

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 928**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2004 PCT/US2004/016995**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.01.2005 WO05003298**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2004 E 04785793 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 1639010**

54 Título: **Criterio de valoración terapéutico equivalente para inmunoterapia de enfermedades basada en antiCTLA-4**

30 Prioridad:

30.05.2003 US 475067 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2021

73 Titular/es:

**E. R. SQUIBB & SONS, L.L.C. (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08540, US**

72 Inventor/es:

**LOWY, ISRAEL y
NICHOL, GEOFFREY, M.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 813 928 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

Criterio de valoración terapéutico equivalente para inmunoterapia de enfermedades basada en antiCTLA-4

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en líneas generales a inmunología molecular y el tratamiento de enfermedades humanas. En particular, se refiere a métodos de tratamiento refinados usando anticuerpos contra CTLA-4 humano.

10 **Antecedentes de la invención**

El sistema inmunitario de vertebrados requiere múltiples señales para conseguir una activación inmunitaria óptima (véase, por ejemplo, Janeway, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1989;54:1-14; Paul William E., ed. Raven Press, N. Y., Fundamental Immunology, 4.^a edición (1998), particularmente los capítulos 12 y 13, páginas 411 a 478). Las interacciones entre los linfocitos T y las células presentadoras de antígenos (APC) son esenciales para la respuesta inmunitaria. Los niveles de muchas moléculas cohesivas encontradas en linfocitos T y APC aumentan durante una respuesta inmunitaria (Springer et al., A. Rev. Immunol. 1987;5:223-252; Shaw y Shimuzu, Current Opinion in Immunology, 1988 Eds. Kindt y Long, 1:92-97; y Hemler, Immunology Today 1988;9:109-113). Los niveles aumentados de estas moléculas pueden ayudar a explicar la causa de que las APC activadas sean más eficaces en estimular la proliferación de linfocitos T específicos de antígeno que las APC en reposo (Kaiuchi et al., J. Immunol. 1983;131:109-114; Kreiger et al., J. Immunol. 1985;135:2937-2945; McKenzie, J. Immunol. 1988;141:2907-2911; y Hawrylowicz y Unanue, J. Immunol. 1988;141:4083-4088).

La respuesta inmunitaria de linfocitos T es un proceso complejo que implica interacciones entre células (Springer et al., A. Rev. Immunol. 1987;5:223-252), particularmente entre linfocitos T y células accesorias tales como APC, y la producción de mediadores inmunitarios solubles (citocinas o linfoquinas) (Dinarello, New Engl. J. Med 1987;317:940-945; Sallusto, J. Exp. Med. 1997; 179:1109-1118). Esta respuesta está regulada por varios receptores de superficie de linfocitos T, incluyendo el complejo receptor de linfocitos T (Weiss, Ann. Rev. Immunol. 1986;4:593-619) y otras moléculas superficiales "accesorias" (Allison, Curr. Opin. Immunol. 1994; 6:414-419; Springer, 1987, *supra*). Muchas de estas moléculas accesorias son antígenos de diferenciación de superficie celular (CD) de origen natural definidas por la reactividad de los anticuerpos monoclonales sobre la superficie de las células (McMichael, Ed., Leukocyte Typing III, Oxford Univ. Press, Oxford, N.Y., 1987).

El antígeno CD28, una glucoproteína homodimérica de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Aruffo y Seed, Proc. Natl. Acad. Sci. 1987;84:8573-8577), es una molécula accesoria encontrada en la mayoría de linfocitos T humanos maduros (Damle et al., J. Immunol. 1983;131:2296-2300). Las evidencias actuales sugieren que esta molécula funciona en una ruta alternativa de activación de linfocitos T distinta de la iniciada por el complejo receptor de linfocitos T (June et al., Mol. Cell. Biol. 1987;7:4472-4481). Los anticuerpos monoclonales (MAb) reactivos con el antígeno CD28 pueden aumentar las respuestas de linfocitos T iniciadas por diversos estímulos policlonales (revisado por June *et al.*, *supra*). Estos efectos estimuladores pueden resultar de la producción de citocinas inducida por MAb (Thompson et al., Proc. Natl. Acad. Sci 1989;86:1333-1337; y Lindsten et al., Science 1989;244:339-343) como consecuencia de estabilización aumentada del ARNm (Lindsten *et al.*, 1989, *supra*).

CTLA-4 se acepta como opuesto a la actividad de CD28 y atenuador de la activación de linfocitos T (Krummel, J. Exp. Med. 1995;182:459-465; Krummel et al., Int'l Immunol. 1996;8:519-523; Chambers et al., Immunity. 1997;7:885-895). Los ratones deficientes de CTLA-4 padecen linfoproliferación masiva (Chambers *et al.*, *supra*). Se ha informado de que el bloqueo de CTLA-4 aumenta las respuestas de linfocitos T *in vitro* (Walunas et al., Immunity. 1994;1:405-413) e *in vivo* (Kearney, J. Immunol. 1995;155:1032-1036), exacerba la inmunidad antitumoral (Leach, Science 1996;271:1734-1736) y potencia una enfermedad autoinmunitaria inducida (Luhder, J Exp. Med. 1998;187:427-432). También se ha informado de que CTLA-4 tiene un impacto alternativo o adicional sobre el carácter inicial de la respuesta inmunitaria de linfocitos T (Chambers, Curr. Opin. Immunol. 1997;9:396-404; Bluestone, J. Immunol. 1997;158:1989-1993; Thompson, Immunity 1997;7:445-450). Esto es coherente con la observación de que algunos pacientes de enfermedad autoinmunitaria tienen autoanticuerpos contra CTLA-4. Es posible que los autoanticuerpos que bloquean CTLA-4 desempeñen una función patógena en estos pacientes (Matsui, J. Immunol.1999;162:4328-4335).

Se han usado anticuerpos contra CTLA-4 no humano en los diversos estudios analizados anteriormente. Además, Se han descrito anticuerpos humanos contra CTLA-4 humano como moduladores de la inmunoestimulación en varias afecciones patológicas, tal como el tratamiento o la prevención de infección vírica o bacteriana y para tratar el cáncer (por ejemplo, publicación PCT WO 01/14424 y publicación PCT WO 00/37504). La patente de Estados Unidos n.º 5 855 887 divulga un método de aumento de la respuesta de un linfocito T de mamífero contra estimulación antigénica combinando un linfocito T con un agente de bloqueo de CTLA-4. La patente de Estados Unidos n.º 5 811 097 divulga un método de disminución del crecimiento de tumores que no son de linfocitos T administrando un agente de bloqueo de CTLA-4. Las solicitudes de patente de Estados Unidos n.º 09/644 668 y 09/948 939 divulgan anticuerpos contra CTLA-4 humano.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo antiCTLA-4 para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto, cuyo tratamiento comprende inducir un acontecimiento liminar en el sujeto administrando el anticuerpo antiCTLA-4 al sujeto hasta observar el acontecimiento liminar, en el que el acontecimiento liminar es un acontecimiento adverso de grado 3 o 4 seleccionado entre el grupo que consiste en diarrea, enterocolitis, dermatitis, hipofisitis, erupción y prurito, en el que el acontecimiento liminar se induce administrando dosis en escala de anticuerpo antiCTLA-4 o administrando anticuerpo antiCTLA-4 a intervalos de dosificación decrecientes y en el que el anticuerpo antiCTLA-4 es un anticuerpo IgG kappa monoclonal humano que comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPD
RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWFQGTKVEIK

y una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNKK
YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGLVTV
SS.

Descripción detallada

La presente invención proporciona usos médicos basados en anticuerpo contra CTLA-4 predecibles y más eficaces para el tratamiento del cáncer. Los usos médicos de la invención representan un desarrollo significativo en el tratamiento de los cánceres con anticuerpo antiCTLA-4, por que evitan la subdosificación de los pacientes con el anticuerpo. Se ha descubierto inesperadamente una correlación estadísticamente significativa entre la aparición de un acontecimiento adverso y la respuesta al tratamiento en pacientes con cáncer tratados con anticuerpo antiCTLA-4. Mientras que evitar los "acontecimientos adversos" graves ha sido un objetivo en el tratamiento de pacientes con cáncer muy enfermos, los usos médicos de la invención tienen el objetivo de inducir y detectar estos acontecimientos (denominados en este documento "acontecimientos liminares" (AL)). La inducción de un acontecimiento liminar significativo, pero reversible, es médicamente factible en estos pacientes, por que el tratamiento con una dosis suficiente de anticuerpo antiCTLA-4 puede mejorar el cáncer del paciente o prolongar su vida.

Los AL son agudos, relacionados con la dosis, fácilmente controlados y, en algún grado, predecibles. Los AL pueden invertirse con la retirada del fármaco y/o cuidados paliativos con o sin tratamiento específico, habitualmente tratamiento con corticoesteroides. La administración de una dosificación de anticuerpo antiCTLA-4 para inducir un AL y detectar el AL es un método eficaz para tratar el cáncer a causa de la correlación significativa entre la respuesta al tratamiento con anticuerpo antiCTLA-4 y el desarrollo de un AL.

En una realización particular, el anticuerpo antiCTLA-4 de la presente invención es anticuerpo monoclonal humano 10D1 como se divulga en el documento WO 01/14424.

La presente invención se basa, en parte, en observaciones hechas durante el ensayo clínico de un anticuerpo antiCTLA-4 de secuencia humana en inmunoterapia de cánceres, como se describe a continuación. Los ensayos demuestran la eficacia del anticuerpo antiCTLA en el tratamiento de pacientes con cáncer, cuando se suministra una dosificación de anticuerpo antiCTLA-4 suficiente para inducir un AL. De acuerdo con la invención, el anticuerpo antiCTLA-4 se administra en una dosificación suficiente para inducir un AL y el AL se detecta en el paciente.

Diversos estudios dieron lugar al reconocimiento de una correlación entre los AL y la eficacia antitumoral. Por ejemplo, en la cohorte 1 de un estudio, catorce pacientes con melanoma en estadio IV recibieron un anticuerpo antiCTLA-4 10D1 (MDX-010) a 3 mg/kg cada tres semanas durante ocho semanas junto con vacunación con dos péptidos gp100. Todos los pacientes se habían sometido previamente a cirugía para el tumor primario. Seis pacientes se habían sometido a quimioterapia previa. Once pacientes se habían sometido a inmunoterapia previa. La respuesta clínica se midió por tomografía axial computarizada (CT) e imágenes por resonancia magnética (MR). El paciente 11, que se había sometido a quimioterapia previa, obtuvo resolución completa del tumor de pulmón, cerebro y subcutáneo después de 5 ciclos de tratamiento. El paciente 13, que se había sometido a quimioterapia e inmunoterapia previas, obtuvo resolución completa del tumor suprarrenal y pulmonar. El paciente 1, que se había sometido a quimioterapia e inmunoterapia previas, fue un respondedor parcial. Cada uno de los tres respondedores experimentó un AL de grado 3. El paciente 1, un respondedor parcial tuvo enterocolitis y dermatitis de grado 3. El paciente 1 se trató para enterocolitis autoinmunitaria con metil prednisolona IV, que provocó una notable mejora en 24 horas. El paciente 11, un respondedor completo, tuvo hipofisitis y panhipopituitarismo de grado 3. El paciente 11 recibió dosis de remplazo de tiroxina, testosterona e hidrocortisona. El paciente 13, un respondedor completo, tuvo dermatitis de grado 3 que se

resolvió tras tratamiento con hidoxizina. Este estudio demostró inesperadamente que los tres respondedores experimentaron acontecimientos adversos de grado 3.

5 En la cohorte 2 del estudio, a veinticuatro pacientes con melanoma metastásico no reseado se les administró anticuerpo antiCTLA-4 10D1 con una dosis de ataque inicial de 3 mg/kg y dosis posteriores de 1 mg/kg cada 3 semanas en combinación con vacunas de péptido gp100. Hasta la fecha, 3 de 24 pacientes (un 13 %) han tenido respuestas tumorales objetivas. Uno de los tres respondedores tuvo un acontecimiento adverso de grado 3 (diarrea).

10 Se descubrió una correlación estadísticamente significativa en las cohortes 1 y 2 entre pacientes que respondían y pacientes que desarrollaban acontecimientos adversos graves, usando tanto el ensayo de la Ji al cuadrado ($p = 0,0146$) y el ensayo exacto de Fisher ($p = 0,0116$). Véase Fisher y Van Belle, 1993, Biostatistics: A methodology for the Health Sciences, J. Wiley and Sons, Nueva York.

15 En otro estudio, a diecisiete pacientes con melanoma maligno en estadio III o IV se les administró una sola dosis de anticuerpo antiCTLA-4 10D1. Dos pacientes tuvieron una respuesta parcial. No hubo acontecimientos adversos graves (grado 3 o 4).

20 A trece pacientes con melanoma maligno se les administró anticuerpo antiCTLA-4 10D1 (3 mg/kg x 2 dosis separadas por 8 semanas) en combinación con la pauta aprobada para MELACINE® (incluyendo ciclofosfamida). No se observaron respuestas objetivas ni acontecimientos adversos graves. Las posibles razones para la ausencia de eficacia incluyen: (1) efectos inhibidores de ciclofosfamida, (2) el largo intervalo de dosificación, y (3) la débil potencia de MELACINE® como vacuna.

25 Combinando los resultados de los estudios anteriores, se descubrió una correlación estadísticamente significativa entre pacientes que respondían y pacientes que desarrollaban acontecimientos adversos graves, usando tanto el ensayo de la Ji al cuadrado ($p = 0,0028$) y el ensayo exacto de Fisher ($p = 0,0049$).

30 En un estudio de diecinueve pacientes con melanoma en estadio III o IV completamente reseado, los pacientes se dividieron en tres cohortes y se trataron con diferentes dosis de anticuerpo antiCTLA-4 10D1 (0,1, 1,0 y 3,0 mg/kg mensualmente durante 6 meses, después cada 3 meses x 2) en combinación con vacunas de gp100, tirosinasa y MART-1. Este estudio demostró una inducción dependiente de la dosis de los acontecimientos adversos de tipo autoinmunitario específicos de órgano, que implican predominantemente la piel y el intestino. Los acontecimientos adversos de tipo autoinmunitario eran tratables y reversibles.

35 En un estudio de tratamiento de pacientes no sometidos previamente a quimioterapia con melanoma metastásico, los pacientes se trataron con anticuerpo antiCTLA-4 10D1 en solitario o en combinación con quimioterapia citotóxica (dacarbazina). Se incluyeron veinticuatro pacientes. Cuatro de doce pacientes que recibieron monoterapia y tres de doce pacientes que recibieron politerapia experimentaron progresión de la enfermedad. Se observó un AAG de erupción y prurito de grado 3.

40 La administración de anticuerpo antiCTLA-4 se ha asociado con acontecimientos adversos graves que sugieren respuestas autoinmunitarias. Los AAG eran infrecuentes después de una sola dosis de anticuerpo antiCTLA-4 administrada en solitario a 3 mg/kg. Los acontecimientos adversos se producen más a menudo cuando el anticuerpo antiCTLA-4 se administra en múltiples dosis y en combinación con vacunas de péptido de melanoma. En el estudio
45 que implica administración de anticuerpo antiCTLA-4 junto con vacunas peptídicas, la reducción en la dosis del anticuerpo antiCTLA-4 en la cohorte 2 redujo la tasa de AAG. No se ha encontrado correlación discernible entre la concentración plasmática de anticuerpo antiCTLA-4 en un paciente individual y el desarrollo de AAG. El análisis estadístico de los datos del ensayo clínico estableció una correlación inesperada, pero muy significativa entre un AL y la eficacia terapéutica. Esta observación experimental respalda el descubrimiento de que dosificar anticuerpo
50 antiCTLA-4 hasta el punto de inducción de un AL (por la cantidad de dosificación, la frecuencia o ambas) indica que se consigue una dosis máximamente eficaz terapéuticamente.

55 Excepto cuando se indica, los términos "paciente" o "sujeto" se usan indistintamente y se refieren a mamíferos tales como pacientes humanos y primates no humanos, así como a animales experimentales tales como conejos, ratas y ratones, y otros animales. Los animales incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios y reptiles.

60 Un "acontecimiento adverso" (AA), como se usa en este documento, es cualquier signo desfavorable y en general no pretendido, incluso indeseable, (incluyendo un hallazgo anómalo de laboratorio), síntoma o enfermedad asociada con el uso de un tratamiento o procedimiento médico. La mayoría de los AA son temporales y se invierten tras la retirada o reducción de la dosis del tratamiento médico, o con tratamiento del AA.

65 El National Cancer Institute define "acontecimiento adverso" como cualquier signo desfavorable y no pretendido (incluyendo un hallazgo de laboratorio anómalo), síntoma o enfermedad asociada temporalmente con el uso de un tratamiento o procedimiento médico que puede considerarse o no relacionado con el tratamiento o procedimiento médico (Cancer Therapy Evaluation Program, Common Terminology Criteria for Adverse Events, Versión 3.0, DCTD,

NCI, NIH, DHHS, 31 de marzo de 2003 (<http://ctep.cancer.gov>), publicado el 16 de abril de 2003 (sitio visitado el 27 de mayo de 2003)). Un "acontecimiento adverso" es una consecuencia no pretendida del tratamiento. Se ha descubierto sorprendentemente que la inducción de un acontecimiento adverso es un marcador que indica que se ha administrado una dosificación suficiente de anticuerpo antiCTLA-4 a un paciente para el tratamiento del cáncer. En el contexto de esta invención, los acontecimientos "adversos" no son pretendidos, sino que en su lugar se buscan a propósito porque sirven como criterio de valoración terapéutico equivalente para inmunoterapia basada en antiCTLA-4 del cáncer. Como los signos, síntomas, hallazgos de laboratorio anómalos y enfermedades temporalmente asociadas con el tratamiento antiCTLA-4 son una consecuencia pretendida del tratamiento por los métodos de la invención, dichos acontecimientos se denominan en este documento "acontecimientos liminares AL)".

Un "acontecimiento liminar (AL)", como se usa en este documento, es un signo pretendido (incluyendo un hallazgo anómalo), síntoma o enfermedad temporalmente asociada con la administración de anticuerpo antiCTLA-4 que está separado del efecto terapéutico en el sitio tumoral. Por ejemplo, una respuesta autoinmunitaria que cause dermatitis en una ubicación separada en el espacio del melanoma en tratamiento es un AL. Un AL en general es un acontecimiento autoinmunitario pero, para los propósitos del uso de la invención en la práctica clínica, no se requiere confirmación patológica de una etiología autoinmunitaria; por ejemplo, la colitis diagnosticada clínicamente de cualquier etiología puede ser un evento innovador si la definición se satisface de otro modo. Un AL puede clasificarse de acuerdo con el sistema de clasificación del NCI para acontecimientos adversos.

Un "acontecimiento liminar autoinmunitario (ALA)" es un acontecimiento liminar que es un acontecimiento autoinmunitario. Cuando se pone en práctica la presente invención, los acontecimientos liminares preferidos son acontecimientos liminares autoinmunitarios. Por consiguiente, la expresión "acontecimiento liminar autoinmunitario" se usa frecuentemente para describir los métodos terapéuticos de esta invención. Se entiende, sin embargo, que los acontecimientos liminares que son útiles para dichos métodos no tienen que ser necesariamente acontecimientos autoinmunitarios. Un acontecimiento liminar autoinmunitario es un acontecimiento liminar preferido.

Un "acontecimiento adverso grave" (AAG) es un acontecimiento adverso de grado 3 o 4 como se define por el National Cancer Institute (NCI). Un AA de grado 3 se define en general como "grave" y un AA de grado 4 en general se define como "potencialmente mortal o discapacitante". El NCI también define específicamente los acontecimientos adversos de grado 3 y 4. Por ejemplo, la colitis de grado 3 consiste en dolor abdominal, fiebre, cambio en los hábitos intestinales con íleo o signos peritoneales (Cancer Therapy Evaluation Program, Common Terminology Criteria for Adverse Events, Versión 3.0, DCTD, NCI, NIH, DHHS, 31 de marzo de 2003 (<http://ctep.cancer.gov>), fecha de publicación 16 de abril de 2003). Esta publicación se adjunta como apéndice 1.

Una "manifestación de autoinmunidad no relacionada con tumor" es cualquier acontecimiento clínico que resulte de, o parezca que resulta de, la dirección inmunitaria de antígenos en células no cancerosas. Dicho AL es particularmente indicativo de un efecto terapéutico mediado inmunológicamente en las células cancerosas, ya que el AL se refiere a una activación intensificada de la inmunidad global incluyendo la inmunidad tumoral.

El término "tratar" incluye la administración de los compuestos o agentes de la presente invención para prevenir o retardar la aparición de los síntomas, complicaciones o indicios bioquímicos de una enfermedad, aliviando los síntomas o deteniendo o inhibiendo el desarrollo adicional de la enfermedad, afección o trastorno (por ejemplo, enfermedad autoinmunitaria). El tratamiento puede ser profiláctico (para prevenir o retardar la aparición de la enfermedad, o para prevenir la manifestación de síntomas clínicos o subclínicos de la misma) o supresión terapéutica o alivio de los síntomas después de la manifestación de la enfermedad.

La expresión "cáncer avanzado" significa cáncer que ya no está localizado en el sitio del tumor primario, o un cáncer que está en estadio III o IV de acuerdo con el American Joint Committee on Cancer (AJCC).

La expresión "dosis terapéuticamente eficaz" significa una dosis de anticuerpo antiCTLA-4 suficiente para inducir la reducción de un cáncer, para ralentizar la progresión de un cáncer o para detener la progresión de un cáncer. Como alternativa, una "dosis terapéuticamente eficaz" significa una dosis de anticuerpo antiCTLA-4 suficiente para inducir una respuesta parcial o completa en un paciente con cáncer.

El término "linfocito", como se usa en este documento, tiene el significado normal en la técnica, y se refiere a cualquiera de los leucocitos monomorfonucleares, no fagocíticos, encontrados en la sangre, la linfa y los tejidos linfoides, es decir, linfocitos B y T.

Las expresiones "antígeno-4 asociado a linfocitos T citotóxicos", "CTLA-4", "CTLA4", "antígeno CTLA-4" y "CD152" (véase, por ejemplo, Murata (1999) *Am. J. Pathol.* 155:453-460) se usan indistintamente e incluyen variantes, isoformas, homólogos de especie de CTLA-4 humano, y análogos que tienen al menos un epítipo común con CTLA-4 (véase, por ejemplo, Balzano (1992) *Int. J. Cancer Suppl.* 7:28-32). La secuencia completa de CTLA-4 se encuentra en el número de acceso a GenBank L15006.

El término "epítipo" significa un determinante proteínico que puede unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítipos habitualmente consisten en agrupaciones químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o

cadenas laterales glucídicas y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítomos conformacionales y no conformacionales se distinguen por que la unión del primero, pero no del segundo, se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes.

5 Un "anticuerpo" intacto comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de la cadena pesada (abreviada en este documento como HCVR o VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta de una región variable de la cadena ligera (abreviada en este documento como LCVR o VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones flanqueantes (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amínico hasta el extremo carboxílico en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores hospedadores, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. El término anticuerpo incluye partes de unión a antígeno de un anticuerpo intacto que retienen la capacidad de unirse a CTLA-4. Ejemplos de unión incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo del anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse usando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que posibilite que se produzcan como una sola cadena proteínica en que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocido como Fv monocatenario (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al., Science 1998;242:423-426; y Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988;85:5879-5883). Dichos anticuerpos monocatenarios se incluyen por referencia en el término "anticuerpo". Los fragmentos pueden prepararse por técnicas recombinantes o escisión enzimática o química de anticuerpos intactos.

Los anticuerpos contra CTLA-4 pueden unirse a un epítipo en CTLA-4 humano para inhibir la interacción de CTLA-4 con el contrarreceptor de B7 humano. Como la interacción de CTLA-4 humano con B7 humano transduce una señal que da lugar a la inactivación de linfocitos T que albergan el receptor de CTLA-4 humano, el antagonismo de la interacción induce, aumenta o prolonga de forma eficaz la activación de linfocitos T que albergan el receptor de CTLA-4 humano, prolongando o aumentando de ese modo una respuesta inmunitaria. Se describen anticuerpos antiCTLA-4 en las patentes de Estados Unidos n.º 5 811 097; 5 855 887; 6 051 227; en las publicaciones PCT n.º WO 01/14424 y WO 00/37504; y en la publicación de Estados Unidos n.º 2002/0039581 A1. Un anticuerpo antiCTLA-4 clínico preferido es el anticuerpo monoclonal humano 10D1 (MDX010) como se divulga en el documento WO 01/14424.

La expresión "respuesta celular inmunitaria" se refiere a la respuesta de las células del sistema inmunitario a estímulos externos o internos (por ejemplo, antígeno, citodinas, quimiocinas y otras células) que producen cambios bioquímicos en las células inmunitarias que provocan la migración de las células inmunitarias, la destrucción de las células diana, la fagocitosis, la producción de anticuerpos, otros efectores solubles de la respuesta inmunitaria y similares.

Las expresiones "respuesta de linfocitos T" y "actividad de linfocitos T" se usan aquí indistintamente para hacer referencia al componente de la respuesta inmunitaria dependiente de linfocitos T (es decir, la proliferación y/o diferenciación de linfocitos T en linfocitos T auxiliares, citolíticos citotóxicos o supresores, el suministro de señales por linfocitos T auxiliares a linfocitos B que causa o evita la producción de anticuerpos, la destrucción de células diana específicas por linfocitos T citotóxicos y la liberación de factores solubles tales como citocinas que modulan la función de otras células inmunitarias).

La expresión "respuesta inmunitaria" se refiere a la acción concertada de los linfocitos, células presentadoras de antígeno, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citocinas y complemento) que provoca daño selectivo en, destrucción de o eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Como se usa en este documento, "receptor de superficie celular" incluye moléculas y complejos de moléculas que pueden recibir una señal y la transmisión de dicha señal a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un "receptor de superficie celular" de la presente invención es el receptor de linfocitos T (TCR) o los ligandos B7 de CTLA-4.

La expresión "activación no específica de linfocitos T" se refiere a la estimulación de linfocitos T independiente de su especificidad antigénica.

"Célula diana" significará cualquier célula indeseable en un sujeto (por ejemplo, un ser humano o animal) que puede abordarse por una composición (por ejemplo, un anticuerpo de secuencia humana o un anticuerpo monoclonal humano de la invención, una molécula específica o multiespecífica de la invención). La célula diana puede ser una célula que expresa o sobreexpresa CTLA-4 humano. Las células que expresan CTLA-4 humano pueden incluir células tumorales, por ejemplo, linfomas.

También se incluyen anticuerpos modificados. La expresión "anticuerpo modificado" incluye anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados que se han modificado por, por ejemplo, eliminación, adición o sustitución de partes del anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede modificarse eliminando la región constante y remplazándola con una región constante destinada a aumentar la semivida, por ejemplo, semivida en suero, estabilidad o afinidad del anticuerpo.

Pueden usarse conjugados de anticuerpo para modificar una respuesta biológica dada o crear una respuesta biológica (por ejemplo, para reclutar células efectoras). El resto de fármaco no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa o fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón alfa; o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

Inducción de un acontecimiento liminar

El objetivo del presente uso médico es conseguir el AL en la cantidad de tiempo más corto posible mientras se evita la sobredosificación. Esto se consigue valorando la dosificación de medicación para inducir el AL. Los métodos de valoración de la dosificación de medicación para conseguir un efecto deseado son bien conocidos en la técnica médica como, por ejemplo, en el tratamiento de la hipertensión en que la dosificación de medicación antihipertensiva se valora para conseguir el efecto deseado sobre la presión sanguínea. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, repetir la misma cantidad de dosificación de una medicación a un intervalo de dosificación fijo, pero más preferiblemente aumentando la cantidad de dosificación, disminuyendo el intervalo de dosificación o una combinación de alteración de la cantidad de dosificación e intervalo de dosificación.

Una dosis inicial de un anticuerpo antiCTLA-4 normalmente comprende de 3 a 10 mg/kg de anticuerpo administrado cada 3 a 8 semanas. Después de una dosis inicial de anticuerpo antiCTLA-4, un médico supervisa al paciente durante un periodo suficiente, que es normalmente durante el transcurso del intervalo de dosificación o de 1 a 4 semanas, para detectar un AL (véase a continuación para métodos de detección). Como un AL puede requerir la expansión de linfocitos T autorreactivos, se espera que este acontecimiento pueda tardar 1-4 semanas en manifestarse después de cualquier dosis terapéuticamente eficaz. La ausencia de un AL durante el periodo de supervisión es una indicación para el médico de que se requiere administración adicional de un anticuerpo antiCTLA-4. Después de una dosis de anticuerpo antiCTLA-4, el paciente se supervisa para un AL, y se administran dosificaciones adicionales hasta que se induce y detecta, al menos, un AL. Los expertos en la materia apreciarán que factores, incluyendo el estado inmunitario del paciente, que puede verse afectado por inmunoterapias previas, la patología, la edad, etc., pueden influir en la dosificación requerida para provocar un AL. Un experto en la materia podrá tener dichos factores en cuenta cuando determina la dosis inicial, así como cualquier dosis posterior, para inducir un AL. Estos factores deben considerarse al determinar la dosis inicial, así como las dosificaciones posteriores, para inducir un AL.

Como un uso médico de la invención es inducir un AL en el periodo de tiempo más corto sin causar una sobredosis en el paciente, es ventajoso acortar el periodo para supervisar al paciente para un AL hasta 1 a 4 semanas, más preferiblemente 2 a 3 semanas. Si se requiere una dosis inicial para conseguir un AL, la dosificación puede aumentarse en, por ejemplo, un 10 a un 100 % de la dosificación anterior. Por ejemplo, si el paciente recibe inicialmente 3 mg/kg y está programado que reciba una segunda dosis 3 semanas después, pero no consigue un AL después del periodo de 3 semanas, entonces la dosificación del paciente puede aumentarse hasta 6 mg/kg (es decir, aumento del 100 %). En otro ejemplo, si el paciente recibe inicialmente 10 mg/kg y está programado que reciba una segunda dosis 8 semanas después, pero no consigue un AL después de supervisión durante 4 semanas, entonces el intervalo de dosificación del paciente puede reducirse de 8 semanas a 4 semanas, manteniendo al mismo tiempo la dosificación de 10 mg/kg. Un experto en la materia apreciará que pueden hacerse diversos cambios en la cantidad e intervalo de dosificación en la práctica de un método de la invención para inducir un AL.

Detección de un acontecimiento liminar

Un AL puede manifestarse como un síntoma, signo o anomalía de laboratorio. Por consiguiente, la detección de dicho acontecimiento requiere la anamnesis de un paciente (para síntomas subjetivos), un examen físico y/o estudios de imágenes (para signos objetivos) y estudios de laboratorio (para anomalías de laboratorio). Dependiendo de los hallazgos iniciales, un médico puede solicitar estudios adicionales tales como, por ejemplo, una endoscopia o una biopsia.

- Un médico estará particularmente con respecto a la detección de AL más comunes tales como, por ejemplo, los que implican la piel (dermatitis, erupción, prurito), tubo gastrointestinal (dolor abdominal, dolor a la palpación, diarrea), sistema endocrino (supresión de los niveles hormonales) e hígado (hepatitis, elevación en las pruebas de función hepática). El médico, sin embargo, debe estar preparado para detectar cualquier AL. El Cancer Therapy Evaluation Program, Common Terminology Criteria for Adverse Events enumera los AL (acontecimientos adversos) y proporciona un sistema de clasificación para estos acontecimientos. Esta publicación también servir como guía para ayudar al médico a supervisar a los pacientes y detectar los AL.
- La supervisión del paciente incluye anamnesis exhaustivas periódicas para síntomas subjetivos y examen físico exhaustivo. Se examina cada sistema orgánico susceptible a un AL. Por ejemplo, la anamnesis relacionada con el sistema dermatológico incluye cuestiones con respecto a prurito, descamación, dolor y cambios en el color de la piel. El examen físico de la piel incluye, por ejemplo, inspección cercana de toda la dermis visible. Estudios adicionales, basados en el criterio del médico, pueden incluir, por ejemplo, biopsia de piel.
- Los AL en sistemas orgánicos que no son fácilmente susceptibles a examen físico, y que son asintomáticos, requieren dependencia añadida de estudios de laboratorio y estudios de imágenes. Por ejemplo, la hepatitis puede detectarse en una fase anterior usando las pruebas de función hepática y exploración CT que por examen físico.
- La detección de AL depende de la supervisión clínica de los pacientes después de la administración del anticuerpo antiCTLA-4. El médico puede usar una amplia gama de métodos de diagnóstico para detectar un AL.

Tratamiento del cáncer

- Los anticuerpos contra CTLA-4 de la invención y el criterio de valoración terapéutico equivalente pueden usarse en el tratamiento de neoplasias, donde el paciente ha recibido previamente una vacuna contra el cáncer o demuestra algún nivel de inmunidad protectora natural contra el tumor. Los anticuerpos pueden usarse como un solo agente o en combinación con uno o más agentes terapéuticos distintos o junto con una vacuna inmunoterapéutica para el tumor, tal como quimioterapia, radioterapia, citocinas, quimiocinas y otras moléculas de señalización biológica, vacunas específicas de tumor, rescate de células madre autólogas y alogénicas (por ejemplo, para aumentar los efectos del injerto contra el tumor), otros anticuerpos terapéuticos, tratamientos dirigidos moleculares, tratamiento antiangiogénico, agentes infecciosos con intención terapéutica (tales como bacterias de localización tumoral) y genoterapia. Los anticuerpos pueden administrarse en una sola dosis o como múltiples dosis. Los anticuerpos pueden usarse en tratamiento adyuvante o neoadyuvante, en solitario o junto con los tratamientos mencionados anteriormente.
- Un agente terapéutico, que está destinado a tratar el AL, por ejemplo, esteroides, también puede usarse en un método de la invención. Por tanto, un agente terapéutico que trate el AL se administra al paciente después del diagnóstico del AL.
- La presente invención se refiere al tratamiento de tumores, particularmente tumores inmunológicamente sensibles, que son cánceres que responden a inmunoterapia o cánceres que se manifiestan en pacientes que están inmunocomprometidos. En una realización, el tumor es un tumor sólido. Ejemplos de tumores que pueden tratarse de acuerdo con la invención incluyen sarcomas y carcinomas tales como, aunque sin limitación: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, linfoma, melanoma, sarcoma de Kaposi, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma, carcinoma colorrectal, carcinoma gástrico, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma escamocelular, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervicouterino, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.
- En otra realización, los cambios disproliferativos (tales como metaplasias y displasias) se tratan o previenen en tejidos epiteliales tales como los del cuello uterino, esófago y pulmón. Por tanto, la presente divulgación proporciona el tratamiento de afecciones conocidas o sospechosas de progresión previa a neoplasia o cáncer, en particular, donde se ha producido crecimiento no neoplásico de células que consiste en hiperplasia, metaplasia o, más particularmente, displasia (para una revisión de dichas afecciones de crecimiento anómalo, véase Robbins y Angell, 1976, Basic Pathology, 2.^a Ed., W. B. Saunders Co., Filadelfia, pág. 68-79). La hiperplasia es una forma de proliferación celular controlada que implica un incremento en el número de células en un tejido u órgano, sin alteración significativa en la estructura o función. Como ejemplo, la hiperplasia endometrial a menudo precede a cáncer endometrial. La metaplasia es una forma de crecimiento celular controlado en que un tipo de célula adulta o completamente diferenciada sustituye otro tipo de célula adulta. La metaplasia puede producirse en células de tejido epitelial o conjuntivo. La metaplasia atípica implica un epitelio metaplásico un tanto desordenado. La displasia es frecuentemente un precursor de cáncer, y se encuentra principalmente en los epitelios; es la forma más desordenada de crecimiento no neoplásico de células,

que implica una pérdida de uniformidad de células individuales y en la orientación arquitectónica de las células. Las células displásicas a menudo tienen núcleos muy teñidos grandes de forma anómala y muestran pleomorfismo. La displasia se produce característicamente cuando existe irritación crónica o inflamación, y a menudo se encuentra en el cuello uterino, las vías respiratorias, la cavidad bucal y la vesícula biliar. Para una revisión de dichos trastornos, véase Fishman et al., 1985, *Medicine*, 2.^a Ed., J. B. Lippincott Co., Filadelfia.

La presente invención también se refiere al tratamiento de tumores no malignos y otros trastornos que implican crecimiento inapropiado de células o tejidos aumentado por angiogénesis por administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector al tejido que experimenta crecimiento inapropiado. Por ejemplo, se contempla que la invención es útil para el tratamiento de malformaciones arteriovenosas (AV), particularmente en sitios intracraneales. La invención también puede usarse para tratar la psoriasis, una afección dermatológica que se caracteriza por inflamación y proliferación vascular; y una hipertrofia prostática benigna, una afección asociada con inflamación y posiblemente proliferación vascular. También se contempla el tratamiento de otros trastornos hiperproliferativos.

El tratamiento con un anticuerpo antiCTLA-4 puede usarse para conseguir una respuesta de memoria preexistente en pacientes tratados con una vacuna contra el cáncer. Por tanto, los pacientes tratados con vacuna pueden seleccionarse para tratamiento adicional con un anticuerpo antiCTLA-4 para inducir o potenciar adicionalmente de ese modo una respuesta inmunitaria.

En una realización, el paciente se ha tratado previamente con una vacuna antineoplásica. El antígeno canceroso puede ser, por ejemplo, un antígeno de melanoma o un antígeno de cáncer prostático. En una realización, el paciente es un ser humano. El anticuerpo antiCTLA-4 de la invención es un anticuerpo humano antiCTLA-4. Un anticuerpo humano antiCTLA-4 preferido de la invención es 10D1, pero los métodos de acuerdo con la presente invención pueden realizarse con cualquier anticuerpo humano contra CTLA-4 de acuerdo con la invención. El anticuerpo antiCTLA-4 puede ser un anticuerpo recombinante tal como un anticuerpo quimérico o humanizado (por ejemplo, con CDR injertadas) antiCTLA-4.

El bloqueo de CTLA-4 por los anticuerpos puede potenciar la respuesta inmunitaria de memoria o secundaria contra las células cancerosas en el paciente. Los anticuerpos contra CTLA-4 pueden combinarse con un agente inmunógeno, tal como células cancerosas, antígenos tumorales purificados (incluyendo proteínas recombinantes, péptidos y moléculas carbohidratadas), células y células transfectadas con genes que codifican citocinas inmunoestimuladoras y antígenos de superficie celular tales como B7 (véase, por ejemplo, Hurwitz, A. et al., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; 95: 10067-10071), o usarse en solitario, para estimular la inmunidad.

El bloqueo de CTLA-4 es eficaz cuando se sigue un protocolo de vacunación. Se han ideado muchas estrategias experimentales para la vacunación contra tumores (véase, Rosenberg, S., 2000, "Development of Cancer Vaccines", ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; véase también Restifo, N. y Sznol, M., "Cancer Vaccines", C. 61, pág. 3023-3043 en DeVita, V. et al., (eds.), 1997, "Cancer: Principles and Practice of Oncology", Quinta Edición). En una de estas estrategias, se prepara una vacuna usando células tumorales autólogas o alogénicas. Estas vacunas celulares han demostrado ser las más eficaces cuando las células tumorales se transducen para que expresen GM-CSF. Se ha demostrado que GM-CSF es un potente activador de la presentación de antígenos para la vacunación contra tumores (Dranoff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993; 90: 3539-43).

El bloqueo antiCTLA-4 para reforzar las vacunas contra células tumorales modificadas por GM-CSF mejora la eficacia de las vacunas en varios modelos experimentales de tumor tales como carcinoma de mama (Hurwitz *et al.*, 1998, *supra*), cáncer primario de próstata (Hurwitz et al., *Cancer Research* 2000; 60:2444-8) y melanoma (van Elsas et al. *J. Exp. Med.* 1999, 190:355-66). En estos casos, los tumores no inmunógenos, tales como el melanoma B16, se han vuelto susceptibles a la destrucción por el sistema inmunitario. La vacuna contra células tumorales también puede modificarse para que exprese otros inmunoactivadores tales como IL2, y moléculas coestimuladoras, entre otras.

El estudio de expresión génica y los patrones de expresión génica a gran escala en diversos tumores ha dado lugar a la definición de los llamados "antígenos específicos de tumor" (Rosenberg, S A (1999) *Immunity* 10: 281 -7). En muchos casos, estos antígenos específicos de tumor son antígenos de diferenciación expresados en los tumores y en la célula a partir de la que surge el tumor, por ejemplo, antígenos de melanocito gp100, antígenos MAGE, Trp-2. De forma más importante, muchos de estos antígenos pueden demostrar ser las dianas de linfocitos T específicos de tumor encontrados en el hospedador. El bloqueo de CTLA-4 puede usarse como un agente de refuerzo junto con vacunas basadas en versiones recombinantes de proteínas y/o péptidos que se han encontrado expresados en un tumor para potenciar una respuesta inmunitaria secundaria o de memoria contra estas proteínas. Estas proteínas normalmente se visualizan por el sistema inmunitario como autoantígenos y, por lo tanto, son tolerantes a ellas. El antígeno tumoral también puede incluir la proteína telomerasa, que es necesaria para la síntesis de los telómeros de los cromosomas y que se expresa en más de un 85 % de los cánceres humanos y en solamente un número limitado de tejidos somáticos (Kim et al., *Science* 1994; 266:2011-2013). Estos tejidos somáticos pueden protegerse del ataque inmunitario por diversos medios. El antígeno tumoral también puede ser "neoantígenos" expresados en células cancerosas a causa

de mutaciones somáticas que alteran la secuencia proteínica o crean proteínas de fusión entre dos secuencias no relacionadas (es decir, bcr-abl en el cromosoma Philadelphia), o el idiotipo de tumores de linfocitos B. Otras vacunas contra tumores pueden incluir las proteínas de virus implicados en cánceres humanos tales como virus del papiloma humano (HPV), virus de la hepatitis (VHB y VHC) y virus del sarcoma del herpes de Kaposi (KHSV). Otra forma de antígeno específico de tumor que puede usarse junto con el bloqueo de CTLA-4 es proteínas de choque térmico (HSP) purificadas aisladas del propio tejido tumoral. Estas proteínas de choque térmico contienen fragmentos de proteínas de las células tumorales y estas HSP son muy eficaces en el suministro a células presentadoras de antígeno para provocar inmunidad tumoral (Suot y Srivastava, Science 1995; 269: 1585-1588; Tamura et al., Science 1997, 278:117-120).

Las células dendríticas (DC) son células presentadoras de antígeno potentes que pueden usarse para estimular respuestas específicas de antígeno. Las DC pueden producirse *ex vivo* y cargarse con diversos antígenos proteínicos y peptídicos, así como extractos de células tumorales (Nestle et al., Nature Medicine 1998; 4:328-332). Las DC también pueden transducirse por medios genéticos para que expresen también estos antígenos tumorales. Las DC también se han fusionado directamente a células tumorales con fines de inmunización (Kugler et al., Nature Medicine 2000; 6:332-336). Como método de vacunación, la inmunización con DC puede reforzarse de forma eficaz con bloqueo de CTLA-4 para activar respuestas antitumorales más potentes.

Otro tipo de vacuna contra melanoma que puede combinarse con bloqueo de CTLA-4 es una vacuna preparada a partir de un lisado de línea celular de melanoma, junto con un adyuvante inmunológico, tal como la vacuna MELACINE®, una mezcla de lisados de dos líneas celulares de melanoma humano más adyuvante inmunológico DETOX™. El tratamiento con vacuna puede reforzarse con antiCTLA4, con o sin tratamiento quimioterápico adicional.

Enfermedades infecciosas

Otros métodos descritos en este documento se usan para tratar a pacientes que se han expuestos a toxinas o patógenos particulares. Similar a su aplicación a tumores como se analiza anteriormente, el bloqueo de CTLA-4 mediado por anticuerpos y el criterio de valoración terapéutico equivalente pueden usarse en solitario, o como adyuvante, en combinación con vacunas, para estimular la respuesta inmunitaria secundaria o de memoria a patógenos, toxinas y autoantígenos. Se ha demostrado que el bloqueo de CTLA-4 es eficaz en la fase aguda de infecciones de *Nippostrongylus brasiliensis* (McCoy, K. et al. (1997) 186 (2); 183-187) y *Leishmania donovani* (Murphy, M. et al. (1998) J. Immunol. 161: 4153-4160). Ejemplos de patógenos para los que esta estrategia terapéutica puede ser particularmente útil incluyen patógenos para los que actualmente no hay vacuna eficaz o patógenos para los que las vacunas convencionales son menos que completamente eficaces. Estos incluyen, aunque sin limitación, VIH, virus de la hepatitis (A, B, y C), virus de la gripe, virus del herpes, *Giardia*, agente causante del paludismo, *Leishmania*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. El bloqueo de CTLA-4 es particularmente útil en el refuerzo de la inmunidad contra infecciones establecidas por agentes tales como VIH que presentan antígenos alterados durante la evolución de las infecciones. Estos epítomos novedosos se reconocen como exógenos en el momento de la administración de anticuerpo antiCTLA-4 humano, provocando de este modo una fuerte respuesta de linfocitos T que no se ve atenuada por señales negativas a través de CTLA-4.

Algunos ejemplos de virus patógenos que causan infecciones que se pueden tratar por métodos de la invención incluyen hepatitis (A, B o C), virus del herpes (por ejemplo, VZV, HSV-1, HAV-6, HSV-II y CMV, virus de Epstein Barr), adenovirus, virus de la gripe, flavivirus, virus ECHO, rinovirus, virus de Cocksackie, coronavirus, virus sincitial respiratorio, virus de las paperas, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubéola, parvovirus, virus de la variolovacuna, virus HTLV, virus del dengue, papilomavirus, virus que provoca molusco, poliovirus, virus de la rabia, virus JC y virus de la encefalitis arboviral.

Algunos ejemplos de bacterias patógenas que causan infecciones que se pueden por métodos de la invención incluyen clamidia, bacterias del género *Rickettsia*, micobacterias, estafilococos, estreptococos, neumococos, meningococos y conococos, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Legionella*, bacteria diftérica, *Salmonella*, bacilos, bacteria colérica, bacteria tatánica, bacteria del botulismo, bacilo del carbunco, bacteria de la peste, bacteria de la leptospirosis y bacteria de la enfermedad de Lyme.

Algunos ejemplos de hongos patógenos que causan infecciones que se pueden tratar por métodos de la invención incluyen *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis*, etc.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, etc.), género *Mucorales* (*Mucor*, *Absidia*, *Rhizophus*), *Sporothrix schenckii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*.

Algunos ejemplos de parásitos patógenos que causan infecciones que se pueden tratar por métodos de la invención incluyen *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii*, *Nippostrongylus brasiliensis*.

Promoción de reacciones autoinmunitarias beneficiosas

La capacidad de los anticuerpos antiCTLA-4 y el criterio de valoración terapéutica equivalente de provocar y amplificar las respuestas autoinmunitarias se ha documentado en varios sistemas experimentales (EAE - encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, un modelo murino para MS (Perrin et al., J Immunol 1996; 157:1333- 1336); diabetes (Luhder *et al.*, 1998, *supra*). De hecho, la inducción de respuestas antitumorales usando vacunas de células tumorales y peptídicas revela que muchas respuestas antitumorales implican reactividades contra lo propio (despigmentación observada en antiCTLA-4 + melanoma B16 modificado con GM-CSF en van Elsas *et al. supra*; despigmentación en ratones vacunados con Trp-2 (Overwijk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999 96:2982-2987); prostatitis autoinmunitaria provocada por vacunas de células tumorales TRAMP (Hurwitz 2000, *supra*), vacunación con antígeno peptídico de melanoma y vitiligo observado en ensayos clínicos en seres humanos (Rosenberg y White, J Immunother Emphasis Tumor Immunol 1996; 19: 81-4).

Por lo tanto, es posible considerar el uso de refuerzo antiCTLA-4 junto con diversas proteínas propias para idear protocolos de vacunación para generar de forma eficaz respuestas inmunitarias contra estas proteínas propias para el tratamiento de la enfermedad. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer implica acumulación inapropiada de péptido Ap en depósitos amiloides en el cerebro; las respuestas de anticuerpos contra el amiloide pueden eliminar estos depósitos amiloides (Schenk et al., Nature 1999; 400:173-177).

Otras proteínas propias también pueden usarse como dianas tales como IgE para el tratamiento de la alergia y el asma, y TNF para artritis reumatoide. Finalmente, pueden inducirse respuestas de anticuerpos contra diversas hormonas mediante el uso de anticuerpo antiCTLA-4. Las respuestas de anticuerpos neutralizantes contra hormonas reproductoras pueden usarse para anticoncepción. La respuesta de anticuerpos neutralizantes contra hormonas y otros factores solubles que son necesarios para el crecimiento de tumores particulares también pueden considerarse como posibles dianas de vacunación.

Pueden usarse métodos análogos como se describe anteriormente para el uso de anticuerpo antiCTLA-4 y el criterio de valoración terapéutico equivalente para la inducción de respuestas terapéuticas autoinmunitarias para tratar a pacientes que tienen una acumulación inapropiada de otros antígenos propios, tales como depósitos amiloides, incluyendo A (3 en enfermedad de Alzheimer, citocinas tales como TNF α e IgE).

30 Ejemplos

La presente invención también se describe mediante los siguientes ejemplos. Sin embargo, el uso de estos y otros ejemplos en cualquier otra parte de la memoria descriptiva es únicamente descriptivo. Pueden ser evidentes muchas modificaciones y variaciones de la invención para los expertos en la materia tras leer esta memoria descriptiva.

35 **Ejemplo 1: Resultados de un ensayo clínico de anticuerpo antiCTLA-4 con péptidos de melanoma/IFA para melanoma en estadio III/IV resecaado**

Diecinueve pacientes con melanoma en estadio III (2 pacientes) o IV (17 pacientes) resecaado recibieron dosis (0,3, 1 y 3 mg/kg) de anticuerpo contra CTLA-4 I OD I con cada inyección de vacuna peptídica de gp100/tirosinasa/MART-1 con adyuvante incompleto de Freund (IFA). Los pacientes eran HLA-A2* y no tenían tratamiento previo con IFN- α . Los tumores eran positivos a IHC para gp100, tirosinasa y/o MART-1. Los criterios de exclusión incluían enfermedad autoinmunitaria y tratamiento previo con MDX-010 o péptidos MART-1, gp100 y tirosinasa. Los péptidos tirosinasa 368-376 (370D), MART-1 26-35 (27L) y gp100209-217 (210M) diferían cada uno del tipo silvestre en una modificación aminoacídica para aumentar la unión a HLA.

El anticuerpo antiCTLA-4 y las vacunas peptídicas se administraron cada 4 semanas durante 6 semanas, después cada 3 meses x 2 (8 dosis en total). Las vacunas peptídicas se administraron por vía subcutánea a 1 mg cada una por dosis emulsionada en in IFA. Tres cohortes recibieron 0,3, 1,0 o 3,0 mg/kg IV de anticuerpo antiCTLA-4.

50

Tabla 1 - Estado de la enfermedad y acontecimientos adversos graves relacionados con el fármaco

Cohorte de dosificación	Paciente	Sexo/edad	Tratamiento previo (I = inmunoterapia, C = quimioterapia, R = radioterapia)	AAG	Estado de la enfermedad
0,3 mg/kg	1	M/43	I, C	Ninguno	
	2	F/40	I, C	Ninguno	Recidivante
	3	F/69	I, C	Ninguno	
	4	F/22	I, C	Ninguno	Recidivante
	5	M/57	I, C	Ninguno	Recidivante

(continuación)

Cohorte de dosificación	Paciente	Sexo/edad	Tratamiento previo (I = inmunoterapia, C = quimioterapia, R = radioterapia)	AAG	Estado de la enfermedad
	6 7	F/54 F/41	Ninguno R, I	Ninguno Ninguno	
1,0 mg/kg	8 9	M/58 F/69	Ninguno R	Ninguno Ninguno	Recidivante
	10 11 12 13 19	M/64 F/43 M/48 F/59 M/56	Ninguno I I Ninguno Ninguno	Ninguno Ninguno Ninguno Ninguno Diarrea de grado 3, fiebre de grado 3, deposiciones sanguinolentas de grado 3, uveítis bilateral	Recidivante Recidivante
3,0 mg/kg	14 15 16 17 18	M/36 F/42 M/40 M/54 M/41	Ninguno I, C I I Ninguno	Ninguno Diarrea de grado 3 Ninguno Diarrea de grado 3 Dolor abdominal de grado 3, diarrea de grado 2	

Tabla 2 - Sumario de dosificación

Dosis mg/kg	n	Número de dosis							Promedio de dosis por paciente	Estado		
		1	2	3	4	5	6	7		Imposibilidad de hacer el seguimiento	Tox	PD
0,3	7			1		4	2		5,8	4		3
1,0	7		1	1	1	1	1	2	4,3		1*	3
3,0	5	1	1	1		1		1	4,0		3*	

*MDX-010 se interrumpió debido a manifestaciones autoinmunitarias, se continuó con los péptidos

Los AAG incluyeron:

- 5 1) Un hombre de 40 años de edad desarrolló diarrea de grado 2 (dos días) y dolor abdominal de grado 3 (diez días) después de la primera infusión de 3 mg/kg de anticuerpo antiCTLA-4. La exploración CT del abdomen y la pelvis mostró engrosamiento e inflamación del íleon terminal y la pared del apéndice vermicular. Una exploración CT repetida cuatro días después mostró resolución de los hallazgos abdominales. El paciente se trató para sus síntomas, que se resolvieron 16 días desde la aparición.
- 10 2) Una mujer de 42 años de edad desarrolló diarrea de grado 3 seis días después de la segunda infusión de 3 mg/kg de anticuerpo antiCTLA-4. La paciente se trató con hidratación IV y antibióticos.
- 15 3) Un hombre de 54 años de edad desarrolló diarrea de grado 3 después de la tercera infusión de 3 mg/kg de anticuerpo antiCTLA-4. Las deposiciones del paciente eran positivas para glóbulos blancos (WBC). La diarrea se trató con antibióticos y se resolvió 8 días después de la aparición.
- 20 4) Un hombre de 56 de edad desarrolló diarrea sanguinolenta de grado 3 y uveítis bilateral después de la segunda infusión de 1 mg/kg de anticuerpo antiCTLA-4. Las deposiciones del paciente eran positivas para WBC, la sigmoidoscopia reveló pared intestinal inflamada y la exploración CT mostró una pared engrosada del apéndice vermicular. El paciente tuvo una respuesta casi inmediata al tratamiento con esteroides orales y tópicos. Todos los síntomas se resolvieron después de tres meses.

Conclusiones

No hubo recidivas en la cohorte de la dosis más alta. Se observaron acontecimientos adversos de tipo autoinmunitario específicos de órgano, dependientes de la dosis de anticuerpo antiCTLA-4. Estos acontecimientos adversos fueron tratables y reversibles.

5 **Ejemplo 2: Resultados de un ensayo clínico de anticuerpo antiCTLA-4 de una sola dosis en pacientes con melanoma en estadio III o IV quirúrgicamente irreseccable**

10 Se realizó un ensayo clínico multicéntrico en abierto en fase I para evaluar la seguridad y farmacocinética del MAb 10D1 en diecisiete pacientes con melanoma maligno progresivo irreseccable. La mediana de la edad fue 59 años (intervalo 29-79). Nueve pacientes habían recibido inmunoterapia previa, seis habían recibido radiación previa y cinco habían recibido quimioterapia previa. Todos los pacientes recibieron una sola dosis de 3 mg/kg de 10D1 por vía intravenosa durante 90 minutos y después se les hizo seguimiento para la toxicidad, farmacocinética, activación de linfocitos T en circulación y resultado clínico. Todas las infusiones se completaron con acontecimientos adversos únicamente leves. Siete pacientes tuvieron erupciones o prurito leves y reversibles. Los niveles plasmáticos de anticuerpo persistieron de uno a cuatro meses. No hubo aumento significativo en los linfocitos T periféricos activados y no hubo evidencias de autoinmunidad clínica más allá de la erupción leve. Dos pacientes experimentaron una respuesta parcial que incluía resolución de tres masas de tejido blando y más de un 50 % de reducción de una masa pulmonar. Además, el paciente que experimentaba la reducción de más de un 50 % en la masa pulmonar era un paciente que se había tratado previamente con una vacuna contra melanoma, lo que sugiere que el tratamiento con anticuerpo antiCTLA-4 podía activar una respuesta de memoria preexistente contra el tumor. Los resultados de este estudio indican que el tratamiento antiCTLA-4 se toleraba bien con claras evidencias de actividad inmunológica y antitumoral.

25 **Tabla 2- Sumario de características de los pacientes y resultados**

Paciente	Sexo	Edad (años)	Tratamiento previo ¹	Estado de mejor respuesta y duración ²	Sitios de enfermedad metastásica	Zonas de respuesta	Acontecimientos adversos graves
1	F	66	R, C	DT	Pulmón, hígado		
2	F	69	Ninguno	PD	Hígado		
3	M	43	C, I	DT	Ganglio linfático		
4	M	56	R, C, I	PD	Ganglio linfático, hueso, perianal		
5	M	43	R, C, I	PD	Bazo, glándula suprarrenal, SNC, pulmón, retroperitoneo, piel		
6	M	58	R, I	DT	Pulmón, ganglio linfático, SNC		
7	M	49	I	PD	Piel, pulmón, hígado, ganglio linfático		
8	F	70	H	PD	Pulmón, piel, hígado		
9	F	79	Ninguno	PD	Desconocido		
10	M	74	R, C	PD	Ganglio linfático, pulmón, páncreas, riñón		Fibrilación auricular de grado III
11	M	76	Ninguno	PR, 7 meses	Ganglio linfático, piel, pulmón, abdomen	Ganglio linfático, piel, pulmón, abdomen	

(continuación)

Paciente	Sexo	Edad (años)	Tratamiento previo ¹	Estado de mejor respuesta y duración ²	Sitios de enfermedad metastásica	Zonas de respuesta	Acontecimientos adversos graves
12	F	49	I ³	PR, 9 meses	Pulmón, piel, efusión pleural	Pulmón, piel, efusión pleural	
13	M	52	C, I	PD	Pulmón, hígado		
14	M	61	C, I	PD	Pulmón		
15	M	29	R, C	DT	Ganglio linfático, pulmón		
16	M	70	Ninguno	PD	Piel, hígado, bazo		
17	F	63	Ninguno	PD	Pulmón, ganglio linfático		

¹ H = hormonal, R = radioterapia, C = quimioterapia, I = inmunoterapia
² PD = enfermedad progresiva, PR = respuesta parcial, SD = enfermedad estable
³ La inmunoterapia incluía IL-2 y vacuna de células dendríticas.

Ejemplo 3: Resultados de un ensayo clínico de anticuerpo antiCTLA-4 en combinación con vacunas peptídicas de gp100

5 **A. Cohorte 1**

Catorce pacientes con melanoma en estadio IV progresivo recibieron anticuerpo antiCTLA-4 10D1 junto con vacunación con dos péptidos gp100 restringidos a HLA-A*0201. Las características de los pacientes se resumen en Tabla

10

Tabla 3- Características de los pacientes y resultados

Paciente	Edad/sexo	Sitios de enfermedad metastásica	Tratamiento previo ¹	Mejor respuesta ² y duración	Zonas de respuesta	AAG
1	52/M	Pulmón	C, I	PR (8 + meses, continuado)	Pulmón	Prurito de grado 3, Diarrea de grado 3
2	40/F	Ganglio linfático	H, C, I	DT		Erupción de grado 3 / descamación
3	39/M	Piel, ganglio linfático, pulmón	Ninguno	DT		
4	55/F	Piel	I	DT		
5	67/M	Hueso, hígado, pulmón, ganglio linfático, piel, intramuscular	C, I, R	PD		
6	58/M	Pulmón, piel	I	PD		
7	48/M	SNC ³ , pulmón	I	PD		
8	48/M	Pulmón, hígado, glándula suprarrenal, ganglio linfático, piel	C, I	PD		
9	52/M	Ganglio linfático	I	DT		Diarrea de grado 3
10	62/M	Pulmón, ganglio linfático	C, I	DT		

(continuación)

Paciente	Edad/ sexo	Sitios de enfermedad metastásica	Tratamiento previo ¹	Mejor respuesta ² y duración	Zonas de respuesta	AAG
11	54/M	Pulmón, SNC, piel	Ninguno	CR (7 + meses, continuado) ⁴	Pulmón, SNC, piel	Hipopituitarismo de grado 3 / confusión
12	43/M	Intraperitoneal, intramuscular, piel	I	DT		Elevación de LFT de grado 4 ⁵
13	49/F	Pulmón, glándula suprarrenal	C, I	CR (7 + meses, continuado)	Pulmón, glándula suprarrenal	Erupción de grado 3 / descamación
14	63/M	Pulmón, pelvis, ganglio linfático	Ninguno	DT		

¹ C = quimioterapia, H = hormonal, I = inmunoterapia, R = radioterapia
² PD = enfermedad progresiva, SD = enfermedad estable, PR = respuesta parcial, CR = respuesta completa.
³ SNC = sistema nervioso central
⁴ El estado del paciente parecía empeorar antes de mostrar una respuesta positiva
⁵ LFT = Ensayo de función hepática

5 Todos los pacientes eran HLA*0201+ con estado de rendimiento de Kamofsky ≥ 60 %. Seis pacientes tenían metástasis visceral. Los pacientes no tenían evidencias de enfermedad autoinmunitaria o inmunodeficiencia. Todos los pacientes se habían sometido previamente a cirugía para su lesión primaria. Seis pacientes se habían sometido a quimioterapia previa. Once pacientes se habían sometido a inmunoterapia previa incluyendo interferón- α (pacientes 2, 5-8, 10, 12 y 13), IL-2 de dosis baja (pacientes 2, 5 y 13), IL-2 intravenosa de dosis alta (pacientes 4, 7 y 8), vacunas de melanoma de células completas (pacientes 1, 2 y 6), vacuna peptídica de NY-ESO-1 (pacientes 4 y 5) y GM-CSF (paciente 9). Los pacientes no se habían sometido a inmunización previa con gp100 y no se habían sometido a tratamiento sistémico en las tres semanas antes del tratamiento.

10 Se administró un ciclo de tratamiento cada tres semanas, que consistía en anticuerpo antiCTLA-4 10D1 a 3 mg/kg administrado por vía intravenosa durante 90 minutos seguido de 1 mg de péptido gp100:209-217(210M) (IMDQVPFSV) emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (IFA) inyectado por vía subcutánea en una extremidad y 1 mg de péptido gp100:280-288(288V) (YLEPGPVT) emulsionado en IFA inyectado por vía subcutánea en una segunda extremidad (péptidos sintéticos proporcionados por el National Cancer Institute Cancer Therapy Evaluation Program). Los pacientes se sometieron a aféresis antes del tratamiento y tres semanas después cada dos ciclos de tratamiento. Se aislaron los leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) por separación en Ficoll-Hypaque y se crioconservaron en suero AB humano inactivado por calor con dimetil sulfóxido al 10 % y se almacenaron a -180 °C hasta uso adicional.

15 Se evaluó la respuesta clínica usando tomografía axial computarizada (CT) del tórax, el abdomen y la pelvis; e imágenes de resonancia magnética (MRI) del cerebro. Estos estudios de imágenes se realizaron en 4 semanas del tratamiento de partida y después cada dos ciclos de tratamiento. Se usaron estudios radiológicos adicionales según lo necesario para evaluar los sitios de la enfermedad. La suma de los diámetros más largos de los tumores en cada paciente (criterios RECIT de la Organización Mundial de la Salud) se calcularon antes y después del tratamiento. Una respuesta parcial se definió como una disminución de al menos un 30 %, pero menos de un 100 %, en la suma de los diámetros más largos de todas las metástasis evaluables que duraban al menos un mes, y sin tumores nuevos o que aumentan de tamaño. Una respuesta completa se definió como una disminución de un 100 % en la suma de los diámetros más largos de todas las metástasis evaluables que duraban al menos un mes, y sin tumores nuevos.

20 Los pacientes se evaluaron para respuestas autoinmunitarias. Los pacientes recibieron un examen oftálmico antes del tratamiento y tres meses después del tratamiento de inicio. Todos los pacientes dieron negativo en análisis de suero sanguíneo antes del inicio del estudio para tiroglobulina Ab, factor reumatoide y anticuerpo antinuclear. Se midieron Ab humano antihumano (antiidiotípico), tasa de sedimentación de eritrocitos, Ab antinuclear, hormona estimuladora de la tiroides y niveles de T4 libre cada semanas durante el estudio.

25 Las concentraciones plasmáticas de MDX-010 se determinaron usando ELISA convencional con pocillos de microvaloración recubiertos con CTLA-4-Ig (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota). Se incubaron diluciones de muestra de plasma en las placas. Se detectó Ab antiCTLA-4 unido con sonda de cabra marcada con fosfatasa alcalina anti-IgG humana específica de F(ab), que se desarrolló con sustrato p-NPP.

30 Se usó un ensayo de sensibilización *in vitro* de doce días, que es más sensible que ELISPOT o los ensayos de tetrámero, para evaluar la reactividad inmunológica en los once pacientes con PBMC disponibles para el ensayo.

- (Rosenberg, S.A. et al., Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat. Med.* 4:321-327 (1998)) Los PBMC crioconservados se descongelaron y cultivaron en medio basado en Iscove completo con suero AB inactivado por calor al 10 % con 1 μ M de péptido natural gp100:209-217 o gp100:280-288 y 300 UI/ml de IL-2. Las células se recogieron de 11 a 13 días después del inicio del cultivo y se cocultivaron con células tumorales o células T2 estimuladas con péptido durante la noche. Se midió la liberación de interferón- γ (IFN- γ) en el sobrenadante usando ensayos ELISA comerciales (Pierce-Endogen, Rockford, Illinois). Los once pacientes mostraron inmunización satisfactoria contra el péptido natural gp100:209-217 después de uno a cuatro ciclos de tratamiento. Seis pacientes se inmunizaron satisfactoriamente contra el péptido natural gp100:280-288.
- Se realizaron análisis de citometría de flujo después de bloqueo del receptor de Fc y tinción con anticuerpos (BD Biosciences, San Diego, California) o tetrámeros (Beckman Coulter Immunomics, San Diego, California). Se comparó la expresión de marcadores superficiales en PBMC de nueve pacientes antes y después de dos ciclos de tratamiento. La expresión de HLA-DR (un marcador de activación) se aumentó significativamente en linfocitos CD3⁺CD4⁺ después de tratamiento (P = 0,0004; ensayo de la t para datos emparejados) y linfocitos CD3⁺CD4⁺ (supuestamente CD8⁺) (P = 0,04). Los linfocitos CD3⁺CD4⁺ también mostraron expresión significativamente aumentada de CD45RO (un marcador de células de memoria) después del tratamiento (P = 0,04). El porcentaje de poblaciones celulares que expresaban CD69, CD25 y CTLA-4 no cambió.
- Los pacientes 1, 11 y 13 eran respondedores. (Tabla 15) El paciente 1 experimentó reducción de una lesión pulmonar solitaria después de dos ciclos de tratamiento. El paciente 13 tuvo resolución completa de una lesión pulmonar solitaria y una lesión suprarrenal. El paciente 11 tenía 31 lesiones pulmonares, dos lesiones subcutáneas y una lesión cerebral. La lesión cerebral creció desde 0,5 cm hasta aproximadamente 1,0 cm después de dos ciclos de tratamiento. Después de tres ciclos de tratamiento adicionales, el paciente 11 tenía resolución completa de todas las lesiones, incluyendo la lesión cerebral.
- Los acontecimientos adversos de grado 1/2 incluían diarrea (pacientes 3, 5 y 14), erupción cutánea (paciente 14), infiltrados pulmonares y dolor torácico pleural leve (paciente 4) y vitiligo (pacientes 2 y 6).
- Seis pacientes desarrollaron siete acontecimientos adversos de grado 3 incluyendo dermatitis (pacientes 1, 2 y 13), colitis/enterocolitis (pacientes 1 y 9), hipofisitis (inflamación de la glándula pituitaria) (paciente 11) y hepatitis (paciente 12). Todos los pacientes se recuperaron después de la interrupción del tratamiento y la administración de cuidados paliativos y/o tratamiento con esteroides. No hubo recidivas o posteriores acontecimientos autoinmunitarios.
- Los análisis de sangre de cribado autoinmunitario fueron normales excepto para los pacientes 5 y 12 que desarrollaron anticuerpo antinuclear (ANA).
- El pico medio de MDX-010 después de la primera dosis fue 72 ± 33 μ g/ml y el mínimo antes de la segunda dosis fue 12 ± 7 μ g/ml. No se observó correlación clara entre las concentraciones plasmáticas o la eliminación de anticuerpo y la regresión tumoral o la toxicidad.
- El paciente 1, un respondedor parcial, desarrolló una erupción maculopapular eritematosa generalizada asociada con prurito grave una semana después del segundo ciclo de tratamiento. Una biopsia de piel mostró infiltrado linfocítico y eosinofílico perivascular, edema dérmico papilar y espongiosis epidérmica coherente con una erupción alérgica al fármaco. Dos días después, el paciente 1 desarrolló diarrea grave y se le dio hidratación IV. La endoscopia gastrointestinal y la biopsia mostraron múltiples zonas de inflamación y ulceración de la mucosa con linfocitosis notable duodenal y colónica, plasmocitosis y eosinofilia. Los estudios inmunohistoquímicos indicaron una predominancia de linfocitos CD3⁺ (linfocitos CD8⁺>CD4⁺) en el infiltrado inflamatorio, policlonalidad de las células plasmáticas y expresión aumentada de MHC-1 y HLA-DR en la vasculatura y el epitelio. Se diagnosticó enterocolitis autoinmunitaria y el paciente se trató con metilprednisolona IV. El paciente obtuvo una mejora clínica notable en 24 horas y los esteroides se redujeron progresivamente durante cinco días. El paciente no tuvo recidiva de los síntomas.
- El paciente 2 desarrolló prurito generalizado leve una semana después del primer ciclo de tratamiento, que progresó durante las dos siguientes semanas hasta erupción macular grave, circunferencial, eritematosa en las extremidades donde recibió las inyecciones de vacuna (brazo derecho y pierna izquierda). La biopsia de piel mostró espongiosis epidérmica, edema dérmico papilar significativo y un infiltrado linfocítico y eosinofílico prominente con implicación vascular como se observa en autoinmunidad a colágeno. El paciente 2 se trató sintomáticamente con hidroxizina y difenhidramina. La erupción se eliminó después de varias semanas. El paciente desarrolló vitiligo en ambas extremidades superiores durante las tres siguientes semanas.
- El paciente 9 desarrolló diarrea 11 días después del segundo ciclo de tratamiento. La endoscopia mostró pancolitis. La biopsia colónica mostró inflamación grave con infiltración celular notable y abscesos en las criptas. Los estudios inmunohistoquímicos demostraron que la mayoría de los linfocitos infiltrantes eran CD3⁺ (con una predominancia de linfocitos CD4⁺), las células plasmáticas eran policlonales y la expresión epitelial de MHC-1 y HLA-DR estaba aumentada. La diarrea del paciente mejoró con tratamiento con metilprednisolona IV y se controló con una lenta reducción progresiva de dexametasona oral.

El paciente 11, un respondedor completo, desarrolló cambios en la personalidad y problemas de memoria después de recibir el cuarto ciclo de tratamiento. Las MRI del cerebro mostraron desaparición de una metástasis temporal izquierda y sin otras anomalías. La evaluación adicional mostró niveles indetectables de hormona estimuladora de la tiroides, T4 libre, hormona adrenocorticotrópica, hormona del crecimiento, prolactina y testosterona, que sugiere panhipopituitarismo. Una MRI centrada repetida mostró que la glándula pituitaria estaba en el límite superior de tamaño del normal. No se usaron esteroides de alta dosis porque el paciente tenía una respuesta clínica completa. El paciente recibió dosis de remplazo de tiroxina, testosterona e hidrocortisona. La personalidad del paciente y las anomalías de memoria se resolvieron. Una MRI de seguimiento seis semanas después mostró una ligera disminución en el tamaño de la glándula pituitaria.

El paciente 12 desarrolló enzimas hepáticas anómalas y anticuerpos antinucleares en análisis de sangre rutinarios realizados tres semanas después del tercer ciclo de tratamiento. La biopsia hepática mostró hepatitis aguda con numerosos focos de inflamación lobular que consistían principalmente en linfocitos. Los estudios inmunohistoquímicos revelaron un infiltrado celular predominantemente CD3⁺ con linfocitos CD4⁺ principalmente en las zonas periportales y linfocitos CD8⁺ principalmente en los lóbulos hepáticos. Durante las dos siguientes semanas, los niveles de alanina aminotransferasa del paciente alcanzaron el máximo en 2860 U/l (lo normal es 6-41) y los niveles de aspartato aminotransferasa alcanzaron el máximo a 1193 U/l (lo normal es 9-34). Se inició el tratamiento con prednisona oral de baja dosis y todos los valores disminuyeron hasta la normalidad durante los cuatro siguientes meses.

El paciente 13, un respondedor parcial, desarrolló una erupción eritematosa y prurítica generalizada grave una semana después de recibir el cuarto ciclo de tratamiento. La biopsia de piel mostró una infiltración linfocítica perivascular con eosinófilos abundantes en la dermis superficial. Los estudios inmunohistoquímicos revelaron linfocitos principalmente CD3⁺ (linfocitos CD4⁺>CD8⁺). Los linfocitos cultivados de una biopsia de la erupción eran todos CD8⁺ y un 97 % reaccionaba con tetrámero gp100:209-217:HLA-A*0201. La erupción se resolvió lentamente con tratamiento con hidroxizina.

B. Cohorte 2

El protocolo de la cohorte 2 fue igual que la cohorte 1 excepto que después de la dosis de ataque inicial de 3 mg/kg de anticuerpo antiCTLA-4, los pacientes en la cohorte 2 recibieron dosis de 1 mg/kg de anticuerpo antiCTLA-4 cada tres semanas en combinación con las vacunas peptídicas. El estudio de la cohorte 2 está en curso. Hasta la fecha, tres de 24 pacientes (13 %) han tenido una respuesta tumoral objetiva y dos de 24 pacientes han tenido AAG (8 %).

Tabla 4- Sumario de características de los pacientes y resultados

Paciente	Sexo	Edad	Tratamiento previo ¹	Estado de mejor respuesta y duración ²	Sitios de enfermedad metastásica	Zonas de respuesta	AAG
15	F	54	C	PR (2 + meses)	Pulmón, ganglio linfático	Pulmón, Ganglio linfático	Diarrea de grado 3
16	M	39	R, I	PD	Ganglio linfático, hígado, pulmón, piel		
17	M	48	Ninguno	PD	Glándula suprarrenal, SNC, pulmón, ganglio linfático, piel		Diarrea de grado 3
18	M	32	R, C, I	PD	Hígado, pulmón, ganglio linfático		
19	F	60	Ninguno	PR (2 + meses)	SNC, vesícula biliar, pulmón, ganglio linfático, piel	SNC, vesícula biliar, pulmón, ganglio linfático, piel	
20	M	62	I	No disponible (N/A) ³	Glándula suprarrenal, hueso, ganglio linfático, bazo		

(continuación)

Paciente	Sexo	Edad	Tratamiento previo ¹	Estado de mejor respuesta y duración ²	Sitios de enfermedad metastásica	Zonas de respuesta	AAG
21	M	50	Ninguno	N/A	Pulmón		
22	M	50	Ninguno	PD	Hueso, ganglio linfático, pulmón		
23	M	64	R, C, I	N/A	Intraperitoneal, hígado, pulmón		
24	M	62	I	PR (1 + mes)	Pulmón, intramuscular, piel		
25	F	61	I	N/A	Ganglio linfático		
26	F	61	Ninguno	N/A	Ganglio linfático		
27	M	21	C, I	N/A	Desconocido		
28	F	45	R, C, I	N/A	Desconocido		
29	F	63	R, I	N/A	Ganglio linfático, piel		
30	F	59	I	N/A	Desconocido		
31	M	56	C, I	N/A	Desconocido		
32	M	57	I	N/A	Desconocido		

¹ H = hormonal, R = radioterapia, C = quimioterapia, I = inmunoterapia
² PD = enfermedad progresiva, PR = respuesta parcial, SD = enfermedad estable
³ Los datos de respuesta del paciente no están disponibles en este momento.

Conclusión

5 Este estudio demostró que respuestas clínicas contra el anticuerpo antiCTLA-4 en combinación con vacunas peptídicas de melanoma se correlacionan fuertemente con la aparición de efectos secundarios adversos de tipo inmunitario. Cuatro de ocho (50 %) pacientes con acontecimientos adversos graves de tipo autoinmunitario tuvieron una respuesta clínica. Solamente 2 de 28 pacientes (7 %) tuvieron una respuesta en ausencia de cualquier acontecimiento adverso de tipo autoinmunitario grave.

10 Ejemplo 4: Resultados de un ensayo clínico de anticuerpo antiCTLA-4 en combinación con pauta aprobada de MELACINE®

15 A trece paciente con melanoma maligno se les administró anticuerpo antiCTLA-4 10D1 (3 mg/kg x 2 dosis separadas por 8 semanas) en combinación con la pauta aprobada para MELACINE® (incluyendo ciclofosfamida). No se observaron respuestas objetivas ni acontecimientos adversos graves.

Ejemplo 5: Análisis estadístico de los resultados del ejemplo 3 (un ensayo clínico de anticuerpo antiCTLA-4 en combinación con vacunas peptídicas de gp100)

20 Seis de los 38 pacientes tuvieron una respuesta tumoral objetiva. Cuatro de estos seis respondedores (66,7 %) tuvieron acontecimientos adversos graves autoinmunitarios. Solamente cuatro de los 32 pacientes que no respondieron tuvieron acontecimientos adversos graves autoinmunitarios (12,5 %).

Tabla 5- Distribución de acontecimientos adversos graves autoinmunitarios (n= 38)

	Pacientes con AAG autoinmunitario	Pacientes sin AAG autoinmunitario
No respondedores	4	28
Respondedores	4	2

5 Se realizó un ensayo de la Ji al cuadrado ajustada a continuidad y ensayo exacto de Fisher para examinar la tasa de incidencia autoinmunitaria diferida entre los respondedores y no respondedores. Se encontró una correlación estadísticamente significativa entre los pacientes que respondían y los pacientes que desarrollaban acontecimientos adversos graves autoinmunitarios usando tanto el ensayo de la Ji al cuadrado ($p = 0,0146$) como el ensayo exacto de Fisher ($p = 0,0116$).

Ejemplo 6: Análisis estadístico de los resultados de los 2, 3 y 4

10 Ocho de los 68 pacientes tuvieron una respuesta tumoral objetiva. Cuatro de los ocho respondedores (50 %) tuvieron acontecimientos adversos graves autoinmunitarios. Solamente cuatro de los 60 pacientes que no respondieron (6,7 %) tuvieron acontecimientos adversos graves autoinmunitarios.

Tabla 6- Distribución de acontecimientos adversos graves autoinmunitarios

	Pacientes con AAG autoinmunitario	Pacientes sin AAG autoinmunitario
No respondedores	4	56
Respondedores	4	4

15 Se realizó un ensayo de la Ji al cuadrado ajustada a continuidad y ensayo exacto de Fisher para examinar la tasa de incidencia autoinmunitaria diferida entre los respondedores y no respondedores. Se encontró una correlación estadísticamente significativa entre los pacientes que respondían y los pacientes que desarrollaban acontecimientos adversos graves autoinmunitarios usando tanto el ensayo de la Ji al cuadrado ($p = 0,0028$) como el ensayo exacto de
 20 Fisher ($p = 0,0049$).

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo antiCTLA-4 para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto, tratamiento que comprende inducir un acontecimiento liminar en el sujeto administrando el anticuerpo antiCTLA-4 al sujeto hasta observar el acontecimiento liminar, en donde el acontecimiento liminar es un acontecimiento adverso de grado 3 o 4 seleccionado entre el grupo que consiste en diarrea, enterocolitis, dermatitis, hipofisitis, erupción y prurito, en donde el acontecimiento liminar se induce administrando dosis en escala de anticuerpo antiCTLA-4 o administrando anticuerpo antiCTLA-4 a intervalos de dosificación decrecientes y en donde el anticuerpo antiCTLA-4 es un anticuerpo IgG kappa monoclonal humano que comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos

10

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPD
RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

y una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNK
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGLVTV
SS.

15

2. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1, en donde el cáncer es un tumor inmunológicamente sensible.

3. El anticuerpo para el uso de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el cáncer es melanoma maligno.

20

4. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el acontecimiento liminar se selecciona del grupo que consiste en diarrea, dermatitis, erupción y prurito.

25

5. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1, en donde se administra un agente terapéutico adicional para tratar el cáncer.

6. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1, en donde se administra un agente terapéutico adicional para tratar el acontecimiento liminar.