

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 728**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/513 (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.02.2015 PCT/JP2015/053569**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2015 WO15125652**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2015 E 15751324 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 3132802**

54 Título: **Agente terapéutico para cáncer sólido**

30 Prioridad:

21.02.2014 JP 2014032241
11.06.2014 JP 2014120300
03.09.2014 JP 2014178953

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.03.2021

73 Titular/es:

IDAC THERANOSTICS, INC. (50.0%)
6F, Suzuya Building, 1-34-5, Hongo, Bunkyo-ku
Toyko 113-0033, JP y
THE UNIVERSITY OF TOKYO (50.0%)

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 808 728 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

Agente terapéutico para cáncer sólido

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un agente terapéutico para uso en el tratamiento de cáncer sólido.

10 **Técnica antecedente**

15 Recientemente, la inmunoterapia contra el cáncer a menudo se informa en las noticias. En 2013, esta noticia llenó las páginas de la American Society of Clinical Oncology. Gracias al progreso en el análisis genómico, los efectos de los fármacos en pacientes individuales ahora pueden discutirse claramente respecto a las anomalías oncogénicas. Sin embargo, a pesar de la relación entre anomalías genéticas y efectos de los fármacos, aún queda un problema: ¿qué estrategias terapéuticas pueden proponerse para pacientes a los que no pueden aplicarse tales relaciones? En inmunoterapia contra el cáncer, las mutaciones genéticas involucradas en carcinogénesis no muestran una correlación directa con los efectos de los fármacos. Igualmente, sin embargo, cada vez está más claro que la inmunoterapia contra el cáncer no es necesariamente eficaz para todos los pacientes. Por lo tanto, la investigación y el desarrollo de medidas para aumentar su eficacia es una tarea urgente.

20 Una de esas medidas es usar varios fármacos en combinación para obtener un efecto sinérgico. Ya se ha informado que una terapia de combinación con un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-PD-1 dio como resultado una mayor eficacia sin causar efectos secundarios combinados graves (Documento de No patente 1). Dado que las moléculas CTLA-4 y PD-1 se entienden como moléculas que actúan en los puntos de control inmunitario, los anticuerpos contra estas moléculas se reconocen como inhibidores del punto de control inmunitario (Documento de No patente 2).

30 También en el campo de los fármacos carcinostáticos, la aparición de fármacos dirigidos a moléculas permitió el desarrollo de fármacos anticáncer que tienen relativamente menos efectos secundarios. Sin embargo, todavía no pueden evitarse acciones negativas en el organismo. A pesar del progreso reciente en investigación y desarrollo de vacunas peptídicas contra el cáncer, que son parte de la inmunoterapia, esas vacunas no son tan eficaces (es decir, la frecuencia de pacientes que muestran eficacia de las vacunas es baja) y, por tanto, las vacunas no están llamando mucho la atención en este momento. Más recientemente, fármacos de anticuerpos (por ejemplo, Herceptin, un anticuerpo contra la molécula denominada her2/neu) llegaron a estar disponibles, y atrajeron la atención como fármacos no sintéticos dirigidos a moléculas. Sin embargo, sus problemas como recurrencia y resistencia a fármacos también se están volviendo evidentes. Después de la aparición de tales anticuerpos inhibidores de unión, los pacientes confiaron en la eficacia de tales anticuerpos, pero hasta ahora los anticuerpos solo han mostrado ligeros beneficios de supervivencia.

40 En estas circunstancias, los inhibidores del punto de control inmunitario han aparecido como fármacos de anticuerpos. Por ejemplo, aunque los anticuerpos dirigidos a CTLA-4 (molécula expresada en el subconjunto de linfocitos T reguladores) no tienen efectos de regresión tumoral muy altos en melanoma, que se sabe que es un cáncer que tiene una inmunogenicidad relativamente fuerte, se ha encontrado que estos anticuerpos permiten una prolongación significativa en términos de la tasa de supervivencia. Por lo tanto, estos anticuerpos ahora están atrayendo una gran atención (Documento de No patente 3). Se entiende que cancelan el estado inmunosupresor del cáncer para mejorar un entorno en donde las células inmunes citotóxicas pueden estar activas. Otro ejemplo de tal molécula es la molécula PD-1. Los anticuerpos contra esta molécula tienen efectos notables, y se ha encontrado que incluso son eficaces para aproximadamente el 30 % de los pacientes con cáncer sólido (por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer de colon) (Documento de No patente 4). Sin embargo, tales anticuerpos no necesariamente han sido eficaces para todos los pacientes con cáncer cuando se usan solos.

50 En vista de esto, se ha intentado el uso combinado de agentes inmunoterapéuticos que tienen diferentes funciones. Primero, se propuso el uso combinado de un anticuerpo anti-CD4 con un anticuerpo anti-CD 137 (también denominado 4-IBB) utilizando un modelo de ratón (Documento de No patente 5), y, posteriormente, se informó que el uso combinado de un anticuerpo anti-PD-1 con un anticuerpo anti-CTLA-4 es muy eficaz según los datos de ensayos clínicos (Documento de No patente 1). La molécula CD137 tiene una actividad agonista contra el punto de control inmunitario. La molécula PD-1 y la molécula CTLA-4 tienen actividades inhibidoras del punto de control inmunitario. Teniendo esto en cuenta, se entiende que una ventaja clínica puede obtenerse mediante el uso combinado de fármacos que tienen actividades de punto de control inmunitario pero que regulan diferentes sistemas de señalización. Aunque hay un informe que sugiere que un anticuerpo anti-CD4 solo tiene efecto de regresión tumoral (Documento de No patente 6), este informe se basa simplemente en un estudio de un modelo de ratón que usa un cáncer particular cuya inmunogenicidad se mejoró mediante el procesamiento artificial de una línea celular de cáncer. Por lo tanto, Este informe no demuestra un efecto sobre el cáncer sólido espontáneo. Se sabe que los anticuerpos anti-CD4 de ratón (por ejemplo, el clon GK1.5) utilizados en modelos de ratón tienen una citotoxicidad dependiente del complemento muy alta (actividad de CDC). Sin embargo, un anticuerpo anti-CD4 de tipo humano o humanizado que tiene un efecto citotóxico tan alto contra células CD4-positivas (CD4⁺) aún no se han desarrollado hasta la etapa de aplicación clínica

(Documento de No patente 7). Todos los anticuerpos anti-CD4 humanizados que se han sometido a ensayos clínicos en el pasado fueron los que se usaron para cánceres sanguíneos que pueden contener células tumorales que expresan CD4, como linfoma maligno, y no se ha desarrollado ningún fármaco de anticuerpo anti-CD4 para cánceres sólidos.

5 La eficacia de los fármacos anticáncer compuestos de bajo peso molecular (fármacos carcinostáticos), que se han usado históricamente como fármacos de primera línea, se ha mejorado con el desarrollo de la ciencia, y los efectos secundarios que habían sido problemáticos se han reducido mediante la mejora de las dosis y los métodos de administración. Sin embargo, el efecto antitumoral de tales fármacos carcinostáticos obtenidos equilibrando el efecto
10 y la toxicidad de tal manera es limitado, y esos fármacos todavía no son necesariamente satisfactorios actualmente como fármacos para tratamiento de cánceres, que son enfermedades cuya curación completa es difícil.

Documento(s) de la técnica anterior

15 **Documento(s) de no patente**

- Documento de no patente 1: Wolchok JD et al., The New England journal of medicine. 2013;369:122-33.
- Documento de no patente 2: Pardoll DM., Nature reviews Cancer. 2012;12:252-64.
- 20 Documento de no patente 3: Prieto PA et al., Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research. 2012;18:2039-47.
- Documento de no patente 4: Hamid O et al., The New England journal of medicine. 2013;369:134-44.
- Documento de no patente 5: Choi BK et al., Cancer research. 2007;67:8891-9.
- Documento de no patente 6: Yu P et al., The Journal of experimental medicine. 2005;201:779-91.
- Documento de no patente 7: Kim YH et al., Blood. 2007;109:4655-62.

25 US 2010/310573 describe un anticuerpo anti-CD4 de alta afinidad con una alta actividad de ADCC o CDC y su uso en el tratamiento del cáncer.

30 WO 2011/109789 describe anticuerpos inmunomoduladores dirigidos y proteínas de fusión para terapia contra el cáncer, en donde el resto inmunomodulador se une específicamente a uno de TGF- β , PD-L1, PD-L2, RANKL, TGF- β R, PD-1 o RANK y el resto del direccionamiento incluye un anticuerpo.

35 Rosenblatt et al., J. Immunother 34:409-418 (2011) describe la investigación de la ruta PDL-1/PD-1 en activación y tolerancia inmunitarias y las respuestas de linfocitos T *ex vivo* a una vacuna de fusión de células dendríticas autólogas/mieloma.

WO 2006/121168 describe anticuerpos monoclonales humanos que se unen a PD-1 con alta afinidad y el uso de los mismos con anticuerpos anti-CTLA-4 en el tratamiento del cáncer.

40 WO 2015/120198 describe combinaciones de un anticuerpo anti-CD4 y un inhibidor del punto de control inmunitario, un inmunoterapéutico adoptivo, un adyuvante inmunitario o un agente inmunomodulador, o sus combinaciones.

Sumario de la invención

45 **Problema a resolver por la invención**

Un objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos medios terapéuticos y profilácticos eficaces para cánceres sólidos humanos.

50 **Medios para resolver los problemas**

Para aplicación clínica de anticuerpos anti-CD4 a humanos, deben considerarse anticuerpos anti-CD4 de tipo humano o humanizados que reciben una citotoxicidad fuerte, dependiente de anticuerpos o dependiente del complemento por ciertos medios. Dado que tales anticuerpos anti-CD4 esperados tienen una propiedad que permite la eliminación de
55 todas las células CD4⁺, son capaces de eliminar no solo los linfocitos T reguladores, sino también de eliminar ampliamente células CD4⁺ del sistema inmunitario que se infiltran en tejidos cancerosos. Por lo tanto, podría esperarse que tales anticuerpos tengan una amplia gama de efectos combinados.

60 Los presentes inventores lograron establecer un anticuerpo anti-CD4 de tipo humano o humanizado capaz de eliminar ampliamente células CD4⁺ y que tienen una actividad citotóxica elevada, y realizaron intensamente un estudio modelo a nivel de ratón con el objeto de desarrollar medios que mostraran una amplia gama de efectos mediante la combinación de anticuerpos basados en los anticuerpos establecidos, completando de esta forma la presente invención.

65 Es decir, la presente invención proporciona un agente para uso en el tratamiento de cáncer sólido, que comprende como principio activo un anticuerpo anti-CD4 que es un anticuerpo quimérico de tipo humano, anticuerpo humanizado

o anticuerpo humano contra CD4 humano, en donde dicho anticuerpo anti-CD4 no contiene fucosas centrales en las cadenas de azúcar presentes en su región Fc y en donde dicho agente se usa en combinación con al menos uno seleccionado entre un anticuerpo antagonista anti-PD-1, y un anticuerpo anti-PD-L1 que se une al ligando e inhibe la unión del ligando al receptor. La divulgación proporciona un agente supresor de recurrencia para cáncer sólido, que comprende como principio activo un anticuerpo anti-CD4 que tiene una actividad citotóxica elevada, o un anticuerpo anti-CD4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, anticuerpo o fragmento que comprende un componente citotóxico unido al mismo, en donde dicho anticuerpo anti-CD4 es un anticuerpo quimérico de tipo humano, anticuerpo humanizado o anticuerpo humano contra CD4 humano. La presente divulgación proporciona además un agente supresor de metástasis para cáncer sólido, que comprende como principio activo un anticuerpo anti-CD4 que tiene una actividad citotóxica elevada, o un anticuerpo anti-CD4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, anticuerpo o fragmento que comprende un componente citotóxico unido al mismo, en donde dicho anticuerpo anti-CD4 es un anticuerpo quimérico de tipo humano, anticuerpo humanizado o anticuerpo humano contra CD4 humano. La presente divulgación proporciona además un agente para mejorar la actividad de, favorecer la proliferación y/o favorecer la diferenciación de linfocitos T CD8⁺ específicos para antígeno tumoral expresados por cáncer sólido en un paciente con cáncer sólido y/o reclutar los linfocitos T CD8⁺ específicos de dicho antígeno tumoral al sitio del tumor en un paciente con cáncer sólido, dicho agente comprendiendo como principio activo un anticuerpo anti-CD4 que tiene una actividad citotóxica elevada, o un anticuerpo anti-CD4 o fragmento de unión a antígeno del mismo, anticuerpo o fragmento que comprende un componente citotóxico unido al mismo, en donde dicho anticuerpo anti-CD4 es un anticuerpo quimérico de tipo humano, anticuerpo humanizado o anticuerpo humano contra CD4 humano. La presente divulgación proporciona además un método para tratar cáncer sólido, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD4 que tiene una actividad citotóxica elevada, o un anticuerpo anti-CD4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, anticuerpo o fragmento que comprende un componente citotóxico unido al mismo, a un paciente que necesita tratamiento de cáncer sólido, en donde dicho anticuerpo anti-CD4 es un anticuerpo quimérico de tipo humano, anticuerpo humanizado o anticuerpo humano contra CD4 humano. La presente divulgación proporciona además un método para suprimir la recurrencia del cáncer sólido, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD4 que tiene una actividad citotóxica elevada, o un anticuerpo anti-CD4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, anticuerpo o fragmento que comprende un componente citotóxico unido al mismo, a un paciente que necesita suprimir la recurrencia del cáncer sólido, en donde dicho anticuerpo anti-CD4 es un anticuerpo quimérico de tipo humano, anticuerpo humanizado o anticuerpo humano contra CD4 humano. La presente divulgación proporciona además un método para suprimir metástasis de cáncer sólido, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD4 que tiene una actividad citotóxica elevada, o un anticuerpo anti-CD4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, anticuerpo o fragmento que comprende un componente citotóxico unido al mismo, a un paciente que necesita suprimir metástasis de cáncer sólido, en donde dicho anticuerpo anti-CD4 es un anticuerpo quimérico de tipo humano, anticuerpo humanizado o anticuerpo humano contra CD4 humano. La presente divulgación proporciona además un método para mejorar la actividad de, favorecer la proliferación y/o favorecer la diferenciación de linfocitos T CD8⁺ específicos para antígeno tumoral expresados por cáncer sólido en un paciente con cáncer sólido y/o reclutar los linfocitos T CD8⁺ específicos de dicho antígeno tumoral al sitio del tumor en un paciente con cáncer sólido, dicho método comprendiendo administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD4 que tiene una actividad citotóxica elevada, o un anticuerpo anti-CD4 o fragmento de unión a antígeno del mismo, anticuerpo o fragmento que comprende un componente citotóxico unido al mismo, a dicho paciente, en donde dicho anticuerpo anti-CD4 es un anticuerpo quimérico de tipo humano, anticuerpo humanizado o anticuerpo humano contra CD4 humano. La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Efecto de la invención

La presente divulgación hace posible no solo tratar cánceres sólidos, sino también suprimir la metástasis y recurrencia de cánceres sólidos, usando un anticuerpo anti-CD4 de tipo humano o humanizado, etc., que puede ejercer una actividad citotóxica suficiente contra células CD4⁺ en un organismo humano. El efecto terapéutico del anticuerpo citotóxico anti-CD4 contra cáncer sanguíneo se ejerce mediante la destrucción de las células tumorales que expresan CD4 *per se*. Por otro lado, cuando se usa el agente terapéutico para cáncer sólido, el entorno inmunocomprometido se cancela mediante la eliminación de células CD4⁺ que implican inmunosupresión, conduciendo a la mejora de la destrucción de las células cancerosas por CTL de CD8⁺ (linfocitos T), logrando así su efecto terapéutico. Asimismo, la metástasis y recurrencia de cánceres sólidos también pueden prevenirse mediante el uso del agente según la presente invención. Convencionalmente, en la inmunoterapia del cáncer sólido, se ha pensado que la eliminación de los linfocitos T reguladores (linfocitos CD4⁺ CD25⁺) es importante y que solo hay que eliminar esos linfocitos mediante el uso de un anticuerpo citotóxico anti-CD25. Sin embargo, es importante eliminar una amplia gama de células CD4⁺ mediante un anticuerpo anti-CD4, y la terapia eficaz para cáncer sólido humano solo puede lograrse estableciendo un anticuerpo anti-CD4 de tipo humano o humanizado que tenga una citotoxicidad fuerte. Mediante el uso de un anticuerpo citotóxico anti-CD4 en combinación con un antagonista o agonista contra una molécula de punto de control inmunitario u otra sustancia estimuladora de la inmunidad celular, etc., la actividad CTL de linfocitos T CD8⁺ puede mejorarse aún más para obtener un efecto sinérgico. Por otro lado, cuando se usa un anticuerpo citotóxico anti-CD4 en combinación con un fármaco anticáncer como quimioterapia de molécula pequeña, la progresión del cáncer se debilita por inhibición del crecimiento o muerte de células cancerosas y, por tanto, también puede obtenerse un efecto sinérgico.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 muestra la actividad ADCC de un anticuerpo humanizado IT1208 anti-CD4 contra células CD4⁺ en células mononucleares de sangre periférica humana medidas utilizando un kit de ensayo disponible en el mercado.

5 Fig. 2 muestra el volumen tumoral en ratones C57BL/6 trasplantados con una línea celular B16F10 de melanoma. Los ratones recibieron una sola administración de anticuerpo anti-CD4 durante un periodo de 2 días antes del trasplante hasta 12 días después del trasplante. El volumen tumoral se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 14. ** indica un nivel de significación de $p < 0,01$.

10 Fig. 3 muestra el volumen tumoral en ratones BALB/c trasplantados con una línea celular Colon26 de cáncer de colon. Los ratones recibieron una sola administración de anticuerpo anti-CD4 durante un periodo de 2 días antes del trasplante hasta 12 días después del trasplante. El volumen tumoral se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 15. * indica un nivel de significación de $p < 0,05$. ** indica un nivel de significación de $p < 0,01$.

15 Fig. 4 muestra el volumen tumoral en ratones C57BL/6 trasplantados con una línea celular LLC de cáncer de pulmón. Los ratones recibieron una sola administración de anticuerpo anti-CD4 durante un periodo de 2 días antes del trasplante hasta 12 días después del trasplante. El volumen tumoral se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 21. ** indica un nivel de significación de $p < 0,01$.

20 Fig. 5 muestra la relación de abundancia de linfocitos T CD4⁺ en los linfocitos extraídos del bazo de ratones C57BL/6 trasplantados con una línea celular B16F10 de melanoma. Los ratones recibieron la administración de anticuerpos anti-CD4 a diversas dosis. El bazo fue extirpado de los ratones el Día 7.

Fig. 6 muestra el volumen tumoral en cada grupo de ratones C57BL/6 trasplantados con una línea celular B16F10 de melanoma. Los ratones recibieron una administración de anticuerpos anti-CD4 a diversas dosis. El volumen tumoral se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 15.

25 Fig. 7 muestra la relación de abundancia de linfocitos T CD4⁺ en los linfocitos extraídos del bazo de ratones BALB/c trasplantados con una línea celular Colon26 de cáncer de colon. Los ratones recibieron la administración de anticuerpos anti-CD4 a diversas dosis. El bazo fue extirpado de los ratones el Día 7.

Fig. 8 muestra el volumen tumoral en cada grupo de ratones BALB/c trasplantados con una línea celular Colon26 de cáncer de colon. Los ratones recibieron la administración de anticuerpos anti-CD4 a diversas dosis. El volumen tumoral se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 18.

30 Fig. 9 muestra el volumen tumoral en cada grupo de ratones C57BL/6 trasplantados con una línea celular B16F10 de melanoma. El volumen tumoral se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 18. El anticuerpo anti-CD4 se administró una vez, y el anticuerpo anti-PD-1 se administró cinco veces. En el grupo de combinación, estos se administraron en combinación. ** indica un nivel de significación de $p < 0,01$. *** indica un nivel de significación de $p < 0,001$.

35 Fig. 10 muestra el volumen tumoral en cada grupo de ratones BALB/c trasplantados con una línea celular Colon26 de cáncer de colon. El volumen tumoral se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 29. El anticuerpo anti-CD4 se administró una vez, y el anticuerpo anti-PD-1 se administró cinco veces. En el grupo de combinación, estos se administraron en combinación. ** indica un nivel de significación de $p < 0,01$.

Fig. 11 muestra el volumen tumoral en cada grupo de ratones C57BL/6 trasplantados con una línea celular B16F10 de melanoma. El volumen tumoral se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 18. La administración combinada de anticuerpo anti-CD4 + anticuerpo anti-PD-1 se realizó como una combinación de una vez/cinco veces o dos veces/diez veces.

40 Fig. 12 muestra el volumen tumoral en cada grupo de ratones BALB/c trasplantados con una línea celular 4T1 de cáncer de mama. El volumen tumoral se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 17. El anticuerpo anti-CD4 se administró dos veces. *** indica un nivel de significación de $p < 0,001$ (ensayo t).

45 Fig. 13 muestra el volumen tumoral en cada grupo de ratones C57BL/6 trasplantados con una línea celular B16F10 de melanoma. El volumen tumoral se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 15. En el grupo de anticuerpos anti-CD4 solo, el anticuerpo se administró una o dos veces. En el grupo combinado de anticuerpo anti-CD4 + anticuerpo anti-CD137, los anticuerpos se administraron una vez/cinco veces en combinación.

50 Fig. 14 muestra los resultados de la observación del tamaño tumoral. Los ratones trasplantados con la línea celular Colon26 de cáncer de colon que mostraron regresión tumoral completa mediante el uso combinado de anticuerpo anti-CD4 + anticuerpo anti-PD-1 fueron trasplantados nuevamente con células Colon26, y se observó el tamaño tumoral.

Fig. 15 muestra los resultados de la observación del tamaño tumoral. Los ratones trasplantados con la línea celular Colon26 de cáncer de colon que mostraron una regresión tumoral completa mediante el uso combinado de anticuerpo anti-CD4 + anticuerpo anti-PD-1 fueron trasplantados nuevamente con células Colon26, y se observó el tamaño del tumor (un gráfico que muestra una vista ampliada del área dentro del marco en Fig. 14).

55 Fig. 16 muestra los resultados de la observación del tamaño tumoral. Los ratones trasplantados con la línea celular Colon26 de cáncer de colon que mostraron regresión tumoral completa mediante el uso combinado de anticuerpo anti-CD4 + anticuerpo anti-PD-L1 fueron trasplantados nuevamente con células Colon26, y se observó el tamaño tumoral.

60 Fig. 17 muestra los resultados de la observación del tamaño tumoral. Los ratones trasplantados con la línea celular Colon26 de cáncer de colon que mostraron una regresión tumoral completa mediante el uso combinado de anticuerpo anti-CD4 + anticuerpo anti-PD-L1 fueron trasplantados nuevamente con células Colon26, y se observó el tamaño del tumor (un gráfico que muestra una vista ampliada del área dentro del marco en Fig. 16).

65 Fig. 18 muestra el volumen tumoral en cada grupo de ratones BALB/c trasplantados con una línea celular Colon26 de cáncer de colon. El volumen tumoral se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 29.

Fig. 19 muestra los resultados de la observación del tamaño tumoral. Los ratones trasplantados con la línea celular

Colon26 de cáncer de colon que mostraron regresión tumoral completa mediante el uso combinado de anticuerpo anti-CD4 + anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1 fueron trasplantados nuevamente con células Colon26 o una línea celular 4T1 de cáncer de mama, y se observó el tamaño tumoral. (n) representa el tamaño tumoral observado en ratones sin tratamiento previo en donde se inocularon células tumorales. Los ratones sin tratamiento previo que no habían sido sometidos a inoculación tumoral ni a administración de anticuerpos recibieron inoculación tumoral.

Fig. 20 muestra el volumen tumoral promedio el Día 11 (11 días después de la re-inoculación) en cada grupo de ratones mostrado en Fig. 19.

Fig. 21 muestra el volumen tumoral en cada grupo de ratones C57BL/6 trasplantados con una línea celular B16F10 de melanoma. El volumen tumoral se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 16. Se estudiaron los efectos del uso combinado de un anticuerpo anti-CD4 con un anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-PD-L2, anticuerpo anti-OX40, o anticuerpo anti-CTLA-4.

Fig. 22 muestra el volumen tumoral en cada grupo de ratones C57BL/6 trasplantados con una línea celular B16F10 de melanoma. El volumen tumoral se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 15. Se estudiaron los efectos del uso combinado de un anticuerpo anti-CD4 con un anticuerpo anti-BTLA, anticuerpo anti-GITR, anticuerpo anti-LAG-3, o anticuerpo anti-TIM-3.

Fig. 23 muestra el volumen tumoral en cada grupo de ratones C57BL/6 trasplantados con una línea celular B16F10 de melanoma. El volumen tumoral se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 15. La administración combinada de anticuerpo anti-CD4 + agente anticáncer de molécula pequeña se realizó como una combinación de dos veces/cuatro veces. ** indica un nivel de significación de $p < 0,01$.

Fig. 24 muestra el número de metástasis en los pulmones en cada grupo de ratones BALB/c trasplantados con la línea celular 4T1. Los ratones se diseccionaron y sus pulmones se extirparon el Día 28 para recuento de la metástasis.

Fig. 25 muestra (A) el protocolo experimental del Ejemplo 9; (B) un ejemplo de los resultados del análisis de citometría de flujo de células de ganglios linfáticos que drenan el tumor en un grupo de ratones que reciben transferencia adoptiva; (C) un ejemplo de los resultados del análisis de la frecuencia de la división celular de linfocitos T CD8⁺ de Pmel-1, OT-1 y policlonales de ganglios linfáticos identificados por el desarrollo en B, cuyo análisis se realizó utilizando la intensidad de fluorescencia de CFSE como índice; (D) los porcentajes de células que muestran una frecuencia de división celular de 0 a 1, de 2 a 4 o de 5 a 8 en los linfocitos T CD8⁺ Pmel-1 de ganglios linfáticos que drenan el tumor en el grupo anticuerpo anti-CD4(-) B16F10(+) y el grupo anticuerpo anti-CD4(+) está B16F10(+); y (E) los números de linfocitos T CD8⁺ Pmel-1 que muestran una frecuencia de división celular de 5 a 8 en sangre periférica (sangre), ganglio linfático que drena el tumor (dLN), ganglio linfático no drenante (ndLN), bazo (bazo), y tumor (tumor) en el grupo anticuerpo anti-CD4(-) B16F10(+) y el grupo anticuerpo anti-CD4(+) B16F10(+).

35 Modo para realizar la invención

Los cánceres a los que se aplica la presente invención son cánceres sólidos que incluyen varios cánceres, excepto cánceres sanguíneos (linfoma maligno, leucemia, mieloma múltiple). Los ejemplos específicos típicos incluyen cánceres epiteliales sólidos como cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de lengua, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cuello de útero, cáncer de ovarios. Sin embargo, los cánceres no están limitados siempre que sean cánceres sólidos, y los ejemplos también incluyen otros cánceres sólidos que no pertenecen a cánceres sólidos epiteliales, como melanoma y glioma. Los ejemplos preferentes del cáncer sólido incluyen, pero sin limitación, al menos un cáncer epitelial sólido seleccionado del grupo que consiste en cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer renal, y cáncer de mama, o al menos un cáncer epitelial sólido seleccionado del grupo que consiste en cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, y cáncer renal, o al menos un cáncer epitelial sólido seleccionado del grupo que consiste en cáncer de colon, cáncer de pulmón, y de mama, o al menos un cáncer sólido seleccionado entre melanoma y glioma. La expresión "tratamiento de cáncer sólido" incluye tanto supresión del crecimiento canceroso, prolongación de la vida de los pacientes con cáncer. La expresión "tratamiento de cáncer sólido" también incluye tratamiento de cáncer primario. Por ejemplo, el agente terapéutico de la presente invención puede aplicarse a un paciente que desarrolló cáncer primario que es diferente del cáncer primario que el paciente había desarrollado por primera vez, con la finalidad de tratamiento del segundo cáncer primario o posteriores.

En la presente invención, el cáncer sólido es normalmente cáncer sólido espontáneo. El cáncer sólido espontáneo es un cáncer sólido compuesto por células cancerosas que se producen espontáneamente. El cáncer sólido es cáncer que se produce en células que no son células inmunes. CD4, que se expresa en células inmunes, no se expresa en cáncer sólido.

El agente de la presente invención puede usarse preferentemente para tratamiento de cáncer sólido en estadios I a IV. En ratones trasplantados con línea celular de cáncer de ratón, el tumor alrededor del 5^o día después del trasplante corresponde al cáncer humano en estadio I, y el tumor el 9^o día después del trasplante B16F10 y el tumor el 12^o día después del trasplante de Colon26 o LLC corresponden al cáncer humano en estadio IV.

El principio activo del agente terapéutico de la presente divulgación es cualquiera de los siguientes. Ambos pueden usarse en combinación. En la presente memoria descriptiva, los principios activos (1) y (2) pueden denominarse en lo sucesivo colectivamente "componente anti-CD4".

(1) Un anticuerpo anti-CD4 que tiene una actividad citotóxica elevada.

(2) Un anticuerpo anti-CD4 o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende un componente citotóxico unido al mismo.

5 En ambos casos de (1) y (2), el anticuerpo anti-CD4 es normalmente un anticuerpo contra CD4 humano, y es un anticuerpo de tipo humano, un anticuerpo humanizado (preparado trasplantando la región CDR de un anticuerpo no derivado de humano a la región correspondiente de un anticuerpo humano), o un anticuerpo humano (el mismo anticuerpo que un anticuerpo producido en el organismo humano, que se prepara usando un animal no humano o una línea celular humana).

10 Los anticuerpos de actividad citotóxica incluyen la actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (actividad ADCC) y la actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (actividad CDC). En casos en donde el componente anti-CD4 pertenece a (1) anterior, el anticuerpo anti-CD4 puede tener cualquiera de la actividad ADCC y la actividad CDC. Es necesario usar un anticuerpo que tenga una actividad citotóxica elevada que pueda ejercer una capacidad suficientemente elevada para destruir células CD4⁺.

15 La expresión "actividad citotóxica elevada" en el contexto de la actividad ADCC significa que un anticuerpo tiene una actividad de ADCC mayor que el anticuerpo anti-CD4 6G5 o CE9.1 conocidos que se sabe que tienen una actividad ADCC, cuando la actividad ADCC contra células que expresan CD4 se mide mediante un método de medición conocido. En el contexto de la actividad CDC, la expresión significa que un anticuerpo tiene una actividad CDC más fuerte que el anticuerpo OKT4 anti-CD4 conocido que se sabe que tiene actividad CDC, cuando la actividad CDC contra células que expresan CD4 se mide en un sistema experimental usando los mismos complementos mediante un método de medición conocido.

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

25 Preferentemente, un anticuerpo anti-CD4 que tiene una actividad citotóxica elevada tiene una actividad de ADCC que es 10 veces o más, más preferentemente 100 veces o superior a la actividad ADCC del anticuerpo 6G5 y/o CE9.1 anti-CD4 conocidos, o tiene una actividad CDC que es 10 veces o superior, más preferentemente 100 veces o superior a la actividad CDC del anticuerpo OKT4 anti-CD4 conocido. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "10 veces o superior" significa, por ejemplo, que la concentración mínima de anticuerpos a la que un anticuerpo dado exhibe una actividad citotóxica contra una cierta cantidad de células es una décima parte o menos de la del anticuerpo conocido descrito anteriormente. Respecto a la afinidad del anticuerpo anti-CD4 hacia CD4, la actividad de unión al anticuerpo K_D puede ser aproximadamente 1 x 10⁻⁹ M o inferior.

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

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

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

5 También se conocen métodos para aumentar la citotoxicidad de un anticuerpo, y puede usarse cualquiera de estos métodos. A continuación se describe un ejemplo de los métodos conocidos.

10 Un método para aumentar la actividad de ADCC es la tecnología POTELLIGENT (marca registrada), en donde la fucosa (fucosa central) contenida en las cadenas de azúcar presentes en la región Fc del anticuerpo se elimina (Yamane-Onuki N, Satoh M, Production of therapeutic antibodies with controlled fucosylation, MAbs 2009; 1: 230-236.). La enzima que añade fucosa central está codificada por el gen denominado FucT-8 (Fut-8). Por lo tanto, las moléculas de anticuerpo con actividad ADCC mejorada pueden obtenerse expresando el gen que codifica un anticuerpo recombinante en células de animales genosuprimidos Fut-8 (Yamane-Onuki N, et al., Establishment of
15 FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity, Biotechnol Bioeng 2004; 87: 614-622). También se conoce un método en donde la donación de sustrato de fucosa se bloquea, pero este método elimina toda la fucosa, incluyendo la fucosa central, y por tanto no es específico de la fucosa central. Por lo tanto, la tecnología POTELLIGENT (marca registrada) descrita anteriormente es más preferente.

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

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

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

35 En casos en donde se usa un anticuerpo anti-CD4 al que se une un componente citotóxico, no es necesario que el anticuerpo tenga una actividad citotóxica alta, porque las células CD4+ están dañadas por el componente citotóxico. Un fragmento de anticuerpo que retiene la capacidad de unión a CD4 (fragmento de unión a antígeno), que comprende un componente citotóxico unido al mismo también puede usarse como un principio activo del agente de la presente divulgación.

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

45 El fragmento de unión a antígeno puede ser cualquier fragmento de anticuerpo siempre que retenga la capacidad de unión (reactividad antígeno-anticuerpo) al antígeno correspondiente de su anticuerpo original. Los ejemplos específicos del fragmento de unión a antígeno incluyen, pero sin limitación, Fab, F(ab')₂, y scFv. Fab y F(ab')₂ pueden obtenerse, como es bien sabido, por tratamiento de un anticuerpo monoclonal con una proteasa como papaína o pepsina. Los métodos para preparar scFv (fragmento de cadena única de región variable) también se conocen bien. Por ejemplo, scFv puede obtenerse extrayendo ARNm de un hibridoma preparado como se describió anteriormente, preparando ADNc monocatenario, realizando PCR usando cebadores específicos para la cadena H y la cadena L de inmunoglobulina para amplificar el gen de la cadena H y el gen de la cadena L de inmunoglobulina, uniéndolos usando un conector, proporcionando un sitio(s) enzimático de restricción apropiado para el producto resultante, introduciendo el producto en un vector plasmídico, transformando *E. coli* con el vector resultante para permitir la expresión de scFv, y después recuperando el scFv expresado de *E. coli*.

50 Mediante la eliminación transitoria de células CD4+ en un paciente con cáncer mediante administración del componente anti-CD4, el entorno inmunocomprometido en un tejido canceroso sólido puede cancelarse y, por tanto, la función CTL de los linfocitos T CD8+ puede mejorarse para eliminar eficazmente células cancerosas. Se ha confirmado que la eliminación de células CD4+ de un cuerpo vivo con cáncer da como resultado la proliferación de linfocitos T CD8+ específicos para un antígeno del cáncer (antígeno tumoral). Se cree que un efecto antitumoral del
55 componente anti-CD4 es producido por linfocitos T CD8+ específicos de antígeno tumoral cuya proliferación,

diferenciación y/o actividad ha sido/han sido favorecida(s) o mejorada(s) en los tejidos inmunes o en tejidos tumorales, y/o ha sido reclutada al sitio tumoral, por administración de componente anti-CD4. Un efecto de regresión tumoral suficiente se obtiene usando solo el componente anti-CD4. Es preferente usar el componente anti-CD4 en combinación con inhibidores del punto de control inmunitario, diversas sustancias que tienen acción estimulante de inmunidad celular, terapia de células inmunes y/o similares, porque puede obtenerse un efecto anticáncer aún mayor (efecto inhibidor del crecimiento canceroso y/o efecto de prolongación de la vida).

La expresión "molécula de punto de control inmunitario" incluye tanto receptores como ligandos que funcionan como un punto de control inmunitario. Los puntos de control inmunitarios son el mecanismo de escape inmunitario para evitar que el sistema inmunitario ataque su propio organismo. Los receptores del punto de control inmunitario están presentes en linfocitos T e interactúan con ligandos expresados en células presentadoras de antígeno. Los linfocitos T reconocen un antígeno presentado en la molécula de MHC y se activan para generar una reacción inmune, mientras que la activación de los linfocitos T está controlada por una interacción entre el receptor del punto de control inmunitario y el ligando que ocurre en paralelo. Los receptores del punto de control inmunitario incluyen receptores coestimuladores y receptores inhibitorios, y la activación de linfocitos T y la reacción inmunitaria están controladas por un equilibrio entre ambos receptores.

Las células cancerosas expresan un ligando para un receptor inhibitorio del punto de control inmunitario y escapan del ataque de los linfocitos T citotóxicos que utilizan el receptor. Por lo tanto, la administración de un antagonista contra el receptor inhibitorio puede evitar que las células cancerosas utilicen el mecanismo de control inmunitario, facilitando así la muerte de células cancerosas por linfocitos T CD8⁺. Además, La administración de un agonista contra un receptor del punto de control inmunitario coestimulador puede mejorar la reacción inmunitaria, mediante lo cual la muerte de las células cancerosas por los linfocitos T CD8⁺ también puede facilitarse. En la presente invención, al menos cualquiera de uno o más de tales antagonistas y uno o más de tales agonistas puede usarse preferentemente en combinación con el componente anti-CD4.

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

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

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

En casos en donde el componente anti-CD4 se usa en combinación con un anticuerpo, los ejemplos específicos preferentes del anticuerpo antagonista descrito anteriormente incluyen un anticuerpo anti-PD-1, anticuerpo anti-CTLA-4, anticuerpo anti-LAG-3, anticuerpo anti-TIM-3, y un anticuerpo anti-BTLA, anticuerpos que se unen a un receptor para inhibir la unión de un ligando al receptor, y los ejemplos específicos preferentes del anticuerpo agonista descrito anteriormente incluyen un anticuerpo anti-CD 137, anticuerpo anti-OX40, y un anticuerpo anti-GITR, anticuerpos que se unen a un receptor para estimular una vía de señalización cadena abajo. Los ejemplos específicos preferentes del anticuerpo también incluyen un anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-PD-L2, anticuerpo anti-CD80, anticuerpo anti-CD86, anticuerpo anti-GAL9, y un anticuerpo anti-HVEM, anticuerpos que se unen a un ligando para un receptor de punto de control inmunitario inhibitorio para inhibir la unión del ligando al receptor. El índice del anticuerpo contra una molécula de punto de control inmunitario (anticuerpo de punto de control anti-inmune) utilizado en combinación con el componente anti-CD4 no está limitado. Puede usarse un anticuerpo de punto de control anti-inmune, o pueden usarse dos anticuerpos de punto de control anti-inmune, o pueden usarse tres o más anticuerpos de punto de control anti-inmune, en combinación con el componente anti-CD4.

Entre los anticuerpos descritos anteriormente, un anticuerpo preferente que puede usarse preferentemente junto con el componente anti-CD4 puede ser al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-PD-1 antagonista, anticuerpo anti-CTLA-4 antagonista, anticuerpo anti-LAG-3 antagonista, anticuerpo anti-TIM-3 antagonista, anticuerpo anti-BTLA antagonista, anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-PD-L2, anticuerpo anti-CD137

agonista, anticuerpo anti-OX40 agonista, y un anticuerpo anti-GITR agonista; más preferentemente, al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-PD-1 antagonista, anticuerpo anti-CTLA-4 antagonista, anticuerpo anti-PD-L1, anticuerpo anti-PD-L2, anticuerpo anti-CD137 agonista, y un anticuerpo anti-OX40 agonista, o al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo antiLAG-3 antagonista, anticuerpo anti-TI M-3 antagonista, anticuerpo anti-BTLA antagonista, y un anticuerpo anti-GITR agonista.

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

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

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

Ya se han desarrollado anticuerpos contra algunos de los puntos de control inmunitario, y también pueden usarse dichos anticuerpos conocidos. Los ejemplos específicos de la combinación preferente de anticuerpos incluyen una combinación de tres componentes: el componente anti-CD4, un anticuerpo anti-PD-1 antagonista y un anticuerpo anti-CTLA-4 antagonista; y una combinación de tres componentes: el componente anti-CD4, un anticuerpo anti-PD-L1 y un anticuerpo anti-CTLA-4 antagonista, pero una combinación que puede usarse en la presente divulgación no se limitan a esto.

Los ejemplos de otras sustancias que pueden usarse en combinación con el componente anti-CD4 incluyen sustancias que tienen una acción para estimular la inmunidad celular o activar linfocitos NK (citotóxicos naturales), como IFN- α/β , IL-12, GM-CSF y varias quimioquinas (p.ej. CCL10, CCL5, RANTES, MIP-1). El uso combinado de estas sustancias con el componente anti-CD4 puede facilitar aún más la destrucción de las células cancerosas por el sistema inmunológico.

La terapia de células inmunes es un método terapéutico para atacar las células cancerosas utilizando células inmunes autólogas. Las células inmunes se extraen de sangre o tejido canceroso recolectado o extraído de un paciente con cáncer, y se cultivan *in vitro* para proliferar y activarlas. Las células inmunes se recuperan y se administran al mismo paciente para atacar las células cancerosas en el organismo del paciente. La terapia de células inmunitarias que puede usarse en combinación con el componente anti-CD4 no está limitada, y puede usarse cualquiera de las terapias celulares conocidas usadas convencionalmente para tratar el cáncer. Los ejemplos de la terapia con células inmunes incluyen, pero sin limitación, terapia TIL en donde los linfocitos presentes en un tejido tumoral (linfocitos infiltrantes de tumor) se aíslan, proliferan y después se administran; terapia LAK en donde los linfocitos que contienen principalmente linfocitos NK se recogen de un paciente, proliferan y después se administran; terapia CTL en donde los linfocitos se estimulan usando linfocitos y células cancerosas recolectadas de un paciente para proliferar CTL específicos para células cancerosas del paciente, y después se administran los CTL; y terapia de transferencia de linfocitos T (receptor de antígeno quimérico; CAR-T) en donde se transfieren linfocitos T producidos por modificación genética. También puede obtenerse un efecto terapéutico aún mayor mediante el uso combinado del agente de la presente divulgación y terapia con células inmunes.

Otros ejemplos de otras sustancias que pueden usarse en combinación con el componente anti-CD4 incluyen agentes anticáncer de molécula pequeña. Un agente anticáncer de molécula pequeña es un agente anticáncer que comprende un compuesto de bajo peso molecular como principio activo. Las expresiones "compuesto de bajo peso molecular" y "fármaco de molécula pequeña" en el campo médico se refieren a una sustancia química que tiene un peso molecular de aproximadamente 1000 a 1500 o inferior (aproximadamente varios cientos en general), y un producto farmacéutico que comprende dicha sustancia química como principio activo, que es diferente de una medicina de anticuerpos y medicina de ácido nucleico. Estas expresiones tienen los mismos significados que las anteriores cuando se usan en la presente invención. Los agentes anticáncer de molécula pequeña que pueden usarse en combinación con el componente anti-CD4 no están limitados. Los ejemplos específicos de agentes anticáncer de molécula pequeña conocidos incluyen varios inhibidores de quinasa, por ejemplo, inhibidores de varias tirosina quinasas como EGFR,

Her2, ALK, MET, JAK y similares, incluyendo Gefitinib, Erlotinib y Tivantinib; inhibidores de BRAF quinasa, incluyendo Vemurafenib y Dabrafenib; e inhibidores de MEK, incluyendo Trametinib. Otros ejemplos específicos incluyen fármacos a base de platino (inhibición de síntesis de ADN) como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino; agentes basados en pirimidina (inhibición de síntesis de ADN) como fluorouracilo y gemcitabina; agentes basados en camptotecina (inhibición de síntesis de ADN) como irinotecán y topotecán; agentes basados en epipodofilotoxinas (inhibición de síntesis de ADN) como etopósido; agentes basados en alcaloides de la vinca (inhibición de división celular) como vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina; antraciclinas (inhibición de síntesis de ADN) como doxorubicina, epirubicina y pirarubicina; taxanos (inductores de apoptosis) como paclitaxel y docetaxel; agentes alquilantes (inhibición de síntesis de ADN) como ciclofosfamida e ifosfamida, y similares. El componente CD4 puede usarse en combinación con uno o más agentes anticáncer de molécula pequeña como se describió anteriormente.

La expresión "uso combinado" de ciertos ingredientes o fármacos eficaces, o la expresión "usado en combinación" significa que una pluralidad de principios activos se administran simultáneamente, secuencialmente, o por separado, a un paciente. Una pluralidad de principios activos para uso en combinación puede proporcionarse como formulaciones separadas. En casos en donde se administran simultáneamente, la pluralidad de principios activos puede estar contenida en una sola formulación.

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

El componente anti-CD4 puede administrarse en cualquier dosis siempre que sea eficaz para el tratamiento del cáncer sólido a tratar. La dosis eficaz se selecciona adecuadamente según el tamaño del tumor, síntomas, edad y peso corporal del paciente, y similares. La dosis del componente anti-CD4 puede ser, pero sin limitación, de aproximadamente 0,001 mg/kg a 1000 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg/kg a 100 mg/kg, en términos del peso del principio activo al día por 1 kg de peso corporal del paciente. La dosis descrita anteriormente puede administrarse a un paciente una vez o dividida en varias o varias veces en un día. Durante el periodo de tratamiento, el componente anti-CD4 puede administrarse una vez, o diariamente durante unos pocos o varios días, o puede administrarse varias veces cada pocos o varios días, cada pocas o varias semanas, o cada pocos o varios meses.

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

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

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

Mediante la administración del componente anti-CD4, no solo puede obtenerse un efecto terapéutico en el cáncer sólido, sino también un efecto inhibitorio en la metástasis y la recurrencia del cáncer sólido. En los ejemplos descritos a continuación se confirma que los ratones cuyo tumor sólido ha sufrido un retroceso completo mediante el uso combinado de un anticuerpo anti-CD4 que tiene una actividad citotóxica elevada y un anticuerpo anti-PD-1 muestran supresión del crecimiento del mismo tipo de células tumorales sólidas trasplantado a los mismos nuevamente. Este resultado indica que el agente según la presente invención tiene un efecto preventivo sobre la recurrencia y metástasis de cáncer sólido. Por lo tanto, el agente terapéutico según la presente invención también puede usarse como agente supresor de metástasis y agente supresor de recurrencia para cáncer sólido. De manera similar al tratamiento del

cáncer sólido, el uso combinado del componente anti-CD4 con un antagonista y/o agonista contra la molécula de punto de control inmunitario y/o similares puede producir un mayor efecto de supresión en metástasis y recurrencia. El agente según la presente divulgación también puede usarse como agente para mejorar la actividad de, favorecer la proliferación y/o favorecer la diferenciación de linfocitos T CD8⁺ específicos para un antígeno (antígeno tumoral) expresado por cáncer sólido en un paciente con cáncer sólido y/o reclutar los linfocitos T CD8⁺ específicos de dicho antígeno tumoral al sitio del tumor en un paciente con cáncer sólido.

Ejemplos

La presente invención se describe a continuación a modo de Ejemplos más concretamente. Sin embargo, la presente invención no se limita a los ejemplos descritos a continuación.

Ejemplo 1: Preparación de Anticuerpo Anti-CD4 que tiene actividad ADCC

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

La medición de la actividad ADCC de IT1208 se realizó bajo las siguientes condiciones, según el protocolo para un kit de ensayo de actividad ADCC comercializado por Promega. Después de mezclar suavemente 12.500 PBMC derivadas de un individuo sano, anti-CD4mAb (IT1208), y 75.000 células efectoras de bioensayo ADCC contenidas en el kit Promega, las células se cultivaron en una incubadora con CO₂ a 37 °C durante 6 horas. El reactivo luminiscente Bio-Glo reactivo se añadió al cultivo, y el cultivo continuó a temperatura ambiente durante 20 minutos, seguido de medición de quimioluminiscencia usando un lector de placas de luminiscencia.

Los resultados se muestran en la Fig. 1. IT1208 mostró actividad ADCC a 1 nM o superior, y la actividad después aumentó de forma dependiente de la concentración para alcanzar el valor máximo a 50 nM. En los casos de rituximab (antiCD20), que se utilizó como anticuerpo de control, la concentración a la que se comenzó a encontrar la actividad ADCC fue 10 nM o superior, y la concentración a la que se alcanzó el valor máximo fue 1 μM o superior.

Ejemplo 2-1: Acción del Anticuerpo Anti-CD4 contra el Modelo de Cáncer Sólido de Ratón - Estudio del Momento de Administración

Una línea celular B16F10 de melanoma de ratón (5x10⁵ células/ratón) se trasplantaron subcutáneamente en el abdomen derecho de ratones C57BL/6 (hembra, de 7 semanas de edad, n = 8); una línea celular Colon 26 de cáncer de colon de ratón (2x10⁵ células/ratón) se trasplantó subcutáneamente en el abdomen derecho de ratones BALB/c (macho, de 7 semanas de edad, n = 8); y una línea celular LLC de cáncer de pulmón de ratón (5x10⁵ células/ratón) se trasplantaron subcutáneamente en el abdomen derecho de ratones C57BL/6 (hembra, de 7 semanas de edad, n = 8). El Día -2 (dos días antes del trasplante de células cancerosas), Día 0 (= día del trasplante de células cancerosas), Día 3, Día 5, Día 9, o Día 12, se administraron 0,2 mg de un anticuerpo anti-CD4 (GK1.5; un anticuerpo que se sabe que es capaz de causar el empobrecimiento de células CD4⁺ en el cuerpo del ratón por la actividad CDC; fabricado por BioXcell) intraperitonealmente de una vez. El diámetro del tumor sólido se midió el Día 14 y el volumen tumoral se calculó como diámetro corto x diámetro corto x diámetro largo x π / 6.

Los resultados de los ratones C57BL/6 trasplantados con la línea celular B16F10 de melanoma se muestran en Fig. 2; los resultados de los ratones BALB/c trasplantados con la línea celular Colon 26 de cáncer de colon se muestran en Fig. 3; y los resultados de los ratones C57BL/6 trasplantados con la línea celular LLC de cáncer de pulmón se muestran en Fig. 4. A partir de estos resultados, se descubrió que el momento óptimo de la administración única del anticuerpo anti-CD4 era del Día 0 al Día 12, especialmente del Día 3 al Día 5, después del trasplante tumoral.

Se observó el crecimiento de cánceres sólidos en los ratones trasplantados con las células cancerosas. En los casos de melanoma B16F10, cuando el anticuerpo se administró el Día 5 después del trasplante, el tumor sólido tenía un tamaño en el que apenas podría observarse. En cambio, en los casos de Colon 26 y LLC, el tumor sólido creció hasta un tamaño en el que podría observarse. En los casos de melanoma B16F10, la formación del tumor sólido se retrasó unos tres días en comparación con los casos de Colon 26 y LLC. Sin embargo, el melanoma B16F10 mostró un rápido crecimiento a partir de entonces, y las muertes ocurrieron en una etapa temprana. En todas las líneas celulares de cáncer, la administración del anticuerpo anti-CD4 produjo una clara diferencia en el crecimiento el Día 7 y posteriormente, después de encontrar el tumor sólido, en comparación con el crecimiento en ratones a los que no se administró el anticuerpo.

Ejemplo 2-2: Relación entre la relación de abundancia de linfocitos T CD4⁺ y efecto antitumoral

La línea celular B16F10 de melanoma de ratón (5x10⁵ células/ratón) se trasplantó subcutáneamente en el abdomen derecho de ratones C57BL/6 (hembra, de 7 semanas de edad, n = 8) (Día 0 = día del trasplante de células cancerosas). El Día 5, se administraron 3,125 μg, 12,5 μg, 50 μg o 200 μg del anticuerpo anti-CD4 (grupo de control negativo: no

se administró anticuerpo).

Dos días después de la administración de anticuerpos (Día 7), se extrajeron los bazos de tres ratones en cada grupo, y se determinó la relación de abundancia de linfocitos T CD4⁺ entre linfocitos extraídos de ellos. Los resultados se muestran en Fig. 5. En los grupos en donde se administraron 3,125 mg o 12,5 mg del anticuerpo anti-CD4, 3,86 % o 2,77 % de linfocitos T CD4⁺ permanecieron, respectivamente (grupo de control negativo: 11,4 %). En cambio, en los grupos en donde se administraron 50 µg o 200 µg del anticuerpo, la relación fue 0,02 % o 0,04 %, respectivamente, indicando la eliminación completa de esas células.

El diámetro del tumor sólido en cada ratón se midió y se calculó el volumen tumoral (diámetro corto x diámetro corto x diámetro largo x π / 6). Fig. 6 muestra el volumen tumoral el Día 15 en cada grupo. Aunque significativo (Dunnett; nivel de significación, p<0,05) se pudieron observar efectos inhibidores del crecimiento tumoral en el grupo de administración de 50 µg y el grupo de administración de 200 µg, en donde los linfocitos T CD4⁺ fueron eliminadas casi por completo, no se pudo confirmar ninguna diferencia respecto al grupo de control negativo en el grupo de administración de 3,125 µg y el grupo de administración de 12,5 µg, en donde quedaba linfocitos T CD4⁺.

Los resultados anteriores sugieren que, en casos de tipos de cáncer cuyas antigenicidades se consideran bajas, puede obtenerse un efecto inhibitor del crecimiento tumoral mediante la eliminación completa de linfocitos T CD4⁺ usando un anticuerpo anti-CD4. Cuando un anticuerpo anti-CD4 se aplica prácticamente a un paciente con cáncer sólido, la relación de abundancia de linfocitos T CD4⁺ puede investigarse utilizando una muestra de sangre periférica o similar para controlar si la dosis es apropiada o no.

Ejemplo 2-3: Relación entre la relación de abundancia de linfocitos T CD4+ y efecto antitumoral

Una línea celular Colon 26 de cáncer de colon (2x10⁵ células/ratón) se trasplantó subcutáneamente en el abdomen derecho de ratones BALB/c (macho, de 7 semanas de edad, n = 8) (Día 0 = día del trasplante de células cancerosas). El Día 5, se administraron 3,125 µg, 12,5 µg o 50 µg del anticuerpo anti-CD4 (grupo de control negativo: no se administró anticuerpo).

Dos días después de la administración de anticuerpos (Día 7), se extrajeron los bazos de tres ratones en cada grupo, y se determinó la relación de abundancia de linfocitos T CD4⁺ entre linfocitos extraídos de ellos. Los resultados se muestran en Fig. 7. En el grupo en donde se administraron 3,125 µg del anticuerpo anti-CD4, 10,14 % de linfocitos T CD4⁺ permanecía (control negativo: 24,77 %). En cambio, en el grupo en donde se administraron 12,5 µg del anticuerpo, la proporción disminuyó a 0,79 %, y, en el grupo en donde se administraron 50 µg del anticuerpo, esas células fueron eliminadas por completo (0,08 %).

El diámetro del tumor sólido en cada ratón se midió y se calculó el volumen tumoral (diámetro corto x diámetro corto x diámetro largo x π / 6). Fig. 8 muestra el volumen tumoral el Día 18 en cada grupo. Aunque el 10,14 % (correspondiente a aproximadamente el 41 % respecto a la proporción en el grupo de control negativo) de linfocitos T CD4⁺ permanecían en el grupo de administración de 3,125 µg, pudo observarse un efecto inhibitor del crecimiento tumoral significativamente mayor que el del grupo de control negativo (Dunnett; nivel de significación, p<0,05). Igualmente, el grupo de administración de 125 µg y el grupo de administración de 50 µg mostraron tendencias a inhibir el crecimiento tumoral.

Los resultados anteriores sugieren que, en casos de tipos de cáncer cuyas antigenicidades se consideran altas, puede obtenerse un efecto inhibitor del crecimiento tumoral suficiente incluso sin la eliminación completa de linfocitos T CD4⁺ usando un anticuerpo anti-CD4. Como se ha mencionado anteriormente, cuando un anticuerpo anti-CD4 se aplica prácticamente a un paciente con cáncer sólido, la relación de abundancia de linfocitos T CD4⁺ puede investigarse utilizando una muestra de sangre periférica o similar para controlar si la dosis es apropiada o no.

Ejemplo 3-1: Comparación del efecto antitumoral mediante el uso de anticuerpo anti-CD4 solo con efecto antitumoral mediante el uso de anticuerpo anti-PD-1 solo o el uso combinado de anticuerpo anti-CD4 + anticuerpo anti-PD-1

La línea celular B16F10 de melanoma de ratón (5x10⁵ células/ratón) se trasplantó subcutáneamente en el abdomen derecho de ratones C57BL/6 (hembra, 7 semanas de edad), y la línea celular Colon 26 de cáncer de colon de ratón (2x10⁵ células/ratón) se trasplantó subcutáneamente en el abdomen derecho de ratones BALB/c (macho, 7 semanas de edad). Después de eso, la administración de anticuerpo se realizó de la siguiente manera (Día 0 = día del trasplante de células cancerosas).

[Tabla 1]

Grupo de control negativo	No se administra anticuerpo.
Grupo anti-CD4 solo	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg; GK1.5) se administra intraperitonealmente en una dosis única el Día 5.

(continuación)

Grupo de control negativo	No se administra anticuerpo.
Grupo anti-PD-1 solo	Un anticuerpo anti-PD-1 (0,2 mg; J43, anticuerpo antagonista, fabricado por BioXcell) se administra intraperitonealmente diariamente durante cinco días desde el Día 4 hasta el Día 8.
Grupo de combinación anti-CD4 + anti-PD-1	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg) se administra intraperitonealmente en una dosis única el Día 5, y un anticuerpo anti-PD-1 (0,2 mg) se administra intraperitonealmente diariamente durante cinco días desde el Día 4 hasta el Día 8.

Fig. 9 muestra el volumen tumoral en cada grupo de ratones C57BL/6 trasplantados con la línea celular B16F10. El volumen tumoral (diámetro corto x diámetro corto x diámetro largo x $\pi / 6$) se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 18.

5 El anticuerpo anti-CD4 inhibió significativamente el crecimiento del tumor sólido de melanoma B16 a 1/5 (21 %) respecto al del grupo control (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,01$). Por otro lado, el anticuerpo anti-PD-1 inhibió significativamente el crecimiento del tumor a aproximadamente la mitad (55 %) respecto al del grupo control (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,01$). Aunque la dosis total del anticuerpo anti-CD4 fue 1/5 de la del anticuerpo anti-PD-1, la acción antitumoral del anticuerpo anti-CD4 fue significativamente más fuerte que la del anticuerpo anti-PD-1 (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,01$).

15 Por otro lado, el uso combinado del anticuerpo anti-CD4 y el anticuerpo anti-PD-1 inhibió casi por completo el crecimiento del tumor sólido de melanoma B16 (al 6 % respecto al crecimiento en el grupo control), con una diferencia significativa en el valor promedio (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,01$). También se encontraron diferencias significativas en el volumen tumoral promedio a un nivel de significación del 1 % (Dunnett) entre el grupo de combinación y el grupo solo anti-CD4, y entre el grupo de combinación y el grupo solo anti-PD-1. Por lo tanto, se sugirió un efecto sinérgico por el uso combinado del anticuerpo anti-CD4 y el anticuerpo anti-PD-1.

20 Fig. 10 muestra el volumen tumoral en cada grupo de ratones BALB/c trasplantados con la línea celular Colon26. El volumen tumoral (diámetro corto x diámetro corto x diámetro largo x $\pi / 6$) se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 29.

25 El anticuerpo anti-CD4 inhibió significativamente el crecimiento del tumor sólido de cáncer de colon, Colon 26, a 1/4 (22 %) respecto al del grupo control (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,01$). Por otro lado, el anticuerpo anti-PD-1 apenas inhibió el crecimiento, sin mostrar diferencias significativas (al 91 % respecto al crecimiento en el grupo control; Dunnett, NS; ensayo t, NS). Aunque la dosis total del anticuerpo anti-CD4 fue 1/5 de la del anticuerpo anti-PD-1, la acción antitumoral del anticuerpo anti-CD4 fue significativamente más fuerte que la del anticuerpo anti-PD-1 (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,01$).

30 Por otro lado, el uso combinado del anticuerpo anti-CD4 y el anticuerpo anti-PD-1 inhibió casi por completo el crecimiento del tumor sólido de cáncer de colon, Colon 26 (al 13 % respecto al crecimiento en el grupo control), con una diferencia significativa en el valor promedio (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,01$). Una diferencia, aunque no significativa, en el volumen tumoral promedio se encontró entre el grupo de combinación y el grupo de anticuerpos anti-CD4, y se encontró una diferencia significativa en el volumen tumoral promedio entre el grupo de combinación y el grupo de administración de anticuerpos anti-PD-1 a un nivel de significación de 1 % (Dunnett). Por lo tanto, se sugirió un efecto sinérgico por el uso combinado del anticuerpo anti-CD4 y el anticuerpo anti-PD-1.

40 **Ejemplo 3-2: Comparación del efecto antitumoral mediante el uso de anticuerpo anti-CD4 solo con efecto antitumoral mediante uso de anticuerpo anti-PD-1 solo o uso combinado de anticuerpo anti-CD4 + anticuerpo anti-PD-1 (Influencia del aumento de la frecuencia de administración)**

45 La línea celular B16F10 de melanoma de ratón (5×10^5 células/ratón) se trasplantó subcutáneamente en el abdomen derecho de ratones C57BL/6 (hembra, 7 semanas de edad), y la línea celular Colon 26 de cáncer de colon de ratón (2×10^5 células/ratón) se trasplantó subcutáneamente en el abdomen derecho de ratones BALB/c (macho, 7 semanas de edad). Después de eso, la administración de anticuerpo se realizó de la siguiente manera (Día 0 = día del trasplante de células cancerosas).

[Tabla 2]

Grupo de control negativo	No se administra anticuerpo.
Grupo anti-CD4 solo	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg; GK1.5) se administra intraperitonealmente en una dosis única el Día 5.
Grupo anti-PD-1 solo	Un anticuerpo anti-PD-1 (0,2 mg; J43, anticuerpo antagonista, fabricado por BioXcell) se administra intraperitonealmente diariamente durante cinco días desde el Día 4 hasta el Día 8.

50

(continuación)

Grupo de control negativo	No se administra anticuerpo.
Grupo de combinación anti-CD4 + anti-PD-1 (una vez/cinco veces)	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg) se administra intraperitonealmente en una dosis única el Día 5, y un anticuerpo anti-PD-1 (0,2 mg) se administra intraperitonealmente diariamente durante cinco días desde el Día 4 hasta el Día 8.
Grupo de administración dos veces de anti-CD4 solo	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg; GK1.5) se administra intraperitonealmente dos veces el Día 5 y el Día 9.
Grupo de diez veces de anti-PD-1 solo	Un anticuerpo anti-PD-1 (0,2 mg; J43, fabricado por BioXcell) se administra intraperitonealmente diariamente durante cinco días desde el Día 4 hasta el Día 8 y nuevamente diariamente durante cinco días desde el Día 14 hasta el Día 18, diez veces en total.
Grupo de combinación anti-CD4 + anti-PD-1 (dos veces/diez veces)	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg) se administra intraperitonealmente dos veces el Día 5 y el Día 9, y un anticuerpo anti-PD-1 (0,2 mg) se administra intraperitonealmente diariamente durante cinco días y nuevamente diariamente durante cinco días desde el Día 14 hasta el Día 18, diez veces en total.

Fig. 11 muestra el volumen tumoral en cada grupo de ratones C57BL/6 trasplantados con la línea celular B16F10. El volumen tumoral (diámetro corto x diámetro corto x diámetro largo x $\pi / 6$) se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 18.

5 El anticuerpo anti-CD4 inhibió significativamente el crecimiento del tumor sólido de melanoma B16 a 1/4 (27 %) respecto al del grupo control (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,01$). Por otro lado, el anticuerpo anti-PD-1 inhibió el crecimiento al 24 % respecto al del grupo control. Aunque la dosis total del anticuerpo anti-CD4 fue 1/5 de la del anticuerpo anti-PD-1, la acción antitumoral del anticuerpo anti-CD4 fue significativamente más fuerte que la del anticuerpo anti-PD-1 (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,01$). El uso combinado del anticuerpo anti-CD4 y el anticuerpo anti-PD-1 inhibió principalmente el crecimiento del tumor sólido de melanoma B16 (al 11 % respecto al crecimiento en el grupo control), con una diferencia significativa en el valor promedio (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,01$). Se encontraron diferencias significativas en el volumen tumoral promedio a un nivel de significación del 1 % (ensayo t) entre el grupo de combinación una vez/cinco veces y el grupo solo anti-CD4, y a un nivel de significación del 0,1 % (ensayo t) entre el grupo de combinación y el grupo anti-PD-1 solo. Por lo tanto, los resultados experimentales en el Ejemplo 3-1 que muestran el efecto sinérgico por la combinación del anticuerpo anti-CD4 y el anticuerpo anti-PD-1 podrían reproducirse.

20 En el grupo de combinación dos veces/diez veces, en donde el anticuerpo anti-CD4 se administró dos veces, y el anticuerpo anti-PD-1 se administró diez veces, el crecimiento del tumor sólido de melanoma B16 se inhibió casi por completo (al 2 % respecto al crecimiento en el grupo control) con un valor promedio significativamente diferente al del grupo control (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,01$). También se encontraron diferencias significativas en el volumen tumoral promedio a un nivel de significación de 0,1 % (ensayo t) entre el grupo de combinación dos veces/diez veces y el grupo solo anti-CD4, y entre el grupo de combinación dos veces/diez veces y el grupo de combinación una vez/cinco veces. Por lo tanto, se sugirió fuertemente que el efecto sinérgico por la combinación del anticuerpo anti-CD4 y el anticuerpo anti-PD-1 puede potenciarse aumentando la frecuencia de administración. Ejemplo de Referencia 3-3: Estudio del efecto antitumoral mediante el uso de anticuerpo anti-CD4 solo contra la línea celular 4T1 de cáncer de mama de ratón

30 Una línea celular 4T1 de cáncer de mama de ratón (1×10^5 células/ratón) se trasplantó subcutáneamente en la almohadilla de grasa mamaria de ratones BALB/c (hembra, 7 semanas de edad), y la administración de anticuerpos se realizó de la siguiente manera (Día 0 = día de trasplante de células cancerosas).

[Tabla 3]

Grupo de control negativo	No se administra anticuerpo.
Grupo de administración de anticuerpos anti-CD4	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg; GK1.5) se administra intraperitonealmente dos veces el Día 5 y el Día 9.

35 Fig. 12 muestra el volumen tumoral en cada grupo de ratones BALB/c trasplantados con la línea celular 4T1. El volumen tumoral (diámetro corto x diámetro corto x diámetro largo x $\pi / 6$) se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 17. El anticuerpo anti-CD4 inhibió significativamente el crecimiento del tumor sólido 4T1 al 76 % respecto al del grupo control (ensayo t; nivel de significación, $p < 0,001$). Este resultado sugiere que el anticuerpo anti-CD4 también inhibe el crecimiento tumoral de la línea celular 4T1 de cáncer de mama.

40 Ejemplo de referencia 4: Comparación del efecto antitumoral mediante el uso de anticuerpo anti-CD4 solo con efecto antitumoral mediante uso combinado de anticuerpo anti-CD4 + anticuerpo anti-CD137 o uso combinado de anticuerpo anti-CD4 + 5-FU

45 La línea celular B16F10 de melanoma de ratón (5×10^5 células/ratón) se trasplantó subcutáneamente en el abdomen

derecho de ratones C57BL/6 (hembra, 7 semanas de edad), y la línea celular Colon 26 de cáncer de colon de ratón (2×10^5 células/ratón) se trasplantó subcutáneamente en el abdomen derecho de ratones BALB/c (macho, 7 semanas de edad). Después de eso, la administración de anticuerpo se realizó de la siguiente manera (Día 0 = día del trasplante de células cancerosas).

5

[Tabla 4]

Grupo de control negativo	No se administra anticuerpo.
Grupo anti-CD4 solo	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg; GK1.5) se administra intraperitonealmente en una dosis única el Día 5.
Grupo de administración dos veces de anti-CD4 solo	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg; GK1.5) se administra intraperitonealmente dos veces el Día 5 y el Día 9.
Grupo anti-CD137 solo	Un anticuerpo anti-CD137 (0,1 mg; 3 H3, anticuerpo antagonista, Juntendo University) se administra intraperitonealmente diariamente durante cinco días desde el Día 5 hasta el Día 9.
Grupo 5-FU solo	El 5-FU se administra a una dosis de 50 mg/kg dos veces por semana durante dos semanas (Día 5, Día 9, Día 12 y Día 16).
Grupo de combinación anti-CD4 + anti-CD137	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg) se administra intraperitonealmente en una dosis única el Día 5, y un anticuerpo anti-CD137 (0,1 mg) se administra intraperitonealmente diariamente durante cinco días desde el Día 5 hasta el Día 9.
Grupo de combinación anti-CD4 + 5-FU	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg) se administra intraperitonealmente en una dosis única el Día 5, y 5-FU se administra a una dosis de 50 mg/kg dos veces por semana durante dos semanas.

Fig. 13 muestra el volumen tumoral en cada grupo de ratones C57BL/6 trasplantados con la línea celular B16F10. El volumen tumoral (diámetro corto x diámetro corto x diámetro largo x $\pi / 6$) se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 15.

10

El anticuerpo anti-CD4 inhibió significativamente el crecimiento tumoral sólido de melanoma B16 a la mitad o más de eso en el grupo control (al 43 % respecto al crecimiento en el grupo control) (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,01$). El efecto de la administración única del anticuerpo anti-CD4 fue equivalente al efecto de la administración cuatro veces de 5-FU. El efecto inhibidor del crecimiento observado en los casos de administración doble del anticuerpo anti-CD4 no fue inferior al doble que en los casos de administración única del anticuerpo. Se espera que la regresión completa del cáncer sea posible mediante la administración del anticuerpo anti-CD4 tres veces. Por otro lado, el anticuerpo anti-CD137 apenas inhibió el crecimiento, sin mostrar diferencias significativas (al 95 % respecto al crecimiento en el grupo control; Dunnett, NS; ensayo t, NS). Aunque la dosis total del anticuerpo anti-CD4 fue 1/2,5 de la del anticuerpo anti-CD137, la acción antitumoral del anticuerpo anti-CD4 fue significativamente más fuerte que la del anticuerpo anti-CD137 (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,01$).

15

20

Por otro lado, en uso combinado del anticuerpo anti-CD4 y el anticuerpo anti-CD137 inhibió casi por completo el crecimiento del tumor sólido de melanoma B16 (hasta el 12 %), con una diferencia significativa en el valor promedio (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,05$). El volumen tumoral promedio mostró diferencias significativas entre el grupo de combinación y el grupo solo anti-CD4 a un nivel de significación del 5 % (ensayo t), y entre el grupo de combinación y el grupo solo anti-CD137 a un nivel de significación del 1 % (Dunnett). Por lo tanto, se sugirió un efecto sinérgico por el uso combinado del anticuerpo anti-CD4 y el anticuerpo anti-CD 137.

25

El agente quimioterapéutico 5-FU, que clínicamente ya se ha usado ampliamente, inhibió significativamente el crecimiento del tumor sólido de melanoma B16 a 1/3 (36 %) respecto al del grupo control (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,01$). El crecimiento tumoral se inhibió más fuertemente (al 21 % respecto al crecimiento en el grupo de control) en el grupo de combinación anti-CD4 + 5-FU en comparación con el crecimiento en los grupos en donde se usaron individualmente, aunque la diferencia no fue significativa. Por lo tanto, se sugirió un efecto sinérgico por la combinación.

30

35

Ejemplo 5-1: Efecto antitumoral por uso combinado de anticuerpo anti-CD4 + anticuerpo anti-PD-1

La línea celular Colon 26 de cáncer de colon de ratón (2×10^5 células/ratón) se trasplantó subcutáneamente en el abdomen derecho de ratones BALB/c (macho, 7 semanas de edad). Después de eso, la administración de anticuerpo se realizó de la siguiente manera (Día 0 = día del trasplante de células cancerosas).

40

[Tabla 5]

Grupo de control negativo	No se administra anticuerpo.
Grupo anti-CD4 solo	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg; GK1.5) se administra intraperitonealmente en una dosis única el Día 5.

(continuación)

Grupo de control negativo	No se administra anticuerpo.
Grupo anti-PD-1 solo	Un anticuerpo anti-PD-1 (0,2 mg; J43, anticuerpo antagonista, fabricado por BioXcell) se administra intraperitonealmente diariamente durante cinco días desde el Día 4 hasta el Día 8.
Grupo de combinación anti-CD4 + anti-PD-1	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg) se administra intraperitonealmente en una dosis única el Día 5, y un anticuerpo anti-PD-1 (0,2 mg) se administra intraperitonealmente diariamente durante cinco días desde el Día 4 hasta el Día 8.

Después de la administración de anticuerpos, se midió el diámetro del tumor sólido en cada ratón y se calculó el volumen tumoral (diámetro corto x diámetro corto x diámetro largo x $\pi/6$). Como resultado, el uso combinado del anticuerpo anti-CD4 y el anticuerpo anti-PD-1 inhibió el crecimiento tumoral en todos los ratones el día 12 y posteriores. El Día 29, el volumen tumoral promedio en estos ratones se convirtió en 13 % respecto al del grupo de control.

El resultado de la evaluación para cada ratón fue el siguiente. El Día 18 y posteriormente, cuatro de ocho ratones mostraron reducción el volumen de sus tumores, y, el Día 36, tres de los ocho ratones mostraron regresión completa de sus tumores (Fig. 14).

Diez días después de la regresión completa del tumor (Día 46), los tres ratones que mostraron la regresión completa el Día 36 fueron sometidos a inoculación subcutánea, en su costado ventral, de células Colon 26 en un número cinco superior (1×10^6 células/ratón) que cuando las células se inocularon inicialmente.

Los resultados se muestran en Fig. 14 y Fig. 15. Cinco días después de la re-inoculación (Día 51), dos de los tres ratones mostraron rastros de tumores y, siete días después de la re-inoculación (Día 53), se encontraron masas tumorales en los tres ratones. Sin embargo, según la comparación de su volumen tumoral promedio el Día 53 con el de los ratones observados 7 días después de la inoculación inicial (Día 7), el promedio el Día 53 fue 1/7 respecto al promedio el Día 7 en el grupo de control, y 1/4 respecto al promedio del Día 7 en el grupo de combinación de anticuerpo anti-CD4 + anticuerpo anti-PD-1.

Los tumores cuyo crecimiento se observó después de la re-inoculación mostraron una reducción de sus volúmenes 11 días después de la reinoculación (Día 57) en todos los ratones, y ya no se encontraron tumores en todos los ratones 14 días después de la reinoculación (Día 64), indicando un rechazo completo de los tumores.

Estos resultados sugieren que el tratamiento con el anticuerpo anti-CD4 tiene efecto para proteger contra cánceres sólidos recurrentes en el organismo, es decir, que el agente de la presente invención puede suprimir la recurrencia y metástasis de cánceres sólidos.

Ejemplo 5-2: Efecto antitumoral por uso combinado de anticuerpo anti-CD4 + anticuerpo anti-PD-L1

La línea celular Colon 26 de cáncer de colon de ratón (2×10^5 células/ratón) se trasplantó subcutáneamente en el abdomen derecho de ratones BALB/c (macho, 7 semanas de edad). Después de eso, la administración de anticuerpo se realizó de la siguiente manera (Día 0 = día del trasplante de células cancerosas).

[Tabla 6]

Grupo de control negativo	No se administra anticuerpo.
Grupo anti-CD4 solo	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg; GK1.5) se administra intraperitonealmente en una dosis única el Día 5.
Grupo anti-PD-L1 solo	Un anticuerpo anti-PD-L1 (0,2 mg; 10F.9G2, fabricado por BioXcell) se administra intraperitonealmente el Día 4, Día 8, Día 14 y Día 18, cuatro veces en total.
Grupo de combinación anti-CD4 + anti-PD-L1	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg) se administra intraperitonealmente en una dosis única el Día 5, y un anticuerpo anti-PD-L1 (0,2 mg) se administra intraperitonealmente el Día 4, Día 8, Día 14 y Día 18, cuatro veces en total.

Después de la administración de anticuerpos, se midió el diámetro del tumor sólido en cada ratón y se calculó el volumen tumoral (diámetro corto x diámetro corto x diámetro largo x $\pi/6$). Como resultado, el uso combinado del anticuerpo anti-CD4 y el anticuerpo anti-PD-L1 inhibió el crecimiento tumoral en todos los ratones el día 10 y posteriores. El Día 21, el volumen tumoral promedio en estos ratones se convirtió en 2,5 % respecto al del grupo de control.

El resultado de la evaluación para cada ratón fue el siguiente. El Día 18 y posteriormente, nueve de cada diez ratones mostraron una reducción del volumen de sus tumores y, el Día 28, seis de los diez ratones mostraron regresión completa de sus tumores (Fig. 16).

Catorce días después de la regresión completa del tumor (Día 42), los seis ratones que mostraron la regresión completa el Día 28 fueron sometidos a inoculación subcutánea, en su costado ventral, de células Colon 26 en un número cinco superior (1×10^6 células/ratón) que cuando las células se inocularon inicialmente.

5 Los resultados se muestran en Fig. 16 y Fig. 17. Cuatro días después de la re-inoculación (Día 46), cuatro de los seis ratones mostraron rastros de tumores. Sin embargo, según la comparación de su volumen tumoral promedio el Día 46 con el de los ratones observado 7 días después de la inoculación inicial (Día 7), el promedio el Día 46 fue 1/20 respecto al promedio el Día 7 en el anticuerpo anti-CD4 + grupo de combinación de anticuerpo anti-PD-L1.

10 Los tumores cuyo crecimiento se observó después de la re-inoculación mostraron una reducción de sus volúmenes 7 días después de la re-inoculación (Día 49) en todos los ratones, y ya no se encontraron tumores en todos los ratones 10 días después de la re-inoculación (Día 52), indicando el rechazo completo de los tumores.

15 Estos resultados también sugieren, de manera similar al Ejemplo 5-1, que el tratamiento con el anticuerpo anti-CD4 tiene efecto para proteger contra cánceres sólidos recurrentes en el organismo, es decir, que el agente de la presente invención puede suprimir la recurrencia y metástasis de cánceres sólidos.

20 **Ejemplo 5-3: Efectos antitumorales por uso combinado de anticuerpo anti-CD4 + anticuerpo anti-PD-1, y uso combinado de anticuerpo anti-CD4 + anticuerpo anti-PD-L1 - --Especificidades de línea celular de antígenos de cáncer**

25 La línea celular Colon 26 de cáncer de colon de ratón (2×10^5 células/ratón) se trasplantó subcutáneamente en el abdomen derecho de ratones BALB/c (macho, 7 semanas de edad). Después de eso, la administración de anticuerpo se realizó de la siguiente manera (Día 0 = día del trasplante de células cancerosas).

[Tabla 7]

Grupo de control negativo	No se administra anticuerpo.
Grupo anti-CD4 solo	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg; GK1.5) se administra intraperitonealmente en una dosis única el Día 5.
Grupo anti-PD-1 solo	Un anticuerpo anti-PD-1 (0,2 mg; J43, anticuerpo antagonista, fabricado por BioXcell) se administra intraperitonealmente diariamente durante cinco días desde el Día 4 hasta el Día 8.
Grupo anti-PD-L 1 solo	
Grupo de combinación anti-CD4 + anti-PD-1	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg) se administra intraperitonealmente en una dosis única el Día 5, y un anticuerpo anti-PD-1 (0,2 mg) se administra intraperitonealmente diariamente durante cinco días desde el Día 4 hasta el Día 8.
Grupo de combinación anti-CD4 + anti-PD-L1	

30 Después de la administración de anticuerpos, se midió el diámetro del tumor sólido en cada ratón y se calculó el volumen tumoral (diámetro corto x diámetro corto x diámetro largo x $\pi/6$). Como resultado, cuando el anticuerpo anti-CD4 y el anticuerpo anti-PD-1 se usaron en combinación, la inhibición del crecimiento tumoral comenzó en todos los ratones el Día 14 y posteriores. El Día 29, el volumen tumoral promedio en estos ratones se convirtió en 39 % respecto al del grupo de control (Fig. 18). El uso combinado del anticuerpo anti-CD4 y el anticuerpo anti-PD-L1 inhibió el crecimiento tumoral en todos los ratones el Día 14 y posteriores. El Día 29, el volumen tumoral promedio en estos ratones se convirtió en 1 % respecto al del grupo de control (Fig. 18).

35 El resultado de la evaluación para cada ratón fue el siguiente. En el grupo de combinación anti-CD4 + anti-PD-1, cuatro de ocho ratones mostraron regresión completa de sus tumores el Día 32. Igualmente, en el grupo de combinación anti-CD4 + anti-PD-L1, siete de ocho ratones mostraron una reducción en sus volúmenes tumorales, y el Día 26 se logró una regresión completa de los tumores.

40 Diez ratones con regresión completa se dividieron en dos grupos, cada uno formado por cinco individuos y, 17 días después de la regresión completa del tumor (Día 49), los ratones fueron sometidos a inoculación subcutánea, en su costado ventral, de células Colon 26 o células 4T1 en un número cinco veces mayor (1×10^6 células/ratón) que cuando las células se inocularon inicialmente. Después se investigó el crecimiento tumoral. Para comparación, Colon 26 (2×10^5 células/ratón) o 4T1 (2×10^5 células/ratón) preparadas al mismo tiempo se trasplantaron subcutáneamente en el abdomen derecho de ratones BALB/c normales (macho, 7 semanas de edad), y el crecimiento tumoral se investigó posteriormente. Los resultados se muestran en Fig. 19 y Fig. 20.

45 En los ratones BALB/c en donde Colon 26 (2×10^5 células/ratón) o 4T1 (2×10^5 células/ratón) se trasplantaron por primera vez (n, Nativo), ambas líneas celulares mostraron claramente el crecimiento tumoral y, por tanto, era evidente que las actividades de crecimiento de ambas líneas celulares se mantuvieron.

Los resultados en los ratones Colon 26-rechazados (r, rechazados) fueron los siguientes. En el grupo re-inoculado con Colon 26, que es la línea celular de cáncer de colon que había sido rechazada una vez, no se encontró crecimiento tumoral adicional en todos los ratones a diferencia de los ratones normales, indicando rechazo tumoral completo. En cambio, en el grupo en donde los ratones Colon 26-rechazados fueron inoculados con la línea celular 4T1 de cáncer de mama, que es diferente a la de colon 26 rechazada una vez, el desarrollo del cáncer se encontró cinco días después de la inoculación (Día 54), y el cáncer creció continuamente a partir de entonces sin ser rechazado. Sin embargo, aunque la línea celular 4T1 de cáncer de mama no fue rechazada en los ratones Colon 26-rechazados, su tasa de crecimiento tumoral fue significativamente menor que la de los ratones normales a los que se trasplantó la línea celular.

Estos resultados sugieren que el tratamiento con el anticuerpo anti-CD4 tiene efecto para proteger contra cánceres sólidos recurrentes en el organismo, es decir, que el agente de la presente invención puede suprimir la recurrencia y metástasis de cánceres sólidos. En particular, se sugirió fuertemente que el agente inhibe el crecimiento de cánceres primarios desarrollados en otros sitios, así como el crecimiento del mismo tipo de cáncer.

Ejemplo 6: Efectos antitumorales por uso combinado del anticuerpo anti-CD4 con el anticuerpo anti-PD-L1, Anticuerpo anti-PD-L2, Anticuerpo Anti-OX40, o Anticuerpo Anti-CTLA-4

La línea celular B16F10 de melanoma de ratón (5×10^5 células/ratón) se trasplantó subcutáneamente en el abdomen derecho de ratones C57BL/6 (hembra, de 7 semanas de edad, n = 8), y la administración de anticuerpos se realizó como se describe a continuación (Día 0 = día del trasplante de células cancerosas).

[Tabla 8]

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

Fig. 21 muestra el volumen tumoral en cada grupo de ratones C57BL/6 trasplantados con la línea celular B16F10. El volumen tumoral (diámetro corto x diámetro corto x diámetro largo x $\pi / 6$) se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 16.

El anticuerpo anti-CD4 inhibió significativamente el crecimiento del tumor sólido de melanoma B16 a aproximadamente 1/3 respecto al del grupo control (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,01$). Aquí, basándose en observaciones del efecto inhibitor del crecimiento tumoral mediante el uso único de cada agente, se muestra claramente que el anticuerpo anti-CD4 tiene mejor efecto inhibitorio que los de los otros anticuerpos anti-punto de control inmunitario.

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

Ejemplo de referencia 7: Efectos antitumorales por uso combinado de anticuerpo anti-CD4 con anticuerpo anti-BTLA, anticuerpo anti-GITR, Anticuerpo Anti-LAG-3, o Anticuerpo Anti-TIM-3

La línea celular B16F10 de melanoma de ratón (5×10^5 células/ratón) se trasplantó subcutáneamente en el abdomen derecho de ratones C57BL/6 (hembra, de 7 semanas de edad, n = 8), y la administración de anticuerpos se realizó como se describe a continuación (Día 0 = día del trasplante de células cancerosas).

[Tabla 9]

Grupo de control negativo	No se administra anticuerpo.
Grupo anti-CD4 solo	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg; GK1.5) se administra intraperitonealmente dos veces el Día 5 y el Día 9.
Anti-BTLA, anti-GITR, anti-LAG-3, o grupo anti-TIM-3 solo	Un anticuerpo anti-BTLA (6A6, fabricado por BioXcell), anticuerpo anti-GITR (DTA-1, anticuerpo agonista; fabricado por BioXcell), anticuerpo anti-LAG-3 (C9B7W, fabricado por BioXcell) o anticuerpo anti-TIM-3 (RMT3-23, fabricado por BioXcell) se administra intraperitonealmente a una dosis de 0,2 mg el Día 4, Día 8, Día 14, y Día 18, cuatro veces en total.
Anti-CD4 + anti-BTLA, anti-GITR, anti-LAG-3 o grupo de combinación anti-TIM-3	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg) se administra intraperitonealmente dos veces el Día 5 y el Día 8, y un anticuerpo anti-BTLA, anticuerpo anti-GITR, el anticuerpo anti-LAG-3, o un anticuerpo anti-TIM-3 se administra intraperitonealmente a una dosis de 0,2 mg el Día 4, Día 8, Día 14 y Día 18, cuatro veces en total.

Fig. 22 muestra el volumen tumoral en cada grupo de ratones C57BL/6 trasplantados con la línea celular B16F10. El volumen tumoral (diámetro corto x diámetro corto x diámetro largo x $\pi / 6$) se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 15.

El anticuerpo anti-CD4 inhibió significativamente el crecimiento del tumor sólido de melanoma B16 a aproximadamente la mitad respecto al del grupo control (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,01$). Aquí, basándose en observaciones del efecto inhibitorio del crecimiento tumoral mediante el uso de cada agente solo, se muestra claramente que el anticuerpo anti-CD4 tiene un mejor efecto inhibitorio que los otros anticuerpos anti-punto de control inmunológico cuando se usan solos.

Por otro lado, cuando se administró el anticuerpo anti-LAG-3 solo, pudo observarse una inhibición significativamente más fuerte del crecimiento respecto al crecimiento en el grupo de control (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,05$), aunque la inhibición fue más débil que la del anticuerpo anti-CD4. Cuando el anticuerpo anti-CD4 se usó en combinación con el anticuerpo anti-BTLA, anticuerpo anti-GITR, anticuerpo anti-LAG-3, o anticuerpo anti-TIM-3, El crecimiento del tumor sólido de melanoma B16 se inhibió más fuertemente que en los grupos en donde los anticuerpos se administraron individualmente sin la administración del anticuerpo anti-CD4. Los promedios en los grupos de anticuerpos de punto de control inmunitario solos fueron significativamente diferentes de los promedios en los grupos de combinación de anticuerpos anti-CD4 (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,05$ o $p < 0,01$). Por lo tanto, los efectos sinérgicos de las combinaciones se hicieron evidentes. En particular, el promedio en el grupo de anticuerpos anti-CD4 solo fue significativamente diferente de los promedios en los grupos en los que el anticuerpo anti-BTLA, el anticuerpo anti-GITR o el anticuerpo anti-TIM-3 se combinó (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,01$), indicando efectos sinérgicos notables.

Ejemplo de referencia 8: Efecto antitumoral por uso combinado de anticuerpo anti-CD4 + agente anticáncer de molécula pequeña

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

[Tabla 10]

Grupo de control negativo	No se administra ningún fármaco.
Grupo anti-CD4 solo	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg; GK1.5) se administra intraperitonealmente dos veces el Día 5 y el Día 9.
Oxaliplatino (OXA, ELPLAT I. V. SOLUCIÓN DE INFUSIÓN, Yakult) grupo solo	Oxaliplatino se administra a una dosis de 10 mg/kg dos veces por semana durante dos semanas (Día 5, Día 9, Día 12 y Día 16).
Grupo de combinación anti-CD4 + OXA	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg) se administra intraperitonealmente dos veces el Día 5 y el Día 9, y OXA se administra a una dosis de 10 mg/kg dos veces por semana durante dos semanas.
Gemcitabina (GEM, Inyección de Gemzar; Eli Lilly Japón) solo grupo	La gemcitabina se administra a una dosis de 20 mg/kg dos veces por semana durante dos semanas (Día 5, Día 9, Día 12 y Día 16).
Grupo de combinación anti-CD4 + GEM	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg) se administra intraperitonealmente dos veces el Día 5 y el Día 9, y GEM se administra a una dosis de 20 mg/kg dos veces por semana durante dos semanas.
Ciclofosfamida (CPA, Endoxan Injection; Shionogi & Co., Ltd.) grupo solo	La ciclofosfamida se administra a una dosis de 10 mg/kg dos veces por semana durante dos semanas (Día 5, Día 9, Día 12 y Día 16).
Grupo de combinación anti-CD4 + CPA	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg) se administra intraperitonealmente dos veces el Día 5 y el Día 9, y el CPA se administra a una dosis de 10 mg/kg dos veces por semana durante dos semanas.

Fig. 23 muestra el volumen tumoral en cada grupo de ratones C57BL/6 trasplantados con la línea celular B16F10. El volumen tumoral (diámetro corto x diámetro corto x diámetro largo x $\pi / 6$) se calculó a partir del diámetro del tumor sólido medido el Día 15.

5 El anticuerpo anti-CD4 inhibió significativamente el crecimiento tumoral sólido de melanoma B16 a la mitad o más de eso en el grupo control (al 47 % respecto al crecimiento en el grupo control) (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,01$). Por otro lado, en el grupo de OXA solo, el crecimiento se inhibió en el mismo grado que en el grupo de anticuerpo anti-CD4 solo (al 46 % respecto al crecimiento en el grupo control) (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,01$). Sin embargo, se observó pérdida de peso en ratones que recibieron OXA a esta dosis, indicando la aparición de un efecto secundario. En el grupo GEM solo, el crecimiento se inhibió al 63 % respecto al del grupo de control, con una inhibición más débil que la del grupo de anticuerpos anti-CD4 solo (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,05$). Por otro lado, CPA solo inhibió débilmente el crecimiento (al 75 % respecto al crecimiento en el grupo de control), sin mostrar diferencias significativas respecto al grupo control.

15 Cuando el anticuerpo anti-CD4 se usó en combinación con OXA, GEM o CPA, el crecimiento del tumor sólido de melanoma B16 se inhibió más fuertemente que cuando el anticuerpo anti-CD4 se usó solo. En particular, el promedio en el grupo de combinación de CPA fue significativamente diferente del promedio en el grupo solo anti-CD4 (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,05$). En todos los grupos combinados, el efecto se mejoró notablemente en comparación los grupos OXA, GEM, o CPA solo, y las diferencias entre los promedios fueron significativas (Dunnett; OXA: nivel de significación, $p < 0,05$; GEM: nivel de significación, $p < 0,05$; CPA: nivel de significación, $p < 0,001$), sugiriendo efectos sinérgicos por uso combinado del anticuerpo anti-CD4 con los fármacos anticáncer.

25 **Ejemplo 8: Comparación del efecto antimetastásico por uso del anticuerpo anti-CD4 solo con efecto antimetastásico mediante uso combinado del anticuerpo anti-CD4 + anticuerpo anti-PD-1 o uso combinado del anticuerpo anti-CD4 + anticuerpo anti-PD-L1, contra la línea celular 4T1 de cáncer de mama de ratón**

30 Una línea celular 4T1 de cáncer de mama de ratón (1×10^5 células/ratón) se transplantó subcutáneamente en la almohadilla de grasa mamaria de ratones BALB/c (hembra, 7 semanas de edad), y la administración de anticuerpos se realizó de la siguiente manera (Día 0 = día de trasplante de células cancerosas).

[Tabla 11]

Grupo de control negativo	No se administra anticuerpo.
Grupo anti-CD4 solo	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg; GK1.5) se administra intraperitonealmente dos veces el Día 5 y el Día 9.
Grupo anti-PD-L1 solo	Un anticuerpo anti-PD-L1 (0,2 mg; 10F.9G2, fabricado por BioXcell) se administra intraperitonealmente el Día 4, Día 8, Día 14, y Día 18, cuatro veces en total.
Grupo de combinación anti-CD4 + anti-PD-1	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg; GK1.5) se administra intraperitonealmente dos veces el Día 5 y el Día 9, y un anticuerpo anti-PD-1 (0,2 mg; J43, fabricado por BioXcell) se administra intraperitonealmente el Día 4, Día 8, Día 14, y Día 18, cuatro veces en total.
Grupo de combinación anti-CD4 + anti-PD-L1	Un anticuerpo anti-CD4 (0,2 mg; GK1.5) se administra intraperitonealmente dos veces el Día 5 y el Día 9, y un anticuerpo anti-PD-L1 (0,2 mg; 10F.9G2, fabricado por BioXcell) se administra intraperitonealmente el Día 4, Día 8, Día 14, y Día 18, cuatro veces en total.

35 Fig. 24 muestra el número de metástasis en los pulmones en cada grupo de ratones BALB/c trasplantados con la línea celular 4T1. Los ratones se diseccionaron y sus pulmones se extirparon el Día 28 para recuento de la metástasis.

40 El anticuerpo anti-CD4 redujo significativamente el número de metástasis de 4T1 a los pulmones al 15 % respecto al del grupo control (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,001$). El grupo de combinación anti-CD4 + anti-PD-1 redujo significativamente el número de metástasis al 32 % respecto al grupo de control (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,001$).

45 Por otro lado, en el grupo anti-PD-L1 solo, hubo una tendencia a inhibir la metástasis, pero no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, el grupo de combinación anti-CD4 + anti-PD-L1 redujo significativamente el número de metástasis al 44 % respecto al grupo de control (Dunnett; nivel de significación, $p < 0,001$), mostrando efecto antimetastásico mejorado por el uso combinado.

Ejemplo de referencia 9: Estudio sobre especificidad antigénica de linfocitos T CD8⁺ que aumentan los ganglios linfáticos que drenan el tumor después de la administración de un anticuerpo anti-CD4 solo

50 La línea celular B16F10 de melanoma de ratón (5×10^5 células/ratón) se inoculó subcutáneamente en el lado derecho

de la parte posterior de ratones C57BL/6 (marcadores congénicos CD45.1⁻ CD45.2⁺ CD90.1⁻ CD90.2⁺), y 0,2 mg del anticuerpo anti-CD4 (GK1.5) se administraron intraperitonealmente intraperitoneal en una dosis única el Día 5. El Día 6, una suspensión mixta que contiene los siguientes tres tipos del mismo número de linfocitos T CD8⁺ que tienen diferentes especificidades de antígeno, marcados con CFSE utilizando el Kit Vybrant (marca registrada) trazador celular CFDA SE (tecnologías Life), se transfirió desde la vena de la cola (transferencia adoptiva).

(1) linfocitos T CD8⁺ de Pmel-1:

Los linfocitos T CD8⁺ preparados a partir de un ratón Pmel-1, ratón que se preparó mediante transferencia génica de TCR restringido a MHC de clase I específico para antígeno de melanoma gp100 (marcadores congénicos: CD45.1⁺ CD45.2⁺ CD90.1⁺ CD90.2⁻).

(2) Linfocitos T CD8⁺ de OT-1:

linfocitos T CD8⁺ preparados a partir de un ratón OT-1, ratón que se preparó mediante transferencia génica de TCR restringido a MHC de clase I específico de ovoalbúmina (marcadores congénicos: CD45.1⁺ CD45.2⁻ CD90.1⁻ CD90.2⁺).

(3) Linfocitos T CD8⁺ policlonales:

linfocitos T CD8⁺ preparados a partir de un ratón de tipo silvestre (marcadores congénitos: CD45.1⁺ CD45.2⁺ CD90.1⁻ CD90.2⁺)

Además del grupo de anticuerpo(+) anti-CD4 B16F10(+), un grupo de anticuerpo(-) anti-CD4 B16F10(-), un grupo de anticuerpo(+) anti-CD4 B16F10(-), y un grupo de anticuerpo(-) anti-CD4 B16F10(+) se proporcionaron como grupos de control.

Tres días después de la transferencia adoptiva, se prepararon suspensiones celulares a partir del tumor (tumor), ganglio linfático braquial con drenaje tumoral (dLN), ganglio linfático braquial sin drenaje (ndLN), sangre periférica (sangre), y bazo (bazo). Las células se tiñeron con anticuerpos marcados con fluorescencia específicos para los antígenos de superficie, y el número de linfocitos T CD8⁺ donantes transferidos y la frecuencia de división celular se analizaron por citometría de flujo.

En los grupos de ratones usados en el presente experimento, los linfocitos T CD8⁺ de Pmel-1 en el grupo B16F10 (+) pueden reconocer el antígeno específico. Por otro lado, los linfocitos T CD8⁺ de OT-1 y policlonales no pueden reconocer el antígeno específico en ninguno de los grupos. Es decir, si la administración del anticuerpo anti-CD4 favorece la respuesta de crecimiento no solo para linfocitos T CD8⁺ de Pmel-1 en el grupo B16F10(+), sino también para linfocitos T CD8⁺ de OT-1 y policlonales en cualquiera de los grupos, la respuesta de crecimiento puede entenderse como una respuesta de crecimiento no específica de antígeno. Por otro lado, si la respuesta de crecimiento se favorece solo para linfocitos T CD8⁺ de Pmel-1 en el grupo B16F10(+), la respuesta de crecimiento puede entenderse como una respuesta de crecimiento específica de antígeno tumoral.

Fig. 25A muestra el protocolo experimental.

Fig. 25B muestra un ejemplo de análisis de citometría de flujo de las células de ganglios linfáticos que drenan el tumor. La fracción IVS-CD45⁻ CD8⁺ se desarrolló según la expresión de CD90.1/FSC para identificar células CD90.1 + Pmel-1. La fracción CD90.1⁻ se desarrolló según la expresión de CD45.1/CD45.2 para identificar por separado linfocitos T CD8⁺ hospedadores de CD45.1⁻ CD45.2⁺, linfocitos T CD8⁺ policlonales de CD45.1⁺ CD45.2⁺ y linfocitos T CD8⁺ de CD45.1⁺ CD45.2⁻ OT-1.

Fig. 25C muestra un ejemplo de los resultados del análisis de la frecuencia de división celular de linfocitos T CD8⁺ de Pmel-1, OT-1 y policlonales del ganglio linfático identificados por el desarrollo mostrado en Fig. 25B, cuyo análisis se realizó utilizando la intensidad de fluorescencia de CFSE como índice. Dado que la señal de fluorescencia de CFSE disminuye a medida que avanza la división celular, la frecuencia de la división celular puede identificarse basándose en la intensidad de fluorescencia de CFSE. El ganglio linfático braquial del grupo anticuerpo(-) anti-CD4 B16F10(-) y el grupo anticuerpo(+) anti-CD4 B16F10 (-), y el ganglio linfático braquial de drenaje tumoral del grupo de anticuerpo(-) anti-CD4 B16F10(+) y el grupo de anticuerpo(+) anti-CD4 B16F10(+), se analizaron. Dado que los linfocitos T CD8⁺ de OT-1 y policlonales no mostraron división celular en ninguno de los grupos y el crecimiento de linfocitos T CD8⁺ de Pmel-1 se produjo solo en las condiciones portadoras de tumor B16F10(+), se sugirió que el aumento en los linfocitos T CD8⁺ en el ganglio linfático braquial que drena el tumor debido a la administración de anticuerpos anti-CD4 fue específico de antígeno tumoral. En comparación entre el grupo de anticuerpo(-) anti-CD4 B16F10(+) y el grupo de anticuerpo(+) anti-CD4 B16F10(+), linfocitos T CD8⁺ de Pmel-1 que habían sufrido una división celular más frecuente se encontraron en el grupo de anticuerpo(+) anti-CD4 B16F10(+). Por tanto, se sugirió que la administración del anticuerpo anti-CD4 favorece el crecimiento de linfocitos T CD8⁺ específicos de tumor.

Fig. 25D muestra el porcentaje de células con frecuencia de división celular de 0 a 1, de 2 a 4 y de 5 a 8 en linfocitos T CD8⁺ de Pmel-1 de ganglio linfático que drena tumor del grupo de anticuerpo(-) anti-CD4 B16F10(+) o del grupo de anticuerpo(+) anti-CD4 B16F10(+). En el grupo de administración de anticuerpo anti-CD4, el porcentaje de células que habían experimentado división celular menos frecuente, es decir, 0-1 y 2-4 veces de división celular, era inferior, mientras que el porcentaje de células que habían experimentado división celular más frecuente, es decir, 5-8 veces de división celular, era mayor, que en el grupo sin administración con significación estadística (n = 5, ensayos t

múltiples; nivel de significación: **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

- 5 Fig. 25E muestra los índices de linfocitos T CD8⁺ de Pmel-1 con frecuencia de división celular de 5 a 8 en sangre periférica (sangre), ganglio linfático que drena el tumor (dLN), ganglio linfático no drenante (ndLN), bazo (bazo), y tumor (tumor) en el grupo de anticuerpo(-) anti-CD4 B16F10(+) o el grupo de anticuerpo anti-CD4 (+) B16F10(+). Las células con una frecuencia de división celular de 5 a 8 se encontraron principalmente en el ganglio linfático que drena el tumor, y el número de esas células fue significativamente mayor en el grupo de administración de anticuerpo anti-CD4 (α CD4) que en el grupo sin administración (Control) (n = 5, ensayos t múltiples; nivel de significación: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$).
- 10 A partir de los resultados anteriores, se sugirió fuertemente que los linfocitos T CD8⁺ que aumentan en el ganglio linfático braquial que drena el tumor cuando el anticuerpo anti-CD4 se administra solo son específicos del antígeno tumoral, y ese aumento no es un aumento inespecífico (proliferación homeostática) en linfocitos T, que a menudo se encuentra en condiciones donde disminuyen los linfocitos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente para uso en el tratamiento de cáncer sólido que comprende como principio activo un anticuerpo anti-CD4 que es un anticuerpo quimérico de tipo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano contra CD4 humano, en donde dicho anticuerpo anti-CD4 no contiene fucosas centrales en las cadenas de azúcar presentes en su región Fc y en donde dicho agente se usa en combinación con al menos uno seleccionado entre un anticuerpo antagonista anti-PD-1 y un anticuerpo anti-PD-L1 que se une al ligando e inhibe la unión del ligando al receptor.
- 10 2. El agente para uso según la reivindicación 1, en donde dicho cáncer sólido es cáncer sólido formado por células cancerosas que se producen espontáneamente.
- 15 3. El agente para uso según las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho cáncer sólido es cáncer epitelial sólido, opcionalmente en donde dicho cáncer epitelial sólido es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer renal y cáncer de mama, o al menos uno seleccionado del grupo que consiste en cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer pancreático y cáncer renal.
- 20 4. El agente para uso según las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho cáncer sólido es al menos uno seleccionado entre melanoma y glioma.
5. El agente para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es para uso en el tratamiento del cáncer sólido en estadios I a IV.
6. El agente para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es para administración sistémica.
- 25 7. El agente para uso según la reivindicación 1, en donde el tratamiento es la supresión de recurrencia del cáncer sólido.
8. El agente para uso según la reivindicación 1, en donde el tratamiento es la supresión de metástasis del cáncer sólido.

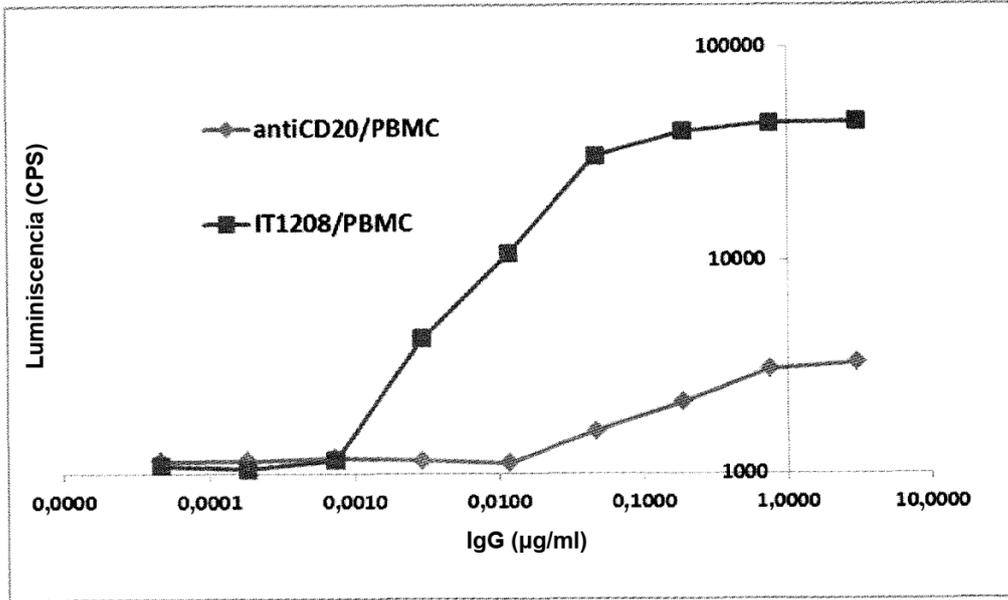


Fig.1

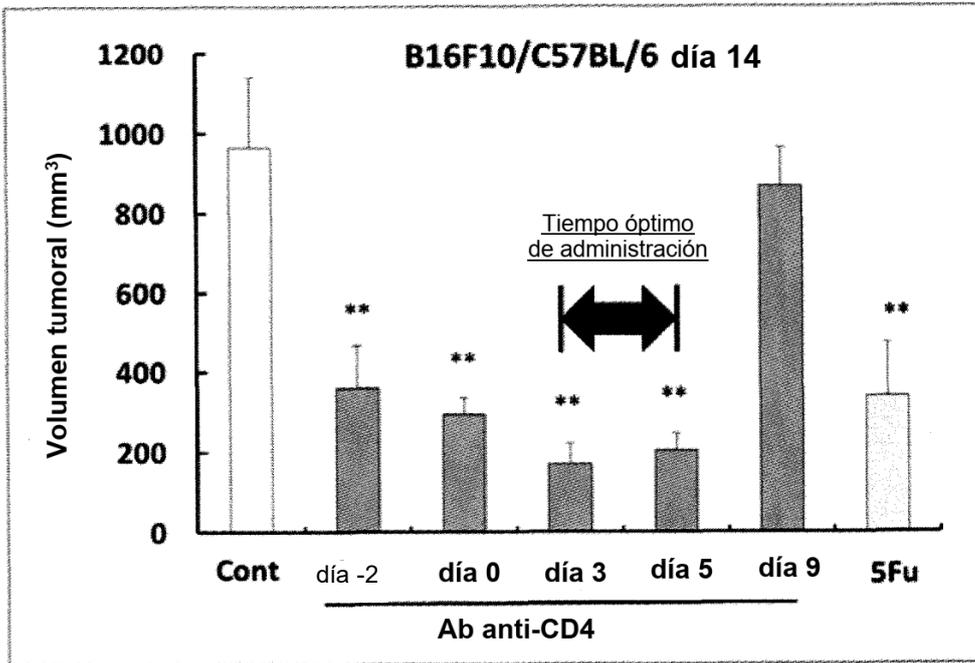


Fig.2

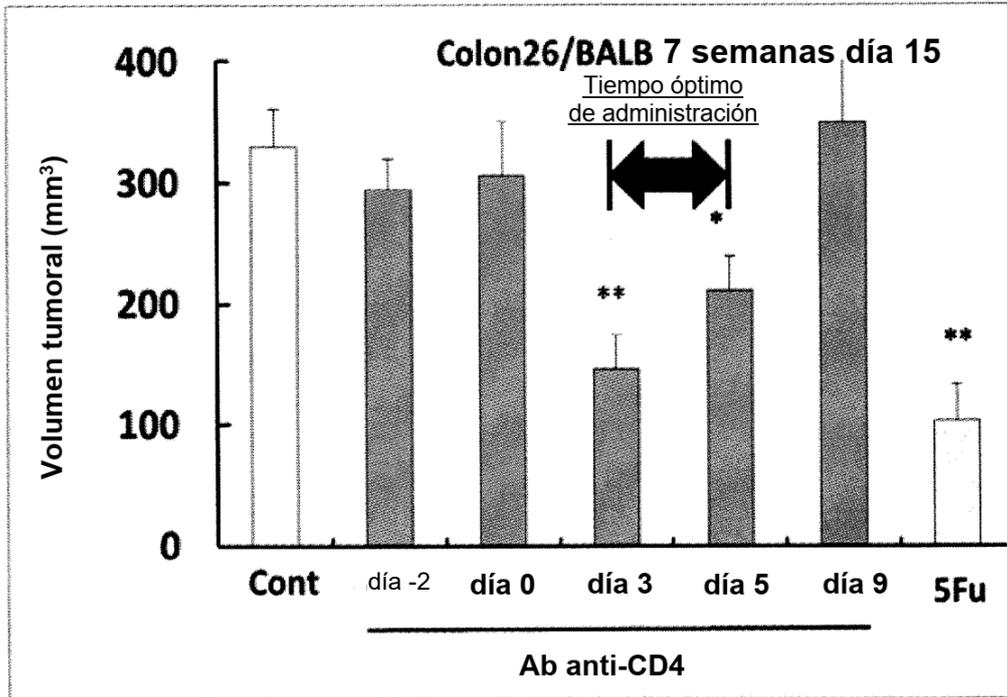


Fig.3

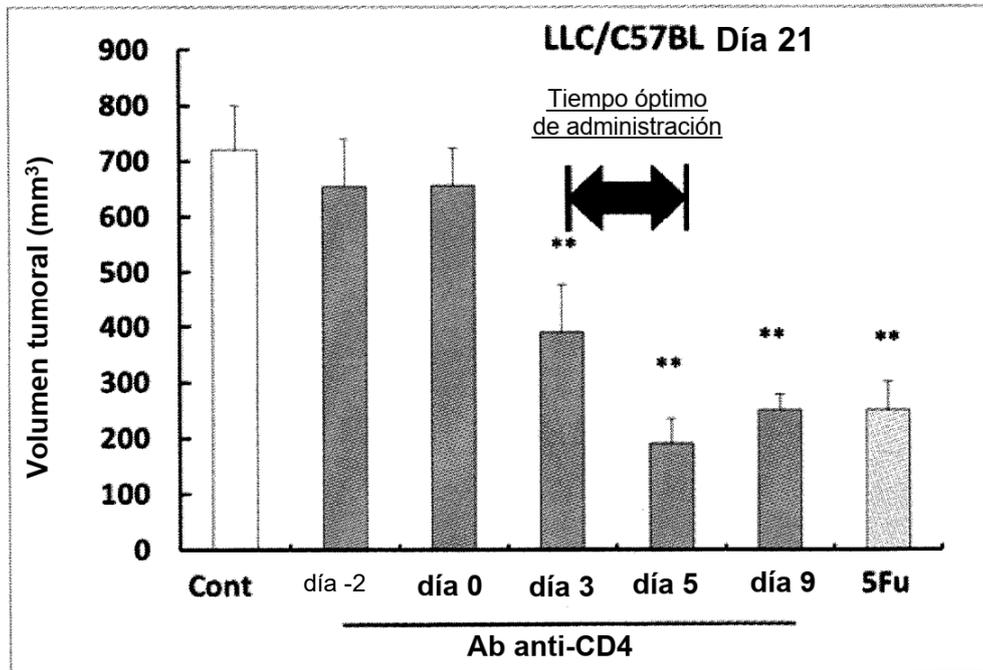


Fig.4

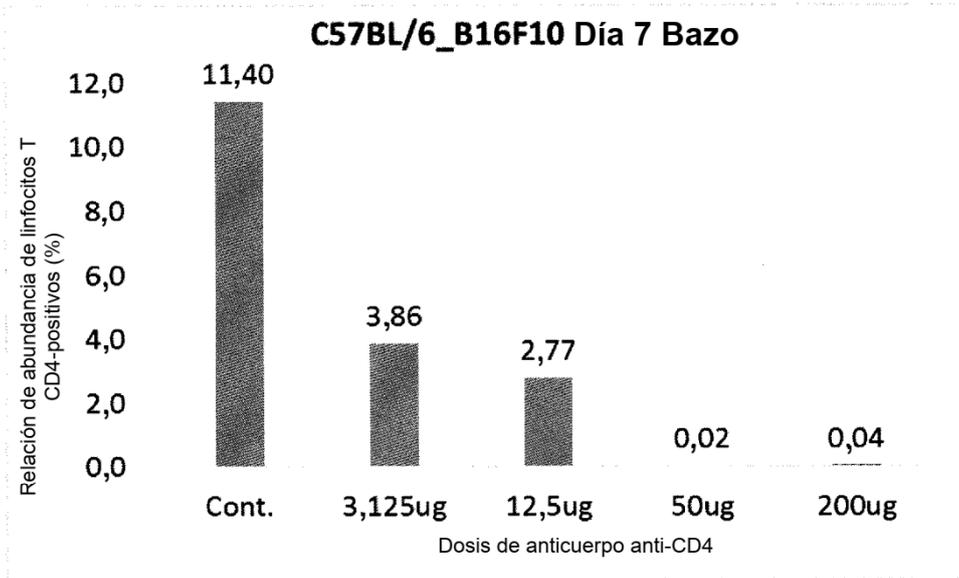


Fig.5

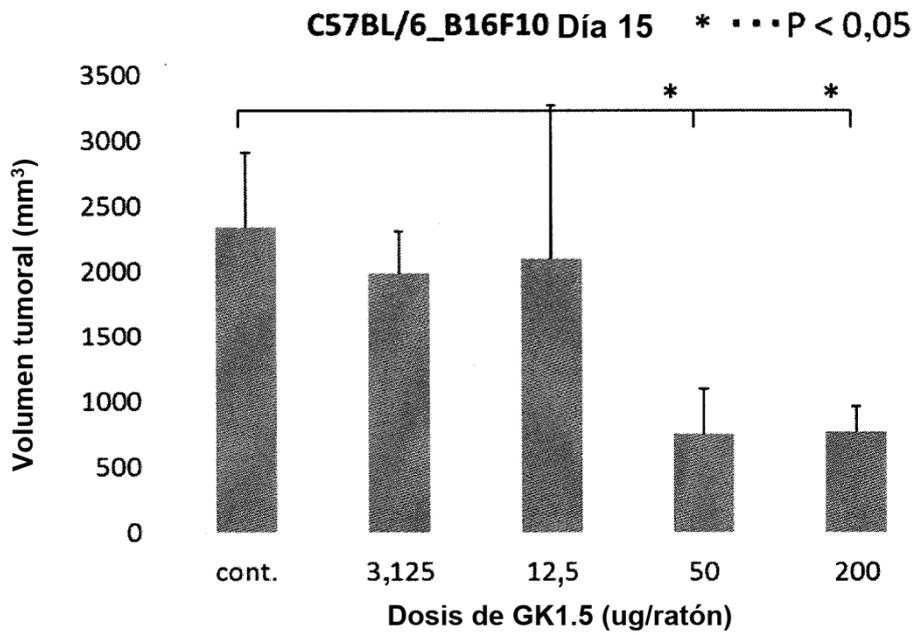


Fig.6

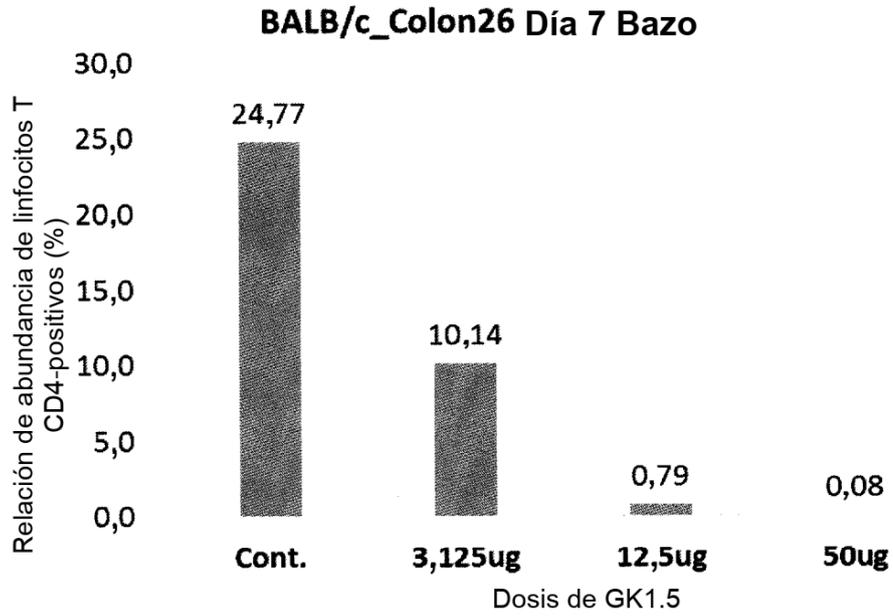


Fig.7

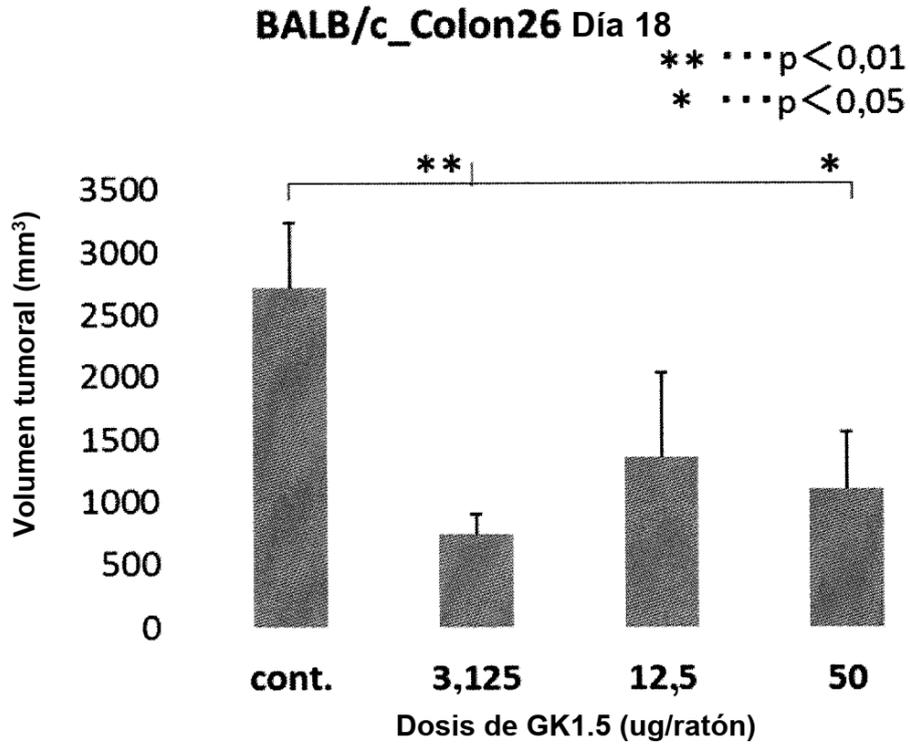


Fig.8

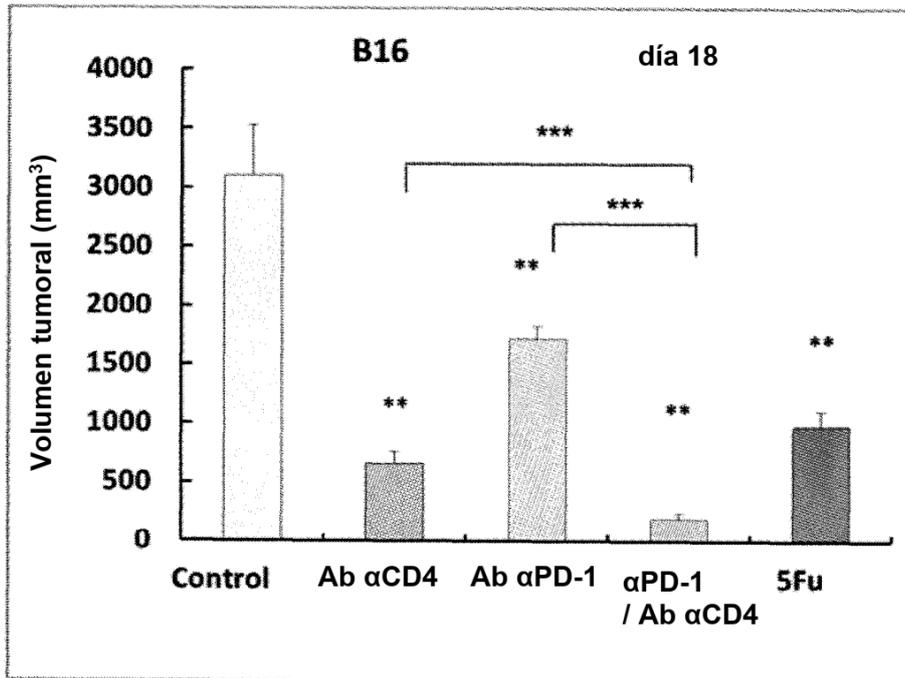


Fig.9

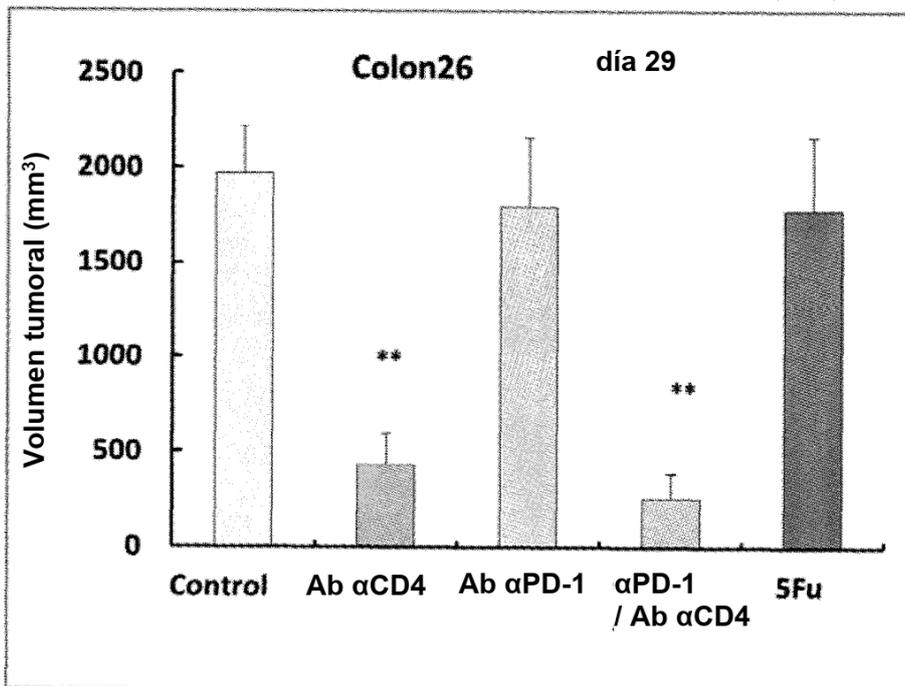


Fig.10

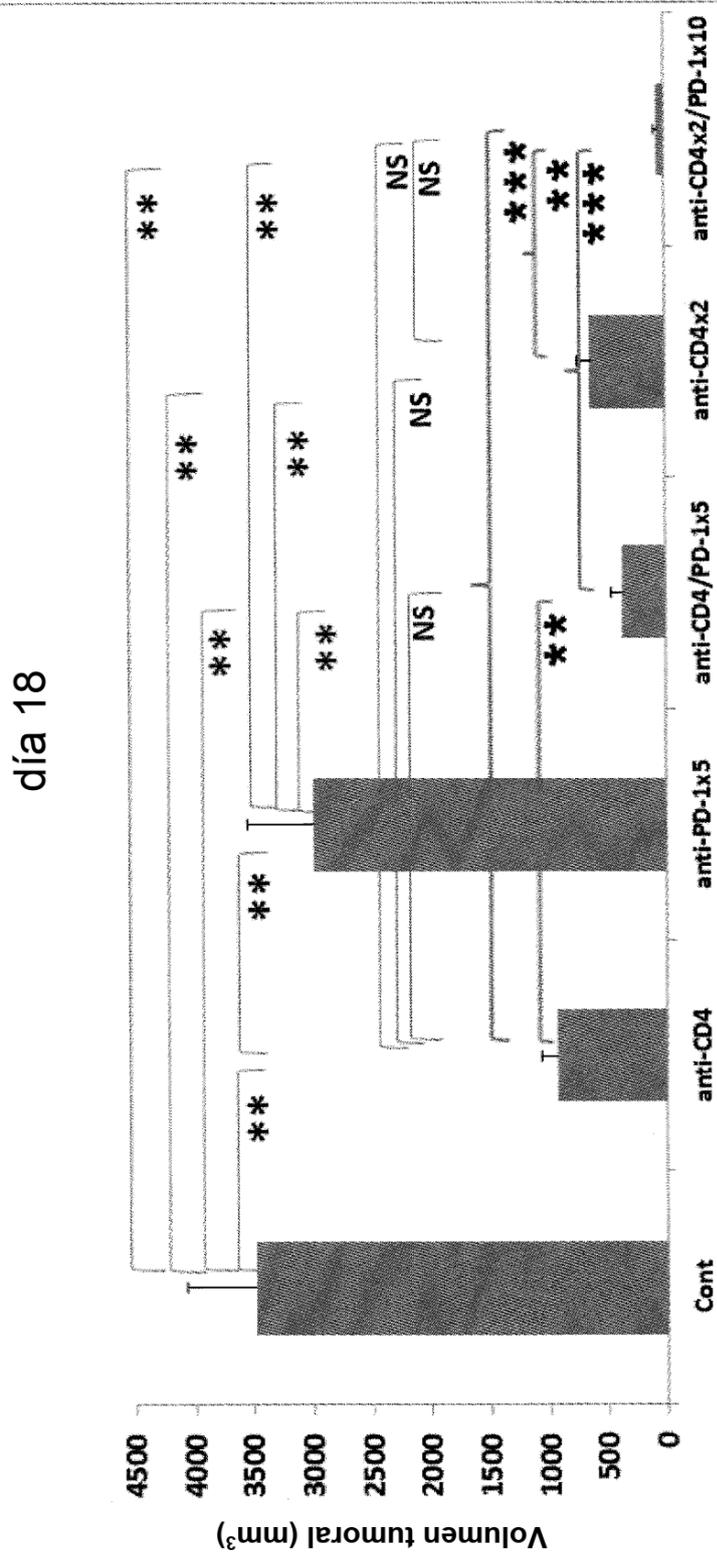


Fig.11

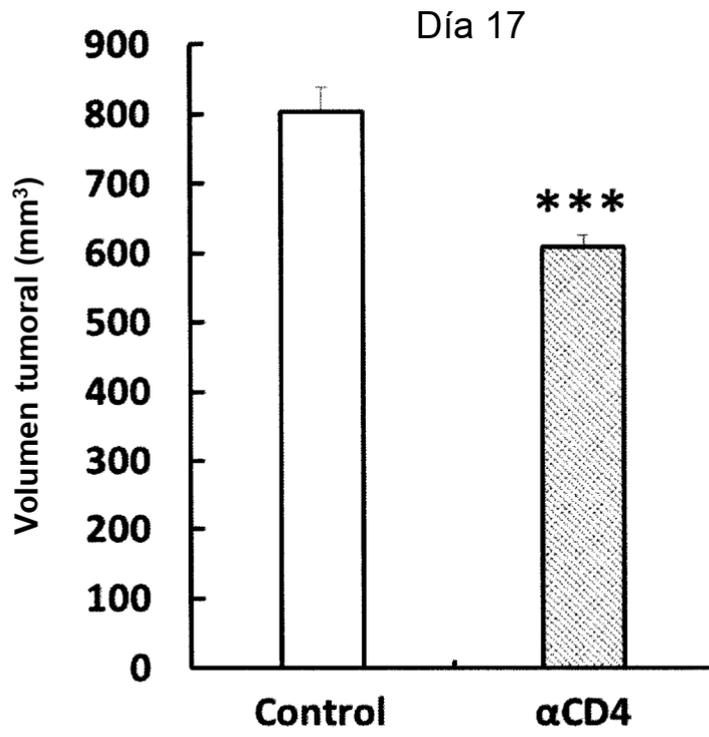
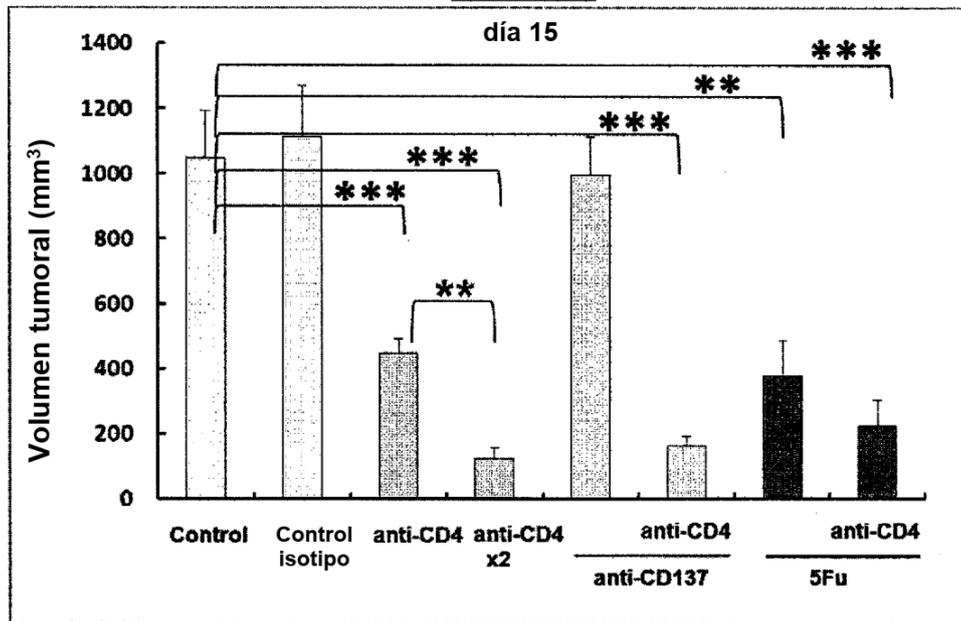


Fig.12

B16F10



frente a Control
 **: p<0,01,
 ***: p<0,001 (Tukey)
 frente a αCD4
 **: p<0,01 (Tukey)

Fig.13

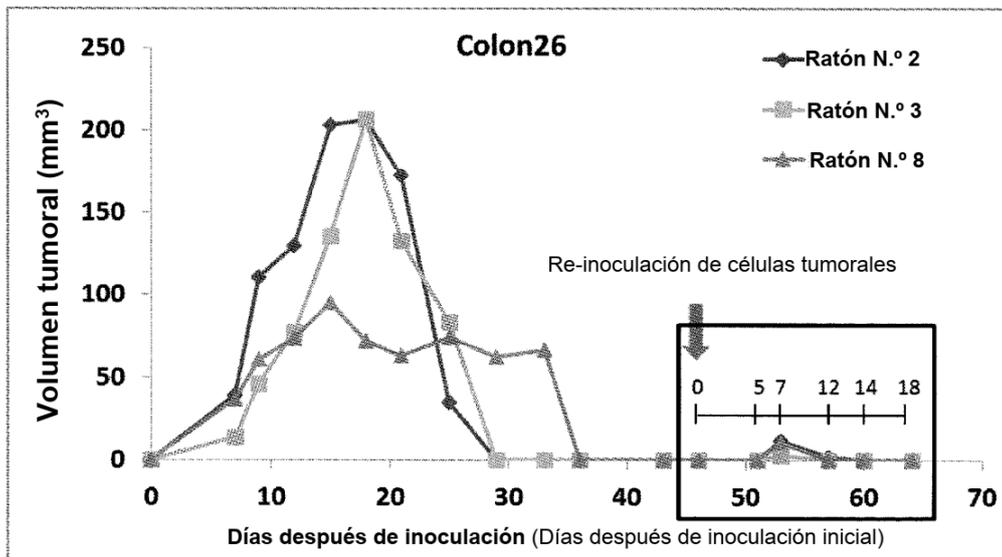


Fig.14

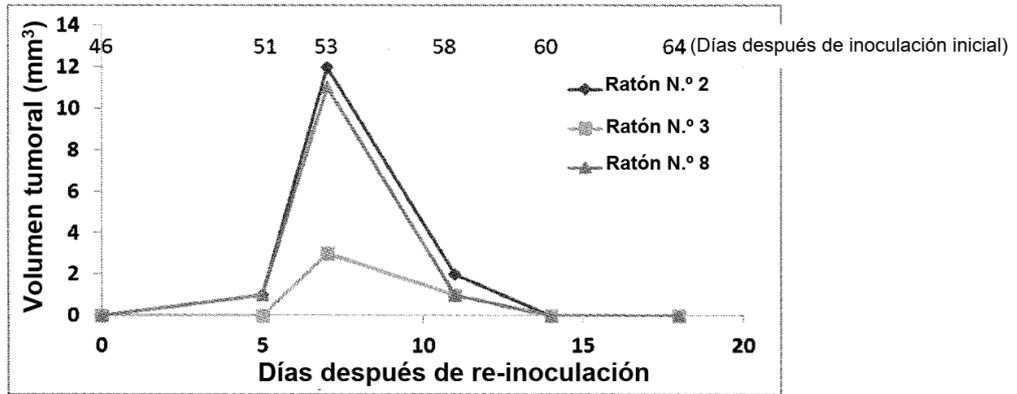


Fig.15

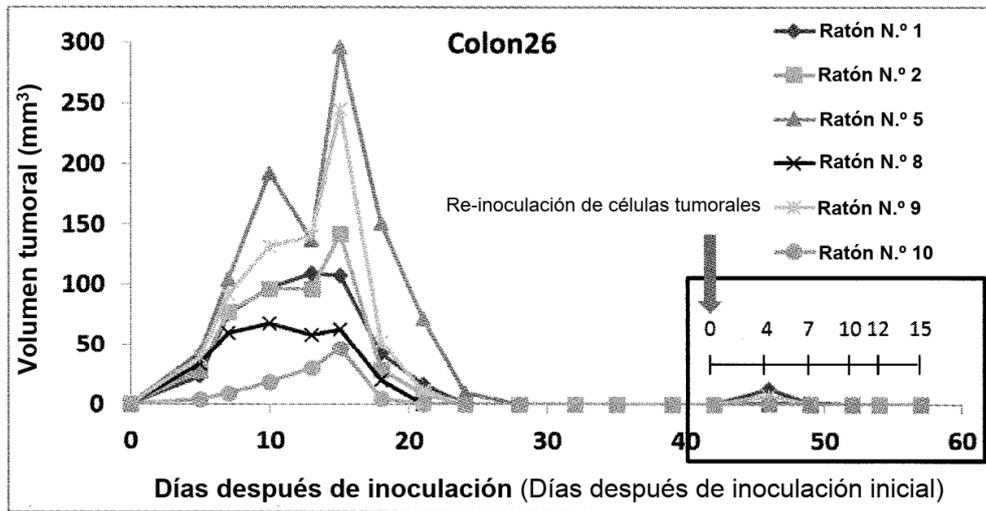


Fig.16

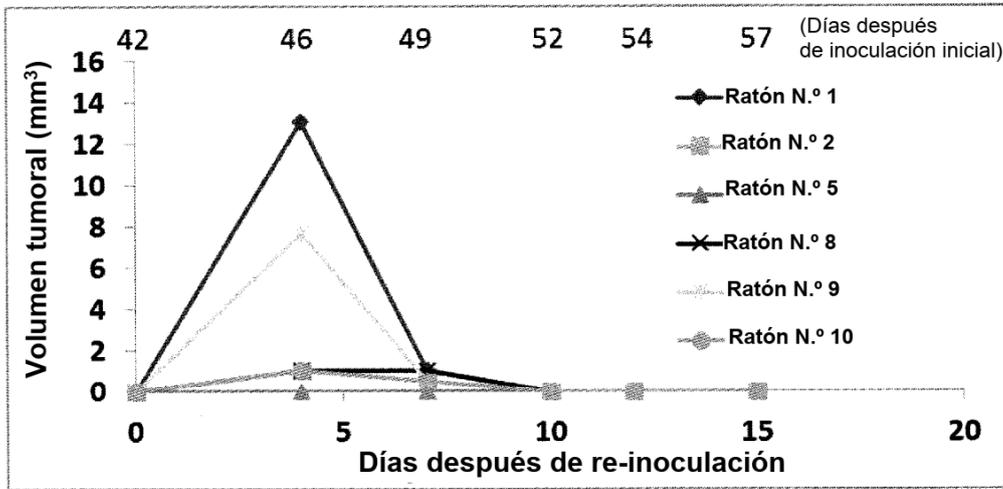


Fig.17

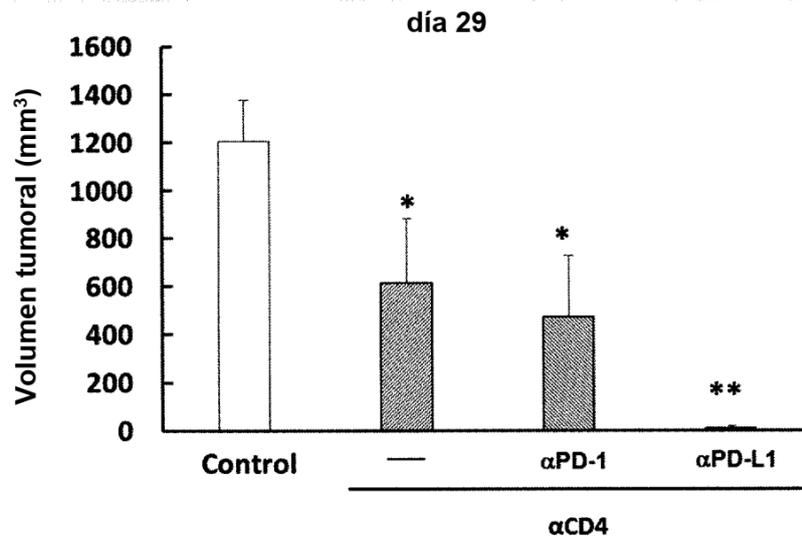


Fig.18

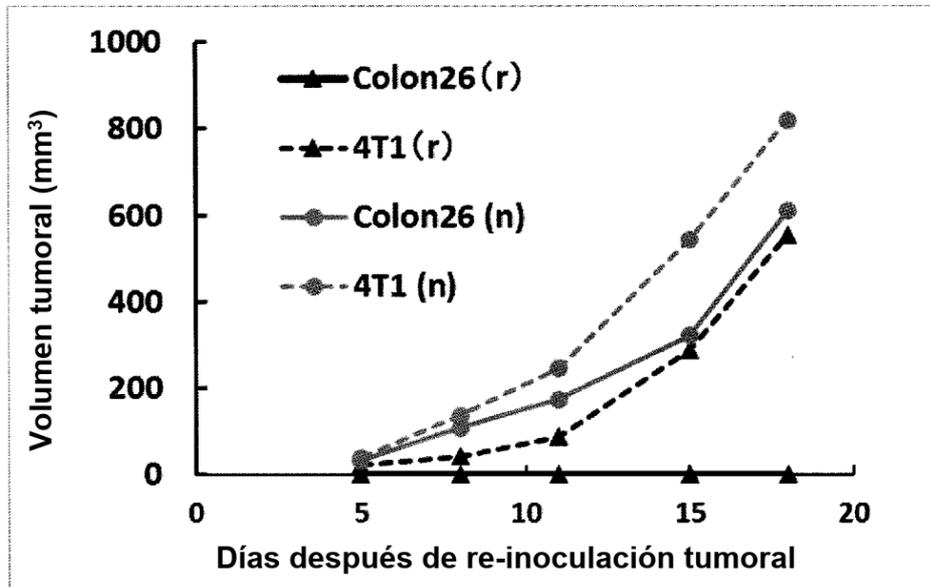


Fig.19

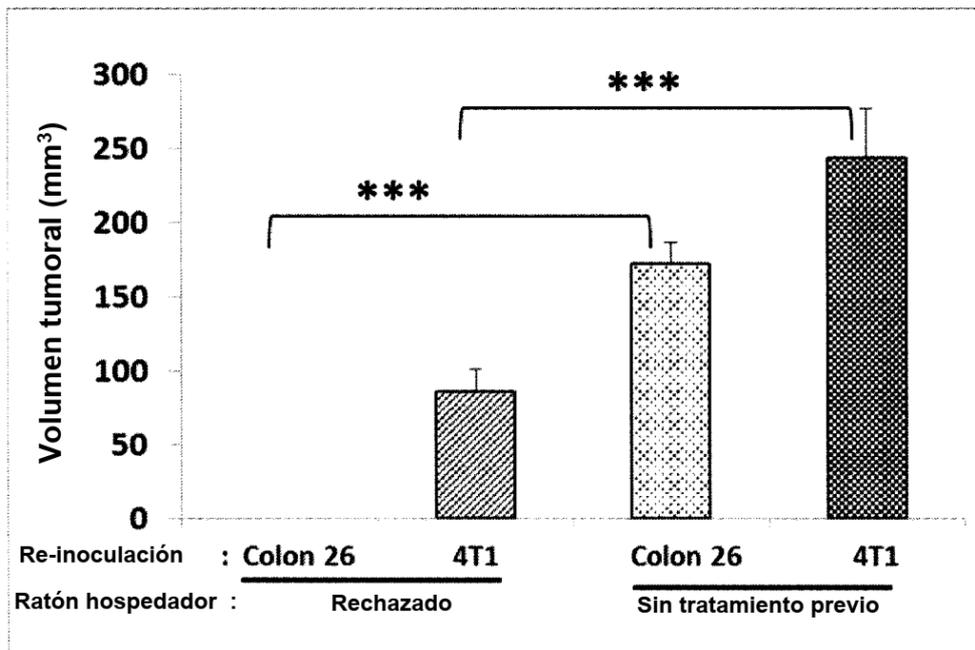
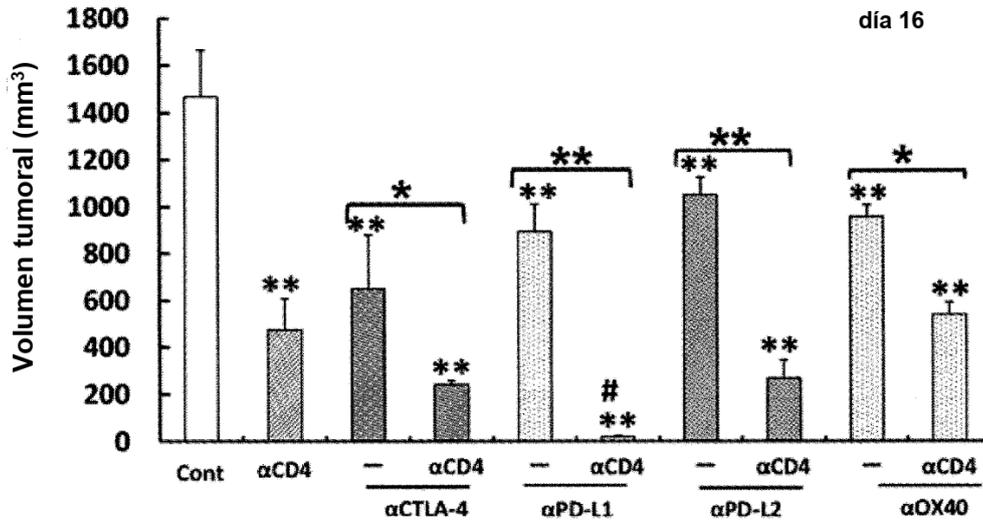
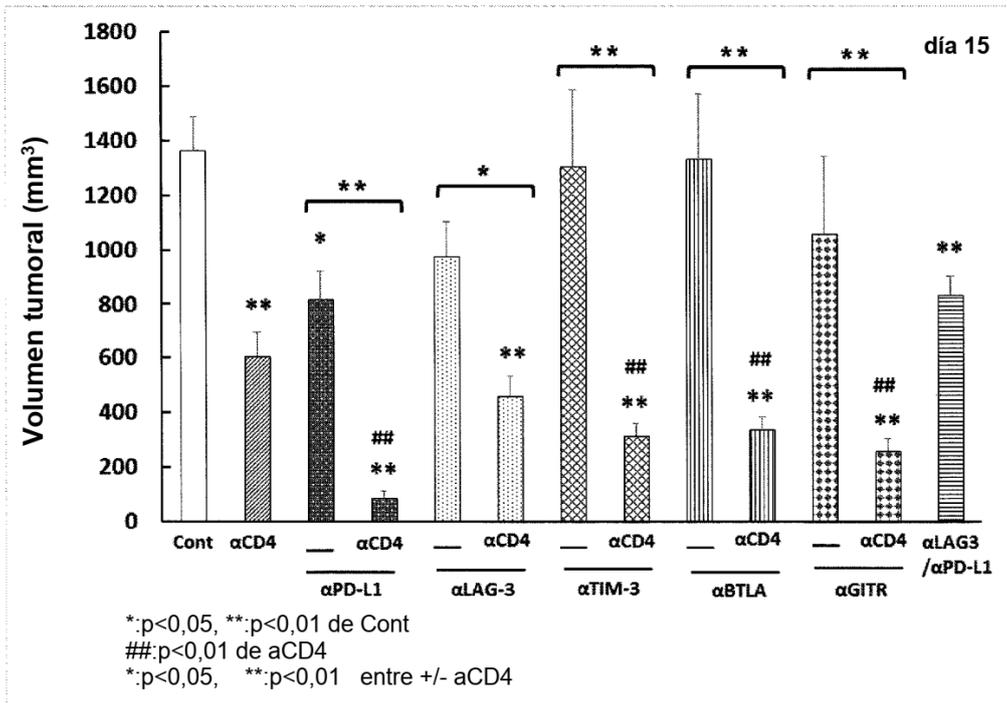


Fig.20



**: $p < 0,01$ de Cont, #: $p < 0,05$ de aCD4
 *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ entre +/- aCD4

Fig.21



*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ de Cont
 ##: $p < 0,01$ de aCD4
 *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ entre +/- aCD4

Fig.22

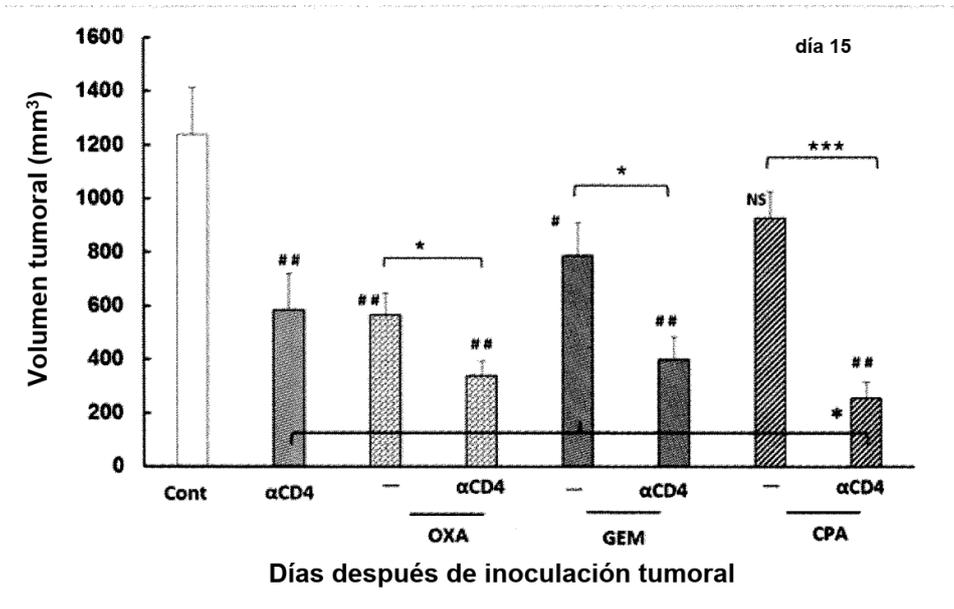


Fig.23

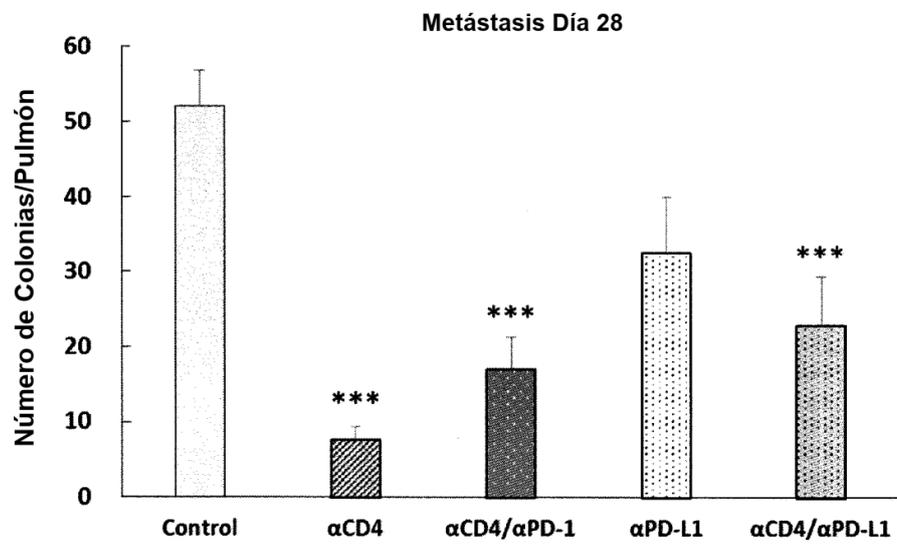


Fig.24

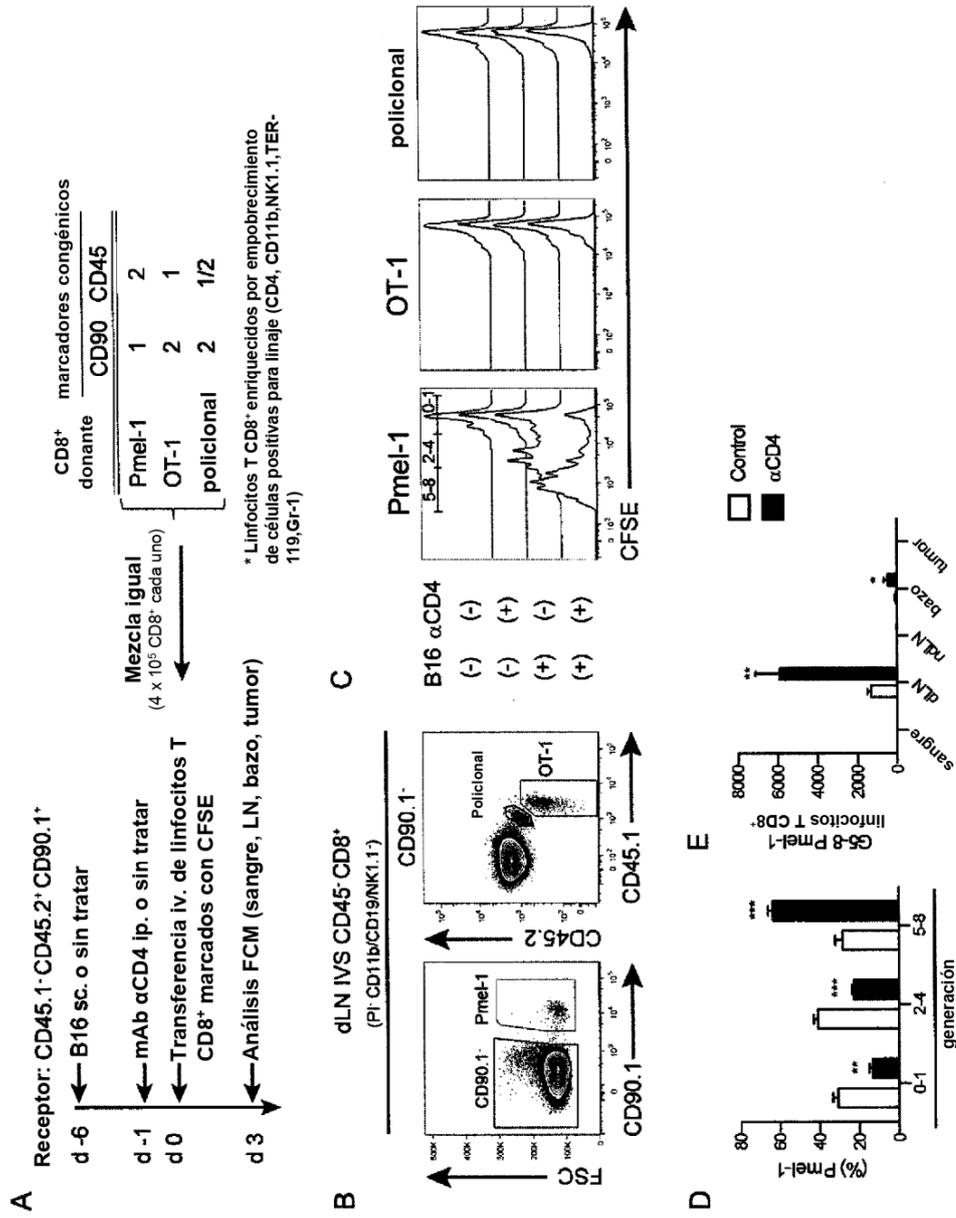


Fig.25