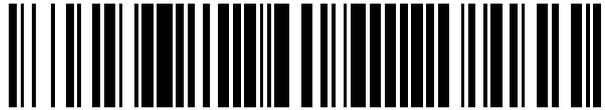


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 287**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02804143 .2**

96 Fecha de presentación: **29.10.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1451224**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.09.2004**

54 Título: **Péptido o proteína que contiene un bucle C'-D de la familia de receptores de la CD28**

30 Prioridad:

04.12.2001 DE 10160516
10.01.2002 DE 10200714

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

07.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

07.12.2012

73 Titular/es:

THERAMAB LLC (100.0%)
8 STR. 1 NAUCHNY PROEZD
MOSCOW 117246, RU

72 Inventor/es:

HÜNIG, THOMAS;
LÜHDER, FRED y
HANKE, THOMAS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 392 287 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

Péptido o proteína que contiene un bucle C'-D de la familia de receptores de la CD28.

5 Sector del invento

El invento se refiere a una proteína o un péptido que contiene una secuencia parcial de un miembro de la familia de la CD28, a un ácido nucleico que codifica un tal péptido, a un plásmido que contiene un tal ácido nucleico, a células de hibridoma, que producen anticuerpos monoclonales (mAb's), que se unen a un tal péptido, a unos mAb's obtenibles a partir de tales células de hibridoma así como a unas utilizaciones del péptido y de los mAb's.

Definiciones:

15 Por el concepto de "anticuerpos monoclonales" se designa a unos anticuerpos, que son producidos por linajes de células híbridas (los denominados hibridomas), que han resultado típicamente mediante una fusión de una célula B que produce anticuerpos, de procedencia animal o humana, con una adecuada célula tumoral de mieloma.

La secuencia de aminoácidos de una CD28 humana se conoce bajo el n° de acceso (en inglés "Accession No.") NM_006139.

20 La secuencia de aminoácidos de una CTLA-4 humana se conoce bajo el n° de acceso L15006.

La secuencia de aminoácidos de una ICOS humana se conoce bajo el n° de acceso AJ277832.

25 La secuencia de aminoácidos de una PD-1 humana se conoce bajo el n° de acceso U64863.

El bucle (del inglés loop) C'-D de una C28 abarca los aminoácidos 52 hasta 66 de la precedente secuencia de la CD28 (numeración de acuerdo con la Fig. 7, véase también la cita de Ostrov, D.A., y colaboradores; Science (2000), 290:816-819). Por el concepto del "bucle C'-D" se han de entender en lo sucesivo también unas arbitrarias secuencias parciales de éste.

35 Un bucle o respectivamente un sitio de unión dispuesto dentro de éste es libremente accesible cuando para un partícipe definido en la unión no se presenta ningún impedimento estérico para el sitio de unión en el bucle por medio de las secuencias o moléculas que siguen al bucle.

Por el concepto de "activación de linfocitos T" se designa a la multiplicación de la actividad metabólica, al aumento del volumen celular, a la síntesis de moléculas importantes inmunológicamente y a la entrada en la división celular (proliferación) de linfocitos T al recibir una incitación externa. Una inhibición constituye el proceso opuesto a esto. Por ejemplo, tales procesos son provocados por ocupación de la molécula de CD28 en células T por medio de unos anticuerpos monoclonales especiales específicos para una CD28. La activación de linfocitos T con los fenómenos acompañantes descritos es una parte de la reacción inmunitaria fisiológica, pero ésta puede quedar allí fuera de control en situaciones patológicas (enfermedades linfoproliferativas), o ser insuficiente (inmunodeficiencia).

45 Por el concepto de "modulación de la proliferación de células T" se entiende o bien el refuerzo de la activación (en el caso de una activación patológicamente insuficiente) o un debilitamiento o respectivamente una inhibición de la activación (en el caso de enfermedades patológicamente linfoproliferativas).

50 Por el concepto de "varios subconjuntos de células T" se entienden por lo menos los subconjuntos de células T CD4 y CD8.

Un péptido análogo es un péptido, cuya secuencia de aminoácidos se desvía de la del péptido, con respecto del que él es análogo, pero que une a un partícipe definido en la unión con una afinidad por lo menos igual. Unas desviaciones en la secuencia pueden ser supresiones, sustituciones, inserciones y elongaciones. Un péptido análogo tendrá por regla general una estructura (parcial) terciaria y/o una exposición dentro del marco de una proteína (de la superficie celular) muy similares a las del péptido, y por lo demás sólo necesita tener un sitio de unión para el partícipe definido en la unión, en la región análoga a la región de unión inmediata del péptido, o formar a éste.

60 Un compuesto mimético de un mAb es una estructura química natural o sintética, que en un ensayo de unión se comporta como un mAb definido, que es mimetizado por el compuesto mimético.

Un compuesto mimético de un bucle C'-D es una estructura química natural o sintética, a la que se unen específicamente unos mAb's superagonistas y que son específicos para un miembro de la familia de la CD28.

65 El concepto de los "mAb's" abarca, junto a las estructuras con la constitución Fab/Fc usual, también unas estructuras que se componen exclusivamente del fragmento Fab. También es posible aprovechar solamente la región variable,

estando unido el fragmento de las cadenas pesadas con el fragmento de la cadena ligera de un modo adecuado, por ejemplo también mediante unas moléculas de puente sintéticas, de tal manera que las regiones de unión de las cadenas formen el sitio de unión de los anticuerpos. El concepto de los "anticuerpos" abarca también unos anticuerpos quiméricos (completos) así como humanizados.

Por el concepto de "la modulación superagonista de la proliferación de células T" se entiende que no es necesaria ninguna estimulación concomitante, es decir que, junto a una unión de un mAb o de un compuesto mimético con un miembro de la familia de la CD28, no es necesario ningún otro suceso adicional de unión para la estimulación o inhibición de la proliferación.

Un procedimiento de escrutinio (en inglés screening) abarca el empleo de una diana (en inglés target), por ejemplo de una secuencia parcial procedente de la CD28, siendo puestas en contacto con la diana una o varias sustancias conocidas o desconocidas, y siendo comprobado o no un suceso de unión. En el caso de la comprobación de un suceso de unión, se selecciona la sustancia. En el caso del empleo de una mezcla de sustancias, a una selección de la mezcla le sigue típicamente una desconvolución con el fin de efectuar la determinación de los componentes que se unen en la mezcla seleccionada.

Por el concepto de "familia de la CD28" se designa a un conjunto de receptores de la superficie de células T, que tienen una actividad inmunoreguladora. Ésta puede ser o bien estimuladora, tal como en el caso de la CD28 o inhibidora, tal como en el caso de la CTLA-4. A la familia de la CD28 pertenecen la CD28, la CTLA-4, la PD-1 e ICOS.

Un sustrato puede ser soluble, insoluble y/o estar inmovilizado. Un sustrato puede estar formado a base de arbitrarias moléculas naturales o sintéticas, entre otras cosas, a base de cadenas de aminoácidos. Por lo tanto, una proteína o un péptido en la terminología de este texto no tiene que ser necesariamente una proteína o un péptido en la definición usual. Por regla general, una proteína o un péptido, de acuerdo con la terminología aquí utilizada, es no obstante también una proteína o un péptido en la terminología usual en la especialidad.

Antecedentes del invento y estado de la técnica

Para la comprensión del invento son importantes en primer lugar los siguientes antecedentes tecnológicos. La activación de células T en reposo para la proliferación y la diferenciación funcional requiere primeramente la ocupación de dos estructuras superficiales, de los denominados receptores: 1. del receptor de antígenos, que posee una especificidad diferente de una célula a otra, y que es necesario para el reconocimiento de antígenos, p.ej. de productos víricos de disociación; así como de la molécula de CD28 expresada de igual manera en todas las células T en reposo con la excepción de un subconjunto de las células T de CD8 de un ser humano, la cual se une de un modo natural a unos ligandos situados sobre la superficie de otras células del sistema inmunitario. Se habla de la estimulación concomitante de la reacción inmunológica específica para antígenos por medio de la CD28. En un cultivo de células se pueden recrear estos procesos mediante la ocupación del receptor de antígenos así como de la molécula de CD28 con unos mAb's adecuados. En el sistema clásico de la estimulación concomitante, ni la ocupación del receptor de antígenos ni la de la molécula de CD28 a solas conducen a la proliferación de células T, pero es efectiva la ocupación de los dos receptores. Esta observación se realizó en células T de un ser humano, de un ratón y de una rata.

Por el contrario, se conocen también unos mAb's, que a solas pueden inducir la proliferación de células T. Una tal activación superagonista, es decir independiente de la ocupación del receptor de antígenos, de linfocitos T en reposo, por unos mAb's específicos para una CD28, se observó en los siguientes sistemas: en la cita bibliográfica de Brinkmann y colaboradores, *J. Immunology*, 1996, 156: 4100-4106 se mostró que una muy pequeña proporción (5 %) de los linfocitos T humanos, que llevan el marcador superficial CD45 RO típico para linfocitos T en reposo, es activada por el mAb 9.3, específico para una CD28, que requiere normalmente una estimulación concomitante, al añadir el factor del crecimiento interleucina-2 (IL-2), sin ninguna ocupación del receptor de antígenos. En el trabajo de Siefken y colaboradores, *Cellular Immunology*, 1996, 176: 59-65 se mostró que mediante un mAb específico para una CD28, producido por una vía convencional, es decir mediante inmunización de ratones con células T humanas en un cultivo celular, se puede activar a un subconjunto de células T humanas para la proliferación sin ocupación del receptor de antígenos, cuando una CD28 es ocupada por este mAb, y los mAb's unidos a las células son reticulados adicionalmente unos con otros por otros anticuerpos. Es una característica común de los anticuerpos conocidos hasta ahora el hecho de que sólo es activable una pequeña proporción de las células T.

En el trabajo de Tacke y colaboradores, *Eur. J. Immunol.*, 1997, 27:239-247 se describieron dos especies de anticuerpos monoclonales específicos para una CD28 con diferentes propiedades funcionales: unos mAb's estimuladores concomitantes, que estimulan concomitantemente la activación de células T en reposo solamente en el caso de una ocupación simultánea del receptor de antígenos; y unos mAb's superagonistas, que pueden activar in vitro y en animales de ensayo a linfocitos T de todas las clases para realizar la proliferación sin ninguna ocupación del receptor de antígenos. Los dos mAb's conocidos hasta ahora proceden de una inmunización con unas células, en las que se ha expresado una CD28 de ratas, y son obtenibles mediante unas selecciones diferentes, que están

orientadas a sus respectivas propiedades descritas. Finalmente, a partir de la cita bibliográfica del documento de solicitud de patente internacional WO 98/54225 se conoce otro mAb superagonista, a saber el CMY-2.

5 No obstante, los mAb's superagonistas conocidos hasta ahora no satisfacen todavía en su efecto estimulador los requisitos establecidos en lo que respecta a la intensidad del efecto activador o a la amplitud de las subpoblaciones activadas de linfocitos T, o no tienen la especificidad necesaria para los seres humanos.

10 Unas proteínas que contienen las SEQ ID NO:41 y/o SEQ ID NO:1 se conocen a partir de las siguientes citas bibliográficas: el documento de patente europea EP 0947582 C y el documento WO-0171042 A.

10 Problema técnico del invento

15 El invento se basa en el problema técnico de indicar unos medios, con los que se puedan encontrar unas sustancias superagonistas, que se unan específicamente a uno o varios miembros de la familia de la CD28 y que tengan un efecto estimulador mejorado o inhibidor, así como el de indicar tales sustancias.

El reconocimiento que constituye el fundamento del invento

20 El invento se basa en la investigación de las regiones de unión de unos mAb's superagonistas con la CD28, así como en la interacción, encontrada en el transcurso de estas investigaciones, del bucle C'-D de la CD28, con unos mAb's superagonistas. El invento se basa en el reconocimiento adicional de que una correspondiente región de unión para unos mAb's superagonistas se encuentra en los otros miembros de la familia de la CD28, a saber también allí donde están los bucles C'-D. A partir de este reconocimiento fundamental se derivan diversos aspectos para las enseñanzas técnicas del invento.

25 Principios del invento y formas preferidas de realización

30 Para la resolución de este problema técnico, el invento enseña el objeto de la reivindicación 1. Expresado con otras palabras, el elemento esencial de una proteína o de un péptido conforme al invento es la estructura del bucle C'-D (o de un compuesto análogo a / o mimético de éste), y ciertamente de manera independiente de que junto a ambos lados del bucle estén unidas unas secuencias y de cuáles sean estas secuencias. Sólo es esencial que la estructura del bucle esté lo suficientemente expuesta como para ser ofrecer acceso para unos mAb's superagonistas o para unos compuestos miméticos de éstos y, en el caso de la posibilidad de una unión específica, para no impedir una unión por motivos estéricos. En este contexto, dentro del marco del invento es sorprendente el hecho de que se unen al bucle C'-D todos los mAb's superagonistas, específicos para una CD28, que se han encontrado, mientras que los mAb's específicos para una CD28, que no son superagonistas, no se unen allí. Con un único conjunto de estructuras diana en lo que respecta a su disposición espacial sobre los miembros de la familia de la CD28, son accesibles por consiguiente unas sustancias activas prospectivas contra las más diversas enfermedades.

40 En la forma de realización de un péptido, en particular de un oligopéptido (de 4 - 9 aminoácidos) o de un polipéptido (de 10 - 100 aminoácidos) se prefiere que los extremos de éstos estén unidos en cada caso a un sitio de unión de un sustrato, estando los sitios de unión del sustrato dispuestos espacialmente unos con relación a los otros de acuerdo con los sitios de unión para el bucle C'-D, estando fijado el bucle C'-D o el péptido análogo a éste en una configuración tridimensional de acuerdo con el bucle C'-D, siendo el bucle C'-D unido, o el péptido unido análogo a éste, libremente accesible para anticuerpos, y no siendo el sustrato un miembro de la familia de la CD28 sin ningún bucle C'-D. De esta manera se crea una estructura tridimensional, que hace posible una unión con sustancias superagonistas.

50 En particular, un péptido o una proteína utilizado/a conforme al invento puede contener una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 41 (bucle de CD28 humana), pero no la CD28 humana. A éste/a pueden estar enganchados junto al extremo 3' y/o al extremo 5' uno o varios aminoácidos de acuerdo con la Fig. 7. Sin embargo, también unas secuencias parciales de éste/a pueden estar contenidas en los péptidos conformes al invento, por ejemplo, de acuerdo con la secuencia SEQ ID NO: 1. Las SEQ ID NO: 5 hasta 10 indican unas variantes del bucle de una CD28 humana. Junto a una secuencia 1 pueden estar conectados uno o varios aminoácidos de la secuencia 11 de acuerdo con la Fig. 7a. En el caso de las mencionadas secuencias se trata de unas regiones conformes al invento, a las que se unen específicamente unos mAb's superagonistas. Al efectuar la comparación de las secuencias se reconoce, en particular, que la estructura primaria del bucle es específica para los respectivos miembros de la familia. Mediante una elección del bucle C'-D de un miembro determinado y por consiguiente mediante el empleo de unas sustancias que tienen especificidad para este bucle escogido se puede dar lugar por consiguiente de manera deliberada alternativamente a una activación o inhibición de la proliferación.

65 Una proteína o un péptido conforme al invento (específica/o para una CD28) se puede identificar sometiendo a una/o o varias/os proteínas o péptidos prospectivas/os a un ensayo de unión con uno de los mAb's 9D7 o 5.11A, y seleccionando los péptidos que se unen. En el caso de los mencionados mAb's se trata de unos nuevos mAb's superagonistas, específicos para una CD28, que se describen con detalle en la parte experimental. Mediante unos correspondientes mAb's con especificidad frente a un bucle C'-D de otro miembro de la familia de la CD28, se

pueden identificar unas proteínas, unos péptidos o unos compuestos miméticos conformes al invento, que sean específicas/os para los otros miembros.

5 Además, se describe un ácido nucleico que codifica un péptido utilizado conforme al invento o una proteína que contiene tal péptido, pero que no codifica a ningún miembro de la familia de la CD28, así como un plásmido que contiene un tal ácido nucleico.

10 Un péptido o una proteína conforme al invento se puede emplear en un procedimiento para la producción de mAb's, que modulan de un modo superagonista la proliferación de células T de desde varios hasta todos los subconjuntos, siendo inmunizado un mamífero no humano con el péptido, con la proteína o con el compuesto mimético de ésta/éste, siendo extraídas unas células a partir del mamífero no humano y siendo producidas células de hibridoma a partir de estas células, y siendo seleccionadas las células de hibridoma obtenidas de esta manera con la condición de que en su material sobrenadante del cultivo han de estar contenidos unos mAb's, que se unen al bucle C'-D del péptido o de la proteína, tales células de hibridoma así como unos mAb's obtenibles con tales células de hibridoma.
15 Unos mAb's conformes al invento procedentes de un ser humano se pueden producir alternativamente, no obstante, también seleccionando unos linfocitos B, que se unen al bucle, y clonando sus genes expresados de inmunoglobulinas. Además, unos mAb's humanos conformes al invento se pueden aislar a partir de bibliotecas de fagos. Un experto con experiencia promedia está en la situación con sus conocimientos de realizar sin problemas tales procedimientos, de tal manera que aquí se puede renunciar a una descripción detallada.

20 Con el invento se pueden identificar unos nuevos mAb's superagonistas, que son específicos para las familias de la CD28. Por lo tanto, el invento se refiere también a la utilización de un péptido o de una proteína conforme al invento o de un compuesto mimético de éste/a, conforme al invento, en un procedimiento de escrutinio para realizar la identificación de unas sustancias, que modulen de un modo superagonista la proliferación de células T de desde
25 varios hasta todos los subconjuntos, siendo sometida una sustancia prospectiva o una mezcla de sustancias prospectivas a un ensayo de unión con el péptido o la proteína, y siendo seleccionadas las sustancias que se unen al péptido o a la proteína. Fundamentalmente se pueden emplear todos los ensayos de unión que son usuales en la especialidad. Puede presentar una importancia especial en este contexto la búsqueda de compuestos miméticos, puesto que éstos son típicamente unas denominadas "small molecules" (= moléculas pequeñas), que tienen
30 ventajas farmacológicas frente a las macromoléculas. En un tal procedimiento de escrutinio en cuanto a compuestos miméticos se puede escrutar una biblioteca de sustancias con un alto caudal de realización.

Tanto un péptido, como una proteína o un compuesto mimético de éste/a, que se haya encontrado conforme al invento, como también los mAb's conformes al invento tienen una importancia terapéutica, puesto que con ellos/as
35 se pueden tratar enfermedades linfoproliferativas mediante una inhibición de la proliferación al igual que enfermedades de inmunodeficiencia mediante una activación de la proliferación. También es posible la inducción de funciones efectoras, p.ej. una secreción de sustancias efectoras. Esto se realiza mediante una selección o un diseño del mAb o del compuesto mimético conforme a una especificidad y a una alta afinidad para un determinado miembro de la familia de la CD28. Si es deseable una especificidad / afinidad aumentada aún más, por ejemplo para dominar
40 a unos efectos secundarios sorprendentes, entonces se puede proceder buscando un segundo ligando, junto al mAb o al compuesto mimético, con especificidad para el miembro especial de la familia, y uniendo el segundo ligando, después de haber analizado las posiciones espaciales relativas de los dos ligandos entre ellos, a través de una unión de puente, con el mAb o respectivamente con el compuesto mimético, y de esta manera, rigidizando por así
45 decir a ambos ligandos unos con respecto a los otros en la posición de unión. La determinación de la posición espacial de dos ligandos entre ellos después de una unión a una diana, se puede efectuar, por ejemplo, con un análisis estructural por rayos X o con una espectroscopía de correlación de RMN multidimensional, por ejemplo, una ¹⁵N/¹H RMN. Un segundo ligando se puede determinar mediante unos usuales métodos de escrutinio, empleándose como diana el miembro especial de la familia de la CD28. Se da por entendido, que el segundo ligando no se une al bucle C'-D, sino que está distanciado espacialmente de éste. Por otra parte, es posible que un péptido, una proteína
50 o un compuesto mimético de éste/ésta, que se ha encontrado conforme al invento, y que no tiene ningún efecto fisiológico adicional, se una competitivamente a unos ligandos naturales de los miembros de la familia de la CD28 y que se consiga de esta manera un efecto inverso, mediante evitación de una activación o una inhibición natural causada patológicamente.

55 Por otra parte, el invento se refiere por lo tanto a la utilización de un mAb conforme al invento para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de enfermedades con unos números disminuidos patológicamente de células CD4 T, en particular de un SIDA, para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento después de trasplantes de células madre como continuación de una quimio- o radioterapia en el caso de enfermedades leucémicas, para la preparación de una composición farmacéutica destinada a la
60 potenciación y/o a la influencia cualitativa sobre reacciones inmunitarias en el caso de vacunaciones protectoras, y para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de enfermedades inflamatorias autoinmunitarias.

65 En lo sucesivo, se ilustra más detalladamente el invento con ayuda de los Ejemplos que representan solamente ciertas formas de realización. Allí muestran:

- La Fig. 1: una estimulación de linfocitos T de una rata con diferentes mAb's específicos para una CD28 (a: estimulación concomitante, b: estimulación superagonista, es decir directa),
- 5 La Fig. 2: una comparación de secuencias entre las de una CD28 de un ratón, otra de una rata y otra de un ser humano en la región del bucle C'-D (encuadrada),
- La Fig. 3: unos resultados experimentales para la localización del sitio de unión de unos mAb's superagonistas a las moléculas de CD28 de una rata,
- 10 La Fig. 4: la unión a una CD28 de diferentes mAb's humanos, específicos para una CD28, (a) así como la actividad estimuladora concomitante y (b) superagonista, es decir directamente estimuladora (c) de los mAb's de la Figura 4a,
- La Fig. 5: unos ensayos de unión, que demuestran que los mAb's humanos, superagonistas, específicos para una CD28, se unen específicamente al bucle C'-D,
- 15 La Fig. 6: una representación tridimensional de la CD28 con marcación del bucle C'-D,
- La Fig. 7: una alineación de secuencias mediando realce del bucle C'-D o respectivamente de unas estructuras análogas, para diferentes miembros de la familia de la CD28, y
- 20 La Fig. 8: unos experimentos para la activación de células por medio de mAb's humanos, específicos para una CD28, conformes al invento, y moléculas de CD28 de un ratón mutado.
- La Fig. 9: una representación de las secuencias SEQ ID NO: 33 - 40 (a - h)
- 25 La Fig. 10: un dominio variable humanizado del mAb 5.11A (cadena ligera: VLC5.11=a; cadena pesada: VHC5.11=b)

30 La Fig. 1 muestra la estimulación de linfocitos T de rata recientemente aislados, en forma de una incorporación de 3H-timidina. La metodología corresponde a la que se describe en la cita bibliográfica WO98/54225, a la que se hace referencia expresa en toda su extensión por la presente y en lo sucesivo, y cuyo contenido de divulgación se incorpora de esta manera en el presente texto. En la Fig. 1a se muestra la estimulación concomitante, es decir que en todos los pocillos unos mAb's específicos para los receptores de células T (TCR) se habían unido a la superficie de material plástico. A falta de una estimulación concomitante, el testigo negativo (fila superior) no muestra ninguna incorporación. La estimulación concomitante se proporciona entonces mediante la adición de unos mAb's específicos para una CD28 en una forma soluble. Pasó a emplearse toda la gama mostrada de mAb's específicos para una CD28. Esta serie de diferentes mAb's específicos para una CD28 procede de un enfoque para la inmunización y producción de linajes de células de hibridoma, que ya se ha descrito en el documento WO98/54225.

35 Se trata de unos materiales sobrenadantes del cultivo, que contenían suficientes mAb's específicos para una CD28 como para realizar una unión saturadora a las 2×10^5 células T cultivadas. De la Figura 1a se puede deducir que todos estos mAb's están en la situación de activar estimulando concomitantemente, es decir de incitar la incorporación de timidina en presencia de los mAb's anti-TCR. En la Figura 1b se muestra la estimulación en ausencia de unos mAb's específicos para los TCR. Este experimento se llevó a cabo también tal como se describe en la cita bibliográfica WO98/54225. Se reconoce que solamente dos mAb's están en la situación de estimular a los linfocitos T en ausencia de una señal de los TCR. Estos mAb's poseen por lo tanto una actividad superagonista.

Además, se investigó si unos mAb's estimuladores concomitantes y superagonistas, específicos para una CD28, se unen a diferentes regiones de la molécula de CD28. Los mAb's se produjeron mediante inmunización de ratones con una CD28 de una rata; conforme a lo esperado, todos ellos no reaccionan por lo tanto con una CD28 de un ratón (no mostrado). Puesto que los mAb's sólo pueden reconocer, por lo tanto, a aquellas regiones de la molécula de una CD28 de una rata, que se diferencia de la de un ratón, primeramente se llevó a cabo una comparación de secuencias entre las de una CD28 de un ratón y otra de una rata (véase la Fig. 2, parte superior). Se realizan las diferencias entre las dos especies. Para la denominación de los aminoácidos se utilizó el código de una sola letra.

50 Como prototipos para un mAb convencional, específico para una CD28 de rata se utilizó el JJ319 y para un mAb superagonista se utilizó el JJ316 (véase el documento WO98/54225).

En la Figura 3 se muestra el cartografiado de la unión. Se construyeron unos plásmidos de expresión, en los que una parte del dominio extracelular procede de una CD28 de un ratón, y otra parte procede de otra de una rata. Esto se ha representado en cada caso simbólicamente mediante barras o respectivamente líneas; a la derecha junto a esto se muestra la unión de los mAb's JJ316 y JJ319 a fibroblastos de ratón (células L929), que habían sido transfectados con estos plásmidos de expresión. En las primeras dos líneas de la Fig. 3 (m/r y r/m 1-37) se cartografía la unión de los dos anticuerpos con la mitad "derecha" de la secuencia: ambos se unen, cuando ellos proceden de una rata; en la construcción artificial inversa (rm CD28 1-37, a la izquierda de una rata, a la derecha de un ratón) no tiene lugar ninguna unión. En la tercera línea (m/r CD28 1-66) se muestra que el JJ316 ya no se une, mientras que la parte todavía presente de la secuencia de rata ("a la derecha") es suficiente todavía para su

60

65

reconocimiento por el JJ319. Por lo tanto, los dos mAb's reconocen a diferentes epítomos en la molécula de CD28, y la unión del anticuerpo superagonista JJ316 tiene que buscarse, como consecuencia de ello, en la región que procedía de una rata en la construcción artificial de la primera línea, pero no en la construcción artificial de la tercera línea. Una candidata manifiesta para ello es la región encuadrada en la Figura 2.

En las líneas 4 y 5 de la Figura 3 se modificaron por lo tanto primeramente dos y luego tres aminoácidos en esta región de la molécula de una CD28 de ratón, de tal manera que ellos constituyen ahora la secuencia de una rata. Mediante este "trasplante" de sólo tres aminoácidos se pudo transferir la capacidad de unión para el mAb JJ316, pero no (como era de esperar) la capacidad de unión para el JJ319. En la Tabla 1 se recopilan los datos de unión para toda la gama de mAb's específicos para las CD28. Se establece una correlación inequívoca: una unión significativa al bucle C'-D de una rata, que había sido proporcionada por transferencia de las posiciones de aminoácidos 62, 64 y 65 a la molécula de una CD28 de ratón, se mostró solamente para los dos mAb's superagonistas JJ316 y 5S38.17, por el contrario, no para los mAb's convencionales (que solamente son estimuladores concomitantes). Un mAb estimulador concomitante (5S35) reconoce muy débilmente al epítipo encuadrado y se une muy fuertemente con el epítipo "convencional".

Las siguientes Figuras se ocupan de unos mAb's superagonistas, específicos para seres humanos. También éstos se produjeron en ratones, y por lo tanto no reaccionan con la molécula de una CD28 de un ratón. Los ratones se inmunizaron con células B de linfoma de ratón A20/J transfectadas con una CD28 humana (véase el documento WO98/54225) y adicionalmente se reforzaron antes de la fusión con la proteína de fusión humana entre una CD28 y una Fc, adquirible comercialmente (comprada de R und D Systems). En una serie de experimentos de fusión, a partir de varios millares de linajes de células de hibridoma se identificaron 24 que producen mAb's específicos para una CD28 humana (unión a células L929 de ratón, que expresan una CD28 humana, pero no a células L929 no transfectadas), análogamente al escrutinio realizado en la cita bibliográfica WO98/54225. Dos de éstos (9D7 y 5.11A) mostraron la actividad superagonista buscada mientras que todos los nuevos mAb's poseen una actividad estimuladora concomitante convencional. Por lo demás, se describen en particular los dos mAb' superagonistas. Como un ejemplo de un mAb convencional, específico para una CD28 humana, se utiliza asimismo el mAb 7.3B6 generado de nuevas.

La Figura 4a muestra que los preparados utilizados de los tres nuevos mAb's son comparablemente buenos y se unen también con un título comparable a los linfocitos T humanos. Se muestra un experimento, en el que se trataron sobre hielo unas células mononucleares recientemente aisladas (las denominadas PBMC's) procedentes de sangre humana primeramente con diferentes escalones de dilución de los mAb's empleados, luego se lavó y el mAb unido se hizo visible mediante un anticuerpo secundario marcado por medio de un colorante fluorescente, que reconoce específicamente a los mAb's de ratón unidos. Mediante utilización de otro mAb adicional, que detecta a las células T de CD4 humanas y al que se había unido un segundo colorante fluorescente, se pudo determinar selectivamente para linfocitos T de CD4 la unión de los mAb's titulados mediante tamizado por una puerta electrónica. Con "MFI" se indica la intensidad promedia de fluorescencia, que constituye una medida de la cantidad de los mAb's específicos para una CD28 que se han unido. Las concentraciones representan unas diluciones triples (en 3 veces) de un preparado de partida normalizado. Es absolutamente normal el hecho de que en el caso de este ensayo la concentración más alta proporcione una señal más débil que las siguientes etapas de titulación; esto tiene que ver con la avidéz (unión bivalente) de los mAb's y no tiene ninguna importancia en los contextos aquí discutidos.

En las Figuras 4b y c se compara la capacidad de estos tres nuevos mAb's específicos para una CD28 - en presencia y en ausencia de una señal de los TCR -, para estimular el crecimiento de células T humanas recientemente aisladas. De nuevo, se muestra una incorporación de 3H-timidina, tal como se ha descrito precedentemente para la rata. Para la Figura 4b los pocillos se habían revestido con un mAb, que reacciona con el complejo humano de un TCR y una CD3. Por lo tanto, se midió una estimulación concomitante. Se reconoce, que no se presenta ninguna proliferación sin una estimulación concomitante con uno de los mAb's (testigo negativo), todos los tres anticuerpos están sin embargo en la situación de estimular la división celular. Para la figura 4c se trabajó en ausencia de un mAb específico para el complejo de TCR/CD3. Sólo los anticuerpos 9D7 y 5.11A pudieron estimular de un modo superagonista.

Después de que se hubo definido al epítipo para mAb's superagonistas en el caso de una rata y de que se hubieron aislado dos nuevos mAb's superagonistas con especificidad para una CD28 humana, se comprobó si estos mAb's se unen al correspondiente lugar de la molécula de CD28 humana. Tal como se puede ver en la Figura 2, las moléculas de CD28 de un ratón y las de un ser humano se diferencian en numerosas posiciones. Apoyándose en el cartografiado del epítipo superagonista, en el caso de una rata se comprobó por lo tanto directamente si el sitio de unión para el epítipo superagonista en una CD28 humana se puede alcanzar también en la molécula de CD28 de un ratón mediante un "trasplante" de los cinco aminoácidos de esta región homóloga. Los resultados se muestran en la Figura 5. Ante los antecedentes de la secuencia de ratón representada homogéneamente para el dominio extracelular de la molécula de CD28 (en el centro), se representan en forma de líneas (abajo) las posiciones de aminoácidos intercambiadas (de ratón a humano). Las cifras que aparecen a un lado reproducen adicionalmente todavía las posiciones y mutaciones individuales (F60V significa p.ej., que en la posición 60 la fenilalanina del ratón se había reemplazado por una valina de la secuencia humana). Junto a esto se representa la unión de los tres mAb's investigados. Como lo muestra la Figura, los tres mAb's reconocen ciertamente a una CD28 humana, pero

sólo los dos mAb's 9D7 y 5.11A reaccionan con la molécula de CD28 de un ratón, a la que se habían trasplantado los cinco aminoácidos de la CD28 humana en el lugar decisivo. En vista de la diversidad y multiplicidad de las diferencias, esta producción deliberada de la reactividad es sorprendente y confirma en plena extensión el reconocimiento, deducido a partir de los experimentos con una CD28 de rata, de que los mAb's superagonistas deben de unirse a un lugar determinado, a saber este lugar de la molécula.

En la Figura 6 se muestra un modelo tridimensional de la molécula de CD28. Se ha realzado la región de unión identificada de nuevas. Ella corresponde a la secuencia encuadrada en la Figura 2. El dominio extracelular de la CD28 pertenece estructuralmente a la denominada superfamilia de las inmunoglobulinas, que se distingue por medio de dos hojas plegadas β situadas una sobre otra como estructura fundamental. La definición con cifras de estas bandas se efectúa según un patrón descrito en la bibliografía. Para la representación aquí mostrada es importante el hecho de que la región identificada como un epítipo para los mAb's superagonistas específicos para una CD28 en una rata y en un ratón, es designada como un "bucle C'-D". Por lo tanto se mostró que los mAb's con especificidad para el bucle C'-D de la molécula de CD28 poseen una actividad superagonista, y por lo tanto se pueden emplear en el sentido de la cita bibliográfica WO98/54225 para realizar la activación de linfocitos T. La actividad superagonista de los mAb's específicos para el bucle C'-D en una rata y en un ser humano muestra que en este caso no se trata de la secuencia del epítipo, sino de su posición o respectivamente su forma.

La CD28 pertenece a una familia de receptores de la superficie celular con una actividad inmunorreguladora. Ésta es o bien una estimuladora (CD28, ICOS), o una inhibidora (CTLA-4, PD-1). En la Figura 7 se recopilan las secuencias de los miembros conocidos de la familia de la CD28 en el sentido de una alineación (en inglés "alignment"). Se realiza el bucle C'-D para una CD28. Unos bucles análogos de las otras moléculas (encasilladas) son una estructura diana correspondientemente buena para el desarrollo de ligandos superagonistas. Acerca de la Figura 7 se ha de indicar, que "-" representa una laguna en la alineación, es decir que los aminoácidos que le siguen están unidos directamente unos con otros.

En los experimentos de la Fig. 8 se investigó si los mAb's conformes al invento con una especificidad para el bucle C'-D de una rata o respectivamente de un ser humano no sólo se unen a la CD28 de ratón con un bucle C'-D "trasplantado" de una rata o respectivamente de un ser humano (véanse las Figuras 3 y 5), sino si realmente también se efectúa una activación. Para esto, se transfectaron células T tumorales de un ratón, BW, o bien con la construcción artificial de la Figura 3, línea 5, (transferencia al bucle C'-D de rata) o con la construcción artificial de la Figura 5, línea 3, (bucle C'-D humano). La activación de estas células no se mide mediante una división celular (ellas proliferan de todos los modos), sino mediante la producción de la citocina IL-2. La Figura 8 muestra en primer lugar que, sin ninguna estimulación, no se efectúa ninguna producción de IL-2 (testigo negativo). La estimulación con un mAb específico para los receptores de células T induce una producción de IL-2 (testigo positivo). La Figura 8a muestra los resultados en el caso del empleo del mAb superagonista JJ316 de una rata, mientras que la Figura 8b muestra los resultados para el mAb 5.11A específico para el bucle C'-D humano. En ambos casos, los respectivos linajes de células son estimulados para la producción de IL-2. Como se esperaba, la estimulación no se efectúa sin embargo mediante unos mAb's "convencionales" específicos para una CD28, puesto que éstos son específicos para unas secuencias específicas para ratas o respectivamente para seres humanos, que no están contenidas en la construcción artificial.

En la Figura 9a se reproduce la secuencia de ácido nucleico de la región variable de la cadena ligera de un mAb 9D7 conforme al invento (SEQ ID NO: 33). La Figura 9b muestra el péptido codificado de esta manera (SEQ ID NO: 34). La Figura 9c muestra la secuencia de ácido nucleico de la región variable de la cadena pesada de este mAb (SEQ ID NO: 35). La Figura 9d es el péptido codificado de esta manera (SEQ ID NO: 36).

En la Figura 9e se reproduce la secuencia de ácido nucleico de la región variable de la cadena pesada de un mAb 5.11A conforme al invento (SEQ ID NO: 37). La Figura 9f muestra el péptido codificado de esta manera (SEQ ID NO: 38). La Figura 9g muestra la secuencia de ácido nucleico de la región variable de la cadena ligera de este mAb (SEQ ID NO: 39). La Figura 9h es el péptido codificado de esta manera (SEQ ID NO: 40). La Figura 10 muestra el dominio variable humanizado del mAb 5.11A. Se representan en la Figura 10a la cadena ligera y en la Figura 10b la cadena pesada.

Tabla 1:
Unión de mAb's anti-CD28 de rata a CD28's de ratón y rata
y diferentes mutantes de CD28.

mAB	CD28 de ratón	CD28 de rata	mCD28, S62P A64V, E65G	m/rCD28 Mva1269I
Testigo	-	-	-	-
JJ316	-	+++	+++	-
JJ319	-	+++	-	+++
5S28	-	++	-	++
5S38.17	-	+++	+++	-
5S247	-	+++	-	+++
5G40/3	-	+++	-	+++
5G87	-	++	-	++
5G111	-	++	-	++
5S35	-	+++	+	+++

5

Lista de secuencias

<110> TeGenero GmbH

10 <120> Péptido o proteína que contiene un bucle C'-D de la familia de receptores de CD28

<130> UNW/DE/0107

<160> 44

15

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 6

20

<212> PRT

<213> artificial

<400> 1

25 Val Tyr Ser Lys Thr Gly
1 5

<210> 2

<211> 5

30

<212> PRT

<213> artificial

<400> 1

35 Phe Leu Asp Asp Ser
1 5

<210> 3

<211> 6

40

<212> PRT

<213> artificial

<400> 3

45 Val Ser Ile Lys Ser Leu
1 5

<210> 4

<211> 6

50

<212> PRT

<213> artificial

<400> 4

Gln Pro Gly Gln Asp Cys
 1 5

5 <210> 5
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> artificial

<400> 5

10 Tyr Ser Lys Thr
 1

15 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

<400> 6

20 Tyr Ser Lys Thr Gly
 1 5

25 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

<400> 7

30 Val Tyr Ser Lys Thr
 1 5

35 <210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> artificial

<400> 8

40 Tyr Ser Lys Thr Gly Phe
 1 5

45 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

<400> 9

50 Val Tyr Ser Lys Thr Gly Phe
 1 5

55 <210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial

<400> 10

60 Ser Lys Thr Gly Phe
 1 5

65 <210> 11
 <211> 8
 <212> PRT

<213> artificial
 <400> 11

5 Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln
 1 5

<210> 12
 <211> 4
 10 <212> PRT
 <213> artificial

<400> 12

15 Leu Asp Asp Ser
 1

<210> 13
 <211> 5
 20 <212> PRT
 <213> artificial

<400> 13

25 Leu Asp Asp Ser Ile
 1 5

<210> 14
 <211> 5
 30 <212> PRT
 <213> artificial

<400> 14

35 Phe Leu Asp Asp Ser
 1 5

<210> 15
 <211> 6
 40 <212> PRT
 <213> artificial

<400> 15

45 Leu Asp Asp Ser Ile Cys
 1 5

<210> 16
 <211> 7
 50 <212> PRT
 <213> artificial

<400> 16

55 Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys
 1 5

<210> 17
 <211> 5
 60 <212> PRT
 <213> artificial

<400> 17

65 Asp Asp Ser Ile Cys
 1 5

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
5 <213> artificial

<400> 18

10 Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
1 5

<210> 19
<211> 4
15 <212> PRT
<213> artificial

<400> 19

20 Ser Ile Lys Ser
1

<210> 20
<211> 5
25 <212> PRT
<213> artificial

<400> 20

30 Ser Ile Lys Ser Leu
1 5

<210> 21
<211> 5
35 <212> PRT
<213> artificial

<400> 21

40 Val Ser Ile Lys Ser
1 5

<210> 22
<211> 6
45 <212> PRT
<213> artificial

<400> 22

50 Ser Ile Lys Ser Leu Lys
1 5

<210> 23
<211> 7
55 <212> PRT
<213> artificial

<400> 23

60 Val Ser Ile Lys Ser Leu Lys
1 5

<210> 24
<211> 5
65 <212> PRT
<213> artificial

<400> 24
Ile Lys Ser Leu Lys
1 5
5
<210> 25
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial
10
<400> 25
Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr
1 5
15
<210> 26
<211> 4
<212> PRT
<213> artificial
20
<400> 26
Pro Gly Gln Asp
1
25
<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial
30
<400> 27
Pro Gly Gln Asp Cys
1 5
35
<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial
40
<400> 28
Gln Pro Gly Gln Asp
1 5
45
<210> 29
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial
50
<400> 29
Pro Gly Gln Asp Cys Arg
1 5
55
<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial
60
<400> 30
Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg
1 5
65
<210> 31

ES 2 392 287 T3

<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

5 <400> 31

Gly Gln Asp Cys Arg
1 5

10 <210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

15 <400> 32

Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser
1 5

20 <210> 33
<211> 321
<212> ADN
<213> artificial

25 <400> 33

gatatccaga cgacacagac tacatcctcc cgttctgcct ctctgggaga cagagtca
cc 60

atcagttgca gggcaggta ggacattagt aattatttaa actggtatca gcagaaac
ca 120

gatggaactg ttaagctct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccat
ca 180

aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagc
aa 240

gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtcatacgc ttccgtggac gttcgggtg
ga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa a
321

30 <210> 34
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<400> 34

ES 2 392 287 T3

<211> 121
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <400> 36

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Trp Pro Arg Pro Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 37
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> artificial

10

<400> 37

ES 2 392 287 T3

```

caggtccaac tgcagcagtc cggacctgag ctggtgaagc cggggacttc agtgagga
tt      60
tcctgcgagg cttctggcta caccttcaca agctactata tacactgggt gaaacaga
gg      120
cctggacagg gacttgagtg gattggatgt atttatcctg gaaatgtcaa tactaact
at      180
aatgagaagt tcaaggacaa ggccacactg attgtagaca catcctccaa cactgcct
ac      240
atgcagctca gcagaatgac ctctgaggac tctgcggtct atttctgtac aagatcac
ac      300
tacggcctcg actggaactt cgatgtctgg ggcgcagga ccacggtcac cgtctcct
ca      360

```

<210> 38
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> artificial

5

<400> 38

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Thr
1				5					10					15	
Ser	Val	Arg	Ile	Ser	Cys	Glu	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20						25					30	
Tyr	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35						40						45	
Gly	Cys	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Val	Asn	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
		50					55						60		

ES 2 392 287 T3

Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 41
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial

10 <400> 41
 Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser Lys Thr Gly Phe
 1 5 10 15

15 <210> 42
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial

20 <400> 42
 Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys
 1 5 10 15

<210> 43
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial

ES 2 392 287 T3

<400> 43

Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu Lys
1 5 10 15

<210> 44

<211> 16

5 <212> PRT

<213> artificial

<400> 44

Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos del bucle C'-D de un miembro de la familia de la CD28, a saber las SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 1, o 5 - 10, o de una proteína que contiene este péptido, pero no de la CD28 humana, en un procedimiento de escrutinio para la identificación de unas sustancias que modulan de un modo superagonista la proliferación de células T de desde varios hasta todos los subconjuntos,
- 5 realizándose que una sustancia o una mezcla de sustancias es sometida para esto a un ensayo de unión con el péptido o la proteína,
- 10 y siendo seleccionadas las sustancias que se unen al péptido o a la proteína.
2. Utilización de acuerdo con la reivindicación 1, siendo la sustancia un anticuerpo monoclonal.
3. Células de hibridoma, que producen anticuerpos monoclonales que se unen a un péptido o a una proteína de acuerdo con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 1, o 5 - 10.
- 15 4. Células de hibridoma de acuerdo con la reivindicación 3, como las que se han depositado bajo los números de DSM DSM ACC2531 o DSM ACC2530.
- 20 5. Anticuerpos monoclonales, que son obtenibles a partir de las células de hibridoma de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, que son codificados por lo menos parcialmente por una o varias de las secuencias SEQ ID NO: 33, 35, 37 y/o 39, o unos anticuerpos monoclonales que contienen o se componen de una o varias de las secuencias SEQ ID NO: 34, 36, 38 y/o 40.
- 25 6. Utilización de un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 5 para la producción de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de un SIDA, o para el tratamiento después de trasplantes de células madre como continuación de una quimio- o radioterapia en el caso de enfermedades leucémicas, o para la potenciación y/o la influencia cualitativa sobre reacciones inmunitarias en el caso de vacunas protectoras o para el tratamiento de enfermedades inflamatorias autoinmunitarias.

FIG. 1

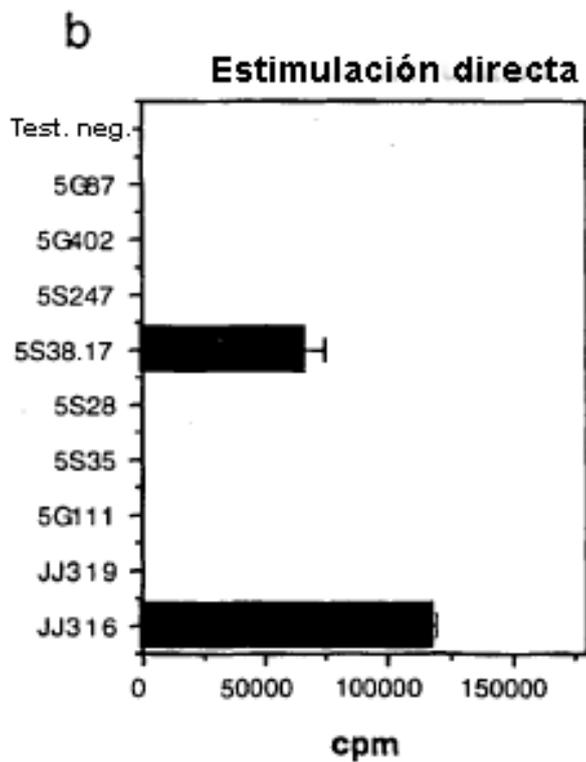
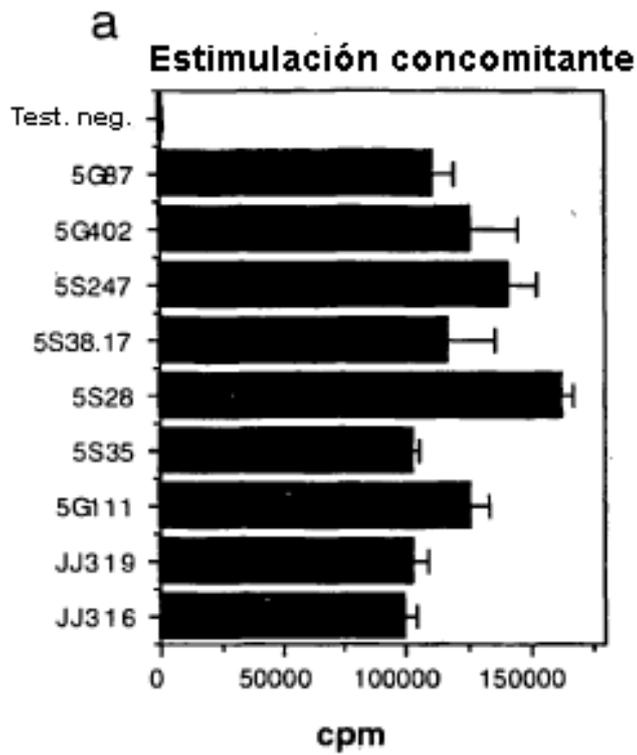


FIG. 2

Diferencias entre especies para la parte extracelular de CD28

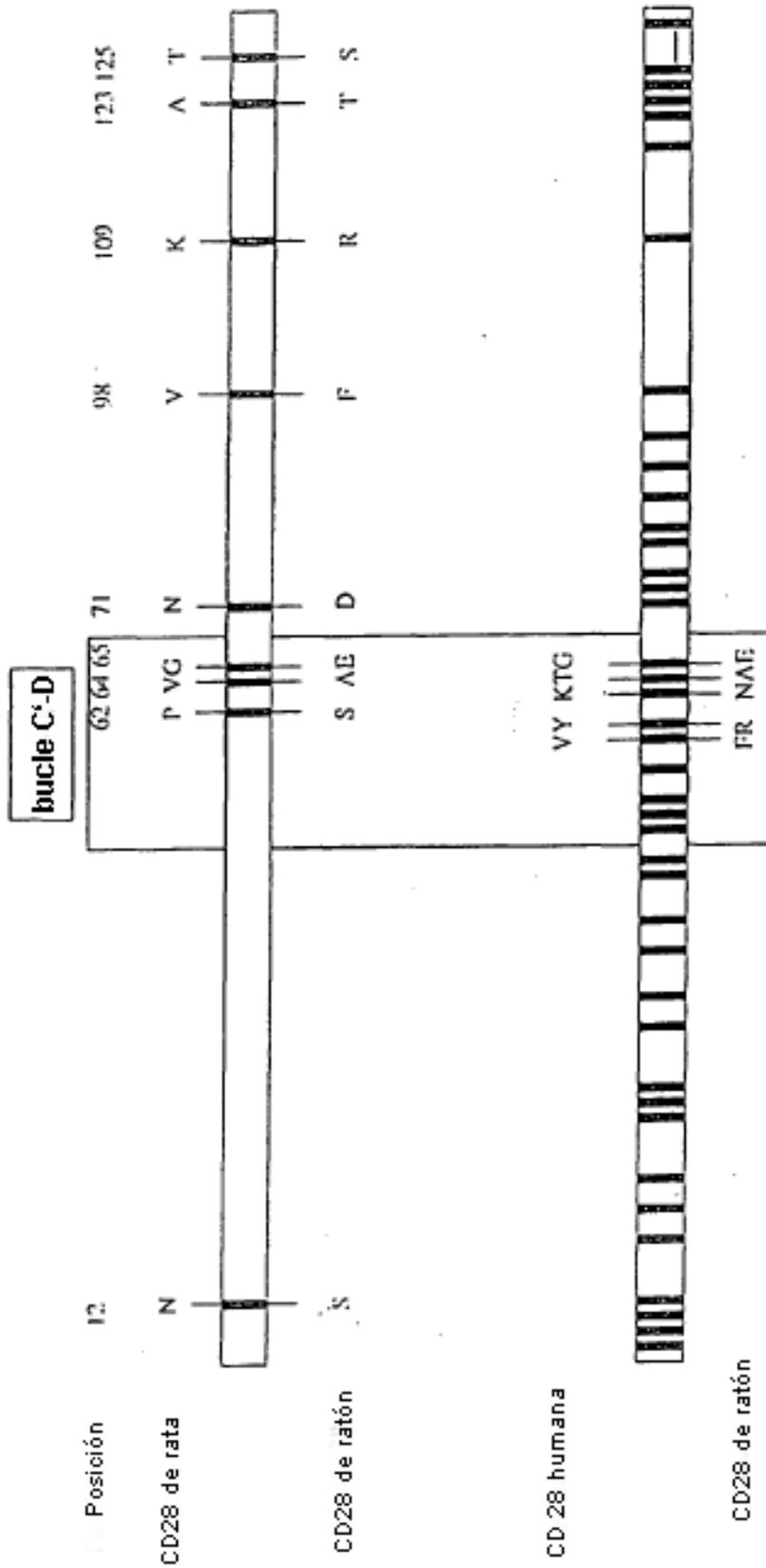
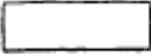


FIG. 3

 = Ratón
 = Rata

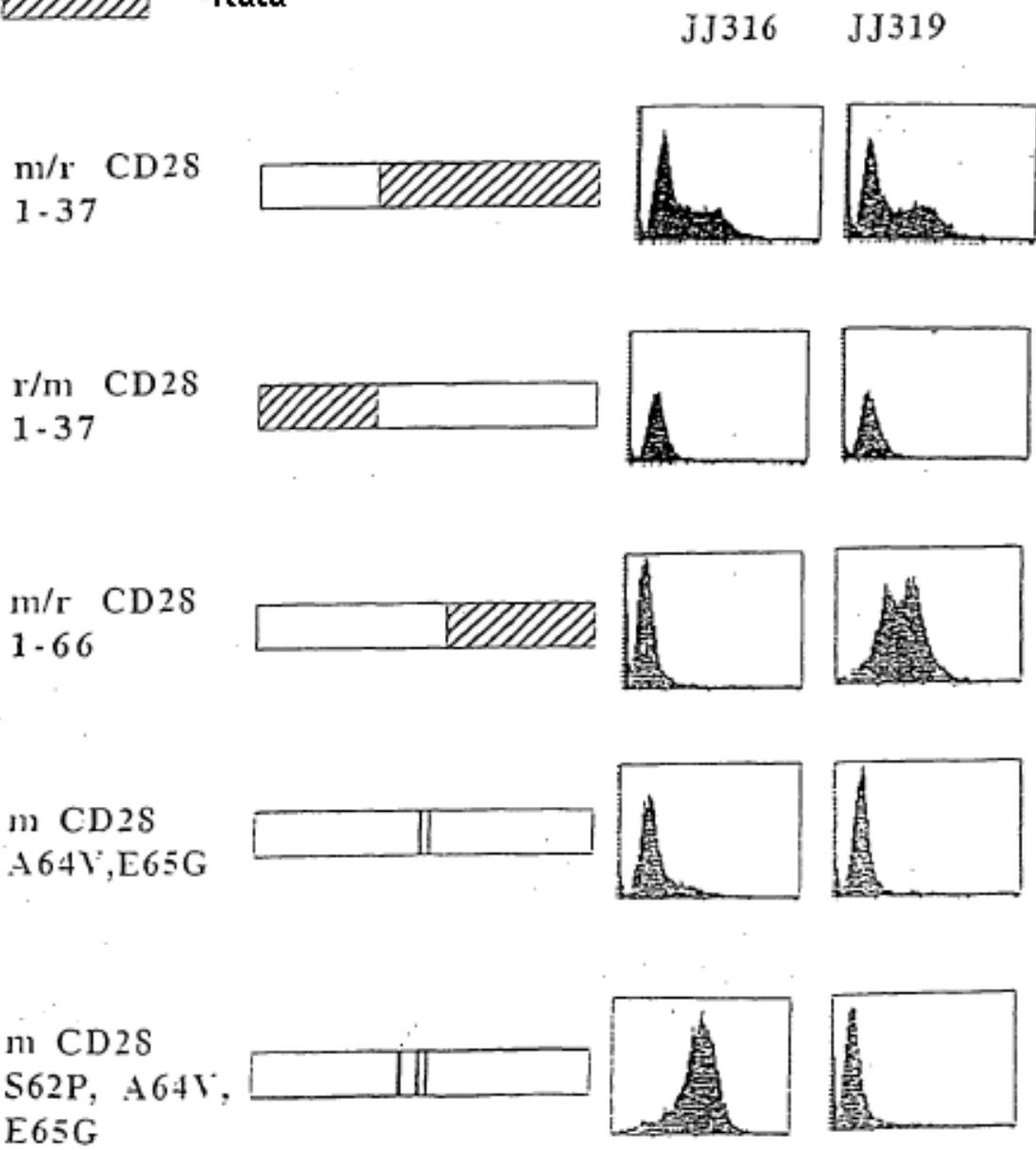
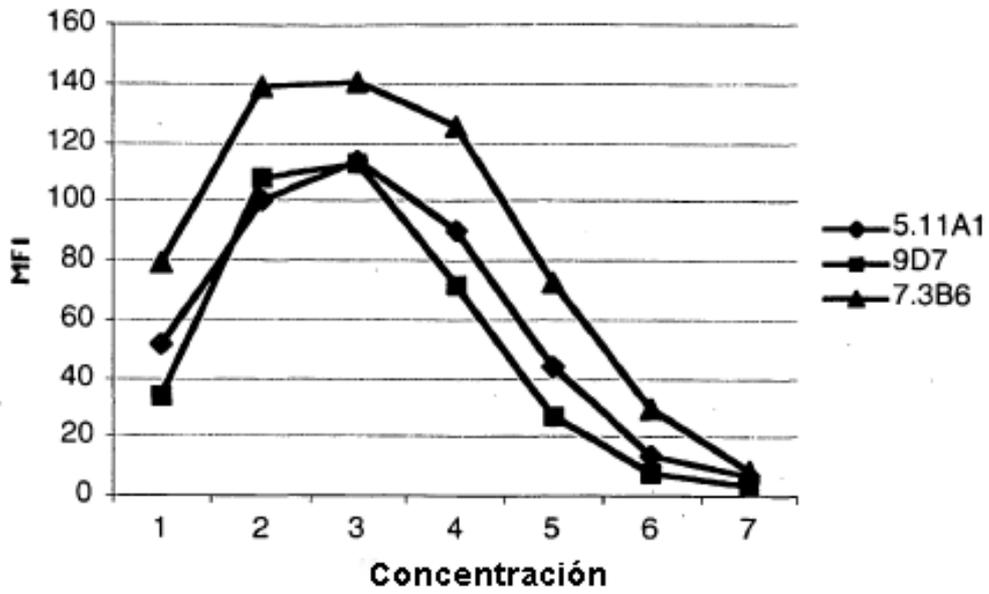
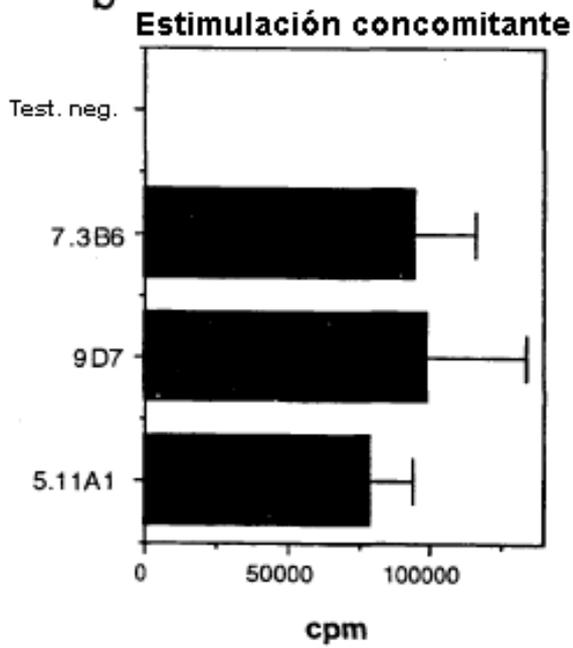


FIG. 4

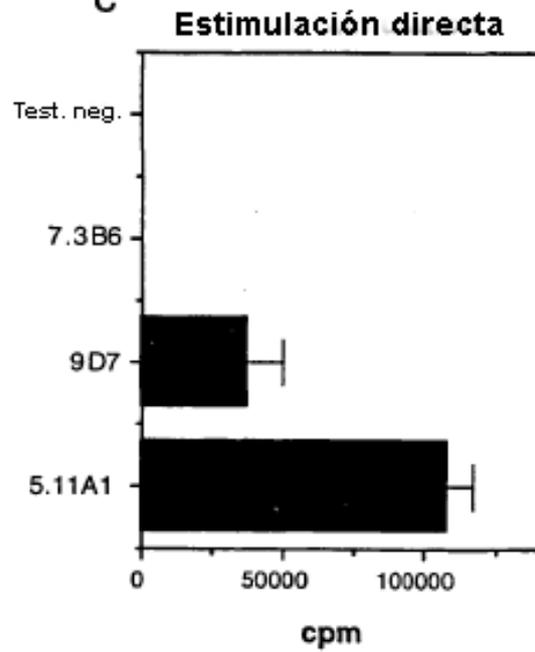
a



b



c



Unión de un mab de CD28 anti-humano a un mutante mCD28

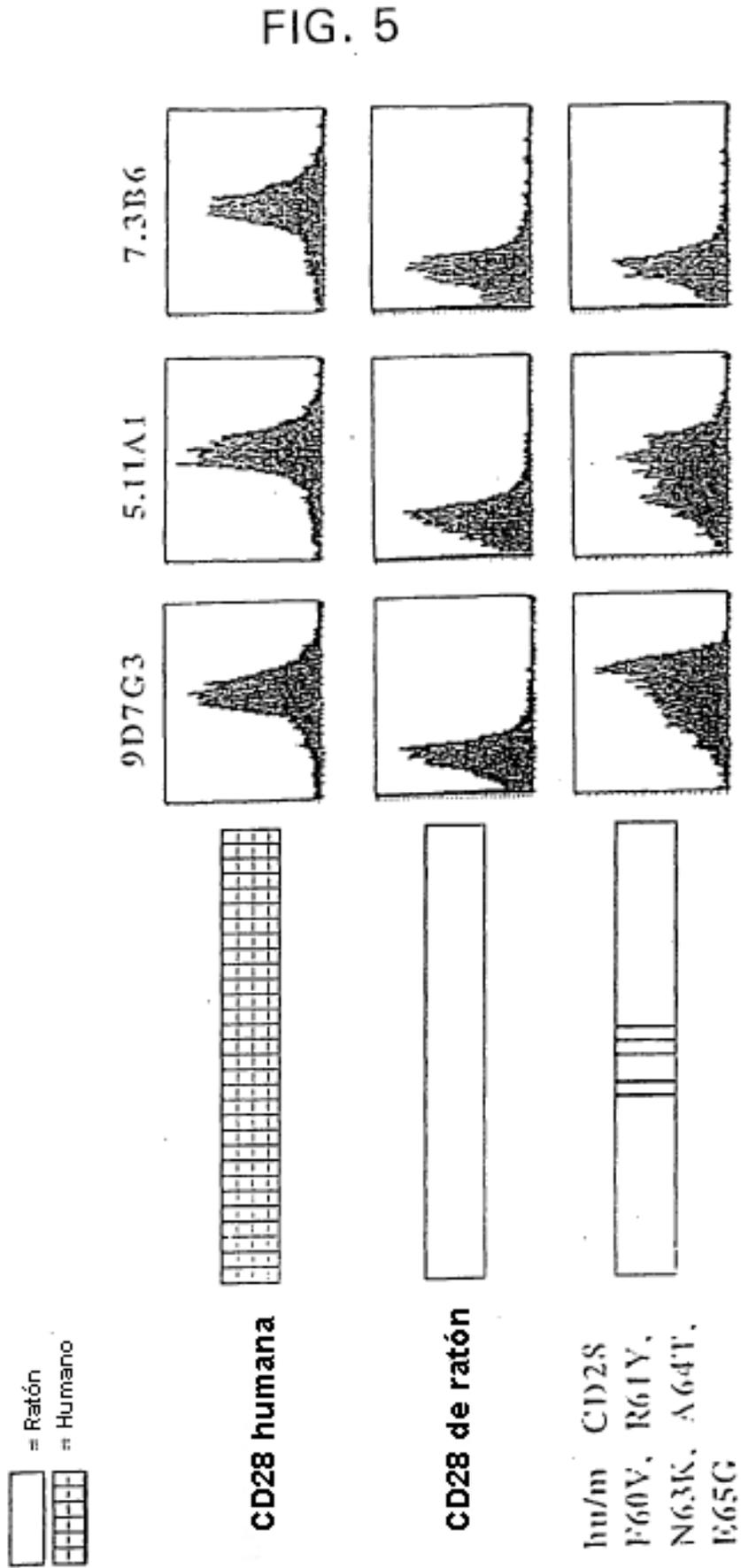


FIG. 5

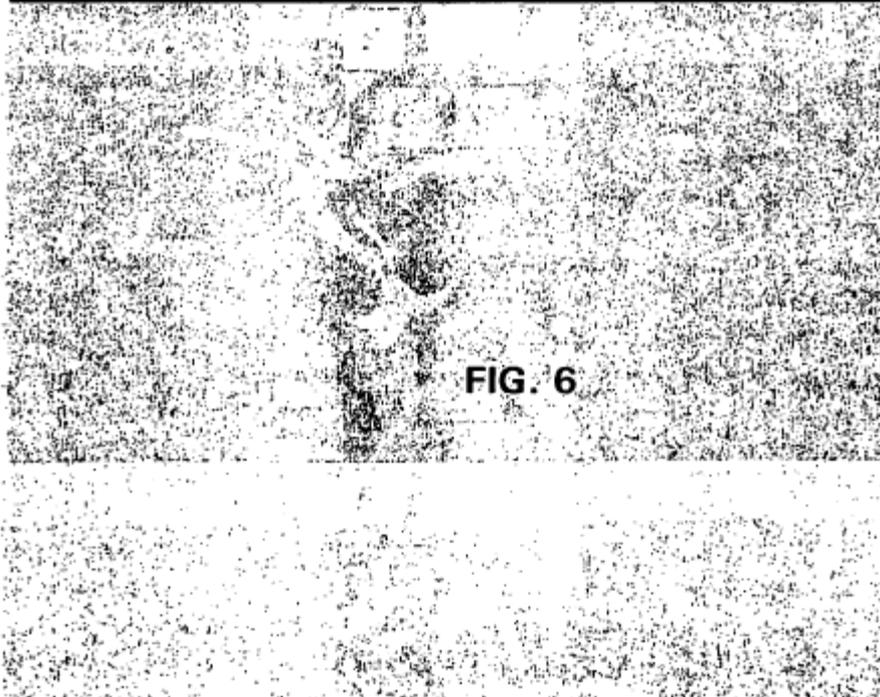
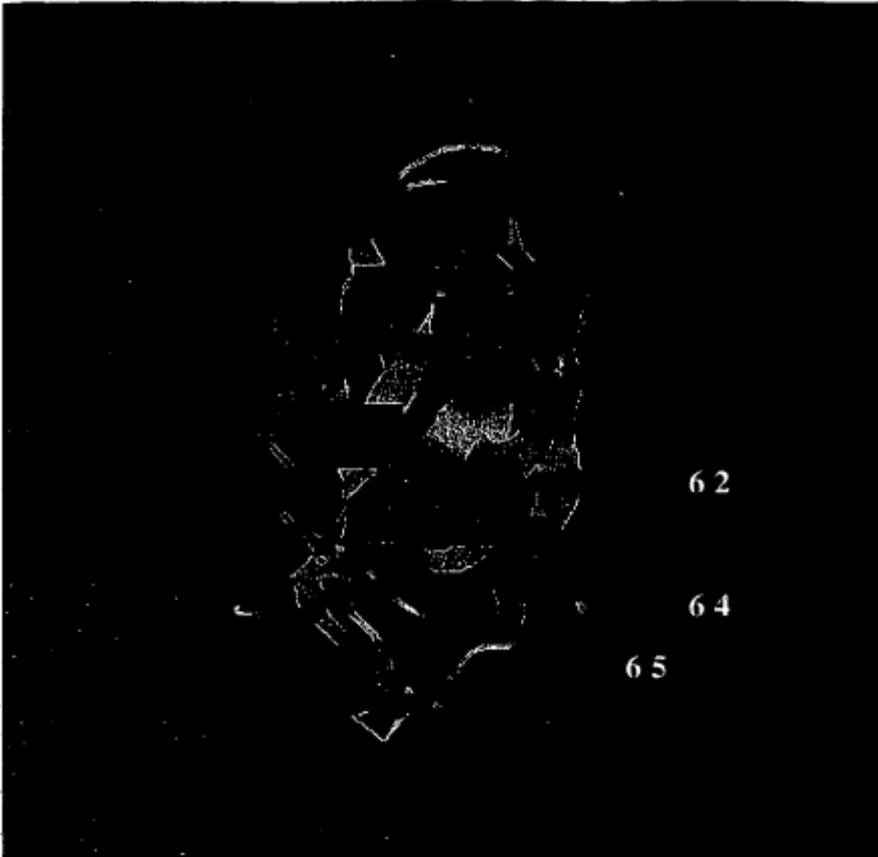


FIG. 7a

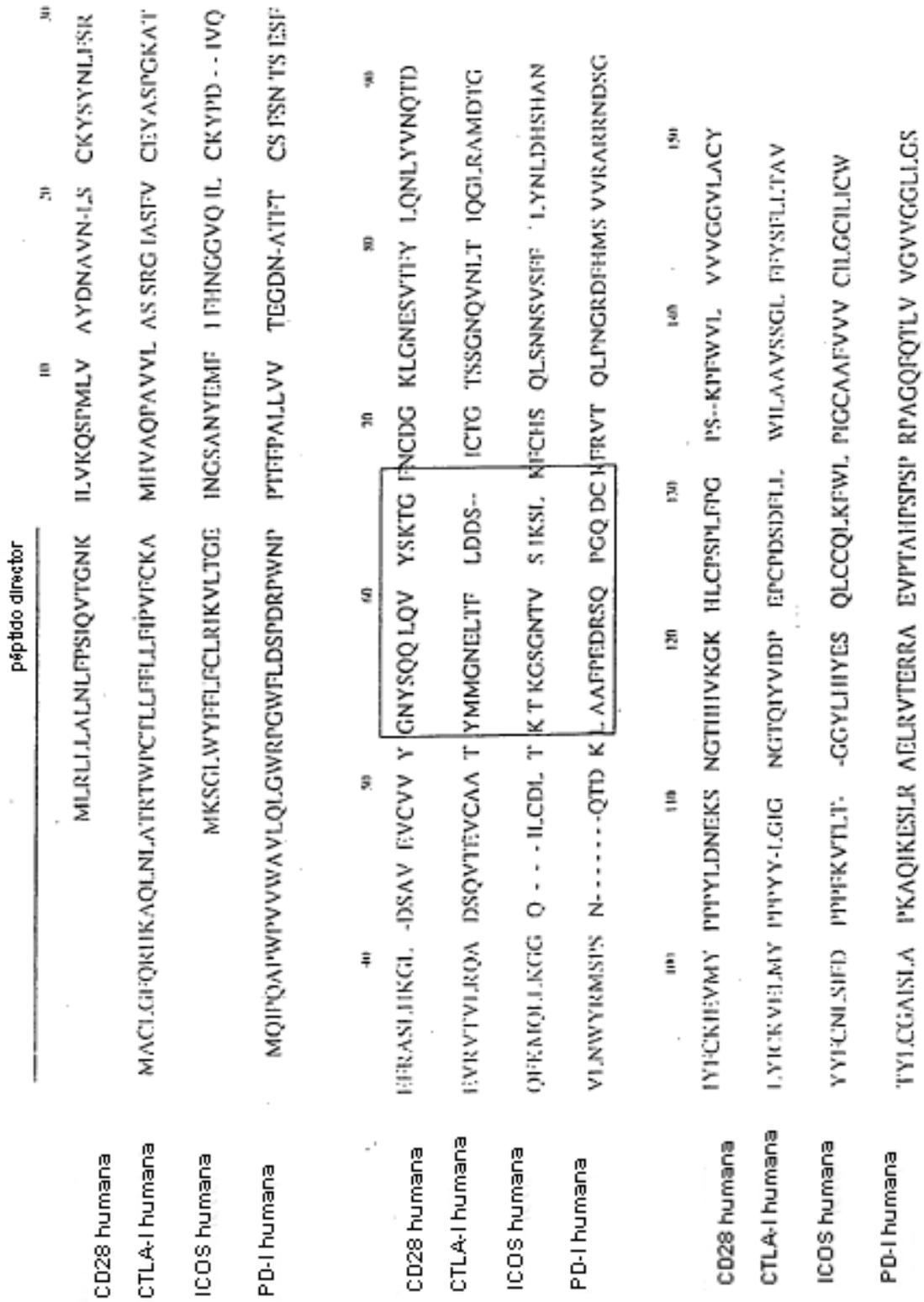
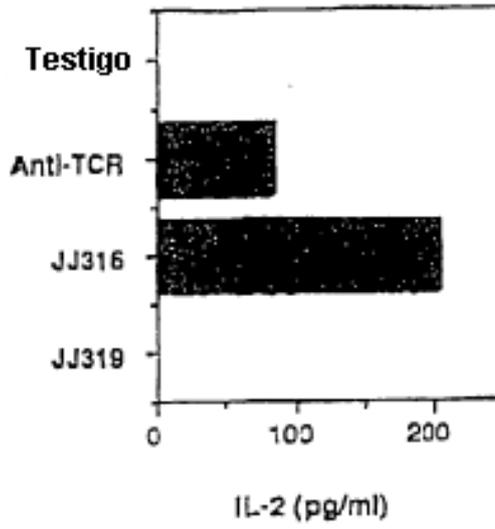


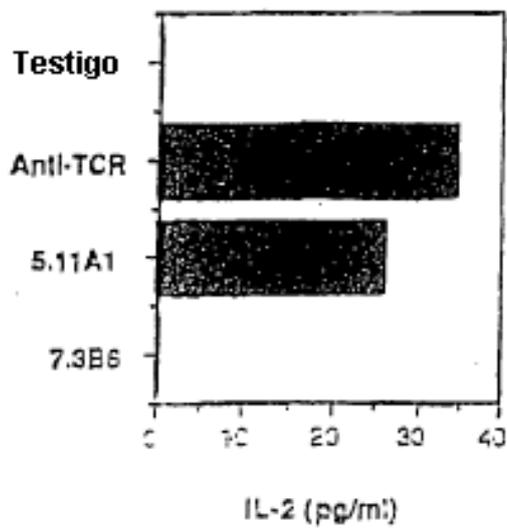
FIG. 7b

	160	170	180	190	200
CD28 humana	SILLVTVAIH	FWVRSKRSRL	LHSDYMNMTI	RRIGPTRKIY	QPYAPPRDFA AYRS
CTLA-1 humana	SI.....	-KMLKKRSPL	TTGVVVKMP	TEPECE-KQF	QPYFIPIN
ICOS humana	-LTKKKYSSS	VHIDINGEYMF	MRAVNTAKKS	R.... L.TDVT L.
PD-1 humana	L.VLJ.VWVLA	VICRAAIRGTI	GARRTQQPLK	EDPSAVPVISV	DYGELDFQWREKTEPT
PD-1 humana	VICVPEQTEY	ATIVFISGMGTSS	PARRGSADGPRSA	QPLRPEDGIICSWPL	

FIG. 8



a



b

FIG. 9

```
gataaccaga cgcacacgac tacctccccc cgtctcgcct ctctgggaga
cagagtcacc      60

atcagttgca ggcaggttca ggacattaga aattatttaa actcgtatca
gcagaaacca      120

gatcgaactg ttaagctcct gatctactac acatcaagat tacactcagg
agtcccacca      180

aggttcagtc gcagtggttc tggaaacagat tattctctca ccattagcaa
ctcggagcaa      240

gascctattg ccacttactt ttgcccaacg ggtcctacgc tccctggac
gttcggctga      300

ggcaccacgc tggaaatcaa #
                 321
```

a

```
1 50
DIQTTQTTSS LSASLGDRVT ISCRAGQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY
51 100
TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GHTLPWTFGG
101 107
GTKLEIK
```

b

FIG. 9

```

gatgtagcaga ttcaaggagtc gggatctggc ctggtgaaac ctctccagtc
tcctgccctc      60
acctgcaactg tcaactgggta ctcaatcacc agtgattatg cctgggactg
gatccggcag      120
tttccagcga acaaacctgga gtagatgggc tacataagat acagtggtag
tactagctac      180
aatccatctc tcaaaagctg aatctctatc actogagaaa catccaagaa
ccagttcttc      240
ctgcaqttag attctgtgac tactgaggac acagccacat actactgtgc
aagagattgg      300
ccgcgaccca gctactggta cttagatgtc tggggcgcag ggaccacggg
caccgtctcc      360

```

C

tca

```

1                               50
DVQLQESGPG LVKPSQSLSL TCTVTGYSIT SDYAWNWIRQ FPGNKLEWMG
51                               100
YIRYSGSTSY NPSLKSRI SI TRDTSKNQFF LQLNSVTTED TATYYCARDW
101                               121
PRPSYWYFDV WGAGTTVTVS S

```

d

FIG. 9

```

caggtccaac tgcagcagtc cggacctcag ctggcgaagc cggcgaattc
agtcaggatt      80

tcctgcgagg ctctcggcta cactctccca agctactata tacactgggt
gaaacagagg      120

ctcggacagg cacttcagtc gattggatct atttatcttc gaactgtcaa
tactaactat      160

atcgagagct tcaggacaa gccccactc atgttagaca catcctccaa
cactgcctac      240

atgcagctca gcagaatgac ctctgaggac tctgcggtct attctctgac
aagatcacac      300

tacggctctc actggacatt cgaatctctg gccgcaggga caacggtcac
cgtctctcca      360
    
```

e

```

1                               50
QVQLQQSGPE LVKPGTSVRI SCEASGYTFT SYIHWVKQR PGQGLEWIGC

51                               100
IYPGNVNTNY NEKFKDKATL IVDTSSNTAY MQLSRMTSED SAVYFCTRSH

101                               120
YGLDWNFDVW GAGTTVTVSS
    
```

f

FIG. 9

```

gacatccaga tgaaccagtc tccatccagt ctgtctgcac cccttggaga
cacattacc      60

atcacttggc atgcccagtc aaccattat gtttggtaa actggtaaca
ccaqaaacc      120

ggaaatatic cttaactott gatctataag gcttccaacc tgcacacagg
cgtccatca      180

aggttttagtc gcaatggatc tggaacagga ttcacattaa ccactcagca
cttgcagcc      240

gaaagacattg caacttacta ctgtcaacag ggtcaaatc atccgtacac
gttoggaggg      300

gggaccasgc tggaaataaa a
                321      g
    
```

```

1                               50
DIQMNQSPSS LSASLGDIT ITCHASQNIY VWLNWYQQKP GNIPKLLIYK

51                               100
ASNLHTGVPS RFSGSGSGTG FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GQTPYTFGG

101  107
GTKLEIK
    
```

h

Nombre de archivo: VLC 5.11 humanizado

```

1                                     15
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

16                                     30
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr

31                                     45
Val Trp Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

46                                     60
Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser

61                                     75
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

76                                     90
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

91                                     105
Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu

106 107
Ile Lys

```

Fig. 10 a

