

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 387**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01974480 .4**
96 Fecha de presentación: **09.10.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1324771**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2003**

54 Título: **ANTICUERPOS TERAPÉUTICOS Y QUE INDUCEN TOLERANCIA.**

30 Prioridad:
09.10.2000 GB 0024673
23.10.2000 US 242143 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2011

73 Titular/es:
ISIS INNOVATION LIMITED
EWERT HOUSE, EWERT PLACE
SUMMERTOWN, OXFORD OX2 7SG, GB

72 Inventor/es:
WALDMANN, Herman;
FREWIN, Mark Raymond;
GILLILAND, Lisa Kim y
DA SILVA GRACA, Luis Richardo Simoes

74 Agente: **Aznárez Urbieto, Pablo**

ES 2 368 387 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

Anticuerpos terapéuticos y que inducen tolerancia.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a anticuerpos terapéuticos así como a un método para reducir o eliminar su inmunogenicidad.

10 La tolerancia a un antígeno o tejido extraño es un estado por el cual un sistema inmune de otro modo normal, maduro, es incapaz específicamente de responder de forma agresiva a tal antígeno/tejido, tratándolo por ello como a un componente normal (no enfermo) de tejido corporal. Al mismo tiempo, el sistema inmune es competente para responder agresivamente a antígenos/tejidos extraños o enfermos a los que no es específicamente tolerante, ya sea mediante el proceso natural de autotolerancia o mediante procedimientos terapéuticos de inducción de tolerancia. Una prueba de tolerancia requiere normalmente demostrar que el individuo tolerante deja de convertirse en inmune al antígeno/ tejido específico cuando se lleva a cabo un intento, o preferentemente varios, de inmunizarle en un momento posterior a cuando se demuestra que el mismo individuo responde a un antígeno/tejido irrelevante. Tal como se emplea aquí, la referencia a la inducción de tolerancia pretende abarcar también la inducción de tolerancia tanto completa como parcial o incompleta. La inducción de tolerancia completa implica la eliminación de la respuesta inmune al antígeno/tejido al cual se debe inducir tal tolerancia, mientras que la inducción de tolerancia parcial o incompleta implica una reducción significativa de esta respuesta inmune.

TÉCNICA ANTERIOR

20 Uno de los mayores problemas que conlleva utilizar anticuerpos en la terapia es la respuesta inmune que se produce contra los mismos. Debido a que el ser humano naturalmente presenta tolerancia a sus inmunoglobulinas, se han venido utilizando diversas estrategias con el fin de crear formas humanas de anticuerpos terapéuticos, estrategias tales como humanización, visualización de fagos cargados de anticuerpos (phage display) procedentes de librerías humanas o utilizar ratones portadores de repertorios de genes de inmunoglobulinas humanas. Aunque sean útiles, estos procedimientos no pueden garantizar que los pacientes no sigan reaccionando contra las características únicas del anticuerpo terapéutico, características tales como los determinantes alotípicos en las regiones constantes y los determinantes idiotípicos codificados por las regiones determinantes complementarias (CDRs).

30 Chiller y Weigle (1970) PNAS 65:551 demostraron en roedores que la tolerancia a las inmunoglobulinas extrañas puede ser inducida por monómeros desagregados de aquellas inmunoglobulinas, mientras los agregados de dichas inmunoglobulinas eran potencialmente inmunogénicos. Benjamin y Waldmann y col., (1986) J. Exp. Med. 163:1539, demostraron que los anticuerpos de unión celular podrían ser también inmunogénicos en comparación con los anticuerpos de no-unión celular. Isaacs y Waldman (1994), Therapeutic Immunology 1:363-32, demostraron que la respuesta humoral contra los anticuerpos terapéuticos era dependiente de las células T CD4+. Para asegurar que los anticuerpos terapéuticos no son inmunogénicos, sería conveniente inducir tolerancia en la población de células T CD4+ a todos los determinantes potencialmente inmunogénicos de aquellos anticuerpos terapéuticos que las células huésped puedan reconocer.

40 Gilliland y col., (1999) The Journal of Immunology 162:3663-3671, describieron una vía alternativa para impedir la respuesta inmune contra los anticuerpos terapéuticos mediante pre-tolerización del huésped con una preparación monomérica de mutantes de anticuerpos de no-unión celular. Específicamente, este estudio demostró que los mutantes del anticuerpo anti-CD52 CAMPATH-1H que no son de unión celular pierden su inmunogenicidad y, por ello, pueden inducir tolerancia a los anticuerpos de unión de tipo salvaje. CAMPATH-1 es el nombre genérico dado al antígeno de la glicoproteína CD52 y a la familia de anticuerpos que lo reconocen. CAMPATH es una marca comercial registrada. Así, la única capacidad de los anticuerpos CAMPATH-1H para matar linfocitos por medio tanto de la lisis mediada por complemento como de la lisis mediada por células ha conducido a un amplio uso de estos anticuerpos para la seroterapia de linfomas, trasplante de médula y de órganos, así como en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. La observación de que algunos pacientes desarrollan respuestas antiglobulina al anticuerpo terapéutico condujo a una investigación centrada en la abolición de la inmunogenicidad. Gilliland y col. demostraron en modelos murinos que la respuesta de la antiglobulina a una forma de unión celular del anticuerpo CAMPATH-1H podría ser abolida mediante inducción de tolerancia primero con un mutante de no-unión celular. Sin embargo, la utilización terapéutica de este método exigiría la aplicación de dos productos, el tolerógeno de no-unión y el presente anticuerpo terapéutico. Se trata de un proceso muy caro y tiene el inconveniente de que como los anticuerpos mutantes y terapéuticos difieren en algunos residuos de aminoácidos y que en ciertos casos la tolerancia puede no extenderse a la diferencia, todavía podría producirse una respuesta de la antiglobulina al anticuerpo de tipo salvaje (no-mutado). Por tanto, existe la necesidad de asegurar la tolerancia a la totalidad del anticuerpo terapéutico.

55 Por tanto, un objetivo a largo plazo en inmunología consiste en encontrar un medio para abolir el potencial de desarrollar una respuesta inmune a ciertas proteínas terapéuticas que pueden tener secuencias de aminoácido diferentes del huésped. Esto tendría grandes implicaciones en un amplio rango de áreas terapéuticas que van desde el cáncer hasta la enfermedad autoinmune del trasplante.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo terapéutico modificado tal como se define en la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo terapéutico modificado, en comparación con el anticuerpo no modificado, presenta una menor unión a su antígeno diana. Ésta es tal que aumenta con el tiempo la unión del anticuerpo a la diana.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo terapéutico inductor de tolerancia que comprende un anticuerpo terapéutico, de efecto terapéutico específico, donde el anticuerpo se somete a una obstrucción temporal de su sitio de combinación, lo que reduce la unión del anticuerpo a su diana natural, y donde, después de la administración a un huésped, dicho anticuerpo es capaz de regenerar una forma funcional suficiente competente como anticuerpo terapéutico para conseguir dicho efecto terapéutico; con ello, la reducción de la unión del anticuerpo para su diana natural convierte al anticuerpo modificado en tolerogénico de sí mismo y de su forma funcionalmente competente. A este respecto, tolerogénico significa se refiere a una inhibición reducida en importancia y/o esencialmente eliminada de la respuesta inmune inmunogénica (una respuesta de anticuerpo) contra el anticuerpo.

Utilizando este anticuerpo, la inmunogenicidad de los anticuerpos de unión celular se puede reducir o evitar, de forma que se puede aplicar una terapia con anticuerpos en todo su potencial.

Sólo se utiliza un producto que es capaz de inducir tolerancia a sí mismo y producir el efecto terapéutico deseado. Esto elimina la necesidad de dos productos tal como se han venido empleando hasta la fecha. El bloqueo temporal del sitio de combinación del anticuerpo (ACS) debe producirse durante un tiempo suficiente como para inducir tolerancia dentro del sistema inmune del huésped; es decir, debe inhibir la respuesta inmune inmunogénica contra el anticuerpo pero, una vez lo ha logrado, el anticuerpo debería volver a o regenerar una forma capaz de interactuar con la diana terapéutica mediante el incremento de la cantidad de anticuerpo unido a la misma. Por tanto, se pueden dar anticuerpos inmunológicamente extraños para producir el efecto terapéutico deseado reduciendo y/o eliminando esencialmente la respuesta inmune inmunogénica del huésped a los mismos.

Así, de acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un fármaco en forma de anticuerpo terapéutico modificado comprendiendo un anticuerpo de unión celular que incluye un sitio de combinación del anticuerpo que se une al antígeno diana unido a células, siendo modificado dicho anticuerpo con un péptido que inhibe la unión del anticuerpo al antígeno diana, donde el péptido comprende el antígeno diana o un dominio o mimotopo del mismo que está unido reversiblemente al sitio de combinación del anticuerpo, siendo eficaz dicho anticuerpo modificado para reducir la respuesta inmune contra el anticuerpo y para producir un efecto terapéutico mediante la unión al antígeno diana.

Se modifica el anticuerpo terapéutico para incluir un compuesto que está unido reversiblemente al sitio de combinación del anticuerpo, compitiendo el antígeno diana con el compuesto en su unión al ACS cuando se administra, con ello se inhibe la unión del anticuerpo a la diana. De esta forma, la cantidad de anticuerpo modificado que se va uniendo al antígeno diana en un período inicial después de la administración es inferior a la cantidad que se hubiera unido si el anticuerpo se hubiera administrado en su forma no-modificada. Debido a que el compuesto se desplaza del ACS a consecuencia de la unión competitiva, la cantidad de anticuerpo que se va uniendo al antígeno diana aumenta. Al inhibir la unión del anticuerpo, aumentando la cantidad de anticuerpo unido a la diana con el tiempo, el anticuerpo modificado es capaz de reducir y/o esencialmente eliminar la respuesta del anticuerpo al mismo y es capaz también de conseguir el efecto terapéutico deseado.

En una realización, el anticuerpo modificado tiene una avidéz por la diana que es inferior a la correspondiente del anticuerpo no-modificado. La avidéz disminuye en una cantidad que es eficaz para reducir y/o eliminar la respuesta de anticuerpo contra el anticuerpo terapéutico mientras se produce el efecto terapéutico deseado mediante la unión a la diana terapéutica.

El término "terapéutico" tal como se emplea aquí engloba tanto el tratamiento de una condición o trastorno debido a una enfermedad existente como la prevención y/o reducción de la severidad de una enfermedad, condición o trastorno.

Una diana terapéutica es el antígeno al que se une el anticuerpo, antígeno que puede estar o no presente en un tejido o en una célula. El compuesto que se combina con el anticuerpo terapéutico para inhibir la unión a la diana puede inhibir dicha unión mediante la unión al ACS y/o mediante la unión o bloqueo del acceso al ACS, por ejemplo por impedimento estérico.

El compuesto se puede combinar con el anticuerpo por medio del enlace del compuesto al anticuerpo y/o mediante la unión del compuesto al ACS. En una realización, el compuesto se enlaza o liga al anticuerpo y se une también al ACS. En otra realización, el compuesto se enlaza al anticuerpo sin unirse al ACS e inhibe la unión del anticuerpo a la diana impidiendo el acceso al ACS, por ejemplo mediante impedimento estérico. En una realización no limitativa, el compuesto se enlaza solamente a una de las cadenas del anticuerpo.

El anticuerpo terapéutico se puede utilizar como producto terapéutico en humanos y puede ser un anticuerpo no humano, por ejemplo uno derivado de roedor.

De acuerdo con la presente invención, se pueden utilizar anticuerpos quiméricos y humanizados, por ejemplo injertados con una CDR. Estos anticuerpos son menos inmunogénicos que los anticuerpos de roedor correspondientes y, por tanto, el bloqueo temporal del ACS de dichos anticuerpos según la invención puede reducir además la inmunogenicidad y potenciar la tolerogenicidad.

5 El compuesto inhibe la unión del anticuerpo a la diana, con lo cual inmediatamente después de la administración se produce una reducción de la cantidad de anticuerpo que se une a la diana en comparación con la cantidad de anticuerpo que se uniría sin la presencia del compuesto. La cantidad de anticuerpo que se une a la diana aumenta con el tiempo, produciendo así un bloqueo temporal del ACS efectivo que inhibe la cantidad de anticuerpo que se une a la diana. El bloqueo temporal del ACS (un bloqueo que reduce inicialmente la cantidad de anticuerpo que se une a la diana, aumentando dicha cantidad con el tiempo) puede ser llevado a cabo por lo siguiente e incluyendo:

- 10
- i) Saturación temporal con moléculas tales como un antígeno definido o un dominio del mismo, péptidos antigénicos de baja afinidad o mimotopos mediante incubación *in vitro*, que pueden disociarse progresivamente *in vivo*, de modo tal que el anticuerpo se acumularía gradualmente sobre el antígeno de unión celular u otro antígeno "diana" si las constantes de asociación y disociación fueran favorables en comparación con el elemento "obstructivo"; o

15

 - ii) Saturación temporal con moléculas tales como un antígeno definido o un dominio del mismo, péptidos antigénicos de baja afinidad o mimotopos que pueden ser fijados por enlazadores flexibles. Una vez administrado *in vivo*, el anticuerpo se acumularía gradualmente sobre el antígeno de unión celular u otro antígeno "diana" si las constantes de asociación y disociación fueran favorables en comparación con el elemento "obstructivo".

20

Dicha modificación dificultaría la acumulación de anticuerpos sobre el antígeno diana durante un período limitado, lo que sería suficiente para asegurar que el anticuerpo terapéutico administrado tiene un efecto de inducción de tolerancia (que es al menos parcial), permitiendo al mismo tiempo que el anticuerpo vuelva a o regenere una parte suficiente de su forma funcionalmente competente para conseguir el efecto terapéutico deseado, esto es acumularse sobre el antígeno diana en una cantidad para producir dicho efecto.

25

La eliminación de la modificación puede conseguirse también mediante los propios procesos bioquímicos y fisiológicos del huésped, tales como cambios de pH, segmentación enzimática dentro del huésped, competición natural con antígenos del huésped unidos a células. Por ejemplo, un mimotopo peptídico podría enlazarse a la cadena H o L del anticuerpo mediante un enlazador que llevara un motivo de enzima degradable susceptible de segmentarse por las enzimas del huésped, por ejemplo elastasa de leucocitos, *in vivo*.

30

De acuerdo con una realización particularmente ventajosa de la invención, el enlazador es segmentado por una enzima que aparece sólo, o preferentemente, en el sitio deseado de acción del anticuerpo terapéutico, proporcionando así un suministro selectivo del anticuerpo terapéutico al sitio deseado de acción. Por ejemplo, un enlazador segmentado por una elastasa de leucocitos sería apropiado para un anticuerpo cuyo sitio de acción previsto es una articulación. Alternativamente, el antígeno o mimotopo soluble puede disociarse más fácilmente a un pH bajo dentro del sitio de un tumor que puede proporcionar también una entrega selectiva del anticuerpo al sitio de acción deseado. Alternativamente, un mimotopo de baja afinidad fijado por un enlazador inerte puede disociarse de forma natural *in vivo*, pudiendo impedirse la reasociación por el ACS que interactúa con el antígeno natural en células huésped.

35

Preferentemente, para modificar el ACS se utiliza el antígeno nativo, dominios del mismo y fragmentos peptídicos o mimotopos. Éste se puede generar a partir de librerías peptídicas, ya sean sintéticas o derivadas biológicamente. Se pueden cribar productos químicos de unión no covalente de librerías naturales o sintéticas o de otros productos disponibles en busca de su capacidad para inhibir la unión del anticuerpo a su antígeno o un sucedáneo equivalente. Preferentemente los enlazadores que se pueden utilizar son flexibles, pero podrían ser enzimáticamente segmentables y/o degradables por el cuerpo durante un período de tiempo establecido.

40

La presente invención se dirige también a anticuerpos tal como se ha descrito anteriormente que comprenden además una región Fc diseñada para reducir la interacción con el sistema del complemento y con receptores celulares especializados para la región Fc de las inmunoglobulinas (receptores FcR). Parte de la inmunogenicidad de los anticuerpos de unión celular puede provenir de su capacidad para activar biológicamente el sistema del complemento y otras células que se unen a través de los receptores FcR. La eliminación de las funciones biológicas efectoras en la región Fc del anticuerpo puede reducir la inmunogenicidad en comparación con el anticuerpo no modificado y, por tanto, potenciar la tolerogenicidad. Será útil para muchos anticuerpos donde la lisis celular no es esencial, tales como anticuerpos de bloqueo o agonistas. Así, la adición de mutaciones en el ACS junto con aquellas en la región Fc puede ser muy eficaz en la inducción de tolerancia hacia los anticuerpos mutados en Fc diseñados para bloquear o potenciar la función celular.

45

50

De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo tal como se ha definido anteriormente para su utilización en terapia.

55

De acuerdo con todavía otro aspecto, la invención proporciona la utilización de un anticuerpo tal como se ha definido anteriormente en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un mamífero con el fin de conseguir dicho efecto terapéutico. El tratamiento comprende la administración del medicamento en una dosis suficiente para lograr el efecto terapéutico. El tratamiento puede comprender la administración repetida del anticuerpo.

5 El anticuerpo se puede administrar a un humano en una dosis suficiente para conseguir el efecto terapéutico deseado y reducir y/o eliminar la respuesta del anticuerpo al anticuerpo terapéutico. El efecto terapéutico puede consistir en el alivio o la prevención de enfermedades que pueden incluir cáncer, enfermedades inflamatorias crónicas como artritis reumatoide, enfermedades autoinmunes como diabetes, psoriasis, esclerosis múltiple, lupus sistémico y otras, enfermedades alérgicas como asma, enfermedades cardiovasculares como infarto del miocardio, derrame cerebral y enfermedades infecciosas. Efectivamente, cualquier enfermedad donde se contemplen dosis continuas o repetidas de un anticuerpo terapéutico.

10 La modificación temporal del tipo descrito anteriormente puede ser también aplicable a proteínas terapéuticas distintas de los anticuerpos y cuya actividad dependa de un sitio biológicamente activo que pueda bloquearse transitoriamente y donde la actividad de este sitio determine la inmunogenicidad. Ejemplos de tales proteínas terapéuticas incluyen hormonas, enzimas, factores de coagulación, citocinas, quimiocinas, proteínas de fusión basadas en inmunoglobulinas.

15 Cuando se enlaza covalentemente el compuesto al anticuerpo, en una realización, el compuesto se enlaza preferentemente a sólo uno de los dos brazos del anticuerpo.

20 El término "anticuerpo" tal como se utiliza aquí incluye todas las formas de anticuerpos tales como anticuerpos recombinantes, humanizados, quiméricos, de cadena única, anticuerpos monoclonales, etc. La invención es aplicable también a fragmentos de anticuerpos que son capaces de unirse a una diana terapéutica.

25 De acuerdo con la invención, un compuesto (que es un péptido capaz de unirse al ACS del anticuerpo) se une reversiblemente al sitio de combinación o de unión del anticuerpo a administrar a una persona. El compuesto ocupa el sitio de unión del anticuerpo para el antígeno, inhibiendo así la unión del anticuerpo al antígeno. Debido a que el compuesto se une reversiblemente al sitio de unión del anticuerpo, el anticuerpo es capaz de unirse al antígeno contra el que se dirige el anticuerpo.

30 En una realización, el compuesto que se selecciona para su unión al sitio de combinación del anticuerpo es un compuesto donde la avidéz del anticuerpo por el compuesto es inferior a la avidéz del anticuerpo por el antígeno. De esta forma, cuando se administra inicialmente el anticuerpo, se reduce la unión del anticuerpo al antígeno en comparación con la unión que tendría lugar en ausencia del compuesto, aumentando dicha unión con el tiempo.

35 La solicitante ha descubierto que se puede conseguir reducir una respuesta del anticuerpo a un anticuerpo terapéutico mediante la administración de un anticuerpo que es capaz de unirse eficazmente al antígeno para producir el efecto terapéutico deseado, siempre que durante el período inmediatamente siguiente a la administración del anticuerpo, se reduzca la cantidad de anticuerpo que se une al antígeno, aumentando con el tiempo dicha cantidad a partiendo de la cantidad reducida.

Por tanto, a diferencia de la técnica anterior, de acuerdo con la invención, un anticuerpo capaz de llevar a cabo su función terapéutica reduce también la respuesta inmune inmunogénica contra el anticuerpo reduciendo inicialmente la cantidad de anticuerpo terapéutico que se une al antígeno, seguido de un incremento en la cantidad de unión del anticuerpo terapéutico.

40 El compuesto que se utiliza para su unión al sitio de combinación del anticuerpo de una forma que reduce inicialmente la cantidad de unión del anticuerpo al antígeno es un péptido. El péptido puede ser idéntico a o diferente de una fracción peptídica correspondiente del antígeno al que se une el anticuerpo terapéutico. El péptido apropiado para un anticuerpo se puede seleccionar a partir de un panel de péptidos en un ensayo de inhibición de la unión con respecto al anticuerpo y su antígeno. Estos y otros procedimientos son conocidos por los especialistas en la técnica en base a estas enseñanzas.

45 En una realización, el anticuerpo combinado con el compuesto tiene una avidéz por el antígeno diana inferior a la correspondiente del anticuerpo no-modificado por el antígeno diana. La avidéz relativa del anticuerpo modificado y del anticuerpo no-modificado pueden determinarse mediante un ensayo de inhibición de unión utilizando el cincuenta por ciento de inhibición de la unión como punto final. Un anticuerpo modificado tiene una avidéz reducida cuando existe un incremento en la cantidad de anticuerpo modificado en comparación con la cantidad de anticuerpo no-modificado necesaria para producir un cincuenta por ciento de la inhibición de unión de un anticuerpo marcado no-modificado al antígeno diana.

55 La avidéz del anticuerpo modificado se reduce en una cantidad eficaz para reducir y/o eliminar esencialmente la respuesta del anticuerpo contra el anticuerpo y el anticuerpo modificado tiene una avidéz por la diana eficaz para producir el efecto terapéutico deseado.

En base a ejemplos no limitativos, el anticuerpo modificado, en comparación con el anticuerpo no modificado, tiene una avidéz por el antígeno diana que es al menos 4 veces inferior, y en muchos casos al menos 50 veces inferior o como mínimo 100 veces inferior a la avidéz del anticuerpo no modificado para el antígeno diana.

5 En una realización no limitativa, el compuesto puede inhibir la unión del anticuerpo modificado proporcionando un anticuerpo modificado con una afinidad reducida por el antígeno diana en comparación con el anticuerpo no modificado. En una realización no limitativa, el anticuerpo modificado puede tener una afinidad por el antígeno al que se debe unir que es como mínimo dos o como mínimo cinco veces inferior a la afinidad del anticuerpo no modificado.

En muchos casos, el anticuerpo modificado puede tener una afinidad que es como mínimo diez veces inferior o como mínimo 20 veces inferior o como mínimo 100 veces inferior al anticuerpo no modificado.

10 En una realización de la invención, la cantidad de anticuerpo modificado que se administra se coordina con la inhibición de la unión del anticuerpo modificado a la diana terapéutica de modo que, durante las primeras 24 horas tras la administración, la cantidad de anticuerpo modificado que se une al antígeno diana es inferior a la cantidad de anticuerpo modificado no unido al antígeno diana, siendo eficaces dichas cantidades relativas para reducir o eliminar la respuesta del anticuerpo contra el anticuerpo terapéutico.

15 En muchos casos, durante las primeras veinticuatro horas o en algunos casos en las primeras 48 ó 72 horas después de la administración del anticuerpo modificado, éste se une al antígeno diana en una cantidad tal que la relación entre el anticuerpo no unido a la diana y el anticuerpo unido a la diana terapéutica es de al menos 10:1, y en muchos casos al menos 50:1 o como mínimo 100:1.

20 El anticuerpo modificado se emplea en una cantidad eficaz tanto para producir el efecto terapéutico deseado como para inducir una respuesta inmune reducida contra el anticuerpo. En general, sin limitar la presente invención, el anticuerpo modificado se administra en una cantidad tal que la cantidad de anticuerpo administrado durante el período de 24 horas, empezando cuando se administra por primera vez, es al menos de 50 mg y en general como mínimo de 100 mg y de forma más general como mínimo de 200 mg. Con frecuencia el anticuerpo terapéutico modificado se utiliza en una cantidad que es superior a la cantidad de la forma no modificada necesaria para conseguir el efecto terapéutico deseado, utilizándose dicha mayor cantidad para proporcionar una cantidad de anticuerpo terapéutico modificado no unido al antígeno diana y para que sea eficaz en la reducción y/o la eliminación esencial de una respuesta inmune contra el anticuerpo en el receptor.

30 Así, existe una respuesta inmune reducida contra un anticuerpo terapéutico mediante la modificación del anticuerpo de forma tal que el éste se una *in vivo* a su antígeno en una menor cantidad, aumentando ésta con el tiempo. La solicitante ha descubierto que un anticuerpo terapéutico modificado puede llevar a cabo su función terapéutica *in vivo* al mismo tiempo que induce una respuesta inmune inmunogénica reducida contra el anticuerpo *in vivo*, siempre que la unión del anticuerpo a su antígeno sea inhibida o reducida inmediatamente después de la administración del mismo, aumentando la unión con el tiempo.

35 El anticuerpo terapéutico se puede emplear en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se considera que la utilización de un vehículo adecuado se encuentra al alcance del especialista en la técnica derivada de las presentes enseñanzas.

40 De acuerdo con la presente invención, se modifica la farmacocinética de un anticuerpo terapéutico o de otra proteína para que su vida media como monómero libre se amplíe en su presencia durante mayor tiempo. Ventajosamente en forma de "depósito de liberación retardada" en términos de dosis acumulativas y frecuencia de administración de la proteína terapéutica necesaria para conseguir los efectos terapéuticos deseados. Además, también permite una mejor penetración en el tumor y minimiza algunos efectos secundarios tras la administración del anticuerpo, efectos que resultan de la acumulación inmediata y masiva del anticuerpo en las células diana.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención. En las figuras adjuntas:

45 Figura 1: resultado de los estudios de unión que demuestran que la forma CAMPATH-1H, con el mimótopo unido por un enlazador flexible, no es capaz de unirse a la línea de células T humanas HUT78 que porta CD52 en comparación con las formas CAMPATH-1H que llevan el enlazador solo, un péptido irrelevante enlazado de la misma forma (p61-IgG1), el enlazador con el mimótopo fijado (MIM-IgG1), así como formas aglicosiladas (eliminación de la asparagina en posición 297 de la cadena H) de los varios anticuerpos (AG, etc.). Se debe observar que la forma AG.MIM-IgG1 es también de no unión celular y que la mera inserción del enlazador mismo reduce la unión de CAMPATH-1H en aproximadamente 4 veces.

55 Figura 2: diagrama de puntos de Clasificador de Células Activadas por Fluorescencia (FACS) que examina la unión del anticuerpo CAMPATH-1H en linfocitos de ratones transgénicos CP-1 a los que se administraron diversos constructos de anticuerpos (0,5 mg) intraperitonealmente (IP) 3 horas antes. Los linfocitos esplénicos y en sangre periférica se tiñeron con una IgG1 anti-humana para resaltar cualquier anticuerpo acumulado en su superficie. En la Fig. 2A, se examinan los linfocitos en sangre periférica. Los ratones tratados con CAMPATH-1H y la forma AG-CAMPATH-1H se tiñeron de forma muy brillante, de hecho saturada de anticuerpo. Efectivamente, se observa en esta etapa cierta

depleción de las células T procedentes de la sangre con ambos constructos (CD3+ el 4% y 32% para los linfocitos). Los constructos p61-IgG1 y AG-p61-IgG1 se tiñeron también fuertemente y presentan cierta depleción en ese momento (para CD3+ el 13,5% y el 23% para linfocitos en sangre). Mim-IgG1 tiñe las células T en la sangre, aunque de forma menos eficaz que los constructos anteriores, observándose escasa depleción en esta etapa (el 65,7% de los linfocitos son CD3+). Finalmente, AG.MIM-IgG1 se une de forma muy débil a los linfocitos en sangre y esta unión débil no está asociada a ninguna depleción de las células T en esta etapa. En la Fig. 2B, se presentan datos comparables sobre los linfocitos esplénicos. Aquí se observa que tanto MIM-IgG1 como AG.MIM-IgG1 son extremadamente ineficaces para la unión y la depleción, a diferencia de otros constructos que han conseguido aproximadamente un 50% de depleción en esta etapa.

Figura 3: demuestra que aunque los anticuerpos MIM-IgG1 y AG.MIM-IgG1 se unen débilmente al antígeno *in vitro*, se unen realmente a las células CD52+ (en ratones transgénicos CP-1) *in vivo*. 7 días después de la administración de 500 µg de cada anticuerpo, se analizaron los linfocitos en bazo y sangre mediante citometría de flujo. Esta figura demuestra que AG.MIM-IgG1 se ha unido a las células CD3+ del animal y que la intensidad de la tinción es superior a la de la Fig. 2. MIM-IgG1 hace lo mismo, pero se produce cierta clara depleción, ya que el porcentaje de células CD3+ en los animales es inferior (el 1,7% en el bazo contra el 36,6% para AG.MIM-IgG1; y el 16,1% en sangre contra el 78,9% para AG.MIM-IgG1).

Figura 4: Efecto en los recuentos de linfocitos en sangre periférica del tratamiento de ratones transgénicos para el antígeno CAMPATH-1 (ratones CP-1) con distintas dosis de CAMPATH-1H con (MIM-IgG1) o sin el mimotopo unido (CAMPATH-1H). Se analizaron los linfocitos en sangre periférica (PBL) mediante citometría de flujo. La columna de la izquierda muestra los resultados de ratones tratados con 1 µg a 50 µg de anticuerpo y la columna de la derecha muestra los resultados de un segundo experimento en el que se trataron los animales con 0,1 mg a 0,5 mg de anticuerpo. El anticuerpo terapéutico puede matar los linfocitos del huésped en 24 horas a una dosis de hasta 5 µg/ml, mientras que el anticuerpo con el mimotopo unido no es capaz de hacerlo a dosis de hasta 250 µg/ml. Por el contrario, a los 21 días, se observan efectos claros de depleción a dosis de 250 µg y 500 µg de "con mimotopo", mientras que con el anticuerpo terapéutico CAMPATH-1H, los linfocitos están empezando a reabastecer la sangre.

Figura 5: muestra la inmunogenicidad de los diversos constructos de anticuerpos en ratones transgénicos CP-1. Se recogieron sueros de ratones CP-1 tratados con distintas dosis del anticuerpo de prueba. Los sueros se recogieron 21 días (ejemplo A) ó 28 días (ejemplo B) después de la administración y se evaluaron por ELISA en cuanto a la presencia de anti-CAMPATH-1H Abs. Las muestras de suero se diluyeron 1:20 en PBS 1% BSA y posteriormente en diluciones dobles. Todas las dosis del anticuerpo terapéutico CAMPATH-1H eran inmunogénicas, mientras que las respuestas a todas las demás formas modificadas eran mucho más bajas (incluido p61-IgG1). Notablemente, 500 µg de la forma aglicosilada con el mimotopo (AG.MIM-IgG1) unido no generaron ninguna respuesta. En la Fig. 5B se puede observar que la insuficiencia en AG.MIM.IgG1 para inmunizar no es exactamente resultado de la mutación para eliminar la glicosilación de la región Fc, ya que AG-CAMPATH-1H demostró ser muy inmunogénico. La especificidad del efecto para el mimotopo también se estableció claramente, ya que AG-p61-IgG1 era también totalmente inmunogénico.

Figura 6A: examina la tolerogenicidad de los diversos constructos de anticuerpos en ratones transgénicos CP-1 y muestra los resultados de los sueros procedentes de ratones CP tratados con distintas dosis de Ab el día 0 y que se recogieron 30 días después del reto con 5 inyecciones intraperitoneales diarias de 50 µg de CAMPATH-1H y se evaluaron por ELISA en busca de anti-CAMPATH-1H Abs. Las muestras de suero se diluyeron 1:20 en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía un 1% de BSA y posteriormente se valoraron en diluciones dobles. En la parte izquierda de la figura, se dejaron los ratones 60 días antes de recibir el reto con el anticuerpo CAMPATH-1H, mientras que en la parte derecha de la figura, se dejaron 21 días. La figura de la izquierda (Fig. 5A) muestra que los animales pretratados con cualquiera de las dosis de 100, 250 ó 500 µg del mimotopo estaban muy deteriorados en su respuesta humoral a CAMPATH-1H. Esto indica cierto nivel de tolerancia. Sin embargo, la figura de la derecha muestra que los ratones estaban totalmente "tolerizados" con la forma aglicosilada del anticuerpo de unión de MIM, pero sólo parcialmente deteriorados con el anticuerpo que une el péptido irrelevante.

Figura 6B: examina el potencial tolerogénico de los constructos con refuerzo repetido con el anticuerpo CAMPATH-1H. Estos son los resultados para los mismos animales observados en la Figura 5A, que habían recibido otro reto con 5 dosis de 50 µg del anticuerpo CAMPATH-1H en el momento de la recogida previa de sueros. Los sueros procedentes de estos animales se recogieron entonces 30 días después de la re-exposición y se analizaron tal como se describe en la Figura 5. Las conclusiones son similares a las de la Fig. 6A.

Figuras 7 y 8: muestran la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos y respectivamente para el enlazador utilizado en los siguientes ejemplos (véase también SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, que son las mismas secuencias sin anotaciones).

Figuras 11 y 12: muestran la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos respectivamente para P61-IgG1 utilizado en los siguientes ejemplos (véase también SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, que son las mismas secuencias sin anotaciones).

Ejemplos**MATERIALES Y MÉTODOS**

En los siguientes experimentos se utilizó el anticuerpo CAMPATH-1H del anti-CD52 humanizado. Se elaboraron diversos constructos utilizando el anticuerpo CAMPATH-1H y la metodología siguiente.

5 Generación de variantes de no-unión de CAMPATH-1H

10 La clonación de las regiones V del anticuerpo humanizado CAMPATH-1H específico del antígeno CD52 humano se llevó a cabo tal como se describe en Gilliland y col., (1999) The Journal of Immunology 162:33663-3671. La metodología se basa en la de Orlandi y col., 1989, PNAS 86: 3833, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La cadena ligera de CAMPATH-1 humanizado de tipo salvaje se clonó en el vector pGEM 9 (Promega) y se utilizó como plantilla PCR para la mutagénesis sitio-dirigida.

15 Se añadió un enlazador flexible (Gly4Ser x 2) al extremo amino terminal de la cadena ligera entre la secuencia líder de CAMPATH-1H y la secuencia VL de CAMPATH-1H utilizando los cebadores oligonucleótidos PUCSE2 y Link-L-3' + Link L-5' y PUCSE REV. Los fragmentos resultantes fueron ensamblados por PCR con los cebadores PUCSE2 + PUCSE REV para producir la cadena ligera de longitud total del Enlazador CP-1H, que se pudo clonar en el vector de expresión como fragmento Hind111/Hind111.

20 Se utilizó entonces el constructo de cadena ligera del Enlazador CO-1H como plantilla PCR para generar los constructos del Mimotopo CD52 QTSSPSAD y del péptido P61 SLLPAIVEL. Se utilizaron los cebadores PUCSE2 y MIM-3' +CD52Mim-5' y PUCSE REV para producir el constructo de cadena ligera del Mimotopo CP-1H. Se utilizaron los cebadores PUCSE2 y P61-3' + HuP61-5' y PUCSE REV para producir el constructo de cadena ligera de P61 CP-1H.

20 El enlazador CP-1H, el Mimotopo CP-1H, los mutantes de P61-CP-1H se transfirieron a pBAN-2, derivado del vector de expresión mamífero pNH316 que contiene la selección de neomicina (Page y col., 1991 Biotechnology 9:64-68) y PEE 12, vector de expresión mamífero que contiene el gen de Glutamina Sintetasa para la selección (Bebbington y col., 1992 Biotechnology 10:169-175).

25 Células subconfluentes de Ovario de Hámster Chino dhfr (Page y col., 1991 Biotechnology 9:64-68) o células de mieloma de ratón NSO (ECACC cat. no. 8511503, Meth Enzymol 1981, 73B,3) fueron cotransfectadas con los mutantes de cadena ligera y el constructo de cadena pesada de CAMPATH-1H con la región constante de la IgG1 humana de tipo salvaje, la región constante de la IgG1 humana aglicosilada y la región constante de la IgG1 humana de no-unión de FcR.

30 Los constructos de cadena pesada de CAMPATH-1H se expresaron en pRDN-1, variante del vector de expresión mamífero pLD9 con un marcador seleccionable dhfr (Page y col., 1991 Biotechnology 9:64-68) y PEE 12.

La transfección se llevó a cabo con el reactivo LipofectAMINE PLUS (Life Technologies) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

35 La constante de la IgG1 humana fue derivada del gen G1m (1, 17) de tipo salvaje descrito por Takahashi y col., 1982 Cell 29, 671-679, mutación aglicosilo en posición 297 de asparagina a un residuo alanina. El oligosacárido en Asn-297 es un aspecto característico de todos los anticuerpos normales de la IgG humana (Kabat y col., Sequence of proteins of immunological interest US Department of Health Human Services Publication). La sustitución de la asparagina por alanina impide la glicosilación del anticuerpo (Routledge y Waldman, Transplantation, 1995, 60). Mutación de no-unión de FcR en la posición 235 de leucina a alanina y en la posición 237 de glicina a alanina (Xu y col., 1993 J Immunology 150:152A). La sustitución de la leucina y de la glicina en las posiciones 235 y 237 impide la fijación y activación del complemento.

40 Los transfectantes de cadena pesada y ligera son seleccionados para IMDM libre de hipoxantina que contiene 1 mg de G418 + un 5% (en volumen) de suero de ternera fetal dializado. Las células seleccionadas resultantes se examinan por ELISA en busca de la producción de anticuerpos y en busca de la unión de antígeno al clon de una célula T humana HUT 78 (Gootenberg JE y col., 1981 J. Exp. Med. 154: 1403-1418 y CD52 ratón transgénico).

45 Se clonaron las células productoras del anticuerpo mediante dilución limitante y luego se expandieron en cultivos en botellas rotatorias. La inmunoglobulina procedente de aproximadamente 15 litros de sobrenadante de cultivo de tejido de cada línea celular se purificó en proteína A, se dializó contra PBS y se cuantificó.

Lista de Cebadores Utilizados

PUCSE-2 5'-CAC AGA TGC GTA AGG AGA AAA TAC-3' (SEQ ID NO7)

50 PUCSE INV 5'-GCA GTG AGC GCA ACG CAA T-3' (SEQ ID NO 8)

LINK-L3'

5'-GCT TCC GCC TCC ACC GGA TCC GCC ACC TCC TTG
GGA GTG GAC ACC TGT AGC TGT TGC TAC-3' (SEQ ID
NO 9)

LINK-L5'

5'-GGA GGT GGC GGA TCC GGT GGA GGC GGA AGC
GAC ATC CAG ATG ACC CAG AGC CCA AG-3' (SEQ ID
NO 10)

MIM-3'

5'-GTC TGC TGA TGG GCT GCT GGT TTG GGA GTG GAC
ACC TGT AGC TGT TGC-3' (SEQ ID NO 11)

5

CD52Mim-5'

5'-CAA ACC AGC AGC CCA TCA GCA GAC GGA GGT
GGC GGA TCC GGT GGA GGA-3' (SEQ ID NO 12)

P61-3'

5'-CTC CAC GAT TGC TGG CAG CAG GCT TTG GGA GTG
GAC ACC TGT AGC TGT TG-3' (SEQ ID NO 13)

10 HuP61-

5'-AGC CTG CTG CCA GCA ATC GTG GAG CTG GGA GGT
GGC GGA TCC GGT GGA G-3' (SEQ ID NO 14)

15 Un ligando bloqueante basado en una secuencia publicada del péptido mimotopo del anticuerpo (Hale G 1995 Immunotechnology 1, 175-187) se construyó en el anticuerpo CAMPATH-1H de tipo salvaje como secuencia de ADNc con un enlazador genérico para fijar el producto peptídico a la cadena ligera del anticuerpo, con el fin de que el anticuerpo se secrete con su ligando unido en el sitio de combinación del anticuerpo. Un anticuerpo similar tenía también su región Fc mutada para eliminar el sitio de glicosilación en la posición 297.

Constructos / líneas celulares producidas

TF CHO/CP-1H IgG1/MIM y TF NSO/CP-1H IgG1/MIM (MIM IgG1)

20 Mimotopo de CD52 QTSSPSAD ligado a la región V de cadena ligera de CAMPATH-1H por el Enlazador flexible Glicina 4 Serina x 2 + la cadena pesada de Campath-1H con región constante de IgG1 humana de tipo salvaje. Clonado en el vector de expresión PEE12 de Celltech para el anticuerpo producido por NSO y los vectores de expresión pRND-1 y pBAN-2 de Wellcome para el anticuerpo producido por CHO.

TF NSO/CP-1H AG IgG1/mim (AG MIM IgG1)

Mimotopo de CD52 QTSSPSAD ligado a la región V de cadena ligera de CAMPATH-1H por el Enlazador flexible Glicina 4 Serina x 2 + la cadena pesada de Campath-1H con región constante de IgG1 humana de aglicosilo. Clonado en el vector de expresión PEE12 de Celltech para el anticuerpo producido por NSO.

5 TF NSO/CP-1H FCR IgG1/MIM (FcRmutMIM IgG1)

Mimotopo de CD52 QTSSPSAD ligado a la región V de cadena ligera de CAMPATH-1H por el Enlazador flexible Glicina 4 Serina x 2 + la cadena pesada de Campath-1H con región constante de IgG1 humana mutada en FcR. Clonado en el vector de expresión PEE12 de Celltech para el anticuerpo producido por NSO.

TF CHO/CP-1H IgG1/Link (Enlazador)

10 Enlazador flexible Glicina 4 Serina x 2 sólo en la región V de cadena ligera de CAMPATH-1H + cadena pesada de CAMPATH-1H con región constante de IgG1 humana de tipo salvaje. Clonado en los vectores de expresión de Wellcome pRDN-1 y pBAN-2 para el anticuerpo producido por CHO.

TF CHO/CP-1H IgG1/P61 (P61-IgG1)

15 Péptido SLLPAIVEL de unión de HLA P61 (Hunt y col., Science 1992 255 1261-1263) ligado a la región V de cadena ligera de CAMPATH-1H por el Enlazador flexible Glicina 4 Serina x 2 + la cadena pesada de CAMPATH-1H con región constante de IgG1 humana de tipo salvaje. Clonado en los vectores de expresión de Wellcome pRDN-1 y pBAN para el anticuerpo producido por CHO.

TF NSO/CP-1H AG IgG1/P61 (AGP61 IgG1)

20 Péptido SLLPAIVEL de unión de HLA P61 ligado a la región V de cadena ligera de CAMPATH-1H por el Enlazador flexible Glicina 4 Serina x 2 + la cadena pesada de CAMPATH-1H con región constante de IgG1 humana de aglicosilada. Clonado en el vector de expresión de Celltech PEE12 para el anticuerpo producido por NSO.

TF NSO/CP-1H FCR IgG1/P61 (FcRmut P61 IgG1)

25 Péptido SLLPAIVEL de unión de HLA P61 ligado a la región V de cadena ligera de CAMPATH-1H por el Enlazador flexible Glicina 4 Serina x 2 + la cadena pesada de CAMPATH-1H con región constante de IgG1 humana sin FcR. Clonado en el vector de expresión de Celltech PEE12 para el anticuerpo producido por NSO.

TF CHO/CO-1H IgG1 (CAMPATH-1H)

Región V de cadena ligera de CAMPATH-1H de tipo salvaje + la cadena pesada de CAMPATH-1H con región constante de IgG1 humana de tipo salvaje. Clonado en los vectores de expresión de Wellcome pRDN-1 y pBAN-2 para el anticuerpo producido por CHO.

30 TF NSO/CP-1H AG IgG1 (AG-IgG1)

Región V de cadena ligera de CAMPATH-1H de tipo salvaje + la cadena pesada de CAMPATH-1H con región constante de IgG1 humana de aglicosilo. Clonado en el vector de expresión de Celltech PEE12 para el anticuerpo producido por NSO.

Resultados

35 Se inyectó una dosis alta de los productos secretados purificados (CAMPATH-1H, MIM-IgG1, AG.MIM-IgG1) en ratones convertidos en transgénicos para CD52 humano (Gilliland y col.). Después de una semana, se descubrió que el anticuerpo se estaba uniendo a células en los 3 grupos, mientras que la depleción de linfocitos se observó solamente en los grupos con CAMPATH-1H y MIM-IgG1.

40 Entonces se retaron los ratones con el anticuerpo de tipo salvaje en múltiples ocasiones y sólo pudieron desarrollar pocas respuestas humorales xenogénicas, a diferencia de los ratones que no habían recibido el tolerógeno o los ratones que tenían, en lugar de ser tratados con, el anticuerpo CAMPATH-1H de tipo salvaje desde el principio. Los ratones tolerizados con la forma aglicosilada de MIM-IgG1 (AG.MIM-IgG1) eran totalmente incapaces de desarrollar una respuesta xenogénica, incluso después de un reto con 10 dosis del anticuerpo CAMPATH-1H terapéutico.

45 La Figura 1 muestra la capacidad de unión de los diversos constructos de anticuerpos a células HUT portadoras de CD52. CAMPATH-1H se une con una eficacia aproximadamente 2000 veces superior a MIM-IgG1, 5 veces superior a CAMPATH-1H-p61 (ambos P61-IgG1 y AG.P61-IgG1) y 10.000 veces superior a AG.MIM-IgG1.

La Figura 2 muestra un diagrama de puntos del Clasificador de Células Activadas por Fluorescencia (FACS) que examina la unión del anticuerpo CAMPATH-1H en los linfocitos de ratones transgénicos CP-1 a los que se administraron diversos constructos de anticuerpos (0,5 mg) intraperitonealmente (IP) 3 horas antes. Los linfocitos

esplénicos y en sangre periférica se tiñeron con una IgG1 anti-humana para resaltar cualquier anticuerpo acumulado en su superficie. En la Fig. 2A se examinan los linfocitos en sangre periférica. Los ratones tratados con CAMPATH-1H y la forma AG-MIM-IgG1 se tiñeron de forma muy brillante, de hecho saturada de anticuerpo. Efectivamente, se observa en esta etapa cierta depleción de células T procedentes de la sangre con ambos constructos (siendo CD3+ el 4% y el 32% de los linfocitos). Los constructos p61-IgG1 y AG-p61-IgG1 se tiñeron también fuertemente y consiguen cierta depleción en ese momento (siendo CD3+ el 13,5% y el 23% de los linfocitos en sangre). MIM-IgG1 tiñe las células T en la sangre, aunque de forma menos eficaz que los constructos anteriores, observándose muy poca depleción en esta etapa (el 65,7% de los linfocitos son CD3+). Finalmente, el AG-MIM-IgG1 se une de forma muy débil a los linfocitos en sangre y esta unión débil no está asociada a ninguna depleción de las células T en esta etapa. En la Fig. 2B, se presentan datos comparables sobre los linfocitos esplénicos. Aquí podemos ver que tanto MIM-IgG1 como AG-MIM-IgG1 son extremadamente ineficaces para la unión y la depleción, a diferencia de otros constructos que han conseguido aproximadamente un 50% de depleción en esta etapa.

La Figura 3 muestra que, aunque los anticuerpos MIM-IgG1 y AG.MIM-IgG1 se unen débilmente al antígeno *in vitro*, se unen realmente a células CD52+ (en ratones transgénicos CP-1) *in vivo*. 7 días después de la administración de 500 µg de cada anticuerpo, se analizaron los linfocitos en bazo y sangre mediante citometría de flujo. La figura muestra que AG.MIM-IgG1 se ha unido a las células CD3+ del animal. MIM-IgG1 ha hecho lo mismo, pero se ha producido claramente cierta depleción, ya que el porcentaje de células CD3+ en los animales es inferior (el 1,7% en el bazo contra el 36,6% para AG.MIM-IgG1; y el 16,1% en sangre contra el 78,9% para AG.MIM-IgG1).

La Figura 4 muestra que la forma de unión al mimotopo de CAMPATH-1H (MIM-IgG1) es lítica para los linfocitos en sangre. Después de las primeras 24 horas, existe sólo una depleción celular limitada en sangre. Sin embargo, a los 7 días se puede ver que las altas dosis de anticuerpo MIM-IgG1 eliminan efectivamente un número significativo de linfocitos en sangre. Al mes, los recuentos de linfocitos en huéspedes tratados son comparables entre las dos formas de anticuerpos a altas dosis (250 µg y 500 µg). La columna de la izquierda (Fig. 4A) muestra el nivel de depleción de los linfocitos en sangre obtenido en ratones tratados con 1 µg a 50 µg de anticuerpo. A estas dosis, la forma de unión al mimotopo no se redujo, mientras que los animales tratados con CAMPATH-1H mostraron una depleción de células T dependiente de la dosis. En la columna de la derecha (Fig. 4B), CAMPATH-1H muestra una depleción rápida y eficaz de células T, mientras que la forma con el mimotopo unido obtuvo una depleción más lenta, que a los 7 días que no era tan completa como con el tratamiento con CAMPATH-1H, pero que se mantuvo durante un período más largo. La reducción de células hCD52+ no se debía al recubrimiento del antígeno con el anticuerpo inyectado como lo confirmaron los resultados mediante una disminución equivalente de células CD4+ y CD8+.

La Figura 5A muestra que el anticuerpo de unión al mimotopo (MIM-IgG1) es poco inmunogénico y que la forma aglicosilada del mimotopo de CAMPATH-1H no es inmunogénica en absoluto. Los animales tratados con CAMPATH-1H tenían altos títulos de Abs de anti-CAMPATH-1H, mientras que los títulos de los ratones tratados con la forma unida del mimotopo son mucho más bajos. Los animales que recibieron la forma aglicosilada del anticuerpo con mimotopo que no se está reduciendo, no tenían ninguna respuesta detectable a la antiglobulina. En la Fig. 5B, se puede observar que la insuficiencia en AG.MIM.IgG1 para inmunizar no es exactamente resultado de la mutación para eliminar la glicosilación de la región Fc, ya que AG-CAMPATH-1H demostró ser muy inmunogénico. Se estableció claramente también la especificidad del efecto para el mimotopo, ya que AG-p61-IgG1 era también totalmente inmunogénico.

La Figura 6A muestra que la forma aglicosilada del anticuerpo CAMPATH-1H de unión al mimotopo (AG.MIM-IgG1) es profundamente tolerogénica. Los animales tratados el día 0 con CAMPATH-1H enlazado al péptido de control, o los que no recibieron tratamiento alguno, tenían también altos títulos de antiglobulina. Los ratones tratados con el anticuerpo de unión al mimotopo (MIM-IgG1) tenían títulos de antiglobulina mucho más bajos, mientras que los animales que recibieron la forma aglicosilada del anticuerpo de unión al mimotopo (AG.MIM-IgG1) que no se está reduciendo no tenían antiglobulina detectable en los sueros.

La Figura 6B confirma además que la forma aglicosilada del CAMPATH-1H de unión al mimotopo (AG.MIM-IgG1) es profundamente tolerogénica. Los resultados de la Figura 6B son similares a los de la Figura 6A, con una diferencia más importante en los títulos de antiglobulina entre los grupos tratados el día 0 con CAMPATH-1H, CAMPATH-1H-p61 o no tratados y aquellos grupos tratados con los anticuerpos de unión al mimotopo. Aquí de nuevo, no había antiglobulinas detectables en los ratones tratados con la forma aglicosilada (AG.MIM-IgG1).

Son posibles numerosas modificaciones y variaciones de las realizaciones descritas aquí en base a las presentes enseñanzas; por tanto, el alcance de la invención no se limita a dichas realizaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Isis Innovation Ltd.
- <120> Anticuerpos Terapéuticos
- <130> JIM/G15589WO
- 5 <160> 14
- <170> PatentIn version 3.0
- <210> 1
- <211> 266
- <212> PRT
- 10 <213> constructo sintético
- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (264)..(264)
- <223> Codón de parada (TAG)
- 15 <400> 1

Ser Leu Ala Leu Gln Leu Leu Ser Thr Gln Asp Leu Thr Met Gly Trp
 1 5 10 15

Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Gly Val His Ser
 20 25 30

Gln Thr Ser Ser Pro Ser Ala Asp Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 35 40 45

Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 50 55 60

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asp
 65 70 75 80

Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 85 90 95

Leu Ile Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe
 100 105 110

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu
 115 120 125

Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Ile Ser Arg
 130 135 140

Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Val Ala
 145 150 155 160

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 165 170 175

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 180 185 190

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 195 200 205

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 210 215 220

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 225 230 235 240

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 245 250 255

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Xaa Lys Leu
 260 265

<210> 2

<211> 850

<212> ADN

5 <213> constructo sintético

<400> 2

gaattcgagc tcggtacccg gggatcctct agagtcgacc tgcaggcatg caagcttggc	60
tctacagta ctgagcacac aggacctcac catgggatgg agctgtatca tcctcttctt	120
ggtagcaaca gctacaggtg tccactccca aaccagcagc ccctcagcag acggaggtgg	180
cggatccggt ggaggcggaa gcgacatcca gatgaccag agcccaagca gcctgagcgc	240
cagcgtgggt gacagagtga ccatcacctg taaagcaagt cagaatattg acaataactt	300
aaactggtac cagcagaagc caggtaaagg tccaaagctg ctgatctaca atacaacaa	360
tttgaaacg ggtgtgcca gtagattcag cggtagcggg agcgggtaccg acttcacctt	420
caccatcagc agcctccagc cagaggacat cgccacctac tactgcttgc agcatataag	480

taggccgcgc acgttcggcc aagggaccaa ggtggaatc aaaactgtgg ctgcaccatc 540
 tgtttcatic ttcccgcat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg 600
 cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgcctt 660
 ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag 720
 cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg 780
 cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaag agcttcaaca ggggagagtg 840
 ttagaagctt 850

<210> 3

5 <211> 780

<212> ADN

<213> constructo sintético

<400> 3

aagcttggct ctacagttac tgagcacaca ggacctcacc atgggatgga gctgtatcat 60
 cctcttcttg gttagaacag ctacaggtgt ccaactccaa ggaggtggcg gatccggtgg 120
 aggcggaagc gacatccaga tgaccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga 180
 cagagtgacc atcacctgta aagcaagtca gaatattgac aaatacttaa actggtacca 240
 gcagaagcca ggtaaggctc caaagctgct gatctacaat acaacaatt tgcaaacggg 300
 tgtgccaagc agattcagcg gtagcggtag cggtagcgac ttcacctca ccatcagcag 360
 cctccagcca gaggacatcg ccacctacta ctgcttcgag catataagta ggccgcgcac 420
 gttcggccaa gggaccaagg tggaatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtttcat 480
 ctcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa 540
 taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg 600
 taactcccag gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag 660
 caccctgacg ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac 720
 ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaag gagcttcaac aggggagagt gttagaagct 780

10

<210> 4

<211> 275

<212> PRT

<213> constructo sintético

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (259)..(259)

<223> Codón de parada (TAG)

<400> 4

Val Ser Leu Ala Leu Gln Leu Leu Ser Thr Gln Asp Leu Thr Met Gly
1 5 10 15

Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Val His
 20 25 30

Ser Gln Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
 35 40 45

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
 50 55 60

Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asp Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr
65 70 75 80

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Thr Asn
 85 90 95

Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 100 105 110

Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala
 115 120 125

Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Ile Ser Arg Pro Arg Thr Phe Gly Gln
 130 135 140

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
145 150 155 160

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
 165 170 175

Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
 180 185 190

Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
 195 200 205

10

Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 210 215 220

<213> constructo sintético

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (260)..(260)

<223> Codón de parada (TAG)

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (279)..(279)

<223> Codón de parada (TAG)

<400> 6

Ser Thr Gln Asp Leu Thr Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu
 1 5 10 15

Val Ala Thr Ala Thr Gly Val His Ser Gln Ser Leu Leu Pro Ala Ile
 20 25 30

Val Glu Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln
 35 40 45

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 50 55 60

Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asp Lys Tyr Leu Asn Trp
 65 70 75 80

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Thr
 85 90 95

Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 100 105 110

Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile
 115 120 125

Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Ile Ser Arg Pro Arg Thr Phe Gly
 130 135 140

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
 145 150 155 160

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
 165 170 175

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 180 185 190

Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val
 195 200 205

Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu
 210 215 220

Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
 225 230 235 240

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg
 245 250 255

Gly Glu Cys Xaa Lys Leu Cys Ser Arg Leu Glu Phe Val Asp Glu Leu
 260 265 270

Pro Ile Val Ser Arg Ile Xaa Arg Pro
 275 280

<210> 7

<211> 24

5 <212> ADN

<213> constructo sintético

<400> 7

cacagatgcg taaggagaaa atac 24

10

<210> 8

<211> 19

<212> ADN

<213> constructo sintético

15

<400> 8

gcagtgagcg caacgcaat 19

<210> 9

<211> 60

ES 2 368 387 T3

<212> ADN

<213> constructo sintético

<400> 9

5 gcttccgct ccaccgatc cgccacctcc ttgggagtg acacctgtag ctgttgctac 60

<210> 10

<211> 56

<212> ADN

10 <213> constructo sintético

<400> 10

ggaggtggcg gatccggtgg aggcggaagc gacatccaga tgaccagag cccaag 56

<210> 11

15 <211> 48

<212> ADN

<213> constructo sintético

<400> 11

20 gtctgctgat gggctgctgg ttgggagtg gacacctgta gctgttgc 48

<210> 12

<211> 48

<212> ADN

<213> constructo sintético

25

<400> 12

caaaccagca gcccatcagc agacggaggt ggcgatccg gtggagga 48

<210> 13

<211> 50

30 <212> ADN

<213> constructo sintético

<400> 13

ctccacgatt gctggcagca ggctttggga gtggacacct gtagctgttg 50

<210> 14

35 <211> 49

<212> ADN

<213> constructo sintético

<400> 14

agcctgctgc cagcaatcgt ggagctggga ggtggcggat ccggtggag

49

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo terapéutico modificado que comprende un anticuerpo de unión celular que incluye un sitio de combinación del anticuerpo que se une a un antígeno diana unido a células, siendo modificado dicho anticuerpo con un péptido que inhibe la unión del anticuerpo al antígeno diana, caracterizado porque el péptido comprende el antígeno diana o un dominio o mimotopo del mismo que está unido reversiblemente al sitio de combinación del anticuerpo, siendo eficaz dicho anticuerpo modificado para reducir una respuesta inmune contra el anticuerpo y para producir un efecto terapéutico mediante la unión al antígeno diana.
2. Anticuerpo terapéutico modificado según la reivindicación 1, caracterizado porque el péptido unido al sitio de combinación del anticuerpo está enlazado también al anticuerpo.
3. Anticuerpo terapéutico modificado según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque sólo una de las cadenas del anticuerpo tiene un péptido enlazado al mismo que se une al sitio de combinación del anticuerpo.
4. Anticuerpo terapéutico modificado según la reivindicación 1, caracterizado porque la avidez del anticuerpo modificado combinado con el péptido es como mínimo 4 veces inferior a la avidez del anticuerpo no-modificado.
5. Anticuerpo terapéutico modificado según la reivindicación 4, caracterizado porque el anticuerpo modificado tiene una avidez por la diana que es como mínimo 100 veces inferior a la avidez del anticuerpo no-modificado por la diana.
6. Anticuerpo terapéutico modificado según la reivindicación 4, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo aglicosilado.
7. Anticuerpo terapéutico modificado según la reivindicación 2, caracterizado porque la fracción Fc del anticuerpo está aglicosilada.
8. Anticuerpo terapéutico modificado según la reivindicación 2, caracterizado porque la unión del anticuerpo al receptor Fc esencialmente se elimina.
9. Anticuerpo terapéutico modificado según la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo no humano.
10. Anticuerpo terapéutico modificado según la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
11. Anticuerpo terapéutico modificado según la reivindicación 1 que tiene un péptido unido reversiblemente al sitio de combinación del anticuerpo, por lo que dicho antígeno diana compite por y desplaza el péptido del sitio de combinación del anticuerpo, inhibiendo dicho péptido la unión del anticuerpo al antígeno diana, dicho anticuerpo modificado uniéndose inicialmente al antígeno diana en una cantidad que es inferior al anticuerpo no-modificado, aumentando dicha unión del antígeno diana como consecuencia del desplazamiento del péptido del sitio de combinación del anticuerpo a medida que el anticuerpo se va uniendo al antígeno diana.
12. Anticuerpo terapéutico modificado según la reivindicación 2, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo alemtuzumab modificado (CAMPATH-1H).
13. Anticuerpo terapéutico modificado según la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo comprende el mimotopo de CD52 que tiene la secuencia de aminoácido QTSSPSAD ligada a la región V de la cadena ligera del alemtuzumab (CAMPATH-1H) por el Enlazador flexible Glicina 4 Serina x 2 y la cadena pesada del alemtuzumab (CAMPATH-1H) con la región constante de la IgG1 humana de tipo salvaje.
14. Anticuerpo terapéutico modificado según la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo comprende el Mimotopo de CD52 que tiene la secuencia de aminoácido QTSSPSAD ligada a la región V de la cadena ligera del alemtuzumab (CAMPATH-1H) por el Enlazador flexible Glicina 4 Serina x 2 y la cadena pesada del alemtuzumab (CAMPATH-1H) con la región constante de la IgG1 humana aglicosilada.
15. Anticuerpo terapéutico modificado según la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo comprende el Mimotopo de CD52 que tiene la secuencia de aminoácido QTSSPSAD ligada a la región V de la cadena ligera del alemtuzumab (CAMPATH-1H) por el Enlazador flexible Glicina 4 Serina x 2 y la cadena pesada del alemtuzumab (CAMPATH-1H) con la región constante de la IgG1 humana mutada en FcR.

16. Anticuerpo terapéutico modificado según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, caracterizado porque la cadena ligera del anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos según la SEQ ID NO: 2.
- 5 17. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo terapéutico modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
18. Anticuerpo terapéutico modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su utilización en terapia.
- 10 19. Anticuerpo terapéutico modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su utilización en el tratamiento de una condición seleccionada de entre cáncer, enfermedades inflamatorias crónicas tales como artritis reumatoide, enfermedades autoinmunes tales como diabetes, psoriasis, esclerosis múltiple, lupus sistémico, enfermedades alérgicas tales como asma, enfermedades cardiovasculares tales como infarto de miocardio, derrame cerebral y enfermedades infecciosas.
- 15 20. Utilización de un anticuerpo terapéutico modificado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una condición seleccionada de entre cáncer, enfermedades inflamatorias crónicas tales como artritis reumatoide, enfermedades autoinmunes tales como diabetes, psoriasis, esclerosis múltiple, lupus sistémico, enfermedades alérgicas tales como asma, enfermedades cardiovasculares tales como infarto de miocardio, derrame cerebral y enfermedades infecciosas.

Anticuerpos Silenciosos de Unión a Células HUT 78

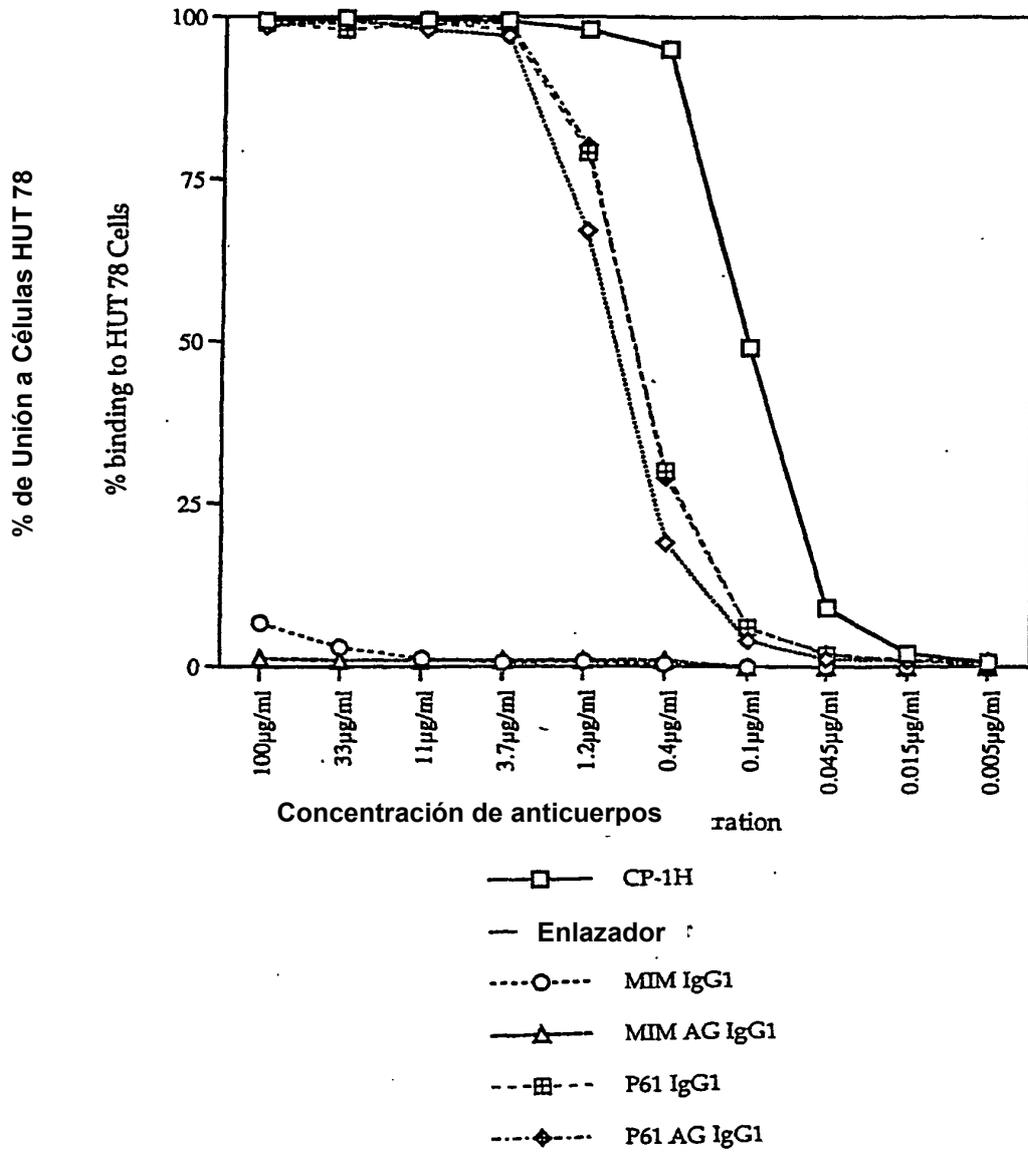


Figura 1 ure 1

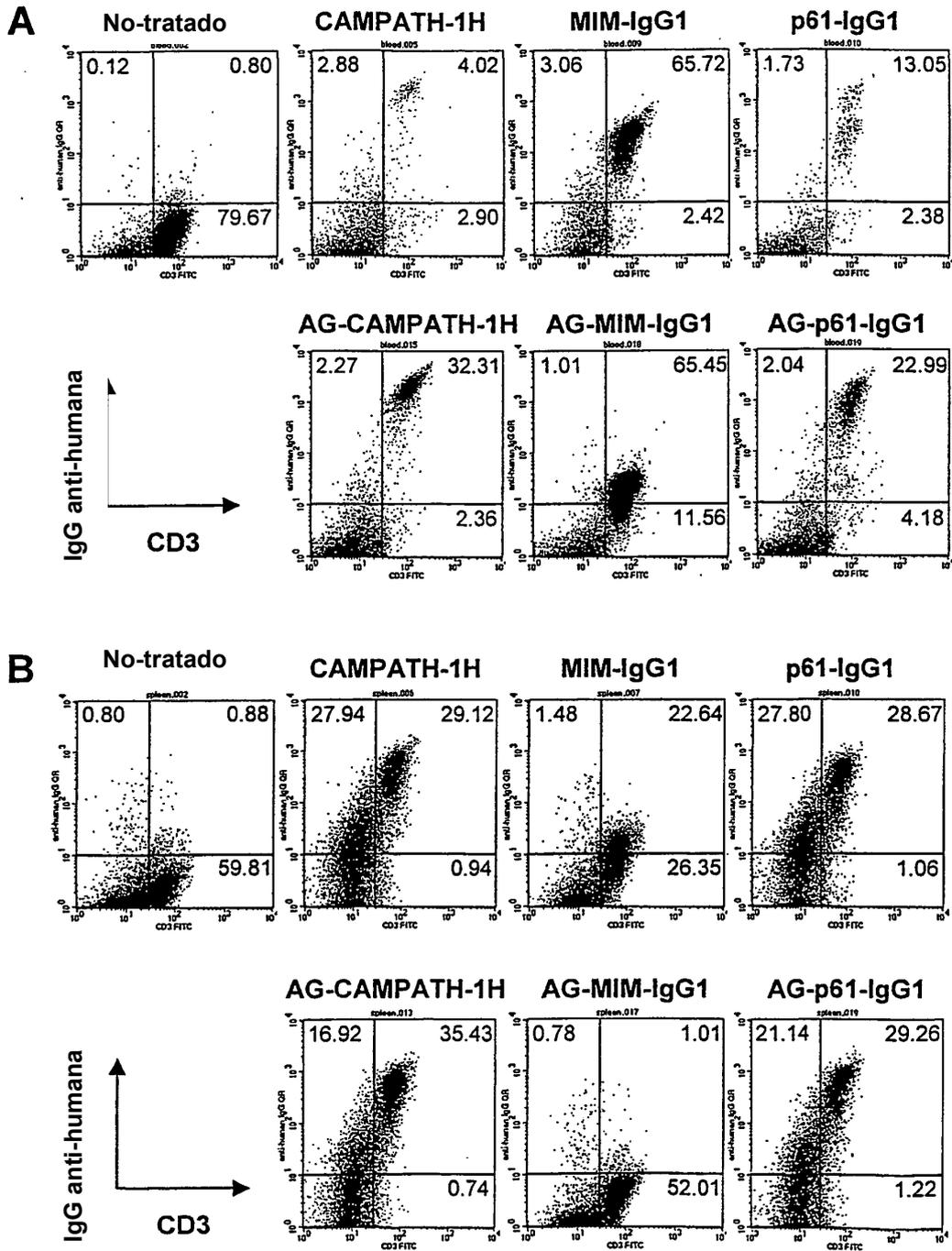


Figura 2



Figura 3

Comparación de la potencia del CAMPATH-1H y del MIM-IgG1 para reducir los linfocitos *in vivo*

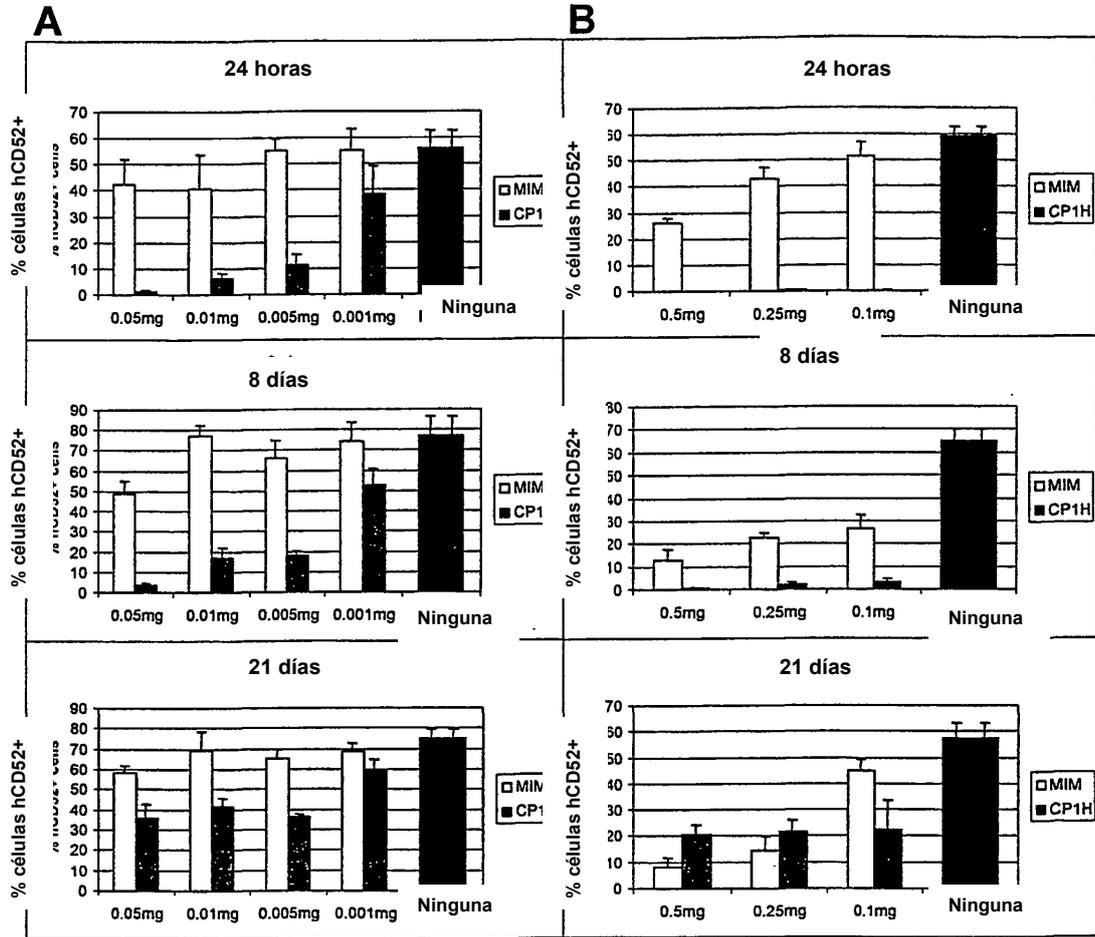


Figura 4

Comparación de la inmunogenicidad del CAMPATH-1H, del MIM-IgG1 y del AG-MIM-IgG1

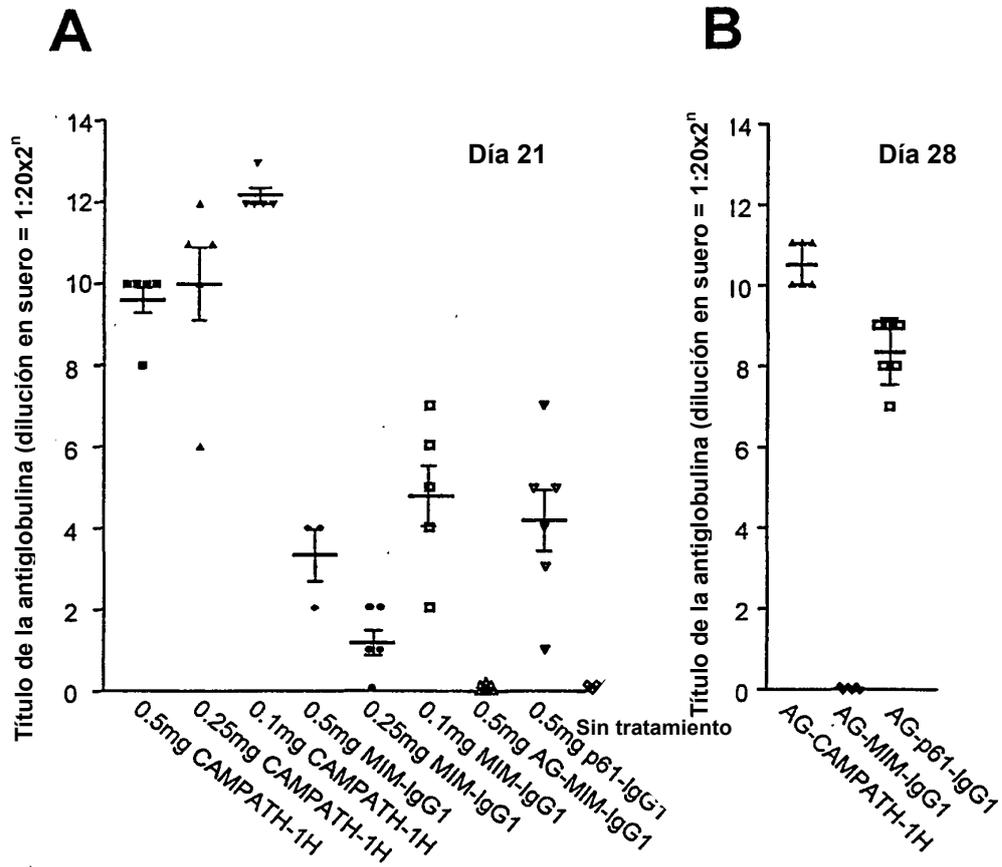


Figura 5

Comparación de la capacidad tolerogénica del CAMPATH-1H, del MIM-IgG1 y del AG-MIM-IgG1

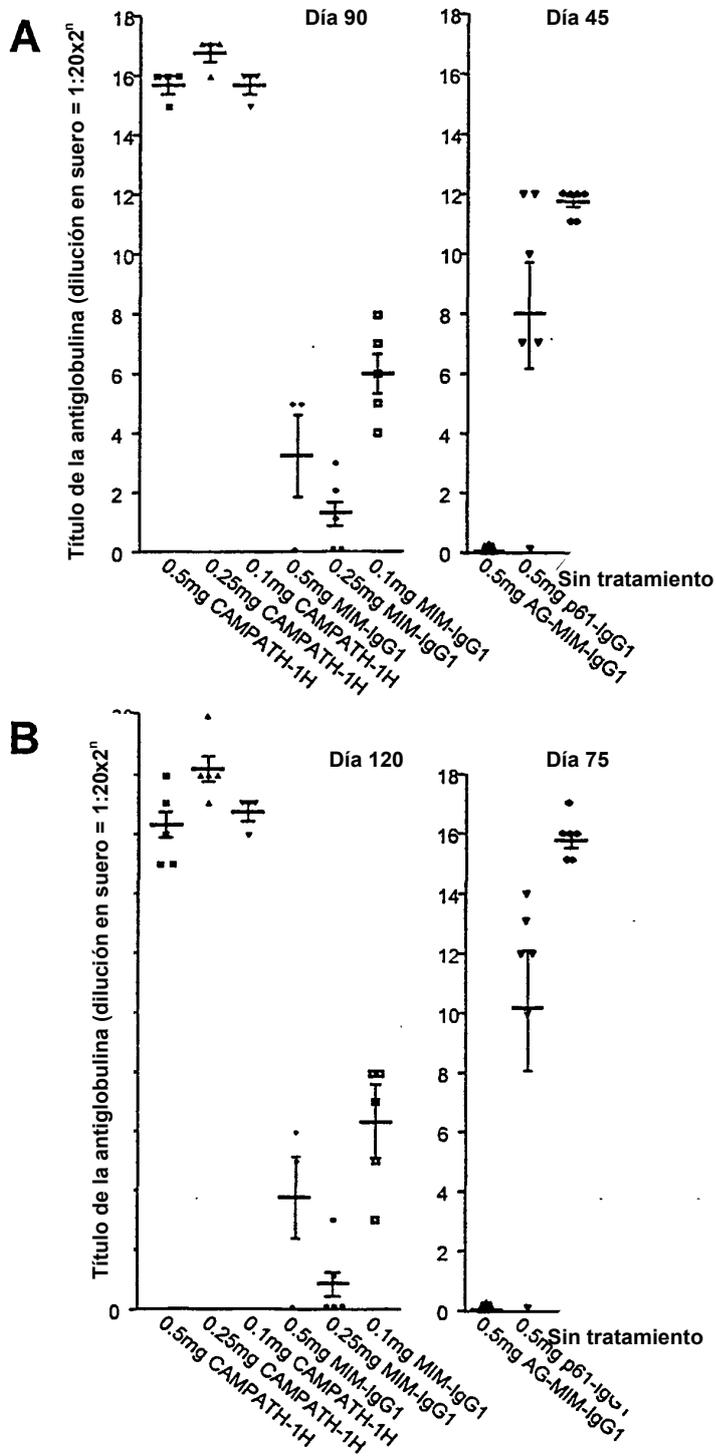


Figura 6

ES 2 368 387 T3

```

                                MIM      Linker
1  SLALQLLSTQ DLTMGWSCII LFLVATATGV HS QTSSPSAD GGGGSGGGGS

                                CDR1
51  DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQNIID KYL NWFYQQKP GKAPKLLIY N

                                CDR2                                CDR3
101 TNNLQT GVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYC LQ HISRPRTFGQ

                                Light chain constant region
151  GTKVEIKTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD

201  NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSLTLL SKADYEKHKV YACEVTHQGL

251  SSPVTKSFNR GEC*KL
```

Figura 7: Secuencia peptídica de: Cadena ligera de CD52 MIM / CP-1H

E	B	H
C	a	i
O	m	n
R	H	I
I	I	I

GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGC AAGCTTGGC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTTAAGCTCGAGCCATGGGCCCTAGGAGATCTCAGCTGGACGTCCGTACGTTCGAACCG

b N S S S V P G D P L E S T C R H A S L A -
 Inicio Secuencia Líder de CP-1L

TCTACAGTTACTGAGCACACAGGACCTCACC ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTTCTT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AGATGTCAATGACTCGTGTGCCTGGAGTGGTACCCTACCTCGACATAGTAGGAGAAGAA

b L Q L L S T Q D L T M G W S C I I L F L -
 Mimotopo Gly4Serx2

GGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTC CCAAACCAGCAGCCCCTCAGCAGA CGGAGGTGG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCATCGTTGTGATGTCCACAGGTGAGGGTTTGGTCGTCGGGGAGTCGTCTGCCTCCACC

b V A T A T G V H S Q T S S P S A D G G G

Enlazador

CGGATCCGGTGGAGGCGGAAG CGACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCCTAGGCCACCTCCGCCTTCGCTGTAGGTCTACTGGGTCTCGGGTTCGTCCGACTCGCG

b G S G G G G S D I Q M T Q S P S S L S A -

CDR1
 CAGCGTGGGTGACAGAGTGACCATCAC CTGTAAAGCAAGTCAGAATATTGACAAATACTT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTCGCACCCACTGTCTCACTGGTAGTGGACATTTTCGTTTCAGTCTTATAACTGTTTATGAA

b S V G D R V T I T C K A S Q N I D K Y L -

CDR2
 AAAGTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTCCAAAGCTGCTGATCTA CAATACAAACAA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTTGACCATGGTCGTCCTTCGGTCCATTCCGAGGTTTCGACGACTAGATGTTATGTTTGT

b N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y N T N N -

TTGCAAAC GGGTGTGCCAAGCAGATTCAGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTTCACCTT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AAACGTTTGCCACACGGTTCGTCTAAGTCGCCATCGCCATCGCCATGGCTGAAGTGGAA

b L Q T G V P S R F S G S G S G T D F T F -

CDR3

CACCATCAGCAGCCTCCAGCCAGAGGACATCGCCACCTACTACT GCTTGCAGCATATAAG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTGGTAGTCGTCTGGAGGTCGGTCTCCTGTAGCGGTGGATGATGACGAACGTCGTATATTC

b T I S S L Q P E D I A T Y Y C L Q H I S -

TAGGCCGCGCAC GTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACCTGTGGCTGCACCATC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ATCCGGCGCGTGCAAGCCGGTTCCCTGGTTCCACCTTAGTTTTGACACCGACGTGGTAG

b R P R T F G Q G T K V E I K T V A A P S -

Región constante de cadena ligera
 TGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACAGAAGTAGAAGGGCGGTAGACTACTCGTCAACTTAGACCTTGACGGAGACAACACAC

b V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C -

CCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGACGACTTATTGAAGATAGGGTCTCTCCGGTTTCATGTCACCTTCCACCTATTGCGGGA

b L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L -

CCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGTTAGCCCATTTGAGGGTCTCTCACAGTGTCTCGTCTGCTGCTTCTGTCGTTGTCGTTGGATGTC

b Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S -

CCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGAGTCGTCGTGGGACTGCGACTCGTTTCGTCGTGATGCTCTTTGTGTTTCAGATGCGGAC

b L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C -

CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GCTTCAGTGGGTAGTCCCGACTCGAGCGGGCAGTGTTCGTCGAAGTTGTCCCCTCTCAC

b E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C -

H
 i
 n
 d
 I
 I
 I
 I

TTA GAAGCTT
 -----+
 AATCTTCGAA

b * K L -

Figura 8: Secuencia nucleotídica de: Región constante + región variable de CD52Mim-CP1L

b L Q P E D I A T Y Y C L Q H I S R P R T -
 GTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CAAGCCGGTTCCCTGGTTCCACCTTTAGTTTGCTTGACACCGACGTGGTAGACAGAAGTA

b F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I -
 Región constante de cadena ligera
 CTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GAAGGGCGGTAGACTACTCGTCAACTTTAGACCTTGACGGAGACAACACACGGACGACTT

b F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N -
 TAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ATTGAAGATAGGCTCTCTCCGGTTTCATGTCACCTTCCACCTATTGCGGGAGGTTAGCCC

b N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G -
 TAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAG
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ATTGAGGGTCCCTCTCAGAGTGTCTCGTCTGTCGTTCCCTGTCGTTGGATGTCGGAGTCGTC

b N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S -
 CACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GTGGGACTGCGACTCGTTTCGCTGATGCTCTTTGTGTTTCAGATGCGGACGCTTCAGTG

b T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T -
 H
 i
 n
 d
 I
 I
 I
 CCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGAAAGCT
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 GGTAGTCCCAGGACTCGAGCGGCAGTGTTCGAAAGTTGCCCTCTACAATCTTCGA

b H Q G L S S P V T K S F N R G E C * K L -

Figura 9: Secuencia nucleotídica de: Región constante + región variable del enlazador CP-1L

ES 2 368 387 T3

```

                                     Linker
1  VSLALQLLST QDLTMGWSCI ILFLVATATG VHSQ GGGGSG GGGG DIQMTQ
                                     CDR1                               CDR2
51  SPSSLSASVG DRVT ITCKAS QNIDKYL NWY QQKPGKAPKL LIY NTNNLQT
                                     CDR3
101 GVPSRFSGSG SGTDFFTTIS SLQPEDIAT Y YCLQHISRPR T FGQGTKVEI
                                     Light chain constant region
151 KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS
201 GNSQESVTEQ DSKDSTYSLT STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT
251 KSFNRGEC*K LCSRLEFVDE LPIVS
```

Figura 10: Secuencia peptídica de: Cadena ligera del enlazador CP-1H


```

TCGCCATGCCATGGCTGAAGTGAAGTGGTAGTCGTCGGAGGTCGGTCTCCTGTAGCGG
c   S G S G T D F T F T I S S L Q P E D I A -
      CDR3
ACCTACTACT GCTTGCAGCATATAAGTAGGCCGCGCAC GTTCGGCCAAGGGACCAAGGTG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGGATGATGACGAACGTCGTATATTCATCCGGCGCGTGCAAGCCGGTTCCTGGTTCCAC
      Región constante de cadena ligera
c   T Y Y C L Q H I S R P R T F G Q G T K V -
      GAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCGCCATCTGATGAGCAG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTTTAGTTTGCTTGACACCGACGTGGTAGACAGAAGTAGAAGGGCGGTAGACTACTCGTC
c   E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q -
      TTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AACTTTAGACCTTGACGGAGACAACACACGGACGACTTATTGAAGATAGGGTCTCTCCGG
c   L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A -
      AAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACACA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTCATGTACCTTCCACCTATTGCGGGAGGTTAGCCCATTGAGGGTCTCTCACAGTGT
c   K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T -
      GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTCGTCTGTCGTTCTGTCGTTGGATGTCGGAGTCGTCGTTGGACTGCGACTCGTTTCGT
c   E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A -
      GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTGATGCTCTTTGTGTTTCAGATGCGGACGCTTCAGTGGGTAGTCCCAGGACTCGAGCGGG
c   D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P -
      Hind 111
      GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG AAGCTT TG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
      CAGTGTTCCTCGAAGTTGTCCCCTCTACAATCTTCGAAAC
c   V T K S F N R G E C * K L -

```

Figura 11: Secuencia nucleotídica de: Región constante + región variable de P61-CP1L

STQDLTMGWS CIILFLVATA

HLA-P61 Linker CDR1
TGVHSQSLLP AIVEL GGGGS GGGGS DIQMT QSPSSLSASV GDRVT ITCKA

CDR2
SQNIDKYL NW YQKPGKAPK LLIY NTNNLQ T GVPSRFSGS GSGTDFFTI

CDR3
SSLQPEDIAT YYCLOHISRP RT FGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL

Región constante de cadena ligera
KSGTASVVCL LNNFYBREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTYSL

SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC* KLCSRLEFVD

ELPIVSRI*R P

**Figura 12: Secuencia peptídica de p61-L2.seq. comprobación: 678 de 1 a: 1085
(montaje de P61 enlazado a cadena L de CP1H-en pGEM9)**