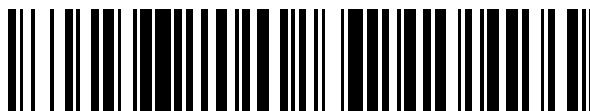


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 763**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2002 E 02020236 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 1400534**

54 Título: **Anticuerpo humano específico de CD3 con propiedades inmunosupresoras**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.02.2016

73 Titular/es:

**AFFIMED GMBH (100.0%)
Im Neuenheimer Feld 582
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**LE GALL, FABRICE;
KIPRIYANOV, M.SERGEY;
LITTLE, MELVYN y
REUSCH, UWE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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).

ES 2 559 763 T3

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo humano específico de CD3 con propiedades inmunosupresoras

5 La presente invención se refiere a anticuerpos scFv que comprenden los sitios de fijación específicos para el marcador CD3 de las células T humanas. Los anticuerpos de la invención son fuertemente inmunosupresores y no causan una liberación significativa de citocinas. La presente invención se refiere también a polinucleótidos que codifican dichos anticuerpos así como vectores que comprenden dichos polinucleótidos, células hospedadoras transformadas con ellos y su uso en la producción de dichos anticuerpos. Por último, la presente invención se refiere a composiciones, preferiblemente composiciones farmacéuticas, que comprenden cualquiera de los polinucleótidos arriba mencionados, anticuerpos o vectores. Las composiciones farmacéuticas son útiles para inmunoterapia, preferiblemente contra rechazos agudos de trasplantes.

15 OKT3, un mAb de IgG2a murino dirigido contra la cadena ϵ del complejo CD3 en los linfocitos T humanos (Salmerón et al., J. Immunol. 147 (1991), 3047-3052) producido por un hibridoma con el número de depósito ATCC de CRL 8001, se utiliza para prevenir el rechazo de tejidos después de trasplante renal y hepático, y proporciona un tratamiento alternativo para rechazos de trasplante que no responden a corticosteroides. In vivo, la administración de OKT3 induce una disminución espectacular en el número de células CD3⁺ circulantes a medida que el mismo modula en sentido decreciente el receptor de las células T (TCR). Sin embargo, pueden presentarse efectos adversos durante los primeros días de tratamiento. A menudo sigue fiebre intermitente a la administración de OKT3 y los pacientes sufren ocasionalmente de náusea, vómito, diarrea, disnea, respiración jadeante, y meningitis estéril. Muchos de estos efectos secundarios han sido atribuidos a la liberación de citocinas, especialmente por las células T. Después de un periodo de uso más prolongado, muchos pacientes desarrollan una respuesta de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA).

25 La fijación de OKT3 por sí sola es insuficiente para disparar las células T. La proliferación de células T que indica la liberación de citocinas como IL-2, IL-6, TNF- α e IFN- γ es resultado de la reticulación de las células T y células portadoras de FcR. Los receptores Fc de IgG humana (Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII) se distribuyen en los monocitos/macrófagos humanos, linfocitos B, células NK y granulocitos. Todos ellos se fijan a la región C γ 2 de IgG tanto de ratón como humana, difiriendo en su afinidad. La inmunogenicidad de dicho Ab anti-CD3 se ha reducido por utilización de anticuerpos quiméricos producidos a partir de los dominios variables de un mAb de ratón y las regiones constantes de un Ab humano. Para reducir la fijación a los receptores Fc, se han empleado dominios Fc de clases particulares de IgG humana o se han introducido mutaciones en el dominio Fc en las partes que se fijan a los receptores Fc. Sin embargo, las interacciones de los dominios Fc no pueden ser anuladas por completo y la eficacia de la actividad inmunosupresora no aumentó.

35 Kipriyanov et al. (Protein Engineering, vol. 10, 1997, p. 445-453) dan a conocer un anticuerpo Fv monocatenario y monovalente, en el cual las secuencias que codifican las regiones variables han sido obtenidas del hibridoma OKT3 específico anti-CD3.

40 Hirsch et al (Transplantation (1990) 49(6) 1117-1123) describen fragmentos anti CD3 F(ab')₂ administrados después de trasplante de piel, que suprimen el rechazo de aloinjertos cuando se administran en dosis múltiples e inducen una respuesta humoral más débil que el mAb anti-CD3 entero.

45 Así, el problema técnico que subyace en la presente invención era proporcionar medios más adecuados para prevención del rechazo de aloinjertos que resuelven las desventajas de los medios de la técnica anterior.

La solución de dicho problema técnico se consigue proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Se han construido anticuerpos que son más eficientes en la supresión de la activación y proliferación de las células T por regulación en sentido decreciente de la molécula CD3 pero que no causan una gran liberación de citocinas, evitando así muchos de los efectos secundarios desagradables. Estos anticuerpos comprenden únicamente los dominios variables de inmunoglobulina, denominados módulos F_v por medio de los cuales pueden evitarse las respuestas inmunes indeseables. El módulo F_v se forma por asociación de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, V_H y V_L, respectivamente. Realizaciones preferidas de estos anticuerpos están basadas únicamente en los dominios variables del anticuerpo OKT3, pero contienen una serina en lugar de una cisteína en la posición H100A de la cadena pesada (conforme al sistema de numeración de Kabat). Se ha demostrado previamente que esta mutación mejora la estabilidad de la molécula F_v monocatenaria (Kipriyanov et al. Protein Engineering, 10, 1997, 445-453). Sorprendentemente, tales anticuerpos, y en particular un anticuerpo bivalente en un formato denominado diacuerpo, tenía un efecto inmunosupresor mucho mayor, como se midió por regulación decreciente de CD3 e inhibición de la proliferación de las células T en una reacción de linfocitos mixtos (MLR) que el anticuerpo OKT3 original parental y, en contraste con el OKT3 parental, no causaba liberación significativa alguna de las citocinas IFN- α e IL-2.

65

Breve descripción de los dibujos**FIGURA 1: Representación esquemática de constructos de anticuerpos Fv monocatenarios mono- y multivalentes**

Diacuerpo: dímero scFv no covalente; scDb: diacuerpo monocatenario; scFv: fragmento de Fv monocatenario; (scFv)₂: dímero scFv-scFv. Los dominios V_H y V_L del anticuerpo se muestran como óvalos negros y grises, respectivamente.

FIGURA 2: Casetes de expresión para constructos scFv anti-CD3

His₆: Seis residuos histidina C-terminales; L: enlazador peptídico corto (la secuencia de aminoácidos se muestra en negrilla) que conecta los dominios V_H y V_L; conductor, secuencia conductora bacteriana (v.g., conductor PelB) para secreción de producto recombinante en el periplasma; rbs, sitio de fijación de ribosoma; stop: codón de parada (TAA); V_H y V_L: regiones variables de las cadenas pesada y ligera específicas para CD3 humano. Cuatro aminoácidos C-terminales del dominio V_H y cuatro aminoácidos N-terminales del dominio V_L están subrayados.

FIGURA 3: Diagrama del plásmido de expresión pSKK3-scFv6 OKt3

bla: gen de beta-lactamasa responsable de resistencia a la ampicilina; pb: pares de bases; CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3: secuencia codificante de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) 1-3 de la cadena pesada; CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3: secuencia codificante de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) 1-3 de la cadena ligera; enlazador H1-L6; secuencia que codifica el péptido de 6 aminoácidos Ser-Ala-Lys-Thr-Thr-Pro que conectan los dominios V_H y V_L; etiqueta His₆: secuencia que codifica seis residuos histidina C-terminales; hok-sok: locus de DNA estabilizador de plásmidos; lacI: gen codificante del represor lac; lac P/O: promotor/operador del operón lac de tipo salvaje; M13ori; región intergénica del bacteriófago M13; pBR322ori: origen de la replicación del DNA; conductor PelB: secuencia de péptido señal de la peptidato-liasa bacteriana; rbs1: sitio de fijación de ribosoma derivado del gen lacZ de E. coli (lacZ); rbs2 y rbs3: sitio de fijación de ribosoma derivado del gen 10 fuertemente expresado del bacteriófago T7 (T7g10); gen skp: gen codificante del factor periplásmico bacteriano Skp/OmpH; tHP: terminador fuerte de la transcripción; tLPP: terminador de la transcripción de lipoproteínas; V_H y V_L: secuencia codificante de la región variable de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina, respectivamente. Se indican los sitios de restricción singulares.

FIGURA 4: Análisis de anticuerpos scFv anti-CD3 purificados por electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio en poliácridamida al 12% (SDS-PAGE) en condiciones reductoras

Pista 1: marcadores M_r (kDa, M_r en miles); Pista 2: scFv₁₀ anti-CD3; Pista 3: scFv₆ anti-CD3. El gel se tiñó con Azul Coomassie.

FIGURA 5: Análisis de anticuerpos scFv purificados anti-CD3 por cromatografía de exclusión de tamaños en una columna Superdex 200 calibrada

Se indican las posiciones de elución de los estándares de masa molecular.

FIGURA 6: Análisis Lineweaver-Burk de dependencia de la fluorescencia con respecto a la concentración de anticuerpos como se determina por citometría de flujo

Se midió la fijación de mAb OKT3 (círculos), scFv₆ (triángulos) y scFv₁₀ (cuadrados) a células Jurkat CD3⁺.

FIGURA 7: Retención de anticuerpos anti-CD3 en la superficie de las células Jurkat CD3⁺ a 37°C

Se midió la retención en la superficie celular de mAb OKT3 (círculos), scFv₆ (triángulos) y scFv₁₀ (cuadrados) en células Jurkat CD3⁺. Los valores se expresan como porcentaje de la intensidad media inicial de fluorescencia.

FIGURA 8: Proliferación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) después de 24 horas de incubación en presencia de mAb OKT3 y anticuerpos scFv anti-CD3 a concentraciones de 0,01-10 µg/ml

Se sembraron PBMCs del donante A o el donante B sanos solos y un cultivo de linfocitos mixtos de PBMCs del donante A más B en placas de microtitulación a densidad de 2 x 10⁶ células/pocillo sin anticuerpos o en presencia de diluciones en serie de mAb OKT3, scFv₆ anti-CD3 y scFv₁₀ anti-CD3. Después de 24 horas de incubación, las células se pulsaron con 10 µM de BrdU durante 18 horas. La incorporación de BrdU se determinó por BrdU-ELISA. Se muestran los valores medios y las SDs de muestras triplicadas.

FIGURA 9: Proliferación de PBMC después de 72 horas de incubación en presencia de mAb OKT3 y anticuerpos scFv anti-CD3 a concentraciones de 0,01-10 µg/ml

Se sembraron PBMCs del donante A o el donante B sanos solos y un cultivo de linfocitos mixtos de PBMCs del donante A más B en placas de microtitulación a densidad de 2 x 10⁶ células/pocillo sin anticuerpos o en presencia de diluciones en serie de mAb OKT3, scFv₆ anti-CD3 y scFv₁₀ anti-CD3. Después de 72 horas de

incubación, las células se pulsaron con 10 μ M de BrdU durante 18 horas. La incorporación de BrdU se determinó por BrdU-ELISA. Se muestran los valores medios y las SDs de muestras triplicadas.

FIGURA 10: Liberación de IL-2 por PBMCs después de 24 horas de incubación en presencia de mAb OKT3 y anticuerpos scFv anti-CD3 a concentraciones de 0,01-10 μ g/ml

Se sembraron PBMCs del donante A o el donante B sanos solos y un cultivo de linfocitos mixtos de PBMCs del donante A más B en placas de 24 pocillos a una densidad de 2×10^6 células/pocillo sin anticuerpos o en presencia de diluciones en serie de mAb OKT3, scFv₆ anti-CD3 y scFv₁₀ anti-CD3. Después de 24 horas de incubación, se cosecharon muestras de los sobrenadantes de cultivo y se midió la concentración de IL-2 por ELISA. Se muestran los valores medios de muestras duplicadas.

FIGURA 11: Liberación de IFN- α por PBMCs después de 72 horas de incubación en presencia de mAb OKT3 y anticuerpos scFv anti-CD3 a concentraciones de 0,01-10 μ g/ml

Se sembraron PBMCs del donante A o el donante B sanos solos y un cultivo de linfocitos mixtos de PBMCs del donante A más B en placas de 24 pocillos a una densidad de 2×10^6 células/pocillo sin anticuerpos o en presencia de diluciones en serie de mAb OKT3, scFv₆ anti-CD3 y scFv₁₀ anti-CD3. Después de 72 horas de incubación, se cosecharon las muestras de los sobrenadantes de cultivo y se midió la concentración de IFN- α por ELISA. Se muestran los valores medios de muestras duplicadas.

FIGURA 12: Liberación de TNF- α por PBMCs después de 36 horas de incubación en presencia de mAb OKT3 y anticuerpos scFv anti-CD3 a concentraciones de 0,01-10 μ g/ml

Se sembraron PBMCs del donante A o el donante B sanos solos y un cultivo de linfocitos mixtos de PBMCs del donante A más B en placas de 24 pocillos a una densidad de 2×10^6 células/pocillo sin anticuerpos o en presencia de 0,1 μ g/ml y 0,01 μ g/ml de mAb OKT3, scFv₆ anti-CD3 y scFv₁₀ anti-CD3. Después de 36 horas de incubación, se cosecharon las muestras de los sobrenadantes de cultivo y se midió la concentración de TNF- α por ELISA. Se muestran los valores medios de muestras duplicadas.

FIGURA 13: Inducción de la expresión de IL-2R α (CD25) en células T después de 90 horas de incubación de cultivos de PBMC en presencia de mAb OKT3 y anticuerpos scFv anti-CD3 a concentraciones de 0,01-10 μ g/ml

Se sembraron PBMCs del donante A o el donante B sanos solos y un cultivo de linfocitos mixtos de PBMCs del donante A más B en placas de 24 pocillos a una densidad de 2×10^6 células/pocillo sin anticuerpos o en presencia de diluciones en serie de mAb OKT3, scFv₆ anti-CD3 y scFv₁₀ anti-CD3. Después de 90 horas de incubación, se detectó por citometría de flujo la expresión de CD25 utilizando mAb anti-CD25 B1.49.9. Se muestran los valores medios de intensidad de fluorescencia después de sustracción de la fluorescencia de fondo.

FIGURA 14: Modulación y recubrimiento de CD3 por mAb OKT3 y anticuerpos scFv anti-CD3

Se sembraron PBMCs del donante A o el donante B sanos en placas de 24 pocillos a una densidad de 2×10^6 células/pocillo sin anticuerpos o en presencia de diluciones en serie de mAb OKT3, scFv₆ anti-CD3 y scFv₁₀ anti-CD3. Después de 24 horas de incubación, las células se cosecharon y se tiñeron con mAb OKT3 anti-CD3 conjugado a FITC, mAb BMA031 anti-TCR α/β conjugado a PCS. Las células T se sometieron a contratinción con mAb anti-CD5 y se analizaron por citometría de flujo. Los datos para modulación de CD3 representan el porcentaje de complejos TCR/CD3 en la superficie de células T tratadas positivas a CD5 como fracción de complejos PCR/CD3 en la superficie de células T CD5-positivas sin tratar. El recubrimiento de CD3 se muestra como la fracción de complejos PCR/CD3 que no podía ser detectada por OKT3 conjugado a FITC.

FIGURA 15: (a) Secuencia de DNA del plásmido pSKK3-scFv6 anti-CD3; (b) secuencia de aminoácidos de V_H y V_L conectadas por el enlazador peptídico SAKTTP codificado por la secuencia de DNA contenida en pSKK3-scFv6 anti-CD3

Así pues, la presente invención se refiere a un anticuerpo que se caracteriza por los rasgos siguientes:

- (a) es capaz de reprimir una reacción inmune;
- (b) está desprovisto de regiones constantes de anticuerpo; y
- (c) es divalente o multivalente y fija un epítipo en el complejo CD3 del receptor de las células T.

El anticuerpo de la presente invención es específico para el complejo humano TCR/CD3 presente en todas las células T con indiferencia de su especificidad de MHC. Tal anticuerpo es capaz de reprimir los linfocitos T activados

sin liberación significativa alguna de citocinas inflamatorias, evitando así muchos de los efectos secundarios desagradables. La liberación de citocinas, v.g., IL-2, IFN- γ y TNF- α se reduce por un factor mayor que 100 comparada con OKT3. Esto está en contraste acusado con cualesquiera anticuerpos inmunosupresores conocidos. Aunque puede conseguirse inmunosupresión por la administración de tales anticuerpos tradicionales a humanos, su

5 eficacia se ve comprometida a menudo por dos factores: el síndrome de primera dosis resultante de la activación de las células T, y la respuesta anti-globulina (v.g. la respuesta HAMA) resultante de inyecciones múltiples de proteínas extrañas de origen no humano. Los síntomas de toxicidad por anticuerpos incluyen fiebre, escalofríos, diarrea y vómitos y en casos graves han dado como resultado la muerte. El síndrome está causado por la liberación de

10 citocinas inflamatorias como resultado de la activación transitoria de las células T. Dicha activación depende de la interacción de la porción Fc del anticuerpo y los receptores Fc (FcR) en células accesorias para reticular los complejos CD3 en las células T. La porción Fc de mAbs de origen murino es también la razón principal de la respuesta anti-globulinas. El anticuerpo de la presente invención está desprovisto de los dominios constantes de inmunoglobulina y, por esta razón, no es capaz de interaccionar con FcRs y es también mucho menos inmunógeno.

15 Los anticuerpos de la presente invención se pueden preparar por métodos conocidos por las personas expertas en la técnica, v.g. por los métodos siguientes:

(a) construcción de anticuerpos Fv monocatenarios por combinación de los genes que codifican al menos dos dominios variables V_H y V_L de inmunoglobulina, separados por enlazadores peptídicos o sin enlazador

20 alguno, en un constructo genético simple y expresión del mismo en bacterias u otro sistema de expresión apropiado.

(b) dimerización o multimerización no covalente de anticuerpos Fv monocatenarios que comprenden al menos dos V_H y V_L específicos para CD3 humano sea separados por enlazadores peptídicos o sin enlazador

25 alguno, en una orientación que evita su apareamiento intramolecular.

El término "capaz de reprimir una reacción inmune" significa que el anticuerpo es capaz, por una parte, de prevenir la activación de los linfocitos T por un aloantígeno extraño y, por otra parte, de agotar selectivamente las células T ya activadas.

30

El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo bivalente o multivalente.

En una realización preferida, el anticuerpo de la presente invención es un dímero no covalente de un anticuerpo Fv monocatenario (scFv) ("diacuerpo"; véase Figura 1) que comprende dominios V_H y V_L específicos de CD3, sea

35 separados por enlaces peptídicos o sin enlazador alguno.

En una realización preferida adicional, el anticuerpo de la presente invención comprende dos anticuerpos Fv monocatenarios (scFv) (véase Figura 1) que comprenden dominios V_H y V_L específicos de CD3.

40 En una realización preferida adicional, el anticuerpo de la presente invención es un diacuerpo monocatenario (véase Figura 1) que comprende dominios V_H y V_L específicos de CD3.

El término "anticuerpo Fv" como se utiliza en esta memoria, se refiere a un anticuerpo que contiene dominios variables pero carece de dominios constantes. El término "enlazador peptídico" como se utiliza en esta memoria se refiere a cualquier péptido capaz de conectar dos dominios variables, dependiendo su longitud de las clases de dominios variables a conectar. El enlazador peptídico podría contener cualquier residuo de aminoácido, aunque se

45 prefieren las combinaciones de aminoácidos SAKTTP o SAKTTPKLGG. El enlazador peptídico que conecta scFv simple o (scFv)₂ y diacuerpos monocatenarios (scDb) podría contener cualquier residuo de aminoácido, aunque se prefieren de 1 a 3 repeticiones de la combinación de aminoácidos GGGGS para (scFv)₂ y 3 a 4 repeticiones de GGGGS para scDb.

50

En una realización más preferida, el anticuerpo de la presente invención contiene dominios variables correspondientes sustancialmente a los dominios variables del anticuerpo producido por el hibridoma de ATCC número de depósito CRL 8001.

55

En una realización aún más preferida, el anticuerpo de la presente invención se caracteriza por que una cisteína en la posición H100A (sistema de numeración de Kabat) ha sido reemplazada por otro aminoácido, preferiblemente por una serina.

60 La presente invención se refiere también a un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente invención y vectores, preferiblemente vectores de expresión que contienen dichos oligonucleótidos. Los vectores recombinantes pueden construirse conforme a métodos bien conocidos por las personas expertas en la técnica; véase, v.g., Sambrook, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), N.Y.

Pueden utilizarse una diversidad de sistemas de expresión vector/hospedador que contienen y expresan secuencias que codifican el anticuerpo de la presente invención. Éstas incluyen, pero sin carácter limitante, microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófago recombinante, plásmido, o vectores de expresión de DNA de cósmidos; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus (v.g. baculovirus); sistemas de células vegetales transformados con vectores de expresión de virus (v.g. el virus del mosaico de la coliflor, CaMV); el virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacterianos (v.g., plásmidos Ti o pBR322); o sistemas de células animales.

Los "elementos de control" o "secuencias reguladoras" son aquellas regiones no traducidas de los intensificadores vectoriales, promotores, regiones 5' y 3' no traducidas que interaccionan con proteínas celulares hospedadoras para llevar a cabo la transmisión y la traducción. Tales elementos pueden variar en su resistencia y especificidad. Dependiendo del sistema vector y el hospedador utilizados, puede utilizarse cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados, con inclusión de promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se trata de clonación en sistemas bacterianos, pueden utilizarse promotores inducibles tales como el promotor híbrido lacZ del fagémido Bluescript.RTM (Stratagene, LaJolla, Calif.) o el plásmido pSport1.TM. (Gibco BRL) y análogos. El promotor polihedrina de baculovirus puede utilizarse en células de insecto. Promotores o intensificadores derivados de los genomas de células de plantas (v.g., choque térmico, RUBISCO; y genes de proteínas de almacenamiento) o de virus de plantas (v.g., promotores virales o secuencias conductoras) pueden clonarse en el vector. En sistemas de células de mamífero, son preferibles promotores de genes de mamífero o de virus de mamífero. Si es necesario generar un linaje de células que contenga copias múltiples de la secuencia que codifica el anticuerpo multímero multivalente, se pueden utilizar vectores basados en SV40 o EBV con un marcador seleccionable apropiado.

En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse cierto número de vectores de expresión dependiendo del uso propuesto para el anticuerpo de la presente invención. Vectores adecuados para uso en la presente invención incluyen, pero sin carácter limitante, el vector de expresión pSKK para expresión en bacterias.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, puede utilizarse cierto número de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol-oxidasa, y PGH; para revisiones, véase Grant et al. (1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544.

En casos en que se utilizan vectores de expresión de plantas, la expresión de secuencias que codifican el anticuerpo de la presente invención puede ser impulsada por cualquiera de cierto número de promotores. Por ejemplo, promotores virales tales como los promotores 35S y 19S de CaMV, pueden utilizarse solos o en combinación con la secuencia conductora omega de TMV Takamatsu, N. (1987) *EMBO J* 6:307-311). Alternativamente, pueden utilizarse promotores de plantas tales como la subunidad pequeña de RUBISCO o promotores del choque térmico (Coruzzi, G. et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680; Broglie, R. et al. (1984) *Science* 224:838-843; y Winter, J. et al. (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105). Estos constructos pueden introducirse en células de plantas por transformación directa de DNA o transfección mediada por patógenos. Tales técnicas se describen en numerosas revistas disponibles generalmente (véase, por ejemplo, Hobbs, S. y Murry, L. E. en McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, Nueva York, N.Y.; pp. 191-196.

Puede utilizarse también un sistema de insecto para expresar los anticuerpos de la presente invención. Por ejemplo, en un sistema de este tipo, se utiliza el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños en células de *Spodoptera frugiperda* o en *Trichoplusia larvae*. Las secuencias que codifican dichos anticuerpos pueden clonarse en una región no esencial del virus, tal como el gen de polihedrina, y ponerse bajo control del promotor polihedrina. La inserción con éxito del gen que codifica dicho anticuerpo hará inactivo el gen de polihedrina y producirá virus recombinante que carece de la proteína de la cubierta. Los virus recombinantes pueden utilizarse luego para insertar, por ejemplo, células de *S. frugiperda* o *Trichoplusia larvae* en las cuales puede expresarse APOP (Engelhard, E.K. et al. (1994) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91:3224-3227).

En células hospedadoras de mamífero, pueden utilizarse cierto número de sistemas de expresión basados en virus. En casos en que se utiliza un adenovirus como vector de expresión, las secuencias que codifican un anticuerpo de la presente invención pueden ligarse a un complejo de transcripción/traducción de adenovirus constituido por el promotor tardío y la secuencia conductora tripartita. La inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma viral puede utilizarse para obtener un virus viable que es capaz de expresar el anticuerpo en células hospedadoras infectadas (Logan, J. y Shenk, T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:3655-3659). Adicionalmente, pueden utilizarse intensificadores de la transcripción, tales como el intensificador del virus del sarcoma de Rous (RSV), para aumentar la expresión en células hospedadoras de mamífero.

Pueden emplearse también cromosomas humanos artificiales (HACs) para suministrar fragmentos mayores de DNA que pueden estar contenidos y expresados en un plásmido. HACs de 6 a 10M se construyen y se suministran por métodos de suministro convencionales (liposomas, amino-polímeros policatiónicos, o vesículas) para propósitos terapéuticos.

Pueden utilizarse también señales de iniciación específicas para conseguir una traducción más eficiente de secuencias que codifican el anticuerpo de la presente invención. Dichas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En casos en que se insertan secuencias que codifican el anticuerpo, su codón de iniciación, y secuencias aguas arriba se insertan en el vector de expresión apropiado, pueden no ser necesarias señales adicionales de control de la transcripción o traducción. Sin embargo, en el caso en que se inserta solamente la secuencia codificante, deberían proporcionarse señales exógenas de control de la traducción que incluyen el codón de iniciación ATG. Adicionalmente, el codón de iniciación debería encontrarse en el marco de lectura correcto para asegurar la traducción de la inserción entera. Los elementos de traducción y codones de iniciación exógenos pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de expresión puede mejorarse por la inclusión de intensificadores que son apropiados para el sistema de células particular que se utilice, tales como los descritos en la bibliografía (Scharf, D. et al. (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20: 125-162).

Adicionalmente, puede seleccionarse una cepa de células hospedadoras por su capacidad de modular la expresión de las secuencias insertadas o de procesar las cadenas de anticuerpo expresadas de la manera deseada. El procesamiento posterior a la traducción que escinde una forma "prepro" de la proteína puede utilizarse también para facilitar la inserción, el plegamiento y/o la función correctas. Células hospedadoras diferentes que tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para actividades posteriores a la traducción (v.g., CHO, HeLa, MDCK, HEK293 y W138), están disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC; Bethesda, Md.) y pueden seleccionarse para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de las cadenas de anticuerpo extrañas.

Para producción a largo plazo y con alto rendimiento de anticuerpos recombinantes, se prefiere expresión estable. Por ejemplo, linajes de células que expresan de manera estable el anticuerpo pueden transformarse utilizando vectores de expresión que pueden contener orígenes virales de replicación y/o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable en el mismo vector o en un vector separado. A continuación de la introducción del vector, las células pueden dejarse crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiar las mismas a un medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de células que expresan satisfactoriamente las secuencias introducidas. Clones resistentes de células transformadas de manera estable pueden proliferar utilizando técnicas de cultivo de tejidos apropiadas para el tipo de célula.

Puede utilizarse cualquier número de sistemas de selección para recuperar linajes de células transformados. Éstos incluyen, pero sin carácter limitante, los genes de timidina-quinasa del virus del herpes simple (Wigler, M. et al. (1977) *Cell* 11: 223-32) y de adenina-fosforibosiltransferasa (Lowy, I. et al. (1980) *Cell* 22: 817-23), que pueden emplearse en células tk.sup.- o aprt.sup., respectivamente. Asimismo, pueden utilizarse la resistencia a antimetabolitos, antibióticos o herbicidas como una base para selección; por ejemplo, dhfr que confiere resistencia a metotrexato (Wigler, M. et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 3567-70); npt, que confiere resistencia a los aminoglicosidos neomicina y G-418 (Colbere-Garatin, F. et al. (1981) *J. Mol. Biol.* 150: 1-14) y als o pat, que confieren resistencia a clorosulfurón y fosfinotricina-acetiltransferasa, respectivamente (Murry, supra). Se han descrito genes seleccionables adicionales, por ejemplo, trpB, que permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano, o hisD, que permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina (Hartman, S.C. y R.D. Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 8047-51). Recientemente, ha ganado popularidad el uso de marcadores visibles con marcadores tales como antocianinas, beta-glucuronidasa y su sustrato GUS, y luciferasa y su sustrato luciferina, que se utilizan ampliamente no sólo en la identificación de transformantes, sino también para cuantificar la cantidad de expresión de proteínas transitoria o estables atribuible a un sistema vector específico (Rhodes, C.A. et al. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131).

Un vector de expresión preferido particular es pSKK3-scFv6_anti-CD3 depositado con la DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen) conforme al Tratado de Budapest bajo DSM 15137 en 16 de agosto de 2002.

La presente invención se refiere también a una composición que contiene un anticuerpo, polinucleótido o un vector de expresión de la presente invención. Preferiblemente, dicha composición es una composición farmacéutica combinada preferiblemente con un portador farmacéutico adecuado. Ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Tales portadores pueden formularse por métodos convencionales y se pueden administrar al individuo en una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas puede efectuarse por vías diferentes, v.g., por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. La ruta de administración, por supuesto, depende de la clase de terapia y la clase del compuesto contenido en la composición farmacéutica. El régimen de dosificación será determinado por el médico que atiende al caso y otros factores clínicos. Como es bien conocido en las técnicas médicas, las dosis para cualquier paciente determinado dependen de muchos factores, que incluyen el volumen del paciente, el área de la superficie corporal, la edad, el sexo, el

compuesto particular a administrar, el tiempo y la ruta de administración, la clase de terapia, el estado general de salud y otros fármacos que se administren concurrentemente.

Un uso médico preferido de los compuestos de la presente invención arriba descritos en los que el anticuerpo es bivalente o multivalente es la inmunoterapia, preferiblemente una terapia contra rechazos agudos de trasplantes y posiblemente contra enfermedades autoinmunes, tales como diabetes tipo I, esclerosis múltiples y artritis reumatoide.

Los ejemplos que siguen explican la invención con mayor detalle.

Ejemplo 1: Construcción de los plásmidos pHOG-scFv10/anti-CD3, pHOG-scFv6/anti-CD3, pSKK3-scFv10/anti-CD3 y pSKK3-scFv6/anti-CD3 para la expresión de anticuerpos anti-CD3 scFv₁₀ y scFv₆ en bacterias

Para construcción de los genes que codifican anti-CD3 scFv₁₀ y scFv₆ (Figura 2), se utilizó el plásmido pHOG21-dmOKT3 que contenía el gen para CD3 scFv₁₈ anti-humano (Kipriyanov et al., 1997, Protein Engineering 10, 445-453). Para facilitar los procedimientos de clonación, se introdujo un sitio de restricción NotI en el plásmido pHOG21-dmOKT3 por amplificación PCR del gen scFv₁₈ utilizando los cebadores Bi3sk, 5'-CAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAACTGCAGCAG y Bi9sk, 5'-GAAGATGGATCCAGCGGCCGCAGTATCAGCCCGGTT. El fragmento PCR de 776 pares de bases resultante se digirió con NcoI y NotI y se clonó en el vector pHOG21-CD19 linealizado con NcoI/NotI (Kipriyanov et al., 1996, J. Immunol Methods 196, 51-62), generando así el plásmido pHOG21-dmOKT3 + Not. El gen codificante del dominio OKT3 V_H con una sustitución Cys-Ser en la posición 100A, conforme al esquema de numeración de Kabat (Kipriyanov et al., 1997, Protein Engineering 10, 445-453) se amplificó por PCR con los cebadores DP1, 5'-TCACACAGAATTCTTAGATCTATTAAGAGGAGAAATTAACC y DP2, 5'-AGCACACGATATCACCGCCAAGCTTGGGTGTTGTTTGGC u OKT_5, 5'-TATTAAGATATCGGGTGTGTTTGGCTGAGGAG, para generar los genes para V_H seguido por enlazadores de 10 y 6 aminoácidos, respectivamente (Figura 2). Los fragmentos PCR de 507 pb y 494 pb resultantes se digirieron con NcoI y EcoRV y se clonaron en el plásmido pHOG21-dmOKT3 + Not linealizado con NcoI/EcoRV, generando así los plásmidos pHOG21-scFv10/anti-CD3 y pHOG21-scFv6/anti-CD3, respectivamente.

Para aumentar el rendimiento de anticuerpos funcionales scFv en el periplasma bacteriano, se generó un vector de expresión optimizado pSKK3 (Figura 3). Este vector se construyó sobre la base del plásmido pHKK (Horn et al., 1996, Appl. Microbiol. Biotechnol. 46, 524-532) que contenía el sistema suicida hok/sok de células exentas de plásmidos (Thisted et al., 1994, EMBO J. 13, 1960-1968). En primer lugar, el gen codificante del híbrido scFv V_H3-V_L19 se amplificó por PCR a partir del plásmido pHOG3-19 (Kipriyanov et al., 1998, Int. J. Cancer 77, 763-772) utilizando los cebadores 5-NDE, 5'-GATATACATATGAAATACCTATTGCCTACGGC, y 3-AFL, 5'-CGAATTCTTAAGTTAGCACAGGCCTCTAGAGACACACAGATCTTTAG. El fragmento PCR de 921 pares de bases resultante se digirió con NdeI y AflII, y se clonó en el plásmido pHKK linealizado con NdeI/AflII generando el vector pHKK3-19. Para delecionar un sitio XbaI adicional, un fragmento de plásmido pHKK que contenía la parte 3'-terminal del gen lacI (que codifica el represor lac), el terminador tHP fuerte de la transcripción y el promotor/operador lac de tipo salvaje se amplificó por PCR utilizando los cebadores 5-NAR, 5'-CACCTGGCGGCCAATACGCAAACCGCC, y 3-NDE, 5'-GGTATTTTATATGTATATCTCCTTCTTCAGAAATTCGTAATCATGG. El fragmento de DNA de 329 pb resultante se digirió con NarI y NdeI y se clonó en el plásmido pHKK3-19 linealizado con NarI/NdeI generando el vector pHKK3-Xba. Para introducir un gen codificante del factor periplásmico Skp/OmpH para mayor producción de anticuerpos recombinantes (Bothmann y Pluckthun, 1998, Natl. Biotechnol. 16, 376-380), se amplificó el gen skp por PCR con cebadores skp-3, 5'-CGAATTCTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAAAGTGTTATTAGCTGCAGG y skp-4, 5'-CGAATTCTCGAGCATTATTTAACCTGTTTCAGTACGTCGG utilizando como molde el plásmido pGAH317 (Holck y Kleppe, 1988, Gene 67, 117-124). El fragmento PCR de 528 pb resultante se digirió con AflII y XhoI y se clonó en el plásmido pHKK3-Xba digerido con AflII/XhoI dando como resultado el plásmido de expresión pSKK2. Para eliminación de la secuencia codificante del epítipo c-nyc potencialmente inmunógeno, se utilizó el plásmido pSKK2 linealizado con NcoI/XbaI para clonación del fragmento PCR de 902 pares de bases digerido con NcoI/XbaI, que codificaba el scFv pHox31E (Marks et al., 1997, Biotechnology 10, 779-783), que se amplificó con cebadores DP1 y His-Xba, 5'-CAGGCCTCTAGATTAGTGATGGTGATGGTGATGGG. El plásmido pSKK3 resultante se digirió con NcoI y NotI se utilizó como vector para clonación de los genes codificantes de anti-CD3 scFv₆ y scFv₁₀, que se aislaron como fragmentos de DNA de 715 pb y 717 pb después de digestión de los plásmidos pHOG21-scFv6/anti-CD3 y pHOG21-scFv10/anti-CD3, respectivamente, con NcoI y NotI.

Los plásmidos generados pSKK3-scFv6/anti-CD3 (Figura 3) y pSKK3-scFv10/anti-CD3 tienen varias características que mejoran la eficiencia del plásmido y conducen a acumulación incrementada de producto funcional bivalente en el periplasma de E. coli en condiciones tanto de cultivo en matraces de sacudidas como de fermentación de alta densidad de células. Éstas son el sistema destructivo hok/sok post-segregación, que previene la pérdida de plásmido, sitios de fijación fuerte de ribosoma en tándem y un gen codificante del factor periplásmico Skp/OmpH, que aumenta el rendimiento funcional de fragmentos de anticuerpo en bacterias. La casete de expresión se encuentra bajo el control de transcripción del sistema promotor/operador lac de tipo salvaje e incluye una secuencia

corta que codifica el péptido N-terminal de β -galactosidasa (lacZ') con un primer rbs derivado del gen lacZ de *E. coli*, seguido por genes codificantes del anticuerpo scFv y el vector periplásmico Skp/OmpH bajo el control de traducción de rbs fuerte del gen 10 del fago T7 (T7g10). Además, el gen del anticuerpo scFv va seguido por una secuencia de nucleótidos que codifica 6 residuos histidina tanto para inmunodetección como para purificación del producto recombinante por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC).

Ejemplo 2: Producción en bacterias y purificación de los anticuerpos scFv

La cepa RV308 de *E. coli* K12 (Δ lacX 74 gall SII::OP308strA) (Maurer et al., 1980, J. Mol. Biol. 139, 147-161) (ATCC 31608) se utilizó para expresión funcional de anticuerpos scFv. Las bacterias transformadas con los plásmidos de expresión pSKK3-scFv6/anti-CD3 y pSKK3-scFv10/anti-CD3, respectivamente, se dejaron crecer durante una noche en medio 2xYT con 100 μ g/ml de ampicilina y glucosa 100 mM (2xYT_{GA}) a 26°C. Los cultivos nocturnos se diluyeron en medio 2xYT_{GA} nuevo hasta densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,1 y continuaron creciendo como cultivos en matraz a 26°C con sacudidas enérgicas (180-220 rpm) hasta que la DO₆₀₀ alcanzó 0,6-0,8. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 5.000 g durante 10 minutos a 20°C y se resuspendieron en el mismo volumen de medio YTBS nuevo (2xYT que contenía sorbitol 1M, glicina-betaína 2,5 mM y 50 μ g/ml de ampicilina). Se añadió isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0,2 mM y se continuó el crecimiento a 21°C durante 14-16 horas. Las células se cosecharon por centrifugación a 9.000 g durante 20 min a 4°C. Para aislar las proteínas periplásmicas solubles, las bacterias peletizadas se resuspendieron en 5% del volumen inicial de Tris-HCl 200 mM enfriado en hielo, 20% de sacarosa, EDTA 1 mM, pH 8,0. Después de 1 hora de incubación en hielo con agitación ocasional, los esferoplastos se centrifugaron a 30.000 g durante 30 min y 4°C dejando el extracto periplásmico soluble como sobrenadante y los esferoplastos más el material periplásmico insoluble como el sedimento. El extracto periplásmico se dializó concienzudamente contra Tris-HCl 50 mM, NaCl 1 M, pH 7,0, y se utilizó como material de partida para aislamiento de anticuerpos scFv. El producto recombinante se concentró por precipitación con sulfato de amonio (concentración final 70% de la saturación). El precipitado de proteínas se recogió por centrifugación (10.000 g, 4°C, 40 min) y se disolvió en 10% del volumen inicial de Tris-HCl 50 mM, NaCl 1 M, pH 7,0, seguido por diálisis concienzuda contra el mismo tampón. Se realizó u a cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) a 4°C utilizando una columna de 5 ml de Chelating Sepharose (Amersham Pharmacia, Freiburg, Alemania) cargada con Cu²⁺ y equilibrada con Tris-HCl 50 mM, NaCl 1 M, pH 7,0 (tampón inicial). La muestra se cargó por paso de la misma a través de la columna por flujo de gravedad. La columna se lavó luego con 20 volúmenes de columna de tampón inicial seguido por tampón inicial que contenía imidazol 50 mM hasta que la absorbancia (a 280 nm) del efuente era mínima. (aproximadamente 30 volúmenes de columna). El material absorbido se eluyó con Tris-HCl 50 mM, NaCl 1 M, imidazol 300 mM, pH 7,0, como fracciones de 1 ml. Las fracciones eluidas que contenían proteína recombinante se identificaron por reducción con SDS-PAGE al 12% seguida por tinción con Coomassie. Las fracciones positivas se reunieron y se sometieron a intercambio de tampón por imidazol-HCl 50 mM, NaCl 50 mM (pH 7,0) utilizando columnas PD-10 pre-compactadas (Pharmacia Biotech, Freiburg, Alemania). La turbidez de la solución de proteínas se eliminó por centrifugación (30.000 g, 1 h, 4°C).

La purificación final se realizó por cromatografía de intercambio iónico en una columna MonoShr 5/5 (Amersham Pharmacia Freiburg, Alemania) en imidazol-HCl 50 mM, pH 7,0, con un gradiente lineal de NaCl 0,05-1 M. Las fracciones que contenían el anticuerpo scFv se concentraron con intercambio simultáneo de tampón por PBS que contenía imidazol 50 mM, pH 7,0 (tampón PBS), utilizando un dispositivo de filtración centrífugo Ultrafree-15 (Millipore, Eschdori, Alemania). Las concentraciones de proteínas se determinaron por el ensayo de fijación de tinte de Bradford (Bradford, 1976, Anal. Biochem., 72, 348-254) utilizando el kit de ensayo de proteínas Bio-Rad (Munich, Alemania). El análisis SDS-PAGE demostró que anti-CD3 scFv₁₀ y scFv₆ migraban como bandas simples una base molecular (M_r) de aproximadamente 30 kDa (Figura 4). La cromatografía de exclusión de tamaños en una columna Superdex 200 HR10/30 calibrada (Amersham, Pharmacia) demostró que scFv₆ se encontraba principalmente en forma dímera con M_r alrededor de 60 kDa, mientras que scFv₁₀ era monómero puro (Figura 5).

Ejemplo 3: Medidas de fijación de células

Se utilizó el linaje de células de leucemia de las células T humanas CD3+ Jurkat para experimentos de citometría de flujo. Las células se cultivaron en medio RPMI 640 suplementado con suero de ternero fetal (FCS) al 10% desactivado por calentamiento, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina G sódica y 100 μ g/ml de sulfato de estreptomicina (todos ellos de Invitrogen, Groningen, Países Bajos) a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂. Se incubaron 1 x 10⁶ células con 0,1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, Invitrogen, Groningen, Países Bajos) suplementadas con 2% de suero de ternero fetal (FCS, Invitrogen, Groningen, Países Bajos) desactivado por calentamiento y 0,1% de acida de sodio (Roth, Karlsruhe, Alemania) (a lo que se hace referencia como tampón FACS) que contenía anticuerpos scFv diluidos o mAb OKT3 (Orthoclone OKT3, Cilag, Sulzbach, Alemania) durante 45 min en hielo. Después de lavado con tampón FACS, se incubaron las células con 0,1 ml de anti-(His)6 mAb de ratón, 13/45/31-2 de 0,01 mg/ml (Dianova, Hamburgo, Alemania) en el mismo tampón durante 45 min en hielo. Después de un segundo ciclo de lavado, se incubaron las células con 0,1 ml de IgG anti-ratón de cabra conjugada con FITC de 0,015 mg/ml (Dianova, Hamburgo, Alemania) en las mismas condiciones que anteriormente. Se lavaron luego de nuevo las células y se resuspendieron en 0,5 ml de tampón FACS que contenía 2 μ g/ml de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania) para excluir las células muertas. La fluorescencia de 1 x

10⁴ células teñidas se midió utilizando un citómetro de flujo Beckman-Coulter Epics XL (Beckman-Coulter, Krefeld, Alemania). La fluorescencia media (F) se calculó utilizando software System-II y Expo32 (Beckman-Coulter, Krefeld, Alemania) y se sustrajo la fluorescencia de fondo. Las constantes de disociación de equilibrio (K_d) se determinaron por ajuste de los valores experimentales a la ecuación de Lineweaver-Burk: $1/F = 1/F_{\max} + (K_d/F_{\max}) (1/[Ab])$ utilizando el programa de software PRISM (GraphPad Software, San Diego, CA).

Los experimentos de citometría de flujo demostraron una interacción específica de anticuerpos scFv con las células Jurkat que expresan CD3 en su superficie. Las intensidades de fluorescencia obtenidas para scFv₆ eran significativamente mayores que para scFv₁₀, reflejando la diferencia de 10 veces en valores de afinidad para estos dos anticuerpos scFv (Figura 6, Tabla 1). El valor de afinidad deducido para scFv₆ estaba muy próximo al de mAb OKT3, confirmando así la fijación bivalente de scFv₆ a la superficie de la célula.

Ejemplo 4: Retención en la superficie celular in vitro

Para investigar la relevancia biológica de las diferencias entre scFv₆, scFv₁₀ y OKT3 en experimentos de fijación directa, se determinó la retención in vitro de los anticuerpos scFv en la superficie de las células Jurkat CD3⁺ por citometría de flujo (Figura 7). Los ensayos de retención de la superficie celular se realizaron a 37°C en condiciones que evitaban la internalización de los antígenos de la superficie celular, como se ha descrito (Adams et al., 1998, Cancer Res. 58, 485-490, excepto que la detección de los anticuerpos scFv retenidos se realizó utilizando anti-(His)6 mAb 13/45/31-2 de ratón (0,01 mg/ml; Dianova, Hamburgo, Alemania) seguido por IgG anti-ratón de cabra conjugada a FITC (0,015 mg/ml; Dianova, Hamburgo, Alemania). Los valores de la constante cinética de disociación (k_{off}) y semivida ($t_{1/2}$) para la disociación de los anticuerpos se dedujeron de un ajuste de desintegración exponencial monofásica de datos experimentales utilizando el programa de software PRISM (GraphPad Software, San Diego, CA). El scFv₁₀ monovalente tenía una semivida de retención relativamente corta (1,02 min), mientras que scFv₆ y OKT3 tenían $t_{1/2}$ 1,5 veces y 2,5 veces mayor, respectivamente, lo que se correlacionaba bien con sus mayores afinidades de fijación deducidas de los experimentos de fijación directa (Figura 7, Tabla 1).

Tabla 1

Afinidad y cinética de la fijación de los anticuerpos anti-CD3 a las células CD3 ⁺ Jurkat			
Anticuerpo	K_d (nM)	k_{off} (s ⁻¹ /10 ⁻³)	$t_{1/2}$ (min)
mAb OKT3	2,06	4,47	2,59
scFv ₆	4,58	7,82	1,48
scFv ₁₀	51,92	11,33	1,02

Las constantes de disociación (K_d) se dedujeron de gráficas de Lineweaver-Burk representadas en la Figura 6. Los valores k_{off} se dedujeron de experimentos de retención en la superficie de las células Jurkat representados en la Figura 7. Los valores de semivida ($t_{1/2}$) para los complejos de disociación anticuerpo-antígeno se dedujeron de la ratio $\ln 2/k_{\text{off}}$.

Ejemplo 5: Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Se aislaron PBMCs humanos de la sangre periférica heparinizada de individuos voluntarios sanos por centrifugación en gradiente de densidad. Las muestras de sangre se diluyeron dos veces con PBS (Invitrogen, Groningen, Países Bajos), se estratificaron en un cojín de Histopaque-1077 (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Alemania) y se centrifugaron a 800 g durante 25 min. Los PBMCs localizados en la interfase se recogieron y se lavaron tres veces con PBS antes de su utilización.

Ejemplo 6: Ensayo de proliferación de células

PBMCs aislados se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FCS desactivado por calentamiento, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de sal sódica de penicilina G y 0,1 mg/ml de sulfato de estreptomycin (todos ellos de Invitrogen, Groningen, Países Bajos) y se pusieron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos con fondo plano (Greiner, Frickenhausen, Alemania) a una densidad de 2×10^5 células por pocillo. Se incubaron triplicados de los cultivos con tinciones seriadas de anticuerpos solubles a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ durante el tiempo indicado, seguido por 18 horas de pulsación con 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) 0,01 mM. La incorporación de BrdU se determinó por ELISA de Proliferación Celular (Roche, Mannheim, Alemania) conforme a las instrucciones de los fabricantes.

A lo largo de la incubación durante 24-36 horas, ni scFv₆ ni scFv₁₀ inducían proliferación tanto de cultivos autólogos (donante A solo y donante B solo, respectivamente, como de cultivos de linfocitos mixtos (donante A+B). En

contraste, mAb OKT3 demostraba alta actividad mitogénica para todos los cultivos de 24 horas testados, debido evidentemente a reticulación de CD3 por células portadoras de FcγR (Figura 8).

La proliferación de células T inducida por OKT3 era significativamente mayor en los cultivos de PBMC autólogos incubados durante 72-90 horas, mientras que scFv₆ y scFv₁₀ demostraban sólo efectos menores en comparación con la incubación de 24 horas (Figura 9). En los cultivos mixtos de PBMC (donante A+B) incubados durante 72 horas sin tratamiento con anticuerpo, se desarrollaba una reacción de linfocitos mixtos (MLR). El tratamiento de los cultivos de PBMC mixtos con OKT3 no tenía efecto alguno sobre la MLR, mientras que ambos anticuerpos scFv eran capaces de reprimir la MLR de una manera dependiente de la concentración, alcanzando así el nivel de ruido de fondo a una concentración de 10 µg/ml (Figura 9).

Ejemplo 7: Análisis de la liberación de citocinas

Para medida de la secreción de citocinas por los linfocitos activados, se extendieron en placas 2 x 10⁶ PBMCs en pocillos individuales de placas de 24 pocillos (Greiner, Frickenhausen, Alemania) en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FCS desactivado por calentamiento, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de sal sódica de penicilina G y 0,1 mg/ml de sulfato de estreptomicina (todos ellos de Invitrogen, Groningen, Países Bajos) junto con los anticuerpos indicados. Para la determinación de la secreción de IL-2, TNF-α e IFN-γ, se recogieron partes alícuotas de los sobrenadantes de cultivo después de 24 horas, 36 horas y 72 horas, respectivamente. Los niveles de citocinas se midieron por duplicado utilizando los kits ELISA disponibles comercialmente para IL-2 (Pharmingen, San Diego, CA), TNF-α e IFN-γ (Endogen, Cambridge, MA).

En ambos cultivos de PBMC, tanto autólogos como mixtos, OKT3 inducía una liberación fuerte de IL-2 (Figura 10), IFN-γ (Figura 11) y TNF-α (Figura 12). En contraste, los cultivos autólogos de PBMC tratados con scFv₆ y scFv₁₀, respectivamente, no producían IL-2 (Figura 10), IFN-γ (Figura 11) y TNF-α (Figura 12). Los cultivos de linfocitos mixtos incubados sin anticuerpos demostraban liberación de cantidades significativas de citocinas como resultado de la estimulación alogénica. Esta secreción de IL-2 e IFN-γ podía ser reprimida por anticuerpos scFv de una manera dependiente de la dosis (Figuras 10 y 11). Los scFv₆ bivalentes demostraban una eficacia aproximadamente 10 veces mayor que scFv₁₀. En contraste, mAb OKT3 tenía más bien inducción que supresión de la liberación de citocinas en los cultivos mixtos de PBMC.

Ejemplo 8: Alteración de los antígenos de superficie en PBMCs tratados con anticuerpos anti-CD3

Para determinación de la expresión en la superficie celular de la subunidad alfa del receptor IL-2 (CD25) como marcador precoz de activación, se extendieron en placa 2 x 10⁶ PBMCs en pocillos individuales de placas de 24 pocillos (Greiner, Frickenhausen, Alemania) en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FCS desactivado por calentamiento, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de sal sódica de penicilina G y 0,1 mg/ml de sulfato de estreptomicina (todos ellos de Invitrogen, Groningen, Países Bajos) junto con los anticuerpos indicados. Las células se cosecharon después de 90 horas de incubación y se tiñeron para análisis por citometría de flujo con mAb B1.49.9 anti-CD25 conjugado a PE y con los controles isotipo correspondientes (todos ellos de Beckman-Coulter, Krefeld, Alemania), como se describe en el Ejemplo 3. Se analizaron 10⁴ linfocitos con un citómetro de flujo Beckman-Coulter, Epics XL (Beckman-Coulter, Krefeld, Alemania). Se calculó la fluorescencia media (F) utilizando software System-II (Beckman-Coulter, Krefeld, Alemania), y se sustrajo la fluorescencia de fondo.

Los PBMCs que se cultivaron en presencia de OKT3 exhibían una regulación creciente fuerte del marcador precoz de activación IL-2Rα (CD25) en su superficie, como se determinó por citometría de flujo (Figura 12). En contraste, ninguno de los cultivos de PBMC tratados con scFv₆ o scFv₁₀ exhibía niveles elevados de expresión de CD25 (Figura 13). Así pues, estos resultados demuestran claramente que, al contrario que mAb OKT3, scFv₆ o scFv₁₀ no poseen las propiedades activadoras de las células T.

Ejemplo 9: Modulación y recubrimiento de TCR/CD3 en linfocitos tratados con anticuerpos anti-CD3

Para medir la modulación y el recubrimiento de TCR/CD3 de la superficie celular en los linfocitos, se extendieron en placas 2 x 10⁶ PBMCs en pocillos individuales de placas de 24 pocillos (Greiner, Frickenhausen, Alemania) en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FCS desactivado por calentamiento, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de sal sódica de penicilina G y 0,1 mg/ml de sulfato de estreptomicina (todos ellos de Invitrogen, Groningen, Países Bajos) junto con los anticuerpos indicados. Las células se cosecharon después de 24 horas de incubación y se tiñeron para análisis por citometría de flujo con OKT3 conjugado a FITC (Dr. Moldenhauer, German Cancer Research Center, Heidelberg) o anti-TCRα/β conjugado a PC5 (Beckman-Coulter, Krefeld, Alemania) y los controles isotipo correspondientes (Beckman-Coulter, Krefeld, Alemania). Las células se sometieron a contratinción con anticuerpos anti-CD5 (Beckman-Coulter, Krefeld, Alemania) para linfocitos T y se analizaron con un citómetro de flujo Beckman-Coulter Epics XL (Beckman-Coulter, Krefeld, Alemania). Se calculó la fluorescencia media (F) de OKT3-FITC y TCR-PC5 de células CD-5-positivas, utilizando software System-II (Beckman-Coulter, Krefeld, Alemania). El cálculo de la modulación y el recubrimiento de CD3 se realizó como se ha descrito anteriormente (Cole, M.S. et al., 1997, J. Immunol. 159, 3613-3621):

% modulación de CD3 =

$$5 \quad \frac{\text{células F (anti-TCR) sin tratar} - \text{células F (anti-TCR) tratadas}}{\text{células F (anti-TCR) sin tratar}} \times 100$$

% recubrimiento de CD3 =

$$10 \quad \frac{\text{células F (anti-TCR) tratadas}}{\text{células F (anti-TCR) de control}} - \frac{\text{células F (OKT3) tratadas}}{\text{células de control (OKT3)}} \times 100$$

15 El recubrimiento, que se define como el número de moléculas CD3 en la superficie de los linfocitos T que están fijadas al anticuerpo y por tanto no son detectables por mAb OKT3 conjugado a FITC, se observó únicamente en un experimento con la concentración mínima de OKT3 y scFv₆ anti-CD3 (Figura 14). La modulación de CD3, que representa la fracción de complejos TCR/CD3 en la superficie de las células T que se pierde después del tratamiento con el anticuerpo, es inducida eficientemente (> 90%) por mAb OKT3 y scFv₆ anti-CD3 a concentraciones comprendidas en el intervalo entre 0,1 µg/ml y 10 µg/ml (Figura 14). En contraste, la actividad de modulación de
20 scFv₁₀ anti-CD3 era mucho menor y podría observarse sólo a concentraciones superiores a 1 µg/ml (Figura 14).

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que es específico para el complejo humano TCR/CD3 en las células T para represión de una reacción inmune, **caracterizado por que**
5 (a) está desprovisto de regiones de anticuerpo constantes; y
 (b) es bivalente o multivalente.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1 que es un diacuerpo.
- 10 3. El anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende dos anticuerpos scFv unidos por un enlazador peptídico.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1 que es un diacuerpo monocatenario.
- 15 5. El anticuerpo conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los dominios variables V_H y V_L están conectados por el enlazador peptídico SAKTTP o SAKTTPKLGG.
6. El anticuerpo conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que los dominios variables corresponden a los dominios variables del anticuerpo producido por el hibridoma de número de depósito ATCC CRL 8001.
20
7. El anticuerpo conforme a la reivindicación 6, en el cual una cisteína en la posición H100A (sistema de numeración de Kabat) se ha intercambiado por otro aminoácido.
- 25 8. El anticuerpo conforme a la reivindicación 7, en el cual la cisteína ha sido intercambiada por una serina.
9. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 9.
30
11. El vector de expresión de la reivindicación 10, que es pSKK3-scFv_6-anti-CD3 depositado conforme al Tratado de Budapest bajo DSM15137.
12. Una célula hospedadora que contiene el vector de expresión de la reivindicación 10 ó 11.
35
13. Una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, el polinucleótido de la reivindicación 9 o el vector de expresión de la reivindicación 10 ó 11.
14. Uso de
40 - un anticuerpo que es específico para el complejo humano TCR/CD3 en la células T, en el cual,
 (a) es capaz de reprimir una reacción inmune; y
 (b) está desprovisto de regiones de anticuerpo constantes;
 - el polinucleótido de la reivindicación 9;
 - o el vector de expresión de la reivindicación 10 ó 11 para la preparación de una composición
45 farmacéutica para inmunoterapia.
15. Uso conforme a la reivindicación 14, en el cual dicha inmunoterapia es una terapia contra los rechazos agudos de trasplantes.
- 50 16. Uso del polinucleótido de la reivindicación 9 o el vector de expresión de la reivindicación 10 ó 11, para la preparación de una composición farmacéutica para terapia génica.

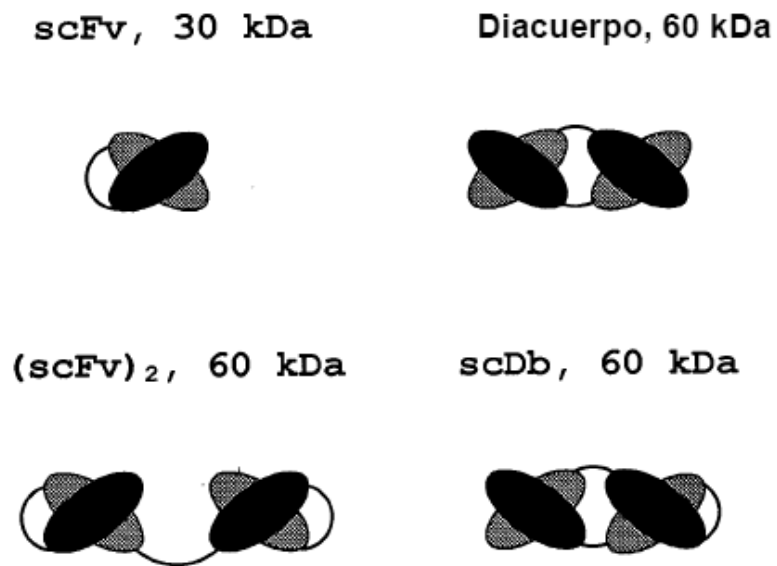


FIGURA 1

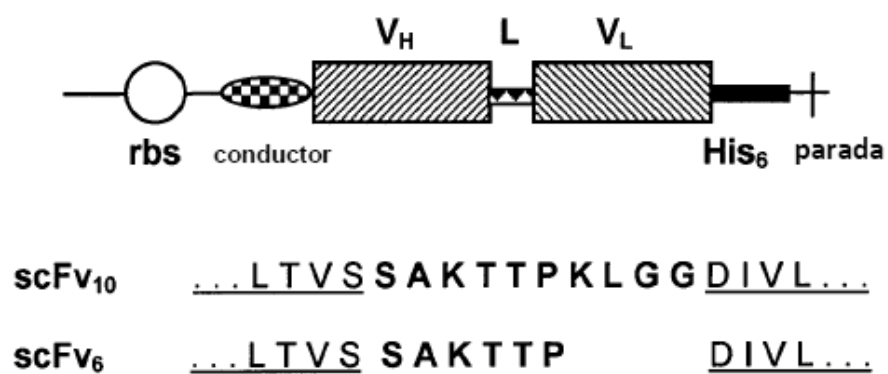


FIGURA 2

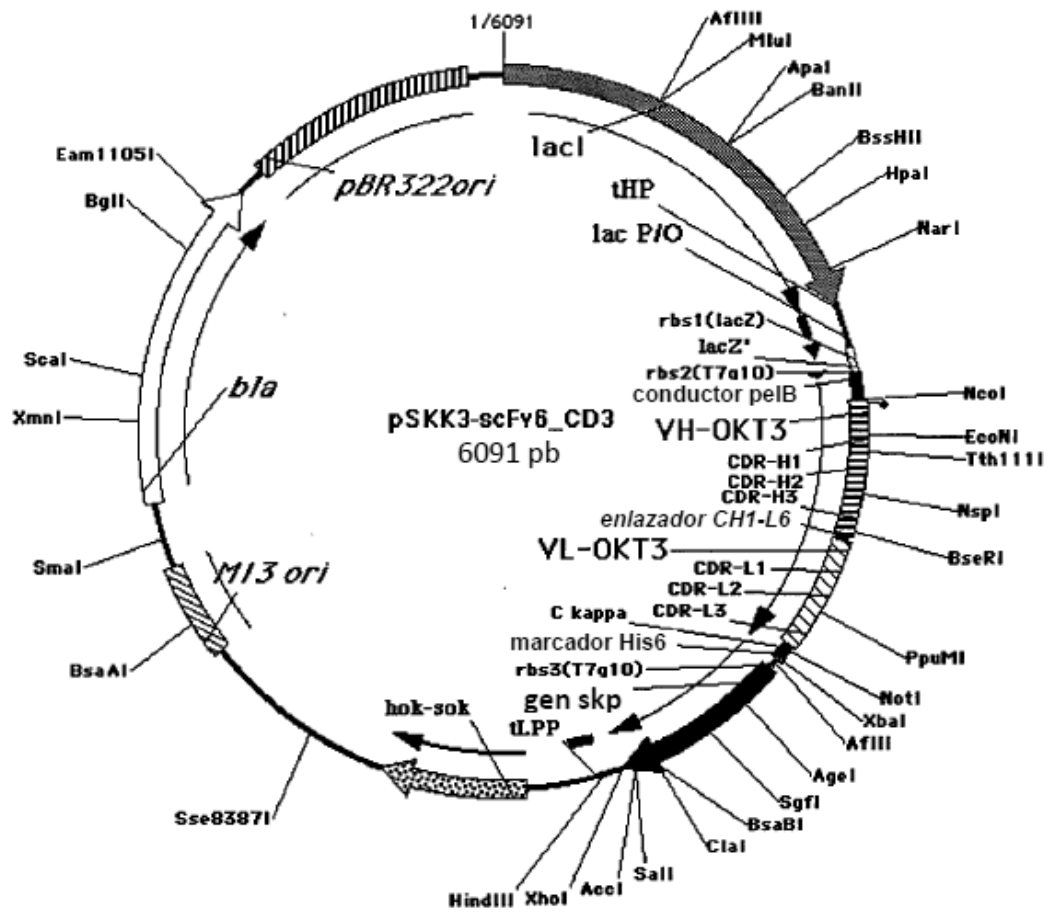


FIGURA 3

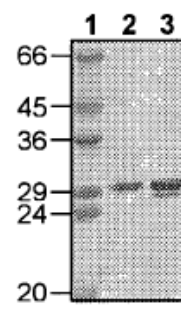


FIGURA 4

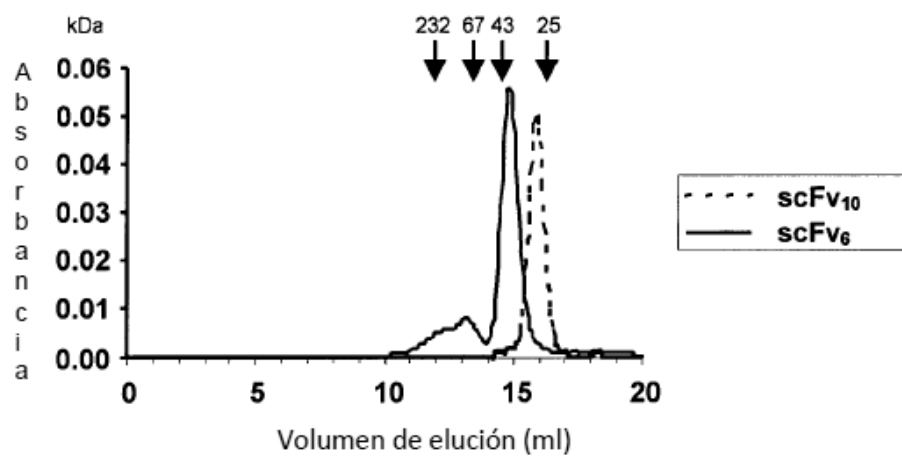


FIGURA 5

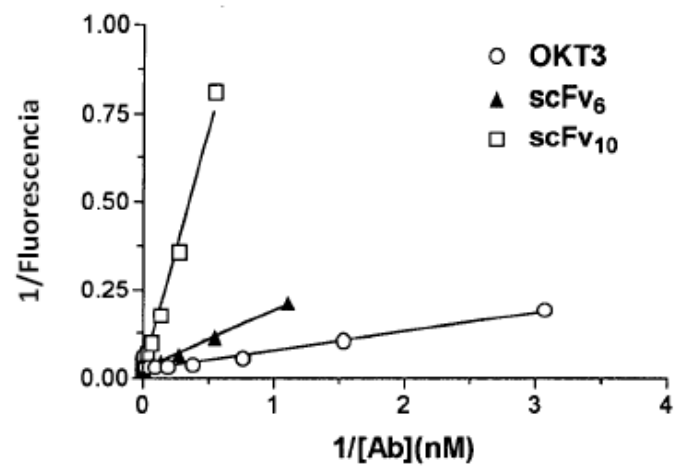


FIGURA 6

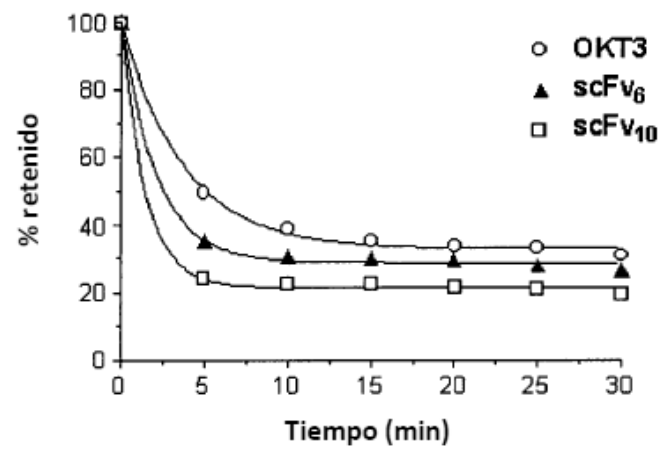


FIGURA 7

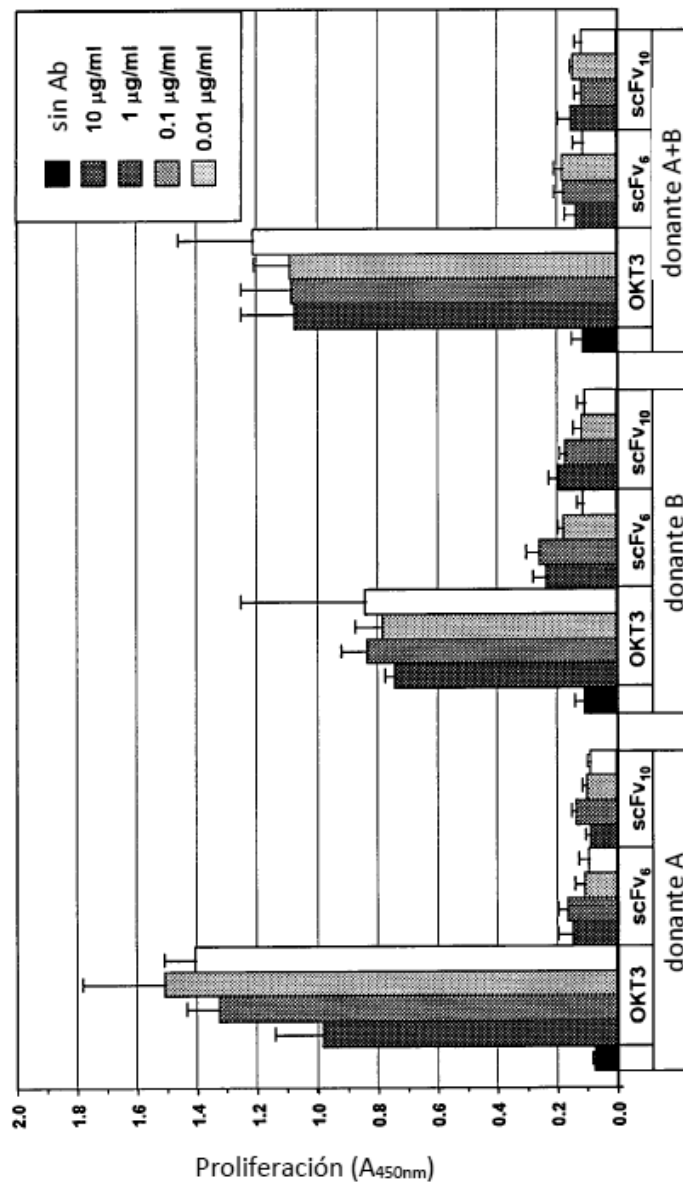


FIGURA 8

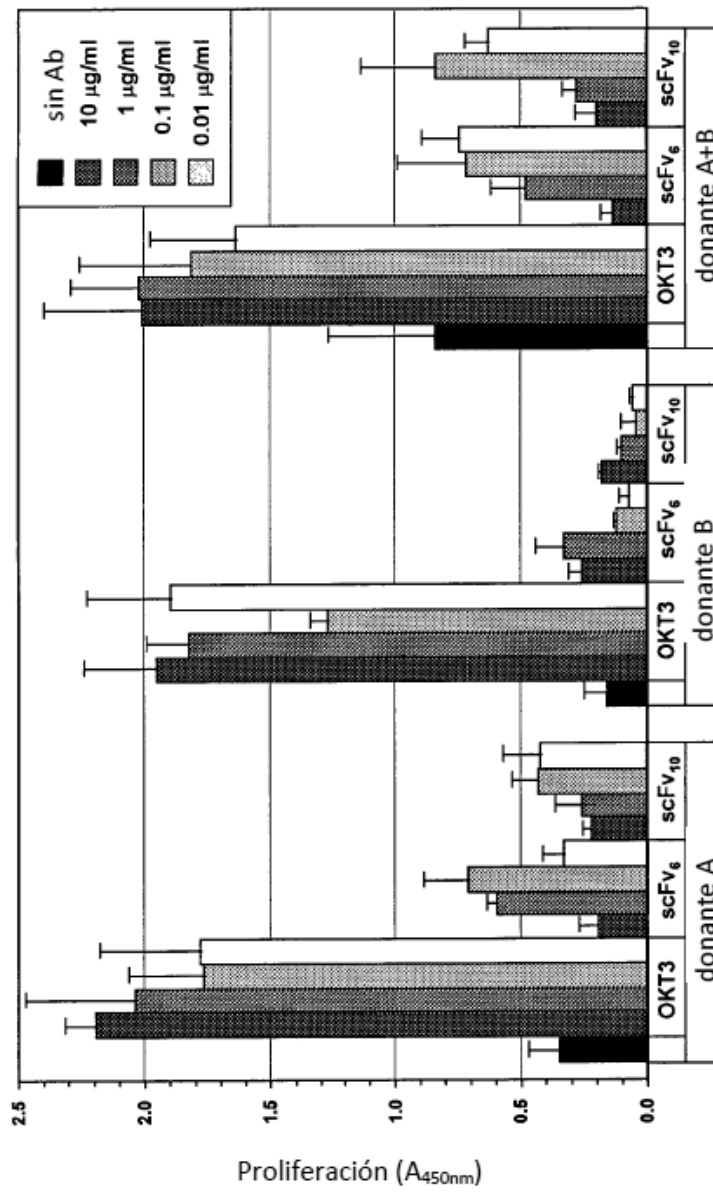


FIGURA 9

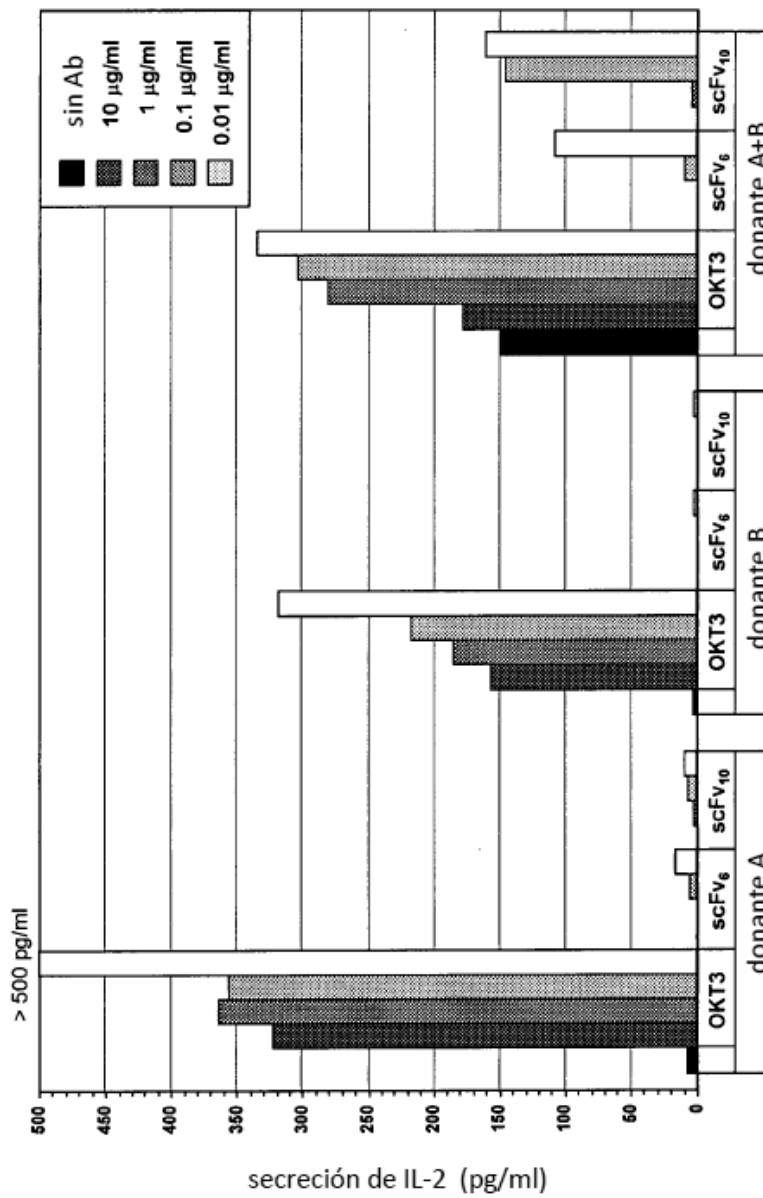


FIGURA 10

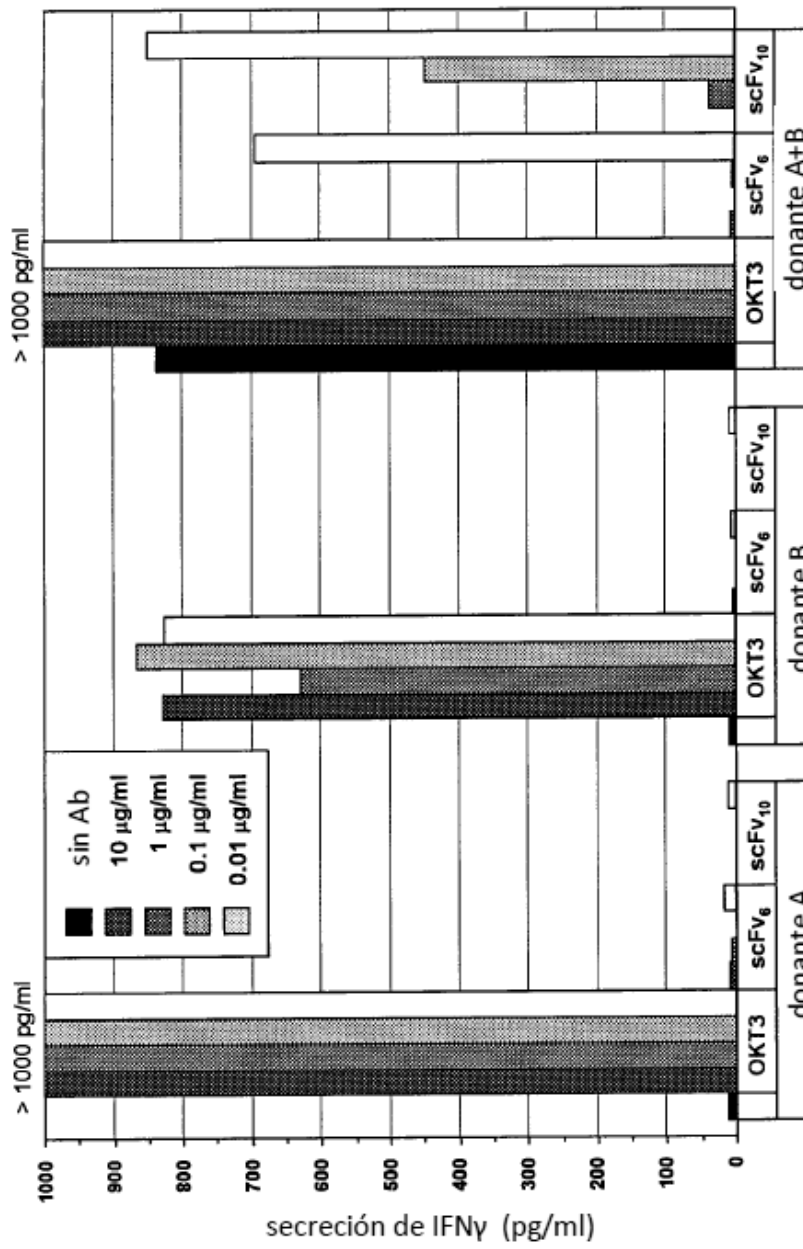


FIGURA 11

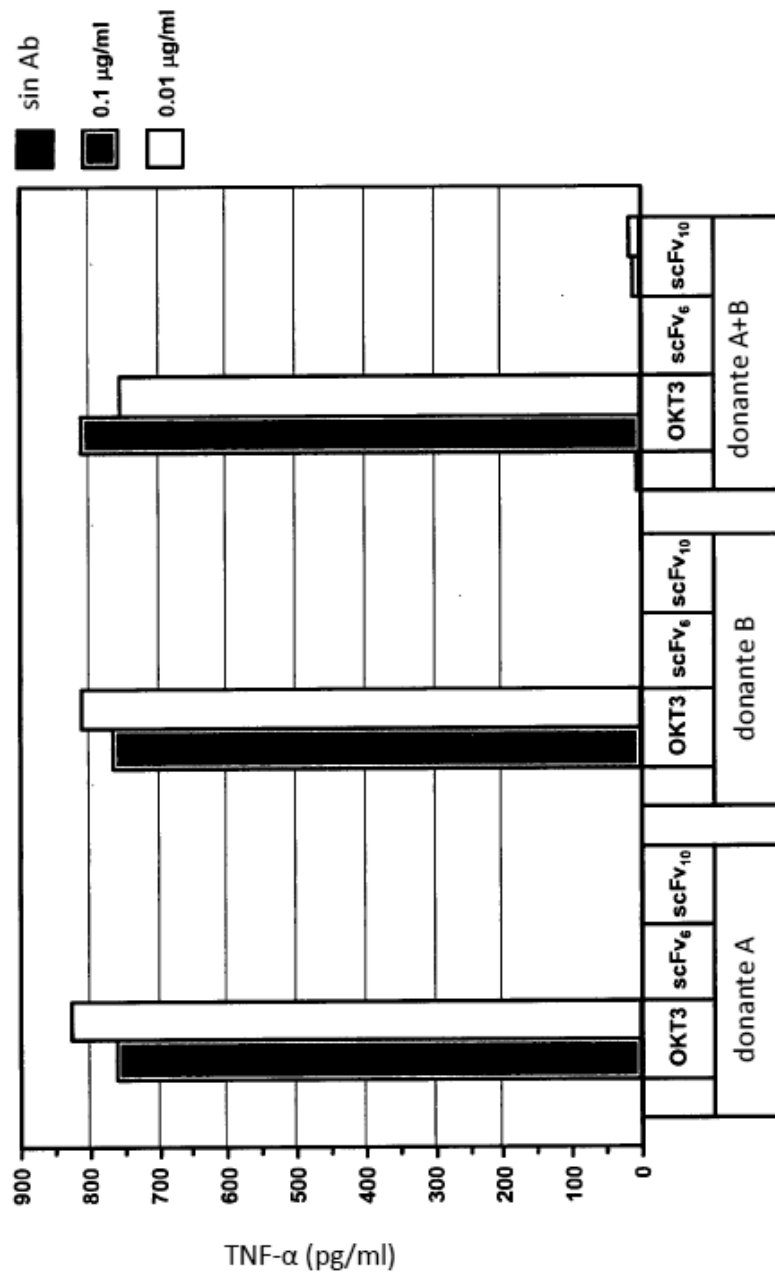


FIGURA 12

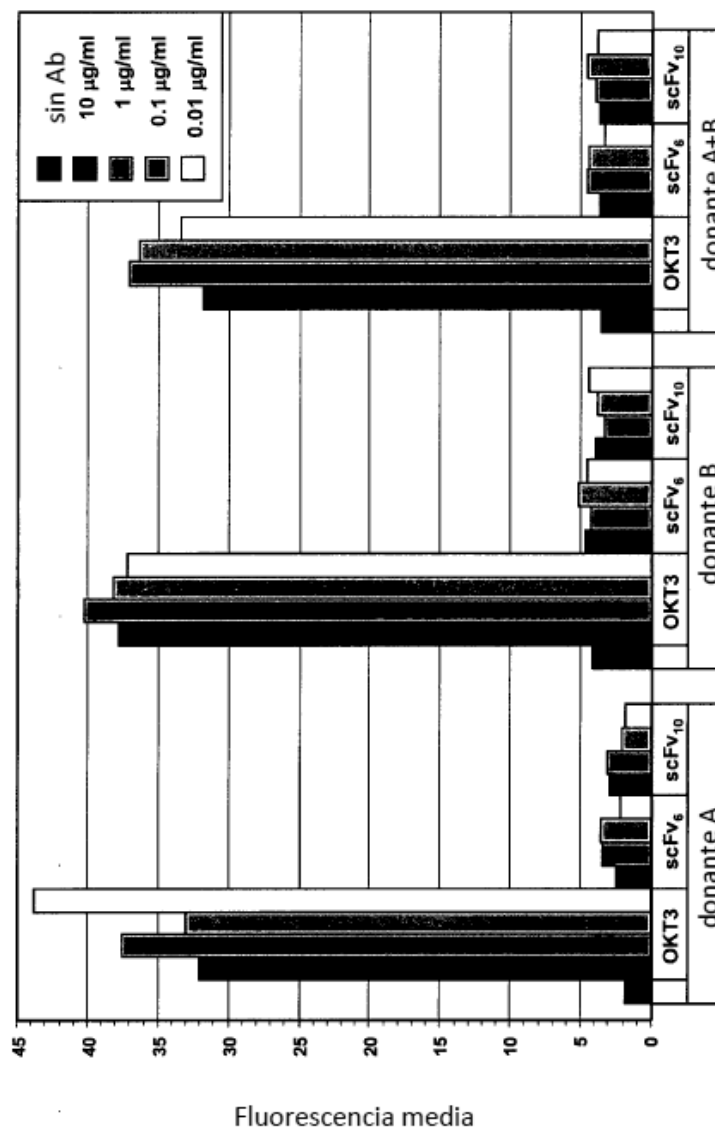


FIGURA 13

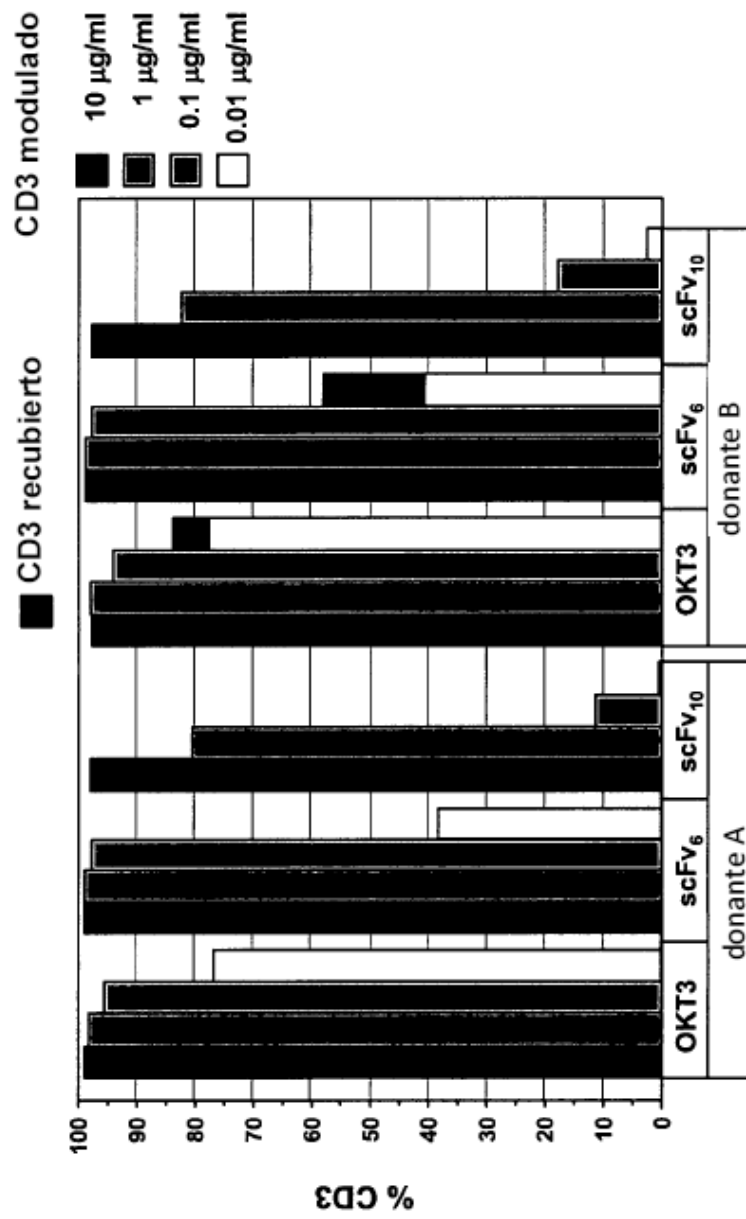


FIGURA 14