

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 781**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2011 PCT/KR2011/004908**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13005873**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2011 E 11869153 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2729497**

54 Título: **Un anticuerpo que induce tolerancia de linfocitos T específica de antígeno y uso del mismo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2017

73 Titular/es:
DINONA INC. (50.0%)
65, Woomyeon-dong Seocho-gu
Seoul 137-140, KR y
SNU R & DB FOUNDATION (50.0%)

72 Inventor/es:
PARK, SEONG HOE y
JUNG, KYEONG CHEON

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 602 781 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

Un anticuerpo que induce tolerancia de linfocitos T específica de antígeno y uso del mismo

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a moléculas-1 de adhesión intercelular (ICAM-1, siglas del inglés *intercellular adhesion molecules-1*) donde el anticuerpo es capaz de modular la diferenciación y la función de las células dendríticas y prolongar la supervivencia del injerto. Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, y el procedimiento de tratamiento de trastornos inmunitarios que utiliza la composición.

Antecedentes de la invención

10 Las células dendríticas (DC, *Dendritic Cells*) son células presentadoras de antígeno altamente especializadas que integran una diversidad de respuestas inmunitarias (*Nature*. 1998, 382:245-252), e incluyen una familia heterogénea de células profesionales presentadoras de antígeno implicadas en la iniciación de la inmunidad y la tolerancia inmunológica. Hasta ahora, se creyó que las DC inmaduras inducían anergia de linfocito T, mientras que se pensaba que las DC transformadas en DC inmaduras por estímulos de activación, tales como lipopolisacárido (LPS), inducían
15 respuesta primaria de linfocito T (*Blood*. 2006, 108:1.435-1.440). Además, las DC semimaduras con un perfil de producción de citoquina característico se deberían crear con funciones tolerogénicas (*Blood*. 2006, 108:1.435-1.440).

ICAM-1 es una glicoproteína de superficie celular tipo I de 90 kDa compuesta de cinco dominios de la superfamilia de inmunoglobulina extracelular (*Cell*. 1.990, 61:243-54). ICAM-1 media la interacción leucocito/leucocito tal como la
20 interacción entre linfocitos T y células presentadoras de antígeno. También media la extravasación de leucocito dentro del tejido durante procesos inflamatorios (*Transplantation*. 1999, 67:729-736). El estudio *in vitro* mostró que los anticuerpos que interfieren la interacción ICAM-1/antígeno-1 asociado a función leucocítica (LFA-1) son capaces de inhibir la adhesión del linfocito T a células endoteliales y la activación del linfocito T también se podría reducir significativamente en una reacción de linfocito mezclado mediante estos anticuerpos (*Proc. Natl. Acad. Sci USA*.
25 1988, 85:3.095-3.099). En estudios en monos usando un anticuerpo monoclonal murino, R6-5-D6 (enlimomab), que se une al dominio de ICAM-1 humana, el aloinjerto renal se ha extendido y se disminuyó la infiltración de linfocito T en el injerto en comparación con los controles (*J. Immunol*. 1990, 144:4.604-4.612). También se ha demostrado que Enlimomab es beneficioso en la actividad de la enfermedad depresiva en paciente con artritis reumatoide (*Arthritis Rheum*. 1994, 37:992-999; *J. Rheumatol*. 1996, 23:1.338-1.334). Sin embargo, la terapia de inducción de enlimomab después del trasplante renal en un estudio multicentro distribuido al azar no era capaz de reducir el índice de rechazo agudo o el riesgo de inicio retrasado de la función del injerto (*Transplantation*. 1999, 67:729-736). Además,
30 el ensayo clínico en paciente con derrame isquémico agudo reveló que la terapia anti-ICAM-1 con enlimomab no era eficaz y de hecho empeoró significativamente la consecuencia del derrame e inducía efecto más adverso, principalmente infecciones y fiebre en comparación con el placebo (*Neurology*, 2001, 57:1.428-1.434). Enlimomab funciona bloqueando la adhesión de los linfocitos T así como neutrófilos a las células endoteliales vasculares y, por tanto, se ha sugerido que al interferir con la emigración de neutrófilo incrementa potencialmente la susceptibilidad a infección (*J. Immunol*. 1999, 162:2.352-2.357).

El documento WO91/16927 describe la generación de anticuerpos anti-ICAM-1 recombinantes o humanizados
40 derivados de R6-5-D6 murino (enlimomab) y su uso con fines de tratamiento (inflamación, enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplante).

Se ha sabido que otro anticuerpo monoclonal anti-ICAM-1, MD-2, suprime el rechazo de trasplante (Publicación de Patente norteamericana N° 2010-0168394-A1). A diferencia de R6-5-D6, este anticuerpo se une al dominio de ICAM-1 y no bloquea la interacción entre ICAM-1 y LFA-1. Un poco después, este anticuerpo suprime la función del linfocito T por la modulación del desarrollo y la función de las células dendríticas.

Sumario de la invención

Una realización de la presente invención se refiere a un anticuerpo que se une al dominio 2 de las moléculas-1 de adhesión intercelular humanas (ICAM-1) donde el anticuerpo es capaz de modular la diferenciación y la función de las células dendríticas e induce la tolerancia del linfocito T específica a antígeno, siendo de ese modo eficaz en la
50 prevención y/o tratamiento de trastornos inmunitarios mediados por linfocito T, tales como rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped y enfermedad autoinmunitaria. Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo. La presente invención además proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo para tratar los trastornos inmunitarios mediados por linfocito T, el anticuerpo para su uso en el tratamiento de trastornos inmunitarios mediados por linfocito T y un procedimiento de tratamiento de los trastornos inmunitarios mediados por linfocito T que usa el anticuerpo.

55 Más particularmente, la presente invención se refiere al anticuerpo anti-ICAM-1 humana que modula la diferenciación y las funciones de las células dendríticas por la unión del dominio 2 de ICAM-1 humana, e induce la tolerancia del linfocito T específica a antígeno más que la supresión generalizada de la función inmunitaria. De ese

modo, la administración de este anticuerpo podría ser eficaz en la prevención y/o tratamiento de trastornos inmunitarios mediados por linfocito T, tal como rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad autoinmunitaria, mientras que minimice los efectos adversos mediante inmunosupresión, tales como infección y desarrollo de cáncer.

- 5 La invención se refiere además a un método para producir el anticuerpo, y una célula que produce el anticuerpo o su fragmento. La invención también incluye la célula hibridoma para producir el anticuerpo, y el anticuerpo producido por la célula hibridoma.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de trastornos inmunitarios mediados por linfocitos T, tales como rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad autoinmunitaria.

10 La composición farmacéutica comprende un agente inmunosupresor seleccionado del grupo que consiste en: un anticuerpo capaz de unirse al dominio 2 de ICAM-1 e inducir tolerancia de linfocito T específica a antígeno, donde el anticuerpo preferiblemente está producido por el hibridoma; y un fragmento del anticuerpo, siendo el fragmento capaz de unirse al dominio 2 de ICAM-1 e inducir tolerancia del linfocito T específica a antígeno.

15 Además, la presente invención también se refiere a un método para la prevención y/o el tratamiento de trastornos inmunitarios mediados por linfocitos T, tales como rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad autoinmunitaria y similares, que comprende administrar uno o más seleccionados del grupo que consiste en el anticuerpo o el fragmento del anticuerpo a un paciente en necesidad del mismo. El anticuerpo o el fragmento del anticuerpo preferentemente se selecciona entre el grupo que consiste en anticuerpos monoclonales, y
20 más preferentemente es de origen humano y animal.

Además, la presente invención se refiere más a un anticuerpo capaz de unirse al dominio 2 de ICAM-1 e inducir tolerancia de linfocito T específica a antígeno, donde el anticuerpo preferentemente está producido por el hibridoma, y un fragmento del anticuerpo, que es capaz de unirse al dominio 2 de ICAM-1 e inducir tolerancia del linfocito T específica a antígeno, para su uso en la prevención y/o tratamiento de trastornos inmunitarios mediados por linfocito T, tales como rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad autoinmunitaria.

25 T, tales como rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad autoinmunitaria.

Breve descripción de los dibujos

Una apreciación más completa de la invención, y muchas de sus ventajas relacionadas, serán fácilmente aparentes ya que la misma llega a ser mejor entendida por referencia a la siguiente descripción detallada cuando se considera en conjunto con el dibujo acompañante, en donde:

30 La FIG. 1 muestra una fotografía de la reactividad del anticuerpo monoclonal MD-3 sobre las células HEK293T sometidas a transfección con genes de ICAM-1 humana, ICAM-1 de ratón, y dos tipos de mutantes quiméricos (h1m2345 y h12m345) compuestos de cada dominio de ICAM-1 humana y de ratón.

La FIG. 2 muestra el nivel de expresión de diversas moléculas sobre la superficie de células dendríticas y la concentración de citoquina en los medios de cultivo de células dendríticas después del tratamiento de anticuerpos control, bloqueante, y MD-3.

35 Las FIG. 3A y 3B muestran las cinéticas de repoblación de linfocitos T humanos en sangre periférica (3A) y cada subconjunto de leucocito humano en bazo de ratón humanizado (3B).

La FIG. 4 muestra la curva de supervivencia de islotes porcinos injertados bajo la cápsula renal de ratones humanizados que recibieron anticuerpos control, bloqueante, o MD-3 antes del trasplante de islote.

40 La FIG. 5 muestra la fotografía de la tinción inmunohistoquímica para insulina, CD3 humana, y CD68 humana en riñones injertados con islote extraídos de cada ratón humanizado.

La FIG. 6 muestra los resultados resumidos del ensayo ELISPOT para evaluar la respuesta del linfocito T frente a islotes porcinos injertados, células mononucleares de sangre alogénica humana (alo-PBMC) y hemocianina de lapa californiana (KLH).

Descripción detallada

La presente invención se explica con más detalle en referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos, de ninguna manera se deberían interpretar como limitantes del alcance de la presente invención.

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal anti-ICAM-1 humana de ratón, denominado MD-3, producido por una célula de hibridoma depositada con el número de registro de KCLRF-BP-00264, fragmentos de MD-3 y una forma quimérica o humanizada de MD-3 capaz de inducir la tolerancia del linfocito T. Más particularmente, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-ICAM-1 humana producido por una célula de hibridoma depositada con el número de registro de KCLRF-BP-00264 que modula la diferenciación y la función de las células dendríticas por la unión del dominio 2 de ICAM-1 humana e induce tolerancia del linfocito T específica a antígeno más que supresión generalizada de la función inmunitaria. De ese modo, la administración de este anticuerpo podría ser eficaz en la prevención y/o el tratamiento de trastornos inmunitarios mediados por linfocitos T, tales como rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped y enfermedad autoinmunitaria, al mismo tiempo que minimice los efectos adversos por inmunosupresión, tales como infección y desarrollo de cáncer.

Además, la descripción está dirigida a un procedimiento para producir el anticuerpo o su fragmento. El procedimiento de producción del anticuerpo o su fragmento incluye la etapa de (a) inmunización de un animal con proteína ICAM-1 humana (Nº de registro Gene Bank NP_000192) o fragmentos de la proteína o una célula que expresa ICAM-1 humana, tal como las células mononucleares de sangre periférica humana activadas y/o DU 145 (ATCC HTB-81), (b) extracción de esplenocitos del animal inmunizado, (c) fusión de las células del bazo del animal con una línea celular de mieloma, y (d) cribado de las células hibridoma y selección de las células hibridoma deseadas que es capaz de modular la diferenciación y la función de las células dendríticas así como suprimir el rechazo de órganos trasplantados pero sin inhibir la interacción entre ICAM-1 y LFA-1. El anticuerpo o su fragmento se pueden obtener por cultivo *in vivo* o inyección dentro de los animales de células productoras del anticuerpo o su fragmento. El anticuerpo o su fragmento se pueden obtener de la ascitis de animales en los que las células productoras del anticuerpo o su fragmento se inyectan intraperitonealmente. El anticuerpo o su fragmento se pueden purificar del sobrenadante de cultivo o ascitis por cromatografía de intercambio iónico o cromatografía en columna por afinidad.

La invención también proporciona la célula hibridoma que produce el anticuerpo MD-3, que es la célula del número de recibo de KCLRF-BP-00264.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de trastornos inmunitarios mediados por linfocito T, tales como rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad autoinmunitaria.

La composición farmacéutica puede comprender un agente inmunosupresor seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal anti-ICAM-1 humana, denominado MD-3 (producido por una célula hibridoma de número de recibo de KCLRF-BP-00264), fragmentos de MD-3, o una forma quimérica o humanizada de MD-3. La administración del anticuerpo o su fragmento según la invención se puede llevar a cabo usando cualquiera de los modos aceptados de administración de composiciones farmacéuticas.

Además, la presente invención también se refiere a un procedimiento para la prevención y/o tratamiento de trastornos inmunitarios mediados por linfocito T, tales como rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad autoinmunitaria, que comprende la etapa de administrar a un paciente que lo necesite uno o más seleccionados entre el grupo que consiste en el anticuerpo (por ejemplo, MD-3) o sus fragmentos. Preferentemente, el anticuerpo o su fragmento se pueden seleccionar del grupo que consiste en anticuerpos monoclonales, y más preferentemente es de origen humano y animal. El procedimiento puede comprender además la etapa de identificación del paciente que necesite el tratamiento y/o prevención de los trastornos inmunitarios mediados por célula T, tales como rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad autoinmunitaria y similares, antes de la etapa de administración.

En otra realización, la presente invención proporciona el anticuerpo (por ejemplo, MD-3) o sus fragmentos para su uso en el tratamiento y/o prevención de los trastornos inmunitarios mediados por linfocito T, tales como rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad autoinmunitaria y enfermedades similares; o en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de los trastornos inmunitarios mediados por linfocitos T, tales como rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad autoinmunitaria.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo que tiene regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo donante y región estructural (framework) variable y regiones constantes de un anticuerpo humano. Por tanto, generalmente un anticuerpo humanizado comprende (i) una cadena ligera que comprende tres CDR de un anticuerpo de ratón, por ejemplo, MD-3, una región estructural variable de un anticuerpo humano, y una región constante humana, y (ii) una cadena pesada que comprende tres CDR de un anticuerpo de ratón, por ejemplo, MD-3, una región estructural variable de un anticuerpo humano y una región constante humana.

Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo en el que la región variable de un anticuerpo de ratón (u otro roedor) se combina con la región constante de un anticuerpo humano; su construcción por medio de ingeniería genética es bien conocida. Tales anticuerpos retienen la especificidad de unión del anticuerpo de ratón, mientras que sean aproximadamente dos tercios humano. La proporción de secuencia no humana presente en anticuerpos de ratón, quiméricos y humanizados sugiere que la inmunogenicidad de los anticuerpos quiméricos es intermedia entre los anticuerpos de ratón y los humanizados.

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) pueden ser de origen animal (por ejemplo, ratón, rata, hámster o pollo), o pueden ser producidos por ingeniería genética. Los mAbs de roedor están hechos por métodos estándar bien conocidos en la técnica, que comprenden inmunización múltiple con ICAM-1 en adyuvante apropiado intraperitonealmente, *in vivo*, o en la almohadilla, seguido de extracción de células del bazo o del nódulo linfóide y fusión con una línea celular adecuadamente inmortalizada y, a continuación, selección de hibridomas que producen unión de anticuerpo a ICAM-1, por ejemplo, véase abajo los Ejemplos. Los mAbs quiméricos y humanizados son realizaciones preferidas de la invención.

Los anticuerpos monoclonales nativos (mAbs) de la invención se pueden producir a partir de sus hibridomas. Los mAbs producidos por ingeniería genética, por ejemplo, mAbs quiméricos o humanizados, se pueden expresar por una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los genes que codifican sus regiones V de cadena

ligera y pesada se pueden sintetizar a partir de oligonucleótidos de superposición y se insertan juntos con regiones C disponibles en los vectores de expresión (por ejemplo, comercialmente disponible en Invitrogen) que proporcionan las regiones reguladoras necesarias, por ejemplo, promotores, potenciadores, sitios poli A, etc. Se prefiere el uso del promotor-potenciador de CMV. A continuación, los vectores de expresión se pueden someter a transfección usando diversos métodos bien conocidos tales como lipofección o electroporación en una diversidad de líneas celulares de mamífero tales como CHO o mielomas no productores que incluyen Sp2/0 y NS0, y las células que expresan los anticuerpos se seleccionaron por selección antibiótica apropiada.

Una vez expresado, los mAbs u otros anticuerpos de la invención se pueden purificar según procedimientos estándar de la técnica tales como microfiltración, ultrafiltración, cromatografía de afinidad a proteína A o G, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico y/o otras formas de cromatografía de afinidad basadas en tintes orgánicos.

Los anticuerpos básicamente puros de al menos aproximadamente 90 o 95 % de homogeneidad son preferidos, y lo más preferido 98 % o 99 % o más de homogeneidad, para usos farmacéuticos.

En una realización preferida, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende los anticuerpos descritos en el presente documento. Es decir, los anticuerpos se pueden usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad. Las composiciones farmacéuticas (es decir, los medicamentos) de los anticuerpos contienen el mAb en un vehículo fisiológicamente aceptable, opcionalmente con excipientes o estabilizadores, en la forma de soluciones liofilizadas o acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos a los destinatarios en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, o acetato a un pH generalmente de 5,0 a 8,0, lo más frecuente de 6,0 a 7,0; sales tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, etc. para hacerlos isotónicos; antioxidantes, conservantes, polipéptidos de bajo peso molecular, proteínas, polímeros hidrófilos tales como polisorbato 80, aminoácidos, carbohidratos, agentes quelantes, azúcares y otros ingredientes estándar conocidos por los expertos en la técnica.

El mAb generalmente está presente a una concentración de 1 a 100 mg/ml, por ejemplo, 10 mg/ml.

Los anticuerpos de la invención generalmente son básicamente puros de contaminantes indeseados. Esto significa que el anticuerpo generalmente es al menos aproximadamente 50 % p/p (peso/peso) puro, así como que está básicamente libre de proteínas y contaminantes que interfieran. Preferentemente los anticuerpos son al menos 90, 95 % o 99 % p/p puros.

En otra realización preferida, la invención proporciona un método de tratamiento de un paciente con una enfermedad que usa un mAb anti-ICAM-1 en una formulación farmacéutica. El mAb preparado en una formulación farmacéutica se puede administrar a un paciente por cualquier ruta adecuada, especialmente parentalmente por infusión intravenosa o inyección por bolo, intramuscularmente o subcutáneamente. La infusión intravenosa se puede dar durante tan poco como 15 minutos, pero más frecuente durante 30 minutos, o durante 1, 2 o incluso 3 horas. El mAb también se puede inyectar directamente en el sitio de la enfermedad (por ejemplo, un tumor), o encapsulado en agentes portadores tales como liposomas. La dosis dada será suficiente para aliviar la afección a tratar ("dosis terapéuticamente eficaz") y es probable que sea de 0,1 a 5 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 mg/kg, pero puede ser tan alta como 10 mg/kg o incluso 15 o 20 mg/kg. También se puede dar una dosis única fijada, por ejemplo, 50, 100, 200, 500 o 1.000 mg, o la dosis puede estar basada en el área superficial del paciente, por ejemplo, 100 mg/m².

El mAb se puede administrar diariamente, semanalmente, bisemanalmente, cada dos semanas, mensualmente o en algún otro intervalo, dependiendo, por ejemplo, de la semivida del mAb, durante 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 8 semanas, 3-6 meses o más. También son posibles regímenes repetidos del tratamiento, ya que es administración crónica. Un régimen de una dosificación e intervalos de administración que alivia o al menos detiene parcialmente los síntomas de la enfermedad (bioquímicos, histológicos y/o clínicos), incluyendo sus complicaciones y fenotipos patológicos intermedios en el desarrollo de la enfermedad, se refiere a un régimen terapéuticamente eficaz.

La presente invención se explica más a más detalle en referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos, de ninguna manera deberían interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

El aislamiento de células hibridoma capaces de producir anticuerpos monoclonales anti-ICAM-1 humana

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana de voluntarios sanos por centrifugación por gradiente de densidad en Ficoll-Paque (GE Healthcare). Para producir proteínas ICAM-1/Fc, se extrajeron ARNs de células mononucleares de sangre periférica humana activadas con fitohemaglutinina (PHA) y los fragmentos de ADNc que corresponden a los dominios extracelulares de ICAM-1 humana se amplificaron con la introducción de los sitios *NheI* y *EcoRI* en los extremos 5' y 3', respectivamente, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores que sigue: cebador 5' GCT AGC GCA ACC TCA GCC TCG CTA TGG CTC (SEQ ID NO: 1); cebador 3', GAA TTC ATC TCA TAC CGG GGG GAG AGC AC (SEQ ID NO: 2). Para formar la construcción de fusión de ICAM-1 humana e IgG Fc humano, este fragmento se ligó en el plásmido pSecTag (Invitrogen) digerido por

EcoRI y *XhoI* que contiene región IgG1 Fc humana. Las células HEK293 (ATCC CRL-1573) transitoriamente se sometieron a transfección con los plásmidos, y se purificaron proteínas ICAM-1/Fc de los sobrenadantes de cultivo usando columna con proteína G.

5 Se inmunizaron intraperitonealmente ratones Balb/c (Hembras, 6~8 semanas, 17~25 g, KOATECH, Corea) con 100 µg de proteínas ICAM-1/Fc emulsionadas en adyuvante de Freund completo y, a continuación, posteriormente se sometieron dos veces a inmunizaciones con 100 µg de proteínas ICAM-1/Fc emulsionadas en adyuvante Freund incompleto en intervalos de dos semanas. Dos semanas después, los ratones inmunizados se estimularon con 100 µg de proteínas ICAM-1/Fc. Se extrajo el bazo de los ratones Balb/c 3 días después de la última administración para preparar la suspensión celular de bazo. Los anticuerpos monoclonales se produjeron fusionando las células del bazo de Balb/c inmunizadas con ICAM-1/Fc humana con células de mieloma de ratón SP2/0-Ag14 (ATCC CRL-1581) resistentes a 9-azaguanina. El procedimiento de fusión celular seguido del método de Koeler y Milstein (Koeler & Milstein *Nature*, 1975, 256, 495-497). 10⁸ células de bazo se fusionaron con 10⁷ células de mieloma usando polietilenglicol 4000 (Roche) al 50 %. Las células se lavaron y se resuspendieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía suero bovino fetal (FBS) al 20 %, hipoxantina 100 µM, aminopterinina 0,44 µM y timidina 16 µM (medios HAT; Sigma). Se introdujeron las células en cuatro placas de 96 pocillos y se cultivaron a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 %.

20 Cuando se formaron las colonias después de dos semanas, el sobrenadante se cribó usando células HEK 293T sometidas a transfección con ICAM-1 humanas. Tanto las células HEK 293T sometidas a transfección con ICAM-1 como las tipo natural se tiñeron con sobrenadante de cultivo y se seleccionaron células productoras de sobrenadante reactivo frente a células 293T sometidas a transfección con ICAM-1 pero no células 293T de tipo natural. Las células tomadas de los pocillos positivos se subclonaron 0,5 células por pocillo por ensayo de dilución limitante ("Anticuerpos: A Laboratory Manual". Editado por ED HARLOW y DAVID LANE; Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory. Nueva York. 1988) para producir clon de hibridoma estable con alta reactividad de anticuerpo.

25 Una línea celular hibridoma obtenida de este experimento producía anticuerpo IgG1 que se une a tanto antígenos humanos como de mono y se le dio el nombre de MD-3. El hibridoma denominado MD-3 se depositó en "Korean Cell Line Research Foundation (KCLRF) localizada en "Cancer Research Institute Seoul National University", College of Medicine, 28 Yongon-dong, ChongnoGu, Seúl, 110-744, República de Corea, el 4 de mayo de 2011, y se recibió con un número registro de KCLRF-BP-00264.

30 Ejemplo 2

Mapeo del dominio de unión a MD-3 de ICAM-1 humana

ICAM-1 tiene una estructura compuesta de cinco dominios similares a inmunoglobulinas (similar a Ig), un dominio de transmembrana y un dominio citoplasmático (*Cell*. 1992, 68:71-81). Para localizar el sitio de unión de MD-3 a un dominio particular similar a Ig de ICAM-1, se realizaron dos tipos de ADNcs quiméricos que codificaban el dominio 1 humano/dominios 2-5 murinos incluyendo dominios de transmembrana y citoplasmáticos murinos (h1m2345) y los dominios 1-2 humanos/dominios 3-5 murinos (h12m345), usando clones de ADNc de ICAM-1 humanos y murinos. Se usó la tecnología de PCR de superposición para construir tres mutantes quiméricos. El ADNc que contiene el dominio humano 1 (h1) se amplificó primero usando los cebadores que siguen: cebador 5' GAA TTC ATG GCT CCC AGC AGC CCC CGG CCC GCG CT (SEQ ID NO: 3); cebador 3' AGG TCT CAG CTC CAC CCG TTC TGG AGT CCA GTA CAC GGT GAG GAA G (SEQ ID NO: 4). Los cebadores para la generación de dominios 2-5 murinos, un dominio de transmembrana y un dominio citoplasmático (m2345) eran como sigue: cebador 5' CTG GAC TCC AGA ACG G GTG GAG CTG AGA CCT CTG CCA GCC TGG CAG (SEQ ID NO: 5); cebador 3' GGA TCC GGG AGG TGG GGC TTG TCC CTT GAG TTT TAT GGC (SEQ ID NO: 6). Estos dos tipos de ADNc se mezclaron y volvieron a amplificar usando cebadores SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 6 y el producto final (h1m2345) se clonó en el vector pcDNA3.1. El mutante que codifica h12m345 también se clonó de un modo similar al de para h1m2345 usando los siguiente cebadores: cebador 5' para h12, GAA TTC ATG GCT CCC AGC AGC CCC CGG CCC GCG CT (SEQ ID NO: 7); cebador 3' para h12, GGT AGC TGG AAG ATC AAA GGT CTG GAG CTG GTA GGG GGC CGA GGT (SEQ ID NO: 8); cebador 5' para m345, CAG CTC CAG ACC TTT GAT CTT CCA GCT ACC ATC CCA AAG CTC GAC ACC (SEQ ID NO: 9); cebador 3' para m345, GGA TCC GGG AGG TGG GGC TTG TCC CTT GAG TTT TAT GGC (SEQ ID NO: 10).

La construcción entera se secuenció para confirmar que se habían obtenido las uniones corregidas y a continuación el ADN plásmido se sometió a transfección a células HEK293T usando el procedimiento de precipitación de fosfato de calcio. Después de la incubación de las células HEK293T con coprecipitados de fosfato de calcio y ADN plásmido durante 16-20 horas, los medios se reemplazaron con 10 ml de solución fresca y las células se incubaron durante otras 24 horas. A continuación, el transfectante se tiñó con anticuerpo MD-3 en hielo. Después de la incubación durante 30 min, las células se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con suero de ternera fetal al 5 % y ácida al 0,1 % y se incubaron durante 30 min con anticuerpo anti-Ig de ratón de cabra conjugado con FITC (2^o Ab). Después de unos tres lavados adicionales, se realizó análisis citométrico de flujo para ensayar su capacidad de reaccionar con cada anticuerpo (FIG. 1). Como control negativo, solamente se usaron las células sometidas a transfección con vector. Tal como se muestra en la FIG. 1, se tiñó positivamente el transfectante

de ICAM-1 humano completo con anticuerpo MD-3, mientras que no era reactivo con el transfectante de ICAM-1 de ratón completo, indicando que el anticuerpo MD-3 no es de reacción cruzada con ICAM-1 de ratón. En el caso de mutantes quiméricos, el anticuerpo MD-3 reaccionó solamente con el mutante que contiene el dominio 2 de ICAM-1 humana (h12m345), indicando que el anticuerpo MD-3 es específico para el epítipo sobre el dominio 2.

5 Ejemplo 3

Efecto inhibitor del anticuerpo MD-3 en la diferenciación de células dendríticas derivadas de monocito

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica de la sangre del donante sano por centrifugación por gradiente de densidad Ficoll-hypaque. Después de lavar dos veces con PBS, las células se resuspendieron en tampón MACS (Milteny-Biotech) a la concentración de 1×10^8 células/ml y, a continuación, se incubaron con perla magnética con anti-CD14 (20 μ l/ 10^7 células; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) en hielo durante 15 minutos, seguido de separación magnética usando MACS (Milteny-Biotech). Monocitos CD14⁺ purificados se resuspendieron en RPMI (Invitrogen) con FBS al 10 % (v/v) y se cultivaron durante 6 días con factor estimulante de colonia de granulocitos-macrófago (GM-CSF, 1.000 U/ml) y IL-4 (1.000 U/ml). El cultivo se complementó con MD-3 o se añadió anticuerpo control emparejado con isotipo (10 mg/ml) el día 0 y día 3 y LPS al medio de cultivo el día 6. Un día después, las células cultivadas se recogieron y se valoró la expresión de MHC clase I, MHC clase II, CD80, CD86 y CD40 como la intensidad media de fluorescencia (MFI) por citometría de flujo (FIG. 2a). También se realizó ELISA para medir la cantidad de IL-12p70, IL-6, IFN- γ y TNF- α en los medios de cultivo (FIG 2b). Cuando se cultivaron monocitos CD14⁺ en presencia de GM-CSF y IL-4, son capaces de diferenciarse en las DC inmaduras y el tratamiento por LPS induce la maduración de DC inmaduras, dando como resultado la regulación al alza de la expresión de superficie de MHC y moléculas coestimuladoras y producción de citoquina. Sin embargo, el pretratamiento del anticuerpo MD-3 antes de la estimulación por LPS suprimió significativamente la regulación al alza de la expresión de molécula de superficie y producción de citoquina en las DC, aunque no era el caso en las DC tratadas con anticuerpo bloqueante (FIG. 5). Por tanto, estos resultados indican que el anticuerpo MD-3 es capaz de inhibir la maduración de las DC derivadas de monocito.

25 Ejemplo 4

Generación de ratones humanizados

Para investigar el efecto *in vivo* de anticuerpos anti-ICAM-1, se generaron ratones humanizados por injerto de células madres hematopoyéticas humanas en ratones inmunodeficientes según el procedimiento por Ito, M. y col., *Blood*. 2002, 100:3.175-82.

Se recogieron células sanguíneas del cordón umbilical durante partos a término normales y se separaron las células mononucleares por centrifugación Ficoll-hypaque. Las células mononucleares separadas se suspendieron a $3,3 \times 10^8$ células/ml en PBS que contenía FBS al 5 % y EDTA 2 mM y se incubaron en hielo durante 30 minutos con anticuerpo bloqueante de Fc (Milteny-Biotech), seguido de incubación en hielo durante 30 minutos con perlas magnéticas con anti-CD34 (Milteny-Biotech). Después de dos lavados, las células acopladas a perla se recogieron por separación magnética usando MACS. Después de dos rondas de separación magnética, la pureza se evaluó por citometría de flujo y no menos del 95 % de las células recogidas eran CD34⁺. Ratones NOD.SCID/ γ c^{null} ("Central Institute for Experimental Animals", Japón) se irradiaron con 240 cGy usando fuente de radiación de cobalto y 1 día después 1×10^5 células CD34⁺ se inyectaron en cada ratón a través de la vena del rabo. La sangre periférica se tomó del plexo venoso retro-orbital secuencialmente entre las semanas 4 y 20 después de trasplante y se tiñó con anticuerpos anti-CD45 humanos y anti-CD3 humanos (BD Biosciences) para la citometría de flujo. La FIG. 3A muestra las cinéticas de linfocitos T CD3⁺ humanos que repueblan la sangre periférica de los ratones en las semanas indicadas después del trasplante celular. Los linfocitos T humanos aparecieron 8 semanas después del trasplante celular de sangre de cordón y, a continuación, se incrementaron rápidamente. Además, los linfocitos T CD4⁺ humanos, linfocitos T CD8⁺, linfocitos B CD19⁺, monocitos CD14⁺ DC convencionales con CD11c⁺ y DC plasmocitoide con CD123⁺ se identificaron en los bazos de ratones humanizados (FIG. 3B).

Ejemplo 5

Supresión del rechazo de trasplante por administración *in vivo* de anticuerpo MD-3 en modelo de injerto de islote porcino

Para demostrar el efecto del anticuerpo MD-3 en suprimir el rechazo de trasplante, se usó el modelo de xenoinjerto de islote. Para obtener islotes pancreáticos porcinos, se realizó una pancreatectomía total sin tiempo de isquemia suave, y el aislamiento del islote se realizó usando el método de Ricordi modificado, como previamente se ha descrito (*Cell Transplant*, 2010, 19:299-311). Los islotes purificados se cultivaron durante la noche en Medio 199 (Gibco, BRL, Life Technologies Ltd, Paisley, Escocia, GB) complementado con suero porcino al 10 %, nicotinamida 10 nM (Sigma) y penicilina-estreptomina al 1 % a 37 °C y, a continuación, bajo la cápsula renal de ratones humanizados. Se tomó una muestra de sangre periférica semanalmente de los senos retro-orbitales para controlar los niveles de glucosa en sangre usando un glucómetro portátil (Accu-Chek, Roche Diagnostics, Seúl, Corea del Sur), y se determinaron los niveles de péptido C porcino en suero por radioinmunoensayo (Linco, St Charles, MO, EEUU). Se definió un injerto con éxito como péptido C porcino >0,5 ng/ml. El rechazo de injerto se definió cuando el

primer día de péptido C<0,1 ng/ml y se confirmó por análisis histológico de los injertos. En el grupo control, el tiempo medio de supervivencia de injerto era de 21 días, y la administración del anticuerpo bloqueante anti-ICAM-1, R6-5-D6, prolongó el tiempo de supervivencia media hasta 40 días (FIG. 4). Sin embargo, los islotes injertados finalmente fueron rechazados en ambos grupos. Por el contrario, ratones tratados con MD-3 no mostraron evidencia de rechazo de injerto a través del periodo de seguimiento.

Los ratones se sacrificaron a los 42 días después del trasplante del islote o cuando mostraron una afección mórbida, y se analizó histológicamente el espécimen de nefrectomía para la evidencia de rechazo de injerto. El espécimen de nefrectomía de cada ratón se fijó en formalina neural al 10 %, se incrustó en parafina y, a continuación, se seccionó en serie en grosor de 4 µm. Para la inmunohistoquímica, se quitó la cera de las secciones de tejido en xileno, se rehidrataron usando una serie de alcohol graduado, y se incubaron en una solución bloqueante de peróxido endógeno durante 5 minutos. La recuperación de antígeno se realizó incubando las secciones en tampón de citrato 6 mM a 99 °C durante 20 minutos usando el sistema Leica Bond Max (Leica, Wetzlar, Alemania), y se previno la tinción no específica tratando las secciones de tejido con suero de conejo (PBS al 1 %) durante 30 minutos. Anticuerpos Anti-insulina humana (DAKO, Carpintería, CA, EEUU), CD3 (F7.2.38; DAKO), CD20 (L26; DAKO) y CD68 (PG-M1; DAKO) se aplicaron durante 30 minutos, y se detectó la unión a anticuerpo usando un kit ABC Elite VECTASTAIN (PK6101; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Tal como se puede ver en la FIG. 5, células de islote positivas en insulina se destruyeron completamente y se reemplazaron por infiltrados predominantes de linfocitos T CD3⁺ y macrófagos CD68⁺ en el grupo control. En el grupo tratado MD-3, sin embargo, claramente se vieron grandes nidos de células de islote positivas en insulina con infiltración insignificante de células mononucleares en el área periférica del islote.

Para abordar si la falta de una respuesta inmunitaria en ratones tratados con MD-3 era o bien tolerancia específica a antígeno o inmunosupresión generalizada, los inventores compararon los números de linfocitos T específicos a islote injertado y alo-específicos en estos ratones. Para esto, las frecuencias de linfocitos T específicos a antígeno secretores de IL-2 o IFN-γ en bazos de ratones humanizados se midieron usando un kit de ELISPOT adquirido en Mabtech (Nacka Strand, Suiza). Las placas revestidas con anticuerpo de captura Anti-IL-2 o IFN-γ se lavaron cuatro veces con solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS; 200 µl/pocillo) y se bloquearon durante 30 minutos con medios RPMI1640 complementados con suero humano al 10 % a temperatura ambiente. Después de separar los medios, se cultivaron 3x10⁵ esplenocitos de los ratones humanizados con 5x10⁴ células de islote porcinos en medios RPMI1640 complementados con suero humano al 10 % durante 40 h a 37 °C en una incubadora de CO₂ al 5 %. Para evaluar la tolerancia del linfocito T específica a antígeno, también se usaron como estimuladores hemocianina de lapa californiana (KLH; 0,1 mg/ml) o células mononucleares de sangre periférica humana irradiadas con γ y mermadas de linfocito T (PBMC; 7x10⁵/pocillo) reunidas de tres voluntarios. Como control negativo (CN), los esplenocitos de ratones humanizados que no se sometieron a trasplante de islote se estimularon con islotes porcinos y se usaron para respuesta anti-islote. Por el contrario, se usaron esplenocitos de ratones injertados cultivados en ausencia de antígeno estimulante para respuestas anti-alo-PBMC y anti-KLH. Después de cultivo durante 40 horas, se separaron las células, y las placas se lavaron cinco veces con PBS (200 µl/pocillo). A continuación, se añadieron anticuerpo de detección conjugado con fosfatasa alcalina diluido a 1:200 o 1:1.000 para IL-2 o IFN-γ, respectivamente, en 100 µl de PBS que contenía suero bovino fetal al 0,5 % y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cinco veces con PBS y se añadieron 100 µl de sustrato BCIP/NBP. El desarrollo de color se paró lavando con agua corriente. Las manchas resultantes se contaron en un Sistema Lector de EliSpot de AID asistido por ordenador (AID, Strassberg, Alemania). Cuando los esplenocitos totales de los ratones control se estimularon con islotes porcinos, se detectaron números significantes de linfocitos T secretores de IL-2 y IFN-γ (FIG.6, izquierda). Por el contrario, no se detectaron linfocitos T secretores de IL-2 y IFN-γ en ratones tratados con MD-3, indicando la supresión completa de respuestas de linfocito T a antígenos de xenoinjerto. En este sistema, sin embargo, la respuesta de los linfocitos T a alo-PBMC humanas era comparable a la de los controles (FIG. 6, mitad). Estos datos sugieren que la no capacidad de respuesta de los linfocitos T reflejó la inducción de tolerancia, específica para antígenos de islote porcinos. Esta inducción de tolerancia de linfocito T específica a antígeno se evidenció además por un reto *in vivo* con antígenos no relacionados. El día 28 después del trasplante, cuando se quitó completamente MD-3, los ratones se inmunizaron con antígeno KLH soluble. Dos semanas después, se evaluaron los números de linfocitos T específicos a KLH en un ensayo ELISPOT. Tal como se muestra en la FIG. 6 (derecha), las células T obtenidas de los ratones tratados con MD-3 mostraron fuerte respuesta frente a KLH en términos de números de células productoras de IFN-γ y IL-2. Estos datos sugieren que la administración de MD-3 indujo la tolerancia del linfocito T específica frente a antígenos de islote de injerto.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DiNonA Inc. SNU R&DB FOUNDATION

U

<120> UN ANTICUERPO QUE INDUCE TOLERANCIA DE LINFOCITOS T ESPECÍFICA DE ANTÍGENO Y SU USO

<160> 10

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

ES 2 602 781 T3

<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Cebador 5' para amplificar los dominios extracelulares de ICAM-1 humana

<400> 1
gctagcgcaa cctcagcctc gctatggctc 30

10 <210> 2
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Cebador 3' para amplificar los dominios extracelulares de ICAM-1 humana

<400> 2
gaattcatct cataccgggg ggagagcac 29

20 <210> 3
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Cebador 5' para amplificar el dominio1 (h1) de ICAM-1 humana

30 <400> 3
gaattcatgg ctcccagcag cccccggccc gcgct 35

<210> 4
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Cebador 3' para amplificar el dominio 1 (h1) de ICAM-1 humana

40 <400> 4
aggctcagc tccaccggtt ctggagtcca gtacacggtg aggaag 46

45 <210> 5
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Cebador 5' para amplificar los dominios 2-5 de ICAM1 murina, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático (m2345)

<400> 5
ctggactcca gaacgggtgg agctgagacc tctgccagcc tggcag 46

55 <210> 6
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> Cebador 3' para amplificar los dominios 2-5 de ICAM-1 murina, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático (m2345)

65 <400>6
ggatccggga ggtggggctt gtccttgag ttttatggc 39

ES 2 602 781 T3

<210> 7
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5
<220>
<223> Cebador 5' para amplificar los dominios 1-2 (h12) de ICAM-1 humana
<400> 7
10 gaattcatgg ctcccagcag cccccggccc gcgct 35
<210> 8
<211> 45
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador 3' para amplificar los dominios 1-2 (h12) de ICAM-1 humana
20 <400> 8
ggtagctgga agatcaaagg tctggagctg gtagggggcc gaggt 45
<210> 9
<211> 48
25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador 5' para amplificar los dominios 3-5 (m345) de ICAM-1 humana
30 <400> 9
cagctccaga ccttgatct tccagctacc atcccaaagc tcgacacc 48
<210> 10
<211> 39
35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
40 <223> Cebador 3' para amplificar los dominios 3-5 (m345) de ICAM-1 humana
<400> 10
ggatccggga ggtggggctt gtccttgag ttttatggc 39

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal denominado MD-3 producido por la célula hibridoma depositada como número de acceso de KCLRF-BP-00264.
- 5 2. Un anticuerpo monoclonal que se une a la ICAM-1 humana que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, comprendiendo la cadena pesada tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal denominado MD-3 producido por el hibridoma depositado como número de acceso de KCLRF-BP-00264 y comprendiendo la cadena ligera tres CDR de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal denominado MD-3 producido por el hibridoma depositado como número de acceso de KCLRF-BP-00264.
- 10 3. El anticuerpo según la reivindicación 2, en la que el anticuerpo es quimérico o humanizado.
4. Una célula hibridoma depositada como número de acceso de KCLRF-BP-00264.
5. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
6. La composición farmacéutica según la reivindicación 5, en la que el anticuerpo monoclonal está en forma aislada.
- 15 7. Un anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en la prevención o el tratamiento de un trastorno inmunitario mediado por linfocitos T en el que el trastorno inmunitario mediado por linfocitos T es rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped o enfermedad autoinmunitaria.

FIG 1

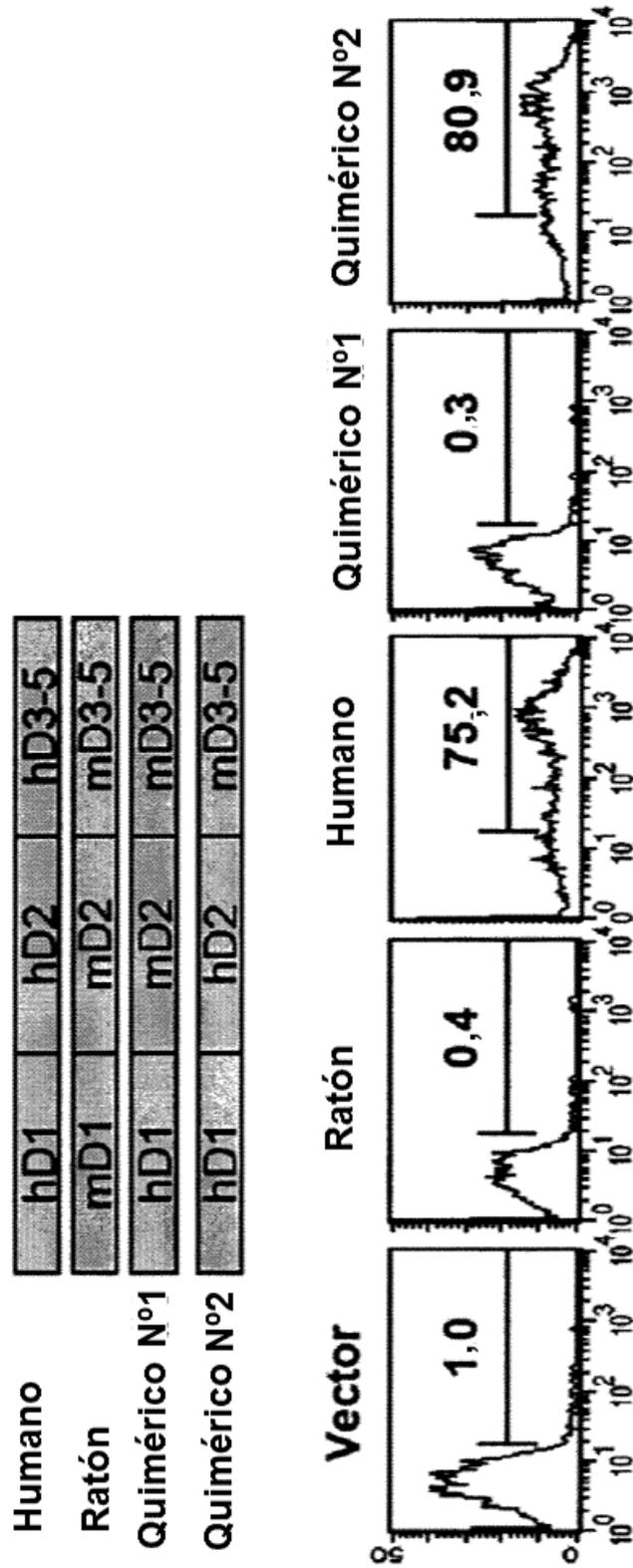


FIG. 2

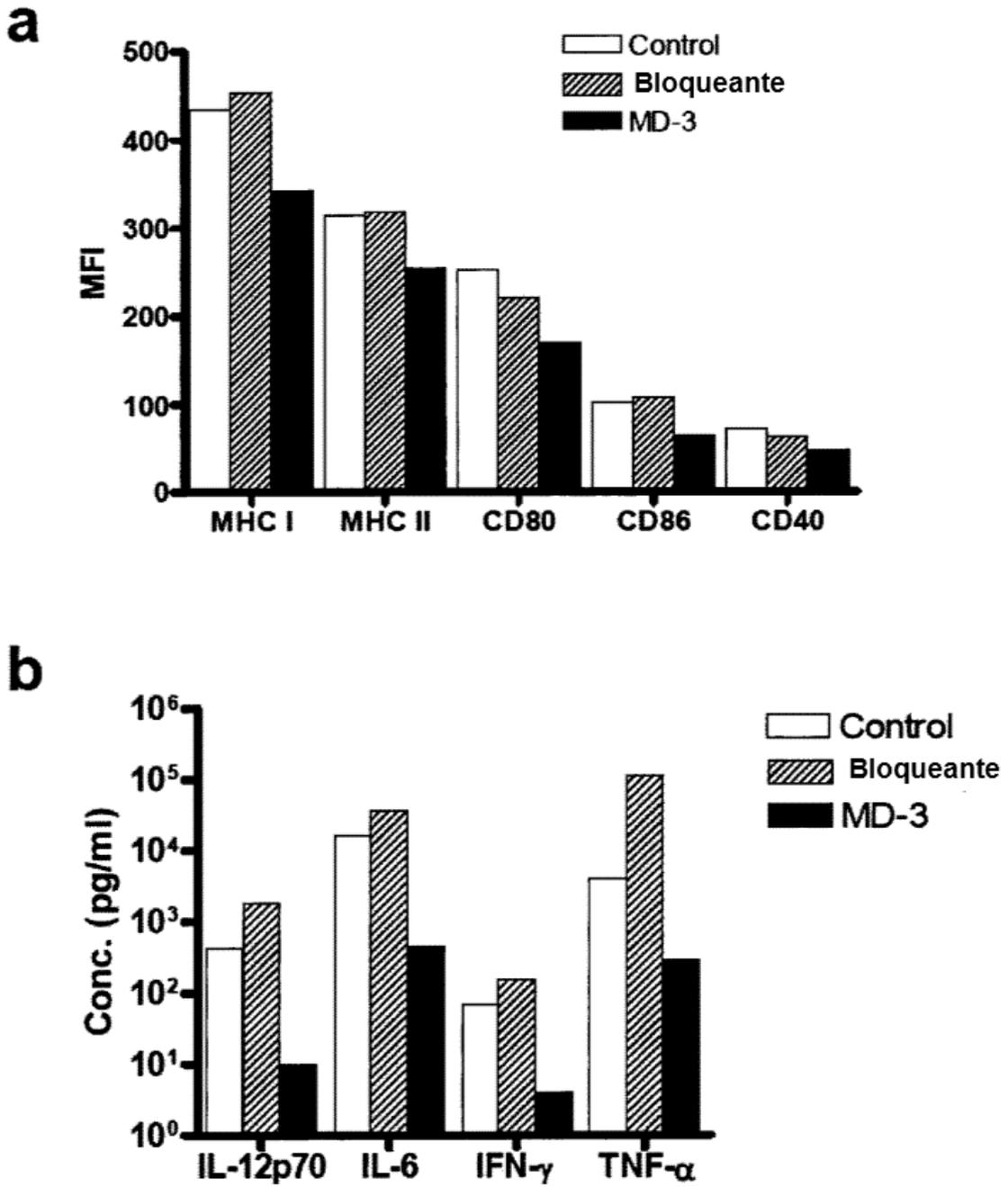


FIG. 3A

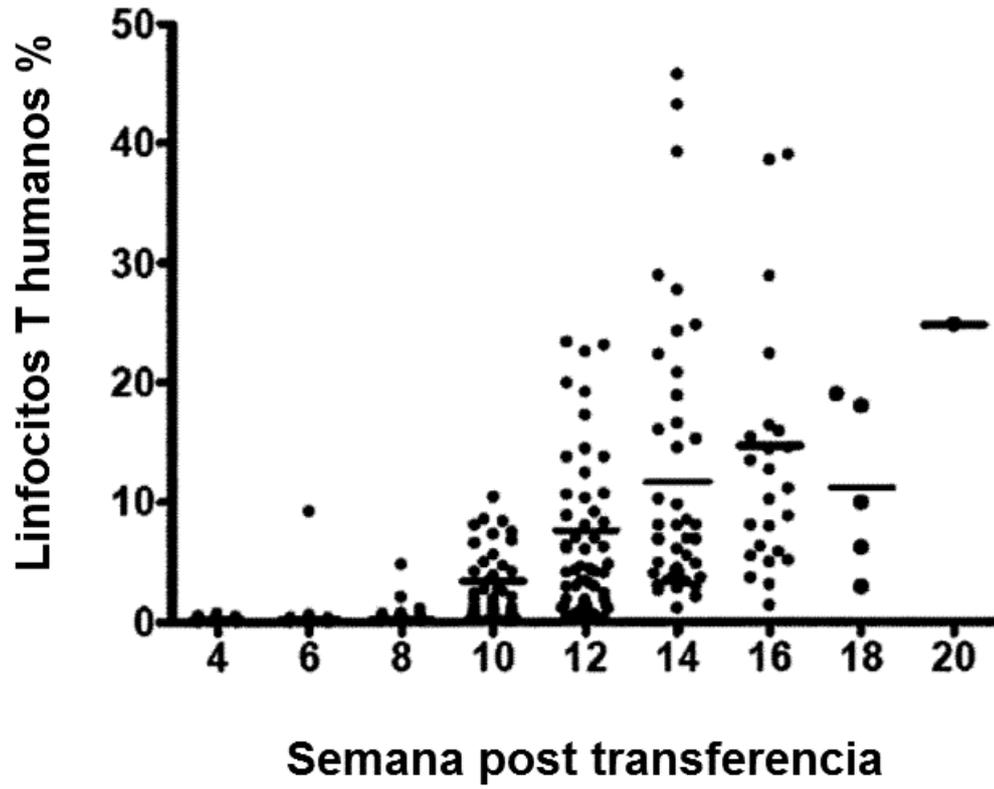


FIG. 3B

Células totales en bazo

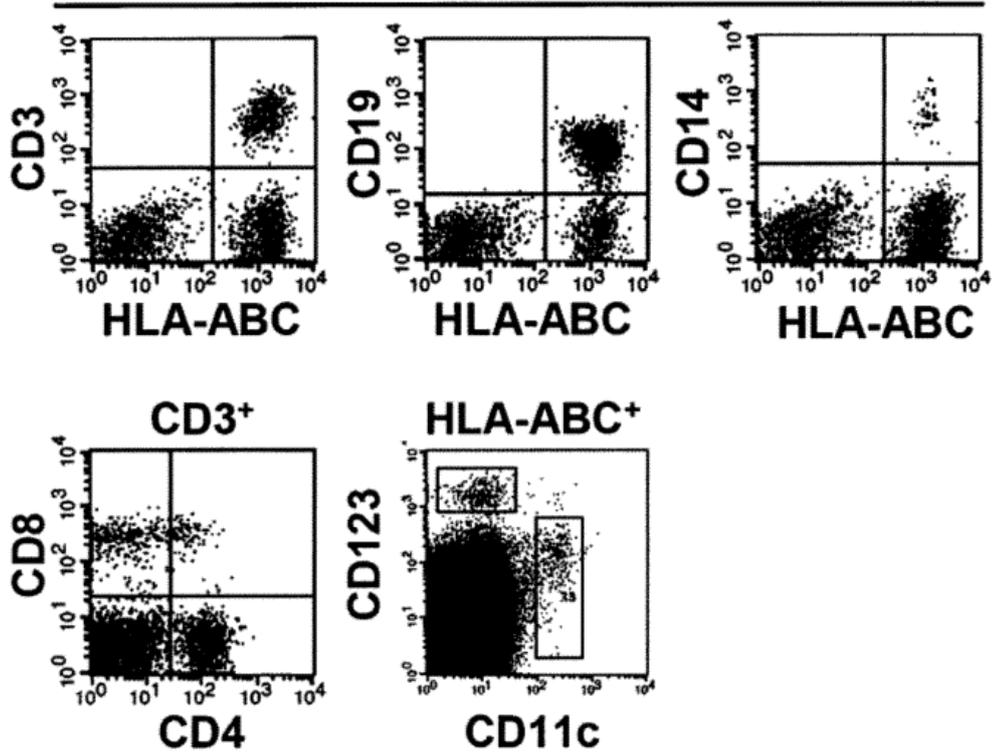


FIG. 4

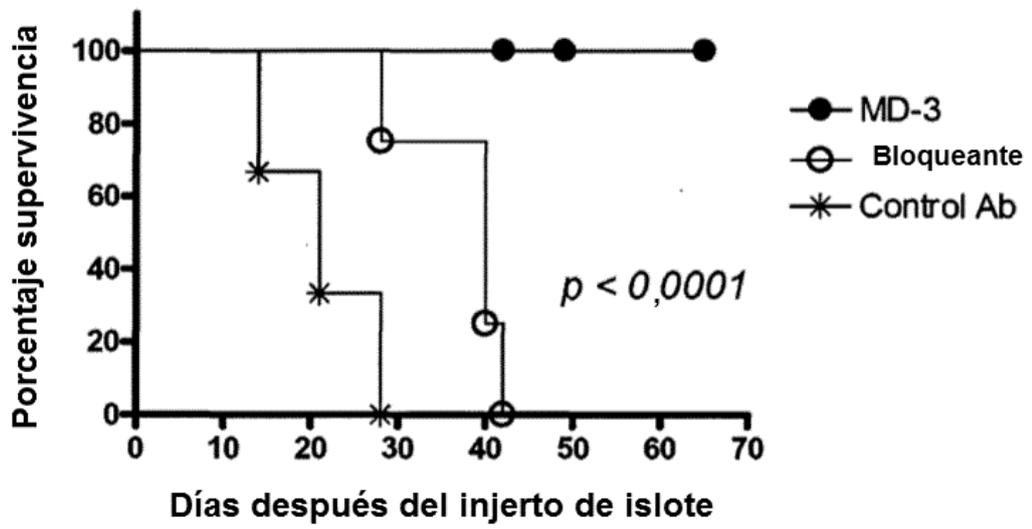


FIG. 5

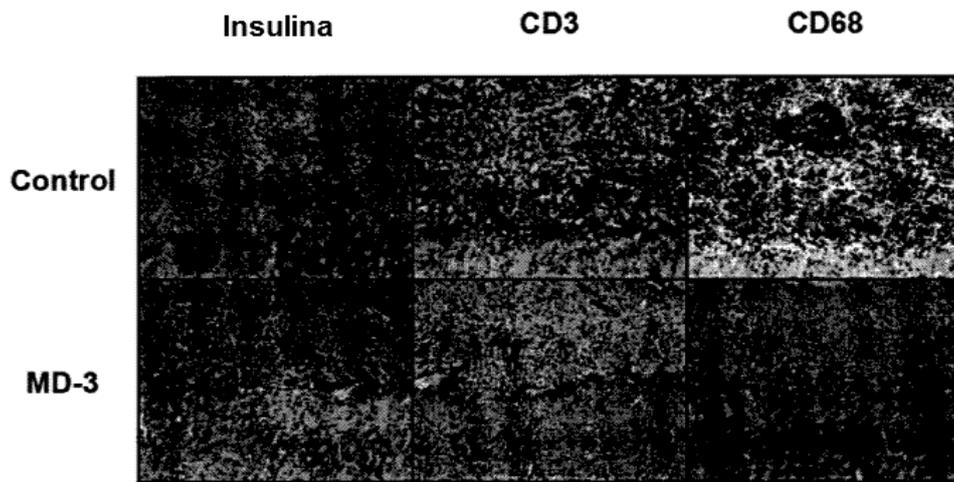


FIG. 6

