



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 369 982**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09153544 .3**
96 Fecha de presentación : **19.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **2070948**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.06.2009**

54 Título: **Anticuerpo anti-CD4 humanizado con propiedades inmunosupresoras.**

30 Prioridad: **21.03.2003 EP 03290725**
16.04.2003 EP 03290942

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.12.2011

73 Titular/es: **Biotest AG.**
Landsteinerstrasse 5
63303 Dreieich, DE

72 Inventor/es: **Wijdenes, John y**
Jonuleit, Helmut

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 369 982 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

Anticuerpo anti-CD4 humanizado con propiedades inmunosupresoras.

5 La invención se refiere a un anticuerpo anti-CD4 humanizado, y a su uso para inmunomodulación.

Las enfermedades autoinmunes así como el rechazo de injertos se producen por una respuesta inmune inapropiada a los antígenos tisulares: a los autoantígenos en el primer caso, y a los antígenos del aloinjerto en el segundo.

10 Las enfermedades autoinmunes incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, dermatitis atópica, etc.

15 Los tratamientos convencionales para estos trastornos inmunológicos implican fármacos inmunosupresores. Sin embargo, estos fármacos inducen una inmunosupresión general, dando lugar a la inhibición no sólo de las funciones nocivas del sistema inmune, sino también de las funciones útiles. Como consecuencia, inducen efectos secundarios, tales como infecciones oportunistas.

20 Como una estrategia alternativa, se ha propuesto usar anticuerpos monoclonales (mAb) inmunosupresores contra moléculas de la superficie celular, con el fin de eliminar subgrupos específicos de linfocitos (anticuerpos destructores) o para inhibir la función de una molécula de superficie diana sin matar a la célula que la porta (anticuerpos no destructores).

25 En general, se reconoce que los linfocitos T CD4⁺ desempeñan un papel importante en el inicio y mantenimiento de la autoinmunidad. Por lo tanto, se ha propuesto el uso de mAb contra moléculas de superficie de los linfocitos T CD4⁺, y en particular mAb anti-CD4, como agentes inmunosupresores. Aunque numerosos estudios clínicos han confirmado el interés potencial de esta estrategia, también se plantearon varias cuestiones a abordar con el fin de hacer que los mAb anti-CD4 sean más adecuados para su uso en la práctica clínica rutinaria.

30 A modo de ejemplo, el anticuerpo B-F5 (IgG1 murina anti-CD4 humano) se ensayó en diferentes enfermedades autoinmunes:

- en pacientes con artritis reumatoide, varios estudios abiertos sugirieron un efecto clínico positivo de B-F5 a una dosis diaria de al menos 20 mg (Racadot *et al.* Clin Exp Rheumatol 10 (4): 375-74; 1992; Wendling *et al.*, Clin Rheumatol, 11 (4): 542-7, 1992). Sin embargo, los resultados observados en un experimento controlado con placebo con una dosis diaria de 20 mg durante 10 días no mostraron una mejora significativa (Wendling *et al.* J Rheumatol; 25 (8): 1457-61, 1998).

35 - en psoriasis, se observó una mejora en las lesiones psoriásicas después de un tratamiento a una dosis de 0,2 mg/kg/día a 0,8 mg/kg/día durante 7 u 8 días (Morel *et al.* J Autoimmun., 5 (4): 165-77, 1992);

40 - en pacientes con esclerosis múltiple (MS), se observaron algunos efectos positivos después de un tratamiento de 10 días en pacientes con formas recurrentes-remitentes, alguna de las cuales estaban libres de recaídas al sexto mes después de la terapia. (Racadot *et al.*, J. Autoimmun, 6 (6): 771-86, 1993); se observaron efectos similares por Rumbach *et al.* (Mult Sclar, 1 (4): 207-12, 1996).

45 - en la enfermedad de Crohn grave, no se observó una mejora significativa en pacientes que recibieron B-F5 a una dosis de 0,5 mg/kg/día durante 7 días consecutivos o de 0,5 mg/kg/día el primer día (día 0) y 1 mg/kg/día los días 1-6 (Canva-Delcambre *et al.*, Aliment Pharmacol Ther 10 (5): 721-7, 1996).

50 - en la prevención del rechazo de aloinjertos, se describió una modificación de los parámetros biológicos, que indicaba una acción de B-F5 *in vivo* a una dosis de 30 mg/día. Sin embargo, se notificó que la biodisponibilidad de B-F5 no era suficiente para permitir su uso para la profilaxis del rechazo de aloinjertos (Dantal *et al.* Transplantation, 27; 62 (10): 1052-6, 1996).

55 Por lo anterior, parece ser que un primer aspecto a resolver es la necesidad de usar dosis altas de mAb para obtener una mejora clínica. Esto se puede producir, entre otras cosas, por la mala accesibilidad al mAb por los linfocitos en los tejidos diana. El uso de dosis mayores puede dar como resultado una acción excesiva sobre linfocitos sanguíneos, induciendo efectos secundarios indeseados.

60 Otra desventaja de la terapia con anticuerpos monoclonales en seres humanos es que estos anticuerpos se obtienen generalmente a partir de células de ratón y provocan respuestas anti-ratón en los destinatarios humanos. Esto no solamente da como resultado una menor eficacia del tratamiento e, incluso, de cualquier tratamiento futuro con anticuerpos monoclonales de ratón, sino también un riesgo incrementado de anafilaxis.

65 En principio, esta desventaja se puede evitar mediante el uso de anticuerpos humanizados, obtenidos injertando las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo monoclonal de ratón, que determinan la especificidad de unión a antígeno, en las regiones marco (FR) de una molécula de inmunoglobulina humana. El objetivo de

ES 2 369 982 T3

la humanización es obtener un anticuerpo recombinante que tenga las mismas propiedades de unión a antígeno que el anticuerpo monoclonal de ratón del que se han obtenido las secuencias CDR y mucho menos inmunogénico en seres humanos.

5 En algunos casos, la sustitución de las CDR del anticuerpo de ratón por las CDR humanas en regiones marco es suficiente para transferir las propiedades de unión a antígeno (que incluyen no solo la especificidad, sino también la afinidad por el antígeno). Sin embargo, en muchos anticuerpos, algunos restos FR son importantes para la unión a antígeno, porque se ponen en contacto directamente con el antígeno en el complejo anticuerpo-antígeno, o porque influyen en la confirmación de las CDR y, por lo tanto, en su comportamiento de unión a antígeno.

10 Por lo tanto, en la mayoría de los casos también es necesario sustituir uno o varios restos marco del anticuerpo de ratón por los restos FR humanos correspondientes. Ya que el número de restos sustituidos tiene que ser tan pequeño como sea posible para evitar reacciones anti-ratón, el problema es determinar qué resto o restos de aminoácidos son críticos para conservar las propiedades de unión a antígeno. Se han propuesto varios métodos para predecir los sitios mas apropiados para la sustitución. Aunque proporcionan principios generales que pueden ser de cierta ayuda en las primeras etapas de humanización, el resultado final varía de un anticuerpo a otro. Por tanto, para un anticuerpo dado, es muy difícil predecir qué sustituciones proporcionarán el resultado deseado.

15 Sin embargo, los inventores han intentado la humanización de B-F5 de ratón y han tenido éxito produciendo B-F5 humanizado (denominado en lo sucesivo en este documento hB-F5) que tiene las mismas propiedades de unión a CD4 que el B-F5 de ratón parental.

20 Además, han observado, sorprendentemente, que hB-F5 tiene un efecto inmunosupresor óptimo *in vivo* a dosis bastante menores que las usadas previamente con B-F5 parental y que las usadas actualmente con otros anticuerpos monoclonales anti-CD4.

25 En realidad, los inventores han observado que hB-F5 proporcionaba una inmunosupresión eficaz, reflejada por un efecto clínico positivo en pacientes con artritis reumatoide, cuando se usó en un tratamiento de 10 días a una dosis tan baja como 1 mg/día y preferentemente a una dosis de 5 mg cada dos días.

30 Como consecuencia, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CD4 humanizado que es capaz de activar linfocitos T reguladores CD4⁺ CD25⁺, donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende una secuencia que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD4 B-F5, donde el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD4 B-F5 tiene regiones V_h y V_k codificadas por la SEC ID N°: 5 y la SEC ID N°: 6. Además, la presente invención proporciona un fragmento de anticuerpo que comprende los dominios V de este anticuerpo anti-CD4 humanizado que es capaz de activar linfocitos T reguladores CD4⁺ CD25⁺, y un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un dominio V de este anticuerpo. La presente invención también proporciona una composición terapéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo, y proporciona el anticuerpo o fragmento de anticuerpo para uso como un medicamento.

35 40 La presente invención proporciona un anticuerpo humanizado (hB-F5) obtenido de MAb B-F5 de ratón, en el que dicho anticuerpo hB-F5 tiene dominios V definidos por las siguientes secuencias polipeptídicas:

45 Dominio V de la cadena H: **EEQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQA
PGKGLEWIGVISVKSSENYGANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCS
AS YYRYDVGAWFAYWGQGLTVTVSS (SEC ID N° 1)**

50 Dominio V de la cadena L: **DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQ
KPGQPPKLLIYLASILESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPWTFG
55 QGTKVEIK (SEC ID N° 2)**

60 Generalmente, un anticuerpo hB-F5 de la invención comprende adicionalmente una región constante humana (Fc). Esta región constante se puede seleccionar entre dominios constantes de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las regiones constantes preferidas se seleccionan entre dominios constantes de IgG, en particular, IgG1.

65 La presente invención también incluye cualquier fragmento de un anticuerpo hB-F5 que comprende las regiones V del mismo. Éste comprende, en particular, fragmentos Fab, Fab', F(ab)₂, Fv y scFv.

ES 2 369 982 T3

La invención también incluye un polinucleótido seleccionado entre:

- un polinucleótido que codifica un polipéptido de la SEC ID N°: 1;
- 5 - un polinucleótido que codifica un polipéptido de la SEC ID N°: 2.

Preferentemente, dicho polinucleótido se selecciona entre:

- 10 - un polinucleótido de la SEC ID N°: 3;
- un polinucleótido de la SEC ID N°: 4.

15 Los polinucleótidos de la invención se pueden obtener fácilmente por los métodos bien conocidos de la tecnología de ADN recombinante y/o síntesis química de ADN.

Un polinucleótido que codifica el dominio V de la cadena H o de la cadena L de un anticuerpo hB-F5 se puede fusionar con un polinucleótido que codifica la región constante de una cadena humana H o L, con el propósito de expresar las cadenas H y L completas obtenidas de este modo; también se puede añadir una secuencia que codifica un péptido señal que permite la secreción de la proteína. Estos polinucleótidos recombinantes también son parte de la invención.

20 La invención también proporciona casetes de expresión en los que un polinucleótido de la invención se une a secuencias de control apropiadas que permiten la regulación de su transcripción y traducción en una célula hospedadora seleccionada, y vectores recombinantes que comprenden un polinucleótido o un casete de expresión de la invención.

Estas construcciones de ADN recombinante se pueden obtener e introducir en células hospedadoras por las técnicas bien conocidas de ADN recombinante e ingeniería genética.

La invención también comprende una célula hospedadora, transformada por un polinucleótido de la invención.

25 Las células hospedadoras útiles dentro del marco de la presente invención pueden ser células procariotas o eucariotas. Entre las células eucariotas adecuadas se mencionarán, a modo de ejemplo, células vegetales, células de levaduras tales como *Saccharomyces*, células de insecto tales como *Drosophila* o *Spodoptera* y células de mamífero tales como HeLa, CHO, 3T3, C127, BHK, COS, etc.

La construcción de vectores de expresión de la invención y la transformación de células hospedadoras se puede realizar por las técnicas convencionales de biología molecular.

30 Se puede obtener un anticuerpo hB-F5 de la invención cultivando una célula hospedadora que contiene un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo, en condiciones adecuadas para la expresión de la misma, y recuperando dicho anticuerpo del cultivo de célula hospedadora.

La presente invención también comprende una composición terapéutica que comprende un anticuerpo hB-F5 de la invención o un fragmento del mismo, como se ha definido anteriormente.

Preferentemente, dicha composición es una composición para administración por vía parenteral, formulada para permitir la administración de una dosis de 0,1 a 10 mg, ventajosamente de 1 a 5 mg de hB-F5.

Más específicamente, la invención incluye el uso de un anticuerpo hB-F5 de la invención o un fragmento del mismo, para preparar una composición inmunosupresora. Dicha composición inmunosupresora es útil, en particular, para el tratamiento o la prevención de enfermedades tales como rechazo de injertos, reacción de injerto contra hospedador o reacción de hospedador contra injerto o enfermedades autoinmunes que incluyen, por ejemplo, miocarditis, diabetes mellitus, psoriasis, lupus eritematoso, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, etc.

Además, los inventores han observado que hB-F5 era capaz de activar un subconjunto particular de células T CD4⁺, concretamente células CD4⁺CD25⁺.

Los linfocitos T reguladores CD25⁺CD4⁺ (células Treg) constituyen el 5-10% de las células T CD4⁺ periféricas. Se describieron por primera vez en 1995 por Sakaguchi *et al.* (J. Immunol., 155: 1151-1164) como células reguladoras en ratones. Cuando están activadas, estas células son capaces de suprimir la activación y proliferación de linfocitos T tanto CD4⁺ como CD8⁺. Más adelante, también se han encontrado linfocitos T supresores CD25⁺CD4⁺ en seres humanos (Jonuleit *et al.*, J. Exp. Med. 193, 1285-1294, 2001; Levings *et al.*, J. Exp. Med. 193, 1295-1302, 2001; Dieckmann *et al.*, J. Exp. Med. 193, 1303-1310 2001). Se han publicado numerosos artículos que describen el papel inmunosupresor de estas células en diferentes modelos de enfermedad autoinmune y en sistemas *in vitro* (para una revisión, véase, por

ES 2 369 982 T3

ejemplo, Shevach, J. Exp. Med., 193, 11, 41-46, 2001). También se ha demostrado que las células Treg CD4⁺CD25⁺ activadas *ex vivo* son eficaces en la prevención de la enfermedad de injerto contra hospedador (Taylor *et al.*, Blood, 99, 3493-3499, 2002; Cohen *et al.*, J. Exp. Med. 196, 401-406, 2002; Hoffmann *et al.*, J. Exp. Med. 196, 389-399, 2002). Por tanto, la proporción de medios para la activación de células Treg CD4⁺CD25⁺ es de gran interés.

5

La invención también se refiere al uso del anticuerpo hB-F5 de la invención, o del anticuerpo parental B-F5, para activar linfocitos T reguladores CD25⁺CD4⁺ *in vitro*.

Preferiblemente, el anticuerpo hB-F5 de la invención se añade a los linfocitos T reguladores CD25⁺CD4⁺ a una concentración de 1 µg/ml a 10 µg/ml.

La presente invención se ilustrará adicionalmente por la siguiente descripción adicional, que se refiere a ejemplos que ilustran las propiedades de anticuerpos hB-F5 de la invención. Sin embargo, se debe entender que estos ejemplos solamente se muestran a modo de ilustración de la invención y no constituyen de ningún modo una limitación de la misma.

15

Ejemplo 1

Construcción de B-F5 humanizado

20

Diseño de Regiones V_H y V_K de B-F5 Humanizado

Las secuencias de ADN que codifican regiones V_H y V_K de B-F5 de ratón se muestran respectivamente en la Figura 1 y la Figura 2 y con los identificadores de secuencia SEC ID N°: 5 y SEC ID N°: 6. La V_H y V_K humanas sobre las que se injertaron las CDR de ratón se seleccionaron buscando en bases de datos V_H humanas más parecidas a las V_H y V_K de B-F5 originales de ratón. La región V_H de un anticuerpo humano (M26; Número de Acceso A36006) tenía la mayor homología con V_H de B-F5. La región V_K de otro anticuerpo humano (FK-001; NAKATANI *et al.*, Biotechnology, 7 (1989), 805-810) tenía la mayor homología con V_K de B-F5.

25

Se construyeron dos tipos de V_K que diferían entre ellos en que el 4° resto era leucina o metionina y se denominaron L4L y L4M. Se construyeron dos tipos de V_H que diferían entre ellos en que el 37° resto de aminoácido era leucina o valina y se denominaron H37L y H37V. El alineamiento de las secuencias polipeptídicas de B-F5, FK-001, L4L y L4M se muestra en la Figura 3. El alineamiento de las secuencias polipeptídicas de B-F5, M26, H37L y H37V se muestra en la Figura 4. Los restos de FR de los que se ha descrito previamente que son importantes para el empaquetamiento de las CDR (Chothia *et al.*, Nature, 342(1989), 8777; Foote *et al.*, J. Mol. Biol., 224(1992), 487) están encuadrados.

30

35

Combinando estas V_H y V_K se diseñaron 4 versiones de regiones V.

40

Expresión de B-F5 humanizado

Las etapas posteriores para la producción de B-F5 humanizado fueron las mismas que las descritas en la Patente de Estados Unidos N° 5.886.152 para B-B10 humanizado.

En resumen, se construyeron por separado plásmidos de expresión para la cadena H (región humanizada de V_H fusionada con la región constante de una cadena γ-1 humana (TAKAHASHI *et al.*, Cell, 29 (1982), 671-679)) y la cadena L (región humanizada de V_K fusionada con la región constante de la cadena κ de FK-001) de B-F5 humanizado. En estos plásmidos, la expresión de B-F5 humanizado se dirige por el promotor/potenciador del gen de IgM monoclonal humana, FK-001. Las Figuras 5 y 6 muestran respectivamente los fragmentos de los plásmidos que codifican las regiones V_H y V_K de BF-5 humanizado. Las secuencias que codifican la región V están subrayadas y las secuencias polipeptídicas correspondientes se indican sobre la secuencia de nucleótidos. Ambos plásmidos y pSV2neo se introdujeron simultáneamente en Sp2/0 de mieloma de ratón (ATCC CRL-1581) usando Lipofectin™. Los transfectomas que producían IgG humano se seleccionaron por ELISA, usando un anticuerpo anti-IgG humano (cadena γ) y un anticuerpo anti-cadena κ de Ig humana.

55

Ejemplo 2

Caracterización de las diferentes versiones de B-F5 humanizado

60

Estimación de la actividad de unión a CD4

Se recogieron y concentraron los sobrenadantes de cultivo de transfectomas que producían las cuatro versiones de hB-F5. Los diferentes anticuerpos se purificaron de los sobrenadantes del cultivo por cromatografía de afinidad usando proteína A Sepharose y se evaluaron para su actividad de unión a CD4 por medición, mediante ELISA competitivo, de sus actividades inhibitorias frente a la unión de mB-F5 biotinilado a CD4 soluble aplicado como recubrimiento sobre placas de microtitulación. El tiempo de incubación es de 2 horas a 37°C y durante una noche a 4°C.

65

ES 2 369 982 T3

Las actividades de unión relativa de los hB-F5 (la actividad de unión de mB-F5 se tomó como el 100%) se muestran en la siguiente Tabla I.

TABLA I

Anticuerpo	Temp. (°C)	Actividad de unión relativa (% de mB-F5)
H37L/L4L	4	30
	37	80
H37L/L4M	4	80
	37	30
H37V/L4L	4	10-20
	37	10
H37V/L4M	4	10-20
	37	10

A partir de los resultados mostrados en la Tabla I, parece que el 37° resto de V_H, Leucina, es crítico para mantener la actividad de unión a CD4 de hB-F5 debido a que la actividad de unión a CD4 se reduce varias veces por conversión de ³⁷Leu en ³⁷Val. Por el contrario, se observa que el 4° resto de V_K no es tan importante para la actividad de unión a CD4. Ya que la diferencia estructural entre ³⁷Leu y ³⁷Val de V_H no esta demostrada claramente por modelado molecular, la superioridad de H37L con respecto a H37V en la actividad de unión a CD4 fue inesperada.

Se seleccionaron H37L/L4L y H37L/L4M para evaluar las actividades biológicas *in vitro*.

Investigación de las actividades biológicas in vitro de B-F5 humanizado

Se evaluaron las actividades biológicas *in vitro* de B-F5 de ratón y B-F5 humanizados (IgG1 H37L/L4M e IgG1 H37L/L4L). También se ensayaron los B-F5 humanizados de tipo IgG2 (IgG2 H37L/L4M e IgG2 H37L/L4L).

Se evaluaron las actividades biológicas *in vitro* de mB-F5 y los cuatro tipos de hB-F5 usando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos. Las PBMC se activaron por ConA (2,5 µg/ml, 3 días) o PPD (10 µg/ml, 4 días) en presencia de B-F5 murino o hB-F5 y se controlaron con respecto a sus respuestas proliferativas por incorporación de ³H-timidina.

Los resultados se muestran en las Figuras 7 y 8. Los B-F5 murinos y hB-F5 podían inhibir de forma moderada la proliferación inducida por ConA, pero las actividades variaban de anticuerpo a anticuerpo y/o de donante a donante (Figura 7). Además, los B-F5 murinos y hB-F5 eran capaces de inhibir la proliferación de PBMC específica de Ag inducida por PPD (Figura 8).

El tipo IgG1 de hB-F5 inhibió la proliferación inducida por PPD de forma mas eficaz (hasta el 70% de inhibición, Figura 7 y 8) que el mB-F5. El tipo IgG1 parecía ser más eficaz que el tipo IgG2, del cual la actividad inhibidora era prácticamente la misma que la de mB-F5. Para el tipo IgG1, H37L/L4M fue más eficaz que H37L/L4L. El tipo IgG2 de H37L/L4M y H37L/L4L tenía casi las mismas actividades inhibidoras. En resumen, las actividades inhibidoras de B-F5 frente a la proliferación de PBMC inducida por PPD fueron las siguientes: IgG1 H37L/L4M > IgG1 H37L/L4L > IgG2 H37L/L4M = IgG2 H37L/L4L = mB-F5.

Considerando la eficacia de la actividad biológica *in vitro* y el menor número de aminoácidos de ratón, se seleccionó IgG1 de H37L/L4M para evaluación posterior.

Ejemplo 3

Evaluación preliminar del efecto de hB-F5 sobre pacientes con artritis reumatoide (RA)

El efecto de hB-F5 (IgG1 H37L/L4M) se ensayó en pacientes con RA.

Las condiciones del ensayo fueron las siguientes:

Cada paciente recibió un tratamiento de 10 días que consistía en 5 inyecciones de 5 mg de hB-F5 (una inyección cada 2 días).

ES 2 369 982 T3

Los resultados para 3 pacientes diferentes se muestran en las siguientes Tablas II-IV:

Paciente 1 (Tabla II):

Diagnóstico: Artritis Reumatoide; Actividad 2
 Factor Reumatoide: 2; Estadio: 2
 Sexo: F; Edad: 65; Aparición de la enfermedad: 1965
 Terapia adicional: Diclofenaco 150 mg/día

TABLA II

Investigaciones clínicas	Antes del tratamiento	Durante el tratamiento (días)					Después del tratamiento (semanas)
		2	4	6	8	10	4
Estimación de dolor en articulaciones (0-10)	4,5	2	2	1,5	3	2,2	3,5
Rigidez matutina en minutos	360	0	0	90	90	120	20
Gravedad de la afección (1-5)	Médico	3	3	2,5	3	3	3
	Paciente	3	3	3	3	3	3
Numero de articulaciones hinchadas	6	6	4	3	2	2	7
Numero de articulaciones doloridas	25	12	6	7	13	13	23
Índice de hinchamiento (0-30)	8	6	4		2	3	9
Potencia en mano	Derecha	17	15	20	22	12	20
	Izquierda	10	10	15	12	19	12
Estimación del cansancio (0-10)	7,7	4	2,3	2	2,3	3,1	3
Estimación de efectos de tratamiento	Paciente	3	3	4	3	5	2
	Médico	3	3	4	3	5	2
Velocidad de sedimentación de eritrocitos	3,5					34	25
Proteína C reactiva	4,0					2	2,5

Paciente 2 (Tabla III):

Diagnóstico: Artritis Reumatoide; Actividad 3
 Factor reumatoide: 2; Estadio: 2
 Sexo: F; Edad: 48; Aparición de la enfermedad: 2000
 Terapia adicional: Diclofenaco 150 mg/día

TABLA III

Investigaciones clínicas	Antes del tratamiento	Durante el tratamiento (días)					Después del tratamiento (semanas)
		2	4	6	8	10	4
Estimación de dolor en articulaciones (0-10)	8,2		8,2	5	2,9	2,2	0,6
Rigidez matutina en minutos	240		120	120	60	20	10
Gravedad de la afección (1-5)	Médico	4	3	3	3	3	2
	Paciente	4	4	3	3	3	2
Numero de articulaciones hinchadas	13		12	11	11	5	5
Numero de articulaciones doloridas	22		22	16	15	13	7
Índice de hinchamiento (0-30)	15		14	12	11	5	5
Potencia en mano	Derecha	30	30	28	34	36	40
	Izquierda	22	20	18	18	22	28
Estimación del cansancio (0-10)	8,7		5,1	2,2	2,2	1,1	0,7
Estimación de efectos de tratamiento	Paciente		2	4	4	4/5	5
	Médico		2	2	3	4/5	5
Velocidad de sedimentación de eritrocitos	35					38	35
Proteína C reactiva	1,2					0,2	0,8

ES 2 369 982 T3

Paciente 3 (Tabla IV):

Diagnóstico: Artritis Reumatoide; Actividad 3

Factor reumatoide: 3; Estadio: 2

Sexo: F; Edad: 49; Aparición de la enfermedad: 1989

Terapia adicional: Diclofenaco 150 mg/día

TABLA IV

Investigaciones clínicas	Antes del tratamiento	Durante el tratamiento (días)						Después del tratamiento (semanas)	
		2	4	6	8	10	1	2	
Estimación de dolor en articulaciones (0-10)	7,9	7,6	7,6	7,2	5,0	3,0	1,5	1,3	
Rigidez matutina en minutos	360	0	0	0	0	0	0		
Gravedad de la afección (1-5)	Medico	4	3	3	3	3	2	2	
	Paciente	5	4	4	3		3	2	
Numero de articulaciones hinchadas	10	7	7	6	5	5	5	5	
Numero de articulaciones doloridas	30	24	24	15	11	11	10	9	
índice de hinchamiento (0-30)	15	12	12	9	7	7	6		
Potencia en mano	Derecha	24	30	30	36	48	48	50	50
	Izquierda	24	30	30	38	40	34	40	42
Estimación de cansancio (0-10)	8,5	7,2	5,2	0	0	0	0	0	
Estimación de efectos de tratamiento	Paciente		3	3	3		5	5	5
	Médico		3	4/3	4	4	5	5	5
Velocidad de sedimentación de eritrocitos	61		53	42	45			41	
Proteína C reactiva	8				3,7			3,3	

Ejemplo 4

Activación de células Treg CD4+CD25+ por hB-F5

Aislamiento de linfocitos T

1) Linfocitos T reguladores (Treg):

- Se aíslan células CD25+ usando microperlas de CD25;
- Reducción de contaminaciones: se preparan células positivas CD14⁻, CD8⁻, CD19⁻ con DYNALbeads CD14/CD8/CD19;
- La reducción de células CD45RA⁺ se realiza con mAb CD45RA + DYNALbeads anti-ratón: pureza: > 95% Treg CD4+CD25+

2) Células Efectoras

- Se aíslan células T CD4+ usando microperlas de CD4
- La reducción de células CD45RO⁺ se realiza con CD45RO + mAb + DYNALbeads anti-ratón; pureza: > 98% CD4/CD45RA⁺, linfocitos T CD25-efectores.

3) Sistema de ensayo

Se cultivan conjuntamente Treg CD25+ del donante A durante 2 días con PBMC con reducción de CD2 singénicas sin adiciones (control negativo = sin activación = sin actividad supresora) o en presencia de 0,5 µg/ml de anti-CD3 (OKT-3 = control positivo = activación completa de Treg) o en presencia de 5 µg/ml o 30 µg/ml de hB-F5.

ES 2 369 982 T3

Después de un lavado exhaustivo de las células precultivadas, se aíslan y se tratan las células Treg CD25+ por radiación γ (3000 rad).

4) Ensayo de actividad supresora:

Se cultivan conjuntamente células Treg CD25+ precultivadas durante 4 días con linfocitos T efectores CD4+ recién aislados (1:1) del donante B en presencia de APC (PBMC con reducción de CD2) del donante A (singénicas para linfocitos T precultivados (sin activación adicional) alogénicos para linfocitos T efectores (= reacción mixta de linfocitos alogénicos)). Después, las células se incuban durante 16 h con ³H-timidina y se detecta la proliferación de linfocitos T efectores.

Los resultados se muestran en la Figura 9.

Leyenda de la Figura 9:

- control negativo (sin activación) = preCD25;
- 0,5 μ g/ml de OKT-3 (control positivo, activación completa) = preCD25-CD3;
- 5 μ g/ml de hB-F5 (Ensayo 1) = preCD25-CD4
- 30 μ g/ml de hB-F5 (Ensayo 2) = preCD25-CD4.

Cláusulas

1) Un anticuerpo humanizado (hB-F5) derivado de anticuerpo B-F5 monoclonal anti-CD4 de ratón, teniendo dicho anticuerpo humanizado (hB-F5) un dominio V definido por las siguientes secuencias polipeptídicas:

Dominio V de la cadena H: **EEQLVESGGGLVKGSSLRRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQA
PGKGLEWIGVISVKSENYGANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLMNSLKTEDTAVYYCS
AS YYRYDVGAWFAYWGQGLTVVSS (SEC ID N° 1)**

Dominio V de la cadena L: **DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYWYQQ
KPGQPPKLLIYLASILESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRELPWTFG
QGTKVEIK (SEC ID N° 2)**

2) Un fragmento de un anticuerpo hB-F5 de la cláusula 1, donde dicho fragmento comprende el dominio V de la SEC ID N°: 1 y de la SEC ID N°: 2.

3) Un polinucleótido seleccionado entre:

- un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el dominio V de cadena H de la SEC ID N° 1;
- un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el dominio V de cadena L de la SEC ID N°: 2.

4) Un polinucleótido de acuerdo con la cláusula 3 que se selecciona entre:

- un polinucleótido que comprende la secuencia SEC ID N°: 3;
- un polinucleótido que comprende la secuencia SEC ID N°: 4.

5) Una composición terapéutica que comprende un anticuerpo humanizado de la cláusula 1, o un fragmento de la cláusula 2.

6) El uso de un anticuerpo humanizado de la cláusula 1, o un fragmento de la cláusula 2, para preparar una composición inmunosupresora.

7) El uso de un anticuerpo humanizado de la cláusula 1, para activar linfocitos T reguladores CD25+CD4+ *in vitro*.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo anti-CD4 humanizado que es capaz de activar los linfocitos T reguladores CD4⁺ CD25⁺, donde el anticuerpo anti-CD4 humanizado comprende una secuencia que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo B-F5 monoclonal anti-CD4 de ratón, donde el anticuerpo B-F5 monoclonal anti-CD4 de ratón tiene regiones V_h y V_k codificadas por la SEC ID N° 5 y la SEC ID N° 6.
- 10 2. Un anticuerpo anti-CD4 humanizado de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo se obtiene a partir de un anticuerpo B-F5 monoclonal anti-CD4 de ratón que tiene regiones V_h y V_k codificadas por la SEC ID N°: 5 y la SEC ID N° 6.
- 15 3. Un fragmento de anticuerpo que comprende dominios V del anticuerpo anti-CD4 humanizado de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que es capaz de activar los linfocitos T reguladores CD4⁺ CD25⁺.
4. Un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica un dominio V de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 20 5. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4.
6. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5.
7. Una composición terapéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, o el fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3.
- 25 8. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o un fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3 para su uso como un medicamento.
9. Un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 8 para el tratamiento o prevención de rechazo de injertos, reacción del injerto contra hospedador o reacción del hospedador contra injerto.
- 30 10. Un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 8 para el tratamiento o prevención de enfermedades autoinmunes.
- 35 11. Un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 10 en el que la enfermedad autoinmune es miocarditis, diabetes tipo I, psoriasis, lupus eritomatoso, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, colitis ulcerosa o dermatitis atópica.
- 40 12. Uso de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 3, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de rechazo de injertos, reacción de injerto contra huésped o reacción de huésped contra injerto.
- 45 13. Uso de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 3, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de enfermedades autoinmunes.
14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13 en el que la enfermedad autoinmune es miocarditis, diabetes tipo I, psoriasis, lupus eritomatoso, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, colitis ulcerosa o dermatitis atópica.
- 50 15. Uso de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o un fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, para activar *in vitro* linfocitos T reguladores CD4⁺ CD25⁺.

55

60

65

ES 2 369 982 T3

mB-E5 V_B :

CAG GAA TAC CTT GTG GAG ACC GGG GGA GGC TTG GTG AGG CCT GGA AAT TCT CTG AAA
CTC TCC TGT GTC ACC TCG GGT TTC AGT TTC AGT GAC TGC OGG ATG TAC TGG CTT CGC
CAG CCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGT GTG ATT TCA GTC AAA TCT GAG AAT
TAT GGA GCA AAT TAT GCA GAG TCT GTG AGG GGC AGA TTC ACT ATT TCA AGA GAT GAT
TCA AAA AGC AGT GTC TAT CTG CAG ATG AGC AGA TTG AGA GAG GAA GAC ACT GCC ACT
TAT TAT TGT AGT GCC TCC TAT TAT AGG TAC GAC GTG GGG GCC TGG TTT GCT TAC TGG
GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA

Figura 1

ES 2 369 982 T3

mB-F5 V_R :

GAC ATT GTG CTG ACA CAG TCT CCT TCT TCC TTA GTT GTA TCT CTG GGG CAG AGG GCC
ACC ATC TCA TGC AGG GCC AGC AAA AGT GTC AGT ACA TCT GGC TAC AGT TAT ATA TAT
TGG TAC CAA CAG ATC CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT CTT GCA TCC ATC
CTA GAA TCT GGG GTC CCT GGC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC
CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAC AGT
AGG GAA CTT CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAG ATC AAA CGG GCT GAT
GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA TCC AGT GAG CA

Figura 2

ES 2 369 982 T3

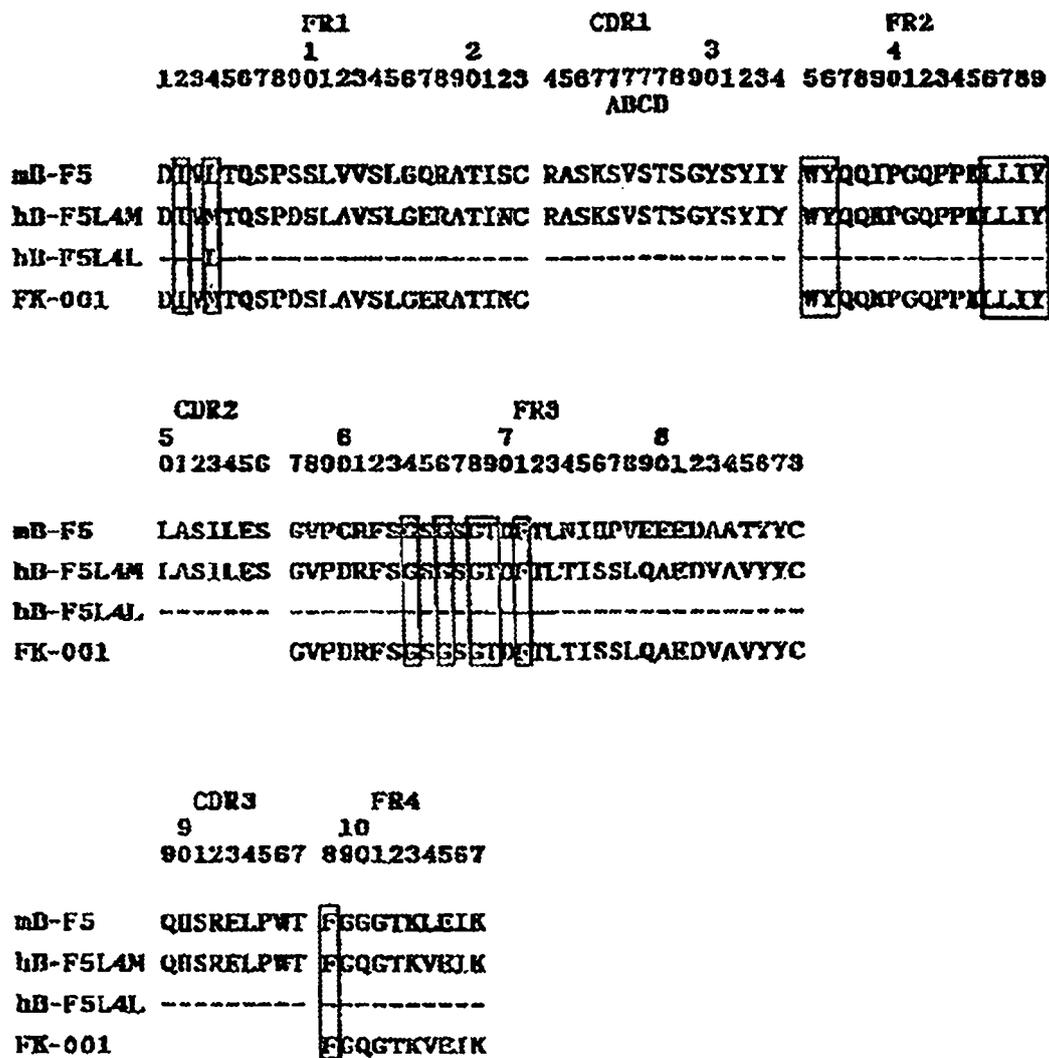


Figura 3

ES 2 369 982 T3

GA GGA GCT CCA GAC AAT GTC TGT CTC CTT CCT CAT CTT CCT GCC CGT GCT GGG CCT
CCC ATG GGG TCA GTG TCA GGG AGA TGC CGT ATT CAC AGC AGC ATT CAC AGA CTG AGG
GGT GTT TCA CTT TGC TGT TTC CTT TTG TCT CCA GGT GTC CTG TCA GAG GAA CAG CTT
E E Q L
GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTG AAA CCC GGA GGT TCT CTG AGG CTC TCC TGT GCA
V E S G G G L V K P G G S L R L S C A
GCC TCG GGT TTC AGT TTC AGT GAC TGC GGG ATG TAC TGG GTT CGC CAG GCT CCA GGG
A S G F S F S D C R M Y W V R Q A P G
AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGT GTG ATT TCA GTC AAA TCT GAG AAT TAT GGA GCA AAT
K G L E W I G V I S V K S E N Y G A N
TAT GCA GAG TCT GTG AGG GGC AGA TTC ACT ATT TCA AGA GAT GAT TCA AAA AAC ACG
Y A E S V R G R F T I S R D D S K N T
GTC TAT CTG CAG ATG AAC AGC TTG AAG ACC GAA GAC ACT GCC GTT TAT TAT TGT AGT
V Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C S
GCC TCC TAT TAT AGG TAC GAC GTG GGG GCC TGG TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT
A S Y Y R Y D V G A W F A Y W G Q G T
CTG GTC ACT GTC TCT TCA GGT AAG AAT GGC CAA GCT TG
L V T V S S

Figura 5

ES 2 369 982 T3

GGA GGA TCC AAT TAT CTG CTG ACT TAT AAT ACT ACT AGA AAG CAA ATT TAA ATG ACA
TAT TTC AAT TAT ATC TGA GAC AGC GTG TAT AAG TTT ATG TAT AAT CAT TGT CCA TTC
CTG ACT ACA GGT GCC TAC GGG GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCA GAC TCC CTG GCT
D I V M T Q S P D S L A
GTG TCT CTG GGC GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC AGG GCC AGC AAA AGT GTC AGT ACA
V S L G E R A T I N C R A S K S V S T
TCT GGC TAC AGT TAT ATA TAT TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG
S G Y S Y I Y W Y Q Q K P G Q P P K L
CTC ATT TAC CTT GCA TCC ATC CTA GAA TCT GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC
L I Y L A S I L E S G V P D R F S G S
GGG TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT GTG GCA
G S G T D F T L T I S S L Q A E D V A
GTT TAT TAC TGT CAG CAC AGT AGG GAA CTT CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG
V Y Y C Q H S R E L P W T F G Q G T K
GTG GAA ATC AAA CGT GAG TAG AAT TTA AAT TTT AAG CTT CTT
V E I K

Figura 6

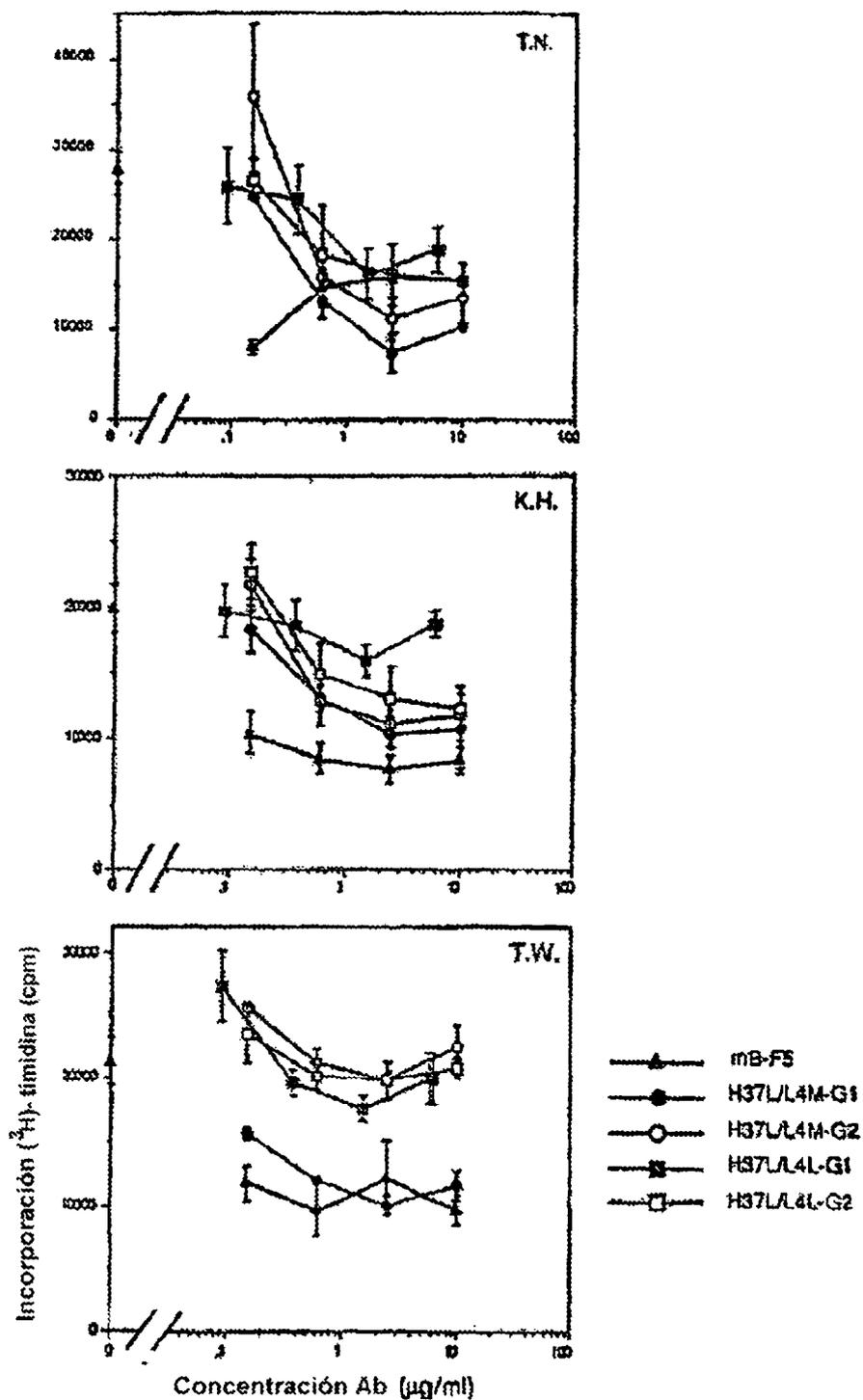


Figura 7

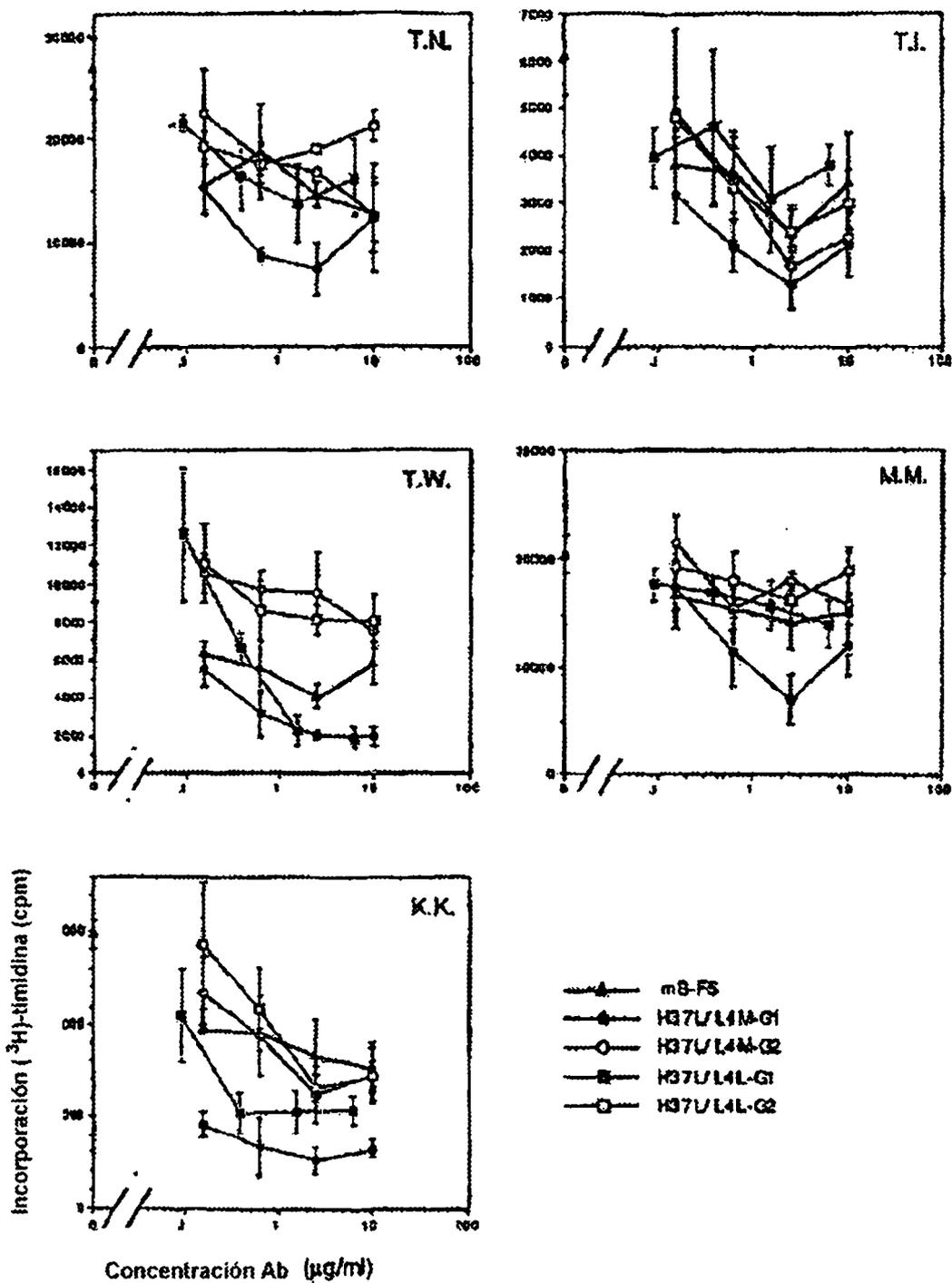


Figura 8

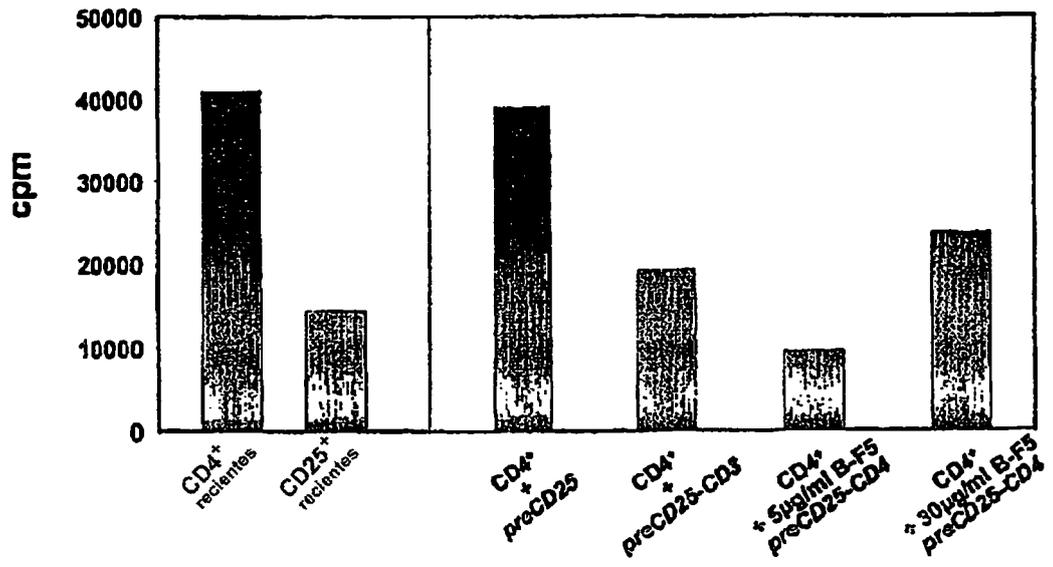


Figura 9

ES 2 369 982 T3

<400> 4

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 5 atcaactgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct acagttatat atattggtac 120
 cagcagaaac caggacagcc tcctaagctg ctcatttacc ttgcatccat cctagaatct 180
 ggggtccctg accgattcag tggcagcggg tctgggacag atttactct caccatcagc 240
 10 agcctgcagg ctgaagatgt ggcagtttat tactgtcagc acagtaggga acttccgtgg 300
 acgttcggcc aagggaccaa ggtggaaatc aaacgt 336

15 <210> 5

<211> 372

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

20

<400> 5

caggaatacc ttgtggagac cgggggaggc ttggtgaggc ctggaaattc tctgaaactc 60
 25 tcctgtgtca cctcgggttt cagtttcagt gactgccgga tgtactggct tcgccagcct 120
 ccagggaaagg ggctggagtg gattggtgtg atttcagtca aatctgagaa ttatggagca 180
 aattatgcag agtctgtgag gggcagattc actatttcaa gagatgattc aaaaagcagt 240
 30 gtctatctgc agatgagcag attgagagag gaagacactg ccacttatta ttgtagtgcc 300
 tcctattata ggtacgacgt gggggcctgg tttgcttact ggggccaagg gactctggtc 360
 35 actgtctctg ca 372

<210> 6

<211> 383

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

40

<400> 6

gacattgtgc tgacacagtc tccttcttcc ttagttgtat ctctggggca gagggccacc 60
 atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct acagttatat atattggtac 120
 50 caacagatcc caggacagcc acccaaaactc ctcatctatc ttgcatccat cctagaatct 180
 ggggtccctg gcaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga acttccgtgg 300
 55 acgttcggtg gaggcaccaa gctggagatc aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc 360
 atcttccac catccagtga gca 383

60

65