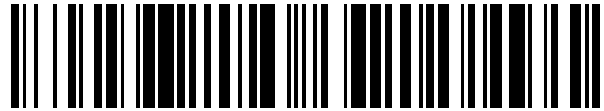


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 652**

51 Int. Cl.:

A61P 37/04 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2010 PCT/GB2010/000351**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.09.2010 WO10097597**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2010 E 10706034 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2401035**

54 Título: **Anticuerpos específicamente dirigidos a la forma soluble de CTLA-4**

30 Prioridad:

26.02.2009 GB 0903325

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

09.04.2018

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY
OF ABERDEEN (100.0%)
Regent Walk
Aberdeen AB24 3FX, GB**

72 Inventor/es:

**WARD, FRANK JAMES;
BARKER, ROBERT NORMAN y
DAHAL, LEKH NATH**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 662 652 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos específicamente dirigidos a la forma soluble de CTLA-4

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a moléculas de anticuerpo, que incluyen anticuerpos y partes funcionales de los mismos, dirigidos específicamente a la forma soluble humana del antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y a los métodos y materiales relacionados con los mismos.

10

Antecedentes de la técnica

La capacidad de modular la respuesta inmune adaptativa en pacientes ofrece la posibilidad de poderosas terapias dirigidas con una seguridad mejorada en comparación con los fármacos convencionales actualmente disponibles. Los métodos destinados a reforzar o suprimir las respuestas de las células T podrían explotarse con éxito como terapias en un número de enfermedades. Esto se debe a que las células T forman un componente importante del sistema inmune adaptativo que media tanto la especificidad como la memoria para un desafío patógeno, proporcionando un enfoque para desarrollar terapias altamente selectivas para sustituir las actuales terapias generales que afectan al sistema inmune como un todo y controlar en lugar de curar enfermedades.

20

La activación completa de las células T requiere estimulación a través del receptor antigénico de las células T y señalización adicional a través de moléculas coestimuladoras que se muestran en la superficie celular de las células T, principalmente el receptor CD28 (1-3). Los ligandos para CD28 son CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2), mostrados por células tales como células dendríticas, macrófagos y células B que también presentan antígeno para la célula T receptora (4,5). El acoplamiento de CD28 por CD80 o CD86 estimula las vías de señalización que estabilizan y amplifican la respuesta de células T específicas de antígeno. Esto se caracteriza por el aumento de la producción de células T de la citoquina IL-2, la expresión de proteínas que suprimen la apoptosis (Bcl-X_L) y la secreción de citoquinas efectoras que amplifican la respuesta inmune específica del antígeno.

25

CTLA-4 es un homólogo estructural de CD28, ambos son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, comparten aproximadamente el 30 % de homología de secuencia de aminoácidos, y en humanos, están ubicados en la misma región del cromosoma 2 (6-8). En particular, ambos conservan motivos de secuencia importantes para unir CD80/CD86. Sin embargo, CTLA-4 es ampliamente aceptado como un receptor con efectos opuestos sobre la actividad de las células T en comparación con CD28, que entrega señales inhibitorias en lugar de estimulantes a las células T activadas. En general, se reconoce que es un contrarreceptor que puede atenuar la intensidad de la respuesta inmune procesada por la célula T activada en la que se muestra (9, 10). También se acepta ampliamente que las células T reguladoras CD4⁺ expresan constitutivamente la molécula en su superficie celular, mientras que otros subconjuntos de células T efectoras, p. ej., células T CD4⁺ Th1, solo la expresan después de la activación (11-13). Hay más pruebas de que la molécula participa en la función Treg y, por tanto, CTLA-4 puede estar implicada en la regulación de la respuesta inmune tanto modulando la actividad intrínseca de la célula que la expresa como inhibiendo otras células T activadas durante una respuesta inmune (14-18).

30

35

40

Los intentos de delinear el papel de CTLA-4 en la estimulación de las células T demostraron que es importante como un regulador inhibitorio de las células T. En primer lugar, los ratones deficientes para el gen CTLA-4 mueren 3-5 semanas después del nacimiento de un trastorno linfoproliferativo masivo en el cual los blastos de células T activados se acumulan rápidamente en los tejidos linfáticos y progresan para infiltrarse en otros órganos y tejidos del cuerpo (19,20). Esto proporciona la prueba de que CTLA-4 tiene un papel tanto en la limitación del estado de activación de las células T como en el mantenimiento de la homeostasis de las células T. Además, se han usado estudios con anticuerpos específicos para CTLA-4 para evaluar su papel en poblaciones de células T purificadas y encontraron que el entrecruzamiento de anticuerpos de CTLA-4 en la superficie celular inhibe la proliferación de células T y la producción de IL-2 (21-24). Estos efectos se oponen directamente a los efectos estimulantes mediados por CD28 y por tanto es probable que las moléculas de coestimulación CD28 y CTLA-4 se combinen para modular la estimulación del receptor antigénico de las células T entregando señales estimuladoras e inhibitorias respectivamente.

45

50

55

El bloqueo de anticuerpos de CTLA-4 se ha usado ampliamente para demostrar que la inhibición de la función de CTLA-4 potencia la actividad de las células T en una gama de situaciones de enfermedad, incluyendo cáncer, infección y otros escenarios relacionados con el sistema inmune. En el cáncer, el bloqueo de anticuerpos de la función CTLA-4 se ha establecido como un método potencialmente viable para establecer respuestas poderosas de células T antitumorales (25-31; véase también el documento US6984720 asignado a Medarex, Inc.). Los primeros experimentos se realizaron en modelos murinos de cáncer. El bloqueo de CTLA-4 potenció las respuestas inmunes de las células T antitumorales, lo que condujo a la reducción exitosa y a la abolición de los tumores. El bloqueo de CTLA-4 se ha realizado en modelos de cáncer usando anticuerpos solos o en combinación con una vacuna específica para el cáncer. Parece que la inmunogenicidad natural del tumor particular es un factor determinante de si el bloqueo de CTLA-4 solo, o el bloqueo en combinación con una vacuna u otro activador inmune es suficiente para generar una respuesta inmune antitumoral exitosa. Los estudios iniciales del bloqueo de CTLA-4 en modelos

60

65

murinos de cáncer han llevado a estudios similares en humanos y al menos dos anticuerpos monoclonales específicos para CTLA-4 humano han sido exhaustivamente estudiados en ensayos clínicos destinados a tratar una gama diversa de cánceres (31).

5 En relación con la infección, el bloqueo de anticuerpos de la función CTLA-4 demostró respuestas inmunes muy potenciadas que incluyen respuestas antiparasitarias, antibacterianas y antivirales que potencian un espectro de inmunidad que incluye un aumento del anticuerpo específico de antígeno y respuestas de células T auxiliares Th1/Th2 (32-36). El bloqueo de anticuerpos de CTLA-4 también potencia las respuestas autoinmunitarias (37).

10 La mayoría de las investigaciones sobre CTLA-4 se han centrado en la forma de receptor de la molécula, pero existen isoformas genéticas alternativas, que en forma proteica no residen en la superficie celular de las células T (revisado por Teft y *col.*, (2006) (38)).

15 La isoforma de CTLA-4 unida a la membrana de longitud completa está codificada en humanos por cuatro exones (1-4) en el cromosoma 2, pero hay otros transcritos de ARNm, incluido uno que genera una forma soluble secretable de CTLA-4 (sCTLA-4) (39,40). A este transcrito empalmado alternativamente le falta el exón 3, correspondiente al dominio transmembrana de CTLA-4 de longitud completa, y un desplazamiento del marco de lectura del exón 4 sustituye la secuencia de cola citoplásmica con una secuencia de aminoácidos C-terminal diferente de función desconocida. Al igual que CTLA-4 de longitud completa, sCTLA-4 tiene la capacidad de unirse a los ligandos coestimuladores B7.1/B7.2 en APC, pero su papel como regulador de respuestas inmunes específicas de antígeno no ha sido evaluado. Los estudios iniciales indicaron que las células T en reposo son la fuente principal de sCTLA-4, las cuales después de la activación no específica con mAb anti-CD3, pasan a producir rápidamente la isoforma de longitud completa para regular la respuesta inmune.

25 The Oaks y Hallett (43) describen la producción de un antisuero policlonal de conejo en la región C terminal de sCTLA-4. El antisuero se usó en transferencias Western para detectar la presencia de la proteína sCTLA-4. No fue usado en ningún ensayo funcional.

30 Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) dentro del locus del gen CTLA-4 se han asociado con la susceptibilidad a la enfermedad autoinmune. Un potente análisis de población de un SNP asociado a CTLA-4 (CT60) encontró que un haplotipo particular (homocigoto g/g) se correlacionaba con una mayor susceptibilidad a la enfermedad de Graves, al hipotiroidismo autoinmune y a la diabetes tipo 1 (41). El SNP se localiza corriente abajo de los 4 exones que codifican CTLA-4 y el análisis posterior indicó que el SNP de susceptibilidad ejerce influencia sobre CTLA-4 determinando una disminución relativa en la cantidad de proteína sCTLA-4 producida. Los niveles de expresión de CTLA-4 de longitud completa no se vieron afectados. Estos datos proporcionaron la prueba de que sCTLA-4 de hecho puede tener un papel en la regulación del sistema inmune.

40 El documento WO2005 /072340 describe las variantes del receptor de CTLA-4 y las moléculas solubles de CTLA-4. El documento WO 2006/059131 A1 divulga métodos y materiales para usar en la modulación de la activación de las células T, basado en la producción y la secreción del antígeno-4 del linfocito T citotóxico soluble (sCTLA-4) por células del sistema inmune.

45 Otras isoformas alternativas de CTLA-4 incluyen liCTLA-4, presente en roedores pero no en humanos, en las que la transcripción alternativa carece del exón 2 y otra codificada solo por los exones 1 y 4 (38). Esta última transcripción, presente en humanos, no tiene ninguna función notificada en la actualidad.

Divulgación de la invención

50 Los presentes inventores han proporcionado un anticuerpo monoclonal, denominado en el presente documento JMW-3B3, que es específico para la forma soluble de CTLA-4, por lo tanto no se une a otras isoformas o proteínas CTLA-4 recombinantes ya que carecen del epítipo seleccionado necesario.

55 Por el contrario, los anticuerpos actuales que se unen a CTLA-4 se unen a ambas isoformas, que normalmente identifican epítipos en las regiones proteicas codificadas por el exón 2.

60 Además de las otras utilidades descritas a continuación, el anticuerpo JMW-3B3 específico de sCTLA-4 tiene un fuerte efecto fortificante sobre las respuestas inmunes humanas específicas de antígeno y particularmente las células linfocíticas T específicas de antígeno (células T). Esta actividad no era predecible a partir de la técnica anterior. Específicamente, en trabajos anteriores en la técnica, generalmente se considera que sCTLA-4 se produce por células T en reposo y no como un componente activo de una respuesta inmune. Esto fue consecuente con la opinión de que sCTLA-4 se secretó en forma monomérica, y sobre esa base se habría considerado poco probable que tuviera la potencia funcional necesaria para regular las respuestas inmunes (por el contrario, los estudios de CTLA-4 de longitud completa revelaron que se muestra en las superficies de las células en forma dímera y ese dimerismo juega un papel importante en su función (42). Igualmente, el CTLA4-Ig recombinante artificial es más potente en forma dímera (8)).

Los estudios con mAb JMW-3B3 han revelado que sCTLA-4, a diferencia de esas suposiciones, es probable que sea dimérica en forma funcional. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, esto puede explicar por qué el bloqueo de su función tiene efectos tan fuertes e inesperados sobre las respuestas inmune específicas de antígeno en términos de proliferación celular y producción de citoquinas efectoras.

5 Se proporcionan secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos que comprenden las regiones variables del anticuerpo mAb JMW-3B3 que incluyen las secuencias de regiones marco conservadas (FR) y las determinantes de la complementariedad (CDR), específicamente las que abarcan FR1 a CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 para las regiones variables de cadena pesada (VP) y de cadena ligera (VL), (véase las Figuras 1 y 2).

10 Como se describe con mayor detalle a continuación, las realizaciones preferentes de la presente invención emplean los dominios VP y/o VL del anticuerpo de JMW-3B3 o fragmentos o variantes del mismo. Otras realizaciones preferentes emplean una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de los dominios variables JMW-3B3 de cadena pesada (VP) y/o variables de cadena ligera (VL), especialmente VP JMW-3B3 (o variantes de cualquiera de estos) en otras regiones marco conservadas de anticuerpo.

15 Algunos aspectos y realizaciones de la invención serán tratados con más detalle.

20 En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo que es un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, que se une específicamente a sCTLA-4 que esencialmente no muestra unión a CTLA-4 en las superficies de los linfocitos y que se une con un epítipo de sCTLA-4 dentro de la secuencia de aminoácidos AKEKKPSYNRGLCENAPNRARM (SEQ ID NO: 11), cuya molécula de anticuerpo puede potenciar las respuestas de las células linfocíticas T específicas de antígeno. Las realizaciones preferentes de este aspecto de la invención se definen mediante las reivindicaciones 2-6.

25 Como los anticuerpos pueden modificarse de varias maneras, el término "molécula de anticuerpo" debe interpretarse como que cubre cualquier molécula de anticuerpo o sustancia que tiene un dominio de unión a antígeno de anticuerpo con la especificidad necesaria. Por tanto, este término cubre fragmentos de anticuerpos y derivados, que incluyen cualquier polipéptido que comprende un dominio de unión a inmunoglobulina, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Por lo tanto, se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o equivalente, fusionado a otro polipéptido. Las moléculas de anticuerpo de la invención son anticuerpos monoclonales tales como JMW-3B3 de acuerdo con la invención que incluyen cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente a los mismos y partes funcionales de los mismos. Ejemplos de dichos equivalentes y partes se describen con más detalle en lo sucesivo en este documento.

30 "Específicamente" en el contexto de la invención, esto significa la capacidad de unirse a sCTLA-4, pero esencialmente no muestra unión a la otra forma principal de CTLA-4 en las superficies de los linfocitos. Análogamente, las moléculas de anticuerpo de la invención pueden no mostrar esencialmente ninguna unión a la forma artificial recombinante de CTLA-4 denominada "CTLA4-Ig".

35 Por "esencialmente sin unión" se entiende una unión, que es al menos aproximadamente 85 %, particularmente al menos aproximadamente 90 %, más particularmente al menos aproximadamente 95 %, incluso más particularmente al menos aproximadamente 98 %, pero especialmente al menos aproximadamente 99 % y hasta un 100 % menos que el enlace a SCTL4.

40 Normalmente, la especificidad puede determinarse mediante un ensayo de unión tal como ELISA empleando un estudio de panel de antígenos, en el que se puede demostrar que una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención reconocerá específicamente sCTLA-4 pero no CTLA4 (véase la Figura 5). Como alternativa, se puede usar un sensor tal como un sensor Biacore para comparar o cuantificar la unión.

45 Como se define mediante las reivindicaciones, la invención proporciona una molécula de anticuerpo que se une a un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos:

50 AKEKKPSYNRGLCENAPNRARM (SEQ ID NO: 11).

55 Esta secuencia es parte de la secuencia de proteína C-terminal de sCTLA4 (A₁₁₆-M₁₃₇) y difiere de la de la isoforma de CTLA-4 comúnmente detectada en la superficie de las células T humanas.

60 Por tanto, en las realizaciones de acuerdo con la reivindicación 4, una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención compite por la unión a sCTLA4 (a un epítipo en la SEQ ID NO: 11) con cualquier molécula de anticuerpo que se une al antígeno y comprende una molécula de anticuerpo, un dominio VP y/o VL divulgado en el presente documento, o un VP CDR3 divulgado en el presente documento, o una variante de cualquiera de estos como se define en las reivindicaciones.

65 La competencia entre moléculas de anticuerpo puede ensayarse fácilmente *in vitro*, por ejemplo usando ELISA y/o mediante el marcado de una molécula indicadora específica a una molécula de anticuerpo que puede ser detectado

en presencia de otra (s) molécula (s) de anticuerpos no marcados, para permitir la identificación de moléculas de anticuerpo que se unen al mismo epítipo o a un epítipo solapado.

5 Se divulga además en el presente documento una molécula de anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno de anticuerpo humano que compite con JMW-3B3 por la unión a sCTLA-4 (por ejemplo, a un epítipo en SEQ ID NO: 11) y que no se une análogamente a CTLA-4 en las superficies de los linfocitos.

10 A la luz de la divulgación en el presente documento, pueden proporcionarse fácilmente anticuerpos específicos para sCTLA-4 y que pueden competir con JMW-3B3 por la unión al epítipo de sCTLA-4 igual o próximo. Por ejemplo, un método puede incluir poner en contacto una biblioteca de moléculas de anticuerpo y dicho epítipo, y seleccionar una o más moléculas de anticuerpo específicas de la biblioteca que puedan unirse a dicho epítipo.

15 La biblioteca puede mostrarse en la superficie de partículas de bacteriófago, conteniendo cada partícula ácido nucleico que codifica el dominio variable VP del anticuerpo mostrado en su superficie, y opcionalmente también un dominio VL que se muestra si está presente.

20 Después de la selección de moléculas de anticuerpo específicas que pueden unirse al epítipo y que se muestran en partículas de bacteriófago, se puede tomar ácido nucleico de una partícula de bacteriófago que muestra dicha molécula de anticuerpo específica seleccionada. Dicho ácido nucleico puede usarse en la producción posterior de una molécula de anticuerpo específica o un dominio variable VP de anticuerpo (opcionalmente un dominio variable VL de anticuerpo) mediante la expresión de ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico tomada de una partícula de bacteriófago que muestra dicha molécula de anticuerpo específica seleccionada.

25 La capacidad para unirse específicamente a sCTLA-4 puede ensayarse aún más y también la capacidad para competir con JMW-3B3 por la unión a sCTLA-4. También se puede ensayar la capacidad para antagonizar la acción de sCTLA-4 en determinados contextos, como se trata más adelante de forma detallada.

30 Una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención se puede unir a sCTLA-4 con la afinidad de JMW-3B3.

35 Por tanto, la presente invención se extiende además a una molécula de anticuerpo que compite por la unión a sCTLA-4 con cualquier molécula de anticuerpo que se une a sCTLA-4 y comprende un dominio V que incluye una CDR con aminoácido sustancialmente como se establece en el presente documento o un dominio V con una secuencia de aminoácidos sustancialmente de acuerdo con la reivindicación 4. La competencia entre moléculas de anticuerpo puede ensayarse fácilmente *in vitro*, mediante el marcado de una molécula indicadora a una molécula de anticuerpo que puede ser detectada en presencia de otra (s) molécula (s) de anticuerpos no marcados, para permitir la identificación de moléculas de anticuerpo que se unen al mismo epítipo o a un epítipo solapado. La competencia puede determinarse, por ejemplo, usando ELISA o citometría de flujo.

40 En los ensayos de competición, puede emplearse un fragmento peptídico de sCTLA-4, especialmente un péptido que incluye el epítipo de interés. Se puede usar un péptido que tenga la secuencia de epítipo más uno o más aminoácidos en cada extremo. Dicho péptido puede decirse que "consiste esencialmente" en la secuencia especificada. Las moléculas de anticuerpo de acuerdo con la presente invención pueden ser tales que su unión a sCTLA-4 es inhibida por un péptido con o que incluye la secuencia dada. En los ensayos para esto, se puede usar un péptido con cualquiera de las secuencias más uno o más aminoácidos.

Como se ha indicado anteriormente, las moléculas de anticuerpo preferentes son anticuerpos monoclonales tales como JMW-3B3 o partes funcionales de los mismos.

50 En una realización preferente, la molécula de anticuerpo comprende el dominio JMW-3B3 VP (SEQ ID NO: 4) y/o el dominio JMW-3B3 VL (SEQ ID NO: 2).

55 En general, un dominio VP está emparejado con un dominio VL para proporcionar un sitio de unión a antígeno de anticuerpo, aunque como se trata más adelante de forma detallada, un dominio VP solo se puede usar para unir antígeno.

60 En una realización preferente, el dominio JMW-3B3 VP (SEQ ID NO: 4) está emparejado con el dominio JMW-3B3 VL (SEQ ID NO: 2), de modo que se forma un sitio de unión a antígeno de anticuerpo que comprende ambos dominios JMW-3B3 VP y VL. En otras realizaciones, el JMW-3B3 VP está emparejado con un dominio VL distinto del JMW-3B3 VL, que, sin embargo, pertenece al alcance de las reivindicaciones. La promiscuidad de la cadena ligera está bien establecida en la técnica.

65 Tal como se divulga en el presente documento, se pueden tomar una o más CDR del dominio JMW-3B3 VP o VL y se pueden incorporar en un marco adecuado. Esto se trata más adelante de forma detallada. Las CDR 1, 2 y 3 de JMW-3B3 VP se muestran en las SEQ ID NO 5, 6 y 7, respectivamente. Las CDR 1, 2 y 3 de JMW-3B3 VL se muestran en las SEQ ID NO 8, 9 y 10, respectivamente.

Las variantes de los dominios VP y VL de los cuales las secuencias se exponen en el presente documento y que pueden emplearse en moléculas de anticuerpo para sCTLA-4 pueden obtenerse mediante métodos de alteración de secuencia o mutación y selección. Dichos métodos también son proporcionados por la presente invención.

- 5 Las variantes de secuencia de aminoácidos de dominio variable de cualquiera de los dominios VP y VL cuyas secuencias se divulgan específicamente en el presente documento, dentro del alcance de las reivindicaciones, se pueden emplear de acuerdo con la presente invención. Las variantes particulares pueden incluir una o más alteraciones de la secuencia de aminoácidos (adición, delección, sustitución y/o inserción de un resto de aminoácido), quizás menos de aproximadamente 20 alteraciones, menos de aproximadamente 15 alteraciones, menos de
10 aproximadamente 10 alteraciones o menos de aproximadamente 5 alteraciones, 4, 3, 2, o 1. Se pueden realizar alteraciones en una o más regiones marco conservadas y/o una o más CDR.

Las sustituciones preferentes son sustituciones conservadoras.

- 15 Por tanto, un aspecto de la invención proporciona un método para obtener un dominio de unión a antígeno de anticuerpo específico para un epítipo de sCTLA-4 dentro de AKEKKPSYNRGLCENAPNRARM, como se define en las reivindicaciones, comprendiendo el método proporcionar mediante adición, delección, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VP establecida en el presente documento un dominio VP que es una variante de secuencia de aminoácidos del dominio VP, y combinar el dominio VP así
20 proporcionado con uno o más dominios VL, y ensayar el dominio VP o la combinación o combinaciones VP/VL para identificar una molécula de anticuerpo o un dominio de unión a antígeno de anticuerpo específico para sCTLA-4. Dicho dominio VL puede tener una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente como se establece en el presente documento.
- 25 Puede emplearse un método análogo en el que una o más variantes de secuencia de un dominio VL divulgado en el presente documento se combinan con uno o más dominios VP.

- En una realización, la invención se refiere a una región VL que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia
30 dada en la SEQ ID NO: 2 o una parte funcional de la misma que comprende todas las CDR incrustadas en sus regiones marco conservadas naturales.

- En una realización, la invención se refiere a una región VP que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia
35 dada en la SEQ ID NO: 4 o una parte funcional de la misma que comprende todas las CDR incrustadas en sus regiones marco conservadas naturales.

- Un aspecto adicional de la invención proporciona una molécula de anticuerpo tal como un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo de acuerdo con la
40 presente invención y como se describe en el presente documento en la que dicho anticuerpo comprende un dominio VL o VP como se describe en el presente documento.

- También se divulga en el presente documento un método para preparar una molécula de anticuerpo específica para sCTLA-4, cuyo método comprende:

- 45 a) proporcionar un repertorio de partida de ácidos nucleicos que codifican un dominio VP que o bien incluye una CDR3 para ser sustituida o que carece de una región codificante de CDR3;
b) combinar dicho repertorio con un ácido nucleico donador que codifica una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se establece en el presente documento para una VP CDR3 de manera que dicho ácido
50 nucleico donador se inserte en la región CDR3 en el repertorio, para proporcionar un repertorio de productos de ácidos nucleicos que codifican un dominio VP;
c) expresar los ácidos nucleicos de dicho repertorio de productos;
d) seleccionar una molécula de anticuerpo específica para sCTLA-4; y
e) recuperar dicha molécula de anticuerpo específica o ácido nucleico que la codifica.

- 55 De nuevo, puede emplearse un método análogo en el que un VL CDR3 de la invención se combina con un repertorio de ácidos nucleicos que codifican un dominio VL que o bien incluye una CDR3 para ser sustituida o que carece de una región codificante de CDR3.

- 60 De forma similar, una o más, o las tres CDR pueden injertarse en un repertorio de dominios VP o VL que luego se criban para moléculas de anticuerpos específicas para sCTLA-4.

- Una parte sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones marco conservadas intermedias. Preferentemente, la parte también incluirá al menos
65 aproximadamente el 50 % de una o ambas de las regiones marco conservadas primera y cuarta, siendo el 50 % el C-terminal 50 % de la primera región marco conservada y el N-terminal 50 % de la cuarta región marco conservada.

- Los restos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser los que normalmente no están asociados con las regiones de dominio variable de origen natural. Por ejemplo, la construcción de moléculas de anticuerpo específicas de la presente invención preparadas mediante técnicas de ADN recombinante puede dar como resultado la introducción de restos N- o C-terminales codificados por enlazadores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de enlazadores que unen dominios variables de la invención a otras secuencias de proteínas que incluyen cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de diacuerpos) o marcadores de proteína como se trata con más detalle a continuación.
- 5
- 10 Las moléculas de anticuerpo de la presente invención incluyen moléculas de anticuerpo y otras inmunoglobulinas, ya sean naturales o parcial o totalmente sintéticas. El término cubre cualquier polipéptido o proteína que comprende un dominio de unión a anticuerpo. Específicamente, incluye fragmentos de anticuerpos que comprenden un dominio de unión a antígeno tales como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd; y diacuerpos. Estos temas se tratan con más detalle a continuación.
- 15 Aunque se prefieren moléculas de anticuerpo específicas que comprenden un par de dominios VP y VL, también se divulgan dominios de unión única basados en secuencias de dominio VP o VL. Se sabe que los dominios de inmunoglobulina individuales, especialmente los dominios VP, pueden unirse a los antígenos diana de una manera específica.
- 20 Así, en otros aspectos de la presente divulgación, se puede proporcionar un dominio variable VP de anticuerpo con la secuencia de aminoácidos de un dominio variable VP de anticuerpo de una molécula de anticuerpo de la invención en forma aislada, como puede ser una molécula de anticuerpo que comprende dicho dominio VP.
- 25 En el caso de cualquiera de los dominios de unión monocatenarios, estos dominios también pueden usarse para detectar dominios complementarios que pueden formar una molécula de anticuerpo de dos dominios que puede unirse a sCTLA-4.
- 30 Esto puede lograrse mediante métodos de cribado de presentación en fagos usando el denominado enfoque combinatorio jerárquico dual como se divulga en el documento WO92/01047 en el que se usa una colonia individual que contiene un clon de cadena P o L para infectar una biblioteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o P) y la molécula de anticuerpo de dos cadenas resultante se selecciona de acuerdo con técnicas de presentación en fago tales como las descritas en esa referencia. Esta técnica también se divulga en Marks y *col.*, *ibíd.*
- 35 Las moléculas de anticuerpo de la presente invención pueden comprender además regiones constantes de anticuerpos o partes de las mismas. Por ejemplo, un dominio VL puede estar unido en su extremo C-terminal a dominios constantes de cadena ligera de anticuerpo que incluyen cadenas C κ o C λ humanas, preferentemente cadenas C κ . De forma similar, una molécula de anticuerpo basada en un dominio VP puede unirse en su extremo C-terminal a la totalidad o parte de una cadena pesada de inmunoglobulina procedente de cualquier isotipo de anticuerpo, p. ej., IgG, IgA, IgE e IgM y cualquiera de las subclases de isotipo. Se pueden emplear regiones Fc tales como Δ nab y Δ nac como se divulga en el documento WO99/58572.
- 40 El documento WO 94/25591 trata la utilidad de regiones marco conservadas de inmunoglobulinas de *Camelidae* en la provisión de dominios de unión monocatenarios. En otras realizaciones, las regiones de anticuerpo o marco conservadas se pueden obtener de la inmunoglobulina de un pez cartilaginoso tal como un tiburón (véase, p. ej., J Immunol. 1 de junio de 2008; 180 (11): 7461-70)
- 45 Una molécula de anticuerpo en algunas realizaciones preferentes de la invención es un fragmento monomérico, tal como F(ab) o scFv. Dichos fragmentos de anticuerpo pueden tener la ventaja de una semivida relativamente corta.
- 50 Además de las secuencias de anticuerpos, una molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede comprender otros aminoácidos, p. ej., formar un péptido o un polipéptido, tal como un dominio plegado, o transmitir a la molécula otra característica funcional (p. ej., una semivida mejorada) además de la capacidad de unirse específicamente a sCTLA4.
- 55 En una realización, las moléculas de anticuerpo de la invención se pueden modificar con restos hidrófilos, particularmente un resto de polietilenglicol (PEG), en la que dicho resto hidrófilo se une covalentemente a cada extremo a través de un aminoácido tal como, por ejemplo, lisina o cualquier otro aminoácido adecuado o análogo de aminoácido que pueda servir como molécula de enlace; y aislar el anticuerpo.
- 60 Los expertos en la técnica conocen numerosos enfoques para conjugar químicamente moléculas con proteínas. Cuando la molécula de anticuerpo es para uso farmacéutico, el enlace conjugado es preferentemente estable en circulación pero lábil una vez que el conjugado se secuestra intracelularmente.
- 65 Así, por ejemplo, las moléculas de anticuerpo de la invención pueden marcarse con un marcador detectable o funcional. Los marcadores detectables incluyen radiomarcadores tales como ^{131}I o ^{99}Tc , que pueden estar unidos a

los anticuerpos de la invención usando la química convencional conocida en la técnica de formación de imágenes de anticuerpos. Los marcadores también incluyen marcadores enzimáticos como la peroxidasa de rábano picante. Los marcadores incluyen además restos químicos tales como biotina que pueden detectarse a través de la unión a un resto detectable afín específico, p. ej., avidina marcada. Preferentemente, los marcadores incluyen marcadores fluorescentes tales como FITC.

La presente invención proporciona además un ácido nucleico aislado que codifica una molécula de anticuerpo de la presente invención. El ácido nucleico incluye ADN y ARN. En un aspecto preferente, la presente divulgación proporciona un ácido nucleico que codifica un dominio CDR, VP o VL de la invención como se define en el presente documento, y métodos para preparar una molécula de anticuerpo, un dominio VP y/o un dominio VL de la invención, que comprenden expresar dicho ácido nucleico en condiciones para provocar la producción de dicha molécula de anticuerpo, dominio VP y/o dominio VL, y recuperarla.

La presente invención también proporciona construcciones en forma de plásmidos, vectores, transcripción o casetes de expresión que comprenden al menos un polinucleótido como el anterior.

La presente invención también proporciona una célula huésped recombinante que comprende una o más construcciones de acuerdo con las reivindicaciones. Un ácido nucleico que codifica cualquier dominio CDR, VP o VL, o una molécula de anticuerpo como se proporciona en sí mismo forma un aspecto de la presente invención, como lo hace un método de producción del producto codificado, cuyo método comprende la expresión del ácido nucleico que lo codifica. La expresión se puede lograr oportunamente cultivando en condiciones adecuadas células huésped recombinantes que contienen el ácido nucleico. Después de la producción por expresión, un dominio VP o VL, o una molécula de anticuerpo puede aislarse y/o purificarse usando cualquier técnica adecuada, y luego usarse según sea adecuado.

Las moléculas de anticuerpo, los dominios VP y/o VL, y las moléculas y vectores de ácido nucleico que codifican de acuerdo con la presente invención se pueden proporcionar aislados y/o purificados, p. ej., de su entorno natural, en forma sustancialmente pura u homogénea, o, en el caso del ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácido nucleico o de un origen de genes distinto de la secuencia que codifica un polipéptido con la función necesaria. El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético. La referencia a una secuencia de nucleótidos como se expone en el presente documento abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada, y abarca una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que U es sustituido por T, a menos que el contexto requiera lo contrario.

Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en diversas células huésped diferentes son bien conocidos. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, levaduras y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de hámster bebé, células NS0 de melanoma de ratón, células YB2/0 de melanoma de rata y muchas otras. Un huésped bacteriano común preferente es *E. coli*.

La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en células procariotas tales como *E. coli* está bien establecida en la técnica. Para una revisión, véase por ejemplo Pluckthun, A. *Bio/Technology* 9:545-551 (1991). La expresión en células eucarióticas en cultivo también está disponible para los expertos en la técnica como una opción para la producción de una molécula de anticuerpo, véase revisiones recientes, por ejemplo Ref, ME (1993) *Curr. Opinion Biotech.* 4: 573-576; Trill JJ y *col.*, (1995) *Curr. Opinion Biotech* 6:553-560.

Se pueden elegir o construir vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras adecuadas, que incluyen secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea adecuado. Los vectores pueden ser plásmidos, virales, p. ej., fagos o fagémidos, según sea adecuado. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: 3ª edición, Sambrook y Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en *Current Protocols in Molecular Biology*, Segunda edición, Ausubel y *col.*, eds., John Wiley & Sons, 1992.

Por tanto, un aspecto adicional de la presente invención proporciona una célula huésped que contiene o se transforma con ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones. Todavía otro aspecto proporciona un método que comprende introducir dicho ácido nucleico en una célula huésped, de acuerdo con las reivindicaciones. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección y transducción mediada por liposomas usando un retrovirus u otro virus, p. ej., vaccinia o, para células de insectos, baculovirus. Para las células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección usando un bacteriófago.

La introducción puede ir seguida de causar o permitir la expresión del ácido nucleico, p. ej., cultivando células

huésped en condiciones para la expresión del gen.

En una realización, el ácido nucleico de la invención se integra en el genoma (p. ej., cromosoma) de la célula huésped. La integración puede promoverse mediante la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas convencionales.

La presente invención también proporciona un método que comprende usar una construcción como se indicó anteriormente en un sistema de expresión con el fin de expresar una molécula de anticuerpo o polipéptido como antes.

Así, por ejemplo, la presente invención proporciona en diversos aspectos:

Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región VL que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 o una parte funcional de la misma que comprende todas las CDR incrustadas en sus regiones marco conservadas naturales.

Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región VL que muestra una secuencia de aminoácidos que es 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4 o una parte funcional de la misma que comprende todas las CDR incrustadas en sus regiones marco conservadas naturales.

Ácido nucleico, generalmente aislado, que codifica un dominio variable VP de anticuerpo (SEQ ID NO: 3) y/o un dominio variable VL (SEQ ID NO: 1) se divulga en el presente documento.

Otro aspecto de la presente invención proporciona ácido nucleico, generalmente aislado, que codifica una secuencia VP CDR o VL CDR divulgada en el presente documento, especialmente una VP CDR seleccionada de SEQ ID NO 5, 6 y 7 o una VL CDR seleccionada de SEQ ID NO 8, 9 y 10, lo más preferentemente JMW-3B3 VP CDR3 (SEQ ID NO: 7).

Un método de producción de un dominio variable de VP de anticuerpo, incluyendo el método causar la expresión a partir del ácido nucleico que codifica. Dicho método puede comprender cultivar células huésped en condiciones para la producción de dicho dominio variable VP de anticuerpo.

Los métodos análogos para la producción de dominios variables VL y las moléculas de anticuerpo que comprenden un dominio VP y/o VL.

Un método de producción puede comprender una etapa de aislamiento y/o purificación del producto.

Un método de producción puede comprender formular el producto en una composición que incluye al menos un componente adicional, tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

El anticuerpo JMW-3B3 específico de sCTLA-4 tiene un fuerte efecto fortificante sobre las respuestas inmunes humanas específicas de antígeno y particularmente las células linfocíticas T específicas de antígeno (células T). Esta actividad no era predecible a partir de la técnica anterior.

La capacidad de una molécula de anticuerpo específica para la isoforma de CTLA-4 soluble para reforzar la respuesta de células T al desafío inmunogénico o antigénico de forma dirigida selectiva, sin afectar a la superficie celular, la función CTLA-4 de longitud completa, tiene una utilidad considerable y puede explotarse en un número de situaciones de enfermedades.

Por tanto, las moléculas de anticuerpo de acuerdo con la presente invención pueden potenciar las respuestas de células linfocíticas T específicas de antígeno, por ejemplo, promoviendo la proliferación de células específicas de antígeno y la producción de moléculas de citoquina implicadas en la activación de estas respuestas inmunes específicas de antígeno.

Para medir dichas respuestas, un ensayo típico podría comprender células mononucleares de sangre periférica (PBMC) purificadas que se incubaron durante 5 días a 37 °C, 5% de CO₂, en presencia o ausencia de antígeno y, o bien, JMW-3B3 anti-sCTLA-4 anticuerpo o un anticuerpo de control de isotipo emparejado no específico. Después de un período durante el cual se permite que se desarrolle una respuesta inmune *in vitro* (normalmente 4-5 días), el fortalecimiento de la respuesta inmune mediante MW-3B3 puede determinarse midiendo citoquinas efectoras mediante ELISA, p. ej., Interferón-γ.

El "desafío inmunogénico o antigénico" se define como cualquier desafío que promueve una respuesta inmune adaptativa que incluye patógenos microbianos, virales o parasitarios, células cancerosas o inmunógenos de proteínas derivadas y antígenos de los mismos.

Las moléculas de anticuerpo de acuerdo con la invención, por ejemplo que tienen el efecto fortificante específico de antígeno descrito anteriormente, pueden usarse en un método de tratamiento o diagnóstico del cuerpo humano o animal, tal como un método de tratamiento (que puede incluir tratamiento profiláctico) de una enfermedad o trastorno en un paciente humano que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de una molécula de anticuerpo de la invención. Las afecciones tratables de acuerdo con la presente invención incluyen las tratadas en otra parte del presente documento.

Se divulgan además métodos de tratamiento que comprenden la administración de una molécula de anticuerpo como se proporciona, composiciones farmacéuticas que comprenden dicha molécula de anticuerpo, y el uso de dicha molécula de anticuerpo en la fabricación de un medicamento para la administración, por ejemplo, en un método de preparación de un medicamento o de una composición farmacéutica que comprende formular la molécula de anticuerpo con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Por tanto, en diferentes aspectos de la presente divulgación, el bloqueo funcional de sCTLA-4 usando moléculas de anticuerpo de la invención selectiva para sCTLA-4 puede usarse para potenciar las respuestas inmunes específicas de antígeno, por ejemplo de la siguiente manera:

- Potenciación de las respuestas inmunes contra tumores inmunogénicos.
- Potenciación de las vacunas-adyuvantes antitumorales para reforzar las respuestas inmunes específicas conjuntamente con una vacuna diseñada para generar una respuesta inmune antitumoral particular.
- Potenciación de las respuestas inmunes contra los patógenos incluidos bacterias, virus y parásitos con o sin vacunación.
- Vacunación posterior a la infección: para reforzar las respuestas inmunes antivirales después de la infección.

Como se describe a continuación, la potenciación o estimulación de la respuesta inmune específica de antígeno puede ser selectiva en el sentido de que, en ausencia de antígeno, la potenciación o estimulación del sistema inmune es leve o está ausente (compárese con el antígeno '0' µg/ml en presencia o ausencia de anticuerpos en la Figura 4).

Los expertos en la materia apreciarán que, a la luz de la divulgación en el presente documento, habrá muchas indicaciones o enfermedades en las que el bloqueo de la acción de sCTLA-4 puede usarse en un efecto ventajoso para potenciar de una respuesta inmune específica.

A modo de ejemplo no limitante, en el tratamiento del cáncer u otra enfermedad proliferativa, un tumor inmunogénico podría ser dirigido con, p. ej., en melanoma, carcinoma renal, linfoma, fibrosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de próstata y de ovario (50-55).

En la infección, el bloqueo de sCTLA4 puede ser útil para potenciar las respuestas inmunes eficaces contra el VIH (35, 36), la infección por nematodos y Leishmania (32,33) y también los polisacáridos capsulares del pneumococo (34).

Se apreciará que las moléculas de anticuerpo de la presente invención se pueden usar en combinación con otros restos inmunopotenciadores, p. ej., GM-CSF, interleuquina (IL-2) u otras vacunas específicas que comprenden cualquier sustancia inmunogénica de un patógeno particular.

De acuerdo con la presente invención, las composiciones proporcionadas pueden administrarse a individuos. La administración está preferentemente en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta suficiente para mostrar un beneficio al paciente. Dicho beneficio puede ser al menos la mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada y la velocidad y el tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de lo que se está tratando. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la posología, etc., es de la responsabilidad de los facultativos generales y otros médicos. Las dosis adecuadas de anticuerpo son bien conocidas en la técnica; véase Ledermann JA y col., (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664; Bagshawe KD y col., (1991) Anticuerpo, inmunoconjugados y radiofármacos 4: 915-922.

La dosis precisa dependerá de un número de factores, incluyendo si el anticuerpo es para diagnóstico o para tratamiento, el tamaño y la ubicación del área a tratar, la naturaleza precisa del anticuerpo (p. ej., anticuerpo completo, fragmento o diacuerpo), y la naturaleza de cualquier marcador detectable u otra molécula unida al anticuerpo. Una dosis de anticuerpo típica estará en el intervalo de 0,5 mg-1,0 g, y esto puede administrarse como un bolo por vía intravenosa. Otros modos de administración incluyen la infusión intravenosa durante varias horas, para conseguir una dosis acumulativa total similar. Esta es una dosis para un solo tratamiento de un paciente adulto, que puede ajustarse proporcionalmente para niños y lactantes, y también ajustarse para otros formatos de anticuerpos en proporción al peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, dos veces a la semana, semanales o mensuales, a discreción del médico.

Un modo de administración adicional emplea el prerrecubrimiento, o de otra manera la incorporación en dispositivos intravasculares, para los cuales se determinará la cantidad óptima de anticuerpo mediante experimentos adecuados.

5 Otro modo de administración adicional es agotar el plasma de sCTLA-4, que luego podría sustituir (por ejemplo a través de plasmaféresis) el propio plasma del paciente.

Un modo de administración adicional emplea el prerrecubrimiento, o de otra manera la incorporación en, dispositivos intravasculares, para los cuales se determinará la cantidad óptima de anticuerpo mediante experimentos adecuados.

10 Las moléculas de anticuerpo de la presente invención generalmente se administrarán en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además de la molécula de anticuerpo.

15 Por tanto, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, y para usar de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del principio activo, un excipiente, un vehículo, un tampón, un estabilizador farmacéuticamente aceptables u otros materiales bien conocidos por los expertos en la técnica. Dichos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, o por inyección, p. ej., por vía intravenosa.

20 Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden estar en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido, tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de

25 Para la inyección intravenosa o la inyección en el sitio de afección, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable sin pirógeno y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica pueden preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactato. Se pueden incluir conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según sea necesario.

30 Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, simultánea o secuencialmente dependiendo de la afección a tratar. Otros tratamientos pueden incluir la administración de dosis adecuadas de fármacos para aliviar el dolor tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (p. ej., aspirina, ibuprofeno o ketoprofeno) u opiáceos tales como morfina o antieméticos.

35 Las moléculas de anticuerpo de la presente invención son útiles en la disección de la función reguladora individual que pertenece tanto a la CTLA-4 de superficie celular de longitud completa como a la isoforma alternativa de sCTLA-4.

40 Las moléculas de anticuerpo de acuerdo con la invención pueden usarse en un método de detección, por ejemplo, para determinar la concentración o presencia de sCTLA4 en el cuerpo, o en una célula o tejido.

45 La presente invención proporciona un método que comprende causar o permitir la unión de una molécula de anticuerpo como se proporciona en el presente documento a sCTLA-4. Como se ha indicado, dicha unión puede tener lugar *in vivo*, p. ej., después de la administración de una molécula de anticuerpo o un ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo, o puede tener lugar *in vitro*, por ejemplo, en ELISA, transferencia Western, inmunocitoquímica, inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad, citometría de flujo etc.

50 Se puede determinar la cantidad de unión de la molécula de anticuerpo a sCTLA-4. La cuantificación puede estar relacionada con la cantidad de la sCTLA-4 en una muestra de ensayo, que puede ser de interés diagnóstico, p. ej., de enfermedades o indicaciones asociadas con niveles séricos altos o bajos de sCTLA-4. Dichos métodos pueden realizarse *in vitro*, por ejemplo, en muestras anteriormente obtenidas del individuo de interés.

55 Actualmente, hay varios informes en la literatura científica que indican que se pueden detectar niveles aumentados de sCTLA-4 en pacientes con enfermedad, incluidas varias enfermedades autoinmunes, p. ej., enfermedad tiroidea autoinmune, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico activo (42-48). Aparentemente también se ha detectado CTLA-4 soluble en pacientes con asma (49). Por tanto, el uso de una molécula de anticuerpo selectiva para sCTLA-4 puede ser útil para investigar y, si es adecuado, diagnosticar o evaluar cualquiera de estas enfermedades o

60 indicaciones, o cualquier otra asociada con niveles séricos altos o bajos de sCTLA-4.

Las reactividades de anticuerpos en una muestra pueden determinarse por cualquier medio adecuado. El radioinmunoensayo (RIA) es una posibilidad. La sCTLA-4 marcada radiactiva se mezcla con sCTLA-4 sin marcar (la muestra de ensayo) y se permite que se una al anticuerpo. La sCTLA-4 unida se separa físicamente de la sCTLA-4 no unida y se determina la cantidad de sCTLA-4 radioactiva unida al anticuerpo. Mientras más sCTLA-4 haya en la muestra de ensayo, menos sCTLA-4 radioactiva se unirá al anticuerpo. También se puede usar un ensayo de unión

competitiva con sCTLA-4 no radioactiva, usando sCTLA-4 o un análogo unido a una molécula indicadora. La molécula indicadora puede ser un fluorocromo, un fósforo o un colorante láser con características de absorción o emisión espectralmente aisladas. Los fluorocromos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y rojo de Texas. Los colorantes cromogénicos adecuados incluyen diaminobencidina.

5 Otros indicadores incluyen partículas coloidales macromoleculares o material particulado tal como perlas de látex que son de color, magnéticas o paramagnéticas, y agentes biológicamente o químicamente activos que pueden provocar directa o indirectamente señales detectables para ser observadas visualmente, detectadas electrónicamente o registradas de otro modo. Estas moléculas pueden ser enzimas que catalizan reacciones que
10 desarrollan o cambian colores o provocan cambios en las propiedades eléctricas, por ejemplo. Pueden ser excitables molecularmente, de manera que las transiciones electrónicas entre estados de energía den como resultado absorciones o emisiones espectrales características. Pueden incluir entidades químicas usadas conjuntamente con biosensores. Se pueden emplear sistemas de detección de biotina/avidina o biotina/estreptavidina y fosfatasa alcalina.

15 Las señales generadas por conjugados anticuerpo-indicador individuales pueden usarse para derivar datos cuantitativos absolutos o relativos de la unión del anticuerpo relevante en las muestras (normales y de ensayo).

20 La presente invención también proporciona el uso de una molécula de anticuerpo como antes para medir los niveles de sCTLA-4 en un ensayo de competición, es decir un método para medir el nivel de sCTLA-4 en una muestra empleando una molécula de anticuerpo proporcionada por la presente invención en un ensayo de competición. Puede ser que no se requiera la separación física de sCTLA-4 unida de la no unida. La unión de una molécula indicadora a la molécula de anticuerpo de modo que se produzca un cambio físico u óptico en la unión es una posibilidad. La molécula indicadora puede generar directa o indirectamente señales detectables, y preferentemente medibles. El enlace de las moléculas indicadoras puede ser directa o indirectamente, covalentemente, p. ej., a través
25 de un enlace peptídico o no covalente. La unión a través de un enlace peptídico puede ser como resultado de la expresión recombinante de un gen de fusión que codifica un anticuerpo y una molécula indicadora.

30 La presente invención también proporciona la medición directa de los niveles de sCTLA-4, empleando una molécula de anticuerpo de acuerdo con la invención, por ejemplo, en un sistema biosensor.

35 Las moléculas de anticuerpo de acuerdo con la invención también son útiles como herramientas de investigación en diversos contextos. A modo de ejemplo no limitante, pueden usarse para medir cantidades relativas de sCTLA-4 en una muestra. Las moléculas se pueden usar para detectar la presencia de sCTLA-4 en células, suero, plasma o sobrenadantes de cultivo celular utilizando un número de técnicas. Cuando se conjugan con marcadores fluorescentes (p. ej., ficoeritrina), las moléculas pueden detectar sCTLA-4 en células, p. ej., células T por citometría de flujo o microscopía de fluorescencia. ELISA se puede usar para detectar la presencia de sCTLA-4 en fluidos, incluido el suero. Las moléculas de anticuerpo también se pueden usar para adsorber y purificar sCTLA-4 de fluidos usando cromatografía de afinidad. Además, se pueden usar para investigar la función de sCTLA-4 *in vitro*
40 añadiéndola a células mononucleares de sangre periférica purificadas o subconjuntos de células purificadas (p. ej., células T) en presencia de factores activadores.

45 El modo de determinar la unión en cualquiera de estas aplicaciones no es *en sí* una característica de la presente invención y los expertos en la técnica pueden elegir un modo adecuado de acuerdo con sus preferencias y conocimiento general.

TERMINOLOGÍA

Molécula de anticuerpo

50 La expresión "molécula de anticuerpo" tal como se usa en el presente documento se entiende que se refiere a moléculas o fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos, en particular para referirse a moléculas de inmunoglobulina y a partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir moléculas que contienen un sitio de unión que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. Una inmunoglobulina
55 de acuerdo con la invención puede ser de cualquier tipo (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA e IgY) o clase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclases de la molécula de inmunoglobulina.

Las moléculas de anticuerpo pueden ser naturales o parcial o completamente sintéticas.

60 Los anticuerpos divulgados en el presente documento incluyen anticuerpos monoclonales, policlonales, quiméricos, monocatenarios, biespecíficos o bi-eficaces, simianizados, humanos y humanizados, así como fragmentos activos de los mismos. Ejemplos de fragmentos activos de moléculas que se unen a antígenos conocidos incluyen (que comprenden un dominio de unión a antígeno) incluyen Fab, F(ab')₂, scFv, Fv y los productos de una biblioteca de expresión de inmunoglobulina de Fab, y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anticuerpos y
65 fragmentos, más también dAb, Fd; diacuerpos etc.

Ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en dominios VL, VP, CL y CP1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VP y CP1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VP de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward, ES y col., Nature 341, 544-546 (1989)) que consiste en un dominio VP; (v) regiones CDR aisladas; (vi) Fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas Fv monocatenarias (scFv), en los que un dominio VP y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird y col., Science, 242, 423-426, 1988; Huston y col., PNAS EE.UU., 85, 5879-5883, 1988); (viii) dímeros Fv monocatenarios biespecíficos (PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multispecíficos contruidos por fusión génica (WO94/13804; P. Holliger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 6444-6448, 1993). Las moléculas Fv, scFv o diacuerpo se pueden estabilizar mediante la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VP y VL (Y. Reiter y col., Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996). También se pueden preparar minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 (S. Hu y col., Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996).

15 Cuando se van a usar anticuerpos biespecíficos, estos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que se pueden fabricar de diversas maneras (Holliger, P. y Winter G. Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449 (1993)), p. ej., preparadas químicamente o a partir de hibridomas híbridos, o puede ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpos biespecíficos mencionados anteriormente. Los diacuerpos y scFv pueden construirse sin una región Fc, usando solo dominios variables, lo que reduce potencialmente los efectos de la reacción antidiotípica.

20 Los diacuerpos biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos completos biespecíficos, también pueden ser particularmente útiles porque pueden construirse fácilmente y expresarse en *E.coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos tales como fragmentos de anticuerpo) de especificidades de unión adecuadas se pueden seleccionar fácilmente usando la presentación en fagos (WO94/13804) de las bibliotecas. Si un brazo del diacuerpo debe mantenerse constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra sCTLA-4, entonces se puede fabricar una biblioteca en la que se varíe el otro brazo y se seleccione un anticuerpo de especificidad adecuada. Los anticuerpos completos biespecíficos pueden prepararse por ingeniería de perillas en agujeros (JBB Ridgeway y col., Protein Eng., 9, 616-621, 1996).

30 Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que conservan la especificidad del anticuerpo original. Dichas técnicas pueden implicar la introducción de ADN que codifica la región variable de inmunoglobulina, o las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo para las regiones constantes, o las regiones constantes más las regiones marco conservadas de una inmunoglobulina diferente. Véase, por ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400. Un hibridoma u otra célula que produce un anticuerpo puede estar sujeto a mutación genética u otros cambios, que pueden o no alterar la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

40 Para una descripción adicional de las técnicas generales para el aislamiento de fragmentos activos de anticuerpos, véase, por ejemplo, Khaw, BA y col., J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982); Rousseaux y col., Methods Enzymology, 121:663-69, Academic Press, 1986.

Dominio de unión a antígeno

45 Cuando se usa en el presente documento, esto describe la parte de una molécula de anticuerpo que comprende el área que se une específicamente y es complementaria a parte o a la totalidad de un antígeno. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo solo puede unirse a una parte particular del antígeno, cuya parte se denomina epítipo.

50 Se entenderá que "unión específica" en este contexto se refiere a la unión que surge de una interacción específica entre la conformación de un dominio de unión a antígeno y su pareja de unión, a diferencia de la unión no específica que surge solamente de las fuerzas de Van der Waals u otras interacciones proteína:proteína no específicas.

CDR

55 El término "CDR" se refiere a la región hipervariable de un anticuerpo. La expresión "región hipervariable", "HVR", o "HV", cuando se usa en el presente documento, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. En general, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en la VP (P1, P2, P3) y tres en la VL (L1, L2, L3). Varias delimitaciones de regiones hipervariables están en uso y se abarcan en el presente documento. Las regiones determinantes de la complementariedad de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las de uso más común (Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

65 La estructura para llevar una CDR de la invención generalmente será de una secuencia de cadena pesada o ligera de anticuerpo o una parte sustancial de la misma en la que la CDR está ubicada en una ubicación correspondiente a la CDR de dominios variables VP y VL de origen natural codificados por genes de inmunoglobulina reorganizada.

Los dominios variables empleados en la invención como se definen en las reivindicaciones se pueden obtener a partir de cualquier línea germinal o dominio variable humano reorganizado, o pueden ser un dominio variable sintético basado en secuencias consenso de dominios variables humanos conocidos. Se puede introducir una secuencia de CDR de la invención (p. ej., CDR3) en un repertorio de dominios variables que carecen de una CDR (p. ej., CDR3), usando tecnología de ADN recombinante.

Una alternativa adicional es generar regiones VP o VL novedosas que lleven una secuencia procedente de la CDR de la invención usando mutagénesis aleatoria de uno o más genes VP y/o VL seleccionados para generar mutaciones dentro del dominio variable completo. Dicha técnica es descrita por Gram *y col.*, (1992, Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU., 89:3576-3580), quienes usaron PCR propensa a error.

Anticuerpo humanizado

Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un tipo de anticuerpo modificado por ingeniería que tiene sus CDR procedentes de una inmunoglobulina donadora no humana, siendo las restantes partes procedentes de la inmunoglobulina de la molécula procedentes de una (o más) inmunoglobulina (s) humana (s). Además, los restos de soporte del marco pueden alterarse para preservar la afinidad de unión. Los métodos para obtener "anticuerpos humanizados" son bien conocidos por los expertos en la técnica. (véase, p. ej., Queen *y col.*, Proc Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson *y col.*, Bio/Technology, 9:421 (1991)).

Un anticuerpo humanizado" también puede obtenerse mediante un novedoso enfoque de ingeniería genética que permite la producción de anticuerpos policlonales similares a los humanos madurados por afinidad en animales grandes tales como, por ejemplo, conejos (véase, p. ej., la Patente de EE.UU. n.º 7.129.084).

Anticuerpo monoclonal

El término "anticuerpo monoclonal" también se reconoce bien en la técnica y se refiere a un anticuerpo que se produce en masa en el laboratorio a partir de un único clon y que reconoce solo un antígeno. Los anticuerpos monoclonales se preparan normalmente fusionando una célula B normalmente productora de anticuerpos, de vida corta, a una célula de crecimiento rápido, tal como una célula cancerosa (a veces denominada célula "inmortal"). La célula híbrida resultante, o hibridoma, se multiplica rápidamente, creando un clon que produce grandes cantidades del anticuerpo. Para el fin de la presente invención, también debe entenderse que "anticuerpo monoclonal" comprende anticuerpos que son producidos por un clon madre que aún no ha alcanzado la monoclonalidad completa.

Anticuerpo funcionalmente equivalente

"Anticuerpo funcionalmente equivalente" se entiende dentro del alcance de la presente invención que se refiere a un anticuerpo que comparte sustancialmente al menos una propiedad funcional principal con JMW-3B3, por ejemplo propiedades funcionales descritas en el presente documento que incluyen, pero sin limitación: especificidad de unión a sCTLA -4.

Inmunógeno y antígeno

Un "inmunógeno" se define como cualquier sustancia que puede inducir una respuesta inmune adaptativa, mientras que un "antígeno" es cualquier sustancia que puede ser reconocida (en términos de respuesta inmune) por las células del sistema inmune adaptativo.

Comprender

Esto se usa generalmente en el sentido de "incluir", es decir, permitir la presencia de una o más características o componentes.

Aislado

Esto se refiere al estado en el que estarán las moléculas de anticuerpo de la invención, o el ácido nucleico que codifica dichas moléculas de anticuerpo, de acuerdo con la presente invención. Los miembros y el ácido nucleico estarán libres o sustancialmente libres del material con el que están asociados de forma natural, tal como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su entorno natural, o el entorno en el que están preparados (p. ej., cultivo celular) cuando dicha preparación es mediante la tecnología de ADN recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*. Los miembros y el ácido nucleico se pueden formular con diluyentes o adyuvantes y aún con fines prácticos se aíslan; por ejemplo, los miembros normalmente se mezclarán con gelatina u otros vehículos si se usan para recubrir placas de microtitulación para su uso en inmunoensayos, o se mezclarán con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se usen en diagnóstico o terapia. Las moléculas de anticuerpo pueden estar glicosiladas, ya sea de forma natural o mediante sistemas de células eucariotas heterólogas (p. ej., células CHO o NS0 (ECACC 85110503), o pueden estar (por ejemplo, si se producen mediante la expresión en una

célula procariota) no glicosiladas.

Secuencias variantes

- 5 Por "sustancialmente como se establece" se entiende que el dominio CDR o VP o VL relevante de la invención será idéntico o altamente similar a las regiones especificadas de las cuales se establece la secuencia en el presente documento. Por "altamente similar" se contempla que de 1 a 5, preferentemente de 1 a 4 tal como 1 a 3 o 1 o 2, o 3 o 4, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos en el dominio CDR y/o VP o VL.
- 10 La "homología" entre dos secuencias está determinada mediante la identidad de secuencia. Si dos secuencias que se van a comparar entre sí difieren en longitud, la identidad de secuencia preferentemente se refiere al porcentaje de los restos de nucleótidos de la secuencia más corta que son idénticos a los restos de nucleótidos de la secuencia más larga. La identidad de secuencia puede determinarse convencionalmente con el uso de programas informáticos tales como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, Wis. 53711). Bestfit utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489, con el fin de encontrar el segmento que tiene la identidad de secuencia más alta entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit u otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular tiene, por ejemplo, una identidad del 95 % con una secuencia de referencia de la presente invención, los parámetros se ajustan preferentemente de modo que el porcentaje de identidad se calcule en toda la secuencia de referencia y se permiten huecos de homología de hasta el 5 % del número total de los nucleótidos en la secuencia de referencia. Cuando se usa Bestfit, los denominados parámetros opcionales se dejan preferentemente en sus valores preestablecidos ("predeterminados"). Las desviaciones que aparecen en la comparación entre una secuencia determinada y las secuencias de la invención descritas anteriormente pueden ser causadas, por ejemplo, por adición, deleción, sustitución, inserción o recombinación. Dicha comparación de secuencia preferentemente también puede llevarse a cabo con el programa "fasta20u66" (versión 2.0u66, septiembre de 1998 por William R. Pearson y la Universidad de Virginia; véase también WR Pearson (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98, ejemplos adjuntos y <http://workbench.sdsc.edu/>). Para este fin, se pueden usar las configuraciones de parámetros "predeterminadas".
- 20
- 25
- 30 Tal como se usa en el presente documento, un "cambio conservador" se refiere a alteraciones que son sustancialmente conformacional o antigénicamente neutras, que producen cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o que producen cambios mínimos en los determinantes antigénicos de los polipéptidos mutantes, respectivamente, en comparación con la proteína nativa. Cuando se hace referencia a los anticuerpos y a los fragmentos de anticuerpo de la invención, un cambio conservador significa una sustitución de aminoácidos que no hace que el anticuerpo no pueda unirse al epítipo objeto. Un experto en la técnica podrá predecir qué sustituciones de aminoácidos se pueden realizar mientras se mantiene una alta probabilidad de ser conformacional y antigénicamente neutro. Dicha orientación se proporciona, por ejemplo en Berzofsky, (1985) *Science* 229:932-940 y Bowie y col., (1990) *Science* 247:1306-1310. Los factores a considerar que afectan la probabilidad de mantener la neutralidad conformacional y antigénica incluyen, pero sin limitación: (a) la sustitución de aminoácidos hidrófobos es menos probable que afecte a la antigenicidad porque es más probable que los restos hidrófobos se ubiquen en el interior de una proteína; (b) la sustitución de aminoácidos fisicoquímicamente similares es menos probable que afecte a la conformación porque el aminoácido sustituido imita estructuralmente el aminoácido nativo; y (c) la alteración de secuencias conservadas evolutivamente es probable que afecte negativamente a la conformación, ya que dicha conservación sugiere que las secuencias de aminoácidos pueden tener una importancia funcional. Un experto en la técnica podrá evaluar las alteraciones en la conformación de proteína usando ensayos bien conocidos, tales como, pero sin limitación, métodos de fijación de microcomplemento (véase, p. ej., Wasserman y col., (1961) *J. Immunol.* 87:290-295; Levine y col., (1967) *Meth. Enzymol.* 11:928-936) y mediante estudios de unión usando anticuerpos monoclonales dependientes de la conformación (véase, p. ej., Lewis y col., (1983) *Biochem.* 22:948-954).
- 35
- 40
- 45
- 50 Todas las técnicas descritas anteriormente se conocen como tales en la técnica y en sí mismas no forman parte de la presente invención. El experto podrá usar dichas técnicas para proporcionar moléculas de anticuerpo de la invención usando la metodología habitual en la técnica.
- 55 Todos los subtítulos en el presente documento se incluyen solo por comodidad, y no deben interpretarse como que limitan la divulgación de ninguna manera.

La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a las siguientes Figuras y Ejemplos no limitantes. Otras realizaciones de la invención se les ocurrirán a los expertos en la técnica a la luz de estas.

60

Secuencias

SEQ ID NO: 1 JMW-3B3 VL que codifica la secuencia de nucleótidos

SEQ ID NO: 2 JMW-3B3 VL secuencia de aminoácidos

65

SEQ ID NO: 3 JMW-3B3 VP que codifica la secuencia de nucleótidos

SEQ ID NO: 4 JMW-3B3 VP secuencia de aminoácidos

SEQ ID NO: 5 JMW-3B3 VP CDR1, dentro de la secuencia de aminoácidos VP (SEQ ID NO: 4)
 SEQ ID NO: 6 JMW-3B3 VP CDR2, dentro de la secuencia de aminoácidos VP (SEQ ID NO: 4)
 SEQ ID NO: 7 JMW-3B3 VP CDR3, dentro de la secuencia de aminoácidos VP (SEQ ID NO: 4)
 SEQ ID NO: 8 JMW-3B3 VL CDR1, dentro de la secuencia de aminoácidos VL (SEQ ID NO: 2)
 SEQ ID NO: 9 JMW-3B3 VL CDR2, dentro de la secuencia de aminoácidos VL (SEQ ID NO: 2)
 SEQ ID NO: 10 JMW-3B3 VL CDR3, dentro de la secuencia de aminoácidos VL (SEQ ID NO: 2)
 SEQ ID NO: 11 secuencia de proteína C terminal sCTLA4 (A₁₁₆-M₁₃₇)

Todas las secuencias anteriores se muestran en las Figuras 1 y 2. Las regiones determinantes de la complementariedad hipervariables (CDR), que constituyen el sitio de unión al antígeno, se delimitan con flechas.

Figuras

Figura 1. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos anotada del marco de cadena ligera variable y regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo monoclonal anti-sCTLA-4 JMW-3B3.

Figura 2. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos anotada del marco de cadena pesada variable y regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo monoclonal anti-sCTLA-4 JMW-3B3.

Figura 3. Los anticuerpos existentes se unen a todas las formas principales de CTLA-4, tanto CTLA-4 en las superficies de los linfocitos, p. ej., células T CD4⁺ como CTLA-4 soluble natural. JMW-3B3 solo se une a la forma soluble natural de CTLA-4 humano que se dirige a una secuencia de proteína transportada solo por la forma soluble. Tenga en cuenta que a veces una forma recombinante artificial de CTLA-4 (CTLA4-Ig) a veces se denomina en la literatura como CTLA-4 soluble. JMW-3B3 tampoco se une a esa forma.

Figura 4.

(a) El anticuerpo monoclonal, JMW-3B3, específico para CTLA-4 soluble humano potencia las respuestas inmunes específicas de antígeno. Se incubaron células mononucleares de sangre periférica (1 millón por pocillo, 1 ml de medio de cultivo) con cantidades crecientes de derivado proteico purificado de *Mycobacterium tuberculosis* (PPD) durante 5 días a 37 °C, 5 % de CO₂, en presencia o ausencia de JMW-3B3. Los gráficos muestran que la adición del anticuerpo, potenció la proliferación de las células inmunitarias (panel superior) y aumentó la producción de la citoquina efectora, interferón- γ .

(b) Potenciación de respuestas inmunes específicas de antígeno por el anticuerpo monoclonal anti-sCTLA-4 JMW-3B3. Datos de seis experimentos separados que demuestran diferencias en la IFN- γ y la proliferación celular cuando se estimularon PBMC con 0 o 5 $\mu\text{g/ml}$ de PPD antígeno de recuperación en presencia de anti-sCTLA-4 mAb, JMW-3B3 o un control de isotipo IgG1.

Figura 5. ELISA para comparar la detección de CTLA-4 por un anticuerpo anti-CTLA-4 pan-específico con anticuerpo selectivo CTLA-4 soluble JMW-3B3. Se usó un anticuerpo anti-CTLA-4 común pan-específico para capturar CTLA-4 presente en 11 sueros de donadores voluntarios sanos. Las placas se bloquearon con un 2 % de producto de leche desnatada en solución salina tamponada con fosfato. La presencia de CTLA-4 se detectó con un anticuerpo biotinilado anti-CTLA-4 pan-específico o un anticuerpo selectivo sCTLA-4 JMW-3B3 biotinilado. La fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina se usó a continuación para detectar la presencia de anticuerpo biotinilado unido en cada caso. Las placas se desarrollaron usando un sustrato de fosfatasa común y un espectrofotómetro con un filtro de 405 nm usado para detectar el cambio de color.

Figura 6. Potenciación de las respuestas inmunes específicas del antígeno carcinoembrionario asociado a tumores (CEA) mediante el anticuerpo monoclonal anti-sCTLA-4 JMW-3B3. Las PBMC se estimularon con 0 o 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de antígeno CEA en presencia de anti-sCTLA-4 mAb, JMW-3B3 o un control de isotipo IgG1 (ninguno).

Figura 7. Anti-sCTLA-4 JMW-3B3 distingue, en suero y sobrenadante de cultivo, CTLA-4 soluble natural verdadero de CTLA-4 unida a la membrana extracelular (mCTLA-4). La parte extracelular de mCTLA-4 está codificada por el exón 2 y es idéntica en sCTLA-4, mCTLA-4 y la forma soluble recombinante de CTLA-4, CTLA4-Ig. Como JMW-3B3 se generó contra la región particular C-terminal de sCTLA-4, no reacciona de forma cruzada con el dominio CTLA-4 extracelular. Se compararon dos mAbs de detección anti-CTLA-4 pan-específicos biotinilados (clones AS-33 y 14D3), específicos para el dominio extracelular de CTLA-4, por su capacidad de unirse a CTLA4 con el JMW-3B3 en un ELISA sándwich típico. Se usó mAb anti-CTLA-4 pan-específico (clon BNI3) como el anticuerpo de captura.

Ejemplos

Parte experimental

JMW-3B3 es un mAb de IgG1 λ de ratón específico para sCTLA-4 humano (véase las Figuras 1 y 2).

La Figura 3 proporciona una ilustración no técnica de cómo el mAb JMW-3B3 difiere de los anticuerpos anti-CTLA-4 pan-específicos actuales.

El mAb JMW-3B3 se generó contra y reconoce un epítipo existente dentro de la región C terminal de sCTLA-4.

5 Se inmunizaron ratones Balb/c con un péptido que representa el extremo c de sCTLA-4 humana conjugado con una proteína portadora, hemocianina de lapa californiana (KLH). Los ratones se inmunizaron por vía subcutánea dos veces con un intervalo de tres semanas. La primera inmunización comprendía péptido-KLH (1 mg/ml) suspendido en una emulsión de adyuvante completo de Freund. La inmunización posterior fue de la misma concentración de péptido-KLH pero se aplicó en una suspensión de adyuvante incompleto de Freund. Una semana antes del sacrificio, a los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal péptido-KLH en una solución salina estéril. La preparación, selección y mantenimiento de hibridomas de células B esplénicas se realizó usando protocolos convencionales que están ampliamente disponibles. La pareja de fusión de línea celular inmortal fue SP2/0-Ag14 de la Colección de Cultura de la Agencia de Protección de Salud, Salisbury, Reino Unido (ECACC). La detección de supuestos hibridomas productores de anticuerpo anti-sCTLA-4 se realizó usando un ELISA de péptido desarrollado en el laboratorio. El péptido que representa la secuencia C terminal del CTLA-4 humano soluble se recubrió sobre placas de ELISA flexibles de 96 pocillos Greiner 3912 a 50 µg/ml en agua durante una noche a 37 °C. La solución de péptido se evaporó completamente durante este período y las placas se lavaron luego con solución salina tamponada con fosfato (PBS) dos veces y se bloquearon con Marvel al 2 % en PBS durante una hora a 36 °C. Los sobrenadantes muestreados de cultivos de células de hibridoma (aproximadamente 100 hibridomas que crecen activamente) se incubaron en las placas antes de la detección con un reactivo específico anti Fc de IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina. Las placas se desarrollaron con un sustrato de fosfatasa y se detectaron pocillos positivos mediante un aumento en la absorbancia a 405 nm. Los hibridomas positivos para el péptido sCTLA-4 se almacenaron bajo nitrógeno líquido. El hibridoma JMW-3B3 se clonó dos veces usando protocolos de dilución limitante típicos y se ensayó su capacidad para unirse a la molécula de sCTLA-4 nativa usando sCTLA-4 purificado a partir de suero.

La adición del anticuerpo a cultivos celulares de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donadores normales potencia las respuestas inmunes específicas de antígeno. En particular, los efectos estimulantes del anticuerpo en ausencia de un estímulo antigénico son de leves a ausentes. La Figura 4 (a) muestra un ejemplo de la actividad estimuladora de JMW-3B3. Las PBMC de un donador sano se incubaron *in vitro* en presencia de cantidades crecientes de derivado proteico purificado de antígeno de recuperación de *Mycobacterium tuberculosis* (PPD), en presencia o ausencia de 10 µg/ml de JMW-3B3. En presencia de JMW-3B3, la respuesta inmune específica de PPD se potencia tanto en términos de aumento de la proliferación celular como de la producción de la citocina efectora, interferón-γ. La Figura 4 (b) muestra los resultados de investigaciones adicionales usando PPD.

Curiosamente, la potenciación de la respuesta inmune se basó en la presencia de antígeno. En efecto, el bloqueo de anticuerpos de sCTLA-4 tuvo efectos positivos altamente selectivos sobre el sistema inmune. Los experimentos que demostraron esta potenciación se repitieron al menos cuatro veces con la misma conclusión.

40 La Figura 6 muestra la potenciación de la respuesta inmune contra CEA en presencia de JMW-3B3 y un control.

En otro experimento, se ensayaron sueros de 11 donadores normales para detectar la presencia de sCTLA-4. Se usó una técnica de ELISA de captura en la que se comparó JMW-3B3 con un anticuerpo CTLA-4 anti-humano pan-específico de uso común (Figura 5). En este caso, cada anticuerpo identificó dos muestras positivas, pero el anticuerpo anti-CTLA-4 pan-específico identificó otras tres muestras positivas. Estos no portan el epítipo sCTLA-4 y, por lo tanto, es probable que sean sCTLA-4 degradados o CTLA-4 escindidos de la membrana de la superficie. Esto demuestra la naturaleza selectiva del anticuerpo JMW-3B3 en la identificación de sCTLA-4 funcional; esto también se demuestra en la Figura 7.

50 Referencias

- (1) Jenkins MK, Taylor PS, Norton SD, Urdahl KB. CD28 entrega una señal coestimuladora de la producción de IL-2 específica de antígeno por las células T humanas. *J. Immunol.* 15 de oct de 1991;147(8):2461-2466.
- 55 (2) Norton SD, Zuckerman L, Urdahl KB, Shefner R, Miller J, Jenkins MK. El ligando CD28, B7, potencia la producción de IL-2 al proporcionar una señal coestimuladora a las células T. *J. Immunol.* 1 de septiembre de 1992; 149 (5): 1556-1561.
- (3) Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP. La señalización mediada por CD28 coestimula las células T murinas y evita la inducción de anergia en los clones de células T. *Nature* 16 de abril de 1992; 356 (6370):607-609.
- 60 (4) Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA. La unión del antígeno de activación B7 de células B a CD28 coestimula la proliferación de las células T y la acumulación de ARNm de interleucina 2. *J. Exp. Med.* 1 Mar 1991;173(3):721-730.
- 65 (5) Hathcock KS, Laszlo G, Dickler HB, Bradshaw J, Linsley P, Hodes RJ. Identificación de un ligando CTLA-4 alternativo coestimulador para la activación de las células T. *Science* 5 de noviembre de 1993; 262 (5135):905-907.

- (6) Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, y col. Un nuevo miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas CTLA-4. *Nature* 16-22 de julio de 1987; 328(6127):267-270.
- (7) Dariavach P, Mattei MG, Golstein P, Lefranc MP. Gen de CTLA-4 de la superfamilia de Ig humana: localización cromosómica e identidad de secuencia de proteína entre dominios citoplasmáticos de CTLA-4 murino y humano. *EUR. J. Immunol.* Diciembre de 1988; 18 (12):1901-1905.
- 5 (8) Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA-4 es un segundo receptor para el antígeno de activación B7 de células B. *J. Exp.Med.* 1 de septiembre de 1991; 174 (3): 561-569.
- (9) Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, y col. CTLA-4 puede funcionar como un regulador negativo de la activación de células T. *Inmunidad* agosto de 1994;1(5):405-413.
- 10 (10) Krummel MF, Allison JP. CD28 y CTLA-4 tienen efectos opuestos sobre la respuesta de las células T a la estimulación. *J. Exp.Med.* 1 de agosto de 1995;182(2):459-465.
- (11) Heikkinen J, Mottonen M, Alanen A, Lassila O. Caracterización fenotípica de células T reguladoras en la decidua humana. *Clin.Exp.Immunol.* Mayo de 2004;136(2):373-378.
- 15 (12) Jago CB, Yates J, Camara NO, Lechler RI, Lombardi G. Expresión diferencial de CTLA-4 entre subconjuntos de células T. *Clin.Exp.Immunol.* Junio de 2004; 136 (3):463-471.
- (13) Birebent B, Lorho R, Lechartier H, de Guibert S, Alizadeh M, Vu N, y col. Las propiedades supresoras de las células T reguladoras humanas CD4+CD25+ dependen de la expresión de CTLA-4. *EUR. J. Immunol.* Diciembre de 2004; 34 (12):3485-3496.
- 20 (14) Read S, Malmstrom V, Powrie F. El antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos juega un papel esencial en la función de las células reguladoras CD25(+) CD4(+) que controlan la inflamación intestinal. *J. Exp.Med.* 17 de julio de 2000;192(2):295-302.
- (15) Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, y col. Auto-tolerancia inmunológica mantenida por las células T reguladoras CD25(+) CD4(+) que expresan constitutivamente el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos. *J. Exp.Med.* 17 de julio de 2000;192(2):303-310.
- 25 (16) Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. Las células T reguladoras CD25+ CD4+ evitan el rechazo de injertos: inmunorregulación de alorrespuestas dependientes de CTLA-4 e IL-10. *J. Immunol.* 1 de febrero de 2002; 168(3):1080-1086.
- (17) Manzotti CN, Tipping H, Perry LC, Mead KI, Blair PJ, Zheng Y, y col. La inhibición de la proliferación de células T humanas mediante CTLA-4 utiliza CD80 y requiere células T reguladoras CD25+. *EUR. J. Immunol.* octubre de 2002;32(10):2888-2896.
- 30 (18) Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, y col. Control de CTLA-4 sobre la función de las células T reguladoras de Foxp3+. *Science* 10 de octubre de 2008; 322 (5899):271-275.
- (19) Tivol EA, Boyd SD, McKeon S, Borriello F, Nickerson P, Strom TB, y col. CTLA4Ig evita la linfoproliferación y la destrucción de tejido multiorgánico letal en ratones deficientes en CTLA-4. *J. Immunol.* 1 de junio de 1997; 158 (11): 5091-5094.
- 35 (20) Waterhouse P, Bachmann MF, Penninger JM, Ohashi PS, Mak TW. Selección tímica normal, viabilidad normal y disminución de la linfoproliferación en ratones deficientes en CTLA-4 transgénicos-receptores de células T. *EUR. J. Immunol.* Agosto de 1997;27(8):1887-1892.
- (21) Kearney ER, Walunas TL, Karr RW, Morton PA, Loh DY, Bluestone JA, y col. La expansión clonal dependiente de los antígenos de una población traza de células T CD4+ específicas de antígeno *in vivo* depende de la coestimulación CD28 y es inhibida por CTLA-4. *J. Immunol.* 1 de agosto de 1995;155(3):1032-1036.
- 40 (22) Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA. La ligación de CTLA-4 bloquea la activación de las células T dependientes de CD28. *J. Exp.Med.* 1 de junio de 1996;183(6):2541-2550.
- (23) Krummel MF, Allison JP. El acoplamiento CTLA-4 inhibe la acumulación de IL-2 y la progresión del ciclo celular tras la activación de las células T en reposo. *J. Exp.Med.* 1 de junio de 1996;183(6):2533-2540.
- 45 (24) Krummel MF, Sullivan TJ, Allison JP. Respuestas superantígenas y coestimulación: CD28 y CTLA-4 tienen efectos opuestos sobre la expansión de las células T *in vivo* e *in vitro*. *Int.Immunol.* abril de 1996; 8(4):519-523.
- (25) Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Potenciación de la inmunidad antitumoral mediante bloqueo de CTLA-4. *Science* 22 de marzo de 1996; 22:271(5256):1734-1736.
- 50 (26) Kwon ED, Hurwitz AA, Foster BA, Madias C, Feldhaus AL, Greenberg NM, y col. Manipulación de señales inhibitorias y coestimuladoras de las células T para la inmunoterapia del cáncer de próstata. *Proc.Natl.Acad.Sci. EE.UU.* 22 de julio de 1997; 94(15):8099-8103.
- (27) Yang YF, Zou JP, Mu J, Wijesuriya R, Ono S, Walunas T, y col. Inducción potenciada de las respuestas de células T antitumorales por bloqueo de la molécula-4 asociado a linfocitos T citotóxicos: el efecto se manifiesta solo en las etapas restringidas que llevan tumores. *Cancer Res.* 15 de septiembre de 1997; 57(18):4036-4041.
- 55 (28) Hurwitz AA, Yu TF, Leach DR, Allison JP. El bloqueo de CTLA-4 se sinergiza con el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos procedentes de tumores para el tratamiento de un carcinoma mamario experimental. *Proc.Natl.Acad.Sci. EE.UU.* 18 de agosto de 1998;95(17):10067-10071.
- (29) Mokyr MB, Kalinichenko T, Gorelik L, Bluestone JA. Realización del potencial terapéutico del bloqueo de CTLA-4 en ratones con tumores tratados con quimioterapia a dosis bajas. *Cancer Res.* 1 de diciembre de 1998; 58 (23):5301-5304.
- 60 (30) Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, y col. Regresión del cáncer y autoinmunidad inducida por el bloqueo del antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos en pacientes con melanoma metastásico. *Proc.Natl.Acad.Sci. EE.UU.* 8 de julio de 2003; 100(14):8372-8377.
- 65 (31) Fong L, Small EJ. Anticuerpo anti-citotóxico del antígeno-4 de linfocitos T: el primero en una clase emergente de anticuerpos inmunomoduladores para el tratamiento del cáncer. *J. Clin. Oncol.* 10 de noviembre de

- 2008; 26 (32): 5275-5283.
- (32) McCoy K, Camberis M, Gros GL. La inmunidad protectora contra la infección por nematodos es inducida por el bloqueo de CTLA-4. *J. Exp.Med.* 21 de julio de 1997; 186(2):183-187.
- 5 (33) Saha B, Chattopadhyay S, Germond R, Harlan DM, Perrin PJ. CTLA4 (CD152) modula la respuesta del subconjunto Th y altera el curso de la infección experimental por *Leishmania* principal. *EUR. J. Immunol.* Diciembre de 1998;28 (12):4213-4220.
- (34) Boudewijns M, Jeurissen A, Wuyts M, Moens L, Boon L, Van Neerven JJ, y *col.* El bloqueo de CTLA-4 (CD152) potencia la respuesta de anticuerpos murinos a los polisacáridos capsulares neumocócicos. *J.Leukoc.Biol.* Noviembre de 2005; 78 (5):1060-1069.
- 10 (35) Hryniewicz A, Boasso A, Edghill-Smith Y, Vaccari M, Fuchs D, Venzon D, y *col.* El bloqueo de CTLA-4 disminuye la expresión de TGF-beta, IDO y ARN vírico en tejidos de macacos infectados con SIVmac251. *Blood*, 1 de diciembre de 2006; 108(12):3834-3842.
- (36) Kaufmann DE, Kavanagh DG, Pereyra F, Zaunders JJ, Mackey EW, Miura T, y *col.* La regulación positiva de CTLA-4 por células T CD4+ específicas del VIH se correlaciona con la progresión de la enfermedad y define una disfunción inmune reversible. *Nat. Immunol.* Noviembre de 2007; 8(11):1246-1254.
- 15 (37) Karandikar NJ, Vanderlugt CL, Walunas TL, Miller SD, Bluestone JA. CTLA-4: un regulador negativo de la enfermedad autoinmune. *J. Exp.Med.* 1 de agosto de 1996;184(2):783-788.
- (38) Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. Una perspectiva molecular de la función de CTLA-4. *Annu. Rev. Immunol.* 2006;24:65-97.
- 20 (39) Magistrelli G, Jeannin P, Herbault N, Benoit De Coignac A, Gauchat JF, Bonnefoy JY, y *col.* Una forma soluble de CTLA-4 generada por corte y empalme alternativo se expresa por células T humanas no estimuladas. *EUR. J. Immunol.* Noviembre de 1999; 29(11):3596-3602.
- (40) Oaks MK, Hallett KM, Penwell RT, Stauber EC, Warren SJ, Tector AJ. Una forma nativa soluble de CTLA-4. *Cell.Immunol.* 1 de mayo de 2000; 201(2):144-153.
- 25 (41) Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, y *col.* Asociación del gen regulador de células T CTLA4 con susceptibilidad a la enfermedad autoinmune. *Nature* 29 de mayo de 2003; 423(6939): 506-511.
- (42) Collins, AV, DW Brodie, RJ Gilbert, A. Iaboni, R. Manso-Sancho, B. Walse, DI Stuart, PA van der Merwe y SJ Davis. Las propiedades de interacción de las moléculas coestimuladoras revisitadas. *Immunity* 2002,17:201-210.
- 30 (43) Oaks, MK y KM Hallett. Tecnología punta: una forma soluble de CTLA-4 en pacientes con enfermedad tiroidea autoinmune. *J. Immunol.* 2000,164:5015-5018.
- (44) Liu, MF, CR Wang, PC Chen y LL Fung. Aumento de la expresión de la molécula de antígeno 4 asociada a linfocitos T citotóxicos solubles en pacientes con lupus eritematoso sistémico. *Scand. J. Immunol.* 2003,57:568-572.
- 35 (45) Sato, S., M. Fujimoto, M. Hasegawa, K. Komura, K. Yanaba, I. Hayakawa, T. Matsushita y K. Takehara. Los niveles séricos de CTLA-4 soluble aumentan en la esclerosis sistémica cutánea difusa. *Reumatología (Oxford)* 2004,43:1261-1266.
- (46) Wong, CK, SW Lun, FW Ko, WK Ip, DS Hui y CW. Lam. Aumento de la expresión de plasma y moléculas coestimuladoras CTLA-4 de superficie celular, CD28 y CD86 en pacientes adultos con asma alérgica. *Clin. Exp. Immunol.* 2005,141:122-129.
- 40 (47) Wong, CK, L.C. Lit, LS Tarn, EK Li y CW. Lam. Producción aberrante de moléculas coestimuladoras solubles CTLA-4, CD28, CD80 y CD86 en pacientes con lupus eritematoso sistémico. *Reumatología (Oxford)* 2005. 44:989-994.
- 45 (48) Saverino, D., R. Brizzolara, R. Simone, A. Chiappori, F. Milintenda-Floriani, G. Pesce y M. Bagnasco. CTLA-4 soluble en enfermedades tiroideas autoinmunes: relación con el estado clínico y posible papel en la desregulación de la respuesta inmune. 2007. *Clin. Immunol.* 123:190-198.
- (49) Ip, WK, CK. Wong, TF Leung y CW. Lam. Las concentraciones plasmáticas de moléculas coestimuladoras CTLA-4, CD28, CD80 y CD86 solubles reflejan la gravedad de la enfermedad del asma aguda en niños. 2006. *Pediatr. Pulmonol.* 41:674-682.
- 50 50) Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ, y *col.* Actividad biológica del bloqueo de anticuerpos del antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos en pacientes con melanoma metastásico y carcinoma de ovario previamente vacunados. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 2003;100:4712-4717.
- 55 (51) Attia P, Phan GQ, Maker AV, y *col.* La autoinmunidad se correlaciona con la regresión tumoral en pacientes con melanoma metastásico tratados con antígeno-4 de linfocitos T anti-citotóxicos. *J Clin Oncol.* 2005;23:6043-6053.
- (52) Small EJ, Tchekmedy NS, Rini BI, Fong L, Lowy I, Allison JP. Un ensayo piloto del bloqueo de CTLA-4 con anti-CTLA-4 humano en pacientes con cáncer de próstata refractario a hormonas. *Clin Cancer Res.* 2007;13:1810-1815.
- 60 (53) Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, y *col.* Regresión del cáncer y autoinmunidad inducida por el bloqueo del antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos en pacientes con melanoma metastásico. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 2003;100:8372-8377.
- (54) Korman A, Yellin M, Keler T. Inmunoterapia tumoral: actividad preclínica y clínica de anticuerpos anti-CTLA4. *Curr Opin Investig Drugs.* 2005; 6:582-591.
- 65 (55) Wolchok JD y Saenger Y. El mecanismo de actividad anti-CTLA-4 y la regulación negativa de la activación de las células T. *Oncólogo.* 2008; 13 Suppl 4:2-9.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de anticuerpo que es un anticuerpo monoclonal o una parte funcional del mismo, que se une específicamente a sCTLA-4 que esencialmente no muestra unión a CTLA-4 en las superficies de los linfocitos y que se une con un epítipo de sCTLA-4 dentro de la secuencia de aminoácidos AKEKKPSYNRGLCENAPNRARM (SEQ ID NO: 11), molécula de anticuerpo que puede potenciar las respuestas de las células linfocíticas T específicas de antígeno.
2. Una molécula de anticuerpo como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende:
- (i) un dominio VP que comprende una secuencia de aminoácidos que es un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 o a una parte funcional del mismo que comprende 3 CDR de cadena pesada que tienen las secuencias polipeptídicas respectivas de SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6 y SEQ ID NO. 7 y
- (ii) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que es un 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 o a una parte funcional del mismo que comprende 3 CDR de cadena ligera que tienen las secuencias polipeptídicas respectivas de SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9 y SEQ ID NO. 10;
- o que es una molécula de anticuerpo que comprende:
- (i) un dominio VP de anticuerpo variante que comprende una variante del dominio JMW-3B3 VP con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4 o una variante que comprende 3 VP CDR con las secuencias de aminoácidos respectivas de SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6; y
- (ii) un dominio VL de anticuerpo variante que comprende una variante del dominio JMW-3B3 VL con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2 o una variante que comprende 3 VL CDR con las secuencias de aminoácidos respectivas de SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9 y SEQ ID NO. 10,
- en la que en cada caso la secuencia variante comprende menos de 20 alteraciones, menos de 15 alteraciones, menos de 10 alteraciones en comparación con los dominios VP o VL; o menos de 5, 4, 3, 2 o 1 alteraciones de la secuencia de aminoácidos en comparación con la CDR;
- o que es una molécula de anticuerpo que comprende:
- (i) un dominio VP de anticuerpo seleccionado de entre el grupo que consiste en el dominio JMW-3B3 VP con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4 y un dominio VP que comprende una VP CDR3 con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO. 7 y dos VP CDR con las secuencias de aminoácidos respectivas de SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6; y
- (ii) un dominio VL de anticuerpo seleccionado de entre el grupo que consiste en el dominio JMW-3B3 VL con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2 y un dominio VL que comprende tres VL CDR con las secuencias de aminoácidos respectivas de SEQ ID NO. 8, SEQ ID NO. 9 y SEQ ID NO. 10.
3. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 que comprende el dominio JMW-3B3 VP con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4 y que comprende el dominio JMW-3B3 VL con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2.
4. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que compite por la unión a un epítipo de sCTLA-4 dentro de la secuencia de aminoácidos AKEKKPSYNRGLCENAPNRARM (SEQ ID NO: 11) con un dominio de unión a sCTLA-4 de un anticuerpo que comprende el dominio JMW-3B3 VP con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4 y el dominio JMW-3B3 VL con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2.
5. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que selecciona de entre el grupo que consiste en:
- (i) una molécula de anticuerpo que comprende o que consiste en un fragmento de anticuerpo o un dominio de unión a antígeno y se selecciona de entre: Fab, scFv, Fv, F(ab')₂; y
- (ii) una molécula de anticuerpo que comprende una región constante de anticuerpo, que opcionalmente es una anticuerpo completo, que opcionalmente es una anticuerpo completo humanizado.
6. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que es el anticuerpo monoclonal JMW-3B3 que tiene un dominio VP con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4 y un dominio VL con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2 o una parte funcional del mismo.
7. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Una célula huésped transformada con ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7.

9. Un proceso para producir una molécula de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, comprendiendo el proceso cultivar células huésped de acuerdo con la reivindicación 8 en condiciones para la producción de dicha molécula de anticuerpo y opcionalmente comprendiendo además, aislar y/o purificar dicha molécula de anticuerpo y opcionalmente comprendiendo además formular la molécula de anticuerpo en una composición que incluye al menos un componente adicional.

10. Un proceso para obtener una molécula de anticuerpo que se une específicamente a un epítipo de sCTLA-4 dentro de la secuencia de aminoácidos AKEKKPSYNRGLCENAPNRARM (SEQ ID NO: 11) que esencialmente no muestra unión a CTLA-4 en las superficies de los linfocitos, comprendiendo el proceso:

(i) proporcionar mediante adición, delección, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del dominio JMW-3B3 VP con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4 uno o más dominios VP cada uno de los cuales es una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio JMW-3B3 VP, y

(ii) combinar uno o más variantes de la secuencia de aminoácidos del dominio VP así provistas con uno o más dominios VL para proporcionar una o más combinaciones VP/VL;

y/o

(iii) proporcionar mediante adición, delección, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del dominio JMW-3B3 VL con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2, un dominio VL que es una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio JMW-3B3 VL, y

(iv) combinar uno o más variantes de la secuencia de aminoácidos del dominio VL así provistas con uno o más dominios VP para proporcionar una o más combinaciones VP/VL;

y

(v) ensayar las variantes de la secuencia de aminoácidos del dominio VP o la combinación o combinaciones VP/VL para identificar una molécula de anticuerpo que se une específicamente a sCTLA-4 que esencialmente no muestra unión a CTLA-4 en las superficies de los linfocitos,

o comprendiendo el proceso:

(i) proporcionar ácidos nucleicos de partida que codifican uno o más dominios VP que comprenden una CDR3 a sustituir o carecen de una región codificante CDR3, y combinar dicho ácido nucleico de partida con un ácido nucleico donador que codifica la secuencia de aminoácidos VP CDR3 de SEQ ID NO. 7 de manera que dicho ácido nucleico donador se inserta en la región CDR3 en el ácido nucleico de partida, para proporcionar ácidos nucleicos producto que codifican dominios VP; o

(ii) proporcionar ácidos nucleicos de partida que codifican uno o más dominios VL que comprenden una CDR3 a sustituir o carecen de una región codificante CDR3, y combinar dicho ácido nucleico de partida con un ácido nucleico donador que codifica la secuencia de aminoácidos VL CDR3 de SEQ ID NO. 10 de manera que dicho ácido nucleico donador se inserta en la región CDR3 en el ácido nucleico de partida, para proporcionar ácidos nucleicos producto que codifican dominios VL;

y en cualquier caso:

(iii) expresar los ácidos nucleicos de dichos ácidos nucleicos producto que codifican dominios VP y combinar opcionalmente los dominios VP así producidos con uno o más dominios VL para proporcionar combinaciones VP/VL, y/o expresar los ácidos nucleicos de dichos ácidos nucleicos producto que codifican dominios VL y que combinan los dominios VL así producidos con uno o más dominios VP para proporcionar combinaciones VP/VL;

(iv) seleccionar una molécula de anticuerpo que comprende un dominio VP o una combinación VP/VL que se une específicamente a un epítipo de sCTLA-4 dentro de la secuencia de aminoácidos AKEKKPSYNRGLCENAPNRARM (SEQ ID NO: 11) que esencialmente no muestra unión a CTLA-4 en las superficies de los linfocitos,

(v) recuperar dicha molécula de anticuerpo y/o dicho ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo que se une a sCTLA-4.

11. Un método *in vitro* que comprende poner en contacto una molécula de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 u obtenible mediante un proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10 con un sCTLA-4 que tiene la secuencia de aminoácidos AKEKKPSYNRGLCENAPNRARM (SEQ ID NO: 11).

12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11 para la detección de sCTLA-4 que tiene la secuencia de aminoácidos AKEKKPSYNRGLCENAPNRARM (SEQ ID NO: 11) en una muestra obtenida de un individuo, o para el diagnóstico o una enfermedad asociada a niveles perturbados de sCTLA-4 en un individuo.

- 5 13. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 u obtenible mediante un proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, que se une específicamente a un epítipo de sCTLA-4 dentro de la secuencia de aminoácidos AKEKKPSYNRGLCENAPNRARM (SEQ ID NO: 11) que esencialmente no muestra unión a CTLA-4 en las superficies de los linfocitos, para su uso en un método *in vivo* para potenciar selectivamente una respuesta inmune específica de antígeno a un desafío inmunogénico o antigénico en presencia de dicho anticuerpo.
- 10 14. Una molécula de anticuerpo para su uso como se reivindica en la reivindicación 13 en donde el método comprende:
- (i) administrar al sujeto la molécula de anticuerpo, o
 - (ii) exponer el plasma a la molécula de anticuerpo, y luego proporcionar el plasma al sujeto.
- 15 15. Una molécula de anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, en la que la respuesta inmune es una respuesta de células T al desafío inmunogénico o antigénico, y opcionalmente, en la que la respuesta inmune es contra un tumor inmunogénico; una vacuna; un patógeno, o inmunógeno de proteína derivada o antígenos de cualquiera de estos, y opcionalmente, en donde la molécula de anticuerpo se usa en una vacuna posterior a la infección para reforzar las respuestas inmunes después de la infección.
- 20 16. Una composición terapéutica, profiláctica o de diagnóstico que comprende una molécula de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, u obtenible mediante un proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 en una cantidad terapéuticamente eficaz, y que opcionalmente comprende además un vehículo, un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables, en la que opcionalmente la molécula de anticuerpo es un adyuvante y la composición comprende un principio activo adicional que es opcionalmente un
- 25 antígeno o un inmunógeno.

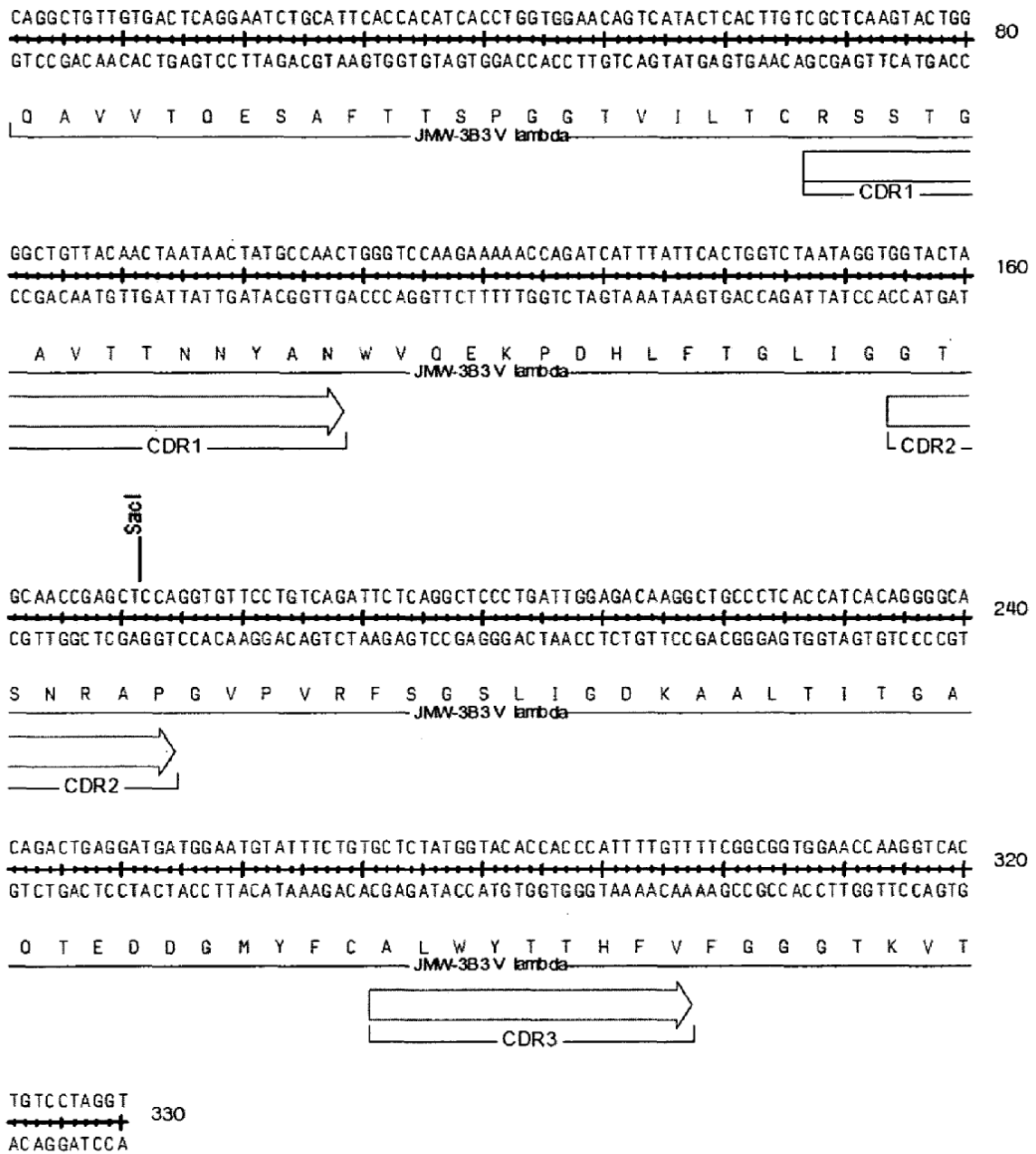


Figura 1

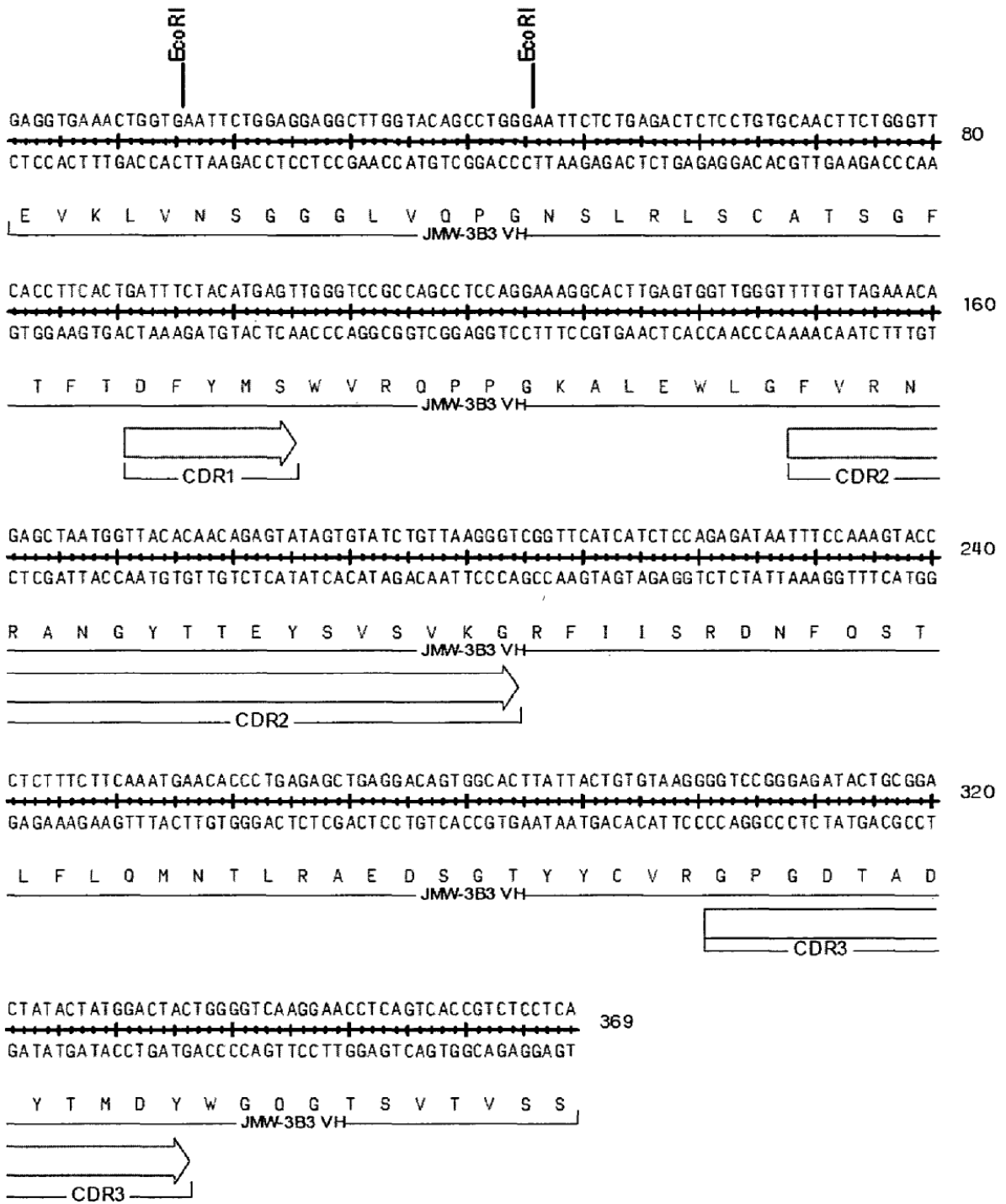


Figura 2

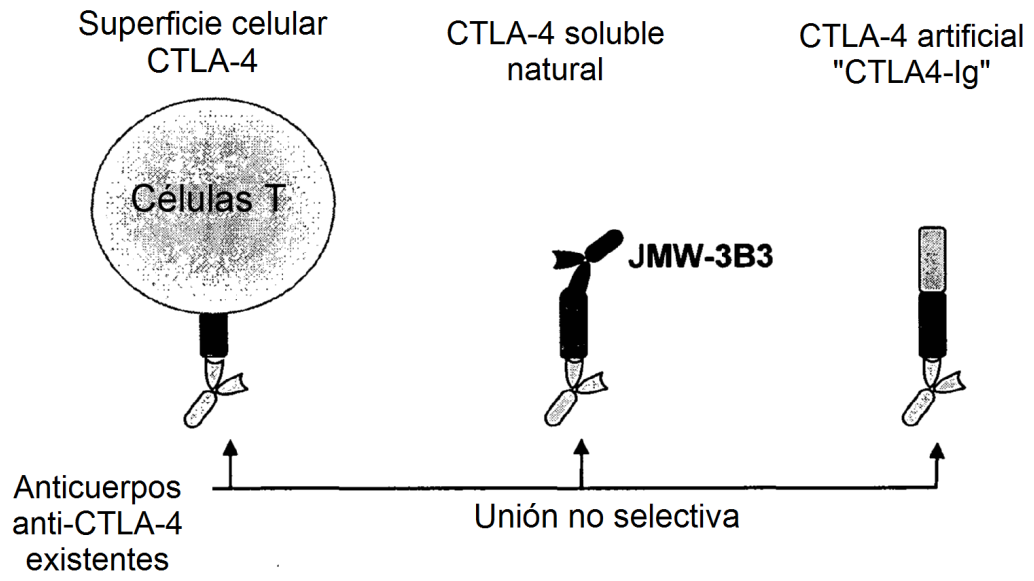


Figura 3

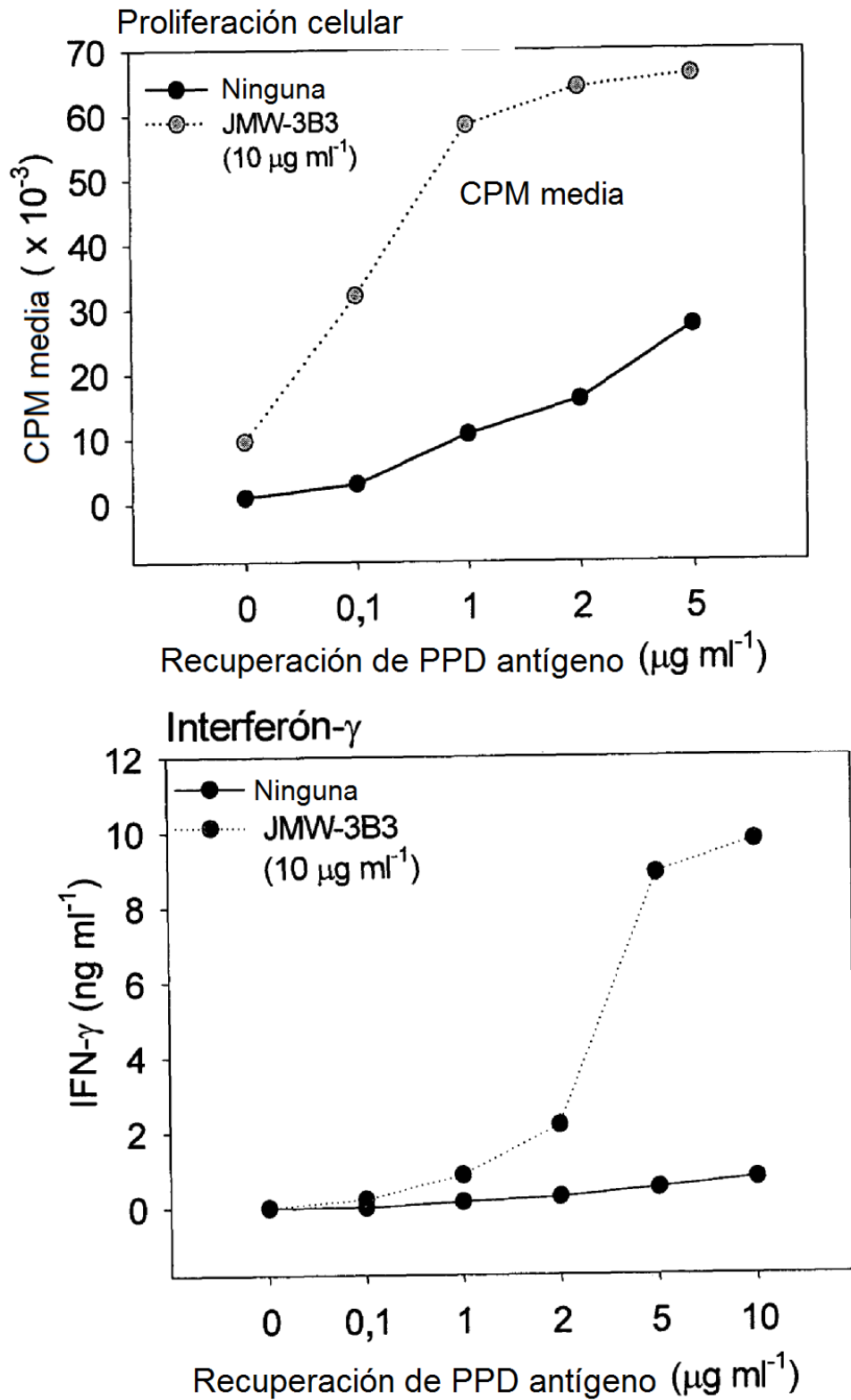


Figura 4 (a)

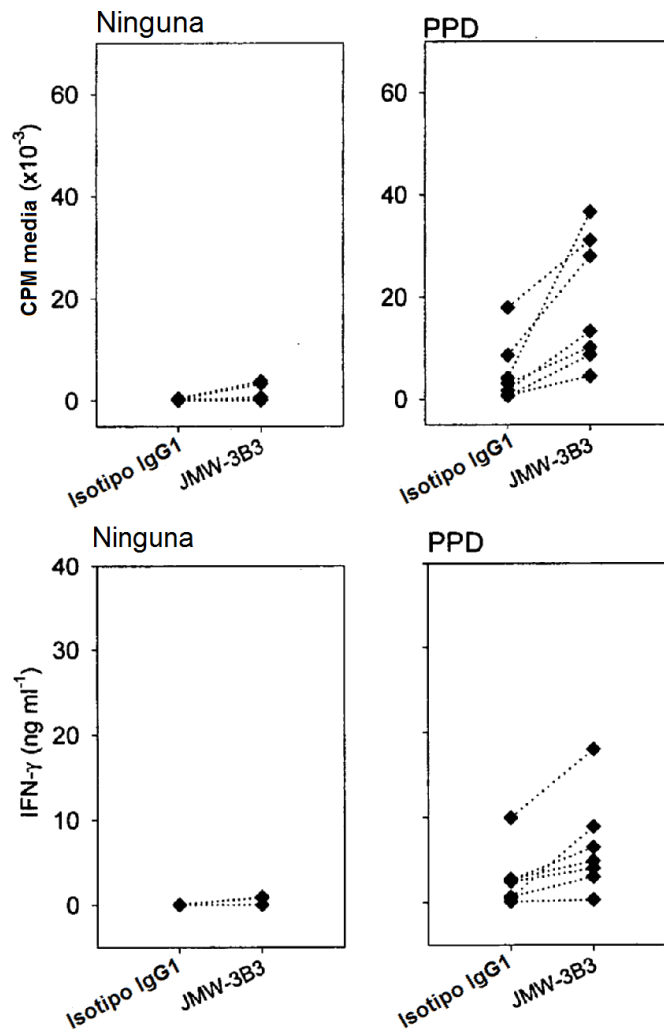


Figura 4 (b)

Comparación de mAb pan específico frente al soluble específico para la detección de CTLA-4 en sueros humanos normales

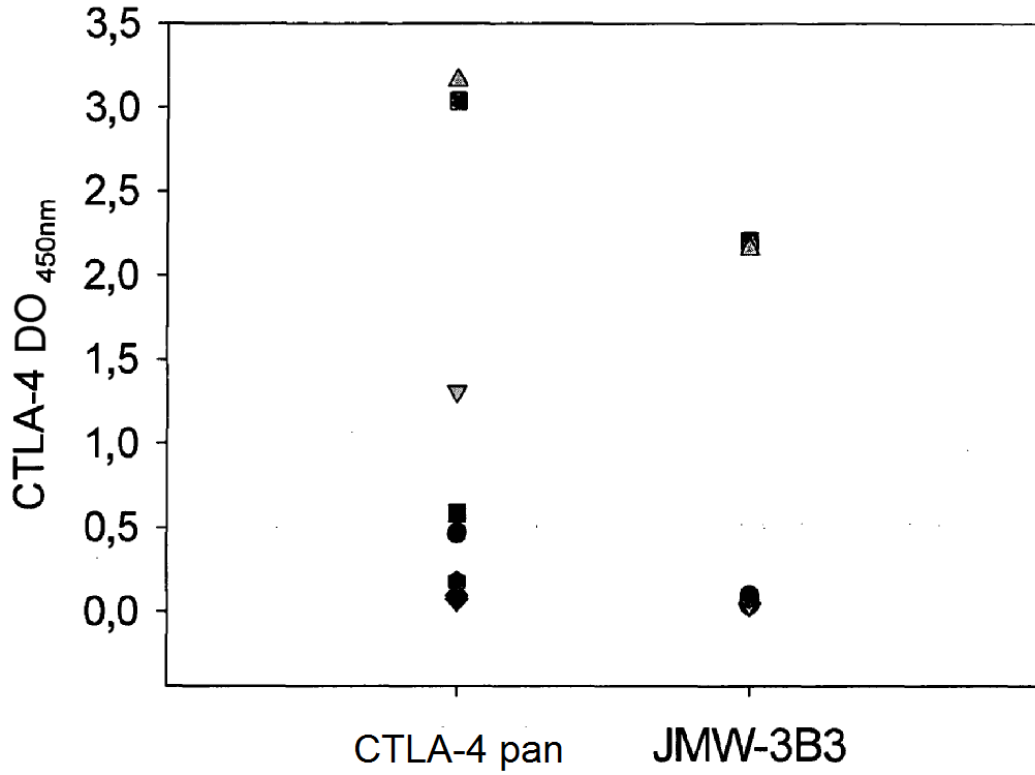


Figura 5

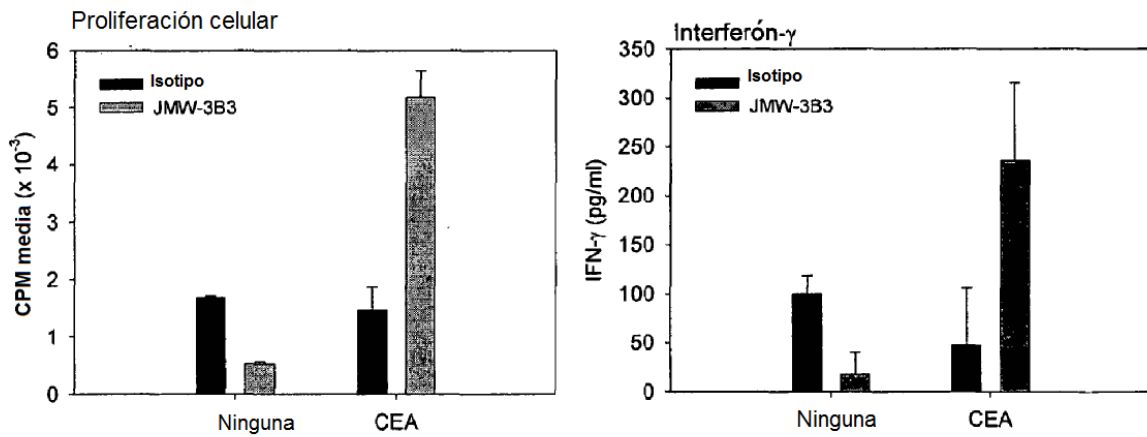


Figura 6

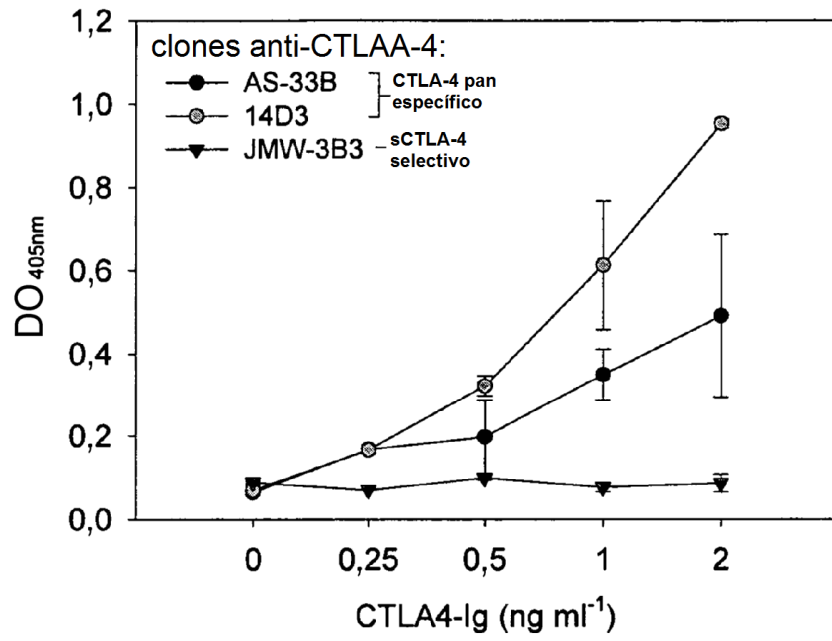


Figura 7