con cáncer de riñón (carcinoma de células renales de células claras, ccRCC) de la misma manera que en la Figura 1 del ejemplo 1, se tiñeron con anticuerpo anti-CD4 (BioLegend, Inc., Clon OMT4), anti-CD3 (BioLegend, Inc., Clon UCHT1), anti-CD45RA (BD Biosciences, Clon HI100), anti-CD8 (BioLegend, Inc., RPA-T8), anti-CCR8 (BioLegend, Inc., Clon L263G8) y anti-FoxP3 (eBioscience, Inc., Clon 236A/E7) o un anticuerpo de control de isotipo anti-FoxP3, y se analizaron por citometría de flujo (BD Biosciences, BD LSRFortessa). Se analizaron los linfocitos T CD3+ CD8+ y los linfocitos T CD3+ CD4+. Los linfocitos T CD3+ CD4+ se dividieron además en 2 grupos según la presencia o ausencia de expresión de FoxP3 y se analizaron. Se preparó un control negativo de expresión de FoxP3 por tinción con el anticuerpo de control de isotipo. El valor medio del análisis FACS (IFM) de cada muestra de paciente se utilizó como la intensidad de expresión de CCR8. La Tabla 1 muestra la IMF media de tinción con el anticuerpo anti-CCR8 o el anticuerpo de control de isotipo y una desviación típica del mismo

[Tabla 1]

Célula	T CD8+		T FoxP3-CD4+		T FoxP3+CD4+	
	Isotipo	Anti-mCCR8	Isotipo	Anti-mCCR8	Isotipo	Anti-mCCR8
IFM media	84,9	267	56,9	423	131,3	3507,2
Desviación típica	26,8	159	62,1	297,5	59	1466,3

Se observó que los linfocitos T CD8+ raramente expresaron CCR8 (Tabla 1). Los linfocitos T CD4+ FoxP3- expresaron ligeramente CCR8, mientras que los linfocitos T CD4+ FoxP3+ tuvieron 8 veces o más la IMF media de los linfocitos T CD4+ FoxP3-, lo cual revela que los linfocitos T CD4+ FoxP3+ expresan significativamente fuerte CCR8 (Tabla 1). La Figura 23 muestra los resultados de la Tabla 1 en forma de gráfico. Cada diagrama del gráfico muestra el nivel medio de expresión CCR8 (IFM) de cada muestra de paciente en un citómetro de flujo. Las líneas horizontales del gráfico representan la IMF media de las muestras. Las barras representan desviaciones típicas. El nivel de significación *** representa P <0,001. A partir de estos resultados, se observó que la proteína CCR8 se expresa específicamente en la superficie de los linfocitos T CD3+ CD4+ FoxP3+ que infiltran tumores en el cáncer de riñón humano (ccRCC). Estos resultados están también en conformidad con los resultados de los análisis de expresión de ARNm mediante análisis de secuenciación del ARN.

Se sometieron a análisis de citometría de flujo los linfocitos T CD4+ infiltrantes de tumor en las 14 muestras de ccRCC descritas anteriormente utilizando FoxP3 y CCR8. Se trazó en gráfico la relación entre las células CCR8 positivas y las células FoxP3 positivas y la relación entre las células CCR8 positivas y las células FoxP3 negativas en función de la muestra (Figura 24). La tinción con un anticuerpo de control de isotipo sirvió como patrón negativo tanto para FoxP3 como para CCR8, y las células que tenían un valor igual o por encima de este umbral sirvieron como células positivas. Como resultado, la tasa de expresión de CCR8 de los linfocitos T CD3+ CD4+ FoxP3+ intratumorales fue aproximadamente 75% y la tasa de expresión de CCR8 de los linfocitos T CD3+ CD4+ FoxP3- fue aproximadamente del 10%.

A partir de estos resultados, se observó que CCR8 se expresaba en la mayoría de los linfocitos Treg que expresan FoxP3 entre las células infiltrantes de tumor de cáncer de riñón humano y se expresaba en aproximadamente el 10% de los linfocitos T CD4 positivos distintos de los linfocitos Treg. A partir de estos resultados, la tasa de expresión de CCR8 de los linfocitos Treg FoxP3 positivos intratumorales humanos fue similar a la de los linfocitos Treg intratumorales de ratón, lo cual indica la posibilidad de que el anticuerpo específico para CCR8 antihumano puede agotar la mayoría de los linfocitos Treg FoxP3 positivos infiltrantes de tumor como en los ratones.

Ejemplo 17

Correlación de la tasa de expresión de CCR8 de células infiltrantes de tumor en varios cánceres con probabilidad de supervivencia

Se ha identificado el gen FoxP3 como un gen que se expresa específicamente en los linfocitos Treg y no se expresa en las células tumorales o en la mayoría de las células humanas normales. Por ejemplo, el gen FoxP3 como gen marcador de linfocitos Treg, el gen CD3G como gen marcador de linfocitos T y células NK y el gen CD8A como gen marcador de linfocitos T CD8 positivos se conocen como los denominados genes marcadores, que son expresados únicamente en ciertas células específicas, tal como se ha mencionado.

También se ha reseñado en cuanto al gen FoxP3, un gen marcador de linfocitos Treg, que puede medirse el nivel de expresión de ARNm del gen FoxP3 dentro de cada tumor y, por lo tanto, utilizarse como índice para la relación de abundancia de linfocitos Treg dentro del tumor (Cell, 2015, Vol. 160, p. 48-61).

Tal como se reseña también en el presente documento, si la relación de abundancia intratumoral de los linfocitos Treg está relacionada o no con una probabilidad de supervivencia puede analizarse dibujando una curva de supervivencia de Kaplan-Meier en cuanto a la tasa de expresión intratumoral (relación de abundancia de Treg) del gen marcador y las probabilidades de supervivencia de los pacientes a través del uso de una base de datos ARN-Seq como TCGA. Los datos de ARN-Seq sobre masas tumorales son datos mixtos sobre ARNm expresado tanto en células de tumor como en células infiltrantes presentes en ellos (linfocitos, células vasculares, etc.). Sin embargo, un gen que, tal como se muestra, no se expresa en las células de tumor puede considerarse como un gen expresado en las células infiltrantes de tumor. Mediante su uso, es posible identificar las células infiltrantes de tumor por análisis, tal como se ha descrito anteriormente, es decir, análisis sobre la expresión del gen marcador utilizando los datos de ARN-Seq sobre masas tumorales. Asimismo, el nivel de expresión de un gen marcador en una masa tumoral puede considerarse como el producto de un recuento de células de expresión de célula en particular, que corresponde al gen marcador, que infiltra la masa tumoral, y el nivel de expresión del gen marcador en cada célula de expresión.

En este contexto, si el nivel de expresión del gen marcador en cada célula es casi constante de un individuo a otro, el nivel de expresión está en proporción directa con un recuento de células infiltrantes. Por lo tanto, se puede calcular individualmente un recuento de células de expresión intratumoral a través del uso de este nivel de expresión y se puede comparar de un individuo a otro.

(Análisis de expresión CCR8 a nivel celular)

Los datos de expresión de ARN de 1037 tipos diferentes de líneas celulares humanas están registrados en una base de datos pública CCLE (Enciclopedia de líneas celulares de cáncer). Se analizó si se expresaba el gen CCR8 o CD3G en células cancerosas distintas a los linfocitos T o células normales utilizando la base de datos.

Se analizó la expresión de ARNm de CD3G y CCR8 en cuanto a líneas celulares derivadas de cáncer de riñón, cáncer de próstata y cáncer de vejiga utilizando la base de datos CCLE.

Las líneas celulares examinadas fueron 40 líneas celulares derivadas de cáncer de riñón VMRCRCW, SKRC20, SNU34, SKRC31, UOK10, SLR20, OSRC2, TUHR14TKB, SLR24, HK2, A498, RCC4, KMRC1, RCC10RGB, ACHN, SLR25, SNU1272, UMRC6, SLR23, 769P, SLR21, HEKTE, CAK11, TUHR4TKB, KMRC2, VMRCRCZ, KMRC3, KMRC20, CAK12, BFTC909, 786O, A704, TUHR10TKB, SLR26, UMRC2, CAL54, FURPNT1, FURPNT2, HEK293, y G402;

8 líneas celulares derivadas de cáncer de próstata

VCAP, LNCAPCLONEFGC, DU145, PC3, 22RV1, PRECLH, MDAPCA2B, y NCIH660; y

2 líneas celulares derivadas de cáncer de vejiga:

TCBC14TK y TCBC2TKB.

En todas estas líneas celulares de cáncer sólidas examinadas, la expresión de CCR8 y CD3G estuvo en el mismo nivel que el nivel de fondo y no se observó expresión de ARNm (incluso el valor máximo que indica la expresión fue 1/500 o menos del nivel de expresión de G3PDH y todos los demás valores fueron 1/1000 o menos del nivel de expresión de G3PDH). En síntesis, se pudo confirmar que CCR8 y CD3G raramente se expresan en células cancerosas sólidas. También se analizaron las células normales primarias derivadas de cada tejido humano de la

misma manera a la expuesta. Se observó que CCR8 y CD3G se expresan únicamente en algunas células hematopoyéticas y raramente se expresan en otras células normales primarias derivadas de tejidos.

5 Estos resultados mostraron que las células de estos 3 cánceres no expresan ni CCR8 ni CD3G. Por lo tanto, se concluyó que los datos de expresión de ARN TCGA utilizados para masas tumorales de cáncer de riñón, cáncer de próstata y cáncer de vejiga reflejan la expresión de ARNm de CCR8 y CD3G en células normales infiltrantes, distintas a células cancerosas, presentes en las masas tumorales.

(Análisis mediante el uso de la base de datos pública TCGA)

10 A continuación, se analizó la relación entre el gen CCR8 y el gen CD3G (CCR8/CD3G) expresado en el tumor de cáncer de riñón, cáncer de próstata o cáncer de vejiga, y las probabilidades de supervivencia de los pacientes mediante el uso de la base de datos pública TCGA. Se observó que un gen que se correlaciona máximamente (correlación de Pearson) por lo que respecta a la expresión con los genes CCR8 y CD3G dentro de estos 3 tumores constituía varios genes expresados específicamente en linfocitos T (FoxP3, CD5, IL7R, etc., con un coeficiente de correlación r de 0,7 o más). Estos resultados indican que CCR8 o CD3G no se expresa en las células tumorales en sí y se expresa específicamente en células de expresión infiltrantes de tumor (particularmente, linfocitos T). Sin embargo, en este caso, se utilizó una población de células que expresan CCR8 ya que esto no niega que CCR8 se exprese en células infiltrantes distintas a linfocitos T. CD3G, tal como se ha reseñado ya en documentos, etc., se expresa específicamente en linfocitos T y células NK. Asimismo, los linfocitos T son células infiltrantes de tumor importantes. Por lo tanto, se puede plantear la hipótesis de un recuento de linfocitos T infiltrantes a partir de un nivel de expresión de CD3G. Por lo tanto, el valor CCR8/CD3G se puede definir como un recuento de células que expresan CCR8 por recuento de linfocitos T presentes dentro de un tumor.

15 Se analizó la relación CCR8/CD3G y las probabilidades de supervivencia de los pacientes en cuanto a estos 3 carcinomas utilizando una curva de Kaplan-Meier. Para el cáncer de riñón, se utilizaron datos de carcinoma renal de células claras renales (TCGA, Provisional) en los datos de TCGA, y se utilizaron 523 casos que tenían datos completos de expresión de ARN y datos de probabilidad de supervivencia de los pacientes. Igualmente, para el cáncer de próstata, se utilizaron datos de adenocarcinoma de próstata (TCGA, provisional) en los datos de TCGA y se utilizaron 490 casos con datos completos de expresión de ARN y datos de probabilidad de supervivencia de los pacientes.

20 Asimismo, para el cáncer de vejiga, se utilizaron datos de carcinoma urotelial de vejiga (TCGA, provisional) en los datos de TCGA, y se utilizaron 392 casos que tenían datos completos de expresión de ARN y datos de probabilidad de supervivencia de los pacientes.

30 Se dividió a los pacientes de cada cáncer 2 grupos iguales (los pacientes con cáncer de riñón eran impares y, por lo tanto, se dividieron en 261: 262) con valores de expresión de CCR8/CD3G altos y con valores de expresión de CCR8/CD3G bajos, seguido del análisis de la curva de supervivencia de Kaplan-Meier utilizando el software analítico R (R-Studio). Se llevó a cabo la prueba de log-rango como una prueba de diferencia significativa. Los resultados sobre el cáncer de riñón se muestran en la Figura 25, los resultados sobre el cáncer de próstata se muestran en la Figura 26 y los resultados sobre el cáncer de vejiga se muestran en la Figura 27. Las líneas verticales en los gráficos muestran que los pacientes sobrevivieron, pero fueron tratados como personas que habían abandonado (en correspondencia con lo que se conoce como censores) en este punto esta vez porque el período de evaluación había terminado en este punto en el tiempo. Los valores en la abscisa representan el número de meses en todos los gráficos.

35 Como resultado, en los 3 carcinomas, los grupos con valores CCR8/CD3G altos tuvieron probabilidades de supervivencia de los pacientes significativamente bajas. Se observó que los grupos con una alta relación de células de expresión de CCR8 infiltrantes de tumor humano en linfocitos T tuvieron una reducida probabilidad de supervivencia. Esto sugiere que también en seres humanos, las células que expresan CCR8 tienen un efecto supresor sobre la inmunidad tumoral. Esto sugiere la posibilidad de que, como en el efecto antitumoral del anticuerpo anti-mCCR8 administrado a ratones, las células que expresan CCR8 intratumoral en seres humanos se agoten o eliminen específicamente mediante algún método para potenciar así la inmunidad tumoral y elevar la probabilidad de supervivencia.

Ejemplo 18**Confirmación de la expresión de CCR8 de ratón en células LM8 y células MethA**

Se cultivaron células LM8 derivadas de osteosarcoma o las células MethA derivadas de fibrosarcoma cutáneo en una placa de 6 pocillos y se retiró la solución de cultivo cuando confluyeron aproximadamente 50% de las células. Se añadieron 5 ml de EDTA/PBS 10 mM y se incubaron las células a 37°C durante 5 minutos. Como resultado, casi todas las células se disociaron, se suspendieron con una pipeta y, con lo cual fue posible separarlas en células casi individuales. Se lavaron las células dos veces con D-MEM/10% FCS, se suspendieron en D-MEM/10% FCS y se tiñeron en hielo con el equipo de reactivos Fixable Near IR Dead Cell Stain LIVE/DEAD® (Thermo Fisher Scientific Inc., L34975) y un CCR8 anti-ratón (SA214G2) o anticuerpo de control de isotipo. Al cabo de 1 hora, se lavaron las células tres veces con D-MEM/10% FCS y se analizaron en cuanto a la tasa de expresión de CCR8 de ratón utilizando un citómetro de flujo (FACSCanto II). Se estableció un fondo utilizando el anticuerpo de control de isotipo y se calcularon la proporción de células positivas igual o mayor que el nivel de fondo y la mediana de fluorescencia (Figura 28). Como resultado, no se observó ninguna diferencia en la mediana de la intensidad de fluorescencia de PE en ninguna de las dos células, y no se observaron las células positivas. En conclusión, estas células no fueron reconocidas por el anticuerpo de CCR8 anti-ratón y se confirmó que no expresaban CCR8 de ratón ni retenían un epítipo reactivo con el anticuerpo.

Ejemplo 19**Evaluación del efecto antitumoral de la administración de anticuerpos de CCR8 anti-ratón utilizando LM8 derivadas de osteosarcoma**

Se trasplantaron por vía intracutánea 3×10^5 células LM8 derivadas de osteosarcoma de ratón (50 μ l) en el dorso de cada ratón C3H/He (7 semanas de vida, macho). 3 días tras la inoculación del tumor, se administraron por vía intraperitoneal 400 μ g (400 μ L) de un anticuerpo de CCR8 anti-ratón de rata (clon SA214G2, BioLegend, Inc.) (N = 11). Se administró un anticuerpo de control de isotipo a un control (N = 10). Se midieron los volúmenes de tumor cada 3 a 4 días a partir de 7 días tras la inoculación del tumor (4 días tras la administración de anticuerpos). Se calculó el volumen de tumor (mm^3) según el eje mayor (mm) \times eje menor (mm) \times eje menor (mm)/2 (Figura 29). Como resultado, el volumen de tumor medio del grupo de administración de anti-mCCR8 en comparación con el grupo de administración de anticuerpos de control de isotipo disminuyó significativamente en todos los puntos en el tiempo de medición el día 18 tras el trasplante o más adelante (nivel de significación: *, P < 0,05 el día 18, **, P < 0,01 en los días 21, 24, 27 y 31, ***, P < 0,001 el día 35). Asimismo, los tumores desaparecieron en 6 de cada 11 ratones en el grupo de administración de anticuerpos de CCR8 anti-ratón y 1 de cada 10 ratones en el grupo de administración de anticuerpos de control de isotipo el día 31 tras la administración de anticuerpos. Hubo una diferencia significativa (P = 0,031) en la prueba de chi-cuadrado de Pearson realizada en esta forma segregada.

Ejemplo 20**Evaluación del efecto antitumoral de la administración de anticuerpos de CCR8 anti-ratón utilizando MethA derivadas de fibrosarcoma cutáneo**

Se trasplantaron por vía intracutánea 1×10^5 células MethA derivadas de fibrosarcoma cutáneo (50 μ l) en el dorso de cada ratón Balb/c (7 semanas de vida, hembra). 3 días tras la inoculación del tumor, se administraron por vía intraperitoneal 400 μ g (400 μ L) de un anticuerpo de CCR8 anti-ratón de rata (clon SA214G2, BioLegend, Inc.) (N = 5). Se administró un anticuerpo de control de isotipo a un control (N = 5). Se midieron los volúmenes de tumor cada 3 a 4 días a partir de 11 días tras la inoculación del tumor (8 días tras la administración de anticuerpos). Se calculó el volumen del tumor (mm^3) según el eje mayor (mm) \times eje menor (mm) \times eje menor (mm)/2 (Figura 30).

Como resultado, el volumen de tumor medio del grupo de administración de CCR8 anti-ratón en comparación con el grupo de administración de anticuerpos de control de isotipo se redujo significativamente en todos los puntos en el tiempo de medición el día 11 o tras el trasplante o más adelante (nivel de significación: *, P < 0,05 en todos los puntos en el tiempo). Asimismo, los tumores desaparecieron en 5 de cada 5 ratones en el grupo de administración de anticuerpos de CCR8 anti-ratón y 0 de cada 5 ratones en el grupo de administración de anticuerpos de control de isotipo el día 21 tras la administración de anticuerpos. Hubo una diferencia significativa (P = 0,0016) en la prueba de chi-cuadrado de Pearson realizada en esta forma segregada.

Ejemplo 21**Evaluación del efecto antitumoral de la administración de anticuerpos de CCR8 anti-ratón utilizando EMT6 derivadas de cáncer de mama**

Se trasplantaron por vía intracutánea 1×10^5 células EMT6 derivadas de cáncer de mama (50 μ l) en el dorso de cada ratón Balb/c (7 semanas de vida, hembra). 3 y 10 días tras la inoculación del tumor, se administraron por vía intraperitoneal 100 μ g (100 μ L) de un anticuerpo de CCR8 anti-ratón de rata (clon SA214G2, BioLegend, Inc.) (N = 20). Se administró un anticuerpo de control de isotipo a un control (N = 20). Se midieron los volúmenes de tumor cada

3 a 4 días a partir de 4 días tras la inoculación del tumor (1 día tras la administración de anticuerpos). Se calculó el volumen del tumor (mm^3) según el eje mayor (mm) \times eje menor (mm) \times eje menor (mm)/2 (Figura 31).

Como resultado, el volumen de tumor medio del grupo de administración de CCR8 anti-ratón en comparación con el grupo de administración de anticuerpos de control de isotipo disminuyó significativamente en todos los puntos en el tiempo de medición el día 10 tras el trasplante o más adelante (nivel de significación: **, $P < 0,01$ el día 10, ***, $P < 0,001$ en los días 14, 17 y 21). Asimismo, los tumores desaparecieron en 19 de cada 20 ratones en el grupo de administración de anticuerpos de CCR8 anti-ratón y en 2 de cada 20 ratones en el grupo de administración de anticuerpos de control de isotipo el día 21 tras la administración de anticuerpos. Hubo una diferencia significativa ($P < 0,0001$) en la prueba de chi-cuadrado de Pearson realizada en esta forma segregada.

10 Ejemplo 22

Confirmación de superioridad del anticuerpo de CCR8 anti-ratón con respecto al anticuerpo anti-PD-1

Se trasplantaron por vía intracutánea 2×10^5 células Colon26 derivadas de cáncer colorrectal (50 μl) en el dorso de cada ratón Balb/c (7 semanas de vida, hembra). 3 y 10 días tras la inoculación del tumor, se administraron por vía intravenosa 400 μg (400 μL) de un anticuerpo de control de isotipo, un anticuerpo de CCR8 anti-ratón de rata (clon SA214G2, BioLegend, Inc.) o un anticuerpo PD-1 anti-ratón (RMP1-14, Bio X Cell) ($N = 10$). Se midieron los volúmenes de tumor cada 3 a 4 días a partir de 3 días tras la inoculación del tumor. Se calculó el volumen de tumor (mm^3) según el eje mayor (mm) \times eje menor (mm) \times eje menor (mm)/2 (Figura 32). Como resultado, el volumen de tumor del grupo de administración de CCR8 anti-ratón en comparación con el grupo de administración de anticuerpos de isotipo disminuyó significativamente en los días 17, 20 y 24 (prueba no paramétrica de Steel: nivel de significación $P < 0,05$). No se observó ninguna diferencia significativa en el grupo de administración de anticuerpo anti-PD-1 en comparación con el grupo de administración de anticuerpos isotipo en ningún punto en el tiempo.

Los ratones como individuo portador de tumor con un volumen de 1000 mm^3 o mayor el día 24 posterior a la administración de anticuerpos fueron 7 de cada 10 ratones en el grupo de administración de anticuerpos isotipo, 2 de cada 10 ratones en el grupo de administración de anticuerpos de CCR8 anti-ratón y 7 de cada 10 ratones en el grupo de administración anti-PD-1. El grupo de administración anti-CCR8 tuvo una diferencia significativa tanto con respecto al grupo de administración de anticuerpos isotipo como del grupo de administración de anticuerpos anti-PD-1 en la prueba de chi-cuadrado de Pearson en cuanto a la forma segregada ($P = 0,025$ para ambos). En conclusión, se confirmó que la administración del anticuerpo de CCR8 anti-ratón produce un efecto terapéutico antitumoral en Colon26 de línea celular de cáncer colorrectal.

Asimismo, el volumen de tumor del grupo de administración de CCR8 anti-ratón en comparación con el grupo de administración de anticuerpo PD-1 anti-ratón disminuyó significativamente los 20 y 24 días tras la inoculación del tumor (prueba no paramétrica Steel-Dwass; nivel de significación $P < 0,05$). En conclusión, se observó un efecto terapéutico antitumoral más fuerte en la línea celular colorrectal de ratón en el grupo de administración de anticuerpo de CCR8 anti-ratón en comparación con el grupo de administración de anticuerpo anti-PD-1.

35 Ejemplo 23

Evaluación del efecto antitumoral de la administración de anticuerpos de CCR8 anti-ratón utilizando RAG de línea celular derivada de cáncer de riñón

Se realizó un estudio similar utilizando RAG de línea celular derivada de cáncer de riñón de ratón. Se trasplantaron por vía intracutánea 4×10^5 células RAG derivadas de cáncer de riñón (50 μl) en el dorso de cada ratón Balb/c (8 semanas de vida, hembra). 6 días tras la inoculación del tumor, se administraron por vía intraperitoneal 100 μg (100 μL) de un anticuerpo de control de isotipo ($N = 10$ excepto $N = 9$ el día 21), un anticuerpo de CCR8 anti-ratón de rata ($N = 10$) (clon SA214G2, BioLegend, Inc.) o un anticuerpo PD-1 anti-ratón ($N = 10$) (RMP1-14, Bio X Cell). Se midieron los volúmenes de tumor cada 3 a 4 días a partir de 6 días tras la inoculación del tumor. Se calculó el volumen de tumor (mm^3) según el eje mayor (mm) \times eje menor (mm) \times eje menor (mm)/2 (Figura 33). Como resultado, el volumen de tumor del grupo de administración de CCR8 anti-ratón en comparación con el grupo de administración de anticuerpos isotipo disminuyó significativamente los días 14, 17 y 21 tras la inoculación del tumor (prueba no paramétrica de Steel: nivel de significación $P < 0,05$). No se observó ninguna diferencia significativa en el grupo de administración de anticuerpos PD-1 anti-ratón en comparación con el grupo de administración de anticuerpos isotipo. En conclusión, se confirmó que la administración del anticuerpo de CCR8 anti-ratón produce un efecto terapéutico antitumoral en la línea celular de cáncer de riñón. Asimismo, el volumen de tumor del grupo de administración de CCR8 anti-ratón en comparación con el grupo de administración de anticuerpo PD-1 anti-ratón disminuyó significativamente el día 14 tras el trasplante (prueba no paramétrica de Steel-Dwass; nivel de significación $P < 0,05$). En conclusión, se observó un efecto terapéutico antitumoral más fuerte en la línea celular de cáncer de riñón de ratón en el grupo de administración de anticuerpo de CCR8 anti-ratón en comparación con el grupo de administración de anticuerpo PD-1 anti-ratón.

55

Ejemplo 24**Análisis sobre la presencia o ausencia de respuesta inflamatoria en ratón al que se administra CCR8 anti-ratón**

Se trasplantaron por vía intracutánea 2×10^5 células Colon26 derivadas de cáncer colorrectal (50 μ l) en el dorso de cada ratón Balb/c (7 semanas de vida, hembra). 3 y 10 días tras la inoculación del tumor, se administraron por vía intravenosa 400 μ g (400 μ L) de un anticuerpo CD198 (CCR8) anti-ratón de rata (clon SA214G2, BioLegend, Inc.) o un anticuerpo de control de isotipo (LTF-2, célula Bio X) (N = 10). Se midieron el peso corporal y el peso de cada órgano de ratón (pulmón, hígado, bazo, intestino delgado y ganglio inguinal) el día 24 tras el trasplante (Figura 34). Como resultado, tal como se muestra en la Figura 34, no se observó ninguna diferencia significativa en el peso corporal y el peso de cada órgano entre el grupo de administración de control (N = 10) y el grupo de administración de anticuerpos de CCR8 anti-ratón (N = 10). A partir de estos resultados, se concluyó que la administración de anticuerpo de CCR8 anti-ratón ni indujo respuesta inflamatoria ni una enfermedad autoinmune.

Ejemplo 25**Análisis de la expresión de CCR8 en diversas células infiltrantes de tumor clínicas**

Se analizó la expresión de CCR8 en células infiltrantes de tumor de cáncer de riñón humano, cáncer de ovario, cáncer de cuerpo uterino, cáncer colorrectal y cáncer de pulmón. El número de pacientes con diversos tumores clínicos utilizados en el análisis de expresión fueron 12 pacientes con cáncer de riñón, 14 pacientes con cáncer de ovario, 21 pacientes con cáncer de cuerpo uterino, 10 pacientes con cáncer colorrectal y 4 pacientes con cáncer de pulmón. Se aislaron varias células infiltrantes de tumor clínicas de la misma manera que en la Figura 1 del ejemplo 1 y se tiñeron con anticuerpos anti-CD45 (BioLegend, Inc., Clon H130) y anti-CCR8 (BioLegend, Inc., Clon L263G8), seguido de medición por citometría de flujo (BD Biosciences, BD LSRFortessa). Se analizó un recuento de células CCR8 positivas por peso tumoral y la relación entre células CCR8 positivas y leucocitos CD45positivos.

La Tabla 2 muestra un recuento medio de células CCR8 positivas por peso tumoral y su desviación típica. La Tabla 3 muestra una relación media entre células CCR8 positivas y leucocitos CD45 positivos y su desviación típica.

[Tabla 2]

Tipo de cáncer	Recuento de células CCR8-positivas ($\times 10^5$) por peso de tumor (g)	
	Media	Desviación típica
Cáncer de riñón	8,9	22,7
Cáncer de ovario	1,7	2,6
Cáncer del cuerpo uterino	13,1	28,5
Cáncer colorrectal	2,9	5,4
Cáncer de pulmón	21,8	36,9

[Tabla 3]

Tipo de cáncer	Relación (%) entre células CCR8-positivas y leucocitos CD45-positivos	
	Media	Desviación típica
Cáncer de riñón	5,6	5,2
Cáncer de ovario	5,2	6,6
Cáncer del cuerpo uterino	9,0	9,2
Cáncer colorrectal	6,2	6,5
Cáncer de pulmón	2,9	2,3

En los diversos tumores clínicos con cáncer de riñón como referencia, en cuanto al recuento de células CCR8 positivas por peso del tumor, el cáncer de ovario y el cáncer colorrectal presentaron una media menor que la del cáncer de riñón, y el cáncer de cuerpo uterino y el cáncer de pulmón presentaron una media más alta que el del cáncer de riñón.

En cuanto a la relación entre células CCR8 positivas y leucocitos CD45 positivos, el cáncer de ovario presentó una media equivalente a la del cáncer de riñón, y el cáncer de pulmón presentó una media menor que la del cáncer de riñón. Además, el cáncer de cuerpo uterino y el cáncer colorrectal presentaron una media mayor que la del cáncer de riñón. La expresión de CCR8 se confirmó en las células infiltrantes de tumor de cáncer de ovario, cáncer de cuerpo uterino, cáncer colorrectal y cáncer de pulmón, además de las células infiltrantes de tumor de cáncer de riñón humano. Estos resultados indicaron la posibilidad de que en el cáncer de riñón, así como en el cáncer de ovario, cáncer del cuerpo uterino, cáncer colorrectal y cáncer de pulmón, las células infiltrantes de tumor CCR8 positivas puedan agotarse utilizando el anticuerpo específico de CCR8 anti-humano.

Ejemplo 26

10 Evaluación del efecto antitumoral de la administración combinada de anticuerpo de CCR8 anti-ratón y anticuerpo anti-PD-1 utilizando EMT6 derivadas de cáncer de mama

Se trasplantaron por vía intracutánea 1×10^5 células EMT6 derivadas de cáncer de mama (50 μ l) en el dorso de cada ratón Balb/c (7 semanas de vida, hembra).

15 Al grupo de administración solamente del anticuerpo de CCR8 anti-ratón, se administraron por vía intravenosa 15 μ g de un anticuerpo de CCR8 anti-ratón (clon SA214G2, BioLegend, Inc.) (100 μ L). 3 y 10 días después de la inoculación de tumor, se administraron 200 μ g (100 μ L) de un anticuerpo de control de isotipo los días 8 y 13 tras la inoculación de tumor (N = 10). Al grupo de administración en solitario de anticuerpo anti-PD-1, se administraron por vía intravenosa 15 μ g (100 μ L) de un anticuerpo de control de isotipo los días 3 y 10 tras la inoculación de tumor y se administraron por vía intravenosa 200 μ g (100 μ L) de un anticuerpo PD-1 anti-ratón (RMP1-14, Bio X Cell) los días 8 y 13 tras la inoculación de tumor (N = 10). Para el grupo de administración combinada de un anticuerpo anti-PD-1 y anticuerpo de CCR8 anti-ratón se administraron por vía intravenosa 15 μ g (100 μ L) de anticuerpo de CCR8 anti-ratón de rata los días 3 y 10 tras la inoculación de tumor y se administraron por vía intravenosa 200 μ g (100 μ L) de anticuerpo anti-PD-1 los días 8 y 13 tras la inoculación de tumor (N = 10). Al grupo de control, se administraron por vía intravenosa 15 μ g (100 μ L) de un anticuerpo de control de isotipo los días 3 y 10 tras la inoculación de tumor y se administraron por vía intravenosa 100 μ L de PBS los días 8 y 13 tras la inoculación de tumor (N = 10). Se midieron los volúmenes de tumor cada 3 a 4 días a partir de 3 días tras la inoculación de tumor (1 día tras la administración de anticuerpo). Se calculó el volumen de tumor (mm^3) según el eje mayor (mm) x eje menor (mm) x eje menor (mm) / 2 (Figura 35).

En la comparación de un volumen de tumor medio entre los grupos de administración en solitario, el volumen de tumor medio fue significativamente pequeño en el grupo de administración de anticuerpos de CCR8 anti- de ratón en comparación con el grupo de administración de anticuerpos anti-PD-1 en los días 10, 14, 17, 20, 23 y 27 (método de Dunnett, nivel de significación: $P < 0,05$). Además, los tumores eran pequeños en el grupo de administración combinada en comparación con cada grupo de administración en solitario.

Se comparó también la tasa de remisión completa de los tumores los días 17 y 27 tras la inoculación de tumor. El día 17 tras el trasplante, la completa remisión de los tumores se presentó en 0 de cada 10 ratones en el grupo de control y el grupo de administración de anticuerpo anti-PD1 y 1 de cada 10 ratones en el grupo de administración de anticuerpo de CCR8 anti-ratón, mientras que los tumores remitieron completamente en 6 de cada 10 ratones en el grupo de administración combinada de anticuerpo anti-PD-1 y anticuerpo de CCR8 anti-ratón. El día 27 tras el trasplante, 2 y 3 de cada 10 ratones presentaron la completa remisión de los tumores en el grupo de control y el grupo de administración de anticuerpo anti-PD-1 respectivamente y 7 de cada 10 ratones en el grupo de administración de anticuerpo de CCR8 anti-ratón, mientras que los tumores remitieron completamente en 9 de cada 10 ratones en el grupo de administración combinada de anticuerpo anti-PD-1 y anticuerpo de CCR8 anti-ratón.

Se calculó adicionalmente la proporción de individuos portadores de tumor superior a 50 mm^3 o menos (Figura 36). Los tumores superiores a 50 mm^3 o menos en todos los individuos en el grupo de administración combinada de anticuerpo anti-PD-1 y anticuerpo de CCR8 anti-ratón (100%) el día 17 tras el trasplante y más adelante fueron 50 mm^3 o menos hasta día 27, mientras que la proporción fue 10% y 30% en el grupo de administración de anticuerpos anti-PD-1 en los días 17 y 27, respectivamente, y 70% en el grupo de administración de anticuerpos de CCR8 anti-ratón tanto en 17 como en 27 días tras la inoculación de tumor

Estos resultados demostraron que el grupo de administración combinada requiere un breve periodo de tiempo de regresión tumoral y tiene un fuerte efecto de regresión, en comparación con otros grupos de administración en solitario.

50

Ejemplo 27**Evaluación del efecto antitumoral de la administración combinada de anticuerpo de CCR8 anti-ratón y anticuerpo anti-PD-1 utilizando RAG de línea celular derivada de cáncer de riñón de ratón**

5 Se trasplantaron por vía intracutánea $4,5 \times 10^5$ células RAG derivadas de cáncer de riñón (50 μ l) en el dorso de cada ratón Balb/c (6 semanas de vida, hembra). Las células RAG utilizadas fueron células RAG (línea celular aclimatada) con una elevada eficiencia de injerto subcutáneo de ratón trasplantando, nuevamente a un ratón, un tumor injertado con éxito de antemano por inoculación subcutánea a un ratón Balb/c y repitiendo esta operación dos veces.

10 A un grupo de administración de anticuerpo anti-PD-1 en solitario, se administraron por vía intravenosa 50 μ g (100 μ L) de un anticuerpo anti-PD-1 (RMP1-14, Bio X Cell) 8 y 15 días tras la inoculación del tumor (N = 10). A un grupo de administración de anticuerpo de CCR8 anti-ratón en solitario, se administraron por vía intravenosa 25 μ g (100 μ L) de un anticuerpo de CCR8 anti-ratón de rata (clon SA214G2, BioLegend, Inc.) 8 y 15 días tras la inoculación del tumor (N = 10). Para un grupo de administración combinada de anticuerpo anti-PD-1 y anticuerpo de CCR8 anti-ratón, se mezclaron 50 μ g de un anticuerpo anti-PD-1 (RMP1-14, Bio X Cell) y 25 μ g de un anticuerpo de CCR8 de rata anti-ratón (clon SA214G2, BioLegend, Inc.) (100 μ L) y se administraron por vía intravenosa 8 y 15 días tras la inoculación del tumor (N = 10). A un grupo de control, se administraron por vía intravenosa 100 μ L de solución salina fisiológica 8 y 15 días tras la inoculación del tumor (N = 10).

Se midieron los volúmenes de tumor cada 3 a 4 días a partir de 8 días tras la inoculación del tumor. Se calculó el volumen del tumor (mm^3) según el eje mayor (mm) \times eje menor (mm) \times eje menor (mm)/2 (Figura 37).

20 Como resultado, se observó que los tumores tenían un tamaño reducido en el grupo de administración combinada de anticuerpo anti-PD-1 y anticuerpo de CCR8 anti-ratón en comparación con el grupo de administración en solitario de anticuerpo anti-PD-1 o anticuerpo de CCR8 anti-ratón.

Ejemplo 28**Análisis sobre la especificidad del anticuerpo de CCR8 anti-ratón utilizando ratón con deficiencia homocigótica de genes CCR8**

25 Se trasplantaron por vía intracutánea 3×10^5 células Colon26 derivadas de cáncer colorrectal (50 μ l) en el dorso de cada ratón de tipo silvestre (N = 10) o ratón con deficiencia homocigótica de genes CCR8 (N = 5) de linaje Balb/c. Para el ratón de tipo silvestre, se administraron por vía intravenosa 100 μ g (100 μ L) de un anticuerpo de CCR8 anti-ratón de rata (clon SA214G2, BioLegend, Inc.) o un anticuerpo de control de isotipo (LTF-2, Bio X Cell) 3 y 10 días tras la inoculación del tumor (N = 5). Se administraron también por vía intravenosa al ratón con deficiencia homocigótica en genes CCR8, 100 μ g (100 μ L) de un anticuerpo de CCR8 anti-ratón de rata (clon SA214G2, BioLegend, Inc.) o un anticuerpo de control de isotipo (LTF-2, célula Bio X) 3 y 10 días tras la inoculación del tumor (N = 5). Se midieron los tamaños de tumor desde el día 7 tras la administración.

35 Como resultado, se observó una regresión del tumor significativa y una regresión del tumor completa final en todos los ratones de tipo silvestre a través de la administración del anticuerpo de CCR8 anti-ratón en comparación con la administración del anticuerpo de control de isotipo. Por otro lado, no se observó ni cambio en el volumen de tumor ni regresión de tumor en los ratones con deficiencia homocigótica de genes CCR8 en el grupo de administración de anticuerpos de CCR8 anti-ratón en comparación con el grupo de administración de anticuerpos isotipo (Figura 38).

40 El efecto antitumoral del anticuerpo de CCR8 anti-ratón desapareció completamente en los ratones con deficiencia homocigótica del gen CCR8, lo cual demuestra que el anticuerpo de CCR8 anti-ratón (SA214G2) utilizado ejerce un efecto antitumoral a través de CCR8.

Aplicabilidad industrial

El anticuerpo contra CCR8 de la presente invención tiene el efecto de activar la inmunidad al disminuir el número de linfocitos Treg infiltrantes de tumor similares y, por lo tanto, es farmacéuticamente útil para el tratamiento de cánceres.

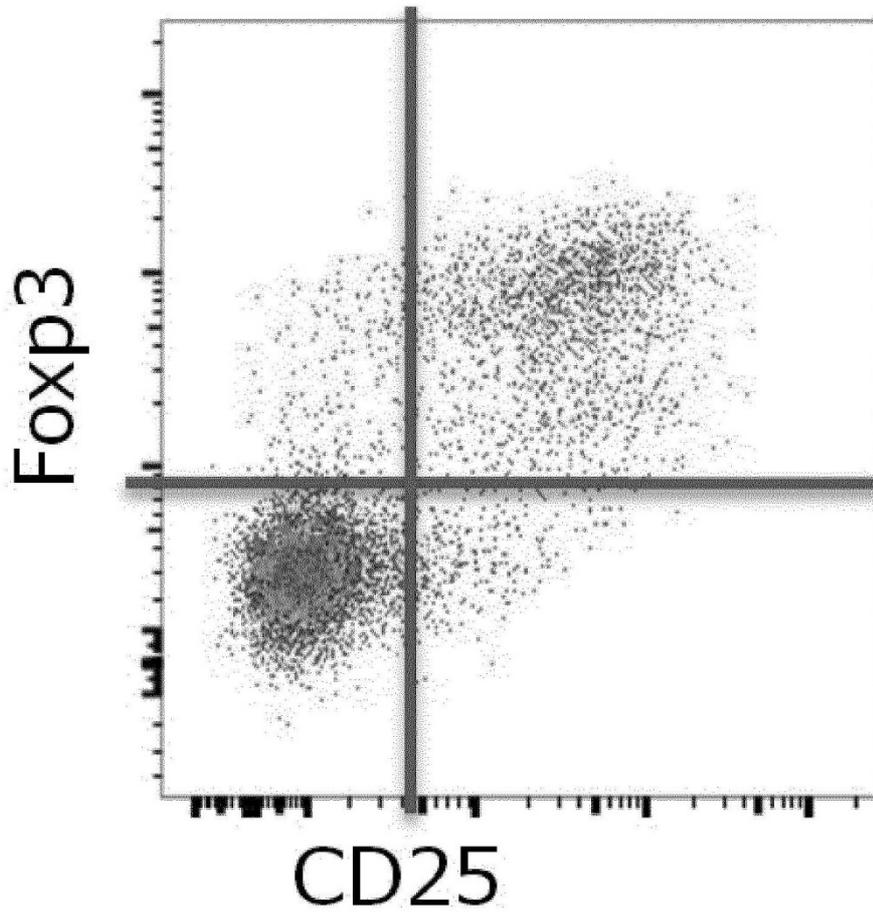
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo contra CCR8 que tiene actividad ADCC, para su uso en un método de tratamiento de un cáncer, en donde el anticuerpo contra CCR8 es un anticuerpo neutralizante de CCR8.
- 5 2. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo contra CCR8 tiene un efecto de agotar linfocitos Treg infiltrantes de tumor.
3. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde el anticuerpo contra CCR8 tiene un efecto de agotar células de macrófago infiltrantes de tumor.
4. El anticuerpo para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es para su uso en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1.
- 10 5. Un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1 para su uso en combinación con un anticuerpo contra CCR8 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en un método para tratar un cáncer.
6. Un medicamento para su uso en tratamiento de cáncer que comprende una combinación de un anticuerpo contra CCR8 que tiene actividad ADCC y un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1, en donde el anticuerpo contra CCR8 es un anticuerpo neutralizante de CCR8.
- 15 7. Una combinación de un anticuerpo contra CCR8 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1, para su uso en un método de tratamiento de un cáncer.
8. El anticuerpo contra CCR8 para su uso según la reivindicación 4 o el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 para su uso según la reivindicación 5 o el medicamento para su uso según la reivindicación 6 o la combinación para su uso según la reivindicación 7, en donde el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab o pembrolizumab o el anticuerpo anti-PD-L1 es atezolizumab, avelumab o durvalumab.
- 20 9. El anticuerpo contra CCR8 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 8 o el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 para su uso según la reivindicación 5 o la reivindicación 8 o la combinación para su uso según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer del cuerpo uterino, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de bazo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer esofágico, cáncer de vejiga, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, linfoma no Hodgkin, cáncer urotelial, sarcoma, cáncer de las células sanguíneas, como leucemia o linfoma, cáncer del conducto biliar, carcinoma de vesícula, carcinoma de tiroides, carcinoma testicular, carcinoma tímico o hepatocarcinoma.
- 25 10. El anticuerpo contra CCR8 para su uso según la reivindicación 9, el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 para su uso según la reivindicación 9 o la combinación para su uso según la reivindicación 9, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer del cuerpo uterino, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de riñón y sarcoma.
- 30 11. El anticuerpo contra CCR8 para su uso según la reivindicación 9, el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 para su uso según la reivindicación 9 o la combinación para su uso según la reivindicación 9, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón y sarcoma.
- 35 12. El anticuerpo contra CCR8 para su uso según la reivindicación 9, el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 para su uso según la reivindicación 9 o la combinación para su uso según la reivindicación 9, en donde el cáncer es cáncer de mama.
- 40 13. El anticuerpo contra CCR8 para su uso según la reivindicación 9, el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 para su uso según la reivindicación 9 o la combinación para su uso según la reivindicación 9, en donde el cáncer es cáncer del cuerpo uterino.
- 45 14. El anticuerpo contra CCR8 para su uso según la reivindicación 9, el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 para su uso según la reivindicación 9 o la combinación para su uso según la reivindicación 9, en donde el cáncer es cáncer de ovario.
15. El anticuerpo contra CCR8 para su uso según la reivindicación 9, el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 para su uso según la reivindicación 9 o la combinación para su uso según la reivindicación 9, en donde el cáncer es cáncer de pulmón.
16. El anticuerpo contra CCR8 para su uso según la reivindicación 9, el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 para su uso según la reivindicación 9 o la combinación para su uso según la reivindicación 9, en donde el cáncer es cáncer colorrectal.

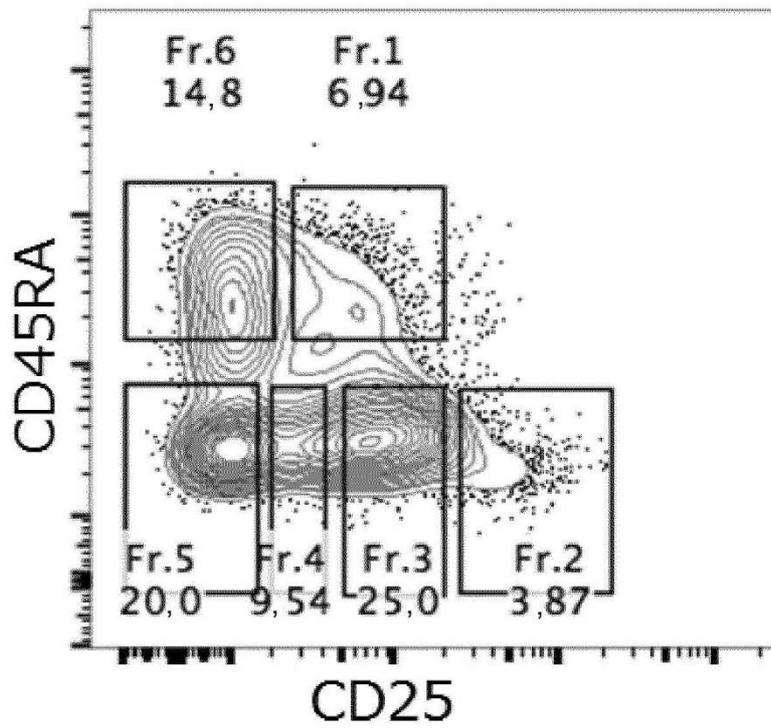
17. El anticuerpo contra CCR8 para su uso según la reivindicación 9, el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 para su uso según la reivindicación 9 o la combinación para su uso según la reivindicación 9, en donde el cáncer es cáncer de riñón.

5 18. El anticuerpo contra CCR8 para su uso según la reivindicación 9, el anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 para su uso según la reivindicación 9 o la combinación para su uso según la reivindicación 9, en donde el cáncer es sarcoma.

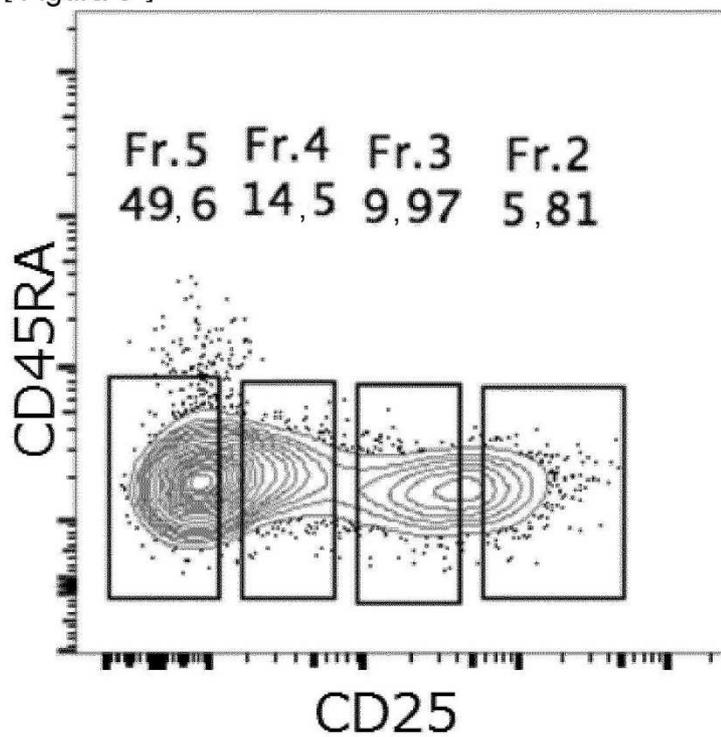
[Figura 1]



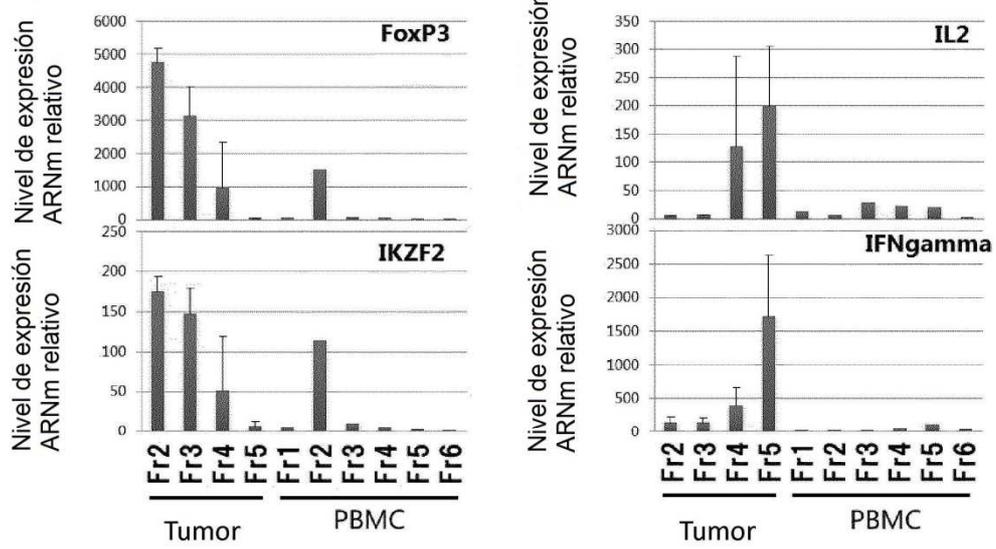
[Figura 2]



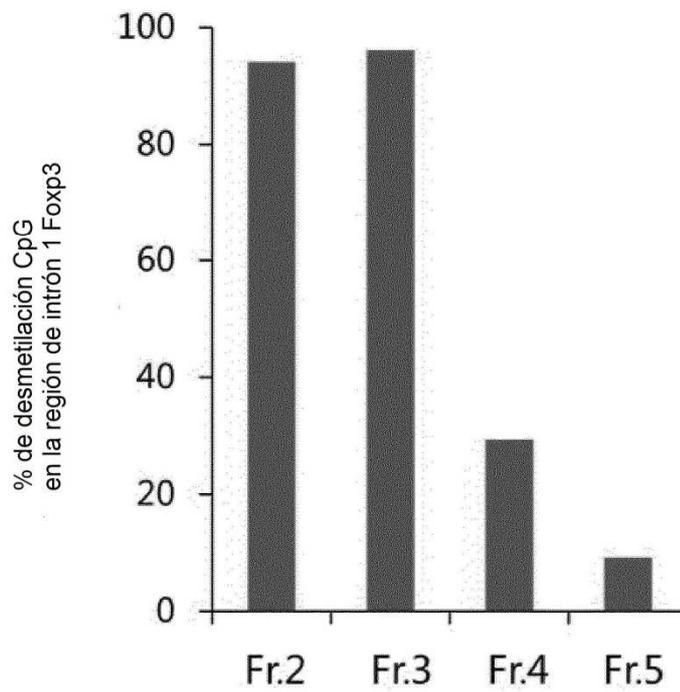
[Figura 3]



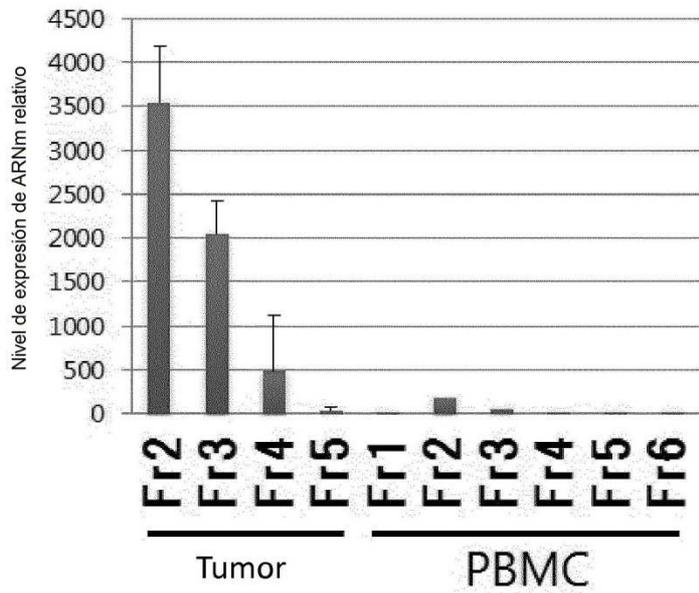
[Figura 4]



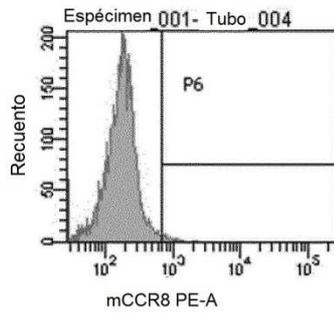
[Figura 5]



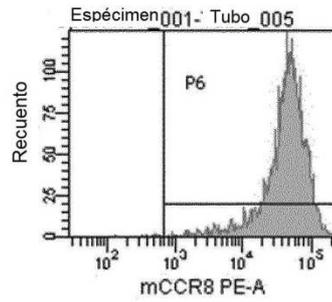
[Figura 6]



[Figura 7]

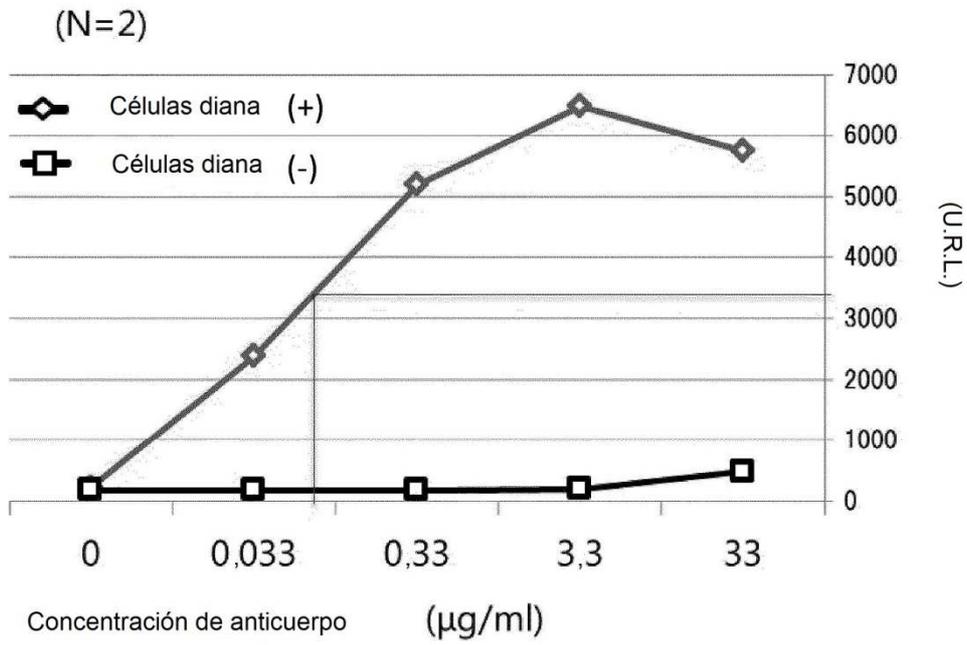


Control pcDNA3.4

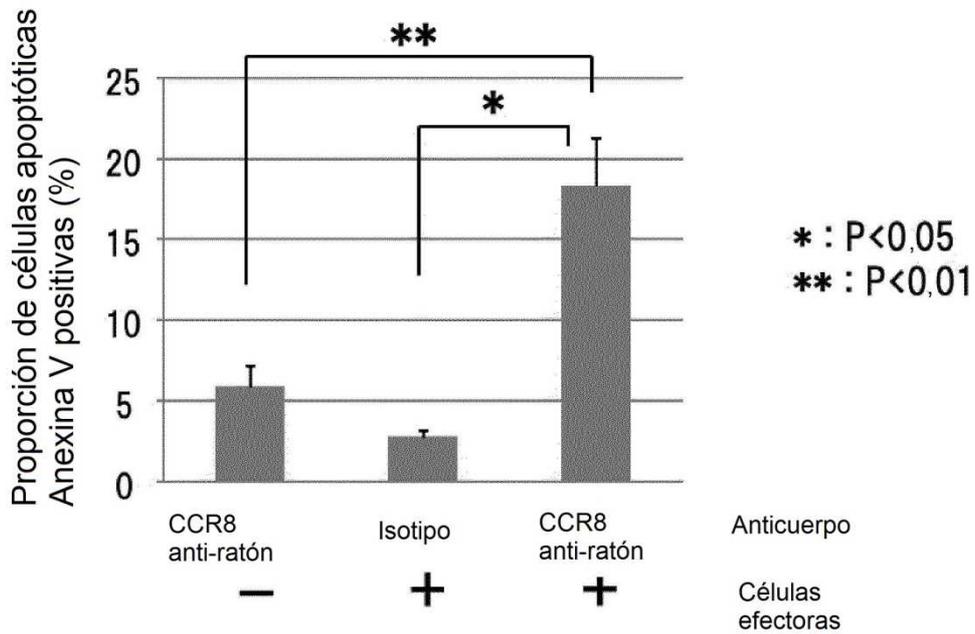


Célula que expresa pcDNA3.4-mCCR8

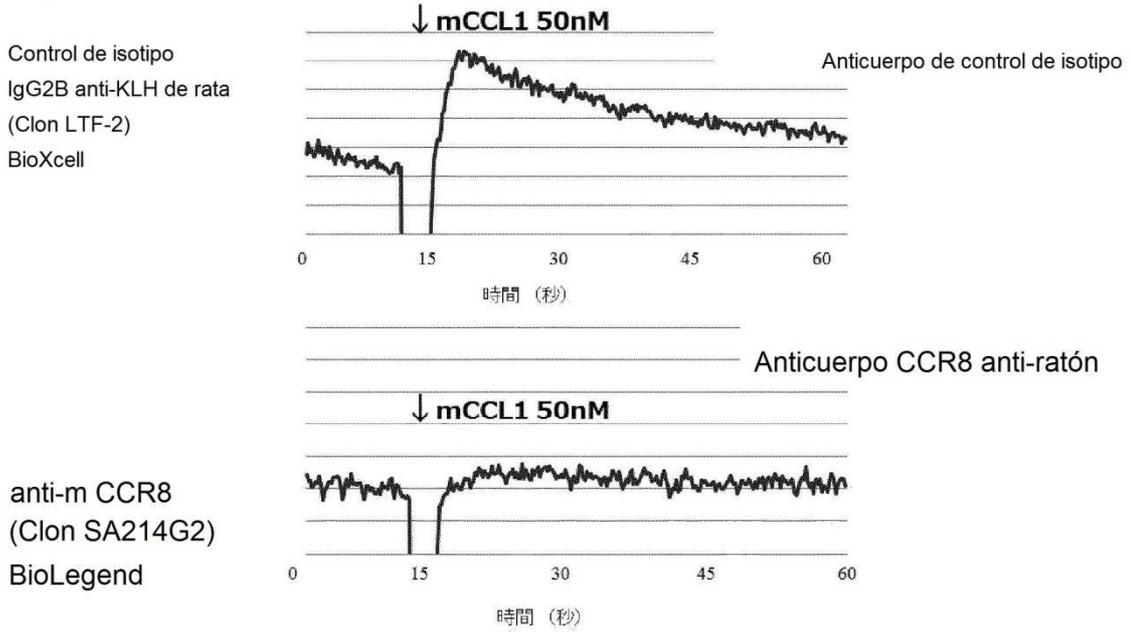
[Figura 8]



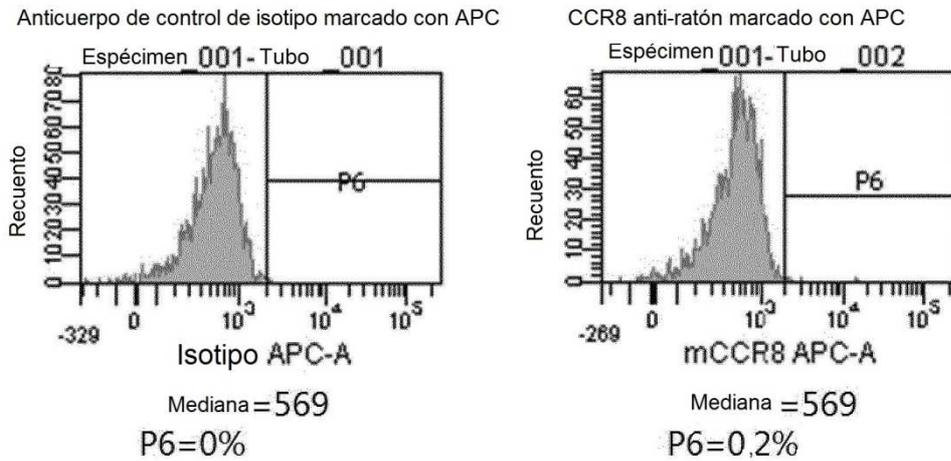
[Figura 9]



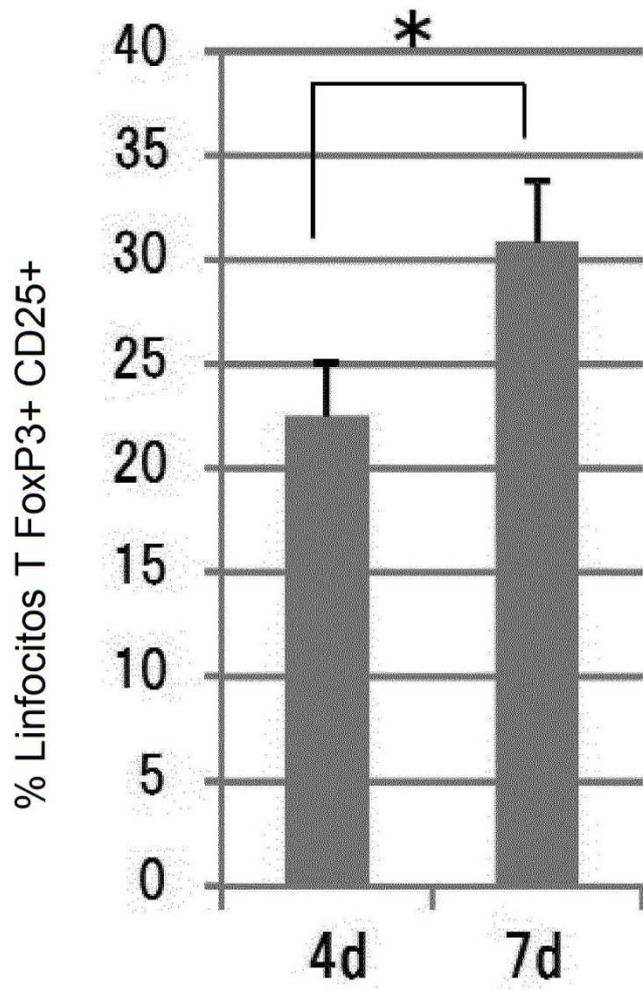
[Figura 10]



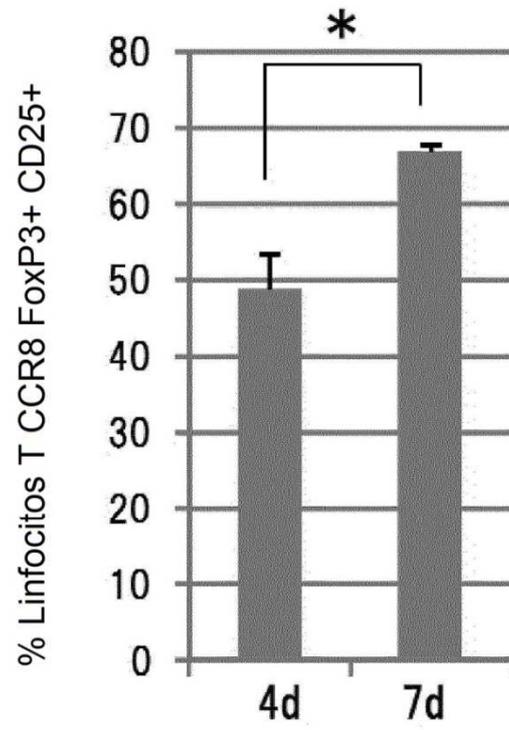
[Figura 11]



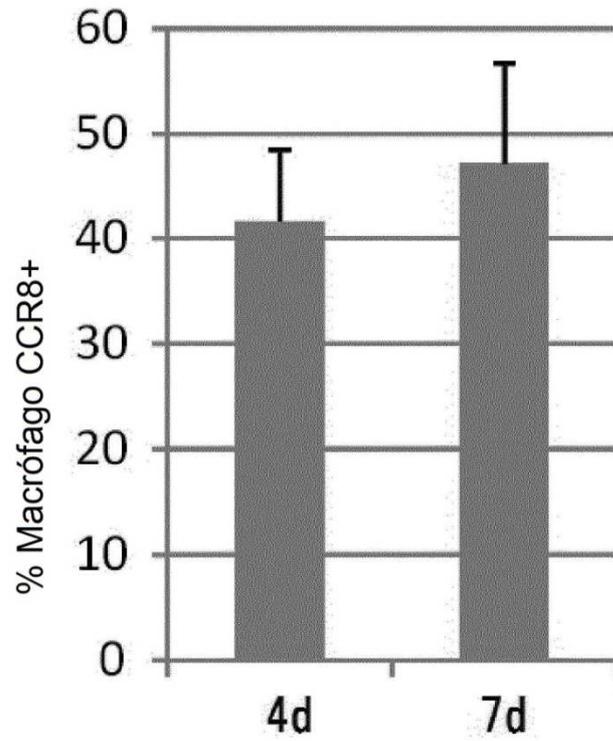
[Figura 12]



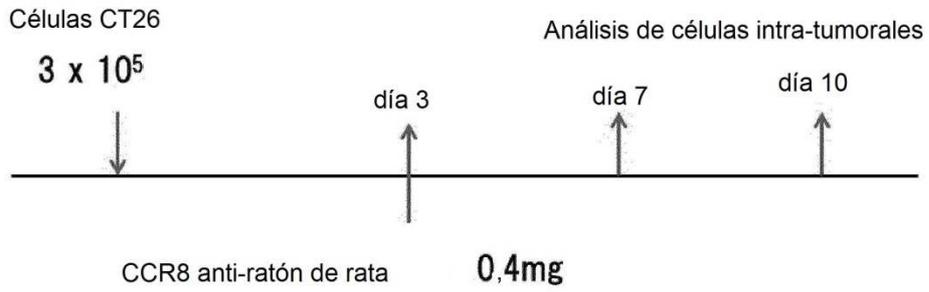
[Figura 13]



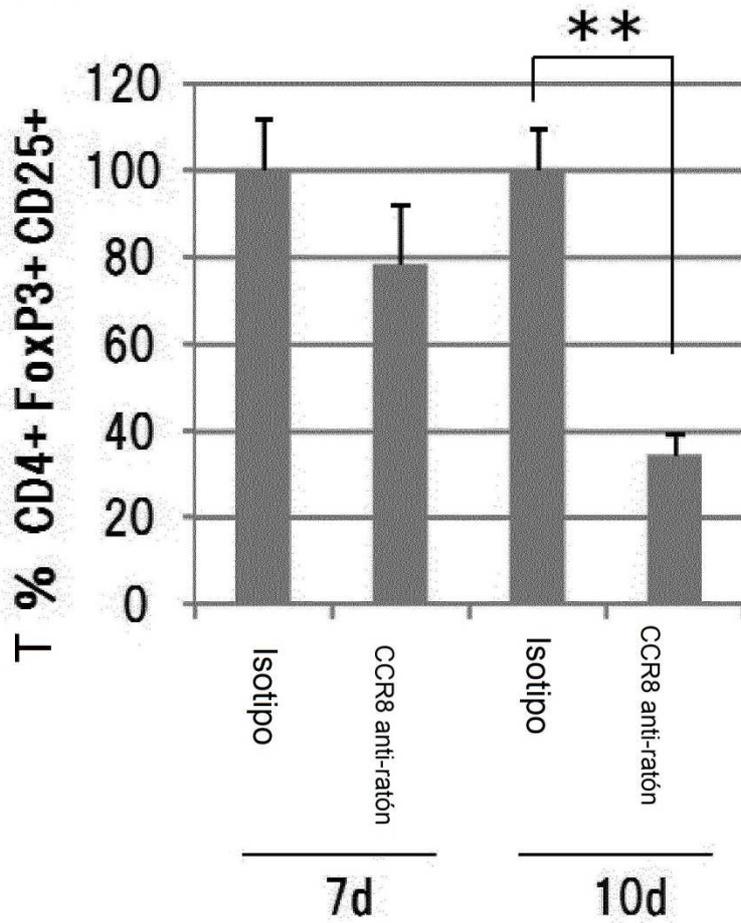
[Figura 14]



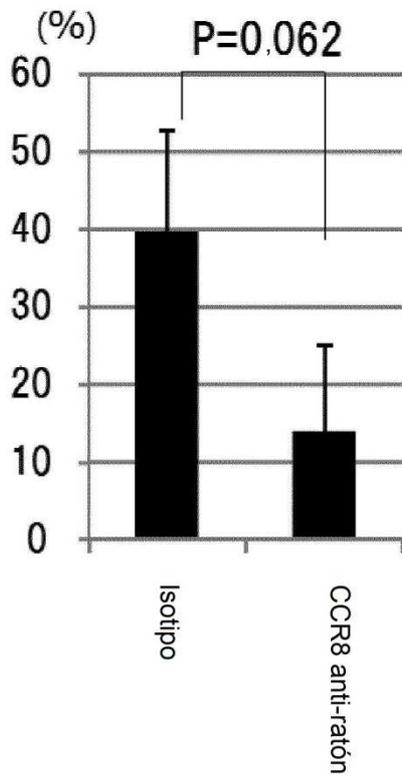
[Figura 15]



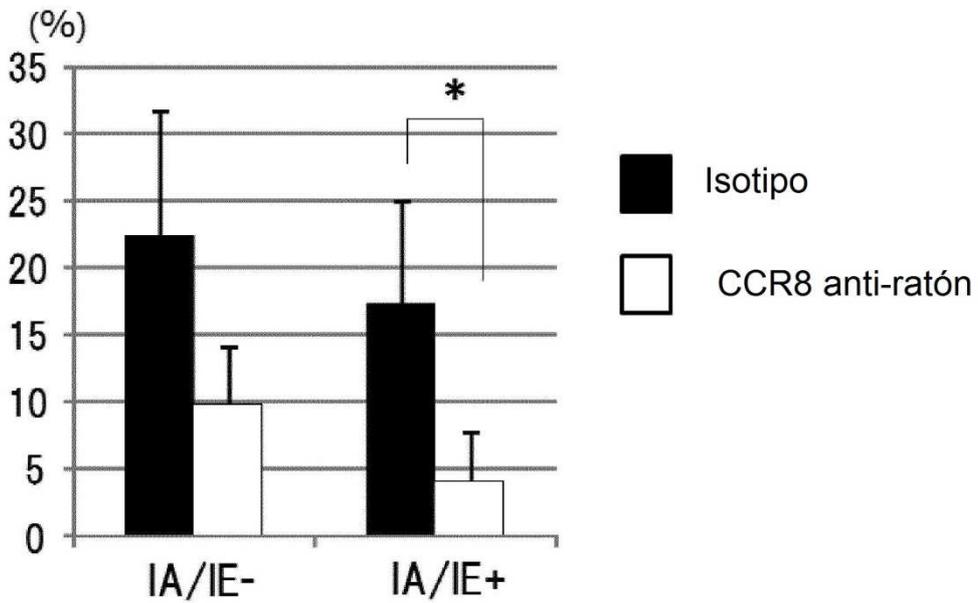
[Figura 16]



[Figura 17]



[Figura 18]

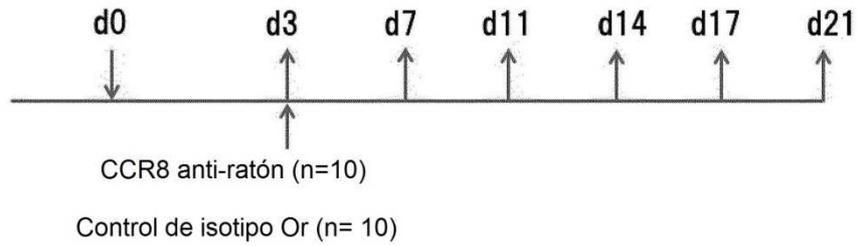


[Figura 19]

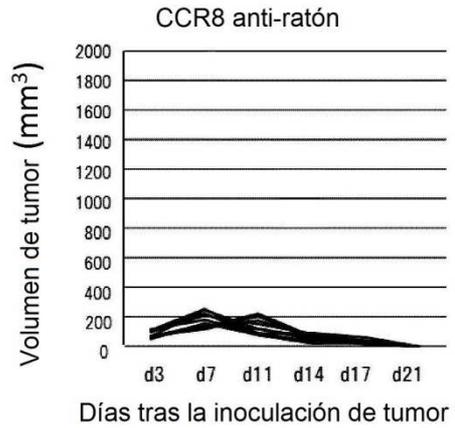
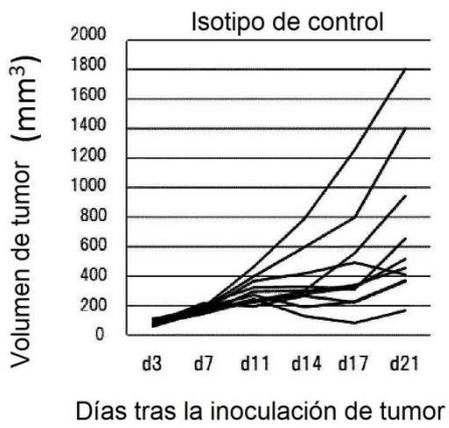
Inoculación célula CT26

3×10^5 células

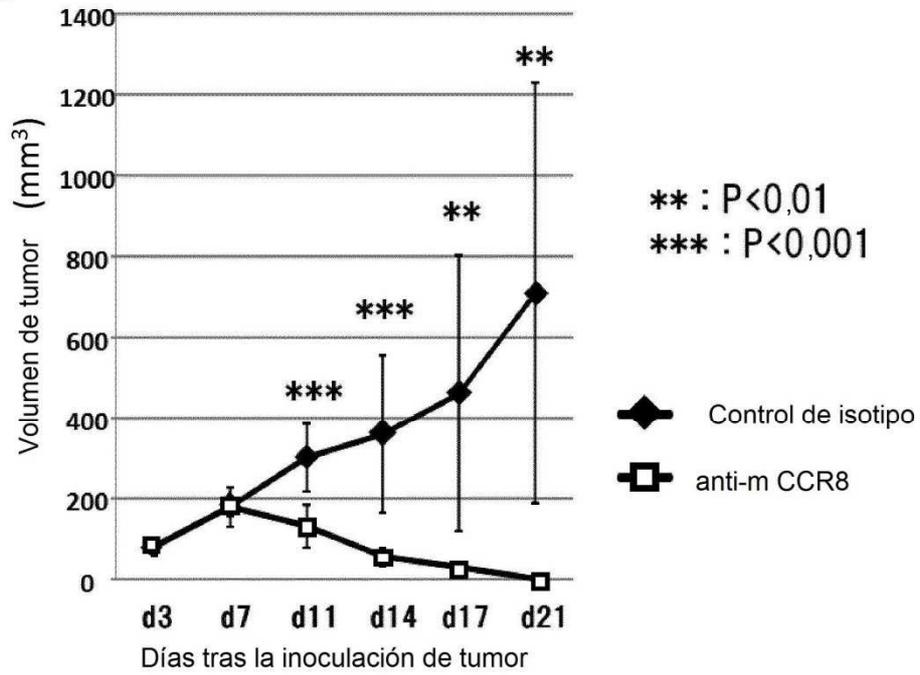
Medición del volumen de tumor



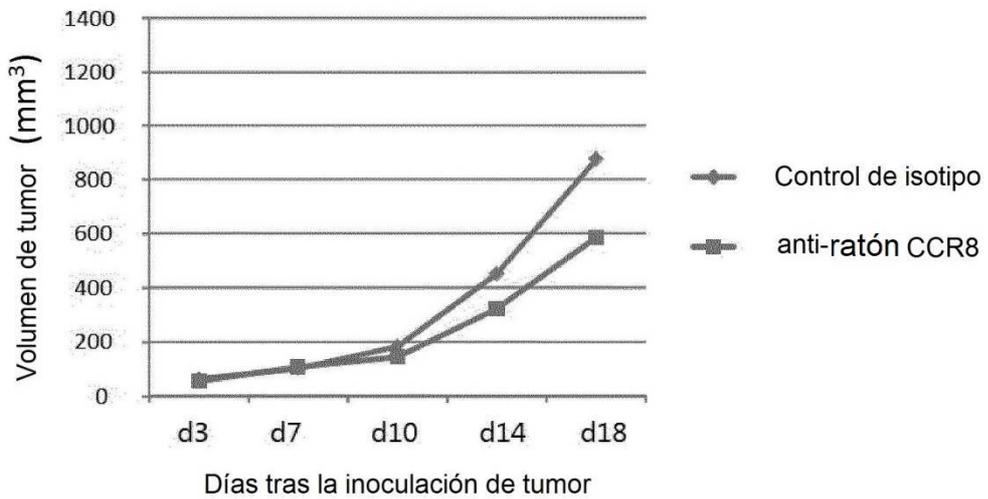
[Figura 20]



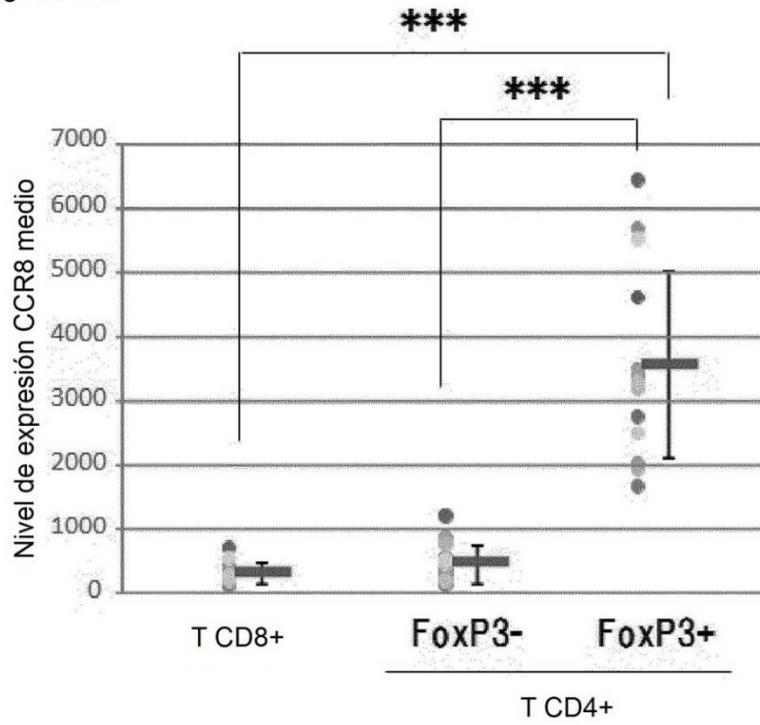
[Figura 21]



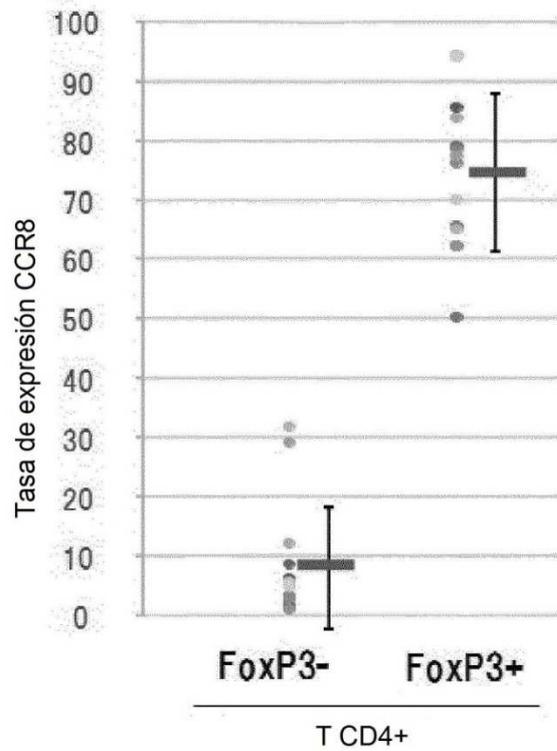
[Figura 22]



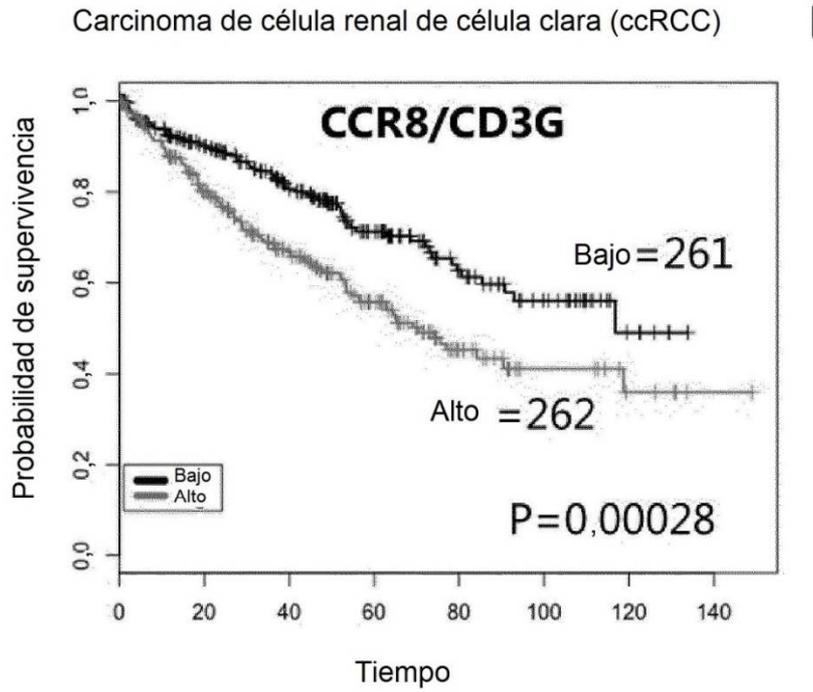
[Figura 23]



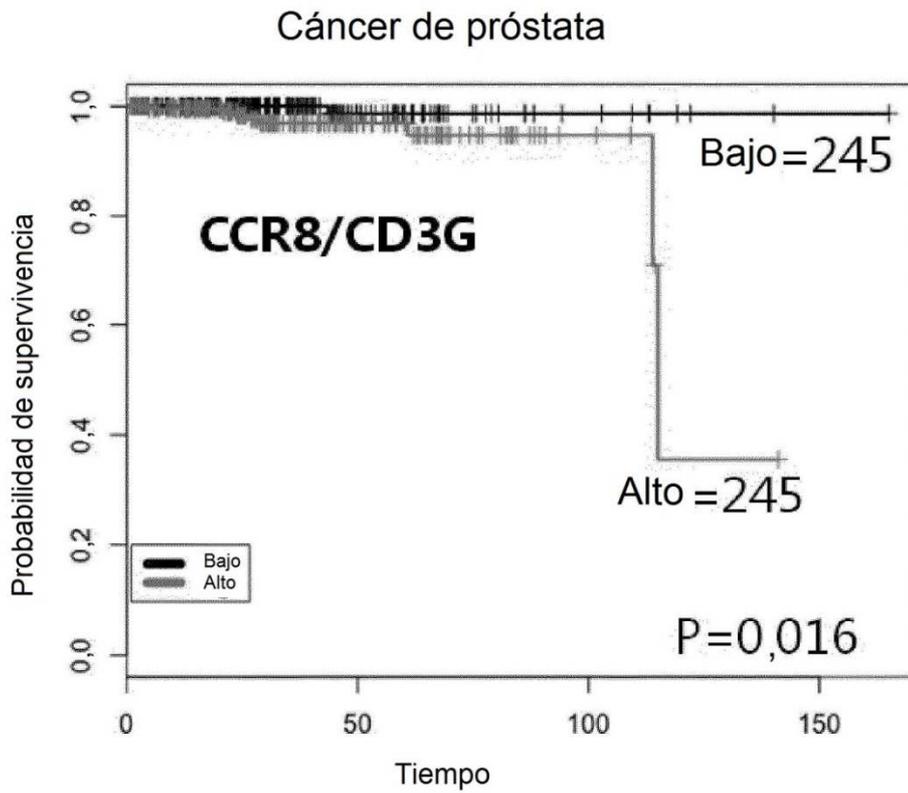
[Figura 24]



[Figura 25]

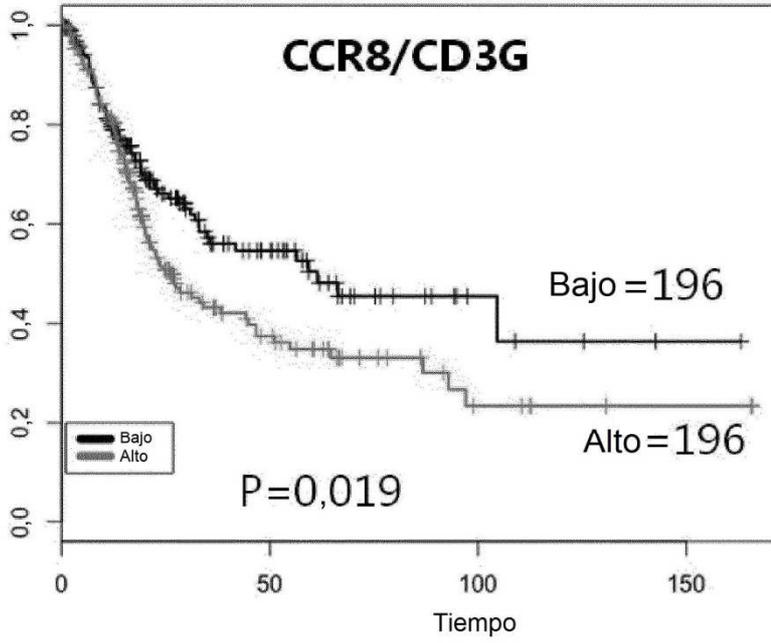


[Figura 26]

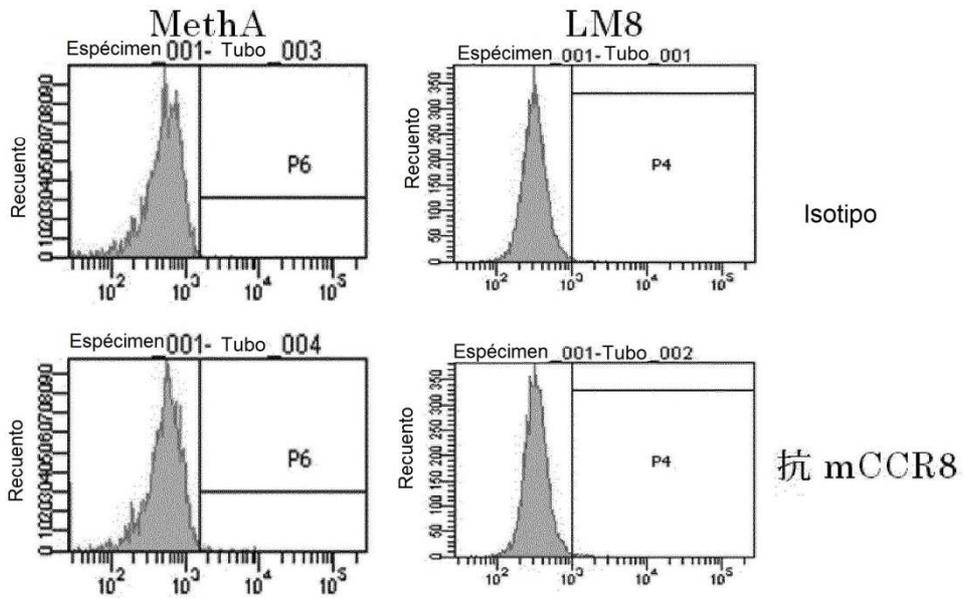


[Figura 27]

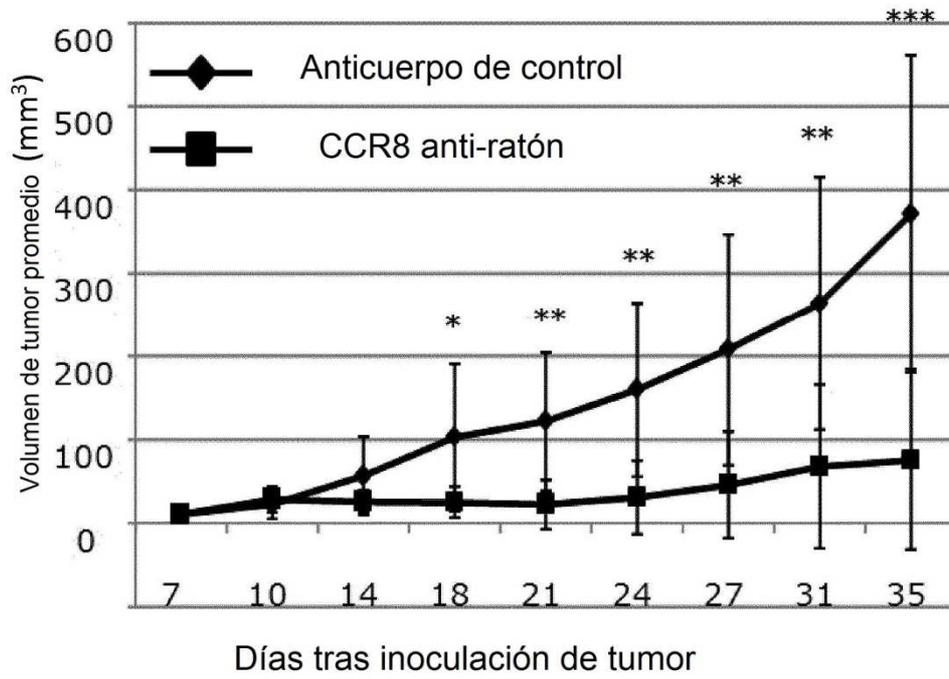
Cáncer de vejiga



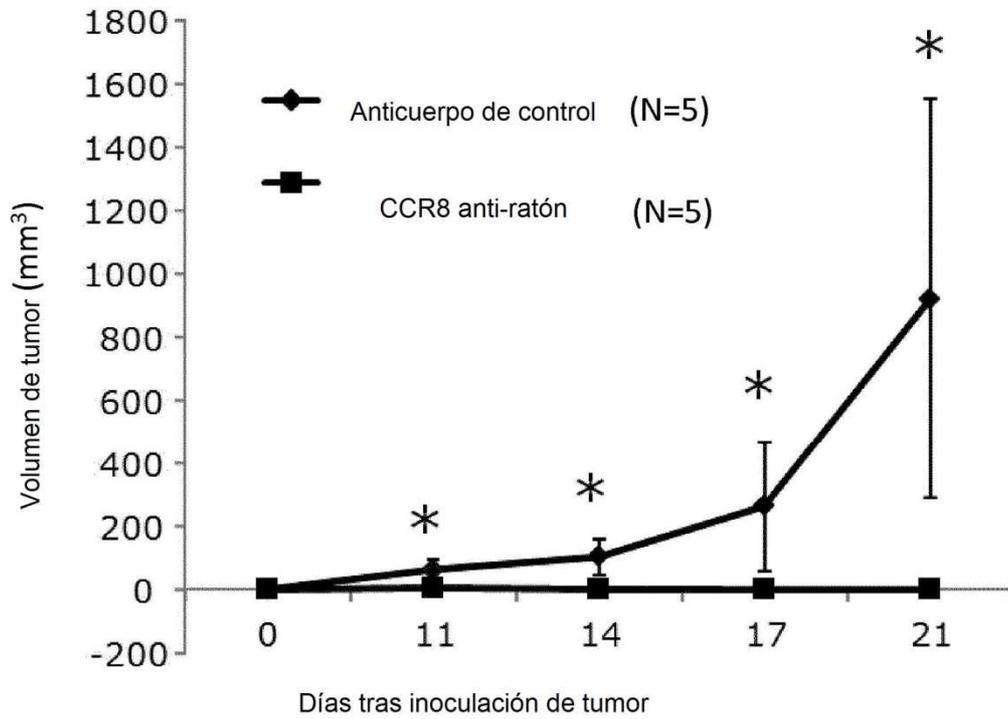
[Figura 28]



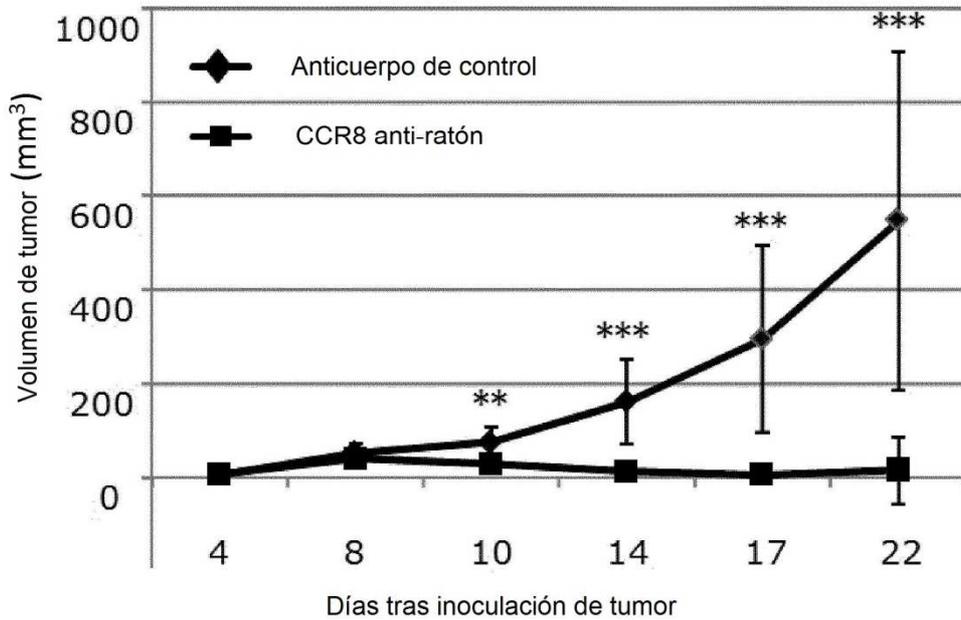
[Figura 29]



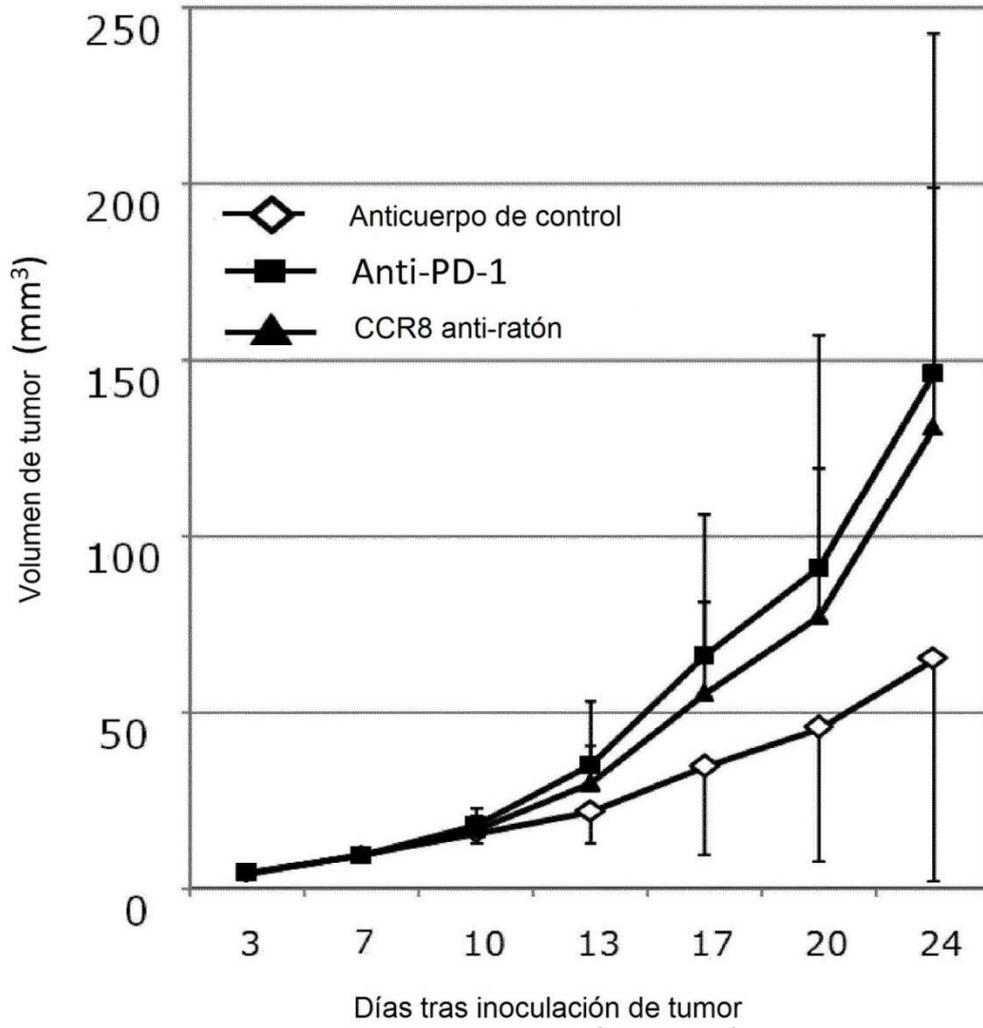
[Figura 30]



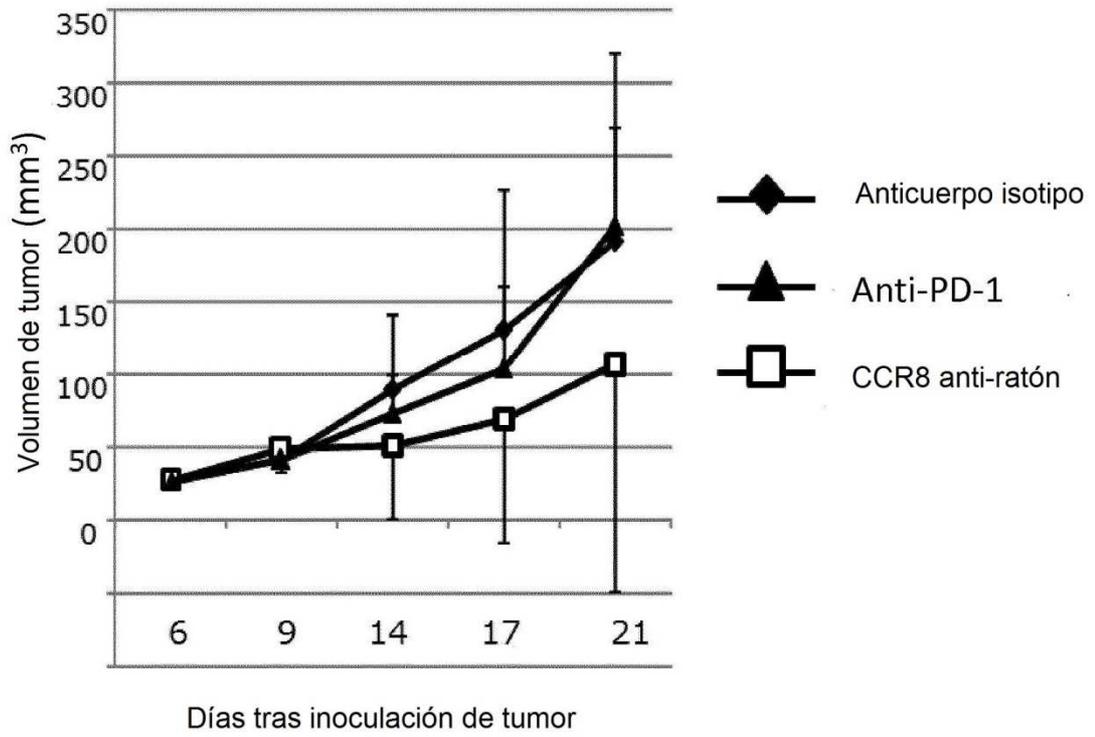
[Figura 31]



[Figura 32]



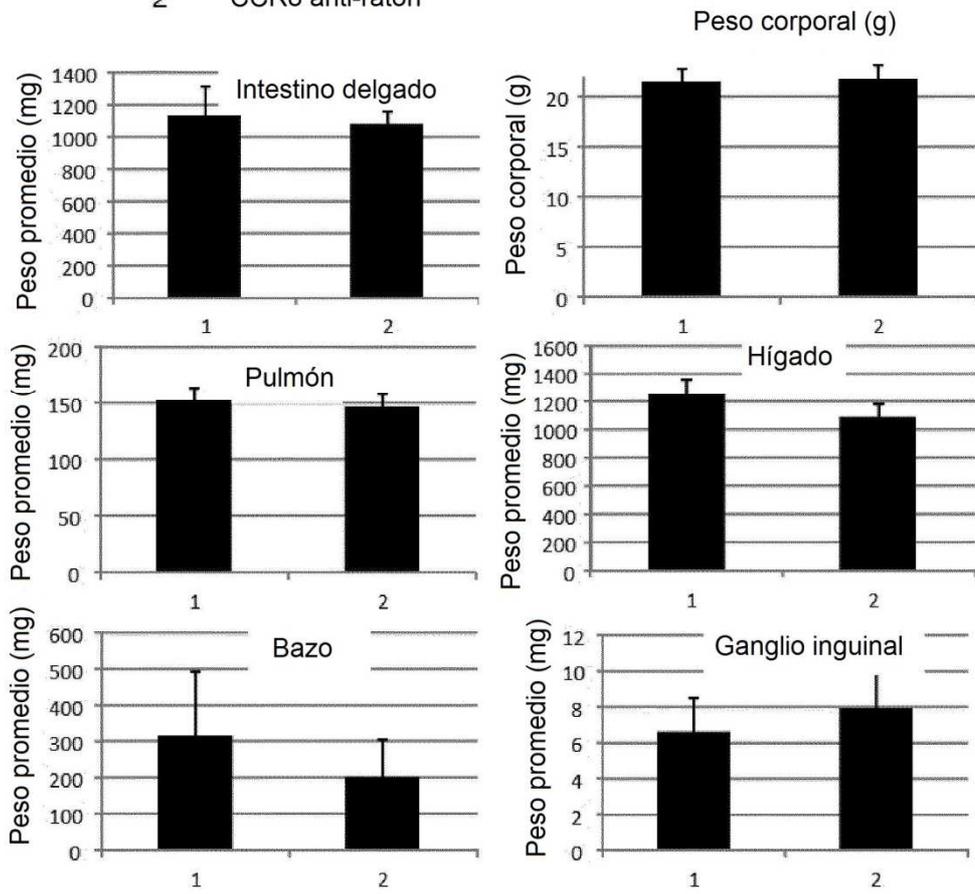
[Figura 33]



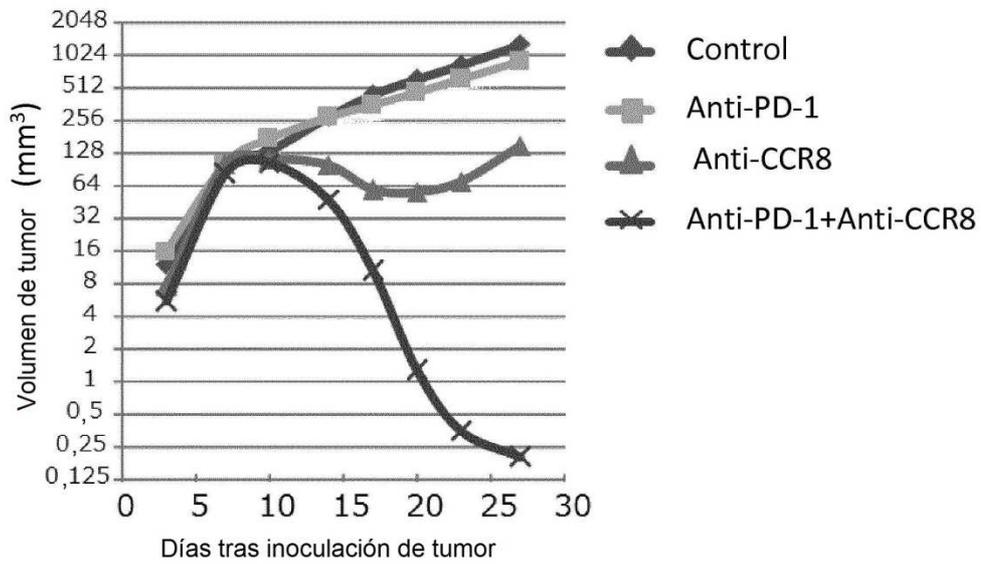
[Figura 34]

1 Anticuerpo de control

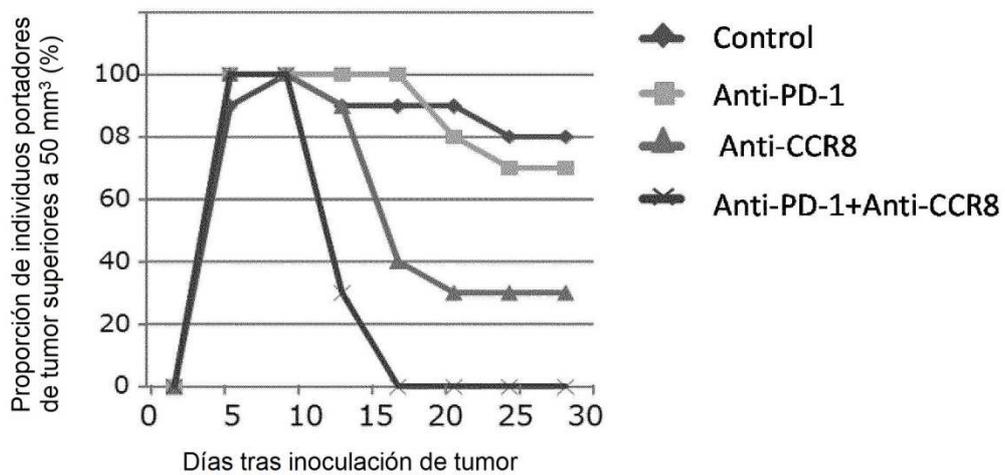
2 CCR8 anti-ratón



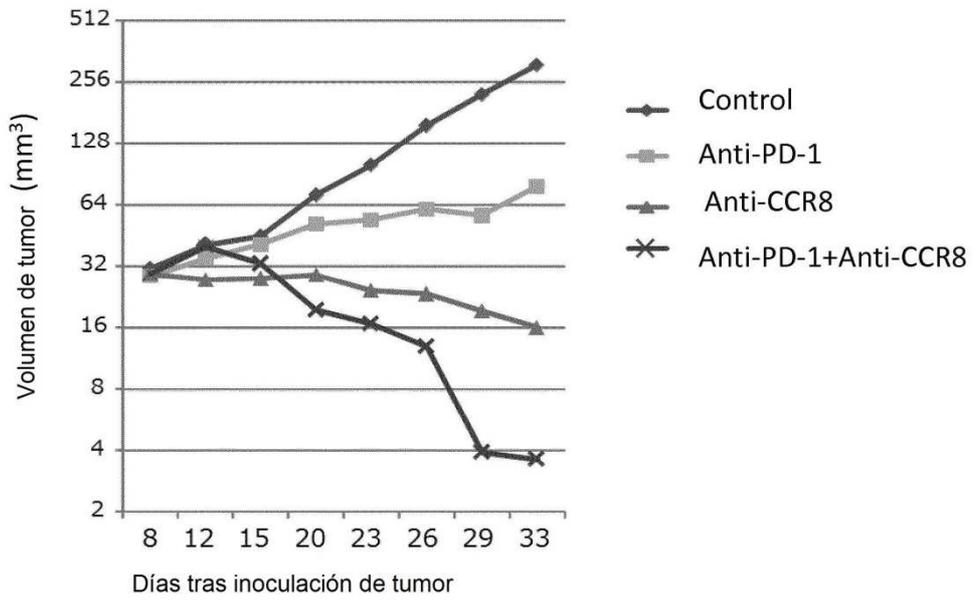
[Figura 35]



[Figura 36]



[Figura 37]



[Figura 38]

