

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 581**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2008 PCT/IB2008/001072**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2008 WO08132601**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2008 E 08750865 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2142210**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 citotóxico y su uso en el tratamiento o prevención del rechazo de órganos trasplantados y enfermedad autoinmunitaria**

30 Prioridad:

**30.04.2007 EP 07290545**

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

**21.02.2017**

73 Titular/es:

**IMMUTEP (50.0%)  
PARC CLUB ORSAY 2 RUE JEAN ROSTAND  
91893 ORSAY CEDEX, FR y  
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET  
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TRIEBEL, FRÉDÉRIC;  
VANHOVE, BERNARD y  
HAUDEBOURG, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 602 581 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 citotóxico y su uso en el tratamiento o prevención del rechazo de órganos trasplantados y enfermedad autoinmunitaria

### I. Campo de la invención

- 5 La presente invención se encuentra en el campo de la inmunoterapia. Más específicamente, se refiere al tratamiento o prevención del rechazo de un órgano trasplantado o para tratar una enfermedad autoinmunitaria. La invención se refiere a anticuerpos anti-LAG-3 citotóxicos y fragmentos de los mismos que se unen a la proteína LAG-3 y producen el agotamiento de linfocitos T LAG-3<sup>+</sup> activados.

### II. Antecedentes

- 10 El gen-3 de activación de linfocitos (LAG-3, CD223) está regulado positivamente durante los estadios tempranos de la activación de linfocitos T. La presente invención se basa en el análisis de los efectos de los anticuerpos citotóxicos contra LAG-3 en el rechazo agudo de aloinjerto cardíaco (en estudios con animales *in vivo*) y en experimentos *in vitro* cuando se seleccionan anticuerpos monoclonales LAG-3 que son eficaces a bajas dosis (< 0,1 µg/ml) en el agotamiento de los linfocitos T efectores LAG-3<sup>+</sup> activados.

- 15 El agotamiento selectivo de linfocitos T activados puede representar un tratamiento de inducción de inmunosupresión capaz de dar como resultado el desarrollo de células reguladoras que soporten la supervivencia a largo plazo de los órganos alogénicos en ratones y primates (1). Esto se ha demostrado ahora con anticuerpos anti-CD40L que agotan los linfocitos T activados *in vivo* por medio de un mecanismo dependiente de Fc (2). Sin embargo, los anticuerpos anti-CD40L también se dirigen a plaquetas activadas en seres humanos y afectan la  
 20 estabilidad de trombos arteriales (3). Por lo tanto, el desarrollo de anticuerpos monoclonales contra otras moléculas específicas para la activación de linfocitos T ha catalizado los intentos para conseguir la inmunosupresión. Una de dichas moléculas es LAG-3 que involucra la Clase II de las células dendríticas (CD) con una alta afinidad, haciendo posible que las CD se conviertan en activadas (4-6). La proteína LAG-3 se expresa *in vivo* en los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> activados que residen en órganos linfoides secundarios o tejidos inflamados pero no en bazo, timo o sangre  
 25 (7). Además, LAG-3 puede funcionar como un regulador negativo de linfocitos T CD4 y CD8 activados humanos inhibiendo los eventos tempranos en la activación primaria (8).

El documento WO 2004/078928A desvela procedimientos que aumentan la respuesta reguladora de linfocitos T, por ejemplo aumentando el número de células CD223<sup>+</sup> en una población de linfocitos T.

- 30 El documento WO 2005/103086A1 desvela procedimientos para el tratamiento de una afección mediada por linfocitos T por el agotamiento de células positivas a ICOS *in vivo*.

Malgorzata y col., European Journal of Immunology, vol. 35, nº 7, 1 de julio de 2005, páginas 2081-2088 desvela que la expresión de LAG-3 en los linfocitos B está inducida por los linfocitos T.

### III. Sumario de la invención

- 35 En una primera realización, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 citotóxico o un fragmento del mismo capaz de producir agotamiento de linfocitos T LAG-3<sup>+</sup> activados, en la que dicho anticuerpo está producido por el hibridoma depositado en la CNCM el 27 de abril de 2007 con el número de registro CNCM I-3755, y adicionalmente en la que dicho anticuerpo o fragmento del mismo presenta citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

- 40 En una segunda realización, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 citotóxico o un fragmento del mismo capaz de producir agotamiento de linfocitos T LAG-3<sup>+</sup> activados, en el que dicho anticuerpo está producido por el hibridoma depositado en la CNCM el 27 de abril de 2007 con el número de registro CNCM I-3756, y además en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo presenta citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

- 45 Los anticuerpos o fragmentos de los mismos de acuerdo con la presente invención se unen a la proteína LAG-3 y producen el agotamiento de linfocitos T LAG-3<sup>+</sup> activados. Dicho agotamiento se puede medir por cambios en el número de linfocitos de sangre periférica, en un tejido o un órgano.

La presente invención proporciona además un anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 citotóxico o un fragmento del mismo de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento o prevención del rechazo de órganos trasplantados o para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria mediada por linfocitos T.

- 50 En una realización adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende de 30 a 300 mg por dosis de un anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 citotóxico de la presente invención, y un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable para su administración a un mamífero.

#### IV. Descripción de las figuras

Figura 1: Expresión de ARNm LAG-3 en un aloinjerto cardíaco (A), en el bazo (B), en los ganglios linfáticos (C). La expresión del ARNm LAG-3 en injertos cardiacos el día 5 se midió por RT-PCR cuantitativa y se comparó con la expresión de transcripciones HPRT constitutivas. Rechazo: aloinjerto sin tratamiento. Singénico: isoinjerto. Tolerante: aloinjerto en receptores que reciben un tratamiento tolerogénico (anticuerpos anti-CD28 CsA<sup>+</sup>). \*\*:  $p < 0,05$  para los singénicos y tolerantes frente a rechazo.

Figura 2: Caracterización de anticuerpos anti-LAG-3 en un ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento. Se marcaron las células diana estimuladas por ConA con <sup>51</sup>Cr y se mezclaron con complemento de conejo y suero anti-LAG-3 (línea continua) o pre-inmune (línea discontinua) a las diluciones indicadas. El % de actividad citotóxica se calcula de la siguiente manera: (CPM del ensayo – liberación de CPM espontánea)/máximo CPM liberado que se obtiene tras la lisis celular.

Figura 3: Actividad de agotamiento *in vitro* de los anticuerpos anti-LAG-3. Los linfocitos T del bazo se activaron durante 48 h con ConA para inducir la expresión de LAG-3 y se marcaron con CFSE. Se inyectaron por vía i.v. 10<sup>5</sup> células en receptores que se habían radiado (4,5 Gy) 3 días antes. Veinticuatro horas tras la inyección, se sacrificaron los receptores y se analizó la presencia de células CFSE<sup>+</sup> en los compartimentos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> del bazo por citometría de flujo.

Figura 4: Supervivencia de injerto cardíaco tras la administración de anticuerpos anti-LAG-3. Los receptores Lew.1A de corazones completamente alogénicos (sin coincidencia en Clase I y II) de Lew.1W se trataron mediante inyecciones los días 0 y 3 de 200  $\mu$ l (línea discontinua) o 600  $\mu$ l (línea continua) de suero anti-LAG-3 de conejo o de 600  $\mu$ l de suero pre-inmune (línea discontinua). Se evaluó la supervivencia de injertados por la evaluación del latido cardíaco.  $P < 0,002$  para los 600  $\mu$ l de suero anti-LAG-3 de conejo frente a suero pre-inmune.

Figura 5: Análisis de células de injerto infiltrantes (GIC). Las GIC se extrajeron de los aloinjertos cardiacos el día 5 de los receptores de control o tratados con anticuerpos anti-LAG-3. Las células se contaron y analizaron por citometría de flujo en cuanto a la expresión de LAG-3. Barras blancas: número total de GIC. Barras negras: GIC LAG-3<sup>+</sup> medidas por citometría de flujo ( $p < 0,01$ ). También se extrajo el ARN total de GIC y el mensajero para INF $\gamma$  por qPCR, en relación al nivel de expresión de HPRT (barras discontinuas;  $p < 0,05$ ).

Figura 6: Comparación de la unión del A9H12 con la del mAb 17B4 específico de LAG-3 de referencia sobre CHO LAG-3<sup>+</sup> y linfocitos T humanos activados.

A) Las CHO transfectadas con hLAG-3 se disociaron del plástico de cultivo utilizando el tampón Versene que contiene un agente quelante catiónico, se incubaron con las concentraciones indicadas de anticuerpos A9H12 o 17B4 durante 30 min a 4 °C, se lavaron y luego se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG+M (H+L) de ratón (5  $\mu$ g/ml, Coulter) durante 30 minutos a 4 °C. Tras el lavado, se analizaron las células por citometría de flujo utilizando un FACSCanto (BD Biosciences) y se representaron las medias de intensidad de fluorescencia en función a la concentración de anticuerpo.

B) Se estimularon PBMC de voluntarios sanos durante 2 días con SEB (1  $\mu$ g/ml, Sigma Aldrich) para inducir la expresión de LAG-3 en linfocitos T. Las PBMC se tiñeron como anteriormente. Los datos representan un valor de porcentaje, que se calcula como el porcentaje de células LAG-3<sup>+</sup> en las PBMC x la media de intensidad de fluorescencia de las células LAG-3<sup>+</sup>, representado en función de la concentración de anticuerpos.

Figura 7: Citotoxicidad dependiente de complemento inducida por el mAb LAG-3 A9H12.

A) Las células CHO de tipo silvestre y transfectadas con hLAG-3 se marcaron con mAb anti-LAG-3 (17B4) conjugado con FITC y se analizó la expresión de LAG-3 sobre la superficie celular por citometría de flujo utilizando un FACSCanto. El histograma representa la intensidad media de fluorescencia de CHO ts (gris) y CHO LAG-3<sup>+</sup> (oscuro).

B) Las células CHO transfectadas con hLAG-3 y tipo silvestre se lavaron en medio completo (MEM suplementado con un 10 % de Suero Fetal Bovino, FCS, inactivado por calor) y se incubaron con 0,1  $\mu$ g/ml de mAb LAG-3 A9H12 o mAb de control del isotipo mIgG2a (Southern Biotechnologies) en medio completo durante 30 min a 4 °C. Luego se lavaron las células y se incubaron en medio completo (-Complemento) o en MEM suplementado con un 10 % de suero de conejo recién suspendido (Cerdalane Inc.) (+Complemento) durante 1 hora a 37 °C. Tras el lavado, las células se tiñeron con 7-AAD (Coulter Inc.) durante 15 minutos a temperatura ambiente y se analizaron por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células positivas a 7-AAD que se corresponde con las células muertas. Los datos representan el porcentaje de células muertas en cada condición respecto a las células CHO transfectadas con hLAG-3 y ts como se indica.

C) Las células CHO LAG-3<sup>+</sup> se incubaron a las concentraciones indicadas de mAb LAG-3 A9H12 durante 30 min a 4 °C y luego se incubaron con MEM suplementado con un 25 % de suero de conejo durante 1 hora a 37 °C. Tras el lavado, las células se tiñeron con 7-AAD (Coulter Inc.) y se analizaron por citometría de flujo. El porcentaje de citotoxicidad específica se calcula según la fórmula siguiente

$$\frac{(\text{Muerte en la muestra} - \text{muerte espontánea}) \times 100}{(\text{Muerte máxima} - \text{muerte espontánea})}$$

donde Muerte en la muestra es el porcentaje de células positivas 7-AAD en cada condición, Muerte espontánea, el porcentaje de células positivas a 7-AAD sin mAb y Muerte máxima, el porcentaje de células positivas a 7-AAD con 10 µg/ml de mAb.

D) Las células CHO LAG-3<sup>+</sup> se incubaron con 0,1 µg/ml de mAb LAG-3 A9H12 o con sus correspondientes isotipos de control (IgG2, IgG1 o IgM, respectivamente) durante 30 min a 4 °C y luego se incubaron con MEM suplementado con un 25 % de suero de conejo durante 1 hora a 37 °C. Se determinó la citotoxicidad específica como anteriormente con una Muerte máxima que se corresponde con 10 µg/ml de A9H12 (panel de la izquierda) y 0,1 µg/ml de A9H12 (panel de la derecha).

E) Las PBMC se estimularon con SEB (1 µg/ml) para inducir la expresión de LAG-3 en linfocitos T y luego se utilizaron como células diana en un ensayo CDC en presencia de los mAb LAG-3 A9H12 y 31G11 o sus isotipos de control. Tras teñir las células con CD3, CD4, CD8, CD25 y 17B4 conjugados con fluorocromo, el porcentaje de células positivas a 7-AAD se analizaron en las subpoblaciones de linfocitos T indicadas. Los datos representan el porcentaje de células muertas en cada población (de las que se restaban las muertas espontáneamente en ausencia de mAb).

Figura 8: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo inducida por el mAb LAG-3 A9H12

A) Las células efectoras (PBMC) se estimularon con IL-2 (100 UI/ml, BD Biosciences) durante 1 día. Las células diana (células CHO transfectadas con *hLAG-3*) se marcaron con CFSE (un colorante fluorescente vital) y se incubaron con 1 µg/ml de A9H12, mIgG2a, 17B4 o mIgG1 durante 20 min a temperatura ambiente. Se mezclaron entonces las células diana con las células efectoras a las relaciones E:D indicadas (E:D; Efectoras:Diana) y se incubaron durante 16 horas a 37 °C. Se recolectaron las células adherentes y no adherentes utilizando un reactivo Versene, se tiñeron con 7-AAD e inmediatamente se analizaron por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células positivas a 7-AAD en la población positiva a CFSE. Los datos representan el porcentaje de células muertas, del que se resta la muerte celular no específica en presencia del isotipo de control.

B) Las células CHO diana LAG-3<sup>+</sup> de tipo silvestre marcadas con CFSE se incubaron con las concentraciones indicadas de A9H12 o mIgG2a y PBMC estimuladas con IL-2 se añadieron con una relación E:D de 50:1 y se incubaron durante 16 horas a 37 °C. La muerte celular se analizó como anteriormente y los datos representan el porcentaje de células muertas en células positivas a CSFE en presencia de A9H12 o su mAb de isotipo IgG2a coincidente de control.

Figura 9: Incidencia de artritis (porcentaje de ratones que desarrollaban CIA)

Se inyectaron ratones DBA/1 machos (n = 22) por vía i.d. con colágeno bovino tipo II (200 µg) emulsionado con CFA que contenía 250 µg de *M. tuberculosis*.

Figura 10: Construcción del anticuerpo terapéutico IMP731 quimérico.

Figura 11: Plásmidos de expresión para las cadenas ligera (panel A) y pesada (panel B) de IMP731.

Figura 12: Construcción de plásmido bi-cistrónico final utilizada para la transfección estable de células CHO.

Figura 13: Unión de IMP731 a las células CHO LAG-3<sup>+</sup> y linfocitos T humanos

A) Las células CHO transfectadas con *hLAG-3* se disociaron del plástico del cultivo utilizando el tampón Versene que contenía un agente quelante catiónico, se incubaron con las concentraciones del Ab IMP731 o su isotipo hIgG1 de control (Chemicon) durante 30 min a 4 °C, se lavaron y luego se incubaron con un anticuerpo secundario F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-IgG1 humana conjugado con FITC (5 µg/ml, SBA) durante 30 minutos a 4 °C. Tras el lavado, las células se analizaron por citometría de flujo utilizando un FACSCanto (BD Biosciences) y se representaron las medias de intensidad de fluorescencia en función a la concentración de anticuerpo.

B) Se estimularon PBMC de un voluntario sano durante 2 días con SEB (1 µg/ml, Sigma Aldrich) para inducir la expresión de LAG-3 en linfocitos T. Las PBMC se tiñeron como anteriormente. Los datos representan el porcentaje medio, calculado como el porcentaje de células LAG-3<sup>+</sup> en las PBMC x la media de intensidad de fluorescencia de las células LAG-3<sup>+</sup>, representado en función a la concentración de anticuerpo.

Figura 14: Citotoxicidad dependiente de complemento inducida por el mAb LAG-3 IMP731

Las células CHO transfectadas con *hLAG-3* se incubaron con 1 µg/ml de Ab IMP731 o un isotipo hIgG1 de control (Chemicon) en medio completo (MEM suplementado con un 10 % de Suero Fetal Bovino inactivado por calor, FCS) durante 30 min a 4 °C. Luego se lavaron las células y se incubaron en medio completo (sin complemento) o en MEM suplementado con un 25 % de suero de conejo recién re-suspendido (Cerdalane Inc.) (con complemento) durante una hora a 37 °C. Tras el lavado, las células se tiñeron con 7-AAD (BD Biosciences) durante 15 minutos a temperatura ambiente e inmediatamente se analizaron por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células positivas a 7-AAD correspondiente con las células muertas. Los datos representan el porcentaje de células

mueras en cada condici3n como se indica.

Figura 15: Citotoxicidad mediada por c3lulas dependiente de anticuerpos inducida por IMP731.

A) Se estimularon las c3lulas efectoras (PBMC) con IL-2 (100 UI/ml, BD Biosciences) durante 1 d3a. Las c3lulas diana (c3lulas CHO transfectadas con hLAG-3) se marcaron con CFSE (un colorante fluorescente vital) y se incubaron con 1 µg/ml de IMP731 o hlgG1 durante 10 min a temperatura ambiente. Las c3lulas efectoras y las c3lulas diana se mezclaron entonces con las relaciones E:D indicadas (E:D, Efectoras:Diana) y se incubaron durante 16 horas a 37 °C. Las c3lulas se tiñeron con 7-AAD y se analizaron inmediatamente por citometr3a de flujo para determinar el porcentaje de c3lulas positivas a 7-AAD en la poblaci3n positiva a CFSE. Los datos representan el porcentaje de c3lulas muertas.

B) Las c3lulas CHO diana LAG-3<sup>+</sup> marcadas con CFSE se incubaron con las concentraciones indicadas de IMP731 o hlgG1 y se aÑadieron las PBMC estimuladas con IL-2 con una relaci3n E:D de 50:1 y se incubaron durante 16 horas a 37 °C. Se analiz3 la muerte celular como anteriormente en la poblaci3n positiva a CSFE. El porcentaje de citotoxicidad espec3fica, se calcul3 seg3n la siguiente f3rmula

$$\frac{(\text{Muerte en la muestra} - \text{muerte espont3nea}) \times 100}{(\text{Muerte m3xima} - \text{muerte espont3nea})}$$

donde la muerte en la muestra es el porcentaje de c3lulas positivas a 7-AAD en cada condici3n, la muerte espont3nea, el porcentaje de c3lulas positivas a 7-AAD sin Ab y la muerte m3xima, el porcentaje de c3lulas positivas a 7-AAD con 1 µg/ml de IMP731.

C) Las c3lulas efectoras (PBMC) se estimularon con IL-2 (100 UI/ml, BD Biosciences) durante 1 d3a. Las c3lulas diana (c3lulas CHO hLAG-3<sup>+</sup> o las c3lulas CHO hLAG-3<sup>-</sup>) se marcaron con CSFE (un colorante fluorescente vital) y se incubaron con 1 µg/ml de IMP731 o hlgG1 durante 10 min a temperatura ambiente. Las c3lulas efectoras y las c3lulas diana se mezclaron entonces a las relaciones E:D indicadas (E:D, Efectoras:Diana) y se incubaron durante 16 horas a 37 °C. Las c3lulas se tiñeron con 7-AAD y se analizaron inmediatamente por citometr3a de flujo para determinar el porcentaje de c3lulas positivas a 7-AAD en la poblaci3n positiva a CFSE. Los datos representan el porcentaje de c3lulas muertas.

#### **V. Descripci3n detallada**

En una primera realizaci3n, la presente invenci3n proporciona un anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 citot3xico o un fragmento del mismo que es capaz de producir agotamiento de linfocitos T LAG-3<sup>+</sup> activados, en la que dicho anticuerpo est3 producido por el hibridoma depositado en la CNCM el 27 de abril de 2007 con el n3mero de registro CNCM I-3755, y adem3s en la que dicho anticuerpo o fragmento del mismo presenta citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

En una segunda realizaci3n, la presente invenci3n proporciona un anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 citot3xico o un fragmento del mismo capaz de producir agotamiento de linfocitos T LAG-3<sup>+</sup> activados, en la que dicho anticuerpo est3 producido por el hibridoma depositado en la CNCM el 27 de abril de 2007 con el n3mero de registro CNCM I-3756, y adem3s en la que dicho anticuerpo o el fragmento del mismo presenta citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

Los anticuerpos y fragmentos de los mismos de acuerdo con la presente invenci3n se unen a la prote3na LAG-3 y producen agotamiento de linfocitos T LAG-3<sup>+</sup> activados. Dicho agotamiento se puede medir por los cambios en el n3mero de linfocitos en sangre perif3rica, un tejido o un 3rgano.

La presente invenci3n se refiere preferentemente a la prote3na LAG-3 humana (hLAG-3 tambi3n llamada de aqu3 en adelante LAG-3).

El gen 3 de activaci3n de linfocitos (LAG-3, CD223) est3 regulado positivamente durante los estadios tempranos de la activaci3n de linfocitos T. La presente invenci3n se basa en el an3lisis de los efectos de anticuerpos citot3xicos contra LAG-3 en el rechazo agudo de aloinjerto cardiaco y en artritis reumatoide (en estudios con animales *in vivo*) y en experimentos *in vitro* en los que los anticuerpos monoclonales LAG-3 seleccionados son eficaces a bajas dosis (< 0,1 µg/ml) en el agotamiento de los linfocitos T LAG-3<sup>+</sup> efectores activados.

Se llev3 a cabo un trasplante heterot3pico totalmente vascularizado de coraz3n alog3nico en ratas cruzando una barrera sin coincidencia completa de MHC (LEW.1W en LEW.1A). Los receptores recibieron dos inyecciones (el d3a 0 y 3) de anticuerpos dirigidos contra el dominio del bucle extra de LAG-3 o anticuerpos de control. Se ensayaron la supervivencia del injerto, histolog3a, transcripciones de ARNm y alorreactividad de linfocitos.

Primero se not3 que se acumulaban las mol3culas de ARNm LAG-3 en los aloinjertos cardiacos que sufren el rechazo, pero no en los 3rganos linfoides perif3ricos. La administraci3n de anticuerpos anti-LAG-3 inhib3 la infiltraci3n de c3lulas mononucleares efectoras en el injerto y prolongaba la supervivencia del injerto desde los 6 d3as en los receptores tratados con anticuerpos de control hasta una media de 27 d3as.

Se descubri3 que el infiltrado de c3lulas que expresaban LAG-3 produc3 el rechazo de los aloinjertos cardiacos y que

el direccionamiento contra LAG-3 utilizando anticuerpos citotóxicos como monoterapia de inducción retrasaba el rechazo agudo reduciendo la infiltración de linfocitos T y monocitos en el injerto.

5 Los experimentos que mostraban que cursos cortos de terapia con un anticuerpo CD40L podían conseguir una supervivencia del injerto a largo plazo en ratones y primates se interpretaron inicialmente como un efecto de bloqueo de co-estimulación. Sin embargo, Monk y col. (2) demostraron que la mayoría de la eficacia de la terapia anti-CD40L no deriva del bloqueo de co-estimulación, sino de la destrucción de linfocitos T activados. El resultado es una purga selectiva de linfocitos T potencialmente agresivos que han experimentado el antígeno.

10 La artritis inducida por colágeno (CIA) es un modelo animal bien descrito para la artritis reumatoide. La artritis inducida por colágeno es una enfermedad autoinmunitaria inducible en ratas, ratones y primates por inmunización con colágeno tipo II heterólogo. La patología articular resultante se parece a la artritis reumatoide con proliferación sinovial, infiltración celular, erosión del cartilago y resorción ósea en los casos más graves (12).

15 Utilizando protocolos de inmunización en particular, los primeros estudios establecieron una jerarquía de sensibilidad a CIA unida al haplotipo H-2, siendo H-2<sup>a</sup> la cepa más sensible (por ejemplo, ratones DBA/1) y H-2<sup>b</sup> (por ejemplo, ratones C57BL/6) entre las cepas menos sensibles. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que la sensibilidad a CIA puede estar menos restringida al MHC clase II de lo que se pensaba previamente y puede ser como si solo dependiera de las condiciones de inmunización (13). La variedad del colágeno tipo II (CII) de diferentes especies y la preparación de adyuvante completo de Freund (CFA) con diferentes concentraciones de *Mycobacterium tuberculosis* eran parámetros importantes para el desarrollo de la artritis. English y col., han demostrado que el CII de pollo pero no el de bovino era capaz de inducir la enfermedad en ratones C57BL/6, con una incidencia del 50 % al 75 %. Esto es lo contrario que con los ratones DBA/1, en los que todos, los CII bovinos, de ratón y de pollo inducían la enfermedad, con una incidencia del 80 % al 100 %. El fenotipo de artritis era más leve en ratones C57BL/6 que en ratones DBA/1, con menos inflamación y un aumento más gradual de la valoración clínica (14). Además, los ratones macho eran preferidos frecuentemente para los estudios de CIA, ya que la incidencia de artritis es de alguna manera mayor en ratones macho que en hembras.

25 En los ratones, la CIA se induce por una inyección i.d. de colágeno tipo II (CII) en presencia de CFA, habitualmente seguida por una inyección de refuerzo i.p. de CII, sin adyuvante, 21 días más tarde. Sin embargo, se han expuesto variaciones para casi todos los aspectos del procedimiento de inmunización e incluso en la cepa altamente susceptible DBA/1, el momento de aparición, gravedad e incidencia de CIA pueden ser variables (13, 15).

30 Los anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias se habían descrito ya, como los mAb TNF $\alpha$  en la artritis reumatoide. Por definición, el LAG-3 (Gen 3 de activación de linfocitos) es un marcador para linfocitos T efectores recién activados. El agotamiento de estos linfocitos T LAG-3<sup>+</sup> dará lugar a una inmunosupresión dirigida (es decir, solamente se suprimen los linfocitos T activados, no todos los linfocitos T como con los corticoides o la ciclosporina). Esta inmunosupresión tan específica debería dar lugar a índices terapéuticos más altos en comparación con los agentes inmunosupresores clásicos o con los anticuerpos terapéuticos (por ejemplo, Humira, Remicade) o receptores solubles (por ejemplo, Enbrel) que bloquean el TNF $\alpha$ . Por lo tanto, el LAG-3 es una diana prometedora disponible para una estrategia de mAb terapéutico de agotamiento para eliminar los linfocitos T efectores activados auto-reactivos.

40 Las moléculas desveladas en el presente documento que se unen a la proteína LAG-3 y producen agotamiento de linfocitos T LAG-3<sup>+</sup> activados incluyen los anticuerpos (mono o policlonales, preferentemente monoclonales) y fragmentos de los mismos, péptidos y moléculas orgánicas pequeñas.

Se desvela en el presente documento un anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 citotóxico o un fragmento del mismo que produce agotamiento de más del 30 % preferentemente más del 50 % de los linfocitos T LAG-3<sup>+</sup> activados.

45 El anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 citotóxico o fragmento del mismo que se desvela en el presente documento comprende anticuerpos con una región Fc de IgG2a murina o de IgG1 humana que tiene fuertes propiedades CDC o ADCC.

Se desvela en el presente documento un anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 citotóxico o un fragmento del mismo, que presenta (i) más del 50 % de la actividad CDC máxima con una concentración de mAb de menos de 0,1  $\mu$ g/ml y/o (ii) más del 50 % de la actividad de ADCC máxima con una concentración de menos de 0,1  $\mu$ g/ml.

50 Los anticuerpos monoclonales anti-LAG-3 citotóxicos de la presente invención, que producen el agotamiento de linfocitos T LAG-3<sup>+</sup> activados, pueden producirse por procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los anticuerpos generados contra los polipéptidos CD223 se pueden obtener administrando, en particular por inyección directa, polipéptidos CD223 a un animal, preferentemente no humano. El anticuerpo así obtenido se unirá entonces a los polipéptidos CD223 propios. De esta manera, incluso una secuencia que codifique solo un fragmento del polipéptido CD223 se puede utilizar para generar anticuerpos que se unan al polipéptido CD223 nativo completo.

55

Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede utilizar cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos continuos de líneas celulares. Ejemplos incluyen la técnica del hibridoma (9), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma humano de linfocitos B (10).

5 Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (Pat. de EE. UU. N° 4.946.778) se pueden utilizar fácilmente para producir anticuerpos de cadena sencilla contra polipéptidos CD223. También se pueden utilizar ratones transgénicos para expresar anticuerpos humanizados contra polipéptidos CD223 inmunogénicos.

Un primer anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención, llamado A9H12, se produce en el hibridoma depositado en la CNCM el 27 de abril de 2007 con el número de registro CNCM I-3755.

10 Un segundo anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención, llamado 31G11, se produce en el hibridoma depositado en la CNCM el 27 de abril de 2007 con el número de registro CNCM I-3756.

En una realización, se proporciona un anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 citotóxico o un fragmento del mismo de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento o la prevención del rechazo de un órgano trasplantado o para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria mediada por linfocitos T.

15 Se desvela en el presente documento el uso de un anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 citotóxico o un fragmento del mismo para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el rechazo de un órgano trasplantado o para tratar una enfermedad autoinmunitaria.

20 Se desvela en el presente documento un procedimiento para tratar o prevenir el rechazo de un órgano trasplantado o para tratar una enfermedad autoinmunitaria. Dicho procedimiento comprende la administración a un sujeto mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 citotóxico o un fragmento del mismo.

25 El rechazo de un órgano trasplantado se refiere al injerto de un órgano en un huésped alogénico. Puede ser útil para tratar organismos que padecen afecciones que dan como resultado una población anormalmente alta de linfocitos T o actividad de linfocitos T perjudicial, por ejemplo, el rechazo del injerto mediado por linfocitos T del huésped, la enfermedad del huésped contra el injerto y enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias mediadas por linfocitos T tales como artritis reumatoide, diabetes tipo 1, esclerosis muscular, etc. Los procedimientos de la invención se pueden aplicar a cualquier organismo que contenga linfocitos T que expresan CD223. Este incluye, pero no se limita a, cualquier mamífero, y particularmente incluye, seres humanos y ratones.

30 Las enfermedades autoinmunitarias son enfermedades en las que el sistema inmunitario propio del sujeto reacciona contra las células del sujeto. Una enfermedad autoinmunitaria que es susceptible de los tratamientos de acuerdo con la presente invención incluye anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, síndrome de Goodpasture, pénfigo vulgar, fiebre reumática aguda, crioglobulinemia esencial mixta, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus insulino dependiente, artritis reumatoide, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, miastenia gravis, y esclerosis múltiple.

35 También se desvela en el presente documento un procedimiento para agotar linfocitos T LAG-3<sup>+</sup> activados de una muestra de un paciente, que comprende hacer reaccionar la muestra con una composición de anticuerpo que comprende un anticuerpo descrito anteriormente.

40 Una composición farmacéutica de la presente invención comprende de 30 a 300 mg por dosis de un anticuerpo monoclonal citotóxico de la presente invención y uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables para su administración a un mamífero. La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse especialmente para su administración en forma sólida o líquida.

### **Ejemplo 1: Células positivas a LAG-3 a las que se dirigen los anticuerpos citotóxicos**

#### Materiales y procedimientos

##### *Animales y trasplantes*

45 Ratas macho congénicas de ocho a 12 semanas de edad Lewis.1W (LEW.1W, haplotipo RT1<sup>b</sup>) y Lewis.1A (LEW.1A, haplotipo RT1<sup>a</sup>) (Centre d'Élevage Janvier, Le Genest-Saint-Isle, Francia), se diferencian en sus regiones MHC completas. Se llevó a cabo el trasplante heterotópico de corazón en LEW.1W como se había descrito anteriormente (11). La supervivencia del injerto se evaluó por palpación de la pared abdominal.

##### *Anticuerpos anti-LAG-3*

50 Un péptido sintético que se corresponde con el dominio del bucle extra de la proteína LAG-3 de la rata (n° de registro NCBI DQ438937; péptido DQPASIPALDLLQGMPSTRRHPPHR) se unió con ovoalbúmina y se utilizó para inmunizar dos conejos. Se recolectaron los sueros pre-inmune e inmune, el día 63 tras la 4<sup>a</sup> inmunización, se ensayaron por ELISA en cuanto al inmunógeno y el péptido y por citometría de flujo en cuanto a las células esplénicas de ratas activadas con Con-A. Los sueros pre-inmunes eran negativos en ambos ensayos. Los sueros inmunes agrupados presentaban un título

(dilución para la señal del 50 %) de 1/60000 por ELISA y de 1/1000 por FACS, y presentaba una especificidad por linfocitos T activados.

#### *Ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento*

5 La citotoxicidad dependiente de complemento se ensayó utilizando sueros de conejo contra los linfocitos T de Lewis 1A en un ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$ . Se marcaron un total de  $2 \times 10^6$  linfocitos T de Lewis 1A con  $30 \mu\text{Ci}$  de  $^{51}\text{Cr}$  durante 90 min a  $37^\circ\text{C}$  en RPMI (GIBCO) con un 10 % de FCS. Tras tres lavados, los linfocitos T se distribuyeron en placas con fondo en V 96 y se incubaron con complemento de conejo y diluciones seriadas de suero de conejo inactivado por calor. Tras 4 h a  $37^\circ\text{C}$ , se midió la liberación de  $^{51}\text{Cr}$  en los sobrenadantes utilizando un contador de centelleo. Se calculó la citotoxicidad específica de acuerdo con la siguiente fórmula: (liberación experimental - liberación espontánea)  $\times 100 /$  (liberación máxima - liberación espontánea).

#### *Citotoxicidad inducida por anticuerpo in vivo*

15 La actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LAG-3 contra las células LAG-3<sup>+</sup> se evaluaron *in vivo*. Los esplenocitos de LEW.W1 activados con ConA (48 h) se marcaron con CFSE y se transfirieron ( $10^8$  células) a receptores LEW.1W radiados (4,5 Gy, día -3), junto con anticuerpos anti-LAG-3. El día 1, los receptores se sacrificaron y se evaluó la presencia de células positivas a CFSE por citometría de flujo en órganos linfoides y en la sangre.

#### *Inmunotinción*

20 Se embebieron las muestras de injerto en Tissue Tek (Compuesto OCT, Torrance, CA, EE. UU.), se sometieron a congelación rápida en nitrógeno líquido, se cortaron en secciones de  $5 \mu\text{m}$  y se fijaron con acetona. Se bloqueó la actividad de biotina endógena utilizando el sistema de bloqueo de biotina Dako (Dako, Trappes, Francia). Las secciones se marcaron entonces con una revelación de inmunoperoxidasa indirecta en tres etapas. El área de cada sección de tejido marcada con inmunoperoxidasa infiltrada por células se determinó por un análisis morfométrico cuantitativo. Las células teñidas positivamente en cada portaobjetos se contaron por análisis morfométrico utilizando un análisis de recuento puntual (14) con una rejilla cuadrículada con 121 intersecciones en el campo del microscopio. En resumen, el porcentaje del área de cada sección de injerto ocupado por células de una especificidad antigénica particular (área de infiltrado) se calculó de la siguiente manera: [número de células positivas bajo la intersección de la rejilla/(número total de intersecciones de la rejilla = 121)]  $\times 100$ . Las secciones de injerto se examinaron con una magnificación de 400x. La precisión de la técnica es proporcional al número de puntos que se cuentan. Por lo tanto, para mantener una SE de  $< 10\%$ , se contaron 15 campos para cada sección marcada. Los resultados se expresan como el porcentaje del área de una sección de tejido infiltrada con leucocitos (determinado con marcado OX1, OX30) y la composición fenotípica del infiltrado y las subpoblaciones que se relaciona con el porcentaje de leucocitos totales y se expresa como el porcentaje de leucocitos.

#### *Tinción de extracción celular del infiltrado en el injerto*

35 Los corazones dilacerados se digirieron con colagenasa D (2 mg/ml; Boehringer Mannheim) durante 10 min a  $37^\circ\text{C}$ . Las células se recolectaron por extracción mediante una malla de acero inoxidable. La suspensión resultante se clarificó entonces por aislamiento en Ficoll.

#### *RT-PCR cuantitativa*

40 Se llevó a cabo la PCR cuantitativa en tiempo real en un Sistema de Detección de secuencia GenAmp 7700 de Applied Biosystems utilizando Reactivos Core PCR verde SYBR (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos en este estudio: LAG-3 de rata: el cebador superior era 5'-ATATGAATTCACAGAGGAGATGAGGCAG-3' y el cebador inferior era 5'-ATATGAATTCTCCTGGTCAGAGCTGCCT-3'. INF-g de rata: el cebador superior era 5'-TGGATGCTATGGAAGGAAAGA-3' y el cebador inferior era 5'-GATTCTGGTGACAGCTGGTG-3'. HPRT de rata: el cebador superior era 5'-CCTTGGTCAAGCAGTA-CAGCC-3' y el cebador inferior era 5'-TTCTGCTGATGACACAAACATGA-3'. Se amplificó una cantidad constante de ADNc que se corresponde con la transcripción inversa de 100 ng de ARN total en  $25 \mu\text{l}$  de mezcla PCR que contenía 300 nM de cada cebador;  $200 \mu\text{M}$  de dATP, dGTP, dCTP;  $400 \mu\text{M}$  de dUTP; 3 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,25 U de uracil-N-glucosilasa; 0,625 U de AmpliTaq Gold ADN polimerasa. La mezcla se sometió a 40 ciclos de amplificación. Los datos de PCR en tiempo real se representaron como el  $\Delta R_n$  de la señal fluorescente frente al número de ciclo. Los valores de  $\Delta R_n$  se calcularon con el software de detección de secuencia 7700 de Applied Biosystems utilizando la fórmula:  $\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$ , donde  $R_n^+$  es la señal de fluorescencia del producto en un tiempo determinado,  $R_n^-$  es la señal de fluorescencia media durante los ciclos 3-13 y al que se hace referencia como la línea base. El valor de  $C_t$  se define como el número de ciclo en el que el  $\Delta R_n$  cruza un umbral. El umbral se fija por encima de la fluorescencia de fondo en la intersección de la parte exponencial de la curva de amplificación de una reacción positiva. El  $C_t$  es inversamente proporcional a la cantidad logarítmica de la matriz de la PCR.

#### *Análisis estadístico*

55 La significación estadística se evaluó utilizando un ensayo de Mann-Whitney para la comparación de dos grupos. Se evaluó la supervivencia del injerto por un análisis de Kaplan-Meier utilizando un ensayo de rango logarítmico.



## Resultados

### *Expresión de ARNm LAG-3 en aloinjertos rechazados y órganos linfoides*

Se expresa LAG-3 en linfocitos T activados en los órganos linfoides y tejidos inflamados (7). Con el fin de ver si también se expresaba LAG-3 en los aloinjertos rechazados, los injertos de corazón de las ratas LEW.1W en LEW.1A receptoras se analizaron el día 5 (el rechazo se producía el día 6). Se analizó el ARN mensajero para LAG-3 y se comparó con los aloinjertos que recibieron un régimen inductor de tolerancia (anticuerpo anti-CD28 + CSA, como se ha descrito (16)) y con isoinjertos. Los aloinjertos rechazados presentaban una acumulación de 7 y 25 veces de ARNm LAG-3 en comparación con los injertos tolerados y singénicos, respectivamente (Figura 1A). Dicha acumulación no se detectó en los ganglios linfáticos (Figura 1B) o en el bazo de los receptores con rechazo (Figura 1C).

### 10 *Mecanismo de acción de anticuerpo anti-LAG-3*

Los anticuerpos anti-LAG-3 se produjeron en conejos por inmunización con un péptido sintético del bucle extra del dominio del extremo N tipo Ig LAG-3, implicado en la interacción de LAG-3 con la Clase II (ref. PNAS Huard 1997). El suero post-inmune, así como la fracción de IgG, tenía < 1 % de células esplénicas de rata y un 40 % de células esplénicas de rata activadas durante 48 h con ConA, PMA + ionomicina o PHA. El suero pre-inmune era negativo (datos no mostrados). Con el fin de caracterizar el efecto de los anticuerpos anti-LAG-3 contra las células LAG-3<sup>+</sup>, se ensayó *in vitro* la citotoxicidad dependiente ADCC y de complemento. El quince % de las células esplénicas activadas con ConA se lisaron en el ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento (Figura 2). Debido a que solo un 40 % de las células diana activadas con ConA expresaban LAG-3, este ensayo reveló que aproximadamente el 37 % de las células esplénicas LAG-3<sup>+</sup> presentes en la preparación se lisaban *in vitro* como resultado de la activación del complemento.

20 *In vivo*, la actividad de agotamiento de los anticuerpos anti-LAG-3 se estimó midiendo la muerte de los linfocitos T activados marcados con CFSE transferidos adoptivamente a ratas receptoras radiadas. Un día tras la inyección de dosis terapéuticas de suero inmune anti-LAG-3, solo la mitad de la cantidad de células CFSE<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> y CFSE<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> se podía recuperar del bazo en comparación con inyecciones similares de suero pre-inmune (Figura 3).

### *Los anticuerpos anti-LAG-3 retrasan el rechazo del aloinjerto*

25 A partir de las observaciones farmacocinéticas preliminares, los inventores establecieron que dos inyecciones i.v. de 600 µl de suero anti-LAG-3 de conejo los días 0 y 3 daban como resultado el mantenimiento de la actividad de unión anti-LAG-3 en el suero del receptor durante al menos 2 semanas. Este tratamiento retrasaba el rechazo del aloinjerto cardiaco desde 6 días en los receptores no tratados y tratados con el control hasta una media de 27 días. Todos los receptores, sin embargo, eventualmente rechazaban su injerto en 10 semanas (Figura 4). El día 5, los injertos de los receptores tratados de control tenían una carga importante de linfocitos T activados y este infiltrado era menos importante en los receptores tratados con anti-LAG-3. La infiltración con células CD25<sup>+</sup> y células NK, sin embargo, no se modificaba por el tratamiento. Ya que los anticuerpos anti-LAG-3 de los inventores no reconocían el LAG-3 en inmunohistología, se analizó la expresión de LAG-3 por las células infiltradas del injerto (GIC) por citometría de flujo tras la extracción. Se podía recuperar una media de  $8,5 \times 10^6 \pm 0,76$  GIC de los injertos rechazados de control. De los aloinjertos de corazón de los receptores tratados con anti-LAG-3, solamente se podían recuperar  $3,16 \pm 0,44 \times 10^6$  GIC (n = 3; p < 0,005). Las GIC contenían  $41,17 \pm 1 \%$  de células LAG-3<sup>+</sup> en los controles (es decir,  $3,5 \times 10^6$  células) frente a  $22,2 \pm 0,9 \%$  en animales tratados (es decir  $0,7 \times 10^6$  células; n = 3; p < 0,0005; Fig. 5). El análisis de la transcripción de ARNm reforzaba estas observaciones de que la infiltración del injerto cardiaco por células mononucleares estaba reducida ya que los inventores midieron cuatro veces menos de moléculas de ARNm INFγ en los injertos tratados (Figura 5).

### *Los anticuerpos anti-LAG-3 inhiben el rechazo agudo en desarrollo del aloinjerto cardiaco*

Con el fin de investigar si los anticuerpos anti-LAG-3 podían servir como un tratamiento de un rechazo agudo de injerto cardiaco, los inventores injertaron corazones de LEW.1W en receptores LEW.1A alogénicos que se mantuvieron sin tratar durante 3 o 4 días. En ese momento, los receptores recibieron una inyección de 600 microlitros del control o suero de conejo anti-LAG-3. Los receptores tratados con el control rechazaron los aloinjertos el día 5 mientras que los receptores tratados con anticuerpos anti-LAG-3 los rechazaron solamente el día 11 (Tabla 1).

Tabla 1

Tratamiento	Día de rechazo	Supervivencia media
Suero de control el día 3	5, 5, 5	5
Suero de control el día 4	5, 5, 5	5
Suero anti-LAG-3 el día 3	12, 13, 9	12 (p < 0,05 vs. control)
Suero anti-LAG-3 el día 4	10, 13, 13, 19	12.5 (p < 0,05 vs. control)

50 Tabla 1: Los receptores de injerto cardiaco se trataron el día 3 o 4 con anticuerpos de control o anti-LAG-3. El rechazo se controló por palpación cardiaca diaria.

**Ejemplo 2: Generación de nuevos mAb hLAG-3 de alta afinidad**Materiales y procedimientos

Los ratones se inmunizaron 3 veces con células CHO transfectadas con hLAG-3 ( $10^7$  células, inyección intraperitoneal), seguido por una inyección i.v. de refuerzo con 10  $\mu$ g de IMP321, la proteína recombinante Ig hLAG-3 de calidad clínica. Tres días después del refuerzo, se fusionaron los esplenocitos con la pareja de fusión X63.AG8653 para producir las células de hibridoma. Los sobrenadantes del hibridoma se exploraron en cuanto a su unión específica (por análisis FACS) con las células CHO transfectadas con hLAG-3 frente a las células CHO de tipo silvestre (ts).

Se seleccionó un anticuerpo IgG2a murino (580.1E9H3A9H12, llamado A9H12), se subclonó para producir una línea celular estable y además caracterizarla por su potencia para agotar las células LAG-3<sup>+</sup> por medio de CDC (citotoxicidad dependiente de complemento) y ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo), debido a que la región Fc de IgG2a murina se conoce por ser el isotipo de Fc más eficaz en ratones para suministrar estas actividades, incluso en células heterólogas (es decir, células CHO o PBMC humanas). De manera similar, se seleccionó también un segundo anticuerpo IgM (31G11E8, llamado 31G11).

Resultados

Se comparó en primer lugar la unión dependiente de la dosis de A9H12 con la del mAb 17B4 específico de LAG-3 de referencia en células CHO transfectadas con LAG-3 y en linfocitos T humanos activados LAG-3<sup>+</sup> *in vitro* (Figura 6). El A9H12 presentaba una mayor unión que el mAb 17B4 de referencia en ambos tipos celulares. Por ejemplo, la unión significativa de A9H12 a los linfocitos T humanos activados se observaba con una concentración tan baja como 0,01  $\mu$ g/ml.

Para el ensayo CDC, las células diana que se utilizaron en este ensayo eran células CHO LAG-3<sup>+</sup> en comparación con células CHO ts (Figura 7A). Ambos tipos de células se incubaron durante 1 hora a 37 °C con A9H12, su control negativo IgG2a murino coincidente en isotipo, 31G11, su control negativo IgM murino coincidente en isotipo o el mAb 17B4 (IgG1) de referencia y suero de conejo que contenía el complemento activo. Entonces se evaluó la viabilidad celular utilizando 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD), un colorante fluorescente que marca las células que han perdido su integridad de membrana, un fenómeno que aparece rápidamente tras la muerte. El porcentaje de células CHO positivas a 7-AAD (es decir, las células diana muertas) se determinó por un análisis de citometría de flujo. El A9H12 presentaba una actividad citotóxica potente y específica en este ensayo de CDC, destruyendo solo células CHO LAG-3<sup>+</sup> en presencia de complemento (Figura 7B). El Ab anti-LAG-3 se tituló para determinar la eficacia del anticuerpo para activar la CDC a baja concentración de anticuerpo. El A9H12 inducía la destrucción de células CHO LAG-3<sup>+</sup> eficazmente a una concentración tan baja como 0,01  $\mu$ g/ml (Figura 7C). El anticuerpo 17B4 IgG1 también se ensayó en este ensayo y no tenía efecto (Figura 7D, panel de la izquierda), demostrando que no todos los mAb LAG-3 podían inducir citotoxicidad en este bioensayo. Como se observa con el A9H12, el segundo mAb específico de LAG-3 31G11 también inducía destrucción de células CHO LAG-3<sup>+</sup> (Figura 7D, panel de la derecha).

El bioensayo de CDC se llevó a cabo también en PBMC estimuladas con el súper-antígeno SEB. Se analizó la citotoxicidad de A9H12 y 31G11 en ambos linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> y T auxiliares CD4<sup>+</sup> tanto activados (a saber células CD25<sup>+</sup>/LAG-3<sup>+</sup>) como no activados (a saber células CD25<sup>-</sup>/LAG-3<sup>+</sup>). Solo los linfocitos T activados CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se destruían específicamente por A9H12 y 31G11 (Figura 7E), demostrando que los linfocitos T humanos activados son susceptibles a la destrucción específica por A9H12 o 31G11 en presencia de complemento.

Para el ensayo ADCC, se estimularon las PBMC durante un día con IL-2 para que funcionaran como células efectoras y se marcaron las células CHO LAG-3<sup>+</sup> con el colorante vital CFSE para que funcionaran como células diana. En presencia del A9H12, las PBMC eran capaces de destruir un porcentaje significativo de células CHO LAG-3<sup>+</sup> y este efecto aumentaba con el número de células efectoras (Figura 8A). En presencia de 17B4, solo se destruía un pequeño porcentaje de células diana incluso con una relación E:D alta (Figura 8A), demostrando que no todos los mAb LAG-3 podían inducir citotoxicidad en este bioensayo. El mAb LAG-3 A9H12 se tituló para determinar la eficacia del anticuerpo para inducir ADCC a baja concentración de anticuerpo. El A9H12 inducía eficazmente la destrucción de las células CHO LAG-3<sup>+</sup> a una concentración tan baja como 0,01  $\mu$ g/ml (Figura 8B).

**Ejemplo 3: Ensayo de agotamiento por los anticuerpos LAG-3 en un modelo de ratón de artritis inducida por colágeno**Materiales y procedimientosAnimales y materiales

Se obtuvieron ratones machos DBA/1 (H-2<sup>a</sup>), de 8-10 semanas de edad en Janvier Laboratories. Todos los experimentos animales se llevaron a cabo con las instrucciones locales. Se adquirió el CII bovino (cartilago articular) en BioCol. El adyuvante incompleto de Freund fue proporcionado por Sigma. La *M. tuberculosis* H37Ra inactivada por calor se adquirió en Difco Laboratories.

*Inducción de la artritis inducida por colágeno (CIA)*

La inducción y evaluación de CIA se llevó a cabo como se había descrito anteriormente en dos publicaciones (13, 15). Se preparó el adyuvante incompleto de Freund mezclando 100 mg de *Mycobacterium tuberculosis* inactivada por calor en 13,3 ml de IFA (concentración final de 7,5 mg/ml). El CII bovino se disolvió a 3 mg/ml en 10 mM de ácido acético durante una noche a 4 °C. Se formó una emulsión mezclando 2 volúmenes de CII con 1 volumen de CFA. La solución de CII y la emulsión con CFA siempre se prepararon en el momento. Los ratones DBA/1 machos se inyectaron por vía intradérmica en la base de la cola con un total de 100 µl de emulsión que contenía 200 µg de CII y 250 µg de *M. tuberculosis* el día 1 (D1). Se repitió la inyección el día 21 (D21). Como control se inyectaron tres ratones con la emulsión de CFA sin CII.

10 *Evaluación clínica de la artritis*

Se examinaron los ratones por signos de artritis tres veces a la semana desde el día 22. La gravedad de la enfermedad se determinó con el siguiente sistema de valoración para cada extremidad: puntuación 0 = normal; puntuación 1 = hinchazón de la almohadilla plantar o articular; puntuación 2 = hinchazón de la almohadilla plantar y 1 o 2 articulaciones; puntuación 3 = hinchazón de la almohadilla plantar y 3 o 4 articulaciones; puntuación 4 = hinchazón de la almohadilla plantar y todas las articulaciones. Se estableció un grado para cada garra, y las 4 puntuaciones se sumaron de manera que la puntuación máxima posible era 16 por ratón. La incidencia se expresó como el porcentaje de ratones con una puntuación de artritis  $\geq 1$ .

Resultados

Se indujo la CIA por inyecciones i.d. de colágeno bovino tipo II (CII) emulsionado en CFA que contenía 250 µg de *M. tuberculosis*. Tras una inyección, 4 de los 22 ratones habían desarrollado artritis el D21. Dos semanas después de la segunda inyección, el D35, el 80-90 % de los ratones habían desarrollado signos clínicos de artritis (Figura 9). Los ratones presentaban puntuaciones clínicas que cubrían el intervalo completo de respuestas de 1 a 16 presentando en algunas extremidades hinchazón severa de la almohadilla plantar, articulación del tobillo/codo y dedos (Tabla 2). Ninguno de los animales de control (inyectados con CFA sin CII) desarrollaron signos de artritis (datos no mostrados).

Tabla 2

Días	Media	SEM
25	2,2	0,9
27	2,7	0,8
29	5,7	1,0
32	9,2	1,5
34	10,5	1,5
36	10,9	1,6
39	10,8	1,7
41	10,9	1,6
43	11,2	1,5
46	11,7	1,3
53	13,1	1,2
55	13,3	1,1

Tabla 2: Puntuaciones clínicas medias ( $\pm$ SEM) durante 55 días. Los ratones DBA/1 machos (n = 10) se inyectaron por vía i.d. con colágeno bovino tipo II (200 mg) emulsionado con CFA que contenía 250 mg de *M. tuberculosis* el D1 y D21.

30 Los resultados de los inventores demuestran que con el protocolo de CIA que se utiliza, es posible obtener un alto porcentaje (80-90 %) de ratones que presentan signos de artritis. El protocolo experimental proporciona un procedimiento para evaluar el efecto terapéutico de agotamiento por el anticuerpo LAG-3 (específico de LAG-3 de ratón) en enfermedades autoinmunitarias.

35 Se inyectaron 200 µg de mAb LAG-3 de agotamiento (A9H12 o 31G11) por vía i.p. o i.v. los días 15 y 25. Ambos estaban implicados en la disminución de la incidencia de artritis y la disminución significativa de las puntuaciones clínicas medias

**Ejemplo 4: Citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) inducidas por IMP731**Materiales y procedimientos

5 Se ha demostrado que un nuevo mAb murino con propiedades de agotamiento, el A9H12, reconoce también las células LAG-3<sup>+</sup> de monos babuinos y macacos con alta avidéz y se ha escogido como el mAb de agotamiento terapéutico principal por los inventores (*Immu Tune* IMP731).

El A9H12 se quimerizó con una región Fc de IgG1 humana utilizando protocolos de modificación genética y PCR convencionales, para dar las propiedades de CDC (citotoxicidad dependiente de complemento) y ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo).

10 Las secuencias del ADNc de VH y VL de A9H12 derivadas del ARNm de las células del hibridoma se fusionaron corriente arriba de los dominios humanos CH1-bisagra-CH2-CH3 de IgG1 y las cadenas Ckappa, respectivamente (Figura 10).

15 Las dos cadenas ligera y pesada quiméricas de IMP731 se clonaron independientemente en plásmidos de expresión separados (Figura 11 panel A y B, respectivamente) bajo el control del promotor PGK (o SRalfa en otra construcción, no mostrada). Estos 2 plásmidos se co-transfectaron (transfección transitoria) juntos en las células CHO y se purificó el IMP731 del sobrenadante del cultivo el día 2 o 3 utilizando una columna de captura por afinidad con Proteína A y se eluyó a pH 3. Tras la neutralización con Tris-HCl el anticuerpo IMP731 purificado se ensayó en experimentos de CDC y ADCC en cuanto a su capacidad para destruir las células diana LAG-3<sup>+</sup>.

20 Las dos cadenas de IMP731 pesada y ligera se clonaron entonces juntas con el promotor PGK(o SRalfa, no mostrado) en una situación de cabeza a cola para la expresión coordinada de las dos cadenas de IMP731 a partir del mismo sitio de integración (Figura 12). Este plásmido de expresión bi-cistrónico de IMP731 se utilizó para la transfección y selección de células CHO-S con alta productividad (por ejemplo, más de 20 picogramos de proteína IMP731 por millón de células CHO-S por día) utilizando concentraciones crecientes de higromicina en medio libre de suero.

Resultados

25 La unión de IMP731 dependiente de la dosis se evaluó primero con las células CHO transfectadas con hLAG-3 (Figura 13A) y sobre linfocitos T LAG-3<sup>+</sup> activados humanos *in vitro* (Figura 13B). El IMP731 presentaba una unión significativa a ambos tipos celulares con una concentración tan baja como 0,01 µg/ml para los linfocitos T activados.

30 Para el ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), las células diana que se utilizaron en este ensayo eran células CHO LAG-3<sup>+</sup> (Figura 14). Se incubaron las células con IMP731 o su control negativo de isotipo IgG1 coincidente humano y luego con suero de conejo que contenía complemento activo durante 1 hora a 37 °C. Luego se evaluó la viabilidad celular utilizando 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD). El 7-AAD es un colorante fluorescente que marca las células que han perdido su integridad de membrana, un fenómeno que aparece rápidamente tras la muerte. El porcentaje de células CHO positivas a 7-AAD (es decir, las células diana muertas) se determinó por un análisis de citometría de flujo. El IMP731 presentaba una actividad de citotoxicidad potente y específica en este ensayo de CDC, destruyendo solamente las células CHO LAG-3<sup>+</sup> en presencia del complemento (Figura 14).

35 Para el ensayo de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), se estimularon PBMC durante un día con IL-2 para que funcionaran como células efectoras y las células CHO LAG-3<sup>+</sup> se marcaron con el colorante vital CFSE para que funcionaran como células diana. En presencia de IMP731, las PBMC eran capaces de destruir un alto porcentaje de células CHO LAG-3<sup>+</sup> (Figura 15A). El Ab LAG-3 IMP731 se tituló en disminución para determinar la eficacia del anticuerpo para inducir ADCC a concentraciones bajas de anticuerpo. El IMP731 inducía significativamente la destrucción de las células CHO LAG-3<sup>+</sup> con una concentración tan baja como de 0,01 µg/ml (Figura 15B). Se destruían las células LAG-3<sup>+</sup> pero no las LAG-3<sup>-</sup> al añadirse el IMP731 en el presente ensayo (Figura 15C).

45 Parece que la unión y las actividades funcionales de IMP731 eran similares al mAb murino A9H12 parental producido por las células de hibridoma.

Referencias

1. Waldmann H. The new immunosuppression: just kill the T cell. *Nat Med* 2003; 9 (10): 1259.
2. Monk NJ, Hargreaves RE, Marsh JE, y col. Fc-dependent depletion of activated T cells occurs through CD40L-specific antibody rather than costimulation blockade. *Nat Med* 2003; 9 (10): 1275.
3. Andre P, Prasad KS, Denis CV, y col. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat Med* 2002; 8 (3): 247.
4. Avice MN, Sarfati M, Triebel F, Delespesse G, Demeure CE. Lymphocyte activation gene-3, a MHC class II ligand expressed on activated T cells, stimulates TNF-alpha and IL-12 production by monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.* 1999; 162: 2748.
5. Andrae S, Piras F, Burdin N, Triebel F. Maturation and activation of dendritic cells induced by lymphocyte

activation gene-3 (CD223). J Immunol 2002; 168 (8): 3874.  
 6. Andrae S, Buisson S, Triebel F. MHC class II signal transduction in human dendritic cells induced by a natural ligand, the LAG-3 protein (CD223). Blood 2003; 102 (6): 2130.  
 7. Triebel F. LAG-3: a regulator of T-cell and DC responses and its use in therapeutic vaccination. Trends Immunol 2003; 24 (12): 619.  
 8. Macon-Lemaitre L, Triebel F. The negative regulatory function of the lymphocyte-activation gene-3 coreceptor (CD223) on human T cells. Immunology 2005; 115 (2): 170.  
 9. Kohler y Milstein. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature. 1975; 256(5517): 495-497.  
 10. Kozbor y col., 1985, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96.  
 11. Ono y col., Improved technique of heart transplantation in rats. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 57, 225-229.  
 12. Stasiuk y col., Collagen-induced arthritis in DBA/1 mice: Cytokine gene activation following immunization with type II collagen. Cellular Immunol. 1996; 173: 269-275.  
 13. Campbell y col., Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. Eur. J. Immunol. 2000; 30: 1568-1575.  
 14. Inglis y col., Collagen-induced arthritis in C57BL/6 is associated with a robust and sustained T-cell response to type II collagen. Arthritis Research & Therapy. 2007; 9: R113.  
 15. Hiroaki y col., A tumor necrosis factor receptor loop peptide mimic inhibits bone destruction to the same extent as anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody in murine collagen-induced arthritis. arthritis & Rheumatism. 2007; 56(4): 1164-1174.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> IMMUTEP  
 INSERM  
 25 TRIEBEL, Frédéric  
 VANHOVE, Bernard  
 HAUDEBOURG, Thomas

<120> ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-LAG-3 CITOTÓXICO Y SU USO EN EL TRATAMIENTO O  
 30 PREVENCIÓN DEL RECHAZO DE ÓRGANOS TRASPLANTADOS Y ENFERMEDAD AUTOINMUNITARIA

<130> 49869/PCT

<150> PCT/IB2008/XXXXX  
 35 <151> 30-04-2008

<150> EP 07290545.8  
 <151> 30-04-2007

40 <160> 7

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1  
 45 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 1  
 50

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

Ser Thr Arg Arg His Pro Pro His Arg  
 20 25

<210> 2  
 55 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

	<400> 2		
	atatgaattc acagaggaga tgaggcag 28		
5	<210> 3		
	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
10	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 3		
	atatgaattc tctggtcag agctgcct 28		
15	<210> 4		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
20	<220>		
	<223> Cebador		
25	<400> 4		
	tggatgctat ggaaggaaag a	21	
	<210> 5		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
30	<220>		
	<223> Cebador		
35	<400> 5		
	gattctggtg acagctggtg	20	
	<210> 6		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
40	<220>		
	<223> Cebador		
45	<400> 6		
	ccttggtcaa gcagtacagc c	21	
	<210> 7		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
50	<220>		
	<223> Cebador		
55	<400> 7		
	ttcgctgatg acacaaacat ga	22	

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 citotóxico o fragmento del mismo capaz de producir el agotamiento de los linfocitos T activados por LAG-3<sup>+</sup>, en el que dicho anticuerpo se produce por el hibridoma depositado en la CNCM el 27 de abril de 2007 con el número de acceso CNCM I-3755, y además en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo presenta citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).
2. Un anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 citotóxico o fragmento del mismo capaz de producir el agotamiento de los linfocitos T activados por LAG-3<sup>+</sup>, en el que dicho anticuerpo se produce por el hibridoma depositado en la CNCM el 27 de abril de 2007 con el número de acceso CNCM I-3756, y además en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo presenta citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).
- 10 3. Una composición farmacéutica que comprende de 30 a 300 mg por dosis de un anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 citotóxico de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, y un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable para su administración a un mamífero.
- 15 4. Un anticuerpo monoclonal anti-LAG-3 citotóxico o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para su uso en el tratamiento o prevención del rechazo de un órgano trasplantado o para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria mediada por linfocitos T.

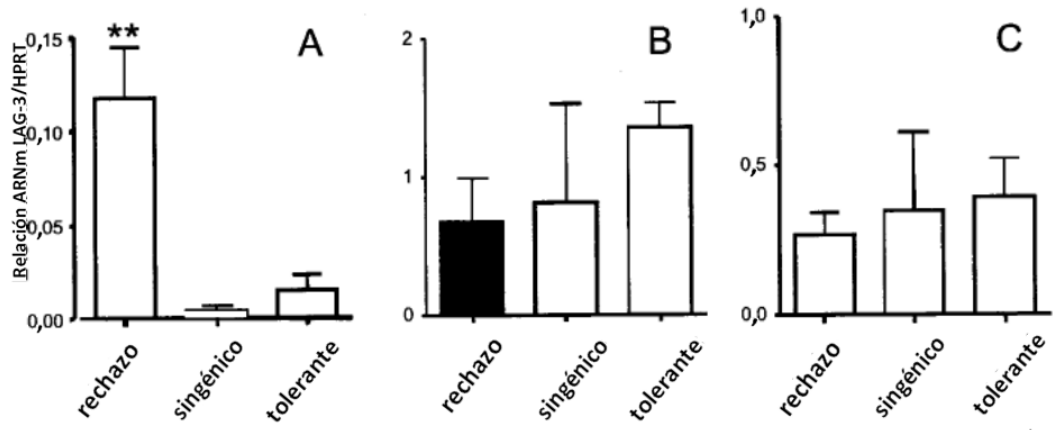


Figura 1

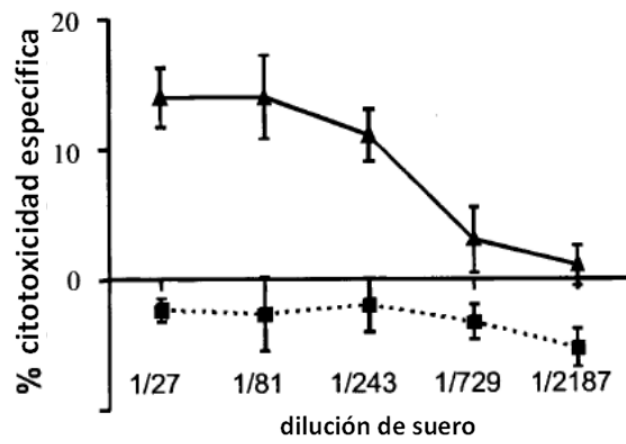


Figura 2



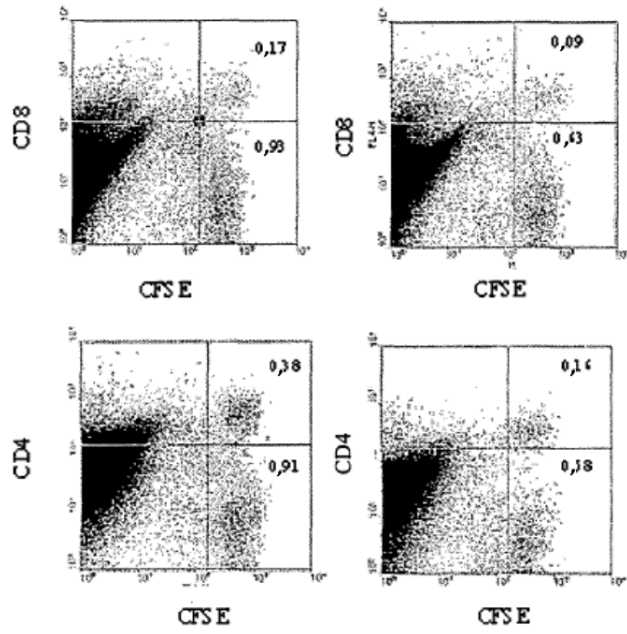


Figura 3

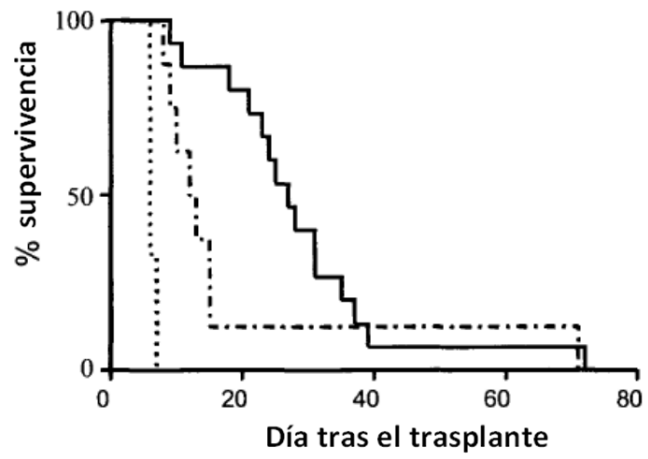


Figura 4

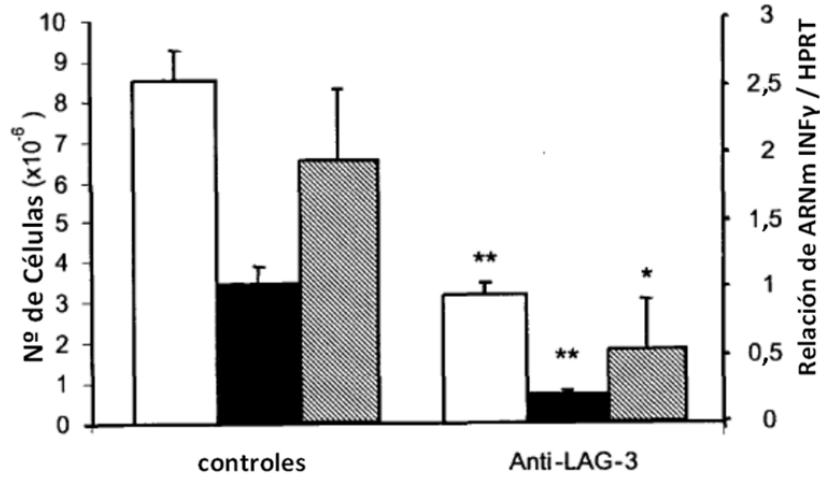


Figura 5

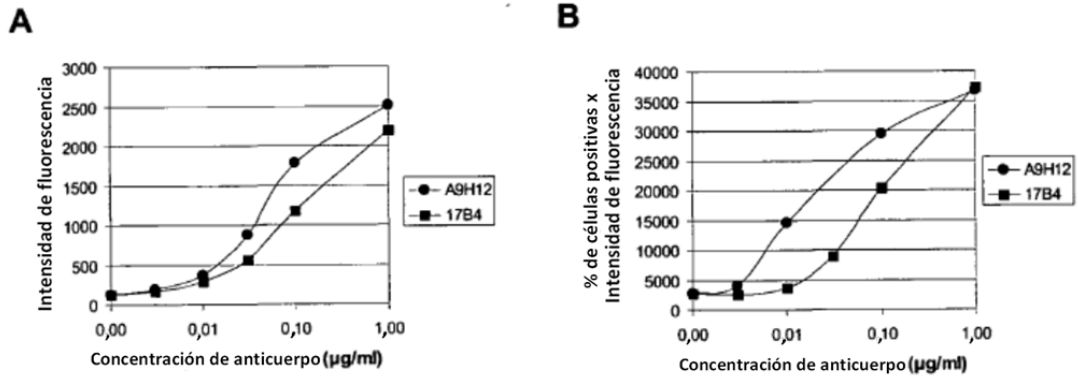


Figura 6

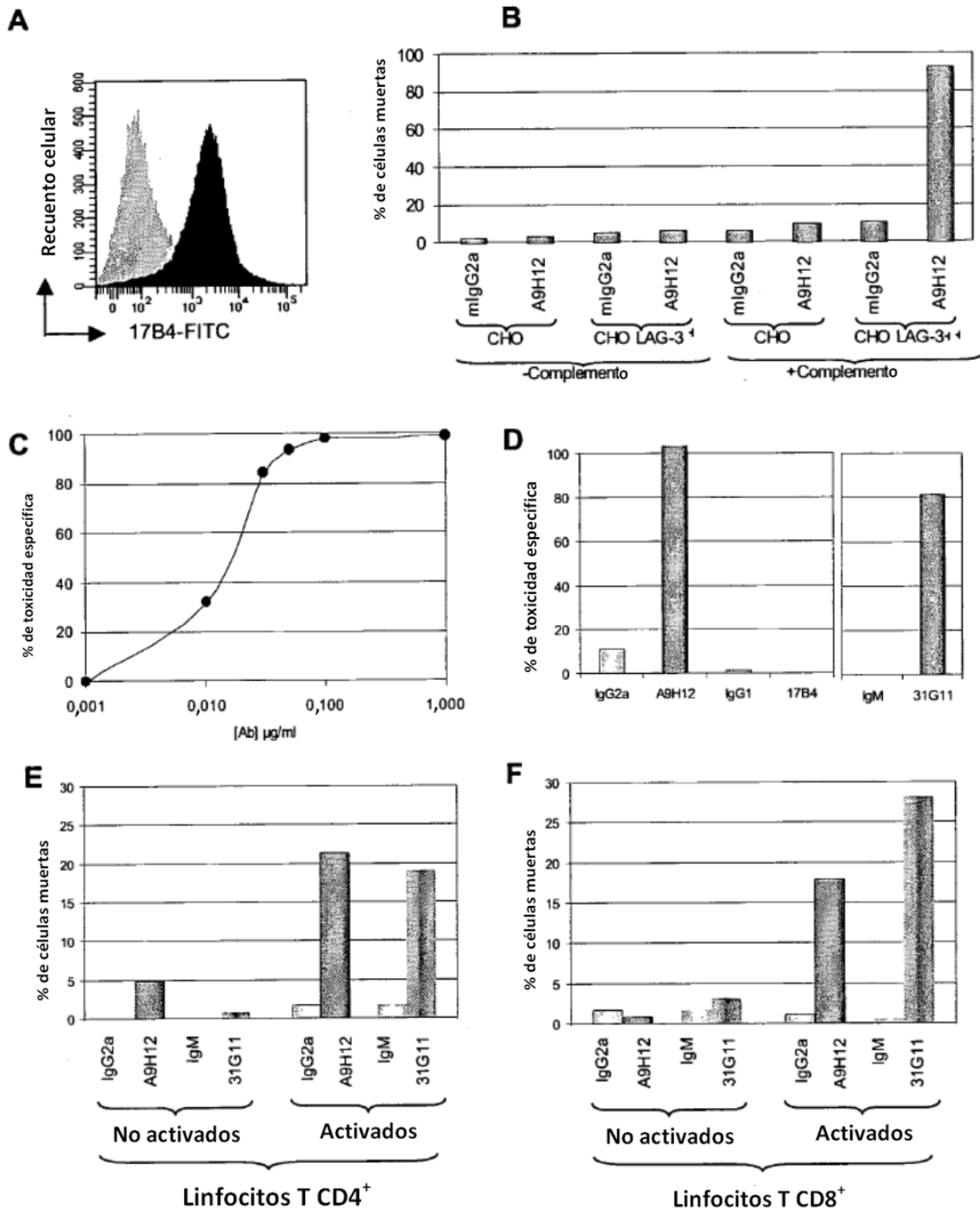


Figura 7

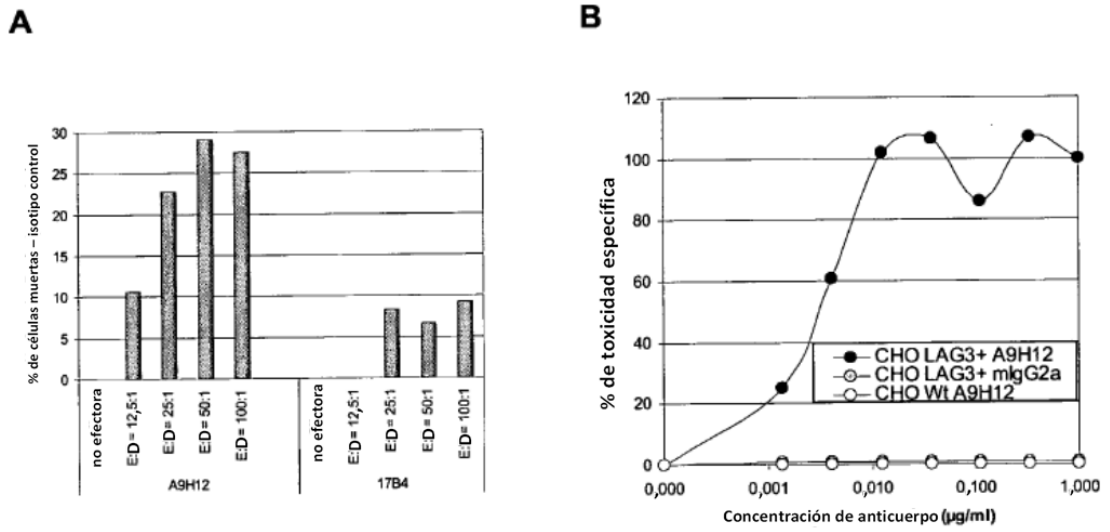


Figura 8

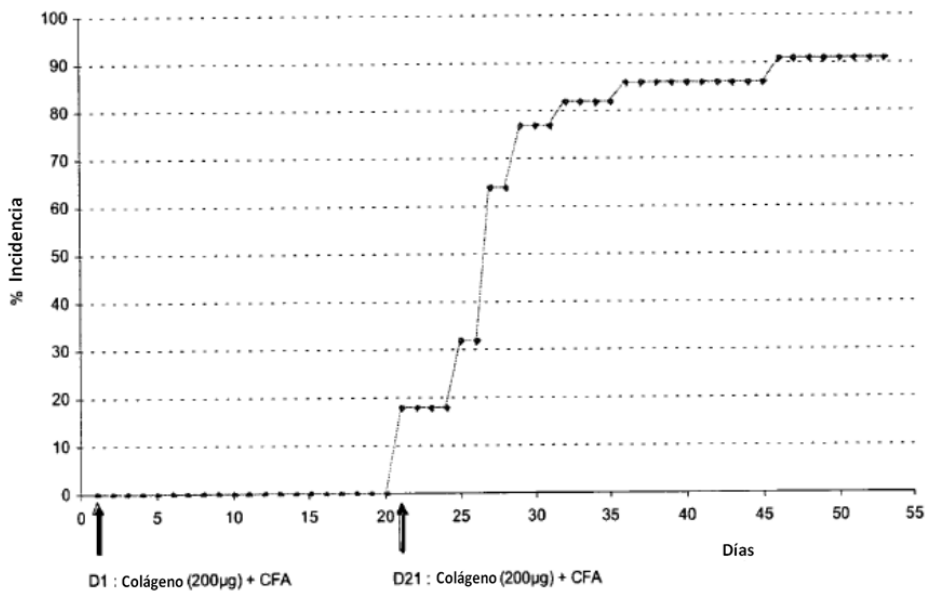


Figura 9

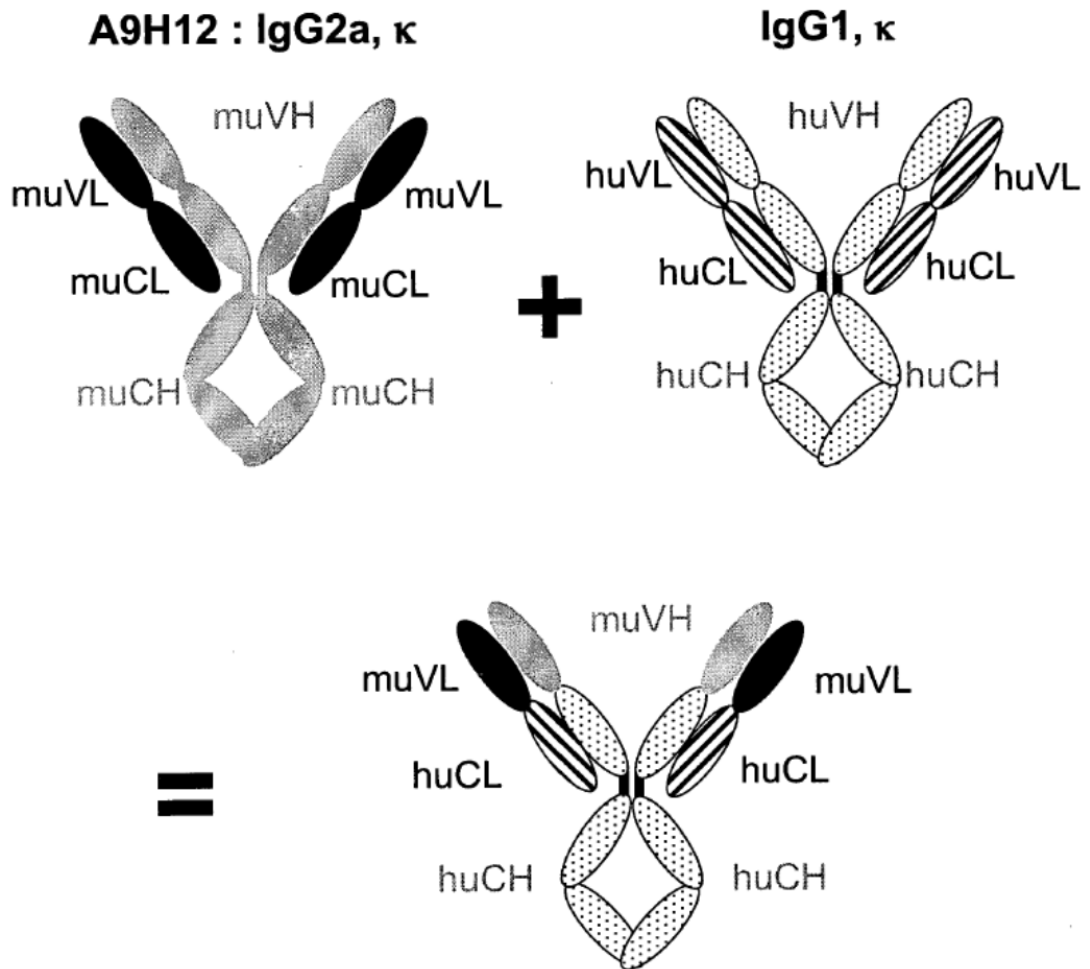


Figura 10

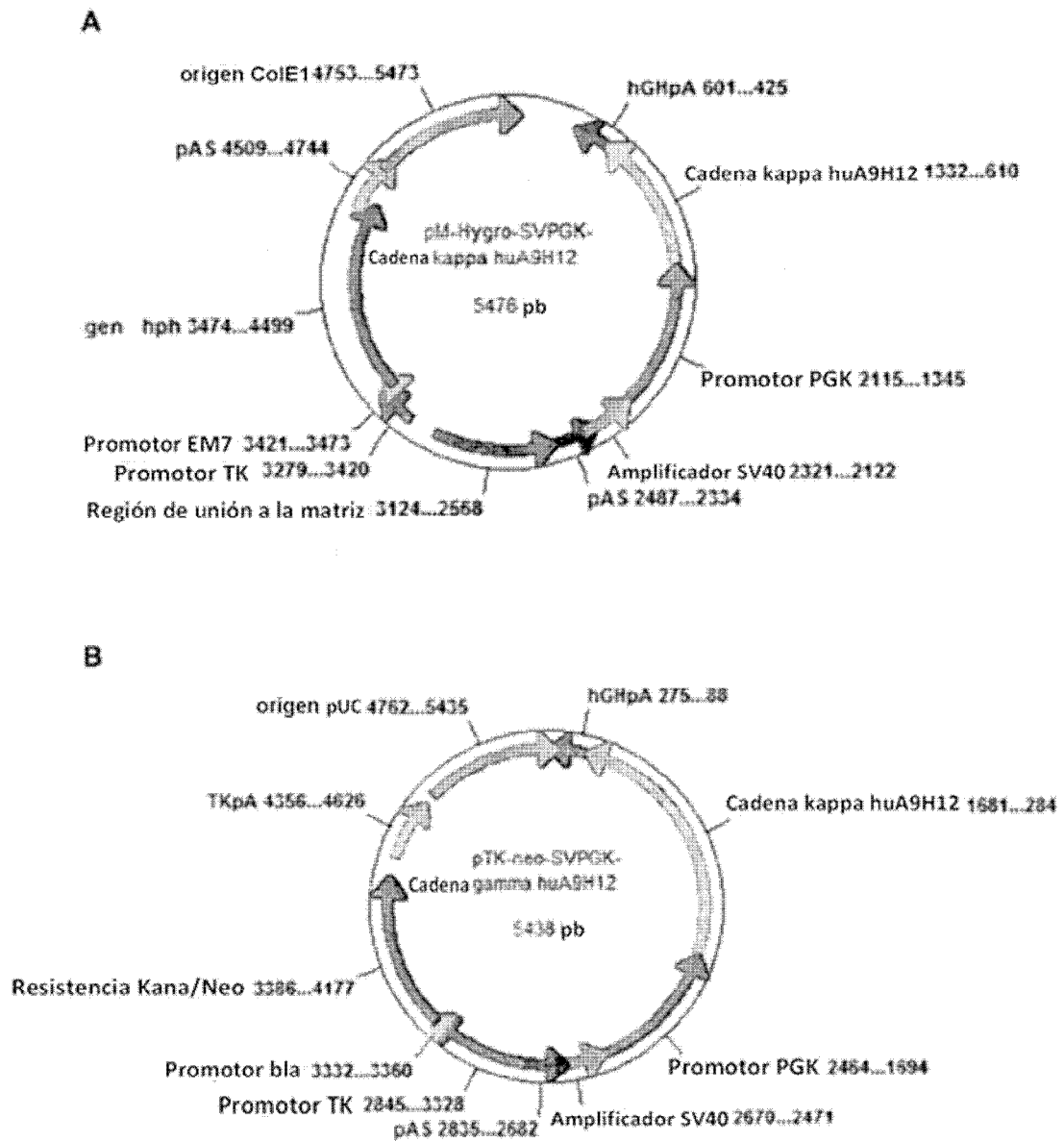


Figura 11

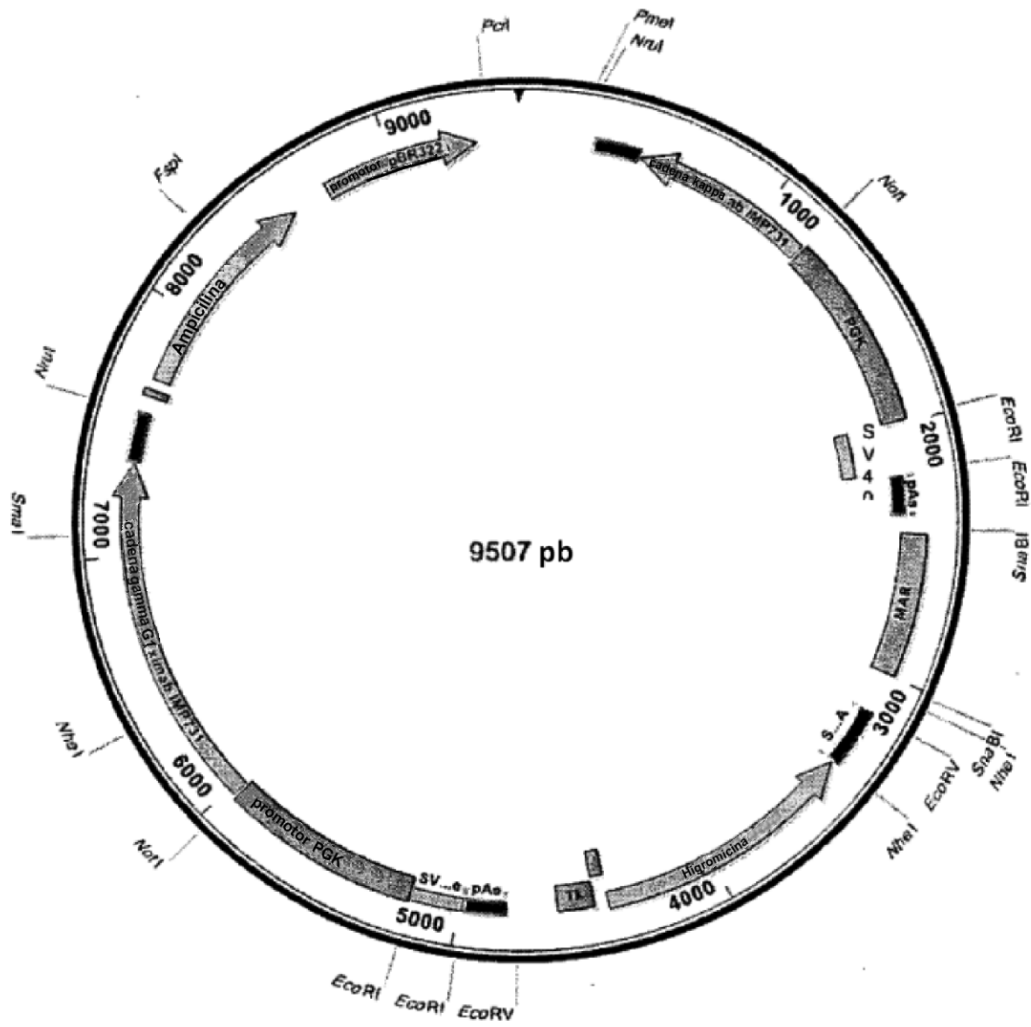


Figura 12

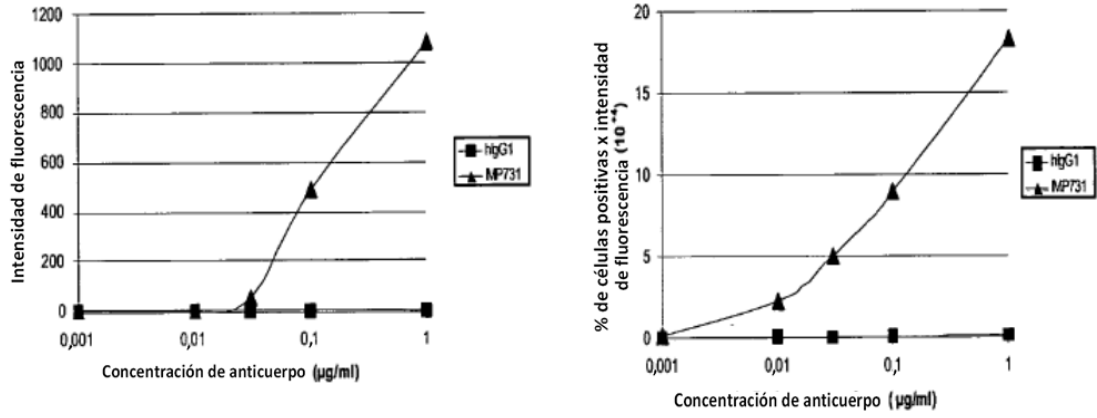


Figura 13

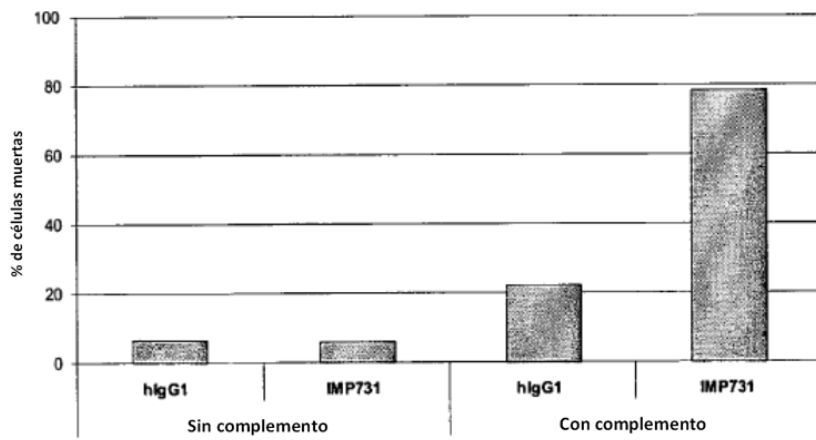


Figura 14



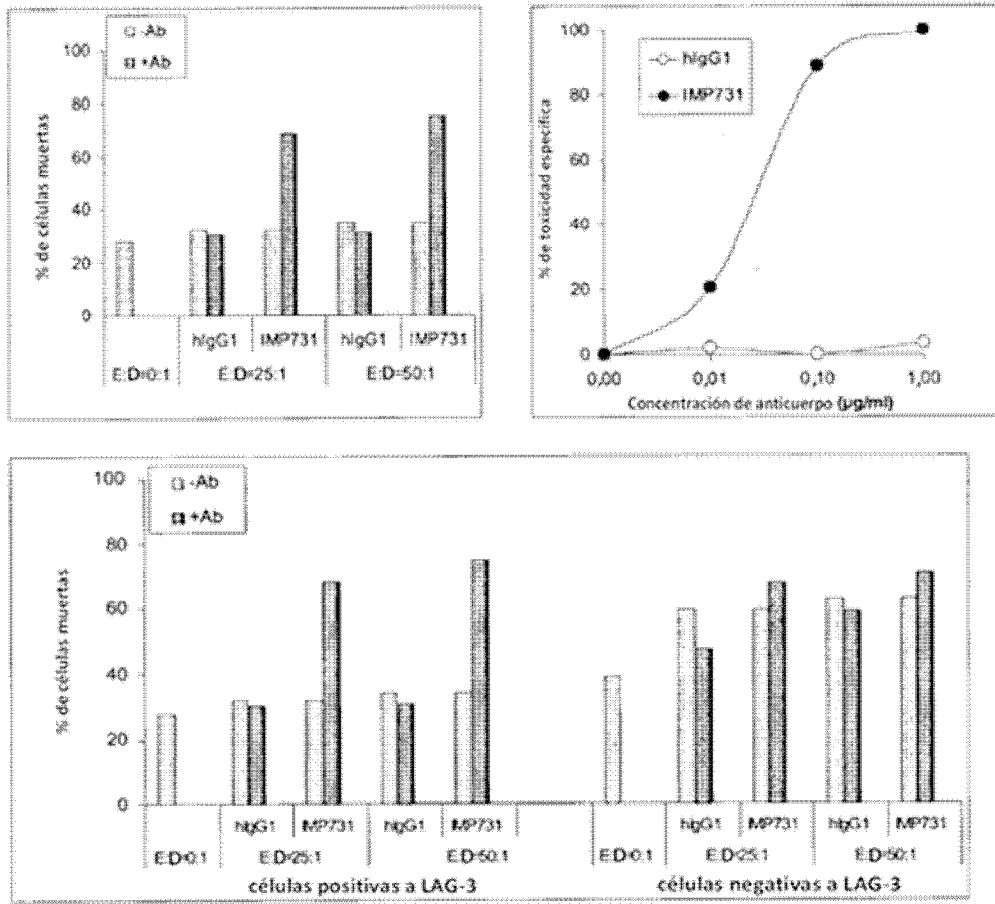


Figura 15