

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 129**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2012 E 12708319 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2683739**

54 Título: **Anticuerpos anti-CTLA4 humanizados**

30 Prioridad:

09.03.2011 GB 201103955

09.03.2011 US 201161450896 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.05.2016

73 Titular/es:

ANTITOPE LIMITED (100.0%)
Babraham Research Campus, Babraham
Cambridge Cambridgeshire CB22 3AT, GB

72 Inventor/es:

JONES, TIMOTHY DAVID;
HOLGATE, ROBERT GEORGE EDWARD y
CARR, FRANCIS JOSEPH

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 571 129 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-CTLA-4 humanizados

La presente invención se refiere al tratamiento y prevención de enfermedades humanas usando nuevos anticuerpos humanizados contra el CTLA4 humano y a su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades humanas.

5 Antecedentes de la invención

El sistema inmunológico de vertebrados requiere múltiples interacciones moleculares y celulares para conseguir respuestas inmunitarias óptimas. En particular, la activación de los linfocitos T (células T) es un componente importante de muchas de estas respuestas. Las células presentadoras de antígeno (CPA) pueden activar a las células T mediante la presentación de antígenos a través de péptidos que llevan las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) al TCR (receptor de células T). Tal activación también requiere la coestimulación mediante las CPA. La liberación de una señal coestimuladora no específica de la célula T requiere al menos dos miembros de la familia B7 homólogos encontrados en las CPA, B7-1 (también denominado B, B7.1, o CD80) y B7-2 (también denominado B7.2 o CD86), ambos de los cuales pueden liberar señales coestimuladoras sobre la unión al antígeno CD28 sobre las células T, lo que produce la activación de células T. El CD28 es un miembro de la glicoproteína homodimérica de la inmunoglobulina de las inmunoglobulinas (Ig) con una sola región variable extracelular y está presente en la mayoría de las células T humanas maduras.

Un homólogo de CD28 denominado CTLA4 (antígeno asociado a linfocitos citotóxicos, también designado CD152) se descubrió en 1987 (Brunet y col., (1987) Nature 328:267-270) con particular asociación con las células T citotóxicas. Como con el CD28, el CTLA4 es un miembro de la superfamilia de las Ig y comprende un único dominio Ig extracelular. Sin embargo, el papel de CTLA4 es, principalmente, para inhibir la activación de las células T y esto se demostró en ratones deficientes en CTLA4 (Chambers y col., (1997) Immunity. 7:885-895) que sufren linfoproliferación masiva. Además, se demostró que el bloqueo de CTLA4 mejoraba las respuestas de las células T *in vitro* (Walunas y col., (1994) Immunity. 1:405-413) e *in vivo* (Kearney (1995) J. Immunol. 155:1032-1036), además de aumentar la inmunidad antitumoral (Leach (1996) Science. 271:1734-1736). Por lo tanto, el bloqueo de CTLA4 podría proporcionar nuevos tratamientos para enfermedades, especialmente enfermedades humanas en las que la estimulación inmunitaria podría ser beneficiosa, tal como para el tratamiento de cánceres y enfermedades infecciosas.

El desarrollo de bloqueantes de la función de CTLA4 se ha centrado en el uso de anticuerpos monoclonales, en especial de anticuerpos derivados de ratones transgénicos en los que se han injertado genes que codifican las inmunoglobulinas humanas (y deficientes en genes de inmunoglobulina del ratón huésped). Se están realizando ensayos clínicos con tales anticuerpos que incluyen ipilimumab (Keler y col., J Immunol 17,1:625.1-6259(2003)), que es un isotipo de IgG1 y Tremelimumab (Ribas y col., Oncologist 12: 873-883(2005)) que es un isotipo IgG2. Mientras que normalmente se comunica que la inmunogenicidad (inducción de anticuerpos contra los anticuerpos monoclonales humanos inyectados) es baja, existe la preocupación de que tales anticuerpos humanos, debido a mutaciones somáticas y reordenamientos en las secuencias de la región variable (que pueden dar lugar a epítopos de las células T), puede inducir inmunogenicidad en algunos pacientes, lo que da lugar a efectos adversos y a falta de efecto terapéutico. Por tanto, existe la necesidad de mejorar anticuerpos monoclonales anti-CTLA4 con una inmunogenicidad potencialmente menor con el fin de proporcionar tratamientos más eficaces de enfermedades humanas.

El documento WO 03/086459 divulga procedimientos de tratamiento que utilizan anticuerpos de secuencia humana contra el CTLA4 humano, en particular procedimientos de tratamiento del cáncer. Un anticuerpo particularmente preferido es el anticuerpo 10D1, que también se conoce como MDX010 o ipilimumab.

Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un anticuerpo anti-CTLA4 humanizado que inhibe la unión de CTLA4 al B7 humano, en el que dicho anticuerpo comprende regiones variables que tienen secuencias de CDR de:

- (i) secuencia que comprende CDRH1 DYNMD (SEQ ID NO:9)
- (ii) secuencia que comprende CDRH2 NINPNSESTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 10)
- (iii) secuencia que comprende CDRH3 DGNRYDAWFAY (SEQ ID NO:11)
- (iv) secuencia que comprende CDRL1 SASSSVTYMH (SEQ ID NO:12)
- (v) secuencia que comprende CDRL2 STSILAS (SEQ ID NO:13), y
- (vi) secuencia que comprende CDRL3 QQRTSYPLT (SEQ ID NO:14);

o

- (i) secuencia que comprende CDRH1 SYWIN (SEQ ID NO:15)
- (ii) secuencia que comprende CDRH2 RIAPGSGTTYNEVFKG (SEQ ID NO: 16)
- (iii) secuencia que comprende CDRH3 GDYGSY (SEQ ID NO:17)

- (iv) secuencia que comprende CDRL1 SASSSISYMH (SEQ ID NO:18);
- (v) secuencia que comprende CDRL2 DTSKLAS (SEQ ID NO:19), y
- (vi) secuencia que comprende CDRL3 HQRTSYPLT (SEQ ID NO:20);

La invención también proporciona anticuerpos humanizados que se unen específicamente al CTLA4 humano que tienen una cadena pesada de anticuerpo de cualquiera de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o que tienen una región constante de IgG mutada, por ejemplo para inhibir la unión a los receptores Fc o para inhibir la unión al complemento. La invención también proporciona anticuerpos humanizados en los que la cadena ligera del anticuerpo es una cadena ligera kappa. El anticuerpo humanizado puede estar codificado por los ácidos nucleicos de la cadena pesada de IgG humana y de la cadena ligera kappa humana que codifican secuencias proteicas en sus regiones variables, tal como se expone en las SEQ ID NO: 31 a SEQ ID NO: 50. En una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo humanizado comprende regiones variables de la SEQ ID NO: 45 y la SEQ ID NO: 49 (denominadas de otro modo "VH5: VK4").

La presente invención también proporciona anticuerpos humanizados que se unen específicamente a CTLA4 humano, de modo que las regiones variables del anticuerpo se han seleccionado o modificado para excluir uno o más epítomos de células T CD4 + humanas. La presente invención también proporciona anticuerpos humanos que se unen específicamente al CTLA4 humano, de modo que las regiones variables del anticuerpo variable se han formado principalmente mediante la fusión de segmentos de secuencias a partir de secuencias de la región variable de anticuerpo humano existentes.

La presente invención también proporciona anticuerpos humanizados de la invención que comprenden las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada, "DYNMD" (SEQ ID No. 9), "NINPNSESTSYNQKFKG" (SEQ ID No. 10) y "DGNRYDAWFAY" (SEQ ID No. 11), respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera, "SASSSVTYMH" (SEQ ID No. 12), "STSILAS" (SEQ ID No. 13) y "QQRTSYPLT" (SEQ ID No. 14), respectivamente.

La presente invención también proporciona anticuerpos humanizados de la invención que comprenden las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada, "SYWIN" (SEQ ID No.15), "RIAPGSGTTYNEVFVKG" (SEQ ID No.16) y "GDYGSY" (SEQ ID No.17), respectivamente, y las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera, "SASSSISYMH" (SEQ ID No.18), "DTSKLAS" (SEQ ID No.19), y "HQRTSYPLT" (SEQ ID No.20), respectivamente.

Los anticuerpos humanizados se pueden crear mediante la unión de las secuencias de las CDR con secuencias de marcos de las regiones variables humanas cuando tales secuencias marco derivan de una o más secuencias marco de la región variable de anticuerpos humanos distintas. Habitualmente, tales secuencias marco de la región variable humana incluirán una o más mutaciones que contribuyen a una unión óptima y mejorada de los anticuerpos humanizados frente a CTLA4. En una realización preferida de la presente invención, dichas secuencias marco de la región variable humana en los anticuerpos humanizados derivan totalmente de secuencias en otras regiones variables del anticuerpo humano como se describe en los procedimientos del documento EP1844074 (Antitope Ltd). Estas secuencias comprenden segmentos unidos de de secuencias de otras regiones variables de anticuerpo humano, junto con regiones constantes humanas. En particular, tales anticuerpos humanizados también contienen secuencias de CDR derivadas de secuencias de CDR, secuencias marco o secuencias marco/de CDR parciales de otras regiones variables de anticuerpos humanos, junto con regiones constantes humanas, de modo que se crean anticuerpos humanizados en los que las secuencias de la región variable derivan totalmente de secuencias en otras regiones variables de anticuerpos humanos, junto con regiones constantes humanas, creando de este modo un anticuerpo "completamente humano".

La invención también proporciona anticuerpos humanizados que se unen específicamente al CTLA4 humano, en el que dicho anticuerpo humanizado lo produce una línea celular de mamífero, especialmente células CHO o NS0. La invención también proporciona un anticuerpo humanizado que se une específicamente aL CTLA4 humano que es un fragmento Fab o un Fv de cadena sencilla (scFv). La invención también proporciona anticuerpos multiespecíficos (dos o más moléculas de anticuerpos diferentes unidas para dar dos o más especificidades diferentes), incluyendo al menos un anticuerpo humanizado de las secuencias SEQ ID NOS: 31 a 35 para la cadena pesada y las SEQ ID NOS: 36 a 40 para la cadena ligera para el anticuerpo 3B10; o el anticuerpo humanizado de las secuencias SEQ ID NOS: 41 a 45 para la cadena pesada y las SEQ ID NOS: 46 a 50 para la cadena ligera para el anticuerpo 8H5, cada uno de los cuales se une específicamente al CTLA4 humano. En una realización preferida, la invención proporciona anticuerpos multiespecíficos con regiones variables que consisten en la SEQ ID NOS: 45 para la cadena pesada y la SEQ ID NOS: 49 para la cadena ligera. Los diferentes anticuerpos incluidos en cada anticuerpo multiespecífico se pueden unir entre sí de forma covalente o no covalente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo de la invención o un polinucleótido que codifica dicho anticuerpo para su uso en el tratamiento de una enfermedad, incluido el cáncer, por ejemplo, cuando el cáncer es cáncer de próstata, de riñón, de colon, de pulmón o de mama; un trastorno proliferativo celular, una enfermedad del sistema nervioso central (SNC), una enfermedad del sistema sanguíneo, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa, una alergia, una enfermedad relacionada con células T, enfermedad del injerto contra el huésped o enfermedad del huésped contra el injerto.

El anticuerpo o polinucleótido encuentra uso en un procedimiento para inducir, aumentar o prolongar una respuesta inmunitaria a un antígeno en un paciente, que comprende administrar al paciente una dosificación eficaz de un anticuerpo humanizado que se une específicamente al CTLA4 humano, en el que el anticuerpo bloquea la unión del CTLA4 humano al B7 humano.

- 5 El antígeno puede incluir un antígeno tumoral, un antígeno asociado a un patógeno, un antígeno asociado con una enfermedad del sistema nervioso central (SNC), un antígeno asociado con enfermedades del sistema sanguíneo, incluyendo hipertensión y aterosclerosis, un antígeno asociado con una enfermedad inflamatoria, incluyendo artritis reumatoide y enfermedades autoinmunes, o un antígeno asociado con una alergia. Los antígenos tumorales pueden ser uno o más antígenos en la superficie celular de un tumor, una o más moléculas que interaccionan con el tumor, uno o más complejos de péptidos del MHC derivados de antígenos tumorales, o antígenos no asociados directamente con tumores, pero en los que las respuestas al antígeno tendrán un efecto adverso sobre el tumor, tales como antígenos asociados con la vasculatura del tumor. Los patógenos pueden ser un virus, una bacteria, un hongo o un parásito. Los antígenos del SNC incluyen el beta amiloide asociado con los depósitos de placa en la enfermedad de Alzheimer. Los antígenos del sistema sanguíneo incluyen integrinas y adhesinas, así como antígenos asociados con los depósitos de placa en la aterosclerosis. Los antígenos de enfermedades inflamatorias incluyen citocinas y receptores de citocinas. Los antígenos de la alergia incluyen antígenos asociados con alimentos, plantas, químicos y alérgenos ambientales. El procedimiento también puede incluir la administración del antígeno, o un fragmento o un análogo del mismo, al paciente, por lo que el antígeno en combinación con el anticuerpo humanizado induce, aumenta o prolonga la respuesta inmunitaria.
- 10
- 15
- 20 anticuerpo o polinucleótido también encuentra uso en un procedimiento de supresión de una respuesta inmunitaria en un paciente, que comprende: administrar al paciente una dosis eficaz de una preparación multivalente que comprende al menos dos anticuerpos humanizados frente al CTLA4 humano unidos entre sí, que da como resultado, por ejemplo, la inducción de células T reguladoras o la regulación por disminución del CTLA4; o administrar al paciente una dosis eficaz de una preparación policlonal que comprende al menos dos anticuerpos humanizados frente al CTLA4 humano.
- 25

Algunos de los anticuerpos humanizados de la invención se caracterizan por la unión al CTLA4 humano con alta afinidad, y/o por el bloqueo de la interacción del CTLA4 humano con su ligando, las moléculas B7-1 y B7-2 humanas. De acuerdo con lo anterior, dichos anticuerpos humanizados de la invención se pueden utilizar como agentes de diagnóstico o terapéuticos *in vivo* e *in vitro*.

- 30 Los anticuerpos humanizados de la invención pueden abarcar varios isotipos del anticuerpo, o mezclas de los mismos, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, IgE o formas mutadas de estas IgG, tales como mutaciones que reducen o eliminan la unión a los receptores de Fc. Normalmente, incluyen IgG4 (por ejemplo, IgG4k) e IgG1 (por ejemplo, IgG1k). Los anticuerpos humanizados pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo IgG4 o IgG1) o pueden incluir solamente una porción de unión a antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')2, Fv o scFv).
- 35

Algunos anticuerpos anti-CTLA4 humanizados de la presente invención se pueden caracterizar por una o más de las siguientes propiedades: a) especificidad por el CTLA4 humano (específicamente la unión al CTLA4 humano); b) una afinidad de unión al CTLA4 humano con una constante de disociación en el equilibrio (K_d) de al menos 10^{-8} M.

- 40 En otro aspecto, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos humanizados, o porciones de unión a antígeno, de la invención. De acuerdo con lo anterior, los vectores de expresión recombinantes que incluyen los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo de la invención, y las células huésped transfectadas con tales vectores, también están abarcados por la invención, como lo son los procedimientos de preparación de los anticuerpos de la invención mediante el cultivo de estas células huésped.

- 45 Los anticuerpos monoclonales humanizados anti-CTLA4 humano de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, Fab), pueden derivarse o unirse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento Fab'). Por ejemplo, un anticuerpo o porción de unión a antígeno de los anticuerpos humanizados de la invención pueden unirse funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CTLA4 humanizado, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, puede conjugarse con un resto terapéutico, por ejemplo, un fármaco citotóxico, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento de la misma, un radioisótopo, un ácido nucleico terapéutico, o un fármaco contra el cáncer de molécula pequeña. Los anticuerpos de la invención también pueden conjugarse con productos farmacéuticos citotóxicos, por ejemplo, radiomarcarse con agentes citotóxicos tales como, por ejemplo, ^{131}I , o pueden acoplarse a una proteína inactivadora del ribosoma, por ejemplo, la exotoxina de *Pseudomonas* (fragmento PE38, toxinas vegetales o bacterianas, tales como ricina, la cadena α de la ricina, saporina, proteína antiviral de la hierba carmín, la toxina de la difteria, o la exotoxina A de *Pseudomonas* (Kreitman y Pastan (1998) Adv. Drug Delivery Rev. 31:53.).
- 50
- 55

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas y de diagnóstico, que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y al menos un anticuerpo monoclonal humanizado de la invención, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente al CTLA4

humano. Algunas composiciones también pueden comprender una combinación de los anticuerpos humanizados o porciones de unión a antígeno de la invención. Tales composiciones también pueden comprender combinaciones de una o más de otras moléculas biológicamente activas como moléculas separadas, por ejemplo, una combinación de al menos un anticuerpo monoclonal humanizado de la invención y otra molécula biológicamente activa, o puede

5 combinar las combinaciones con una o más de otras moléculas biológicamente activas en la misma molécula, por ejemplo, como una molécula biespecífica o multiespecífica, ya sea como una combinación de dos o más anticuerpos humanizados de la invención o como una combinación con una o más de otras moléculas biológicamente activas.

Para procedimientos *in vivo*, el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo (o una molécula biespecífica o multiespecífica de la invención) se pueden administrar a un sujeto humano que padece una enfermedad relacionada con células T o una enfermedad que se puede mejorar o prevenir induciendo, aumentando, prolongando o

10 suprimiendo una respuesta inmunitaria.

Las composiciones de anticuerpos monoclonales humanizados de la invención también se pueden administrar en combinación con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia anti-cáncer. Los ejemplos de usos incluyen en un procedimiento para tratar el cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de un anticuerpo humanizado, junto con un vehículo farmacéutico. Algunos de estos procedimientos incluyen combinación con una vacuna. Algunas de tales vacunas incluyen una vacuna de células tumorales, una vacuna de células tumorales modificadas con GM-CSF, una vacuna de ácido nucleico (tal como ADN) y un antígeno asociado a tumor o una vacuna de células dendríticas cargadas con antígeno.

15 Las composiciones de anticuerpos monoclonales humanizados de la invención también se pueden administrar en combinación con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia anti-cáncer. Los ejemplos de usos incluyen en un procedimiento para tratar el cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de un anticuerpo humanizado, junto con un vehículo farmacéutico. Algunos de estos procedimientos incluyen combinación con una vacuna. Algunas de tales vacunas incluyen una vacuna de células tumorales, una vacuna de células tumorales modificadas con GM-CSF, una vacuna de ácido nucleico (tal como ADN) y un antígeno asociado a tumor o una vacuna de células dendríticas cargadas con antígeno.

Los anticuerpos humanizados al CTLA4 humano se pueden utilizar en procedimientos de tratamiento que requieren estimulación o supresión de respuestas inmunitarias. La estimulación se logra usando anticuerpos que bloquean la unión al CTLA4 humano, al B7 humano y enfermedades susceptibles al tratamiento mediante estimulación y aumento de la prolongación de las respuestas inmunitarias incluyen cánceres de próstata, de riñón, de colon, de pulmón o de mama; infecciones patógenas; enfermedades asociadas con el SNC, por ejemplo, enfermedades

25 amiloidogénicas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer; y enfermedades con componentes inflamatorias o alérgicas. La inmunosupresión también se puede lograr utilizando anticuerpos humanizados frente al CTLA4 humano, por ejemplo a través de la inducción de células T reguladoras (Coquerelle y col., Gut 2009;58:1363-1373). Las enfermedades susceptibles de tratamiento incluyen enfermedad del injerto contra el huésped, la enfermedad del huésped contra el injerto, alergias, enfermedades autoinmunes y otras enfermedades inflamatorias.

En todavía aspectos adicionales, la presente invención proporciona anticuerpos de la invención para su uso en un procedimiento para detectar *in vivo* la presencia del antígeno CTLA4 humano en una muestra, así como el uso de anticuerpos de la invención en un procedimiento para detectar *in vitro* la presencia de antígeno CTLA4 humano en una muestra, por ejemplo, para el diagnóstico de una enfermedad relacionada con el CTLA4 humano. En algunos procedimientos, esto se consigue poniendo en contacto una muestra que se va a analizar, junto con una muestra control, con un anticuerpo monoclonal humanizado de la invención, o una porción de unión a antígeno del mismo (o una molécula biespecífica o multiespecífica), en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y el CTLA4 humano. A continuación se detecta la formación de complejos (por ejemplo, mediante ELISA) en las muestras de ensayo y cualquier aumento estadísticamente significativo en la formación de complejos entre las muestras de ensayo y de control es indicativo de la presencia del antígeno CTLA4 humano en la muestra de ensayo.

40 Ejemplos

Las figuras y tablas se refieren a los siguientes ejemplos y son los siguientes:

Figura 1- unión de los anticuerpos murinos frente a CTLA4-Fc.

Figura 2 - ELISA de competición de los anticuerpos murino para la unión a CTLA4-Fc contra B7.1 biotinilado.

Figura 3 - ELISA de competición de los anticuerpos murino para la unión a CTLA4-Fc contra B7.2 biotinilado.

45 Figura 4 - Unión de los anticuerpos IgG1 humanos quiméricos 3B10 y 8H5 frente a CTLA4-Fc.

Figura 5 - ELISA de competición de los anticuerpos IgG1 humanos quiméricos 3B10 y 8H5 por la unión a CTLA4-Fc contra B7.1 biotinilado.

Figura 6 - ELISA de competición de los anticuerpos IgG1 humanos quiméricos 3B10 y 8H5 por la unión a CTLA4-Fc contra B7.2 biotinilado.

50 Figura 7 - Proliferación de células T de PBMC humanos en respuesta a los anticuerpos IgG1 humanos 3B10 y 8H5 quiméricos.

Figura 8 - Mapas de vectores de expresión del anticuerpo pANT.

Figure 9 – Secuencias de ADN de la región variable (VH Y VK) de 3B10.

Figura 10 - Secuencias de ADN de VH y VK de 8H5.

Figura 11 - Secuencias de aminoácidos de VH y VK de 3B10.

Figura 12 - Secuencias de aminoácidos de VH y VK de 8H5.

Figura 13 - Secuencias de aminoácidos de VH de 3B10 humanizado.

5 Figura 14 - Secuencias de aminoácidos de VK de 3B10 humanizado.

Figura 15 - Secuencias de aminoácidos de VH de 8H5 humanizado.

Figura 16 - Secuencias de aminoácidos de VK de 8H5 humanizado.

Figura 17 - ELISA de competición de los anticuerpos 8H5 humanizados por la unión a CTLA4-Fc contra la IgG1 de 8H5 quimérica biotinilada humana (="h8H5 parental IgG1").

10 Figura 18 - Secreción de IFN γ por el VH5/VK4 anti-CTLA4 y MDX0101 humanizados en una reacción mixta de linfocitos humanos con pares de donantes.

Figura 19 - Crecimiento del tumor MC38 en ratones con activación de CTLA4 humano con dosis semanales de anticuerpos a partir de día 2.

Tabla 1 - Secuencias del cebador para la amplificación de regiones variables de ADNc murino.

15 Tabla 2 - Secuencias del cebador para la amplificación de regiones variables murinas para la clonación en pANT17 y pANT13.

Los reactivos disponibles comercialmente mencionados en los ejemplos se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario. La fuente de las células identificadas en los ejemplos y en toda la memoria descriptiva mediante los números de acceso ECACC es la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), Salisbury, Inglaterra. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente. A continuación se describen procedimientos y materiales de ejemplo, aunque en la práctica o análisis de la presente invención también se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la el presente documento.

25 **Ejemplo 1 Generación de anticuerpos monoclonales de ratón**

La proteína de fusión-CTLA4-recombinante que comprende el dominio extracelular del CTLA4 humano fusionado con el dominio constante de la IgG1 humana se adquirió en R&D Systems (Oxford, Reino Unido). El fragmento extracelular del CTLA4 se preparó mediante escisión proteolítica de la proteína de fusión CTLA4-Fc con el Factor Xa (Qiagen, Crawley, Reino Unido), seguido de la posterior eliminación de la proteasa usando la resina de eliminación del Factor Xa (Qiagen) y del fragmento Fc escindido usando proteína A-agarosa para dejar el dominio extracelular de CTLA4 solamente.

35 Se inmunizó a ratones BALB/c hembra por vía subcutánea con 200 μ l de una emulsión 1:1 de adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido) que contiene 20 μ g de la proteína de fusión CTLA4-Fc. Los ratones inmunizados fueron reforzados posteriormente aproximadamente cada 3 semanas con hasta tres inyecciones intraperitoneales de una emulsión 1:1 de adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich) que contiene 20 μ g de CTLA4-Fc. 3 días antes de la fusión del mieloma, los dos ratones que mostraban el título de anticuerpos más alto recibieron un refuerzo intraesplénico de antígeno completo o dominio extracelular del CTLA4.

40 Los bazo se extrajeron y homogeneizaron para dar una única suspensión celular. Se fusionaron 1×10^8 esplenocitos con 5×10^7 células de mieloma de ratón NS0 (proporción 2:1) utilizando polietilenglicol (PEG). Las células fusionadas se resuspendieron en 200 ml de DMEM/20 % de FCS/5 % de BM Condimed H1 (Roche, Burgess Hill, Reino Unido) que contiene los agentes de selección de hibridoma azaserina e hipoxantina - "medio HAZA" y se pipeteó en volúmenes de 200 μ l en 10 placas de 96 pocillos. Las placas se incubaron a 37 °C en 5 % de CO₂ y la mitad del volumen (100 μ l) de cada pocillo de cultivo se reemplazó cada dos días con medio HAZA recién preparado que contiene 2,5 % de BM Condimed H1. Después de 12 días de incubación, 100 μ l de medio gastado de cada pocillo de crecimiento se transfirieron a una placa de almacenamiento de 96 pocillos y se analizó la presencia de anticuerpos frente a CTLA4-proteína de fusión utilizando el ELISA de CTLA4-proteína de fusión como se describe a continuación. Los cultivos inmunopositivos se ampliaron mediante transferencia a 1 ml de "medio H" (DMEM/20 % de FCS/hipoxantina) en una placa de 24 pocillos y se permitió el crecimiento durante 5 - 7 días. Después, cultivos positivos se subclonaron mediante dilución límite, se ampliaron y se analizaron mediante ELISA de CTLA4-proteína de fusión. Además, los cultivos positivos se analizaron mediante FACS como se describe a continuación.

Para la dilución limitante, se determinaron los recuentos de células usando un hemocitómetro y se diluyeron las células en serie en medio que contiene 2,5 % de BM Condimed H1 hasta que se alcanzaron densidades celulares

de 5 a 15 células/ml. Para cada hibridoma, se pipetearon 200 µl de solución celular en 48 pocillos con una densidad de 1 a 3 células por pocillo. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en 5 % de CO₂ durante 2 semanas con un medio de alimentación adicional de la mitad de un volumen después de 1 semana. El medio de cultivo se analizó para determinar la presencia de anticuerpos específicos para la proteína de fusión-anti-CTLA4 mediante ELISA. Los clones positivos en el ELISA se seleccionaron y se expandieron a cultivos de 10 ml en DMEM 20 % de FCS/ 2,5 % de BM Condimed H1. Después, los clones se congelaron en medio que contiene 10 % de DMSO y se almacenaron en N₂ líquido, y también se expandieron más para la purificación de anticuerpos. Dos hibridomas designados 3B10 y 8H5 se subclonaron y los subclones se congelaron después y se utilizaron para la producción de anticuerpos monoclonales en estudios adicionales.

Para identificar los hibridomas que secretan anticuerpos de ratón específicos de CTLA4 anti-humanos, las placas de ELISA (VWR, Lutterworth, Reino Unido) se revistieron durante la noche a 4 °C con 100 µl/pocillo de la proteína de fusión-CTLA4 recombinante o IgG1 humana (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido) a 0,5 µg/ml en PBS. Las placas se lavaron y se bloquearon con 150 µl/pocillo de PBS que contienen 2 % de BSA. Los sobrenadantes del cultivo celular o anticuerpos purificados se diluyeron en PBS/2 % de BSA y se añadieron 100 µl a cada placa, seguido de incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween (0,05 %) y se incubaron durante 1 hora con 100 µl/pocillo de Ig de cabra anti-ratón (específica de Fab) conjugada con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich). Las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween tras lo cual se añadió sustrato SigmaFast OPD (Sigma-Aldrich) y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 4 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de HCl 3M. Las placas se leyeron a 490 nm usando un lector de placas Dynex (Dynex, Worthing, Reino Unido).

Los anticuerpos monoclonales se isotiparon usando el kit de isotipado de anticuerpos de ratón ELISA rápido (Perbio, Cramlington, Reino Unido). Los anticuerpos se purificaron en una columna de proteína A-Sefarosa de 1 ml (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Antes de la purificación, tanto los tubos como la columna de Proteína A se despirogenaron usando NaOH 0,4M. La columna se reequilibró con 20 CV de 1x PBS pH 7,4. Se recogieron los sobrenadantes del cultivo de células de hibridoma, se ajustaron a 1x PBS a pH 7,4 usando 10x de PBS y se esterilizaron mediante filtración. El sobrenadante filtrado se bombeó a través de la columna a 0,5 ml/min. La columna se lavó con 1 x PBS a pH 7,4 y la IgG se eluyó usando citrato de sodio 0,1 M estéril a pH 3, con fracciones de 0,9 ml recogidas y neutralizadas con 0,1 ml de Tris-HCl 1M estéril a pH 9. En condiciones estériles, el producto se intercambió con tampón en PBS a pH 7,4 para eliminar cualquier tampón de elución y concentrar la muestra. Después de la concentración, los anticuerpos se cuantificaron mediante DO280nm usando un coeficiente de extinción, E_c (0,1 %) de 1,4. Los anticuerpos purificados se analizaron mediante SDS-PAGE usando un sistema de electroforesis Novex NuPAGE con un gel al 4-12 % NuPage (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) y tampón de carrera MES. Se preparó 1 µg de anticuerpo con tampón de muestra 4 x NuPAGE más beta-mercaptoetanol y se calentó. El gel se tiñó con solución de tinción InstantBlue (Expedeon, Cambridge, Reino Unido) y el tamaño molecular se estimó mediante la comparación de las bandas teñidas con PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas, York, Reino Unido). Se identificaron dos bandas para cada anticuerpo sin contaminación detectable presente.

Con el fin de evaluar la unión de anticuerpos a CTLA4 y el bloqueo de la interacción entre CTLA4 con los ligandos de CTLA4 B7.1 y B7.2, se realizaron ensayos de competición mediante ELISA. Los ligandos B7.1-Ig y B7.2-Ig (R&D Systems) se biotinilaron usando el kit de microbiotinilación Biotin Tag™ (Sigma-Aldrich). Las placas de 96 pocillos MaxiSorp (Nunc) se revistieron con 0,5 µg/ml de CTLA4-Ig (IgG1) recombinante humana (R & D Systems) en PBS de Dulbecco (PAA Laboratories, Yeovil, Reino Unido) (80 µl de volumen final) a 4 °C durante la noche. El CTLA4-Ig se desechó y las placas se bloquearon con PBS de Dulbecco-2 % de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado (0,05 % de Tween 20 en PBS de Dulbecco). Los anticuerpos de ensayo a diversas concentraciones se mezclaron previamente con B7.1-Ig biotinilado (0,36 µg/ml de concentración final) o B7.2-Ig biotinilado (0,65 µg/ml de concentración final) y después se añadió a la placa de CTLA4-Ig (84 µl de volumen final). Todas las muestras se analizaron por duplicado. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con tampón de lavado. Se añadieron 80 µl de una dilución de 1 en 500 de estreptavidina HRP (Sigma-Aldrich) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado y se añadió sustrato SigmaFast OPD (Sigma-Aldrich, n.º de catálogo P9187) y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 4 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de HCl 3M. Las placas se leyeron a 490 nm usando un lector de placas Dynex. Los subclones 8H5-1B1, 3B10-4F7, 7B9-1A3 y 2C7-1G10 se seleccionaron como productores de anticuerpos monoclonales principales sobre la base de la unión a CTLA4 (Figura 1). De estos principales, todos menos 7B9-1A3 mostraron que competían con B7.1 biotinilado (Figura 2) y B7.2 biotinilado (Figura 3) por la unión a CTLA4 humano.

Con el fin de determinar si los anticuerpos monoclonales principales unidos a CTLA4 se expresaban en la superficie de las células T, se realizó un análisis de citometría de flujo. Se aislaron las células T periféricas humanas a partir de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) humanas y se estimularon para aumentar la expresión de CTLA4. Las células CD4⁺ se purificaron a partir de PBMC utilizando un kit de aislamiento de células T CD4⁺ (Miltenyi Biotec, Bisley, Reino Unido), se sembraron en una placa de 24 pocillos (1 x 10⁶ células/pocillo) en medio AIM-V (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) y se incubaron a 37 °C durante la noche. Las células se estimularon con ionomicina (1 µg/ml) y PMA (12-miristato 13-acetato de forbol) (50 ng/ml) y se incubaron 4 horas a 37 °C. Las células se lavaron una vez en medio AIM-V, se fijaron en PBS que contenía 2 % de formaldehído durante 15 minutos y se resuspendieron en tampón de FACS (D-PBS que contenía 1 % de BSA, azida sódica al 0,05 % y 0,1 % de saponina)

a 2×10^6 células/ml y se incubaron 30 minutos a 4 °C. Se tiñeron 2×10^5 células utilizando una dilución de 1 en 10 del anticuerpo anti-CTLA4 conjugado con PE (BN13) (Abcam, Cambridge, Reino Unido) como control positivo o con 5 µg/ml de anticuerpos monoclonales anti-CTLA4 individuales junto con una dilución de 1 en 50 de anticuerpo IgG anti-ratón conjugado con PE (Sigma). También se incluyó IgG de ratón (Sigma) como controles separados para los diferentes isotipos murinos presentes dentro de los anticuerpos monoclonales principales. Las células se tiñeron durante 1 hora a 4 °C. Un anticuerpo IgG anti-ratón conjugado con PE también se incluyó solo control. Las células se lavaron dos veces con tampón de FACS y, opcionalmente, se tiñeron durante 1 hora en oscuridad a 4 °C, ya sea con una dilución de 1 en 40 de anticuerpo anti CD4 humano conjugado con FITC (Caltag, Buckingham, Reino Unido) o anticuerpo IgG2a de ratón conjugado con FITC (Caltag). Después de dos lavados con tampón de FACS, las células se resuspendieron en tampón FACS y se realizó citometría de flujo usando un Beckton Dickinson FACSCalibur (Becton Dickinson, Oxford, Reino Unido). Los parámetros del instrumento se determinaron mediante análisis de los anticuerpos de control de isotipo relevante. Sobre la base de la unión a CTLA4 observada, los anticuerpos monoclonales 8H5 y 3B10 se designaron como anticuerpos monoclonales principales primario y secundario, respectivamente.

Ejemplo 2 Secuenciación del gen de la región variable

Los subclones 3B10-4F7, 3B10-6E3, 8H5-1A1 y 8H5-1B productores de los anticuerpos monoclonales principales 8H5 y 3B10 se sometieron a análisis de la secuencia de la región variable (región V). El ARN total se extrajo de 3×10^6 células de hibridoma utilizando el kit RNAqueous-4PCR (Ambion, Warrington, Reino Unido) y se utilizó para la síntesis de ADNc. Los fragmentos de la región V de la cadena ligera kappa y la cadena pesada de la inmunoglobulina murina se amplificaron mediante PCR usando cebadores de la secuencia líder de ratón degenerados (Sigma) y cebadores del dominio constante único (Sigma) como se muestra en la tabla 1. Los fragmentos de PCR resultantes se subclonaron en el sistema de vector pGEM-T Easy I (Promega, Southampton, Reino Unido) y los insertos se secuenciaron usando el cebador específico del vector, M13Directo (Sigma). La secuenciación de todo el ADN la realizó Geneservice Ltd, Cambridge, Reino Unido. Se obtuvieron secuencias de nucleótidos únicas de la región V para 3B10 (SEQ ID NO 1 y 2) y 8H5 (SEQ ID NO 5 y 6).

Las secuencias de las regiones hipervariables (CDR) de 3B10 y 8H5 se determinaron del siguiente modo:

SEQ ID No. 9 3B 10 CDRH1 DYNMD
 SEQ ID No. 10 3B10 CDRH2 NINPNSESTSYNQKFKG
 SEQ ID No. 11 3B10 CDRH3 DGNRYDAWFAY
 SEQ ID No. 12 3B10 CDRL1 SASSSVTYMH
 SEQ ID No. 13 3B10 CDRL2 STSILAS
 SEQ ID No. 14 3B10 CDRL3 QQRTSYPLT
 SEQ ID No. 15 8H5 CDRH1 SYWIN
 SEQ ID No. 16 8H5 CDRH2 RIAPGSGTTTYNEVFKG
 SEQ ID No. 17 8H5 CDRH3 GDYGSY
 SEQ ID No. 18 8H5 CDRL1 SASSSISYMH
 SEQ ID No. 19 8H5 CDRL2 DTSKLAS
 SEQ ID No. 20 8H5 CDRL3 HQRTSYPLT

Ejemplo 3 Generación de anticuerpos quiméricos

Las secuencias del dominio variable de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales principales 3B10 y 8H5 se amplificaron mediante PCR y se subclonaron en vectores de expresión de anticuerpos pANT (Figura 8) con regiones V de las cadenas pesada y ligera clonadas en pANT17 y pANT13 respectivamente. Los genes de la región V de la cadena pesada se clonaron en pANT17 a través de los sitios MluI y HindIII en el marco con el gen de la cadena pesada $\gamma 1$ humana (alotipo de G1m3 (G1m(f)) o el gen de la cadena pesada $\gamma 4$ humana, y los genes de la región V de la cadena ligera se clonaron en pANT13 a través de los sitios BssHII y BamHI en marco con el gen de la región constante de la cadena ligera kappa humana (alotipo Km3). La transcripción de los genes de las cadenas pesada y ligera estaba bajo el control del promotor de CMV I/E (documentos US5168062 y US5385839, Universidad de Iowa) y el plásmido pANT17 contenían minigén de *dhfr* mutante (Simonsen y Levinson 1983, PNAS 80: 2495-2499) bajo el control de un promotor SV40 y la secuencia poliA para la selección en células eucariotas. Tanto pANT17 como pANT 13 contenían un gen de la β -lactamasa (Ap^R) para la selección procariótica y un origen e replicación pMB1 para la propagación en células procariotas. Todos los plásmidos se propagaron en *E. coli* XL1-blue (Stratagene n.º de cat. 200130). Los cebadores utilizados para amplificar los genes de la región V para la clonación en los vectores de expresión de pANT se muestran en la Tabla 2.

Después, las construcciones de la expresión de las cadenas pesada y ligera se cotransfectaron de forma transitoria en células HEK293 mediante transfección a base de fosfato de calcio o se transfectaron de forma estable en células NS0 por electroporación. El anticuerpo secretado se purificó a partir de los sobrenadantes del cultivo celular mediante cromatografía de proteína A. Mediante análisis con ELISA de unión a CTLA4 (Figura 4), ELISA de competición de CTLA4 contra B7.1 y B7.2 (Figuras 5 y 6), y mediante la unión al CTLA4 expresado en las células T por citometría de flujo como en el Ejemplo 1, se demostró que ambos anticuerpos 3B10 y 8H5 quiméricos retenían la unión a CTLA4 de los anticuerpos monoclonales de partida.

Ejemplo 4 Ensayo de proliferación de células T

Las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) se activaron usando perlas recubiertas con anticuerpos anti-CD2 humano, anti-CD3 humano y anti-CD28 humano (Miltenyi Biotec, Bisley, Surrey). Se sembraron 5×10^5 células en cada pocillo de una placa de 96 pocillos en medio AIM-V con las perlas añadidas a las células en una proporción de 1 perla por célula. Los anticuerpos de ensayo o de control de isotipo se diluyeron según sea adecuado en medio AIM-V y se añadieron 50 μ l por pocillo a las células, dando un volumen final de 200 μ l. También se incluyeron controles con solo medio (sin anticuerpo). Las placas se incubaron durante 4 días a 37 °C y las células se pulsaron después con 0,75 μ Ci de [3 H]-timidina (Perkin Elmer, Beaconsfield, Reino Unido) en medio de cultivo AIM-V® y se incubaron durante otras 18 horas antes de recolectar sobre esteras de filtro (Perkin Elmer) usando un cosechador celular TomTec Mach III (Hamden CT, EE. UU.). Los recuentos por minuto (cpm) para cada pocillo se determinaron mediante recuento por centelleo Meltilex™ (Perkin Elmer) en un contador de centelleo líquido 1450 Microbeta Wallac Trilux (Perkin Elmer) en Paralux, de recuento de fondo bajo. Los recuentos por minuto para cada muestra de anticuerpo se normalizaron con el control de solo medio. En dos estudios separados, se demostró que los anticuerpos quiméricos invertían la inhibición inducida por CTLA4 de la proliferación de las células T, como se ha visto con los anticuerpos monoclonales de partida (figura 7).

Ejemplo 5 Generación de anticuerpos humanizados

Los anticuerpos humanizados se generaron utilizando los procedimientos descritos en el documento EP1844074 (Antitope Ltd). Los modelos estructurales de las regiones V de ratón se produjeron utilizando Swiss PDB y se analizaron con el fin de identificar los aminoácidos importantes de las regiones V de 3B10 y 8H5 que era probable que fueran importantes para las propiedades de unión a CTLA4 del anticuerpo ("restos restrictivos"). Se usó una base de datos de secuencias de la región V humanas para identificar segmentos de secuencias de la región V humana que contienen cada uno de los restos de restricción que se van a usar en el diseño de los anticuerpos humanizados. Normalmente se usaron dos o más segmentos de la secuencia de la región V alternativas para proporcionar cada resto de restricción resultante en una amplia gama de posibles secuencias de secuencias de la región V anti-CTLA4 humanizadas tanto para 8H5 como para 3B10. Después, estas secuencias se analizaron para la predicción de la unión del péptido del MHC de clase II no de la línea germinal mediante análisis *in silico* como se describe en Fothergill et al. (documento WO9859244, Eclagen Ltd) y también para epítomos de las células T CD4⁺ conocidos usando bases de datos que incluyen "The Immune Epitope Database and Analysis Resource", <http://www.immuneepitope.org/>. Las secuencias de la región V con los péptidos de unión del MHC de clase II no línea germinal o con coincidencias significativas contra las bases de datos del epítomo de células T se desearon. Esto dio lugar a un conjunto reducido de secuencias de la región V. Las combinaciones seleccionadas de los segmentos de la secuencia de la región V se combinaron después para producir secuencias de aminoácidos de la región variable de las cadenas pesada y ligera humanizadas. Las secuencias de cinco cadenas pesadas y de cinco cadenas ligeras (designadas VH1 a VH5, y VK1 a VK5 respectivamente) se seleccionaron para cada uno de 8H5 (SEQ ID NO 41 a 45 y 46 a 50 respectivamente) y 3B10 (SEQ ID NO 31 a 35 y 36 a 40 respectivamente).

El ADN que codifica las regiones V variantes humanizadas se sintetizó y se subclonó en los vectores de expresión pANT17 y pANT13 como se describe en el ejemplo 3. Todas las combinaciones de las cadenas VH y VK humanizadas (es decir, un total de 25 apareamientos para cada uno de 8H5 y 3B10) se transfectaron de forma transitoria en células HEK293 y también se transfectaron en células NS0, y el anticuerpo se purificó mediante cromatografía en proteína A de los sobrenadantes del cultivo como se describe en el ejemplo 3.

Ejemplo 6 Análisis de anticuerpos humanizados

La unión de las variantes humanizadas 8H5 y 3B10 derivadas de HEK y derivadas de NS0 a CTLA4 recombinante se evaluó en un ELISA de competición contra el anticuerpo quimérico parental adecuado. Los anticuerpos quiméricos 8H5 y 3B10 parentales se biotinilaron usando el kit Biotin Tag™ Micro Biotinylation (Sigma-Aldrich). Las placas de 96 pocillos MaxiSorp (Nunc) se revistieron con 0,5 μ g/ml de CTLA4-Ig en PBS de Dulbecco (100 μ l de volumen final) a 4 °C durante la noche. El CTLA4-Ig se desechó y las placas se bloquearon con PBS de Dulbecco-2 % de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado (0,05 % de Tween 20 en PBS de Dulbecco). Los anticuerpos humanizados de ensayo a diversas concentraciones se mezclaron previamente con el anticuerpo quimérico parental biotinilado (0,02 μ g/ml de concentración final) y después se añadieron a la placa de CTLA4-Ig (100 μ l de volumen final). Todas las muestras se analizaron por duplicado. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con tampón de lavado. Se añadieron 100 μ l de una dilución de 1 en 500 de estreptavidina HRP (Sigma-Aldrich) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado y se añadieron 100 μ l de sustrato SigmaFast OPD (Sigma-Aldrich, n.º de catálogo P9187) y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 4 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 μ l de HCl 3M. Las placas se leyeron a 490 nm usando un lector de placas Dynex.

Todas las variantes humanizadas principales 8H5 mostraron perfiles de unión competitiva similares a los del anticuerpo quimérico 8H5, aunque las variantes que contienen la cadena kappa VK5 mostraron una unión ligeramente disminuida en comparación con otras variantes (Figura 17). Del mismo modo, todas las variantes 3B10 humanizadas principales mostraron perfiles de unión competitiva similares a los del anticuerpo quimérico 3B10.

Además, todas las variantes 8H5 y 3B10 humanizadas principales, cuando se analizaron en el ELISA de competición del CTLA4 contra B7.1 y B7.2 (Ejemplo 3) dieron perfiles de unión competitiva muy similares a los del anticuerpo quimérico mostrado en las figuras 5 y 6, de modo que > 90 % de la unión B7.1 o B7.2 estaba inhibida a las concentraciones máximas de las variantes humanizadas principales. Una variante VH5/VK4 humanizada principal (SEQ ID Nos 45 y 39 respectivamente) se eligió como el anticuerpo principal para otros estudio.

Ejemplo 7 Generación de scFv y Fab

Las variantes 8H5 y 3B10 humanizadas del ejemplo 6 se convirtieron en scFv y se clonaron en los vectores de expresión en fagos M13 como se describe en Benhar I. y Reiter Y., Current Protocols in Immunology, Unit 10.19B, Wiley Online Library, May 2002 (<http://www.currentprotocols.com/protocol/im1019b>) usando el módulo de expresión RPAS del vector CANTAB5E El (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Reino Unido). Los genes de VH y VK humanizados se amplificaron usando cebadores que proporcionaron sitios de restricción SfiI y NotI, un enlazador Gly4Ser interno y un marcador his6 en el extremo C. Las construcciones de scFv se insertaron en el vector pCANTAB5E como fragmentos DE SfiI-NotI y se transformaron en E.coli HB2151, que dio lugar a scFv exportados al periplasma y parcialmente al medio de crecimiento. Los scFv se purificaron a partir del medio de cultivo mediante cromatografía de afinidad de níquel-quelato usando cartuchos de SU-Select HF (Sigma-Aldrich). Los scFv purificados se analizaron en el ensayo de competición B7.1-Ig y B7.2-Ig como se detalla en el Ejemplo 1 y todos los scFv humanizados exhibieron unión competitiva a CTLA4. Las variantes de 8H5 y 3B10 humanizadas del Ejemplo 6 también se convirtieron en Fab usando el procedimiento utilizado para los scFv, excepto que los genes de VH y VK humanizados amplificados se amplificaron después con los genes de la región constante CH1 y Ck para formar los fragmentos VH-CH1 y VK-Ck que se amplificaron después con los cebadores para unirse a estos fragmentos con una secuencia líder de pelB de 22 aminoácidos (Lei S.P., Lin H.C., Wang S.S., Callaway J., y Wilcox G., J Bacteriol. 169 (1987) p4379-4383) entre los fragmentos de los genes de VH-CH1 aguas arriba y de VK-Ck aguas abajo, que da lugar a un gen de Fab dicistrónico. Los Fab de las variantes de anticuerpo humanizado se generaron y purificaron como anteriormente para los scFv y se analizaron en el ensayo de competición B7.1-Ig y B7.2-Ig como se detalla en el ejemplo 1. Todos los Fab humanizados exhibieron unión competitiva a CTLA4.

Ejemplo 8 Análisis de las respuestas de las células T CD4+

Las PBMC se aislaron de las capas leucocitarias de donantes de la comunidad sanos (de sangre extraída en un plazo de 24 horas) obtenidas del Servicio Nacional de Transfusión de Sangre del Reino Unido (Addenbrooke's Hospital, Cambridge, Reino Unido) de acuerdo con la autorización concedida por el Comité de Ética de Investigación Local del Hospital de Addenbrooke. Las PBMC se aislaron de capas leucocitarias mediante centrifugación en densidad Lymphoprep (Axis-shield, Dundee, Reino Unido) y las células T CD8⁺ se deplecionaron usando CD8⁺ RosetteSep™ (StemCell Technologies Inc, Londres, Reino Unido). Los donantes se caracterizaron mediante la identificación de los haplotipos HLA-DR utilizando un kit de tipado tisular basado en HLA SSP-PCR (Biotest, Solihull, Reino Unido). Las respuestas de las células T a los antígenos control, incluyendo la toxina tetánica antígeno de recuerdo, también se determinaron (KLH Pierce, Cramlington, Reino Unido) y los péptidos derivados de los virus de la gripe A y de Epstein Barr). Los PBMC se congelaron y almacenaron en nitrógeno líquido hasta que fueron necesarios.

Para preparar células dendríticas derivadas de monocitos (DC), se seleccionaron 50 PBMC de donantes diferentes para proporcionar una distribución con frecuencias de los alotipos HLA-DR y HLA-DQ similares a las frecuencias en la población general mundial. Los PBMC se revivieron en medio de cultivo AIM-V® y las células CD14⁺ se aislaron utilizando microperlas Miltenyi CD 14 y columnas LS (Miltenyi Biotech, Oxford, Reino Unido). Los monocitos se resuspendieron en medio AIM-V® complementado con 1000 U/ml de IL-4 y 1000 U/ml de GM-CSF ("medio de cultivo DC") a $4-6 \times 10^6$ PBMC/ml y luego se distribuyeron en placas de 24 pocillos (2 ml de volumen de cultivo final). Las células se alimentaron el día 2 mediante el cambio de la mitad del volumen del medio de cultivo DC. Para el día 3, los monocitos se habían diferenciado a DC semimaduros que se preincubaron con 40 µg/ml de anticuerpo humanizado quimérico de ensayo, 100 µg/ml de KLH o medio solamente. Los DC semimaduros se incubaron con antígeno durante 24 horas, después de lo cual el exceso de anticuerpo de prueba se eliminó lavando las células dos veces y resuspendiendo en medio de cultivo DC suplementado con 50 ng/ml de TNF-α (Peprotech, Londres, Reino Unido). Los DC se alimentaron el día 7 mediante cambio de la mitad del volumen del medio de cultivo de DC (suplementado con 50 ng/ml de TNFα) antes de cosechar los DC maduros el día 8. Los DC maduros cosechados se contaron y la viabilidad se evaluó usando exclusión con pigmento azul tripán. Después, los DC se irradiaron con rayos γ (4000 rads) y se resuspendieron a 2×10^5 células por ml en medio AIM-V antes de su uso en el ELISPOT y ensayos de proliferación. Adicionalmente, el día 8, se prepararon también células T CD4⁺ frescas. Para purificar las células T CD4⁺, los PBMC se revivieron en medio de cultivo AIM-V® y las células CD4⁺ se aislaron utilizando microperlas Miltenyi CD4 y columnas LS (Miltenyi Biotech, Oxford, Reino Unido) y se resuspendieron en medio AIM-V® en 2×10^6 células/ml.

El día 8, se establecieron ensayos de proliferación de células T mediante los cuales se añadieron 1×10^5 células T CD4⁺ a 1×10^4 DC cargados con anticuerpos humanizados o quiméricos (relación de 10:1) en placas de 96 pocillos con fondo en U, con medio AIM-V® añadido a un volumen final de 200 µl/pocillo). El día 14, las placas de ensayo se pulsaron con Luci [³H] (Perkin Elmer, Beaconsfield, Reino Unido) por pocillo en 25 µl de AIMV durante 6 horas antes de la cosecha en esteras de filtro (Perkin Elmer) utilizando un cosechador celular TomTec Mach III (Hamden CT, EE.

UU.). Todas las preparaciones de anticuerpos se analizaron en cultivos por sextuplicado. Los recuentos por minuto (cpm) para cada pocillo se determinaron mediante recuento por centelleo Meltilex™ (Perkin Elmer) en un contador de centelleo líquido 1450 Microbeta Wallac Trilux (Perkin Elmer) en Paralux, de recuento de fondo bajo. Los recuentos por minuto para cada muestra de anticuerpo se normalizaron con el control con solo medio AIM V®.

5 Para los ensayos de ELISPOT, las placas de ELISPOT (Millipore, Watford, Reino Unido) se recubrieron con 100 µl/pocillo de anticuerpo de captura de IL-2 (R & D Systems, Abingdon, Reino Unido) en PBS. Después, las placas se lavaron dos veces en PBS, se incubaron durante la noche en tampón de bloqueo (1 % de BSA (Sigma) en PBS) y se lavaron en medio AIM V®. El día 8, se añadieron 1×10^5 células T CD4⁺ autólogas a 1×10^4 de DC cargados con antígeno (proporción de 10:1) en placas de ELISpot de 96 pocillos. Todas las preparaciones de anticuerpos se
10 analizaron en cultivos por sextuplicado. Para cada PBMC donante, también se incluyeron un control negativo (medio AIM V® solo), control sin células y un control positivo para PHA (10 µg/ml).

Después de un período de incubación de 7 días adicionales, las placas ELISPOT se desarrollaron mediante tres lavados secuenciales en dH₂O y PBS antes de la adición de 100 µl de anticuerpo de detección biotinilado filtrado (R & D Systems, Abingdon, Reino Unido) en PBS/1 % de BSA. Después de incubación a 37 °C durante 1,5 horas, las
15 placas se lavaron adicionalmente tres veces en PBS y se añadieron 100 µl de estreptavidina-AP filtrada (R & D Systems) en PBS/1 % de BSA durante 1 hora (incubación a temperatura ambiente). La estreptavidina-AP se desechó y las placas se lavaron cuatro veces en PBS. Se añadió BCEP/NBT (R & D Systems) a cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. El desarrollo de la mancha se detuvo mediante lavado de los pocillos y las partes posteriores de los pocillos tres veces con dH₂O. Las placas secas se escanearon en un
20 analizador Immunoscan™ y las manchas por pocillo (mpp) se determinaron usando el software Immunoscan™ Versión 4.

Tanto para los ensayos de proliferación como de ELISPOT de IL-2, los resultados se expresaron como un índice de estimulación (IE) definidos como la relación de cpm (ensayo de proliferación) o machas (ensayo ELISPOT) para el anticuerpo de ensayo contra un control de solo medio usando un umbral de IE igual o mayor que 2 (IE ≥ 2,0) para
25 las respuestas de células T positivas. Los datos mostraron que los anticuerpos 8H5 quimérico y 3B10 quimérico indujeron respuestas de células T en 8 o más de los 50 PBMC de donantes analizados (> = 16%), mientras que ninguno de los anticuerpos 8H5 o 3B10 humanizados indujo respuestas de células T en más de 2 de 50 donantes (<= 4 %, promedio de 2 % + -2 %), lo que demuestra la eficacia del proceso de humanización en la eliminación de respuestas de células T a partir de las regiones V. En paralelo, el ADN con las secuencias de la región V de los
30 anticuerpos anti-CTLA4 completamente humanos MDX010 (Ipilimumab) (Keler y col., citado anteriormente) y tremelimumab (Ribas y col., citado anteriormente) se sintetizaron y usaron para producir formas IgG1/kappa recombinantes de estos anticuerpos con procedimientos como se detalla en el Ejemplo 5. Las preparaciones derivadas de NS0 de estos anticuerpos se analizaron después con los mismos 50 PBMC donantes que el anterior para la inducción de las respuestas de células T CD4 + colaboradoras en cultivos por sextuplicado. Las respuestas
35 de células T se detectaron en un promedio de 4 donantes para Ipilimumab (8 % + - 2 %) y 5 donantes para la versión de IgG1/k de tremelimumab (10 % + - 2 %), lo que demuestra que solo los anticuerpos anti-CTLA4 humanizados de la presente invención, cuando se analizó *in vitro* a inducción de las respuestas de células T CD4 + colaboradoras en 50 muestras de sangre humana, fueron capaces de dar respuestas de células T CD4 + en <= 4 % de los donantes.

Ejemplo 9 Modelo de reacción de linfocitos mixtos humanos (MLR)

40 Se usó un ensayo de reacción de linfocitos mixtos para medir el efecto de bloqueo de la vía del CTLA4 sobre la secreción de IFN-γ como una medida de la activación de las células T humanas. La sangre fresca de múltiples donantes humanos (obtenidos del Servicio Nacional de Transfusión de Sangre del Reino Unido, ejemplo 8) se diluyó a 1:1 con PBS/2 % de suero humano y se estratificó en solución Lymphoprep (Nycomed) para centrifugar a 900 g. Los PBMC se retiraron de la interfaz, se lavaron y se resuspendieron en medio AIM-V (Invitrogen). Los PBMC
45 generados a partir de diferentes pares de donantes mal apareados se combinaron después en una relación 1: 1 y se sembraron en una placa de 96 pocillos para proporcionar un total de $2,5 \times 10^5$ de PBMC por pocillo de muestra. Se añadió PHA (fitohemaglutinina, Sigma Aldrich) para una concentración final de 2 µg/ml para estimular la proliferación de poblaciones de células T. El anticuerpo anti-CTLA4 VH5/VK4 principal, el anticuerpo control anti-CTLA4 MDX010 (ejemplo 8) o un anticuerpo IgG1 de control de isotipo se añadieron a una concentración final de 150 µg/ml. También
50 se usaron 5 µg/ml de CTLA4-Fc en lugar de anticuerpo como control para demostrar la inhibición de la secreción de IFN-γ. El volumen total final por pocillo fue de 150 µl y cada anticuerpo se analizó cinco veces por combinación de donantes. Placas de 96 pocillos se incubaron en condiciones de cultivo normales durante 72 horas, después de lo cual se obtuvieron muestras de 100 µl del sobrenadante para la medición de IFN-γ mediante ELISA (Thermo scientific, ESS0002) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. A partir de los datos de la Figura 19, el
55 anticuerpo VH5/VK4 principal mostró mayor activación de células T que el anticuerpo de control anti-CTLA4 MDX010 para todas las combinaciones de donantes con un aumento promedio de > 2 veces en la activación de las células T para VH5/VK4 en comparación con MDX010.

Ejemplo 10 Modelo animal de tumor

60 Se usó un modelo animal de tumor para el análisis *in vivo* de anticuerpos anti-CTLA4 humanos en la inhibición del crecimiento tumoral. En el modelo, células tumorales de colon murino MC38 (Corbett y col., (1975) Cancer Res 35:

2434-2439, suministradas por Oncolmmune, Inc. Ann Arbor, EE. UU.) se cultivaron en ratones con activación para CTLA4 humano (Oncolmmune, Inc.).

5 A los ratones con activación para CTLA4 (7-10 semanas de edad, machos y hembras igualmente distribuidos en grupos) se les inyectó por vía subcutánea en el flanco 5×10^5 células tumorales MC38 en el volumen de 0,1 ml. Se inyectaron bien el anticuerpo principal VH5/VK4 anti-CTLA4, MDX010 (Ejemplo 8) o bien un anticuerpo control equivalente de isotipo a las dosis 5 mg/kg o 10 mg/kg (volumen de dosis de 10 ml/kg) semanalmente a partir del día después de la administración de las células tumorales ("Día 2"). Las mediciones del tumor se realizaron dos veces a la semana durante el curso del experimento mediante medición con compás y el tamaño del tumor se expresó como el volumen cúbico (mm^3). Se siguió a los animales hasta alcanzar un volumen de tumor de 2000 mm^3 o el día 45 después de la inyección de las células tumorales. Los resultados mostrados en el Ejemplo 19 demuestran una inhibición mejorada del crecimiento del tumor por el anticuerpo principal VH5/VK4 anti-CTLA4 en comparación con MDX010.

10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-CTLA4 humanizado que inhibe la unión de CTLA4 a B7 humano, en el que dicho anticuerpo comprende regiones variables que tienen secuencias de CDR de:

- (i) secuencia que comprende CDRH1 DYNMD (SEQ ID NO:9)
- (ii) secuencia que comprende CDRH2 NINPNSESTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 10)
- (iii) secuencia que comprende CDRH3 DGNRYDAWFAY (SEQ ID NO:11)
- (iv) secuencia que comprende CDRL1 SASSSVTYMH (SEQ ID NO:12)
- (v) secuencia que comprende CDRL2 STSILAS (SEQ ID NO:13), y
- (vi) secuencia que comprende CDRL3 QQRTSYPLT (SEQ ID NO:14);

o

- (i) secuencia que comprende CDRH1 SYWIN (SEQ ID NO:15)
- (ii) secuencia que comprende CDRH2 RIAPGSGTTYNEVFKG (SEQ ID NO: 16)
- (iii) secuencia que comprende CDRH3 GDYGSY (SEQ ID NO:17)
- (iv) secuencia que comprende CDRL1 SASSSISYMH (SEQ ID NO:18);
- (v) secuencia que comprende CDRL2 DTSKLAS (SEQ ID NO:19), y
- (vi) secuencia que comprende CDRL3 HQRTSYPLT (SEQ ID NO:20);

2. Un anticuerpo anti-CTLA4 de la reivindicación 1, que comprende secuencias de la región variable seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 31-35 para la región variable de la cadena pesada en combinación con secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 36-40 para la región variable de la cadena ligera.

3. Un anticuerpo anti-CTLA4 de la reivindicación 1, que comprende secuencias de la región variable seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 41-45 para la región variable de la cadena pesada en combinación con secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 46-50 para la región variable de la cadena ligera.

4. Un anticuerpo anti-CTLA4 de la reivindicación 3, que comprende la SEQ ID NO: 45 para la región variable de la cadena pesada en combinación con la SEQ ID NO: 49 para la región variable de la cadena ligera.

5. Un anticuerpo anti-CTLA4 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que, cuando se analiza *in vitro* para la inducción de respuestas de células T CD4 + colaboradoras en al menos 50 muestras de sangre humana con una distribución de alotipos HLA-DR de la población humana, da lugar a ≤ 4 % de respuestas de células T.

6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las secuencias de la región variable derivan totalmente de las secuencias de las regiones variables de anticuerpo humano.

7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que está comprendida por regiones variables junto con una región constante de cadena pesada de cualquiera de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o una región constante de IgG mutada, y una región constante de cadena ligera de isotipo kappa, por ejemplo, en el que las regiones constantes humanas son IgG1 y kappa o IgG4 y kappa.

8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el anticuerpo es un scFv o Fab.

9. Un anticuerpo multiespecífico que comprende uno o más anticuerpos de las reivindicaciones 1-8.

10. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

11. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 10.

12. Una célula huésped que comprende un vector de la reivindicación 11.

13. Una composición que comprende un anticuerpo anti-CTLA4 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o un polinucleótido de la reivindicación 10.

14. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en un procedimiento de diagnóstico *in vivo* de una enfermedad relacionada con CTLA4 humano.

15. El uso de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en un procedimiento para detectar *in vitro* la presencia de antígeno CTLA4 humano en una muestra para el diagnóstico de una enfermedad relacionada con CTLA4 humano.

16. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o un polinucleótido de la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de una enfermedad, incluido el cáncer, por ejemplo, en el que el cáncer es cáncer de próstata, de riñón, de colon, de pulmón o de mama; un trastorno proliferativo celular, una enfermedad del sistema nervioso

central (SNC), una enfermedad del sistema sanguíneo, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad infecciosa, una alergia, una enfermedad relacionada con células T, enfermedad del injerto contra el huésped o enfermedad del huésped contra el injerto.

Figura 1:

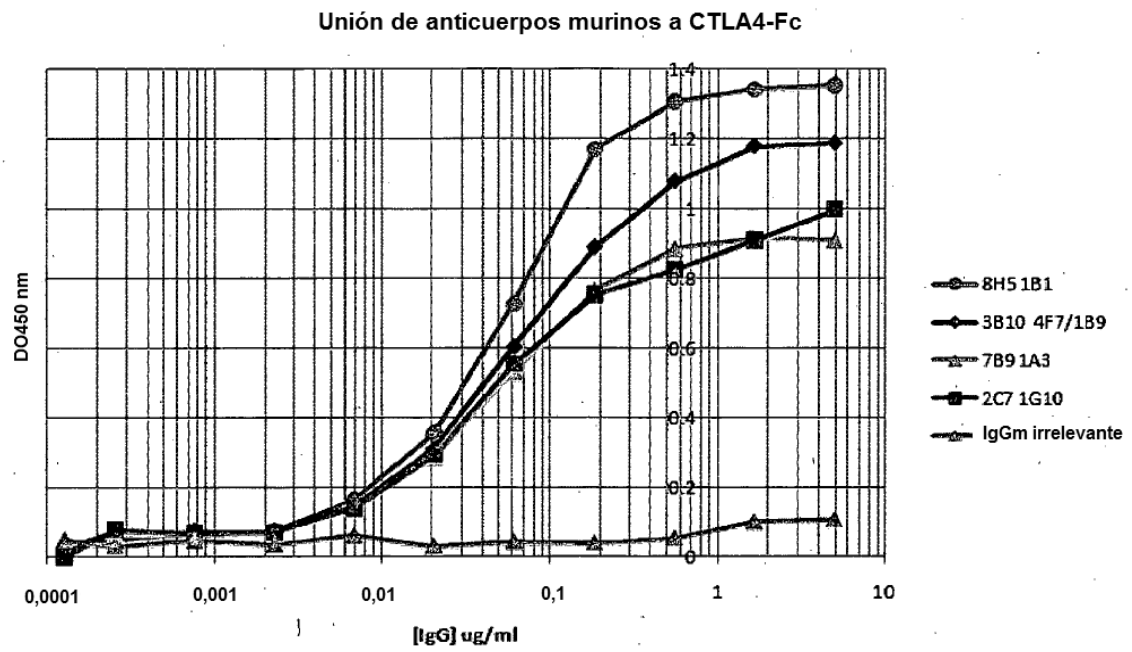


Figura 2:

Competición de anticuerpos de hibridoma de ratón contra B7.1 biotinilado

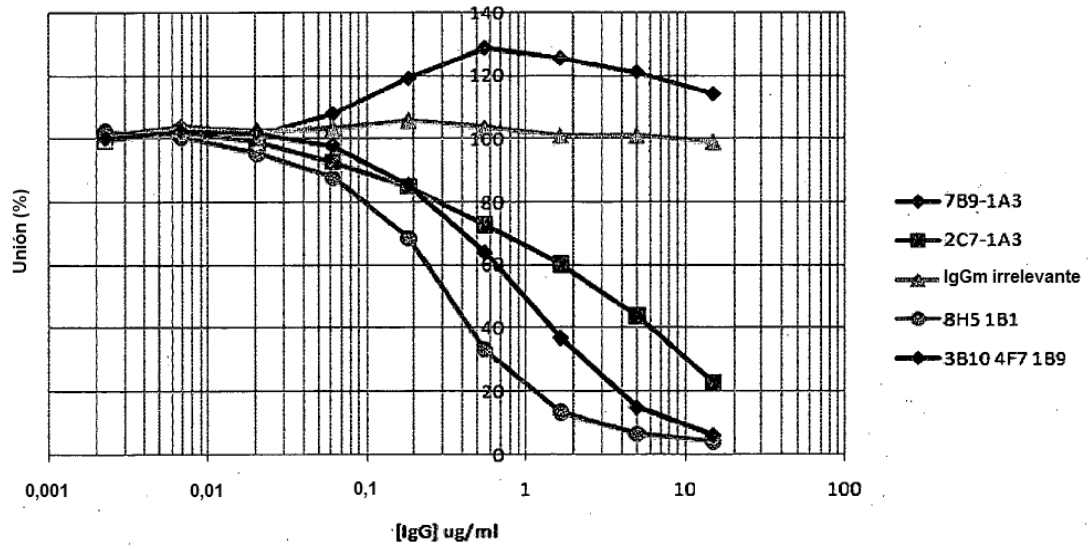


Figura 3:

Competición de anticuerpos de hibridoma de ratón contra B7.2 biotinilado

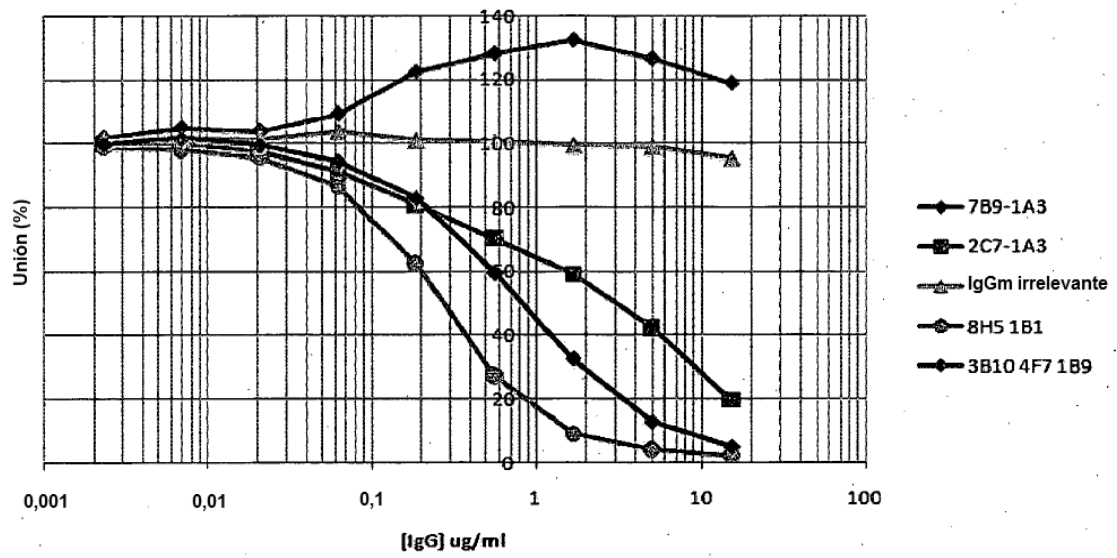


Figura 4:

Unión de anticuerpos IgG1 humanos (quiméricos) frente a CTLA4-Fc

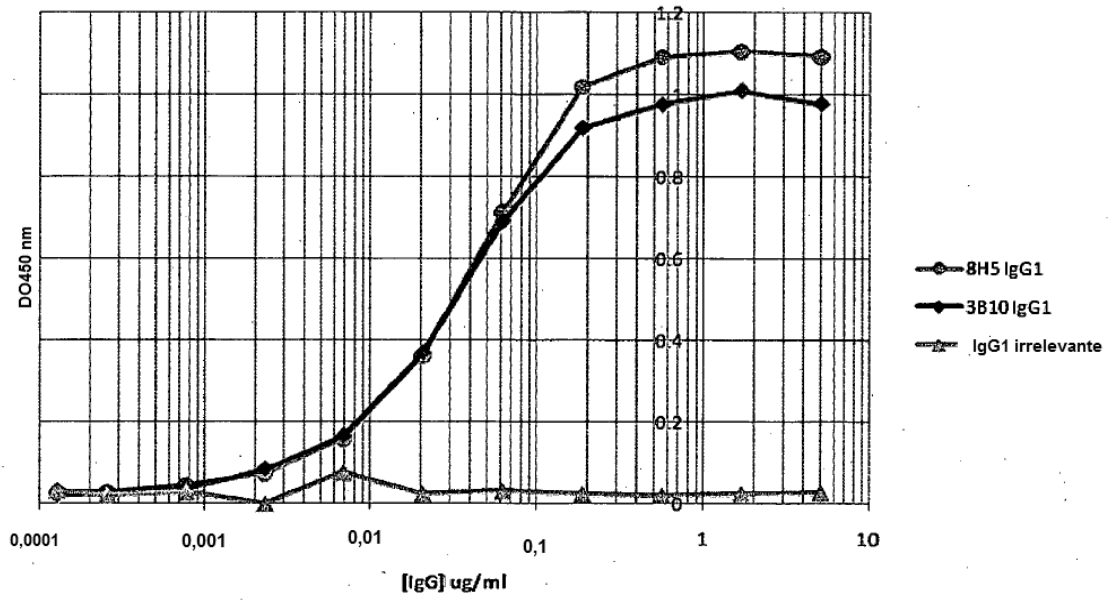


Figura 5:

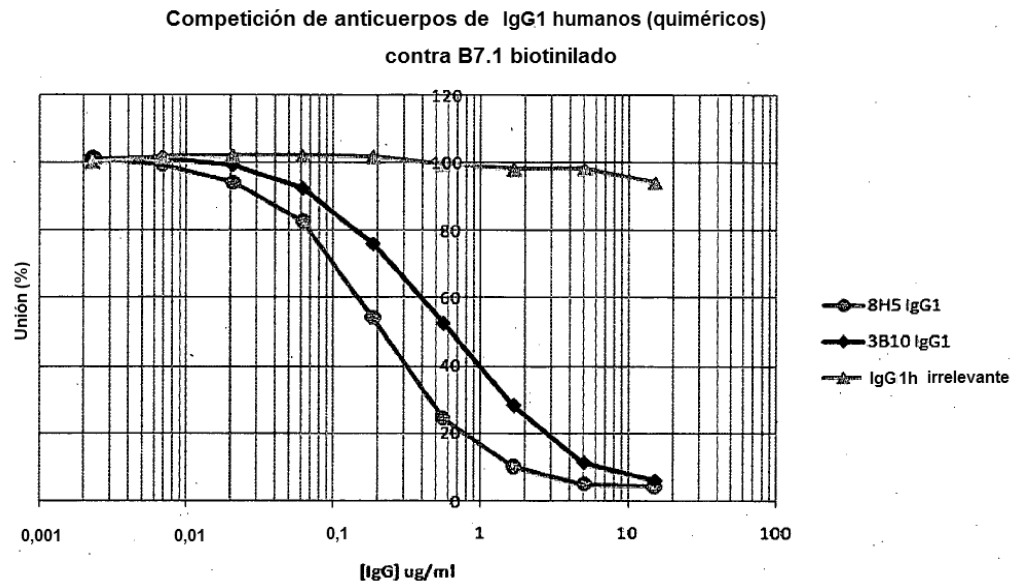


Figura 6:

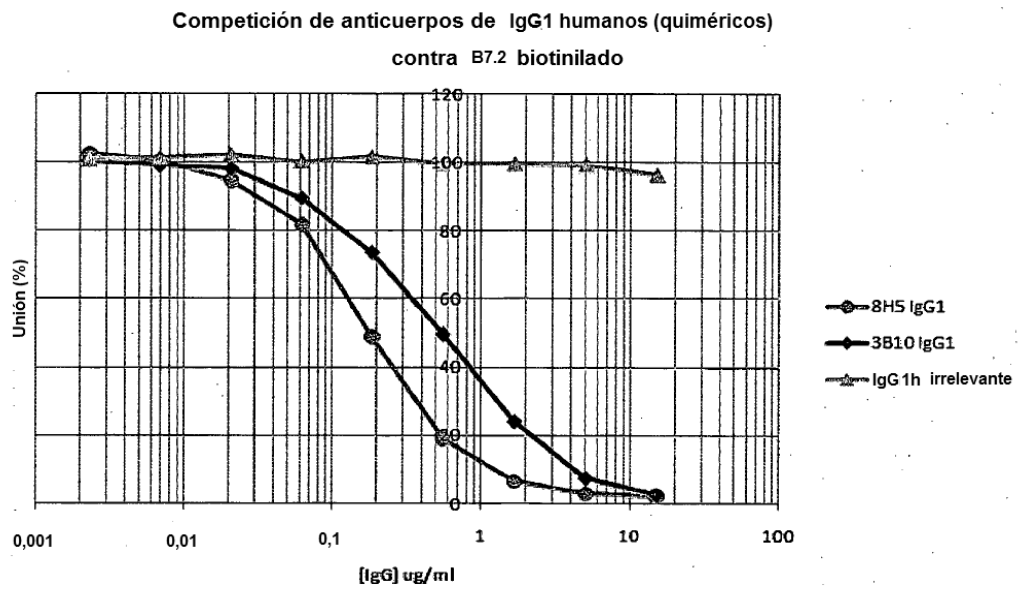


Figura 7:

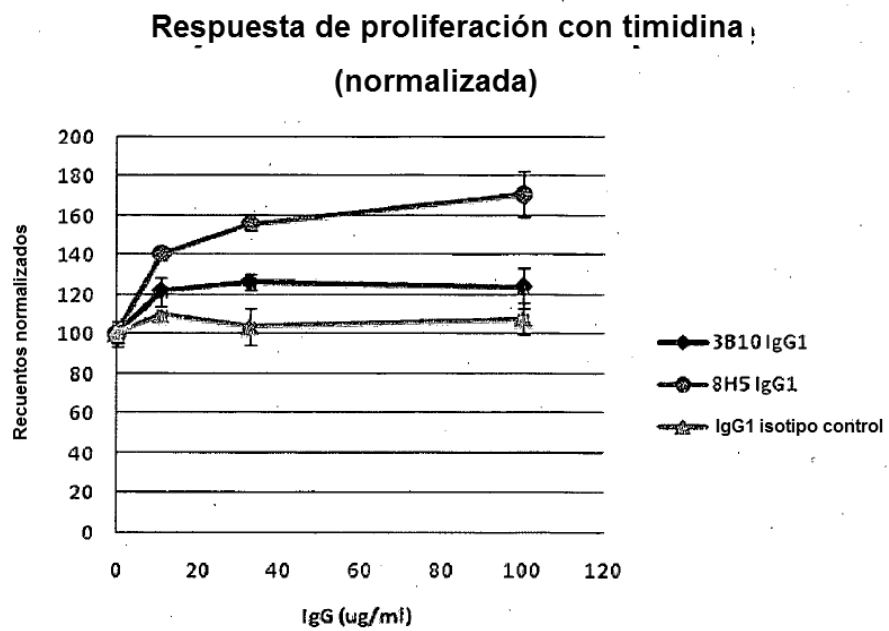
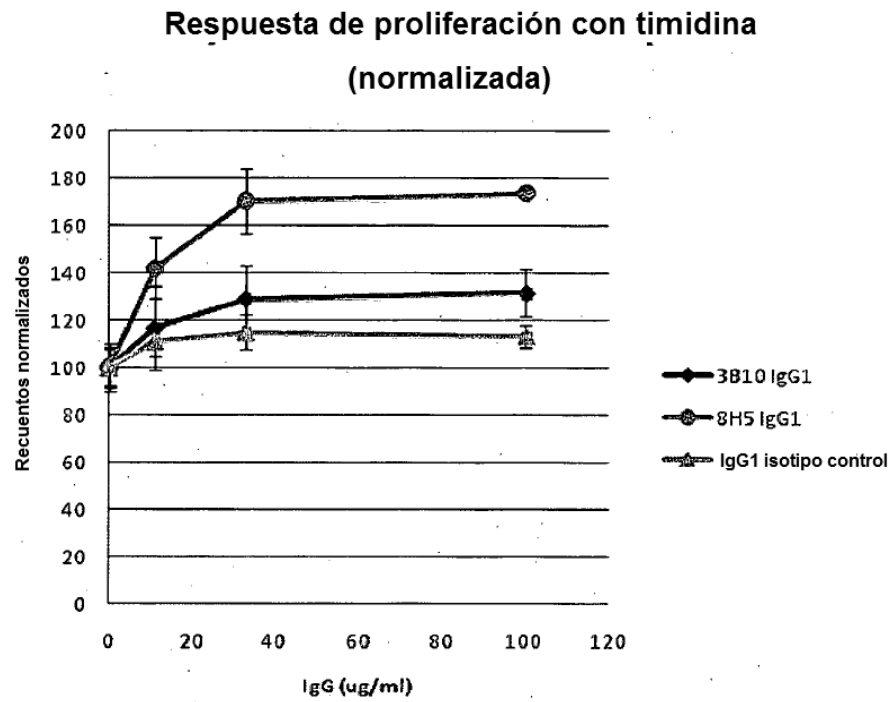


Figura 8:

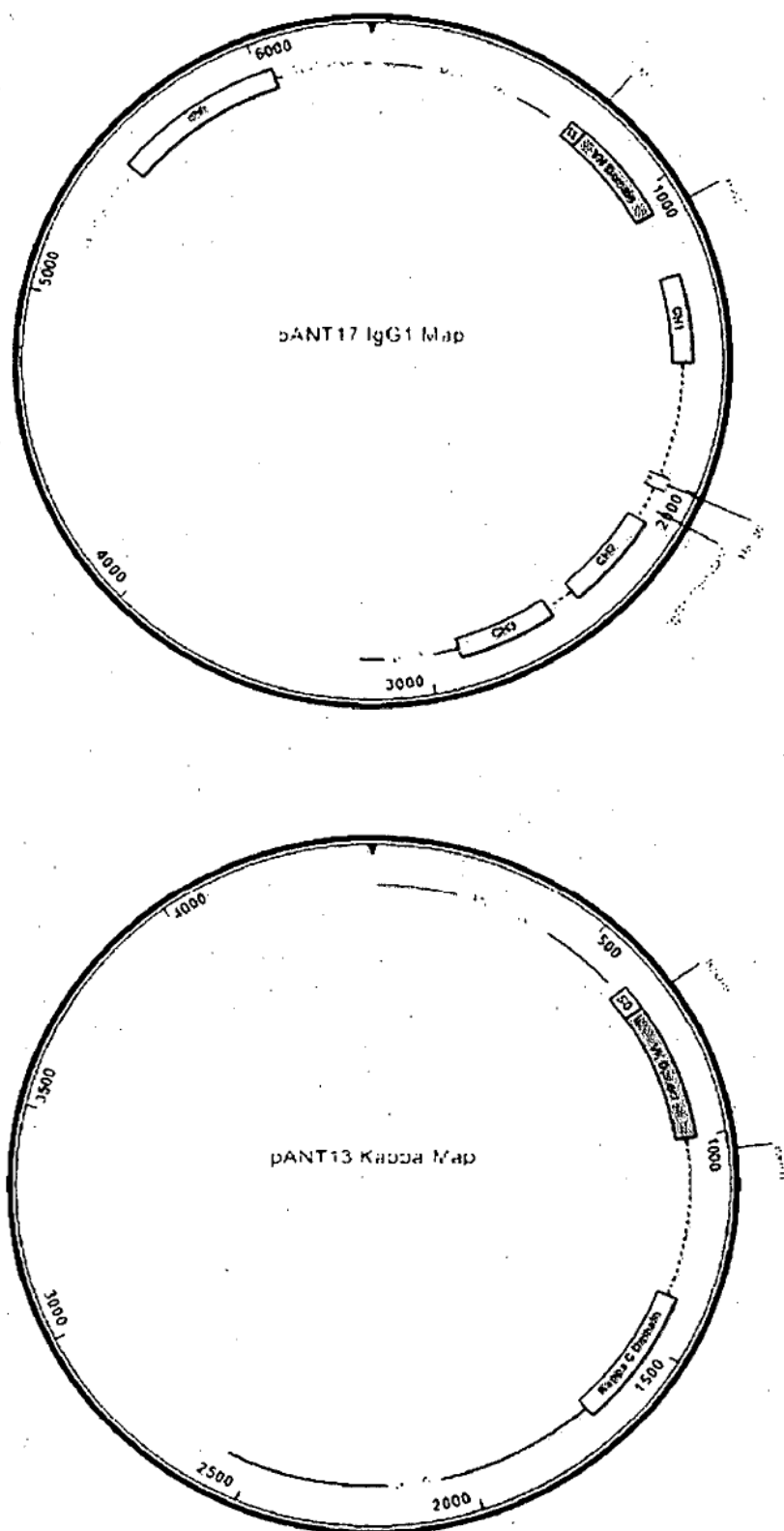


Figura 9:

ADN de VH de hibridoma 3B10 (SEQ ID No. 1)

GAGGTCCAGC	TGCAACAGTT	TGGAGCTGAA	CTGGTGAAGC	CTGGGGCTTC	50
AGTGAAGATG	TCCTGCAAGG	CTTCTGGCTA	CACATTCACT	GACTACAACA	100
TGGACTGGGT	GAGGCAGAGC	CATGGAAAGA	GTCTTGAGTG	GATCGGAAAT	150
ATTAAATCCTA	ACTCTGAGAG	TACTAGTTAC	AACCAGAAGT	TCAAGGGAAA	200
GGCCACATTG	ACTGTAGACA	AGTCCTCCAG	CACAGCCTAC	ATGGAGCTCC	250
GCAGCCTGAC	ATCTGATGAC	ACTGCAGTCT	ATTACTGTAC	AAGAGACGGG	300
AATAGGTACG	ACGCCTGGTT	TGCTTACTGG	GGCCAAGGGA	CTCTGGTCAC	350
TGTCTCCTCA					360

ADN de VK de hibridoma 3B10 (SEQ ID No. 2)

CAGATTGTTC	TCACCCAGTC	TCCAGCAATC	ATGTCTGCAT	CTCCAGGGGA	50
GAAGGTCACC	ATGACCTGCA	GTGCCAGCTC	AAGTGTTACT	TACATGCACT	100
GGTTCCAGCA	GAAGCCAGGC	ACTTCTCCCA	AACTCTGGAT	TTATAGCACA	150
TCCATCCTGG	CTTCTGGAGT	CCCTGCTCGC	TTCAGTGGCA	GTGGATCTGG	200
GACCTCTTAC	TCTCTCACAA	TCAGCCGAAT	GGAGGCTGAA	GATGCTGCCA	250
CTTATTACTG	CCAGCAAAGG	ACTAGTTACC	CGCTCACGTT	CGGTACTGGG	300
ACCAAGCTGG	AGCTGAAA				318

Figura 10:

ADN de VH de hibridoma 8H5 (SEQ ID No. 5)

CAGGTCCAGC	TGCAACAGTC	TGGAGATGAT	CTGGTAAAGC	CTGGGGCCTC	50
AGTGAAGCTG	TCCTGCAAGG	CTTCTGGCTA	CACCTTCACC	AGCTACTGGA	100
TTAACTGGAT	AAAACAGAGG	CCTGGACAGG	GCCTTGAGTG	GATAGGACGT	150
ATTGCTCCTG	GAAGTGGTAC	TACTTACTAC	AATGAAGTGT	TCAAGGGCAA	200
GGCAACACTG	ACTGTAGACA	AATATTCCAG	CACAGCCTAC	ATTCAGCTCA	250
GCAGCCTGTC	ATCTGAGGAC	TCTGCTGTCT	ATTTCTGTGC	AAGAGGGGAC	300
TATGGTTCTT	ACTGGGGCCA	AGGGACTCTG	GTCACTGTCT	CCTCA	345

ADN de VK de hibridoma 8H5 (SEQ ID No. 6)

CAAATTGTTT	TCACCCAGTC	TCCAGCAATC	ATGTCTGCAT	CTCCAGGGGA	50
GAAGGTCACC	ATGACCTGCA	GTGCCAGCTC	AAGTATAAGT	TACATGCACT	100
GGTTCCAGCA	GAAGCCAGGC	ACCTCCCCCA	AAAGATGGAT	TTATGACACA	150
TCCAAACTGG	CTTCTGGAGT	CCCTGCTCGC	TTCAGTGGCA	GTGGGTCTGG	200
GACCTCTTAT	TCTCTACAA	TCAACAGCAT	GGAGGCTGAA	GATGCTGCCA	250
CTTATTACTG	CCATCAGCGG	ACTAGTTACC	CACTCACGTT	CGGTGCTGGG	300
ACCAAGCTGG	AGCTGAAA				318

Aminoácidos de VH de hibridoma de 3B10 (SEQ ID No. 3)

Aminoácidos de VK de hibridoma de 3B10 (SEQ ID No. 4)

1	10	20	23 24	30	33 35	40
Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V T Y M H W F Q Q K P E						
VK de 3B10 de ratón						
41	49 50	56 57	60	70	79	
G T S P K L W I Y S T S I L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S R R M E						
VK de 3B10 de ratón						
80	88 89 90	97 98	100	106A		
A E D A A T Y Y C Q Q R T S Y P L T F G T G T K L E L K						
VK de 3B10 de ratón						

Figura 12:

Aminoácidos de VH de hibridoma de 8H5 (SEQ ID No. 7)

VH de 8H5 de ratón	1	Q	V	Q	L	Q	S	G	D	D	L	V	K	P	G	A	S	V	K	L	S	C	K	A	S	G	Y	I	F	I	S	Y	W	I	N	W	I	K	Q	R	
										10										20										30	31		35	36			40				
VH de 8H5 de ratón	41	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	R	I	A	P	G	S	G	T	I	Y	Y	N	E	V	F	K	G	K	A	T	L	T	V	D	K	Y	S	S	T	A	Y
										49	50		52	52a	53				60									65	66			70							79		
VH de 8H5 de ratón	80	I	Q	L	S	S	L	S	E	D	S	A	V	Y	F	C	A	R	G	D	Y	G	S	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S						
										82	82a	82b	82c	83					90									95			100	103			110		113				

Aminoácidos de VK de hibridoma de 8H5 (SEQ ID No. 8)

VK de 8H5 de ratón	1	Q	I	V	L	I	Q	S	P	A	I	M	S	A	S	P	G	E	K	V	I	M	I	C	S	A	S	S	I	S	Y	M	H	W	F	Q	K	P	40	
											10										20				23	24				30		33	35							
VK de 8H5 de ratón	41	G	T	S	P	K	R	W	I	Y	D	T	S	K	L	A	S	G	V	P	A	R	F	S	G	S	G	S	G	T	S	Y	S	L	I	N	S	M	E	79
										49	50							56	57			60								70										
VK de 8H5 de ratón	80	A	E	D	A	A	T	Y	C	H	Q	R	T	S	Y	P	L	I	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K												
										88	89	90							97	98					100					106A										

Figura 13:

secuencias de aminoácidos de VH de la variante de 3B10 humanizada (SEQ ID Nos 3 y 31 a 35)

		CDR 1																																									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40		
VH de ratón (SEQ ID No. 3)		E	V	Q	L	Q	L	Q	Q	F	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	M	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	N	M	D	W	V	R	Q	S
proteína VH1 (SEQ ID No. 31)		E	V	Q	L	Q	L	Q	Q	F	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	M	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	N	M	D	W	V	R	Q	S
proteína VH2 (SEQ ID No. 32)		E	V	Q	L	Q	L	Q	Q	F	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	M	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	N	M	D	W	V	R	Q	S
proteína VH3 (SEQ ID No. 33)		E	V	Q	L	Q	L	Q	Q	F	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	M	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	N	M	D	W	V	R	Q	S
proteína VH4 (SEQ ID No. 34)		E	V	Q	L	Q	L	Q	Q	F	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	M	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	N	M	D	W	V	R	Q	S
proteína VH5 (SEQ ID No. 35)		E	V	Q	L	Q	L	Q	Q	F	G	A	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	M	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	N	M	D	W	V	R	Q	S
VH de ratón		41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79			
proteína VH1		H	G	K	S	L	E	W	I	G	N	I	N	P	N	S	E	S	T	S	Y	N	Q	K	F	K	G	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	S	T	A	Y	
proteína VH2		H	G	K	S	L	E	W	I	G	N	I	N	P	N	S	E	S	T	S	Y	N	Q	K	F	K	G	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y		
proteína VH3		H	G	K	S	L	E	W	I	G	N	I	N	P	N	S	E	S	T	S	Y	N	Q	K	F	K	G	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y		
proteína VH4		H	G	K	S	L	E	W	I	G	N	I	N	P	N	S	E	S	T	S	Y	N	Q	K	F	K	G	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y		
proteína VH5		H	G	K	S	L	E	W	I	G	N	I	N	P	N	S	E	S	T	S	Y	N	Q	K	F	K	G	K	A	T	L	T	V	D	K	S	S	S	T	A	Y		
VH de ratón		80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	
proteína VH1		M	E	L	R	S	L	T	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	D	G	N	R	Y	D	A	W	F	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	S	S
proteína VH2		M	E	L	R	S	L	T	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	D	G	N	R	Y	D	A	W	F	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	S	S
proteína VH3		M	E	L	R	S	L	T	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	D	G	N	R	Y	D	A	W	F	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	S	S
proteína VH4		M	E	L	R	S	L	T	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	D	G	N	R	Y	D	A	W	F	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	S	S
proteína VH5		M	E	L	R	S	L	T	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	T	R	D	G	N	R	Y	D	A	W	F	A	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	S	S

secuencias de aminoácidos de VH de la variante de 3B10 humanizada (SEQ ID Nos 4 y 36 a 40)

	1	10	20	23	24	30	33	35	40
VK de ratón									
proteína vk1 (SSQ ID No. 4)	Q	A	P	A	S	S	P	G	E
proteína vk2 (SSQ ID No. 36)	Q	I	V	L	T	Q	S	P	A
proteína vk3 (SSQ ID No. 37)	Q	I	V	L	T	Q	S	P	A
proteína vk4 (SSQ ID No. 38)	Q	I	V	L	T	Q	S	P	A
proteína vk5 (SSQ ID No. 39)	Q	I	V	L	T	Q	S	P	A
proteína vk6 (SSQ ID No. 40)	Q	I	V	L	T	Q	S	P	A

	41	49	50	56	57	60	70	79
VK de ratón								
proteína vk1	G	T	S	P	K	L	W	I
proteína vk2	G	T	S	P	K	L	W	I
proteína vk3	G	T	S	P	K	L	W	I
proteína vk4	G	T	S	P	K	L	W	I
proteína vk5	G	T	S	P	K	L	W	I

	80	88	89	90	97	98	100	106A
VK de ratón								
proteína vk1	A	E	D	A	A	T	Y	Y
proteína vk2	A	E	D	A	A	T	Y	Y
proteína vk3	A	E	D	A	A	T	Y	Y
proteína vk4	A	E	D	A	A	T	Y	Y
proteína vk5	A	E	D	A	A	T	Y	Y

Figura 15:

Secuencias de aminoácidos de VH variantes de 8H5 humanizados (SEQ ID Nos 7 y 41 a 45)

		CDR 1																					
		30										35											
		31										36											
		32										37											
		33										38											
		34										39											
		40										41											
		42										43											
		44										45											
		46										47											
		48										49											
		50										51											
		52										53											
		54										55											
		56										57											
		58										59											
		60										61											
		62										63											
		64										65											
		66										67											
		68										69											
		70										71											
		72										73											
		74										75											
		76										77											
		78										79											
		80										81											
		82										83											
		84										85											
		86										87											
		88										89											
		90										91											
		92										93											
		94										95											
		96										97											
		98										99											
		100										101											
		102										103											
		104										105											
		106										107											
		108										109											
		110										111											
		112										113											
		114										115											
		116										117											
		118										119											
		120										121											
		122										123											
		124										125											
		126										127											
		128										129											
		130										131											
		132										133											
		134										135											
		136										137											
		138										139											
		140										141											
		142										143											
		144										145											
		146										147											
		148										149											
		150										151											
		152										153											
		154										155											
		156										157											
		158										159											
		160										161											
		162										163											
		164										165											
		166										167											
		168										169											
		170										171											
		172										173											
		174										175											
		176										177											
		178										179											
		180										181											
		182										183											
		184										185											
		186										187											
		188										189											
		190										191											
		192										193											
		194										195											
		196										197											
		198										199											
		200										201											
		202										203											
		204										205											
		206										207											
		208										209											
		210										211											
		212										213											
		214										215											
		216										217											
		218										219											
		220										221											
		222										223											
		224										225											
		226										227											
		228										229											
		230										231											
		232										233											
		234										235											
		236										237											
		238										239											
		240										241											
		242										243											
		244										245											
		246										247											
		248										249											
		250										251											
		252										253											
		254										255											
		256										257											
		258										259											
		260										261											
		262										263											
		264										265											
		266										267											
		268										269											
		270										271											
		272										273											
		274										275											
		276										277											
		278										279											
		280										281											
		282										283											
		284										285											
		286										287											
		288										289											
		290										291											
		292										293											
		294										295											
		296										297											
		298										299											
		300										301											
		302										303											
		304										305											
		306										307											
		308										309											
		310										311											
		312										313											
		314										315											
		316										317											
		318										319											
		320										321											
		322										323											
		324										325											
		326										327											
		328										329											
		330										331											
		332										333											
		334										335											
		336										337											
		338										339											
		340										341											
		342										343											
		344										345											
		346										347											
		348										349											
		350										351											
		352										353											
		354										355											
		356										357											
		358										359											
		360										361											
		362										363											
		364										365											
		366										367											
		368										369											
		370										371											
		372										373											
		374										375											
		376										377											
		378										379											
		380										381											
		382										383											
		384										385											
		386										387											
		388										389											
		390										391											
		392										393											
		394										395											
		396										397											
		398										399											
		400										401											
		402										403											
		404										405											
		406										407											
		408										409											
		410										411											
		412										413											
		414										415											
		416										417											
		418										419											
		420										421											
		422										423											
		424										425											
		426										427											
		428										429											
		430										431											
		432										433											
		434										435											
		436										437											
		438										439											
		440										441											
		442										443											
		444										445											
		446										447											
		448										449											
		450										451											
		452										453											
		454										455											
		456										457											
		458										459											
		460										461											
		462										463											
		464										465											
		466										467											
		468										469											
		470										471											
		472										473											
		474										475											
		476										477											
		478										479											
		480										481											
		482										483											
		484										485											
		486										487											
		488										489											
		490										491											
		492										493											
		494										495											
		496										497											
		498										499											
		500										501											
		502										503											
		504										505											
		506										507											
		508										509											
		510										511											
		512										513											
		514										515											
		516										517											
		518										519											
		520										521											
		522										523											
		524										525											
		526										527											
		528										529											
		530										531											
		532										533											
		534										535											
		536										537											
		538										539											
		540										541											
		542										543											
		544										545											
		546										547											
		548										549											
		550										551											
		552										553											
		554										555											
		556										557											
		558										559											
		560										561											
		562										563											
		564										565											
		566										567											
		568										569											
		570										571											
		572										573											
		574										575											
		576										577											
		578										579											
		580										581											
		582										583											
		584										585											
		586										587											
		588										589											
		590										591											
		592										593											
		594										595											
		596										597											
		598										599											
		600										601											
		602										603											
		604										605											
		606										607											
		608										609											
		610										611											
		612										613											
		614										615											
		616										617											
		618										619											
		620										621</											

Figura 16:

secuencias de aminoácidos de VK de la variante de 8H5 humanizada

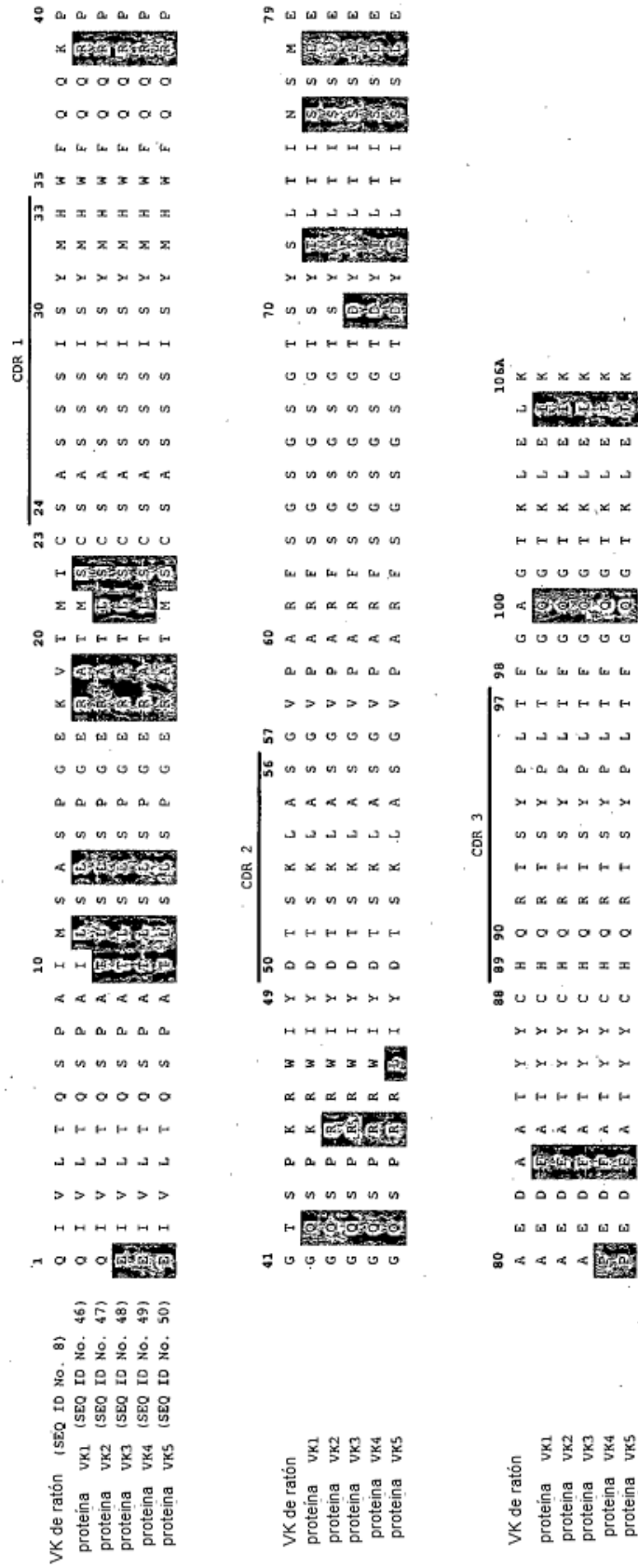
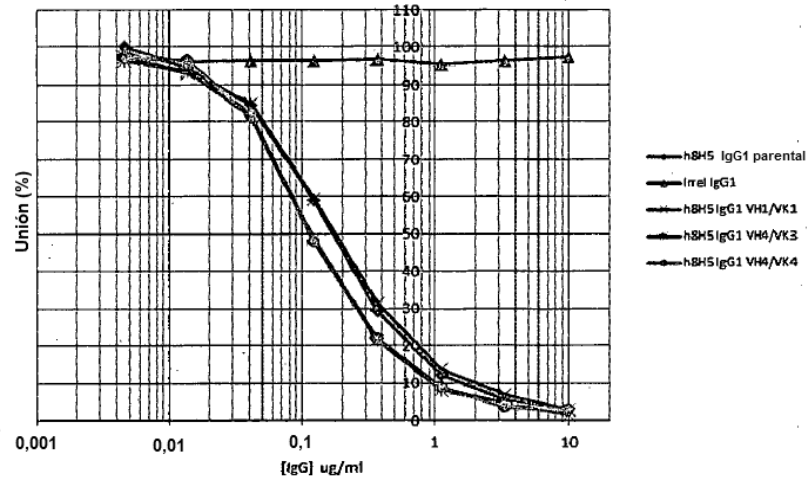
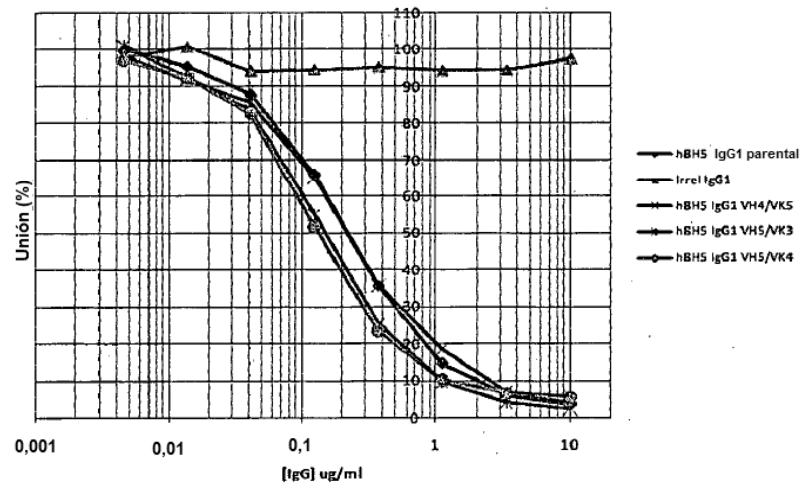


Figura 17:

ELISA de competición - Muestra frente a bio h8H5 IgG1



ELISA de competición - Muestra frente a bio h8H5 IgG1



ELISA de competición - Muestra frente a bio h8H5 IgG1

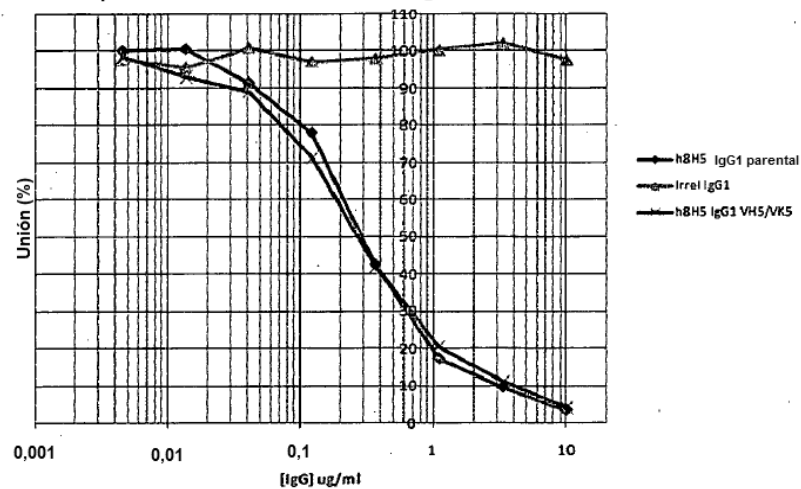


Figura 18: Modelo de reacción de linfocitos mixtos humanos

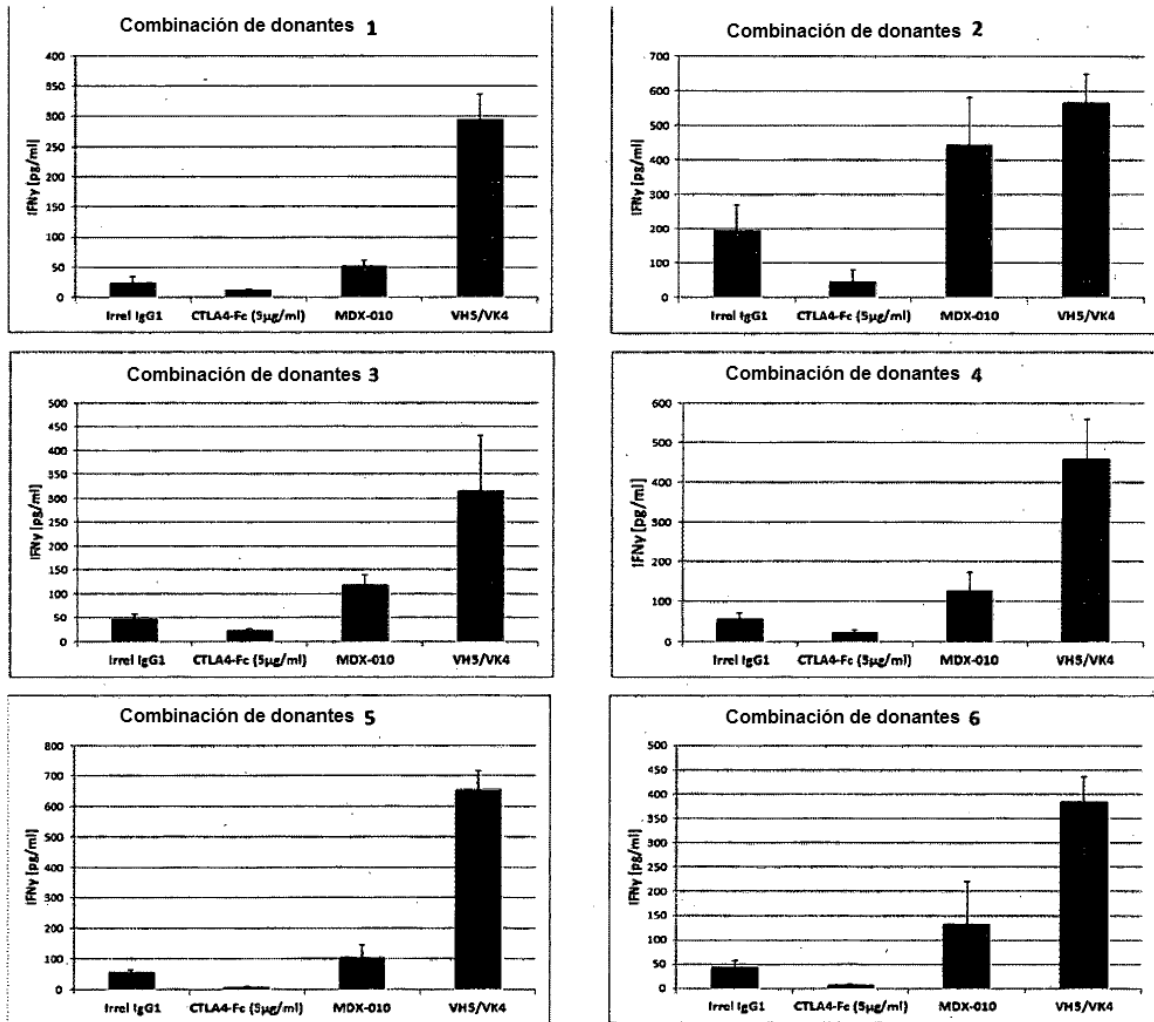
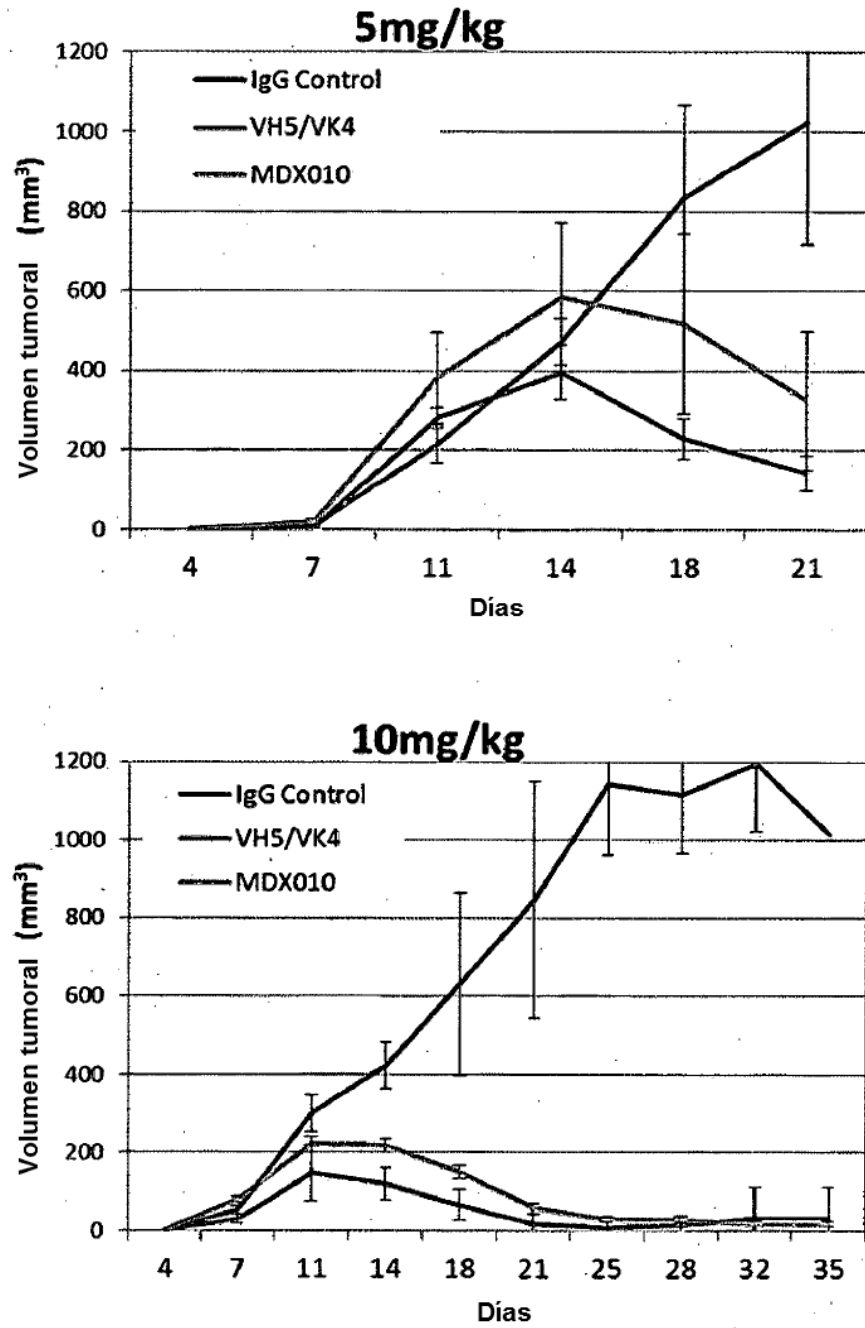


Figura 19: Modelo animal de tumor



Secuencia	Nombre-conjunto
ATGRASTTSKGGYTMARCTKGRTTT	MulgV _H 5'-A
ATGRAATGSASCTGGGYWYCTCTT	MulgV _H 5'-B
ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCT	MulgV _H 5'-C
ATGGCTGTCYTRGBGCTGYTCYCTG	MulgV _H 5'-C
ATGGVTTGGSTGTGGAMCTTGCYATTCCT	MulgV _H 5'-C
ATGAAATGCAGCTGGRTYATSTTCTT	MulgV _H 5'-D
ATGGRCAGRCTTACWYTYTCATTCCT	MulgV _H 5'-D
ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT	MulgV _H 5'-D
ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT	MulgV _H 5'-E
ATGAAGWTGTGGBTAACTGGRT	MulgV _H 5'-E
ATGGRATGGASCKIRTCTTTMTCT	MulgV _H 5'-E
ATGAACTTYGGGYTSAGMTTGRTTT	MulgV _H 5'-F
ATGTACTTGGGACTGAGCTGTGTAT	MulgV _H 5'-F
ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG	MulgV _H 5'-F
ATGGATTTTGGGCTGATTTTATTG	MulgV _H 5'-F
CCAGGGGCCARKGGATARACIGRTGG	MulgV _H 3'-2
ATGRAGWCACAKWCYAGGTCTTT	MulgkV _L 5'-A
ATGGAGACAGACACTCCTGCTAT	MulgkV _L 5'-B
ATGGAGWCAGACACTSCTGYTATGGGT	MulgkV _L 5'-C
ATGAGGRCCCTGCTCAGWTTTGTGGIWTCTT	MulgkV _L 5'-D
ATGGGCWTCAGATGRAGTCACAKWYCWGG	MulgkV _L 5'-D
ATGAGTGTGCYACTCAGGTCTGGSCTT	MulgkV _L 5'-E
ATGTGGGGAYCGKTTYAMMCTTTCAATTG	MulgkV _L 5'-E
ATGGAAGCCCAGCTCAGCTTCTCTCC	MulgkV _L 5'-E
ATGAGIMMKTCTIMTTCAITTCYGGG	MulgkV _L 5'-F
ATGAKGTHCYCIGCTCAGTYCTIRG	MulgkV _L 5'-F
ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG	MulgkV _L 5'-F
ATGTATATATGTTTGTGTCTATTCT	MulgkV _L 5'-F
ATGAAGTTGCTGTTAGGCTGTTGGTGCT	MulgkV _L 5'-G
ATGGATTWCARGTGACAGATTWCAGCTT	MulgkV _L 5'-G
ATGGTYCTYATVTCCTTGCTGTTCTGG	MulgkV _L 5'-G
ATGGTYCTYATVTRCTGCTGCTATGG	MulgkV _L 5'-G
ACTGGATGGTGGGAAGATGGA	MulgkV _L 3'-1

Tabla 1

Secuencia	Nombre
ctgttgctacgcgtgtccactccGAGGTCCAGCTGCAACAG	3B10 VH 5'
ctgccccagaaagcttaccTGAGGAGACAGTGACCAGAG	3B10 VH 3'
ggctcccaggcgcgcgatgtCAGATTGTTCTCACCCAGTC	3B10 VK 5'
tagaattgcccgaatccaactgaggaagcaaagtttaattctactcacgTTTCAGCTCCAGCTTGGTC	3B10 VK 3'
ctgttgctacgcgtgtccactccCAGGTCCAGCTGCAACAG	8H5 VH 5'
ctgccccagaaagcttaccTGAGGAGACAGTGACCAGAG	8H5 VH 3'
ggctcccaggcgcgcgatgtCAAATTGTTCTCACCCAGTCTC	8H5 VK 5'
tagaattgcgggatccaactgaggaagcaaagtttaattctactcacgTTTCAGCTCCAGCTTGGTCC	8H5 VK 3'

Tabla 2