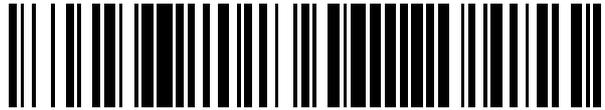


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 497**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2010 E 10785516 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2486059**

54 Título: **Ligandos monovalentes del receptor CD28 humano**

30 Prioridad:

**09.10.2009 FR 0904866**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.02.2016**

73 Titular/es:

**EFFIMUNE (50.0%)  
Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil  
44035 Nantes Cedex, FR y  
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA  
RECHERCHE MÉDICALE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VANHOVE, BERNARD y  
MARY, CAROLINE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 561 497 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

Ligandos monovalentes del receptor CD28 humano

La presente invención se refiere a la selección de ligandos monovalentes del receptor CD28 humano que permitan bloquear la interacción CD28/B7 sin activar CD28.

5 La activación de los linfocitos T necesita una señal activadora inducida por el reconocimiento por los receptores T (TCR) del antígeno asociado al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I o II y presentado por las células presentadoras de antígeno (CPAg). Esta activación conlleva sin embargo la proliferación de linfocitos T y la secreción de citocinas inmunomoduladoras específicas (tales como interleucina 2, interferón  $\gamma$  o interleucina 4) solo si se activan igualmente otros sistemas de coestimulación T.

10 Uno de los sistemas más importantes de regulación de la activación de linfocitos T es el sistema molecular B7/CD28/CTLA4. Este sistema desempeña un papel esencial en los mecanismos de rechazo de injerto [WOODWARD *et al.*, Transplantation, 66, 14-20, (1998)]. Las moléculas B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86), designadas colectivamente de aquí en adelante con el término "B7", que son portadas por las CPAg pueden activar el receptor CD28 así como el receptor CTLA4 de linfocitos T. La activación de CD28 suministra al linfocito T una señal positiva  
15 estimulante de la célula; en contraposición, la activación de CTLA4 suministra una señal negativa que conduce a una no respuesta (anergia) [FALLARINO *et al.*, J. Exp. Med., 188, 205-210, (1998)].

Los linfocitos T en reposo expresan una cantidad alta de CD28 y muy baja de CTLA4. En un primer contacto cognitivo entre una CPAg y un linfocito T, se privilegia la interacción CD28/B7, lo que activa la célula. Es solo varias  
20 horas después del inicio de la activación, debido al aumento de la expresión de CTLA4 en membrana, cuya afinidad por B7 es de 5 a 10 veces superior a la de CD28, que la interacción B7/CD28 se desplaza a favor de una interacción B7/CTLA4.

La inhibición selectiva de la señal agonista suministrada al linfocito T por CD28 dejando intacto el sistema antagonista constituido por el par CTLA4/B7, a través de un bloqueo específico de la interacción CD28/B7, puede  
25 permitir evitar la activación de linfocitos T, y favorecer así la inducción de tolerancia en el caso de trasplante de órganos, así como en el marco del tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

Esta inhibición selectiva puede obtenerse orientándose al receptor CD28 de los linfocitos T, especialmente con la ayuda de un anticuerpo dirigido contra CD28.

Sin embargo, no todos los anticuerpos poseen la misma capacidad de inhibir selectivamente la interacción CD28/B7. Efectivamente, una gran parte de ellos, cuando se utilizan en su forma nativa divalente, conllevan la dimerización de  
30 CD28 lo que provoca su activación, y se utilizan en forma de fragmentos monovalentes que no conllevan la dimerización de CD28, no presentando más efecto inhibitorio de la interacción CD28/B7. Otros anticuerpos anti-CD28, denominados anticuerpos superagonistas, son capaces de activar los linfocitos T incluso en ausencia de señales de activación inducidas por la interacción TCR/CMH. Estas diferentes propiedades de los anticuerpos anti-CD28 se han atribuido a su capacidad de reconocer diferentes regiones de CD28 (NUNES *et al.*, Int. Immunol., 5, 311-315, 1993; LUHDER *et al.*, J. Exp. Med. 197, 955-66 2003).

En el artículo de NUNES *et al.* (1993, anteriormente citado), se han utilizado diferentes anticuerpos monoclonales anti-CD28 para analizar las relaciones de estructura-función con la molécula CD28. Entre estos anticuerpos, se ha  
35 identificado un subgrupo compuesto por CD28.1, CD28.3 y CD28.5 como particularmente interesante. Efectivamente, estos anticuerpos presentan perfiles de inhibición frente a CD28 prácticamente idénticos.

40 En el transcurso de los trabajos anteriores, el equipo de inventores ha seleccionado entre los anticuerpos monoclonales anti-CD28 descritos por NUNES *et al.* (1993, anteriormente citado) un anticuerpo denominado CD28.3, cuyos fragmentos monovalentes poseen la capacidad de inhibir la interacción CD28/B7. El hibridoma productor del anticuerpo CD28.3 se ha depositado en la CNCM con el número I-2582, y se describe en la solicitud PCT WO 02/051871. Esta solicitud internacional divulga fragmentos monovalentes del anticuerpo CD28.3 que  
45 presentan una afinidad suficiente para ser utilizables *in vitro* o *in vivo* con el fin de bloquear el receptor CD28 sin inducir su activación.

Los inventores han caracterizado ahora el epítipo reconocido por el anticuerpo CD28.3, lo que permite identificar otros ligandos monovalentes de CD28 que posean las mismas propiedades que los fragmentos monovalentes  
50 procedentes de CD28.3. Este epítipo es un epítipo conformacional, localizado en los dominios C, D, E y F de la molécula CD28.

Se representa en la Figura 1 la secuencia de una porción del receptor CD28 humano que contiene el epítipo reconocido por el anticuerpo CD28.3. Los diferentes dominios A, A' B, C, C' C", E, F, G y G', tales como se definen por EVANS *et al.* (Nat. Immunol., 6(3): 271-9, 2005) se indican por encima de la secuencia. Las regiones  
55 constituyentes del epítipo se subrayan en gris. Esta secuencia se representa igualmente en la lista de secuencias adjunta con el identificador SEQ ID NO: 1.

Se describe aquí un ligando monovalente del receptor CD28 humano capaz de bloquear selectivamente la interacción CD28/B7 sin activar el receptor CD28, caracterizado porque reconoce un epítipo formado por porciones de la secuencia SEQ ID NO: 1 que tienen las secuencias siguientes:

SREFRASLHKGL (SEQ ID NO: 2) ;  
 NCDGKL (SEQ ID NO: 3) ;  
 VTFYLNQLYVNOQTDIYFCKIEVM (SEQ ID NO: 4),

5 con la excepción de un ligando monovalente que tiene las CDR de la cadena pesada y las CDR de la cadena ligera de la inmunoglobulina CD28.3.

Se define aquí como "ligando monovalente" cualquier ligando del receptor CD28 humano que posea un solo sitio de enlace con dicho receptor CD28. Dicho ligando es preferiblemente una proteína; puede tratarse por ejemplo de un fragmento monovalente del anticuerpo anti-CD28, o bien de una anticalina (SKERRA *et al.*, FEBS J., 275(11): 2677-83, 2008).

Según un modo de realización preferido, dicho ligando monovalente es una proteína que comprende las CDR de la cadena pesada y las CDR de la cadena ligera de un anticuerpo anti-CD28 que reconoce el epítipo definido anteriormente. Puede tratarse especialmente de un fragmento monovalente (Fv, Fab o scFv) de dicho anticuerpo o de una proteína recombinante que asocia dicho fragmento monovalente con un polipéptido heterólogo, como se describe por ejemplo en la solicitud PCT WO 02/051871 para los fragmentos monovalentes del anticuerpo CD28.3.

La presente invención tiene como objeto un procedimiento de obtención de un ligando monovalente del receptor CD28 humano capaz de bloquear selectivamente la interacción CD28/B7 sin activar el receptor CD28, caracterizado porque comprende la puesta en contacto de ligandos monovalentes del receptor CD28 humano con un polipéptido que tiene la secuencia del receptor CD28 humano o de un fragmento del mismo que comprende las secuencias SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, y la selección de los ligandos que reconocen un epítipo formado por dichas secuencias SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

Se describe igualmente aquí cualquier molécula de ácido nucleico que codifique un ligando monovalente del receptor CD28 humano, así como cualquier vector recombinante, especialmente cualquier vector de expresión, que comprenda dicha molécula de ácido nucleico, y cualquier célula hospedadora transformada con dicho vector recombinante.

Las moléculas de ácido nucleico pueden comprender ventajosamente, además de una secuencia que codifica una proteína tal como se describe anteriormente, una secuencia que codifica un péptido señal que permite la secreción de dicha proteína; pueden comprender también una o varias secuencias que codifican uno o varios péptidos marcadores que permiten la detección y/o que facilitan la purificación de dicha proteína.

30 Los vectores de expresión comprenden al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína tal como se describe anteriormente, asociada a elementos de control de la transcripción y de la traducción activos en la célula hospedadora elegida. Los vectores utilizables para la construcción de vectores de expresión son conocidos por sí mismos, y se elegirán especialmente en función de la célula hospedadora que se desee utilizar.

Las células hospedadoras pueden ser células procarióticas o eucarióticas. Entre las células eucarióticas utilizables, se citarán en particular las células vegetales, células de levadura tales como *Saccharomyces*, células de insecto tales como células de *Drosophila* o de *Spodoptera* y células de mamíferos tales como células HeLa, CHO, 3T3, C127, BHK, COS, etc...

La construcción de vectores de expresión, y la transformación de células hospedadoras, pueden efectuarse mediante técnicas clásicas de biología molecular.

40 Pueden utilizarse especialmente ligandos monovalentes del receptor CD28 humano, de la misma manera que las proteínas monovalentes derivadas de CD28.3 descritas en la solicitud PCT WO 02/051871, para la obtención de medicamentos inmunosupresores que bloquean selectivamente los fenómenos de activación de linfocitos T que implican el receptor CD28.

Estos medicamentos son utilizables en todas las patologías dependientes de linfocitos T.

45 Se trata esencialmente de rechazo de injerto, enfermedad del injerto contra el hospedador, enfermedades autoinmunitarias mediadas por linfocitos T, tales como diabetes de tipo I o esclerosis en placas, e hipersensibilidad de tipo IV, que interviene en fenómenos alérgicos así como en la patogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas después de una infección por un agente patógeno (especialmente lepra, tuberculosis, leishmaniosis, listeriosis, etc.). Puede tratarse igualmente de enfermedades tales como mieloma, en las que los linfocitos experimentan una proliferación desregulada y que es dependiente de una señal transmitida por CD28 (BAHLIS *et*

*al.*, Blood, 109(11): 5002-10, 2007).

La presente invención se comprenderá mejor con la ayuda del complemento de descripción siguiente, que se refiere a un ejemplo que ilustra la identificación del epítipo reconocido por el anticuerpo CD28.3

**EJEMPLO: IDENTIFICACIÓN DEL EPÍTOPO RECONOCIDO POR EL ANTICUERPO CD28.3**

5 Para la determinación del epítipo reconocido por el anticuerpo CD28.3, se pusieron en contacto fragmentos Fab de CD28.3 con CD28 humano (R&D Systems, Lille, Francia) inmovilizado sobre Sepharose®. Se redujeron y alquilaron los complejos inmunitarios por incubación durante 1 hora en presencia de yodoacetamida (55 mM), antes de la adición de quimotripsina (1 mg/50 mg de anticuerpo ligado) seguido de incubación durante 4 h a 18-25 °C. Se lavó a continuación la Sepharose® con carbonato de amonio 25 mM y después glicina 50 mM, pH 2,5. Se eluyeron a  
 10 continuación los péptidos sobre una matriz C18 y se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF para establecer el mapa peptídico másico.

Los resultados de este análisis muestran que los fragmentos protegidos de la proteólisis por quimotripsina se sitúan en los bucles C-D-E-F de las moléculas de CD28, y constituyen por tanto un epítipo conformacional. La secuencia de la región del receptor CD28 donde está localizado este epítipo se representa en la Figura 1, y las secuencias de  
 15 los fragmentos peptídicos que forman el epítipo, así como su localización con respecto a los dominios del CD28 humano, se enumeran en la Tabla I a continuación.

Tabla I

Dominio del CD28 humano	Secuencia del péptido protegido de la proteólisis
C	SREFRASLHKGL (SEQ ID NO: 2)
D	NCDGKL (SEQ ID NO: 3)
E/F	VTFYQLNLYVQNQTDIYFCKIEVM (SEQ ID NO: 4)

LISTA DE SECUENCIAS

<110> TcL Pharma  
 INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)  
 VANHOVE, Bernard MARY,  
 5 Caroline

<120> Ligandos monovalentes del receptor CD28 humano

<130> MJP11/F2173-2WO

<150> FR0904866

<151> 2009-10-09

10 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 134

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 1

Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr Asp Asn  
 1 5 10 15

Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser Arg Glu  
 20 25 30

Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu Val Cys  
 35 40 45

Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser Lys Thr  
 50 55 60

Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr Phe Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys Lys Ile  
 85 90 95

Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly  
 100 105 110

Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe  
 115 120 125

Pro Gly Pro Ser Lys Pro  
 130

ES 2 561 497 T3

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu  
1 5 10

<210> 3

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asn Cys Asp Gly Lys Leu  
1 5

<210> 4

<211> 23

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Val Thr Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr  
1 5 10 15

Phe Cys Lys Ile Glu Val Met  
20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento de selección de un ligando monovalente del receptor CD28 humano capaz de bloquear selectivamente la interacción CD28/B7 sin activar el receptor CD28, caracterizado porque comprende la puesta en contacto de ligandos monovalentes del receptor CD28 humano con un polipéptido que tiene la secuencia del receptor CD28 humano o de un fragmento del mismo que comprende las secuencias SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, y la selección de un ligando que reconoce un epítipo formado por las secuencias SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dichos ligandos son fragmentos monovalentes de anticuerpo anti-CD28 humano.

10

A    A'    B    C    C'    C''  
NKILVKQSPMLVAYDN**AVNLSCKY**SYNLF**SREFRASLHKGL**DSAVEV**CVVYGNYS**QQLQVYS

D    E    F    G    G'  
KTGF**NCDGKL**GNE**SVTFYLO**ONLYVNQ**TDIYFCKIEV**MYPPPY**LDNEKSNGTII**HVKGKHLCP

SPLFPGPSKP

FIGURA 1