

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 893**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2012** **PCT/EP2012/003819**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013** **WO13037484**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2012** **E 12759019 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018** **EP 2755999**

54 Título: **Anticuerpo anti-TCR alfa-beta**

30 Prioridad:

12.09.2011 US 201161533510 P

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

14.05.2018

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)
15 Pleasant Street Connector
Framingham MA 01701-9322, US**

72 Inventor/es:

**SNELL, DANIEL;
MENRAD, ANDREAS;
LACORCIA, GINA;
SHANKARA, SRINIVAS;
QIU, HUAWEI;
PAN, CLARK y
KEBBLE, BENJAMIN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 667 893 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti-TCR alfa-beta

La presente invención se refiere a un anticuerpo específico para el receptor de linfocitos T alfa-beta ($\alpha\beta$ TCR). En particular, la invención se refiere al anticuerpo anti- $\alpha\beta$ -TCR humanizado, que procede del anticuerpo monoclonal murino BMA031 y al uso de dicho anticuerpo humanizado en terapia inmunosupresora.

Introducción

El uso de agentes inmunosupresores en enfermedades autoinmunitarias y terapia de trasplante de órganos está muy documentado; sin embargo, el proceso dista de ser óptimo. La toxicidad, las infecciones oportunistas, la cascada de citocinas y el riesgo mayor de cáncer son frecuentes en pacientes tratados con estos agentes. El uso de agentes biológicos en esta área ha mejorado el resultado para los pacientes en cierta medida, pero estos efectos secundarios continúan siendo evidentes.

El uso de antisueros policlonales contra los linfocitos es muy conocido para fines de inmunosupresión. Sin embargo, los antisueros son laboriosos de producir, muestran propiedades que varían entre lotes y la especificidad que se puede obtener utilizando antisueros policlonales es limitada.

La producción de anticuerpos monoclonales mediante la tecnología de hibridomas fue descrita por primera vez por Köhler y Milstein (*Nature* 256:495-497 (1975)). En comparación con los antisueros policlonales, los anticuerpos monoclonales (mAbs) son más específicos y tienen propiedades más uniformes. Los mAb se han utilizado con la mayor frecuencia y con éxito para terapia inmunosupresora en el trasplante de órganos clínico. Sin embargo, la mayoría de los mAb utilizados como agentes inmunosupresores para tratar enfermedades autoinmunitarias y en pacientes de trasplante tienen una capacidad inmunosupresora amplia, lo que, por tanto, influye de forma no deseada en las funciones de un amplio espectro de células inmunológicas, presumiblemente no todas implicadas en el rechazo del injerto.

Los anticuerpos monoclonales de ratón contra antígenos de receptores de la superficie de los linfocitos T se produjeron por primera vez en 1979 utilizando la tecnología de hibridomas (Kung *et al.* (1979) *Science* 206:347-349). De los tres anticuerpos monoclonales descubiertos por Kung *et al.*, un anticuerpo denominado muromonab-CD3 (OKT3) tiene una especificidad definida hacia el receptor CD3 del linfocito T, al reaccionar con más de un 95% de los linfocitos T maduros periféricos sin afectar a los timocitos inmaduros. La unión de OKT3 al complejo CD3 provoca la internalización del receptor CD3 y la pérdida de células positivas para CD3 de la periferia. El tratamiento exitoso con OKT3 se asocia con una rápida disminución de los linfocitos T positivos para CD3 de aproximadamente un 60% a menos de un 5%.

El OKT3 se ha utilizado extensamente para el tratamiento de pacientes que experimentan rechazo del aloinjerto agudo después de un trasplante de riñón (Russell, P. S., Colvin, R. B., Cosimi, A. B. (1984) *Annu. Rev. Med.* 35:63 y Cosimi, A. B., Burton, R. C., Colvin, R. B. *et al.* (1981) *Transplantation* 32:535). Además, se utilizaron complemento de conejo y OKT3 para purgar los linfocitos T maduros de la médula del donante para prevenir la enfermedad del injerto frente a huésped aguda (GVHD, por sus siglas en inglés) en el trasplante de médula ósea alogénico (Prentice, H. G., Blacklock, H. A., Jarossy, G. *et al.*, (1982) *Lancet* 1:700 y Blacklock, H. A., Prentice, H. G., Gilmore, M. J., *et al.* (1983) *Exp. Hematol.* 11:37). Aunque parece que el tratamiento con OKT3 es eficaz para la prevención de la GVHD en el trasplante de médula ósea alogénico para la leucemia aguda, un tratamiento combinado *in vitro/in vivo* con OKT3 no pudo prevenir la GVHD durante una terapia para la inmunodeficiencia combinada grave (Hayward, A. R. *et al.* (1982) *Clin. Lab. Observ.* 100:665). El tratamiento de linfocitos con OKT3 provoca varias respuestas incompatibles con la supresión inmunitaria que incluyen la activación de los linfocitos T, la producción de mediadores inmunitarios y la modulación de T3. Se ha postulado que el complejo T3-antígeno reconocido por los mAb contra CD3 (p. ej., OKT3) desempeña una función crucial durante la activación de los linfocitos T. Los linfocitos T alfa-beta reconocen los ligandos peptídicos de MHC por medio de un conjunto proteico multimérico denominado complejo receptor de antígenos de linfocitos T (TCR) $\alpha\beta$ -CD3. Esta estructura se compone de un dímero de TCR $\alpha\beta$ variable que se une a antígenos y tres dímeros invariantes (CD3 $\gamma\epsilon$, $\delta\epsilon$ y $\zeta\zeta$) que están implicados en el transporte superficial, estabilización y transducción de señales TCR CD3. El receptor de linfocitos T alfa-beta ($\alpha\beta$ TCR) se expresa en la mayoría (aprox. un 95%) de los linfocitos T y tiene una función crítica en la activación de los linfocitos T mediante el acoplamiento de un antígeno mostrado en el MHC. El 5% de linfocitos restante son positivos para el receptor de linfocitos T gamma-delta ($\gamma\delta$ TCR). La población de linfocitos positivos para $\gamma\delta$ TCR desempeña una función importante en la respuesta inmunitaria innata en la defensa contra las infecciones oportunistas de origen fúngico, viral y bacteriano. Los linfocitos T gamma-delta no desempeñan ninguna función en el rechazo al injerto en un trasplante. Por tanto, utilizar como diana la población de linfocitos positivos para $\alpha\beta$ TCR y dejar la población positiva para $\gamma\delta$ TCR debería permitir una eficacia terapéutica significativa a la vez que se mantiene una protección inmunitaria basal frente a las infecciones oportunistas.

El anticuerpo monoclonal IgG2b de ratón BMA031 (Borst *et al.* (Nov. 1990) *Hum. Immunol.* 29(3):175-88; EP0403156) es específico para el determinante común en el complejo TCR alfa-beta/CD3 y no se une al TCR gamma-delta. El BMA031 es muy inmunosupresor y puede inducir la apoptosis de los linfocitos T activados mediante un

mecanismo de muerte celular inducida por activación (AICD) (Wesseborg *et al.*, (mayo 1993) *J. Immunol.* 150(10): 4338-4345). Este inhibe *in vitro* una reacción de linfocitos mixtos y ha mostrado una eficacia clínica preliminar en la prevención del rechazo al injerto en varias situaciones de trasplante de órganos sólidos, así como en el tratamiento de la enfermedad de injerto frente a huésped aguda (aGVHD) (Kurre *et al.* (feb 1989) *Transplant Proc.* 21(1): 1017-1019). El BMA031 no se acopla a receptores Fc gamma humanos (FcγR) en la mayoría de la población humana (aproximadamente un 10% de los seres humanos poseen FcγR que sí se unen al isotipo IgG2b de ratón). Como tal, el anticuerpo no causa la activación de los linfocitos T mediante entrecruzamiento del receptor de linfocitos T y, por tanto, no induce la activación de los linfocitos T o la liberación de citocinas asociada. En este sentido, su perfil es muy preferible sobre el de OKT3. Sin embargo, el BMA031 es un anticuerpo murino y, como tal, no es adecuado para una dosificación repetida en sujetos humanos en vista de la respuesta a anticuerpos antiratón humanos (HAMA, por sus siglas en inglés) provocada en ellos.

Se han descrito varias versiones humanizadas de BMA031 (remítase al documento EP 0403156; también Shearman *et al.*, (1991) *J. Immunol.* 147:4366-4373). Como se señala en el documento EP0403156, un mero injerto de CDR no fue eficaz para mantener la unión a antígenos. Un clon con modificaciones del marco significativas, EUCIV3, se unió con éxito a linfocitos T; sin embargo, como se señala en el documento EP0403156, la unión al αβTCR no es tan eficaz como la del anticuerpo BMA031 progenitor según se determinó mediante ensayos de competición por citometría de flujo. Los inventores también han mostrado que la capacidad del EuCIV3 para inhibir una respuesta inmunitaria *in vitro* es significativamente reducida en comparación con el BMA031 (remítase a la Fig. 2). Además, el EuCIV3 se generó originalmente en una estructura de IgG4 o IgG1 humana de origen natural que aún mantiene la unión a FcγR. Por tanto, estos anticuerpos humanizados permitieron la activación, la proliferación de linfocitos T y la liberación de citocinas inherente y, como tales, fueron significativamente diferentes respecto a las propiedades originales del BMA031.

La modificación de la glicosilación de anticuerpos se conoce en la técnica. Por ejemplo, se tiene constancia de que los anticuerpos aglicosilados pueden tener una funcionalidad extensamente modificada; remítase a Boyd *et al.* (1996) *Mol. Immunol.* 32:1311-1318. Sin embargo, no se han descrito previamente formas aglicosiladas de BMA031 humanizado o derivados con patrones de glicosilación modificados.

Existe la necesidad en la técnica, por tanto, de un anticuerpo humanizado anti-αβTCR que mejore las propiedades de unión del EUCIV3 y mantenga convenientemente las propiedades no activadoras de linfocitos T e inmunosupresoras del BMA031.

Compendio de la invención

En un primer aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende las CDR de BMA031 y mantiene la afinidad de unión del BMA031 por su antígeno cognado. En una primera realización, dicho anticuerpo humanizado comprende una región variable de cadenas pesadas que comprende las CDR expuestas en las SEQ ID NO: 7, 12 o 13 y el marco IGH3-23 humano expuesto en la SEQ ID NO: 17, donde la posición 6 del marco es un residuo de donante; en una realización alternativa, la posición 18 del marco es un residuo de donante. Opcionalmente, las posiciones 49 y/o 69 del marco son residuos de donante.

En una segunda realización, el anticuerpo monoclonal humanizado comprende una región variable de cadenas pesadas que comprende las CDR expuestas en las SEQ ID NO: 15 o 16 y el marco IGHV1-3*01 humano expuesto en la SEQ ID NO: 18, donde una o más de las posiciones 38, 44 y/o 48 del marco es un residuo de donante; en una realización alternativa, las posiciones 44 y 48 del marco son residuos de donante.

En una tercera realización, el anticuerpo monoclonal humanizado comprende una región variable de cadenas ligeras que comprende las CDR expuestas en la SEQ ID NO: 14 y el marco IGKV3-11*01 humano expuesto en la SEQ ID NO: 19, donde las posiciones del marco 70 y/o 71 son residuos de donante. Opcionalmente, la posición 46 es un residuo de donante.

Algunos ejemplos de anticuerpos de acuerdo con la primera realización incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadenas pesadas seleccionada a partir de las cadenas pesadas que comprenden las secuencias expuestas en la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 12 y la SEQ ID NO: 13, y una secuencia de región variable de cadenas ligeras que comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 14.

Algunos ejemplos de anticuerpos de acuerdo con la segunda realización incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadenas pesadas seleccionada a partir de las cadenas pesadas que comprenden las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 y una región variable de cadenas ligeras que comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 14. Los anticuerpos humanizados de acuerdo con las realizaciones descritas son versiones humanizadas del BMA031. Sus estructuras primarias difieren de las del anticuerpo humanizado EuCIV3, que tiene una unión menor al αβTCR en comparación con el BMA031.

En el listado de secuencias, las CDR se indican por medio de anotación o subrayado. Los marcos son todas las secuencias fuera de las CDR, que se definen de acuerdo con el sistema de numeración "Kabat" y se extienden, cuando proceda, mediante el uso de la definición de CDR "IMGT". Si no se indica que se modifique un residuo del

marco para que coincida con una secuencia de donante, se sobreentenderá normalmente que es un residuo de aceptor.

Los anticuerpos humanizados pueden comprender una región constante. En una realización, la región constante es de origen humano.

- 5 Los anticuerpos humanizados de la invención se pueden modificar adicionalmente mediante diseño de Fc. Las inmunoglobulinas son responsables del entrecruzamiento de receptores Fc γ , que puede dar lugar a la activación de linfocitos T constitutiva para anticuerpos antilinfocitos T. Con el fin de evitar el entrecruzamiento de Fc γ , se pueden modificar los anticuerpos para eliminar la región Fc tal como mediante la generación de fragmentos Fab o Fv; sin embargo, las inmunoglobulinas truncadas carecen de las funciones efectoras beneficiosas y exhiben una semivida
- 10 en suero inferior. Por tanto, la región Fc del anticuerpo humanizado se puede modificar para prevenir el entrecruzamiento de Fc γ . Algunas técnicas ilustrativas incluyen la generación de inmunoglobulinas aglicosiladas, por ejemplo, mediante la modificación de la región Fc mediante una mutación N297Q. Las inmunoglobulinas que no pueden unirse a Fc γ también son descritas por Armour *et al.*, (1999) *Eur. J. Immunol.* 29:2613-2624. La modificación efectuada en una IgG1 se conoce como la modificación Δ b y consiste en una combinación de la mutación Δ a, en la
- 15 que los residuos de IgG se sustituyen en las posiciones 327, 330 y 331, y los residuos de IgG2 se sustituyen en las posiciones 233-236 y la mutación Δ b, en la que el residuo 236 se elimina. En otra realización, el patrón de glicosilación de los anticuerpos de acuerdo con la invención se puede modificar.

En una realización, el anticuerpo comprendía una o más de las mutaciones S298N, T299A e Y300S.

- 20 En realizaciones, el anticuerpo comprende dos o más de las mutaciones N297Q, S298N, T299A e Y300S. Por ejemplo, se proporciona un anticuerpo humanizado que comprende las mutaciones múltiples N297Q/S298N/Y300S, S298N/T299A/Y300S o S298N/Y300S.

- 25 En un segundo aspecto, se proporciona un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende las CDR del BMA031 y mantiene las propiedades supresoras de linfocitos T del BMA031. Dicho anticuerpo humanizado comprende preferentemente una región variable de cadenas pesadas que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 12, 13, 15 o 16 y una región variable de cadenas ligeras que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 14.

- 30 En un tercer aspecto, se proporciona un ácido nucleico que codifica al menos una región variable de cadenas pesadas de un anticuerpo monoclonal humanizado de acuerdo con los aspectos precedentes de las realizaciones descritas. El ácido nucleico puede codificar regiones constantes y variables del anticuerpo humanizado. Las cadenas ligeras y pesadas se pueden codificar en ácidos nucleicos separados o en la misma molécula de ácido nucleico.

- 35 De acuerdo con un cuarto aspecto, se proporciona una célula que expresa un ácido nucleico de acuerdo con el aspecto precedente. La célula es, por ejemplo, una célula adaptada para que exprese moléculas de anticuerpo en cultivo. El ácido nucleico puede incluir secuencias de señalización y/u otras secuencias o modificaciones que sean necesarias para la expresión de la molécula de anticuerpo en la célula, y/o la secreción de la molécula de anticuerpo a partir de la célula o que las modulen.

En una realización adicional, se proporciona un anticuerpo humanizado tal como se ha descrito en los aspectos anteriores, para su uso en la supresión de una respuesta mediada por linfocitos T en un sujeto.

- 40 Por ejemplo, la respuesta mediada por linfocitos T puede estar implicada en una afección seleccionada a partir de trasplante de tejidos, que incluye trasplante de órganos sólidos y trasplante de tejidos compuestos, injerto de tejidos, esclerosis múltiple y diabetes tipo 1.

También se describe un método para tratar a un sujeto que padece una afección que implica una respuesta mediada por linfocitos T aberrantes que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una dosis farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo de acuerdo con las realizaciones descritas.

- 45 Por tanto, se han generado anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR no activadores humanizados que no inducen liberación de citocinas que puedan modular selectivamente el $\alpha\beta$ TCR e inducir la apoptosis de los linfocitos T positivos para $\alpha\beta$ TCR activados. Estos anticuerpos se han generado para su uso como agentes inmunosupresores en enfermedades mediadas por linfocitos T. Estos anticuerpos se han generado mediante la humanización de un anticuerpo anti- $\alpha\beta$ TCR de ratón BMA031 y mediante el diseño de Fc de los anticuerpos humanizados para evitar el
- 50 acoplamiento de receptores Fc gamma. Los anticuerpos de acuerdo con las realizaciones descritas mantienen la afinidad de unión del BMA031, al contrario que las versiones humanizadas de BMA031 disponibles en la técnica. Además, tal como se muestra en ensayos de diferenciación *in vitro*, las propiedades inmunosupresoras de los anticuerpos de acuerdo con las realizaciones descritas son superiores a las del BMA031. Además, al contrario que los anticuerpos BMA031 humanizados de la técnica anterior, los anticuerpos de acuerdo con las realizaciones
- 55 descritas no inducen la liberación de citocinas en PBMC normales.

También se describe un anticuerpo que comprende un Fc modificado, en el que dicho Fc modificado comprende un patrón de glicosilación modificado que reduce la unión al receptor FcγR, que comprende una o más de las mutaciones S298N, T299A e Y300S.

En una realización, el anticuerpo comprende dos o más de las mutaciones N297Q, S298N, T299A e Y300S.

- 5 En realizaciones, el anticuerpo comprende las mutaciones múltiples N297Q/S298N/Y300S, S298N/T299A/Y300S o S298N/Y300S.

Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo tal como se ha descrito en aspectos anteriores de la invención.

- 10 También se describe un anticuerpo multiespecífico que comprende al menos una cadena pesada de un primer dominio de unión tal como se ha descrito en los aspectos anteriores de la invención y un segundo dominio de unión específico para un antígeno específico de tumores.

En una realización, el primer dominio de unión comprende una cadena pesada de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

El anticuerpo multiespecífico puede comprender muchas conformaciones diferentes; en una realización, comprende un scFv anti-TCR/CD3 y un scFv antitumoral.

- 15 En una realización, el anticuerpo multiespecífico es biespecífico.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1. El BMA031 se une con más intensidad a αβTCR en comparación con EuCIV3.

Competición de la unión del anticuerpo BMA031 marcado con PE por parte de los anticuerpos BMA031, MolgG2b, BMA031 HulgG1 y EuCIV3 HulgG1. El EuCIV3 tiene una potencia menor en comparación con el BMA031.

- 20 **Fig. 2. El EuCIV3 es menos potente que el BMA031 en un ensayo de diferenciación *in vitro* (IVE).**

Gráfico que muestra la pérdida de rendimiento del anticuerpo humanizado EuCIV3 en un ensayo biológico, en comparación con el anticuerpo BMA031 progenitor. Los linfocitos T CD8+ se trataron con anticuerpos anti-αβTCR con varias concentraciones (eje x) y se cocultivaron con células dendríticas autólogas pulsadas con el péptido de CMV 495-503 (pp65) durante siete días.

- 25 **Fig. 3. El HEBE1 se une a αβTCR de forma comparable al BMA031 en un ensayo de competición.**

Competición de la unión del anticuerpo BMA031 marcado con PE por parte de los anticuerpos BMA031 HulgG1, HEBE1 HulgG1 y EuCIV3 HulgG1. El EuCIV3 tiene una potencia menor, en comparación con el BMA031 y el HEBE1.

Fig. 4. El HEBE1 tiene una potencia similar al EuCIV3 en un ensayo de diferenciación *in vitro* (IVE).

- 30 El ensayo de IVE se llevó a cabo tal como se ha descrito al respecto de la Fig. 2.

Fig. 5. Representación esquemática que muestra las rondas iterativas de mutagénesis de los dominios variables anti-αβTCR.

- 35 El marco en la caja sombreada representa la región FR donde recaen ciertos residuos de ratón. Los residuos sombreados en la primera fila de mutaciones son los aminoácidos de ratón que son útiles para mantener la constante de disociación. Los residuos sombreados en la segunda fila de mutaciones son los residuos de ratón alrededor de las regiones CDR que se mantuvieron durante el proceso de germinalización final.

Fig. 6. El anticuerpo humanizado optimizado tiene una constante de disociación mejorada, en comparación con el BMA031.

- 40 La cinética de la disociación de los anticuerpos del αβTCR en los linfocitos T se midió por citometría de flujo. El BMA031 tuvo una constante de disociación mejor, en comparación con EuCIV3 y HEBE1. Mediante la optimización del dominio de unión del HEBE1, los inventores fueron capaces de mejorar la constante de disociación del HEBE1.H10, en comparación con el BMA031.

Fig. 7. El anticuerpo humanizado optimizado tiene una constante de disociación mejorada, en comparación con el BMA031.

- 45 La cinética de la disociación de los anticuerpos del αβTCR en los linfocitos T se midió por citometría de flujo. Mediante la optimización del dominio de unión del HEBE1, los inventores fueron capaces de mejorar la constante de disociación del HEBE1.H66, en comparación con el BMA031.

Fig. 8. El anticuerpo humanizado optimizado tiene una constante de disociación mejorada, en comparación con el BMA031 en los formatos tanto Δ ab como aglicosilado.

La cinética de la disociación de los anticuerpos del $\alpha\beta$ TCR en los linfocitos T se midió por citometría de flujo.

Fig. 9. La optimización del HEBE1 da lugar a una funcionalidad equivalente a la de BMA031.

- 5 Ensayo de IVE tal como se ha descrito en la Fig. 4. El BMA031 inhibió la diferenciación de los linfocitos T CD8+, ya que estos no pudieron lisar dianas específicas de manera dependiente de la dosis. El anticuerpo humanizado progenitor, el HEBE1, no fue tan potente como el BMA031 y solamente pudo inhibir la diferenciación a la dosis más alta (se observaron resultados similares con un segundo Ab humanizado no mejorado HEBE1 H13). Se realizaron mejoras adicionales al anticuerpo humanizado, HEBE1 H10, que tuvo una potencia equivalente al BMA031 en este ensayo.

Fig. 10. Datos de IVE con anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR.

Tanto los anticuerpos de la serie GL1 BM como HEBE1 mostraron mejoras en los resultados de IVE, en comparación con el BMA031.

- 15 **Fig. 11. Células positivas para antígeno del ensayo de IVE determinado por la unión a tetrámeros específicos para antígenos.**

Las células que son positivas para antígenos (es decir, se han diferenciado en un ensayo de IVE) se pueden unir a una molécula de tetrámero de MHC. Cuando el ensayo de IVE se llevó a cabo en presencia de un anticuerpo que había podido evitar la diferenciación de los linfocitos T respecto al antígeno, hubo menos células que pudieran unirse al tetrámero de MHC al final del ensayo.

- 20 **Fig. 12. Proliferación de PBMC en presencia de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR, OKT3 y microesferas estimuladoras.**

No se observó actividad estimuladora de OKT3 en los anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR en esta comparación.

Fig. 13. Liberación de citocinas a partir de PBMC en presencia de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR.

El perfil de liberación de citocinas de los anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR fue similar al perfil demostrado por el BMA031.

Fig. 14. Liberación de IFN-gamma a partir de linfocitos T en un ensayo de IVE.

- 25 Los linfocitos T CD8+ se trataron con anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR con varias concentraciones (remítase a la Fig. 2, eje x) y se cocultivaron con células dendríticas autólogas pulsadas con el péptido de CMV 495-503 (pp65) durante siete días en un ensayo de diferenciación in vitro (IVE). En este ensayo se midió la liberación de IFN-gamma.

Fig. 15. Apoptosis inducida por activación mediante anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR

- 30 Se indujo la apoptosis de linfocitos T CD8+ estimulados por antígenos mediante la unión de los anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR BMA031 y HEBE1 H66. La capacidad del HEBE1 H66 para inducir la apoptosis fue mayor, en comparación con el BMA031.

Fig. 16. Aislamiento de los anticuerpos aglicosilados y con mutaciones de glicosilación.

Gel teñido con azul de Coomassie que muestra la expresión y la purificación de las mutaciones de glicosilación.

Fig. 17. Unión de los anticuerpos contra $\alpha\beta$ TCR con mutaciones a Fc γ R1IIa humano utilizando Biacore.

- 35 Se utilizó Biacore para evaluar la unión a Fc γ R1IIa humano recombinante (V518 & F158).

Fig. 18. Unión de los anticuerpos contra $\alpha\beta$ TCR con mutaciones a Fc γ RI humano utilizando Biacore.

Se utilizó Biacore para evaluar la unión a Fc γ RI y humano recombinante.

Fig. 19. Liberación de citocinas a partir de PBMC en presencia de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR con mutaciones de glicosilación (día 2).

- 40 El perfil de liberación de citocinas para TNFa, GM-CSF, IFN γ e IL-10 de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR fue similar al perfil demostrado por BMA031 y H66 delta AB.

Fig. 20. Liberación de citocinas a partir de PBMC en presencia de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR con mutaciones de glicosilación (día 2).

- 45 El perfil de liberación de citocinas para IL6, IL4 e IL2 de los anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR fue similar al perfil demostrado por BMA031 y H66 delta AB.

Fig. 21. Liberación de citocinas a partir de PBMC en presencia de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR con mutaciones de glicosilación (día 4).

El perfil de liberación de citocinas para TNFa, GM-CSF, IFN γ e IL10 de los anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR fue similar al perfil demostrado por BMA031 y H66 delta AB.

5 **Fig. 22. Liberación de citocinas a partir de PBMC en presencia de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR con mutaciones de glicosilación (día 4).**

El perfil de liberación de citocinas para IL6, IL4 e IL2 de los anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR fue similar al perfil demostrado por BMA031 y H66 delta AB.

Fig. 23. Perfiles de unión de los TRACERS

- 10 Perfiles de unión de anticuerpos biespecíficos tanto a las células diana tumorales como a los linfocitos T humanos evaluados por citometría de flujo.

Fig. 24. Actividad citotóxica de diferentes ramas de reclutamiento de linfocitos T.

Se ha creado un grupo de anticuerpos BMA031 humanizados y a partir de este grupo se ha seleccionado una serie de anticuerpos que presentan actividad citotóxica frente a líneas celulares que expresan antígenos tumorales.

15 **Fig. 25. Perfil de liberación de citocinas de diferentes ramas de reclutamiento de linfocitos T.**

Un grupo de TRACERS con diferentes ramas de reclutamiento de linfocitos T muestra perfiles de liberación de citocinas similares. Se detectan grandes cantidades de citocinas después de la activación de los linfocitos T en presencia de células diana, mientras que en presencia de solamente PBMC humanas no estimuladas los niveles de citocinas observados son significativamente más bajos.

20 **Fig. 26. Unión de anticuerpos para CD52 con mutaciones a Fc γ RIIIa humano utilizando Biacore.**

Se utilizó Biacore para evaluar la unión de anti-CD52 modificados a Fc γ RIIIa humano recombinante (V158). Se utilizaron anti-CD52 que comprendían mutaciones S298N/Y300S en el dominio Fc para evaluar la función efectora de la molécula modificada. A: unión al péptido CD52. B: unión a Fc γ RIIIa (V158). C: unión de un control a FcRn de ratón.

25 **Descripción detallada de la invención**

A menos que se indique de otro modo, todos los términos y expresiones técnicos y científicos utilizados en la presente tienen los mismos significados que sobreentiende normalmente un experto en la técnica a la que esta invención pertenece. Se pueden utilizar cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente en los métodos o técnicas de la presente invención.

- 30 Los métodos y técnicas de la presente solicitud se llevan a cabo por lo general de acuerdo con métodos convencionales muy conocidos en la técnica y tal como se ha descrito en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva a menos que se indique de otro modo. Remítase a, p. ej., Gennaro, A. R., ed. (1990) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18.^a ed. Mack Publishing Co.; Hardman, J. G., Limbird, L. E. y Gilman, A. G., eds. (2001) *The Pharmacological Basis of therapeutics*, 10.^a ed., McGraw-Hill Co.; Colowick, S. et al., eds. *Methods In Enzymology*, Academic Press, Inc.; Weir, D. M. y Blackwell, C. C., eds. (1986) *Handbook of Experimental Immunology*, Vol. I-IV, *Blackwell Scientific Publications*; Maniatis, T. et al., eds. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.^a edición, vol. I-III, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*; Ausubel, F. M. et al., eds. (1999) *Short Protocols in Molecular Biology*, 4.^a edición, John Wiley & Sons; Ream et al. eds. (1998) *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, *Academic Press*;
- 35 Newton, C. R. y Graham, A. eds. (1997) *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2.^a ed., Springer-Verlag.

- Un anticuerpo monoclonal humanizado, tal como se denomina en la presente, es un anticuerpo que está compuesto por un marco de anticuerpo humano, en el que se han injertado regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo no humano. También se pueden llevar a cabo modificaciones en el marco de aceptor humano. Los procedimientos para el diseño y la producción de anticuerpos humanizados son muy conocidos en la técnica y se han descrito, por ejemplo, en Cabilly et al., Patente de EE. UU. n.º 4 816 567; Cabilly et al., Solicitud de Patente europea 0 125 023; Boss et al., Patente de EE. UU. n.º 4 816 397; Boss et al., Solicitud de Patente europea 0 120 694; Neuberger, M. S. et al., el documento WO 86/01533; Neuberger, M. S. et al., Solicitud de Patente europea 0 194 276 B1; Winter, Patente de EE. UU. n.º 5 225 539; Winter, Patente de EE. UU. n.º 5 225 539; Winter, Solicitud de Patente europea 0 239 400; Padlan, E. A. et al., Solicitud de Patente europea 0 519 596. Algunos detalles adicionales sobre los anticuerpos, anticuerpos humanizados, anticuerpos diseñados humanos y métodos para su preparación se pueden encontrar en Kontermann, R. y Dübel, S. eds. (2001, 2010) *Antibody Engineering*, 2.^a ed., Springer-Verlag, Nueva York, NY.
- 45
- 50

El término “anticuerpo”, a menos que se indique de otro modo, se utiliza para referirse a anticuerpos enteros, así como a los fragmentos que se unen a antígenos de tales anticuerpos. Por ejemplo, el término engloba moléculas de IgG de cuatro cadenas, así como fragmentos de anticuerpos.

5 Tal como se utiliza en la presente, la expresión “fragmentos de anticuerpo” se refiere a partes de un anticuerpo de longitud completa intacto, por ejemplo, tal como se describe adicionalmente más adelante.

Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM; y de cualquier subclase tal como IgG1 o IgG4. Las diferentes clases y subclases de inmunoglobulina tienen diferentes propiedades que pueden ser convenientes en diferentes aplicaciones. Por ejemplo, los anticuerpos IgG4 tienen uniones reducidas a receptores Fc.

10 La especificidad, en el contexto de los anticuerpos descritos en la presente, se refiere a que el anticuerpo reivindicado se pueda unir selectivamente a su antígeno cognado definido, que es el complejo $\alpha\beta$ TCR.CD3. Los anticuerpos de la invención se unen al complejo $\alpha\beta$ TCR.CD3 expresado en las células.

15 El complejo $\alpha\beta$ TCR/CD3 humano es el complejo receptor de linfocitos T presentado en la superficie de los linfocitos T. Remítase a, Kuhns *et al.*, (2006) *Immunity* 24: 133-139. Este complejo es utilizado como diana por el anticuerpo monoclonal murino BMA031 (remítase a la Solicitud de Patente europea EP 0 403 156; SEQ ID NO: 1 y 2).

20 Las inmunoglobulinas de origen natural tienen una estructura central común en la que dos cadenas ligeras idénticas (de aproximadamente 24 kD) y dos cadenas pesadas idénticas (de aproximadamente 55 o 70 kD) forman un tetrámero. La parte amino terminal de cada cadena se conoce como la región variable (V) y se puede distinguir de las regiones constantes (C) más conservadas del resto de cada cadena. Dentro de la región variable de la cadena ligera (también denominada el dominio V_L) hay una parte C terminal conocida como la región J. Dentro de la región variable de la cadena pesada (también denominada el dominio V_H) hay una región D además de la región J. La mayor parte de la variación de secuencia de aminoácidos en las inmunoglobulinas está confinada a tres ubicaciones separadas en las regiones V conocidas como regiones hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que están directamente implicadas en la unión a antígenos. Partiendo del extremo amino, estas regiones se denominan CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente. Las CDR se mantienen en su lugar mediante regiones del marco más conservadas (FR). Partiendo del extremo amino, estas regiones se denominan FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente. Las ubicaciones de las regiones CDR y FR y un sistema de numeración han sido definidos por Kabat *et al.* (Kabat E. A. *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos, Imprenta del Gobierno de EE. UU. (1991) y actualizaciones de este que se pueden encontrar por internet). Además, los límites de las regiones CDR se han definido adicionalmente mediante la nomenclatura IMGT.

35 Las regiones variables de los anticuerpos de acuerdo con las realizaciones descritas se pueden encontrar en las SEQ ID NO: 5-7 y 12-16 y se pueden obtener humanizando el BMA031, es decir, transfiriendo las CDR del BMA031 a un marco humano. Se describen dos series de anticuerpos humanizados, la serie HEBE1, que comprende las SEQ ID NO: 5-7, 12 y 13, y la serie GL1BM, que comprende las regiones variables de cadenas pesadas tal como se muestran en las SEQ ID NO: 8, 15 y 16. En ambos casos, la región variable de cadenas ligeras utilizada es tal como se muestra en la SEQ ID NO: 14 (GL1BM VK43).

Los marcos humanos utilizados son IGH3-23 en el caso de HEBE1 e IGHV1-3*01 e IGKV3-11*01 en el caso de GL1BM.

40 Las regiones constantes pueden proceder de cualesquiera regiones constantes de anticuerpos humanos. Los genes de las regiones variables se pueden clonar en vectores de expresión en fase con los genes de las regiones constantes para expresar cadenas de inmunoglobulina pesadas y ligeras. Tales vectores de expresión se pueden transfectar en células hospedadoras que produzcan anticuerpos para la síntesis de anticuerpos.

45 Las regiones constantes y variables de los anticuerpos humanos pueden proceder de bases de datos de secuencias. Por ejemplo, existen secuencias de inmunoglobulinas disponibles en la base de datos IMGT/LIGM (Giudicelli *et al.*, (2006) *Nucleic Acids Res.* 34: (suplemento 1): D781-D784) o VBase (vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk).

50 Los anticuerpos aglicosilados pueden tener una funcionalidad extensamente modificada; remítase a, Boyd *et al.*, (1996) *Mol. Immunol.* 32:1311-1318. Una modificación “delta ab” o Δ ab, a la que se hace referencia en la presente, es una modificación de Fc tal como se describe en Armour *et al.*, (1999) *Eur. J. Immunol.* 29:2613-2624. Las técnicas para modificar la glicosilación de regiones Fc de anticuerpos se conocen en la técnica e incluyen medios químicos, enzimáticos y mutacionales, por ejemplo, la mutación de la posición N297 en el dominio CH_2 . Las técnicas para mutar genes de anticuerpos para producir moléculas de IgG aglicosiladas se describen en Tao y Morrison (1989) *J. Immunol.* 143:2595-2601.

55 Los “ácidos nucleicos”, tal como se denominan en la presente, incluyen moléculas de ADN que codifican los anticuerpos de la invención. Se prefieren vectores de expresión, que son adecuados para expresar genes de anticuerpos en una célula hospedadora. Los vectores de expresión y las células hospedadoras para la expresión de

genes de anticuerpos se conocen en la técnica; remítase a, por ejemplo, Morrow, K. J. *Genetic Engineering & Biotechnology News* (15 de junio de 2008) 28(12) y Backliwal, G. *et al.* (2008) *Nucleic Acids Res.* 36(15):e96-e96.

1. Anticuerpos

La invención engloba fragmentos que se unen a antígenos de los anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR humanizados. Los fragmentos de los anticuerpos pueden unirse al complejo $\alpha\beta$ TCR.CD3. Estos engloban los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v).

Los fragmentos incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y scFv. Estos fragmentos carecen de la parte Fc de un anticuerpo intacto, se eliminan más fácilmente de la circulación y pueden tener una menor unión a tejido no específica que un anticuerpo intacto. Estos fragmentos se pueden producir a partir de anticuerpos intactos utilizando métodos muy conocidos, por ejemplo, mediante escisión proteolítica con enzimas tales como la papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂).

Los anticuerpos y fragmentos también engloban fragmentos de anticuerpos monocatenarios (scFv) que se unen al complejo $\alpha\beta$ TCR.CD3. Un scFv comprende una región variable de cadenas pesadas de anticuerpo (V_H) ligado operablemente a una región variable de cadenas ligeras de anticuerpo (V_L), donde la región variable de cadenas pesadas y la región variable de cadenas ligeras, juntas o de forma individual, forman un sitio de unión que se une a $\alpha\beta$ TCR. Un scFv puede comprender una región V_H en el extremo amino terminal y una región V_L en el extremo carboxilo terminal. Como alternativa, el scFv puede comprender una región V_L en el extremo amino terminal y una región V_H en el extremo carboxilo terminal. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, son codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que permita que se produzcan como una única cadena proteica en la que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenarios (scFv)). Un scFv puede comprender además opcionalmente un conector polipeptídico entre la región variable de cadenas pesadas y la región variable de cadenas ligeras.

Fuera del alcance de la invención se encuentran los anticuerpos y fragmentos que son fragmentos de anticuerpos de un dominio (dAb) tal como se describen en Ward, E. S. *et al.* (1989) *Nature* 341:544-546 que constan de un dominio V_H. Tales anticuerpos y fragmentos también engloban anticuerpos de cadena pesada (HCAb). Se ha descrito que estos anticuerpos forman regiones de unión a antígeno que utilizan solamente una región variable de cadenas pesadas, en que estos anticuerpos funcionales son dímeros de cadenas pesadas solamente (denominados "anticuerpos de cadena pesada" o "HCAb"). Por consiguiente, los anticuerpos y fragmentos pueden ser anticuerpos de cadena pesada (HCAb) que se unan específicamente al complejo $\alpha\beta$ TCR.CD3.

Los anticuerpos y fragmentos también engloban anticuerpos que son proteínas de fusión de la inmunoglobulina del dominio de unión o SMIP específicas para el complejo $\alpha\beta$ TCR.CD3. Estos constructos son polipéptidos monocatenarios que comprenden dominios de unión a antígeno fusionados a dominios de inmunoglobulina necesarios para llevar a cabo funciones efectoras de anticuerpos (remítase al documento WO2005/01748).

Los anticuerpos y fragmentos también engloban diacuerpos. Estos son anticuerpos bivalentes en los que los dominios V_H y V_L se expresan en una única cadena polipeptídica, pero que utilizan un conector que es demasiado corto como para permitir el apareamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Esto obliga a que los dominios se apareen con dominios complementarios de otra cadena y crea de este modo dos sitios de unión a antígeno (remítase a, por ejemplo, el documento WO 93/11161). Los diacuerpos pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de este no reacciona de forma cruzada con ninguna diana que no sea el complejo $\alpha\beta$ TCR.CD3.

El anticuerpo o fragmento de este se puede modificar para aumentar su semivida en suero, por ejemplo, mediante la adición de moléculas tales como PEG u otros polímeros hidrosolubles, incluidos polímeros polisacáridos para aumentar la semivida.

Los anticuerpos y fragmentos de estos pueden ser biespecíficos. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden asemejarse a anticuerpos sencillos (o fragmentos de anticuerpos), pero tienen dos sitios de unión a antígeno diferentes (regiones variables). Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante varios métodos tales como técnicas químicas, técnicas de "polidoma" o técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos biespecíficos pueden tener especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes, al menos uno de los cuales es el complejo $\alpha\beta$ TCR.CD3. La otra especificidad se puede seleccionar a partir de cualesquiera especificidades útiles o deseadas que incluyen, por ejemplo, la especificidad por la seroalbúmina humana para la extensión de la semivida *in vivo*.

El uso de anticuerpos biespecíficos en un centro de salud para aplicaciones oncológicas se está convirtiendo actualmente en una realidad con el Catumaxomab trifuncional (Removmab[®]) aprobado para su uso en casos de ascitis maligna y el anticuerpo biespecífico Blinatumomab, actualmente en ensayos de fase II en neoplasias hematológicas. Estas moléculas tienen en común una rama de unión que se une a los linfocitos T y una segunda

rama que se une a la célula diana tumoral, lo que da como resultado la lisis mediada por linfocitos T de la diana tumoral. También en común, estas moléculas reclutan linfocitos T a través de la proteína CD3 situada en la superficie celular. Una alternativa al reclutamiento a través de CD3 es hacer uso del receptor de linfocitos T $\alpha\beta$ ($\alpha\beta$ TCR) que también se expresa en la superficie de la célula. Por consiguiente, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar para desarrollar anticuerpos antitumorales mediante la combinación de una especificidad por un antígeno asociado a tumores con una especificidad por el receptor de linfocitos T $\alpha\beta$ ($\alpha\beta$ TCR).

2. Producción de anticuerpos

Las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de los anticuerpos descritos en la presente se exponen en las SEQ ID NO: 5-7 y 12-16. La producción de anticuerpos se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica conocida en la técnica, incluso en organismos transgénicos tales como cabras (remítase a, Pollock *et al.* (1999) *J. Immunol. Methods* 231: 147-157), pollos (remítase a, Morrow, K. J. J. (2000) *Genet. Eng. News* 20: 1-55), ratones (remítase a Pollock *et al.*, supra) o plantas (remítase a, Doran P. M. (2000) *Curr. Opinion Biotechnol.*, 11:199-204, Ma. J. K-C (1998) *Nat. Med.* 4:601-606, Baez, J. *et al.* (2000) *BioPharm.* 13: 50-54, Stoger, E. *et al.* (2000) *Plant. Mol. Biol.* 42:583-590). Los anticuerpos también se pueden producir mediante síntesis química o mediante expresión de genes que codifiquen los anticuerpos en las células hospedadoras.

Un polinucleótido que codifica el anticuerpo se aísla e inserta en un vector o constructo replicable tal como un plásmido para una propagación o expresión adicional en una célula hospedadora. Los constructos o vectores (p. ej., vectores de expresión) adecuados para la expresión de una inmunoglobulina humanizada de acuerdo con las realizaciones descritas se encuentran disponibles en la técnica. Se encuentra disponible una variedad de vectores, que incluye vectores que se mantienen en una copia única o copias múltiples en una célula hospedadora o que pasan a estar integrados en el o los cromosomas de la célula hospedadora. Los constructos o vectores se pueden introducir en una célula hospedadora adecuada y se pueden producir y mantener en cultivo células que expresen una inmunoglobulina humanizada. Se pueden utilizar un único vector o múltiples vectores para la expresión de una inmunoglobulina humanizada.

Los polinucleótidos que codifican el anticuerpo se aíslan y secuencian fácilmente utilizando procedimientos convencionales (p. ej., sondas de oligonucleótidos). Los vectores que se pueden utilizar incluyen plásmidos, virus, fagos, transposones, microsomas, de los cuales los plásmidos son una realización típica. Por lo general, tales vectores incluyen además una secuencia de señalización, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y secuencias de terminación de la transcripción ligadas operablemente al polinucleótido de cadenas pesadas y/o ligeras para facilitar la expresión. Los polinucleótidos que codifican las cadenas pesadas y ligeras se pueden insertar en vectores separados e introducirse (p. ej., mediante transformación, transfección, electroporación o transducción) en la misma célula hospedadora simultánea o secuencialmente o, si se desea, tanto la cadena pesada como la cadena ligera se pueden insertar en el mismo vector antes de dicha introducción.

Se puede proporcionar un promotor para la expresión en una célula hospedadora adecuada. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles. Por ejemplo, un promotor se puede ligar operablemente a un ácido nucleico que codifique una cadena de inmunoglobulina o una inmunoglobulina humanizada, de modo que controle la expresión del polipéptido codificado. Se encuentra disponible una variedad de promotores adecuados para hospedadores procariontes y eucariotas. Los promotores procariontes incluyen los promotores lac, tac, T3, T7 para *E. coli*; 3-fosfoglicerato-cinasa u otras enzimas glicolíticas, p. ej., enolasa, gliceraldehído 3-fosfato-deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato-decarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato-isomerasa, 3-fosfoglicerato-mutasa y glucocinasa. Los promotores eucariotas incluyen promotores de levaduras inducibles tales como alcohol-deshidrogenasa 2, isocitocromo C, ácido-fosfatasa, metalotioneína y enzimas responsables del metabolismo del nitrógeno o la utilización de la maltosa/galactosa; promotores de ARN-polimerasa II que incluyen promotores virales tales como polioma, virus de la viruela aviar y adenovirus (p. ej., adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (en particular, el promotor de genes de expresión inmediata temprana), retrovirus, virus de la hepatitis B, actina, promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), y el virus de Simian 40 temprano o tardío y promotores no virales tales como EF-1 alfa (Mizushima y Nagata (1990) *Nucleic Acids Res.* 18(17):5322). Los expertos en la técnica podrán seleccionar el promotor adecuado para expresar un anticuerpo humanizado o una parte de este.

Cuando proceda, p. ej., para la expresión en células de eucariotas superiores, se pueden incluir elementos potenciadores adicionales en lugar o además de los que se encuentran situados en los promotores descritos anteriormente. Las secuencias potenciadoras de mamíferos adecuadas incluyen elementos potenciadores de globina, elastasa, albúmina, fetoproteína, metalotionina e insulina. Como alternativa, se puede utilizar un elemento potenciador a partir de un virus de células eucariotas tal como un potenciador SV40, un potenciador de un promotor temprano de citomegalovirus, un potenciador de polioma, un potenciador baculoviral o un locus de IgG2a murina (remítase al documento WO 04/009823). Si bien tales potenciadores a menudo se sitúan en el vector en un sitio anterior al promotor, también pueden estar situados en otro lugar, p. ej., en una región no traducida o posterior a la señal de poliadenilación. La elección y el posicionamiento del potenciador se puede basar en la compatibilidad con la célula hospedadora utilizada para la expresión.

Además, los vectores (p. ej., vectores de expresión) pueden comprender un marcador seleccionable para la selección de células hospedadoras que porten el vector y, en el caso de un vector replicable, un origen de replicación. Los genes que codifican productos que confieren resistencia a fármacos o antibióticos son marcadores seleccionables comunes y se pueden utilizar en células procariotas (p. ej., gen f3-lactamasa (resistencia a ampicilina), gen Tet (resistencia a tetraciclina) y eucariotas (p. ej., genes de resistencia a neomicina (G418 o geneticina), gpt (ácido micofenólico), ampicilina o higromicina). Los genes marcadores de la dihidrofolato-reductasa permiten la selección con metotrexato en una variedad de hospedadores. Los genes que codifican el producto génico de los marcadores auxótrofos del hospedador (p. ej., LEU2, URA3, HIS3) a menudo se utilizan como marcadores seleccionables en levadura. El uso de vectores de fagos o virales (p. ej., baculovirus), y vectores que se puedan integrar en el genoma de la célula hospedadora tales como vectores retrovirales también se contempla.

En sistemas eucariotas, las señales de poliadenilación y terminación están ligadas operablemente a un polinucleótido que codifica el anticuerpo de la invención. Tales señales habitualmente se colocan en posición 3' del marco abierto de lectura. En sistemas de mamíferos, algunos ejemplos no limitantes de señales de poliadenilación/terminación incluyen los que proceden de hormonas de crecimiento, factor de elongación-1 alfa y genes virales (p. ej., SV40) o repeticiones terminales largas retrovirales. En sistemas de levaduras, algunos ejemplos no limitantes de señales de poliadenilación/terminación incluyen los que proceden de los genes de la fosfoglicerato-cinasa (PGK) y la alcohol-deshidrogenasa 1 (ADH). En sistemas de procariotas, normalmente no se requieren señales de poliadenilación y en su lugar es habitual emplear secuencias terminadoras más cortas y más definidas. La elección de secuencias de poliadenilación/terminación se puede basar en la compatibilidad con la célula hospedadora utilizada para la expresión. Además de los anteriores, otros rasgos que se pueden emplear para potenciar los rendimientos incluyen elementos remodeladores de cromatina, modificación de codones específicos de la célula hospedadora e intrones. El uso de codones de los anticuerpos de la invención se puede modificar para adecuarse al sesgo de codones de la célula hospedadora para aumentar la transcripción y/o el rendimiento de producto (p. ej., Hoekema, A. *et al.* (1987) *Mol. Cell Biol.* 7(8):2914-24). La elección de los codones se puede basar en la compatibilidad con la célula hospedadora utilizada para la expresión.

La invención se refiere, por tanto, a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican las inmunoglobulinas humanizadas o cadenas ligeras o pesadas de estas. La invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una parte de unión a antígeno de las inmunoglobulinas y sus cadenas.

Los anticuerpos se pueden producir, por ejemplo, mediante la expresión de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifiquen el anticuerpo en una célula hospedadora adecuada. La célula hospedadora se puede producir utilizando cualquier método adecuado. Por ejemplo, los constructos de expresión (p. ej., uno o más vectores, p. ej., un vector de expresión de células de mamíferos) descritos en la presente se pueden introducir en una célula hospedadora adecuada y la célula resultante se puede mantener (p. ej., en cultivo, en un animal, en una planta) en condiciones adecuadas para la expresión del o de los constructos o vectores. Las células hospedadoras pueden ser procariotas, incluidas células bacterianas tales como *E. coli* (p. ej., la cepa DH5aTM) (Invitrogen, Carlsbad, CA), PerC6 (Crucell, Leiden, NL), *B. subtilis* y/u otras bacterias adecuadas; células eucariotas tales como células de levaduras o fúngicas (p. ej., *Pichia pastoris*, *Aspergillus sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*; *Neurospora crassa*) u otras células de eucariotas inferiores y células de eucariotas superiores tales como las de insectos (p. ej., células de *Drosophila Schnieder* S2, células de insecto Sf9) (documento WO 94/126087 (O'Connor)), células de insecto BTI-TN-5B1-4 (High FiveTM) (Invitrogen), de mamíferos (p. ej., células COS tales como COS-1 (N.º de acceso en ATCC CRL-1650) y COS-7 (N.º de acceso en ATCC CRL-1651), CHO (p. ej., N.º de acceso en ATCC CRL-9096), CHO DG44 (Urlaub, G. y Chasin, L. A. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 77(7): 4216-4220), 293 (N.º de acceso en ATCC CRL-1573), HeLa (N.º de acceso en ATCC CCL-2), CV1 (N.º de acceso en ATCC CCL-70), WOP (Dailey, L., *et al.* (1985) *J. Virol.*, 54:739-749), 3T3, 293T (Pear, W. S., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 90:8392-8396), células NSO, células SP2/0, células HuT 78 y similares, o plantas (p. ej., tabaco, lemná (lenteja de agua) y algas). Remítase a, por ejemplo, Ausubel, F. M. *et al.*, eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc. (1993). En algunas realizaciones, la célula hospedadora no forma parte de un organismo multicelular (p. ej., planta o animal), p. ej., es una célula hospedadora aislada o es parte de un cultivo celular.

Las células hospedadoras se pueden cultivar en frascos de agitación, matraces oscilantes, botellas rotatorias, reactores de onda (p. ej., System 1000 de wavebiotech.com) o sistemas de fibra hueca, pero se prefiere para la producción a gran escala que se utilicen reactores de tanque agitado o reactores de bolsa (p. ej., Wave Biotech, Somerset, Nueva Jersey, EE. UU.), particularmente para cultivos en suspensión. Los reactores de tanque agitado se pueden adaptar para la aireación utilizando, por ejemplo, tubos burbujeadores, deflectores o propulsores de bajo cizallamiento. Para las columnas de burbujeo y los reactores de agitación neumática, se puede utilizar la aireación directa con burbujas de aire u oxígeno. Cuando las células hospedadoras se cultivan en un medio de cultivo exento de suero, el medio se puede complementar con un agente protector celular tal como pluronic F-68 para contribuir a evitar el daño celular como resultado del proceso de aireación. Dependiendo de las características de las células hospedadoras, se pueden utilizar microportadores como sustratos de crecimiento para líneas celulares dependientes de anclaje o se pueden adaptar las células al cultivo en suspensión. El cultivo de las células hospedadoras, particularmente las células hospedadoras de vertebrados, pueden utilizar una variedad de modos operacionales tales como procesado por lotes, por lotes alimentados o por lotes repetidos (remítase a, Drapeau *et al.* (1994) *Cytotechnology* 15:103-109), procesos por lote extendido o cultivo por perfusión. Aunque las células hospedadoras

de mamíferos transformadas de forma recombinante se pueden cultivar en medios que contienen suero tales como medios que comprenden suero fetal bovino (FCS), se prefiere que tales células hospedadoras se cultiven en medios exentos de suero tales como los descritos en Keen *et al.* (1995) *Cytotechnology* 17:153-163 o medios que se pueden adquirir de distribuidores comerciales tales como ProCHO-CDM o UltraCHO™ (Cambrex NJ, EE. UU.), complementados en caso necesario con una fuente de energía tal como glucosa y factores de crecimiento sintéticos tales como insulina recombinante. El cultivo exento de suero de las células hospedadoras puede requerir que esas células se adapten para crecer en condiciones exentas de suero. Una estrategia de adaptación es cultivar dichas células hospedadoras en medios que contengan suero e intercambiar repetidamente un 80% del medio de cultivo por el medio exento de suero de modo que las células hospedadoras aprendan a adaptarse en condiciones exentas de suero (remítase a, p. ej., Scharfenberg, K *et al.* (1995) *Animal Cell Technology: Developments Towards the 21st Century* (Beuvery, E. C. *et al.*, eds), págs. 619-623, *Kluwer Academic publishers*).

Los anticuerpos de acuerdo con las realizaciones descritas pueden secretarse en el medio y recuperarse y purificarse a partir de este utilizando una variedad de técnicas para proporcionar un grado de purificación adecuado para el uso previsto. Por ejemplo, el uso de anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de pacientes humanos habitualmente exige al menos un 95% de pureza determinada mediante SDS-PAGE reductor, más habitualmente un 98% o un 99% de pureza, al compararlo con los medios de cultivo que comprenden los anticuerpos terapéuticos. En un primer momento, se pueden eliminar los restos celulares de los medios de cultivo utilizando centrifugación seguida de un paso de clarificación del sobrenadante utilizando, p. ej., microfiltración, ultrafiltración y/o filtración en profundidad. Como alternativa, el anticuerpo se puede recoger mediante microfiltración, ultrafiltración o filtración en profundidad sin centrifugación previa. Existe una variedad de otras técnicas disponibles tales como diálisis y electroforesis en gel y técnicas cromatográficas tales como hidroxipatito (HA), cromatografía de afinidad (que opcionalmente conlleva un sistema de marcado de afinidad tal como polihistidina) y/o cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) (remítase al documento US 5 429 746). En una realización, los anticuerpos, después de varios pasos de clarificación, se capturan utilizando cromatografía de afinidad de Proteína A o G seguida de pasos de cromatografía adicionales tales como cromatografía de intercambio iónico y/o HA, intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de exclusión de tamaños y precipitación con sulfato amónico. También se pueden emplear varios pasos de eliminación de virus (p. ej., nanofiltración utilizando, p. ej., un filtro DV-20). Después de estos varios pasos, se proporciona un preparado purificado que comprende al menos 10 mg/mL o más, p. ej., 100 mg/mL o más del anticuerpo de la invención y, por tanto, constituye otra realización de la invención. Se puede generar una concentración de 100 mg/mL o superior mediante ultracentrifugación. Tales preparados están sustancialmente exentos de formas agregadas de anticuerpos de la invención.

Los sistemas bacterianos son particularmente adecuados para la expresión de fragmentos de anticuerpos. Dichos fragmentos se localizan intracelularmente o dentro del periplasma. Las proteínas periplásmicas insolubles se pueden extraer y replegar para formar proteínas activas de acuerdo con los métodos conocidos para los expertos en la técnica, remítase a Sanchez *et al.* (1999) *J. Biotechnol.* 72:13-20; Cupit, P. M. *et al.* (1999) *Lett. Appl. Microbiol.* 29:273-277.

La presente invención también se refiere a células que comprenden un ácido nucleico, p. ej., un vector, de la invención (p. ej., un vector de expresión). Por ejemplo, un ácido nucleico (es decir, uno o más ácidos nucleicos) que codifican las cadenas ligeras y pesadas de una inmunoglobulina humanizada de acuerdo con las realizaciones descritas o un constructo (es decir, uno o más constructos, p. ej., uno o más vectores) que comprende dicho o dichos ácidos nucleicos, se puede introducir en una célula hospedadora adecuada mediante un método apropiado para la célula hospedadora seleccionada (p. ej., transformación, transfección, electroporación, infección), con el o los ácidos nucleicos que están, o que pasan a estar ligados operablemente a uno o más elementos de control de la expresión (p. ej., en un vector, en un constructo creado mediante procesos en la célula, integrado en el genoma de la célula hospedadora). Las células hospedadoras se pueden mantener en condiciones adecuadas para la expresión (p. ej., en presencia de medios adecuados inductores complementados con sales, factores de crecimiento, antibióticos, complementos nutricionales, etc. apropiados), mediante las cuales se producen el o los polipéptidos codificados. Si se desea, se puede aislar el anticuerpo humanizado codificado, por ejemplo, a partir de las células hospedadoras, leche o medio de cultivo. Este proceso engloba la expresión en una célula hospedadora (p. ej., una célula de glándula mamaria) de una planta o un animal transgénico (p. ej., tabaco) (remítase, p. ej., al documento WO 92/03918).

3. Aplicaciones terapéuticas

La supresión de la actividad de los linfocitos T es deseable en una serie de situaciones en las que está garantizada la inmunosupresión y/o tiene lugar una afección autoinmunitaria. Por consiguiente, la utilización del complejo $\alpha\beta$ TCR.CD3 como diana está indicada en el tratamiento de enfermedades que implican una respuesta inmunitaria inapropiada o indeseada tal como inflamación, autoinmunidad y otras afecciones que implican dichos mecanismos. En una realización, tal enfermedad o trastorno es una enfermedad autoinmunitaria y/o inflamatoria. Algunos ejemplos de dichas enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias son el lupus sistémico eritematoso (SLE), la artritis reumatoide (RA) y la enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) (que incluye colitis ulcerosa (UC) y enfermedad de Crohn (CD)), la esclerosis múltiple (MS), el escleroderma y la diabetes tipo I (T1D) y otras enfermedades y trastornos tales como PV (*pemphigus vulgaris*), psoriasis, dermatitis atópica, enfermedad celíaca, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves (tiroides), síndrome de

Sjogren, síndrome de Guillain-barré, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Addison, granulomatosis de Wegener, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmunitaria, polimialgia reumática, fenómeno de Raynaud, arteritis temporal, arteritis de células gigantes, anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, enfermedad de behcet, cirrosis biliar primaria, uveítis, miocarditis, fiebre reumática, espondilitis anquilosante, glomerulonefritis, sarcoidosis, dermatomiositis, miastenia gravis, polimiositis, alopecia areata y vitíligo.

En una realización, tal enfermedad o trastorno es SLE, RA o IBD. En una realización, tal enfermedad o trastorno es MS.

En otra realización, los anticuerpos de acuerdo con las realizaciones descritas se utilizan para asistir un trasplante mediante la inmunosupresión del sujeto. Dicho uso mitiga la enfermedad de injerto contra huésped. Para consultar una descripción de los tratamientos existentes para la enfermedad de injerto frente a huésped, remítase a, p. ej., Svénilson, *Bone Marrow Transplantation* (2005) 35:S65-S67 y las referencias citadas en ella. Convenientemente, los anticuerpos de la invención se pueden utilizar combinados con otras terapias disponibles.

Con respecto al tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias, la terapia combinada puede incluir la administración de un anticuerpo de la presente invención junto con un medicamento, que junto con el anticuerpo comprende una cantidad eficaz para prevenir o tratar dichas enfermedades autoinmunitarias. Cuando dicha enfermedad autoinmunitaria es la diabetes tipo 1, la terapia combinada puede englobar uno o más de un agente que promueva el crecimiento de las células beta pancreáticas o potencie el trasplante de células beta tales como factores de crecimiento de células beta o de supervivencia o anticuerpos inmunomoduladores. Cuando dicha enfermedad autoinmunitaria es la artritis reumatoide, dicha terapia combinada puede englobar uno o más de metotrexato, un anticuerpo anti-TNF- β , una proteína de fusión Ig-receptor de TNF- β , un anticuerpo anti-IL-15 o anti-IL-21, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) o un fármaco antireumático modificador de la enfermedad (DMARD). Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente biológico tal como un agente anti-TNF (p. ej., Enbrel®, infliximab (Remicade®) y adalimumab (Humira®) o rituximab (Rituxan®). Cuando dicha enfermedad autoinmunitaria es un rechazo a un trasplante hematopoyético, se pueden administrar uno o varios factores de crecimiento hematopoyéticos (tales como eritropoyetina, G-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-11, trombopoyetina, etc.) o uno o varios antimicrobianos (tal como fármacos antifúngicos, antivirales, antibióticos). Cuando dicha enfermedad autoinmunitaria es la psoriasis, el agente adicional puede ser uno o más de brea y derivados de esta, fototerapia, corticoesteroides, Ciclosporina A, análogos de la vitamina D, metotrexato, inhibidores de proteínas activadas por mitógeno p38 (MAPK), así como agentes biológicos tales como agentes anti-TNF y Rituxan®. Cuando dicha enfermedad autoinmunitaria es una enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) tal como, por ejemplo, enfermedad de Chron o colitis ulcerosa, el agente adicional puede ser uno o más de aminosalicatos, corticoesteroides, inmunomoduladores, antibióticos o agentes biológicos tales como Remicade® y Humira®.

El tratamiento combinado se puede llevar a cabo de cualquier forma que sea estimada necesaria o conveniente por el experto en la técnica y para el propósito de la presente memoria descriptiva, no se contemplan limitaciones en cuanto al orden, cantidad, repetición o cantidad relativa de los compuestos que se van a utilizar combinados. Por consiguiente, los anticuerpos de acuerdo con las realizaciones descritas se pueden formular en composiciones farmacéuticas para su uso en terapia.

4. Composiciones farmacéuticas

En una realización preferida, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención o un ligando o ligandos que se puedan identificar mediante un método de ensayo, tal como se ha definido en el aspecto previo de la invención. Los ligandos pueden ser inmunoglobulinas, péptidos, ácidos nucleicos o moléculas de bajo peso molecular, tal como se ha discutido en la presente. Se denominan, en la siguiente discusión, "compuestos".

Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención es una composición de material que comprende un compuesto o compuestos que pueden modular la actividad de los linfocitos T como un principio activo. El compuesto se encuentra en forma de cualquier sal farmacéuticamente aceptable o, p. ej., cuando corresponda, un análogo, forma básica libre, tautómero, racemato de enantiómeros o combinación de estos. Se contempla que los principios activos de una composición farmacéutica que comprende el principio activo de acuerdo con la invención exhiban actividad terapéutica, por ejemplo, en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped, cuando se administren en una cantidad que depende del caso particular.

En otra realización, se pueden utilizar uno o más compuestos de la invención combinados con cualquier compuesto reconocido en la técnica del que se tenga constancia de que es adecuado para tratar la indicación particular en el tratamiento de cualquiera de las afecciones mencionadas anteriormente. Por consiguiente, se pueden combinar uno o más compuestos de la invención con uno o más compuestos reconocidos en la técnica de los que se tenga constancia de que son adecuados para tratar las indicaciones anteriores de modo que se pueda administrar una composición única conveniente al sujeto. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para que proporcionen la respuesta terapéutica óptima.

Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas diariamente o se puede reducir la dosis de forma proporcional, según indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

El principio activo se puede administrar de una manera conveniente tal como por las vías oral, intravenosa (cuando sea hidrosoluble), intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica o supositoria o implantarse (p. ej., utilizando moléculas de liberación lenta).

En función de la ruta de administración, se puede requerir que el principio activo se recubra con un material para proteger dichos principios de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar dicho principio.

Con el fin de administrar el principio activo por medios diferentes a la administración parenteral, se recubrirá, o administrará, con un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el principio activo puede administrarse en un adyuvante, coadministrarse con inhibidores enzimáticos o en liposomas. El término adyuvante se utiliza en su sentido más amplio e incluye cualquier compuesto inmunoestimulante tal como el interferón. Los adyuvantes que se contemplan en la presente incluyen los resorcinolos, surfactantes no iónicos tales como éter oleil polioxietilénico y éter *n*-hexadecil polietilénico. Los inhibidores enzimáticos incluyen la tripsina pancreática.

Los liposomas incluyen emulsiones de CGF de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales.

El principio activo se puede administrar también parenteral o intraperitonealmente.

Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de estos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estos preparados contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando sean hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación improvisada de dispersiones o soluciones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista la posibilidad de que sea administrada a través de una jeringa fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe preservar de la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de estos y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos.

La prevención de la acción de los microorganismos se puede propiciar mediante varios agentes antifúngicos y antibacterianos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En ciertos casos, puede ser preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede propiciar mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el principio activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los demás ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, y después esterilizando por filtración. Por lo general, las dispersiones se preparan incorporando el principio activo esterilizado en un vehículo estéril que contenga el medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la técnica de liofilización que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de la solución previamente esterilizada por filtración de este.

Varios materiales diferentes pueden estar presentes como recubrimientos o, de lo contrario, modificar la forma física de la forma farmacéutica unitaria. Por supuesto, cualquier material utilizado para preparar cualquier forma farmacéutica unitaria debería ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas. Además, el principio activo se puede incorporar en preparados y formulaciones de liberación sostenida.

Tal como se utiliza en la presente, la expresión "diluyente y/o portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antifúngicos y antibacterianos, agentes isotónicos y que retrasen la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es muy conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla el uso de estos en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar principios activos complementarios en las composiciones.

Es especialmente conveniente formular composiciones parenterales en formas farmacéuticas unitarias para una fácil administración y uniformidad de la dosificación. La expresión "forma farmacéutica unitaria" tal como se utiliza en la presente se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como formas farmacéuticas unitarias para los sujetos mamíferos que se han de tratar; donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material

activo calculada para que produzca el efecto terapéutico deseado asociado con el portador farmacéutico requerido. Las especificaciones para las nuevas formas farmacéuticas unitarias de la invención están dictadas por, y dependen directamente de, (a) las características únicas del material activo y el efecto terapéutico particular que se ha de lograr y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de mezclado tales como un material activo para el tratamiento de una enfermedad en sujetos vivos que tengan una condición de enfermedad en la que la salud corporal se vea afectada.

Los principios activos principales se mezclan para una administración conveniente y eficaz en cantidades eficaces con un portador farmacéuticamente aceptable adecuado en una forma farmacéutica unitaria. En el caso de composiciones que contengan principios activos complementarios, las dosis se determinan en referencia a la dosis habitual y la forma de administración de dichos ingredientes.

Con el fin de facilitar el suministro de compuestos peptídicos, incluidos anticuerpos, a las células, los péptidos se pueden modificar con el fin de mejorar su capacidad para cruzar una membrana celular. Por ejemplo, el documento US 5 149 782 describe el uso de péptidos fusogénicos, péptidos que conforman canales iónicos, péptidos de membrana, ácidos grasos de cadena larga y otros agentes de fusión de membrana para aumentar el transporte de proteínas a través de la membrana celular. Estos y otros métodos también se describen en el documento WO 97/37016 y US 5 108 921.

En un aspecto adicional se proporciona el principio activo de la invención tal como se ha definido anteriormente en la presente para su uso en el tratamiento de una enfermedad solo o combinado con compuestos reconocidos en la técnica de los que se tiene constancia de que son adecuados para tratar la indicación particular. Consecuentemente, se proporciona el uso de un principio activo de la invención para la fabricación de un medicamento con el fin de tratar una enfermedad asociada con una respuesta inmunitaria aberrante.

También se describe un método para tratar una afección asociada con una respuesta inmunitaria aberrante, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un ligando que se puede identificar utilizando un método de ensayo tal como se ha descrito anteriormente.

La invención se describe adicionalmente, a efectos únicamente ilustrativos, en los siguientes ejemplos.

Ejemplo comparativo 1

La unión y actividad biológica de EuCIV3 es reducida en comparación con BMA031

Mediante el uso de la citometría de flujo, los inventores han mostrado que EuCIV3 es inferior a BMA031 en la unión a linfocitos T (Fig. 1). En este ensayo de competición, los linfocitos T se incubaron en hielo en presencia de una concentración fijada de MolgG2b-BMA031 (competidor murino) marcado con ficoeritrina directamente y una concentración creciente de anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR. Después de una incubación de 20 minutos, las células se lavaron y se detectó el MolgG2b-BMA031 marcado con ficoeritrina directamente unido a la superficie por citometría de flujo. El anticuerpo quimérico BMA031 HulgG1 compite mucho más eficazmente que EuCIV3.

Con el fin de evaluar su capacidad para inhibir la actividad de los linfocitos T *in vivo*, se trataron linfocitos T CD8+ con anticuerpos anti- $\alpha\beta$ TCR con varias concentraciones (remítase a la Fig. 2, eje x) y se cocultivaron con células dendríticas autólogas (DC) pulsadas con el péptido de CMV 495-503 (pp65) durante siete días en un ensayo de diferenciación *in vitro* (IVE).

Los productos de aféresis de donantes normales de individuos HLA-A2+ se obtuvieron de HemaCare Corp., Van Nuys, CA). Las PBMC se aislaron mediante centrifugación con Ficoll (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los linfocitos T CD8+ se aislaron utilizando microesferas magnéticas (Invitrogen, Carlsbad, California) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para generar células dendríticas inmaduras autólogas, se resuspendieron las PBMC en RPMI 1640/5% de suero AB humano (Sigma) se más de 2 horas a 37 °C/5% de CO₂. Los monocitos adherentes se enjuagaron posteriormente con PBS y se cultivaron durante 6 días en RPMI 1640/5% de suero AB humano complementado con GM-CSF (Immunex, Seattle, WA) e IL-4 (PeproTech, Rocky Hill, NJ). Antes de establecer los cocultivos de linfocitos T/DC, se pulsaron las DC con péptidos (10 µg/mL) durante 4 horas y a continuación se maduraron. Las células dendríticas maduras se generaron mediante la adición de TNF-alfa con una concentración de 50 ng/mL, IL-1 β con una concentración de 25 ng/mL, IL-6 con una concentración de 10 ng/mL, PGE-2 con una concentración de 500 ng/mL (PeproTech, Rocky Hill, NJ) y el cultivo de las células dendríticas durante un tiempo adicional de 24 horas. Las DC pulsadas con péptidos se añadieron entonces a los linfocitos T CD8+ aislados previamente con una relación T:DC de 10:1. Los cultivos se alimentaron inmediatamente con IL-2 (100 UI/mL) añadida a los cultivos. Los cultivos se complementaron con IL-2 (100 UI/mL) el día 4. Se analizó la reactividad peptídica de los cultivos en bruto en un ensayo de liberación de cromo en el día 7.

El gráfico en la Fig. 2 muestra los datos de lisis del ensayo de liberación de cromo, donde se diferenciaron con éxito linfocitos T no tratados contra el péptido pp65 y pudieron lisar dianas específicas en >50%. El BMA031 inhibió la diferenciación de estos linfocitos T, puesto que estos no pudieron lisar dianas específicas de una forma dependiente de la dosis. El anticuerpo humanizado EuCIV3 fue menos potente que el BMA031 y solo pudo inhibir la diferenciación en la dosis más elevada.

Ejemplo 2**Diseño de Fc de anticuerpos quiméricos de BMA031**Perfil *in vitro*

5 Los inventores han evaluado el perfil *in vitro* de BMA031 en un grupo de ensayos. La Tabla 1 muestra el perfil *in vitro* de BMA031. El BMA031 se compara con OKT3 en estos ensayos.

En el ensayo de proliferación de PBMC, se cultivaron PBMC humanas con concentraciones crecientes del anticuerpo terapéutico durante 72 horas. Se añadió ³H-timidina y las células se recogieron 18 horas más tarde.

10 Para el ensayo de agotamiento de linfocitos T/liberación de citocinas, se cultivaron PBMC humanos con concentraciones crecientes de anticuerpo terapéutico y se analizaron diariamente en cuanto a recuentos y viabilidad celulares (Vi-Cell, Beckman Coulter) hasta el día 7. Los sobrenadantes celulares también se recogieron, se almacenaron a -20 °C y se analizaron en un panel de citocinas 8-plex (Bio-Rad).

15 El BMA031 no induce: (i) proliferación de PBMC; (ii) agotamiento de linfocitos T; (iii) expresión de CD25 o (iv) liberación de citocinas. Por el contrario, el OKT3 sí induce todos los efectos mencionados anteriormente. El BMA031 y el OKT3 pueden bloquear la diferenciación de células CD8+ contra un péptido en un ensayo de diferenciación *in vitro* (IVE) y también pueden bloquear una reacción de linfocitos mixtos (MLR). El BMA031 también induce la apoptosis de linfocitos T activados (muerte celular inducida por activación; AICD).

20 Al contrario que el BMA031, una versión quimérica de BMA031 (HulgG1), con una región constante de IgG humana de origen natural, tuvo un perfil *in vitro* comparable al de OKT3 (Tabla 1). Los inventores postularon que la implicación de FcγR era crítica para este cambio del perfil *in vitro* para el HulgG1 BMA031, en comparación con el BMA031 MolgG2b. Por tanto, los inventores produjeron fragmentos F(ab')₂ de BMA031 HulgG1 y descubrieron que estos recuperaban el perfil del BMA031 MolgG2b. Mediante el diseño de Fc, incorporaron modificaciones que eliminaban la unión a FcγR en mutaciones conocidas como "delta ab" (Armour *et al.* (1999) *Eur. J. Immunol.*, 29:2613-2624) y mediante la generación de una forma aglicosilada de HulgG4 (N297Q). Los anticuerpos anti-αβTCR HulgG1 delta ab y HulgG4 agli tuvieron el mismo perfil *in vitro* que BMA031 MolgG2b (Tabla 1).

	PBMC normales							Linfocitos T activados por antígeno		
	Unión a γδTCR	Unión a αβTCR	Unión a FcγR	Proliferación de PBMC	Agotamiento	Expresión de CD25	Liberación de citocinas	Inhibición de MLR	Apoptosis/AICD	Inhibición de IVE
OKT3	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+
BMA031 MolgG2b	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
BMA031 HulgG1	-	+	+	+	+	+	+	ND	ND	+
BMA031 F(ab) ₂	-	+	-	-	-	-	-	ND	ND	+
BMA031 Δab HulgG1	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
HEBE1 Δab HulgG1	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+

HEBE 1 IgG4 agli	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
------------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Tabla 1

Ejemplo 3**Construcción de anticuerpos humanizados con unión mejorada**

- 5 Los inventores han generado dos series de versiones humanizadas de BMA031 denominadas serie HEBE1 (IGH3-23) y serie GL1BM (IGHV1-3*01 & IGKV3-11*01; remítase a VBase, vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk). El injerto inicial de regiones CDR de cadenas pesadas de BMA031 en regiones del marco IGH3-23 (remítase a las SEQ ID NO: 5 y 6) mejoró la unión del anticuerpo al $\alpha\beta$ TCR tal como se muestra mediante un ensayo de competición (Fig. 3); remítase al Ejemplo 2. Sin embargo, esta mejora no se tradujo en una mejora funcional en el anticuerpo tal como se muestra mediante un ensayo de IVE (Fig. 4).

Ejemplo 4**Optimización de anticuerpos humanizados**

- 15 La estrategia para la optimización de los anticuerpos humanizados se basó en la mutagénesis y cribado funcional. La optimización se comenzó con cambios de bloques de residuos aminoacídicos en una de cada una de las cuatro regiones del marco de los dominios variables, de ratón a humano. Se identificaron las regiones del marco clave en cada una de las series GL1BM HC, GL1BM LC y HEBE1 HC. Después de esta identificación, los residuos individuales en estas regiones del marco se mutaron a residuos de la línea germinal humana a partir de la secuencia de ratón original. Los residuos del marco para los que se descubrió que la identidad con la secuencia de ratón era importante para mantener las propiedades de unión del anticuerpo se mantuvieron como residuos de ratón. En caso contrario, los residuos del marco se modificaron para que coincidiesen con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal humana. Esto se prosiguió a lo largo de la secuencia hasta que se identificó el número mínimo de residuos de ratón para mantener las propiedades de unión originales del anticuerpo. Remítase a la Fig. 5. Los inventores han demostrado que varios de los anticuerpos de estas series tienen una unión mejorada, en comparación con el BMA031 determinada por la constante de disociación del anticuerpo de los linfocitos T (Figs. 6, 7 y 8).

- 25 Para los ensayos de las constantes de disociación, se incubaron 10^5 linfocitos T humanos durante 30-60 minutos a temperatura ambiente en 100 μ L de medio de crecimiento completo que contenía 2 μ g/mL de los anticuerpos expresados como HulgG1- Δ ab. A continuación, se lavaron las células, se resuspendieron en 50 μ L de medio de crecimiento completo y se añadieron 20 μ g/mL de F(ab')₂ de HEBE1 con el fin de evitar que los anticuerpos candidatos disociados se volviesen a unir. Al final de este ensayo cronológico, las células se fijaron y el nivel de anticuerpo HulgG1- Δ ab restante unido a la superficie celular se midió por citometría de flujo mediante un anticuerpo secundario anti-HulgG de cabra marcado con PE.

- 35 Los inventores también han demostrado que los anticuerpos son activos para prevenir la respuesta inmunitaria en un ensayo de IVE (Figs. 9, 10 y 11) y de MLR. En el ensayo de IVE, la unión a tetrámeros se utilizó como una medición cuantitativa para la IVE. El porcentaje de células que eran específicas para antígenos se determinó mediante tinción de los linfocitos T con un tetrámero marcado directamente que es específico para el péptido diferenciador. De forma resumida, en el día 7 los linfocitos T CD8+ de la IVE se tiñeron con un tetrámero mediante protocolos de tinción de citometría de flujo estándar y se analizaron con BD FACSCalibur. Además, los anticuerpos humanizados demostraron niveles comparables de potencial proliferativo en PBMC y liberación de citocinas, en comparación con el BMA031 (Figs. 12 y 13).

- 40 Los anticuerpos también mostraron una capacidad para inhibir la liberación de IFN γ a partir de linfocitos T en un ensayo de IVE (Fig. 14). Además, los inventores han mostrado que varios de estos anticuerpos tienen una capacidad mejorada para provocar la muerte celular inducida por activación (AICD) de linfocitos T positivos para $\alpha\beta$ TCR activados, en comparación con el BMA031 (Fig. 15). En el ensayo de AICD, los linfocitos T CD8+ específicos para antígenos se cultivaron con un anticuerpo terapéutico. A las 24 horas, 48 horas y 72 horas, las células se tiñeron con los marcadores de apoptosis Anexina V y 7-AAD. Las células también se tiñeron con un tetrámero para monitorizar la apoptosis con efectos en los linfocitos T específicos para antígenos.

- 45 En conclusión, los inventores han realizado una mejora significativa sobre intentos anteriores de humanizar el BMA031. El descubrimiento de anticuerpos con una constante de disociación mejorada, en comparación con el BMA031 es un hallazgo inesperado mediante este proceso. Esta mejora en la unión se correlaciona con una mejora en la potencia para suprimir una respuesta inmunitaria demostrada en el ensayo de IVE (Figs. 10 y 11). La especificidad de los anticuerpos por $\alpha\beta$ TCR, la inmunogenicidad reducida mediante humanización, la apoptosis específica de los linfocitos T activados y la falta de activación de linfocitos T tras la unión del anticuerpo hace de estos anticuerpos unos candidatos excelentes para fines terapéuticos.

Ejemplo 5**Generación de Fc con mutaciones para una función efectora reducida.**

Se diseñaron y generaron variantes de Fc diseñados donde se introduce un sitio de glicosilación en la posición aminoacídica Ser 298, contigua al sitio Asn297 de origen natural. La glicosilación en el Asn297 fue mantenida o suprimida mediante mutaciones. Los resultados de las mutaciones y la glicosilación se exponen en la Tabla 2.

#	Mutación	Resultado predicho	Beneficio esperado
1	N297Q	Aglicosilación	Control agli
2	T299A	Aglicosilación	Control agli, función efectora desconocida
3	N297Q/S298N/Y300S (NSY)	Aglicosilación en 297, pero un sitio de glicosilación diseñado en 298	Función efectora reducida
4	S298N/T299A/Y300S (STY)	Aglicosilación en 297, pero un sitio de glicosilación diseñado en 298	Función efectora reducida
5	S298N/Y300S (SY)	Dos sitios de glicosilación potenciales en 297 y 298. ¿Glicosilación doble? ¿Glicosilación mixta?	Control positivo para la función efectora reducida

Tabla 2

Se llevaron a cabo mutaciones en la cadena pesada del clon #66 del anticuerpo contra el receptor de linfocitos T $\alpha\beta$ mediante QuickChange utilizando un molde pENTR_LIC_IgG1. El dominio VH de HEBE1 Δ ab IgG1 #66 se amplificó con cebadores de LIC y se clonó en pENTR_LIC_IgG1 naturales o con mutaciones mediante LIC para crear Ab con mutaciones o naturales de longitud completa. El subclonaje se verificó con una digestión doble con DralI/XhoI, que produce una inserción de ~1250 pares de bases en los clones con éxito. Estos mutantes de longitud completa se clonaron después en un vector de expresión, pCEP4(-E+I)Dest, mediante clonado Gateway. Las mutaciones se confirmaron después mediante secuenciación de ADN.

Se utilizaron dos constructos, HEBE1 Agli IgG4 y HEBE1 Δ ab IgG1 en pCEP4, como controles en la transfección de HEK293.

Los controles (Agli y Δ ab), wt (origen natural, por sus siglas en inglés) y mutantes se transfectaron en células HEK293-EBNA en matraces múltiples de 3 capas para la expresión. Las proteínas se purificaron a partir de 160 mL de medio acondicionado (CM) con columnas de proteína A HiTrap de 1 mL (GE) conectadas a una bomba peristáltica multicanal. Se analizaron cinco microgramos de cada sobrenadante en SDS-PAGE con un 4-20% de Tris-Glicina reductor y no reductor (remítase a la Figura 16). La cadena pesada de los mutantes aglicosilados (N297Q, T299A y el control agli, es menor (flecha en negro), lo que concuerda con la pérdida de glicanos en estos anticuerpos. Las cadenas pesadas de los anticuerpos glicosilados diseñados (NSY, STY, SY, Δ ab y control wt, flechas en rojo); sin embargo, migran de la misma manera que el control de origen natural. Este resultado es coherente con el resultado esperado del sitio de glicosilación diseñado en las posiciones 298. El análisis por SEC-HPLC indicó que todos los mutantes se expresan como monómeros.

Análisis de glicosilación por LC-MS.

Las variantes de Fc IgG1 H66 diseñadas se redujeron parcialmente con DTT 20 mM a 37 °C durante 30 min. Las muestras se analizaron mediante LC/MS capilar en un sistema de HPLC capilar Agilent 1100 acoplado con un sistema híbrido QSTAR qq TOF (Applied Biosystem). Se utilizó una reconstrucción de proteínas Bayesiana con corrección de la línea base y simulación por ordenador en Analyst QS 1.1 (Applied Biosystem) para el análisis de los datos. Para el ejemplo del anticuerpo con mutación H66 S298N/T299A/Y300S, se observó un sitio de glicosilación en el aminoácido 298 con glicanos de tipo complejo con dos antenas y tres antenas detectados como las especies principales, así como G0F, G1F y G2F.

Unión de anticuerpos contra $\alpha\beta$ TCR con mutaciones a Fc γ R1IIa y Fc γ RI humanos utilizando Biacore

Se utilizó Biacore para evaluar la unión a Fc γ R1IIa (V158 & F158) y Fc γ RI humanos recombinantes. Todas las 4 celdas de flujo de un chip CM5 se inmovilizaron con un anticuerpo anti-HPC4 mediante el procedimiento de acoplamiento de aminos estándar proporcionado por Biacore. El anticuerpo anti-HPC4 se diluyó hasta una concentración de 50 μ g/mL en acetato de sodio 10 mM a pH 5.0 para la reacción de acoplamiento y se inyectó

durante 25 min a 5 µL/min. Se inmovilizaron aproximadamente 12 000 UR de anticuerpo en la superficie del chip. Se diluyeron el FcγRIIIa-V158 y el FcγRI-F158 recombinantes humanos hasta una concentración de 0.6 µg/mL en tampón de unión, HBS-P con CaCl₂ 1 mM y se inyectaron en las celdas de flujo 2 y 4, respectivamente, durante 3 min a 5 µL/min para capturar 300-400 UR de receptor en el chip de anti-HPC4. Con el fin de distinguir los de unión

5 baja, se capturó tres veces más rhFcγRIIIa en la superficie del anti-HPC4 que el normalmente utilizado en este ensayo. Las celdas de flujo 1 y 3 se utilizaron como controles de referencia. Cada anticuerpo se diluyó hasta una concentración de 200 nM en tampón de unión y se inyectó en todas las 4 celdas de flujo durante 4 min, seguidos de 5 min de disociación en tampón. Las superficies se regeneraron con EDTA 10 mM en tampón HPS-EP durante 3 min a 20 µL/min.

10 Los resultados se muestran en la Figura 17.

También se utilizó Biacore para comparar la unión a FcγRI. El anticuerpo anti-tetra His se intercambió con tampón en acetato de sodio 10 mM a pH 4.0 utilizando una columna de desalinización Zeba y se diluyó hasta una concentración de 25 µg/mL en el tampón de acetato para el acoplamiento de aminas. Se inmovilizaron dos celdas de

15 De forma similar al experimento previo, se capturó diez veces más FcγRI en la superficie del anti-tetra-his con el fin de comparar los de unión débil. El FcγRI humano recombinante se diluyó 10 µg/mL en tampón de unión HBS-EP y se inyectó en la celda de flujo 2 durante 1 min a 5 µL/min para capturar ~ 1000 UR de receptor en el chip anti-tetra-His. Se inyectó una única concentración de anticuerpo, 100 nM, durante 3 min a 30 µL/min sobre el receptor capturado y la superficie de control. La disociación se monitorizó durante 3 min. La superficie se regeneró con dos

20 inyecciones de 30 s de glicina 10 mM a pH 2.5 a 20 µL/min.

Los resultados se muestran en la Figura 18.

El resultado sugiere muy poca unión de los mutantes con glicosilaciones diseñadas a FcγRIIIa o FcγRI. El H66 S298N/T299A/Y300S en particular tiene una unión suprimida casi por completo a ambos receptores. Este mutante se seleccionó como el ejemplo para la caracterización detallada.

25 Caracterización de la estabilidad utilizando dicroísmo circular (CD).

La estabilidad del anticuerpo con la mutación S298N/T299A/Y300S se monitorizó mediante un experimento de termofusión de CD en el UV lejano, donde la señal de CD a 216 nm y 222 nm se monitorizaba a medida que la temperatura aumenta, lo que eventualmente da lugar al despliegue del anticuerpo. Los espectros de CD se registraron en un espectrofotómetro Jasco 815 con una concentración proteica de aproximadamente 0.5 mg/mL en

30 tampón de PBS en una cubeta de cuarzo (Hellma, Inc) con un paso óptico de 10 mm. La temperatura se controló con un peltier termoelectrónico (modelo Jasco AWC100) y se aplicó una rampa con una velocidad de 1 °C/min de 25-89 °C. Se recogieron tanto la señal de CD como el voltaje de HT. Se obtuvieron datos de 210-260 nm con intervalos de datos de 0.5 nm y a intervalos de temperatura de 1 °C. La velocidad de barrido fue de 50 nm/min y una separación de datos de 0.5 nm. Se utilizó un ancho de banda de 2.5 nm con un ajuste de sensibilidad de medio. Se

35 realizaron cuatro barridos replicados para cada muestra. El resultado sugiere que tanto el H66 delta AB como el mutante H66 S298N/T299A/Y300S muestran un comportamiento térmico similar y tienen la misma temperatura de inicio para la degradación alrededor de 63 °C. Dicho de otro modo, el mutante es tan estable como el formato delta AB.

Remítase a la Figura 18.

40 **Ejemplo 6**

Análisis funcional de mutantes con Fc diseñados

Los ensayos de proliferación de PBMC y de liberación de citocinas se llevaron a cabo tal como se ha expuesto en el Ejemplo 2. Las PBMC de donantes normales se descongelaron y se trataron en las siguientes condiciones (todos en medios que contenían complemento):

- 45
- No tratadas
 - BMA031, molgG2b con una concentración de 10 µg/mL
 - OKT3, molgG2a con una concentración de 10 µg/mL
 - H66, hulgG1 delta AB con una concentración de 10 µg/mL, 1 µg/mL y 0.1 µg/mL
 - H66, hulgG1 S298N/T299A/Y300S con una concentración de 10 µg/mL, 1 µg/mL y 0.1 µg/mL.

50 Las citocinas se recogieron en el día 2 (D2) y en el día 4 (D4) para un análisis Bioplex (IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, GM-CSF, IFNγ, TNFα). Las células se tiñeron al D4 para la expresión de abTCR, CD4, CD8 y CD25.

Los resultados, mostrados en las Figuras 19-22, demuestran que el H66 S298N/T299A/Y300S se comportó de forma similar al H66 deltaAB en todos los ensayos basados en células, al mostrar una activación de linfocitos T mínima mediante la expresión de CD25; unión a abTCR, aunque con cinéticas ligeramente diferentes a deltaAB; liberación de citocinas mínima en ambos puntos temporales D2 y D4; el mutante fue de hecho superior a deltaAB en el D4 en cuanto a varias citocinas.

La mutación S298N/T299A/Y300S, por tanto, eliminó la función efectora de forma tan eficaz como la mutación deltaAB.

Ejemplo 7

Anticuerpos biespecíficos

Se construyeron moléculas biespecíficas compuestas por dos anticuerpos monocatenarios (scFv) unidos entre sí mediante un conector de aminoácidos corto, donde una rama puede unirse a una diana tumoral y la otra puede unirse a linfocitos T mediante el $\alpha\beta$ TCR. La molécula biespecífica se denomina en la presente TRACER (habilitador citotóxico activado por receptores de linfocitos T).

Se produjeron los siguientes constructos scFc anti- $\alpha\beta$ TCR humanizados:

GL1BM Δ SxVK1

GL1BM Δ SxVK27

GL1BM Δ SVH11xVK1

GL1BM Δ SVH15xVK1

GL1BM Δ SVH28xVK43

GL1BM Δ SVH31xVK43

Las secuencias de las cadenas ligeras y pesadas se exponen en las SEQ ID n.^{os} 14-16 y 20-24.

La caracterización de estas moléculas comprendía una evaluación de la unión a dianas tumorales y linfocitos T, la actividad citotóxica *in vitro* y el perfil de liberación de citocinas en presencia y ausencia de células diana tumorales.

El perfil de unión evaluado por citometría de flujo muestra que los anticuerpos biespecíficos anti- $\alpha\beta$ TCR pueden unirse tanto a la línea celular diana tumoral como a los linfocitos T. Remítase a la Figura 23.

La actividad citotóxica *in vitro* medida por citometría de flujo muestra que los linfocitos T reclutados mediante un anticuerpo biespecífico anti- $\alpha\beta$ TCR pueden inducir lisis mediada por linfocitos T. Remítase a la Figura 24.

El análisis del perfil de liberación de citocinas ha mostrado que tras la unión de ambas ramas del anticuerpo biespecífico existe un nivel elevado de liberación de citocinas TH1/TH2 a partir de los linfocitos T que no se observa en ausencia de células diana. En conjunto, este mecanismo de acción muestra un perfil similar al de los biespecíficos basados en CD3 descritos en la bibliografía.

Ejemplo 8: Preparación y caracterización de una variante con Fc diseñado en un anticuerpo anti-CD52.

Con el fin de evaluar la generalidad de la aplicabilidad de las mutaciones de Fc descritas en la presente, también se preparó una mutación de glicosilación S298N/Y300S en un anticuerpo anti-CD52 (clon 2C3) para comprobar si la modulación de la función efectora con la pérdida de la unión a FCyRIII se aplica a una estructura de anticuerpo diferente. El ADN de la variante S298N/Y300S 2C3 se preparó mediante mutagénesis QuickChange. La proteína se purificó a partir de medios acondicionados después de la transfección transitoria de HEK293. El anticuerpo de origen natural anti-CD52 2C3 se produjo en paralelo como control. Se utilizó Biacore para caracterizar la unión a antígeno, el FCyRIII, y las propiedades de unión de los anticuerpos purificados (remítase a la Figura 26).

La variante S298N/Y300S 2C3 se une estrechamente al péptido CD52 y el sensorgrama de la unión es indistinguible del control de origen natural, lo que sugiere que esta mutación en el dominio Fc no afecta a su unión a antígenos (Figura 26A).

Para someter a ensayo la función efectora de Fc, se utilizó el receptor FCyRIII (Val158) en estudios de unión. El anticuerpo de control de origen natural y el mutante se diluyeron hasta una concentración de 200 nM y se inyectaron a un FCyRIIIa capturado con un marcador HPC4. La unión a FCyRIII es prácticamente indetectable para el mutante S298N/Y300S, lo que indica una pérdida de la función efectora con esta variante (Figura 26B). El mutante también se une al receptor FcRn con la misma afinidad que el anticuerpo de control de origen natural, de modo que los inventores no esperan ningún cambio en su semivida en circulación u otras propiedades farmacocinéticas (remítase a la Figura 26C). Los inventores concluyen que la mutación S298N/Y300S es aplicable a los anticuerpos en general,

para reducir o eliminar la función efectora de Fc no deseada, por ejemplo, mediante el acoplamiento de receptores Fcγ humanos.

Listado de secuencias

SEQ ID NO: 1

5 Dominio variable de cadenas pesadas de BMA031:

**EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDV
TKYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVHYCARGSYDYDGFVYWGQGT
LTVSA**

SEQ ID NO: 2

Dominio variable de cadenas ligeras de BMA031:

**QIVLTQSPAISASPGEKVTMTCSATSSV.SYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVP
ARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK**

10 SEQ ID NO: 3

Dominio variable de cadenas pesadas de EuCIV3:

**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYKFTSYVMHWVKQAPGQGLEWIGYINPYNDV
TKYNEKFKGKATLTADSTNTAYMELSSLRSEDYAVHYCARGSYDYDGFVYWGQGT
LTVSS**

SEQ ID NO: 4

Dominio variable de cadenas ligeras de EuCIV3:

**DIQMTQSPSTLSASVGDRVTMTCSATSSV.SYMHWYQQKPGKAPKRWIYDTSKLASGV
PARFIGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK (h)**

15

SEQ ID NO: 5

Dominio variable de cadenas pesadas de HEBE1:

**EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHWVKQAPGKGLEWIGYINPYNDV
TKYNEKFKGKATLSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVHYCARGSYDYDGFVYWGQGT
LTVSS**

SEQ ID NO: 6

20 Dominio variable de cadenas ligeras de HEBE1:

**DIQMTQSPSTLSASVGDRVTMTCSATSSVSYMHWYQQKPGKAPKRWIYDTSKLASGV
PARFIGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK**

SEQ ID NO: 7

Dominio variable de cadenas pesadas de HEBE1 H10:

**EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTSYVMHWVKQAPGKGLEWIGYINPYNDV
TKYNEKFKGKATLSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVHYCARGSYDYDGFVYWGQGT
LTVSS**

25 SEQ ID NO: 8

Dominio variable de cadenas pesadas de GL1BM:

**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYKFTSYVMHWVRQAPGQRLEWMGYINPYND
VTKYNEKFKGKATITRDT SANTAYMELSSLRSED TAVYYCARGSYDYDGFVYWGQG
LTVVSS**

SEQ ID NO: 9

Dominio variable de cadenas ligeras de GL1BM:

**EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSIMHWYQQKPGQAPRRWIYDTSKLASGVP
ARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK**

SEQ ID NO: 10

Fc de HulgG1 delta ab:

**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPV
AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

SEQ ID NO: 11

Fc de HulgG4 agli:

**ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
QFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK**

SEQ ID NO: 12

Dominio variable de cadenas pesadas de HEBE1 H66:

**EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHWVRQAPGKGLEWVGYNPYND
VTKYNEKFKGRFTLSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDYDGFVYWGQG
TLTVVSS**

SEQ ID NO: 13

Dominio variable de cadenas pesadas de HEBE1 H71:

**EVQLLES GGGLVQPGGSVRLSCAASGYKFTSYVMHWVRQAPGKGLEWVGYNPYND
VTKYNEKFKGRFTLSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSYDYDGFVYWGQG
TLTVVSS**

SEQ ID NO: 14

Dominio variable de cadenas ligeras de GL1BM VK43:

**EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSIMHWYQQKPGQAPRRLIYDTSKLASGVP
ARFSGSGSGTSYTLTISSELEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK**

SEQ ID NO: 15

Dominio variable de cadenas pesadas de GL1BM VH28:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSYVMHWVKQAPGQGLEWIGYINPYNDV
TKYNEKFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGSYDYDGFVYWGQGT
VTVSS

SEQ ID NO: 16

5 Dominio variable de cadenas pesadas de GL1BM VH31:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSYVMHWVRQAPGQGLEWIGYINPYNDV
TKYNEKFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGSYDYDGFVYWGQGT
VTVSS

SEQ ID NO: 17

CADENA PESADA DE IGH3-23

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS
TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAK

10 SEQ ID NO: 18

CADENA PESADA DE IGHV1-3*01

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGN
GNTKYSQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR

SEQ ID NO: 19

CADENA LIGERA DE IGKV3-11*01

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIP
ARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWP

15

SEQ ID N.º 20

GL1BM VHΔS

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSYVMHWVRQAPGQRLEWMGYINPYND
VTKYNEKFKGKATITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGSYDYDGFVYWGQGT
LVTVSS

SEQ ID N.º 21

20 GL1BM VK1

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWYQQKPGQAPRRWIYDTSKLASGVP
ARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID N.º 22

GL1BM VK27

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWYQQKPGQAPRRWIYDTSKLASGVP
ARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK

25 SEQ ID N.º 23

GL1BM VHΔS VH11

**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDV
TKYNEKFKGKATITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGSYDYDGFVYWGQGT
LVTSS**

SEQ ID N.º 24

GL1BM VHΔS VH15

**QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSYVMHWVKQAPGQGLEWIGYINPYNDV
TKYNEKFKGKATITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGSYDYDGFVYWGQGT
LVTSS**

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal humanizado específico para el complejo $\alpha\beta$ TCR/CD3 humano que comprende una región variable de cadenas pesadas que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo compuesto por las secuencias expuestas como SEQ ID NO: 7, 12, 13, 15 y 16, y una región variable de cadenas ligeras que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 14.
2. El anticuerpo monoclonal humanizado de acuerdo con la reivindicación 1, donde la región variable de cadenas pesadas se selecciona a partir del grupo compuesto por las secuencias de aminoácidos expuestas como SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13.
3. El anticuerpo monoclonal humanizado de acuerdo con la reivindicación 1, donde la región variable de cadenas pesadas se selecciona del grupo compuesto por las secuencias de aminoácidos expuestas como SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16.
4. El anticuerpo monoclonal humanizado de acuerdo con la reivindicación 1, donde la región variable de cadenas pesadas tiene la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 15.
5. El anticuerpo monoclonal humanizado de acuerdo con la reivindicación 1, donde la región variable de cadenas pesadas tiene la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 16.
6. El anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que además comprende una región constante de origen humano.
7. El anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 6, que además comprende una modificación de Fc que reduce la unión al receptor Fc γ .
8. El anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende una región Fc aglicosilada o una modificación delta ab.
9. El anticuerpo humanizado de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende un patrón de glicosilación modificado.
10. Un ácido nucleico que codifica al menos una región variable de cadenas pesadas y una región variable de cadenas ligeras de un anticuerpo monoclonal humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Una célula que expresa un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10.
12. El anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en la supresión de una respuesta mediada por linfocitos T en un sujeto.
13. El anticuerpo humanizado para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde la respuesta mediada por linfocitos T está implicada en una afección seleccionada a partir de trasplante de tejidos, que incluye trasplante de órganos sólidos y trasplante de tejidos compuestos, injerto de tejidos, esclerosis múltiple y diabetes tipo 1.

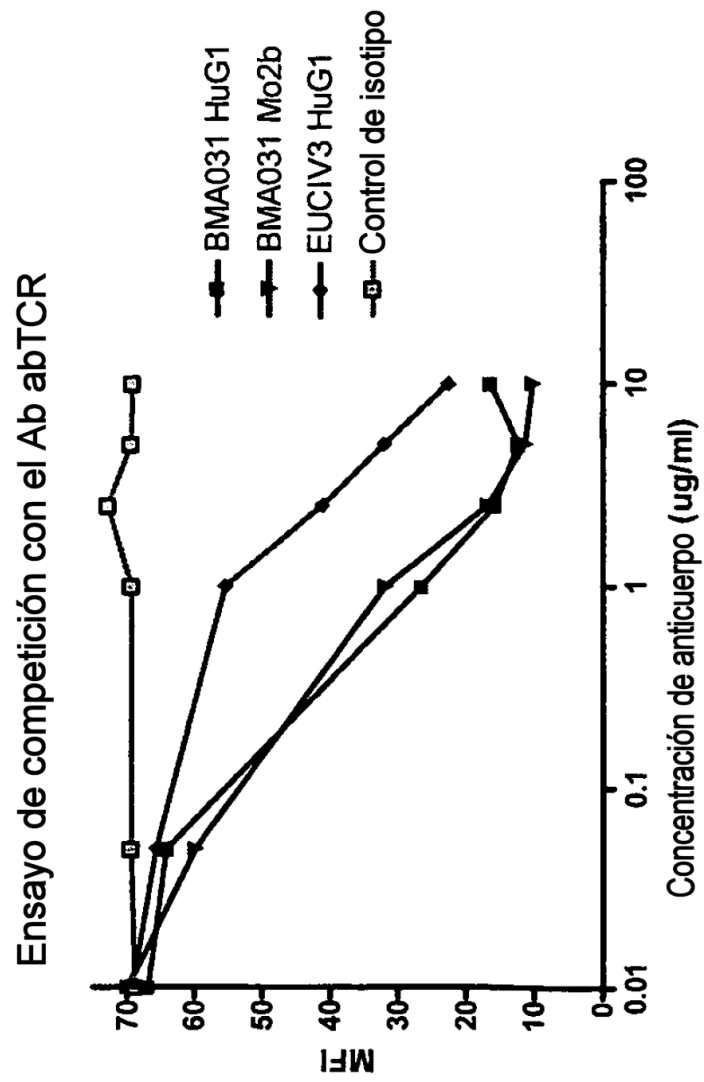


Figura 1

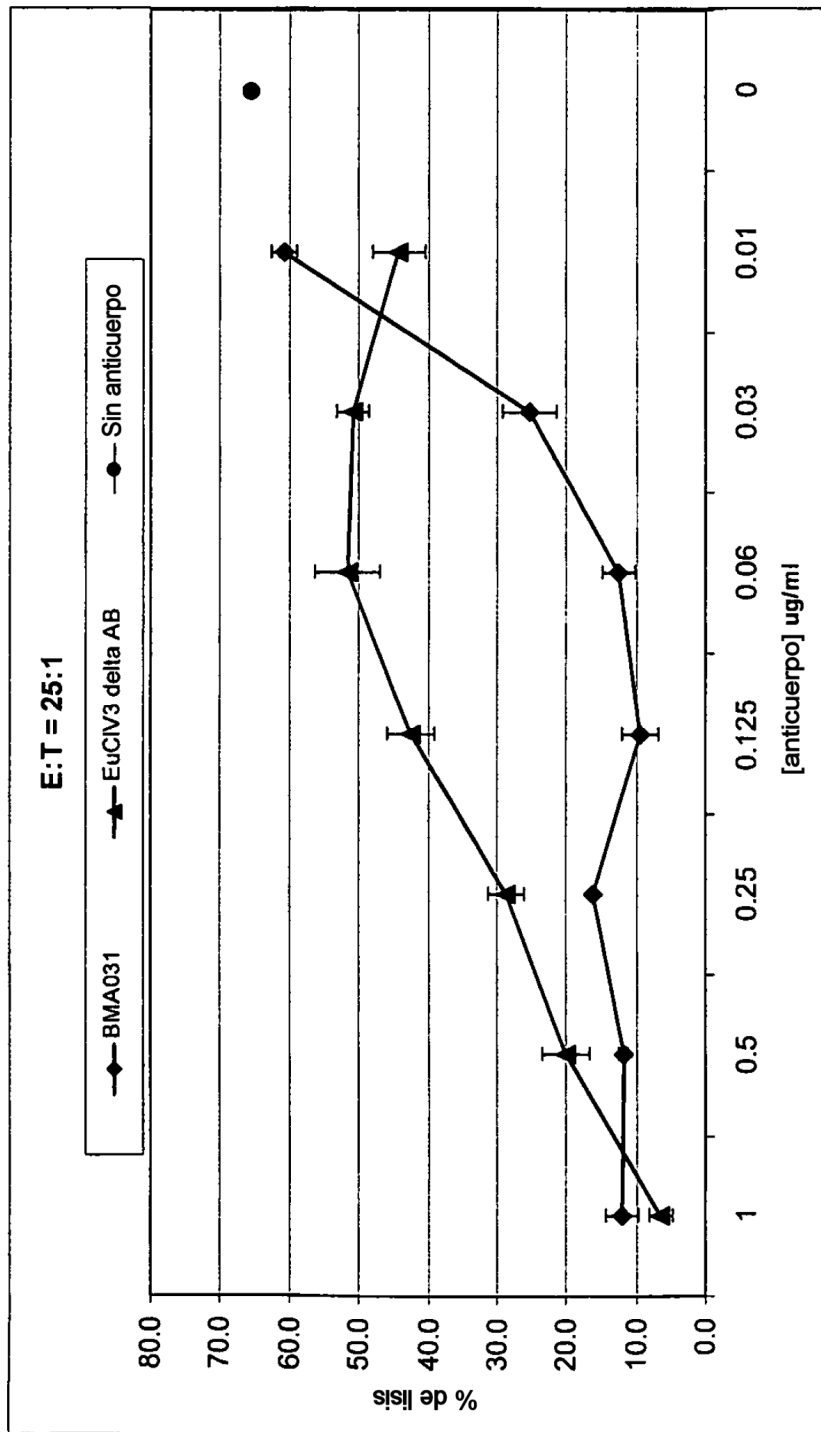


Figura 2

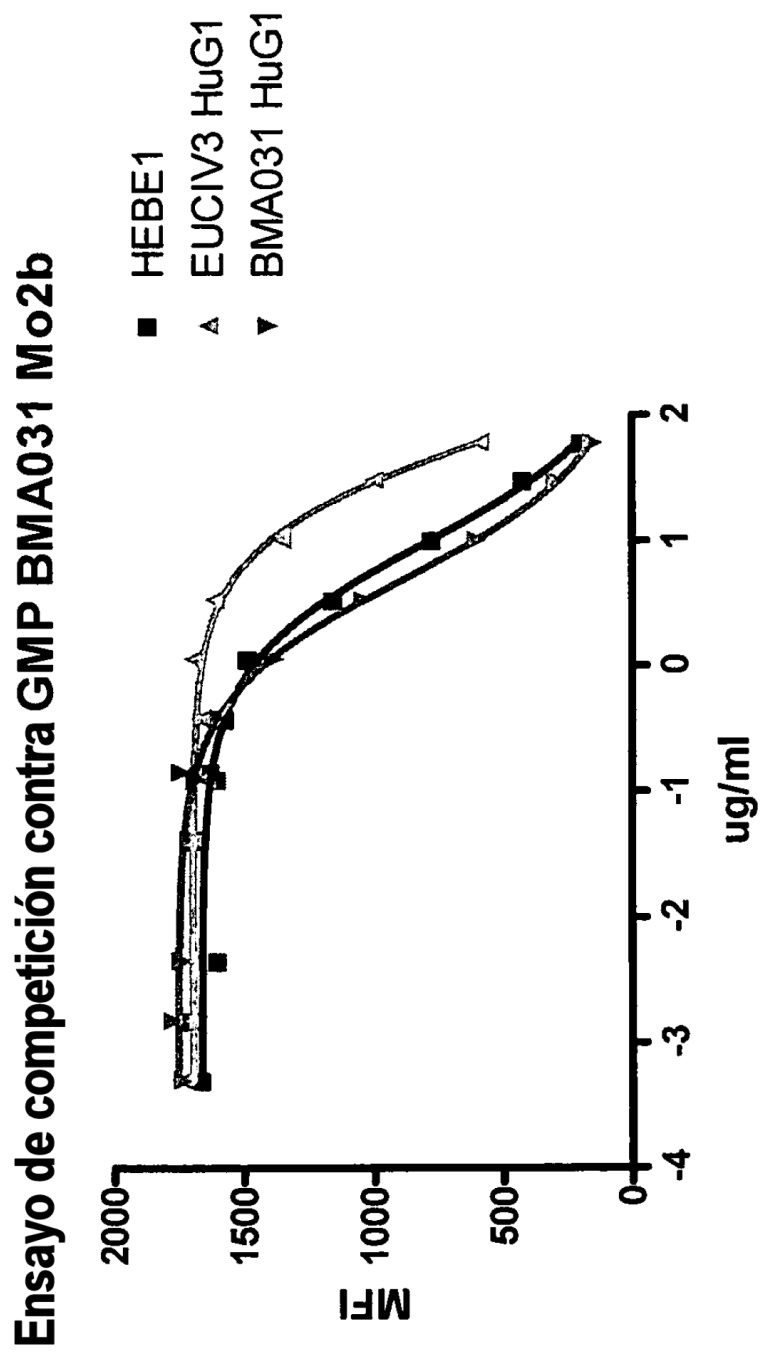


Figura 3

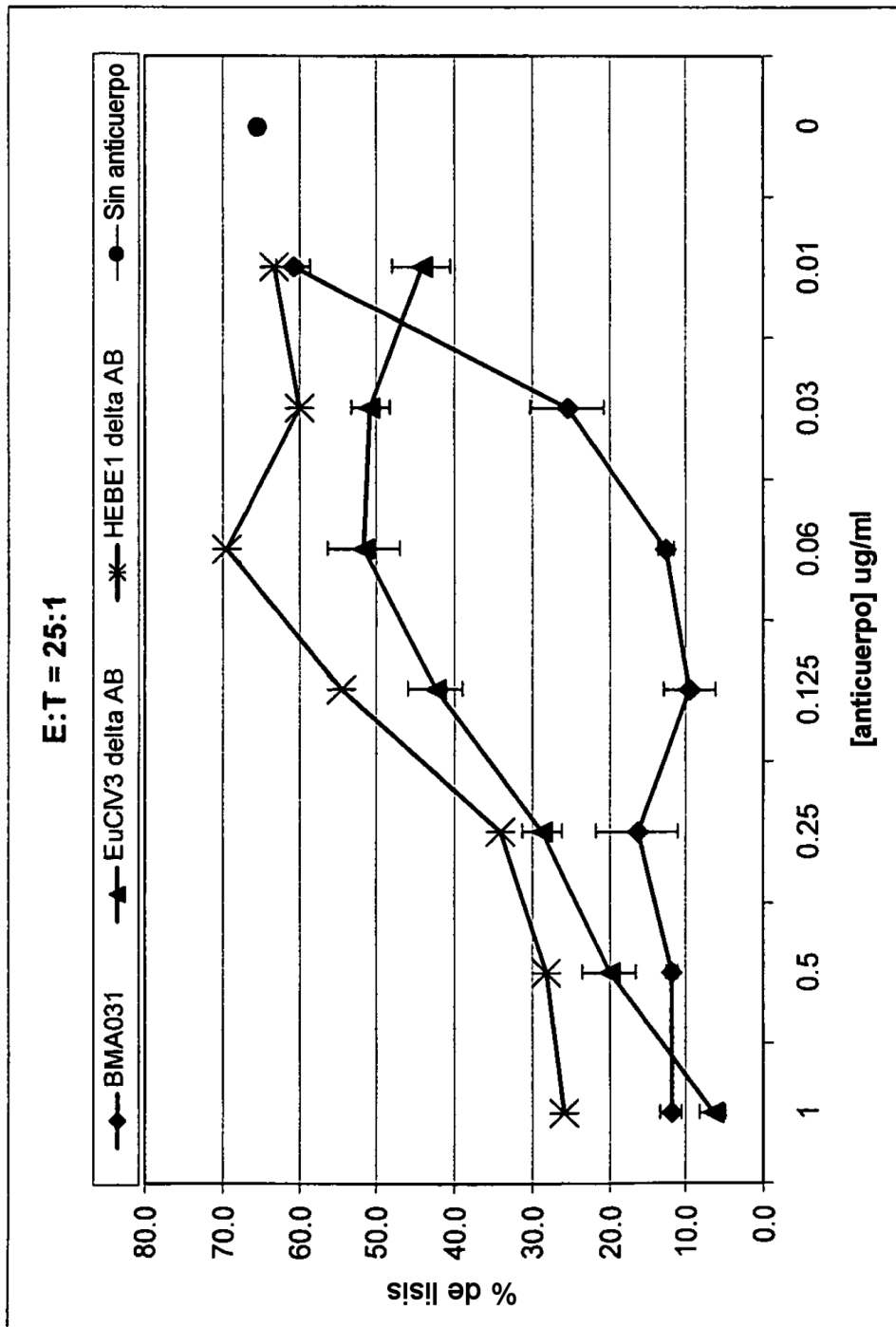


Figura 4

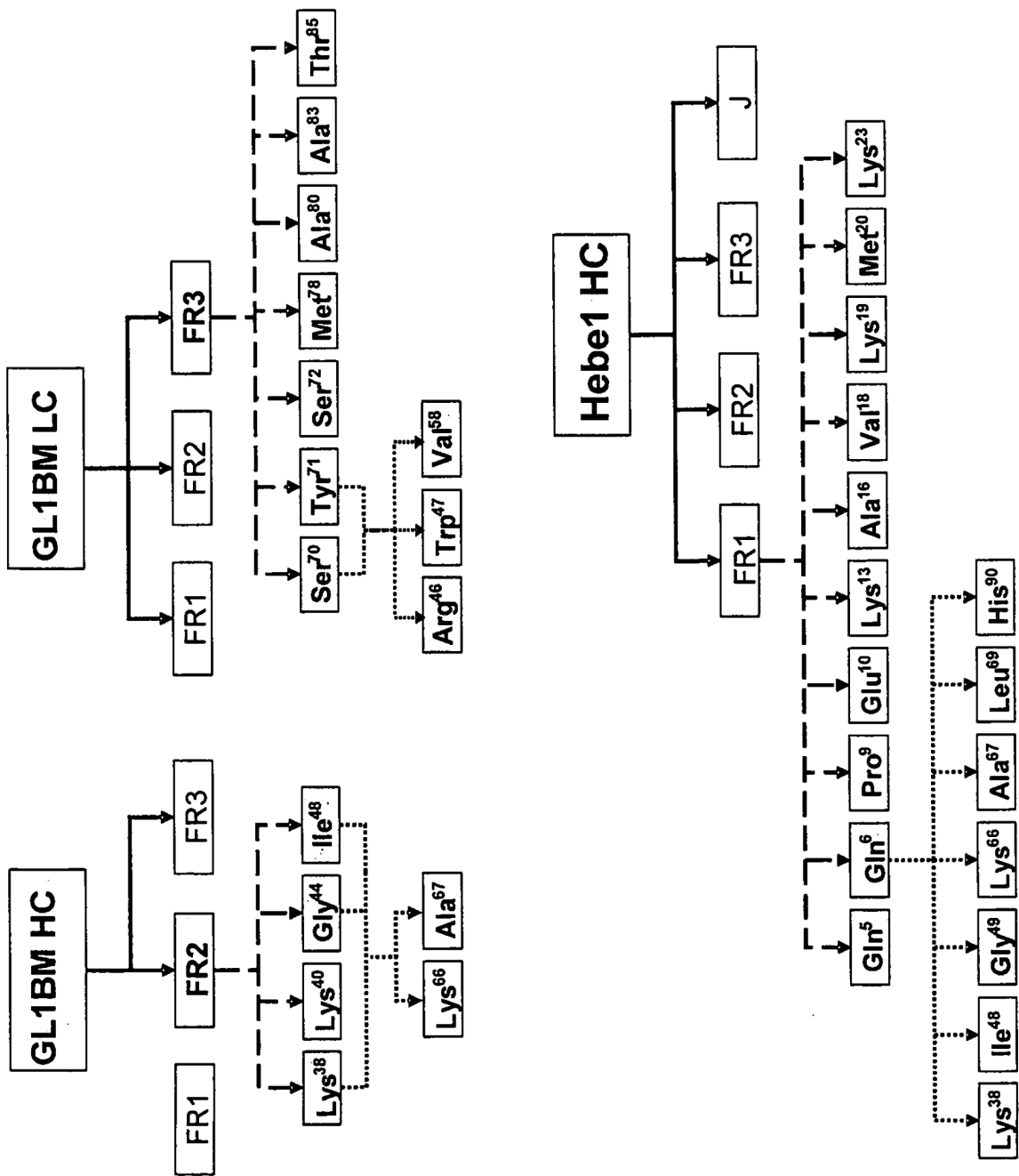


Figura 5

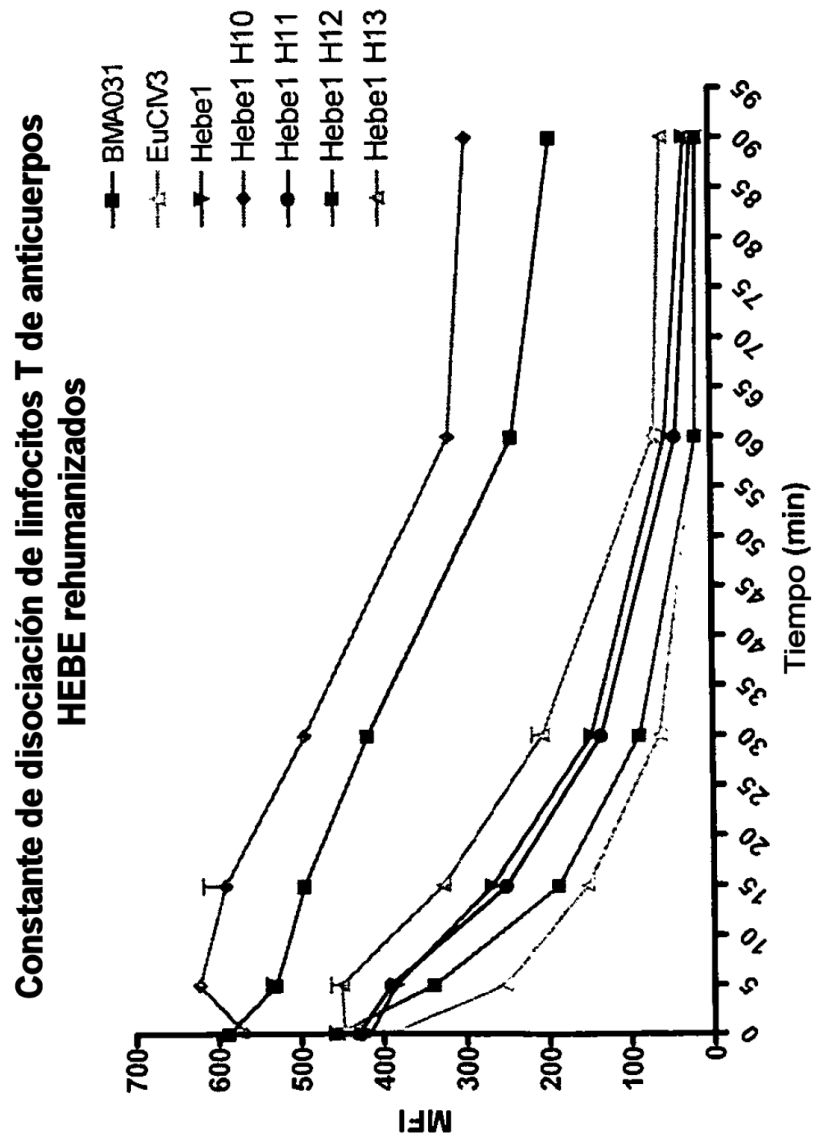


Figura 6

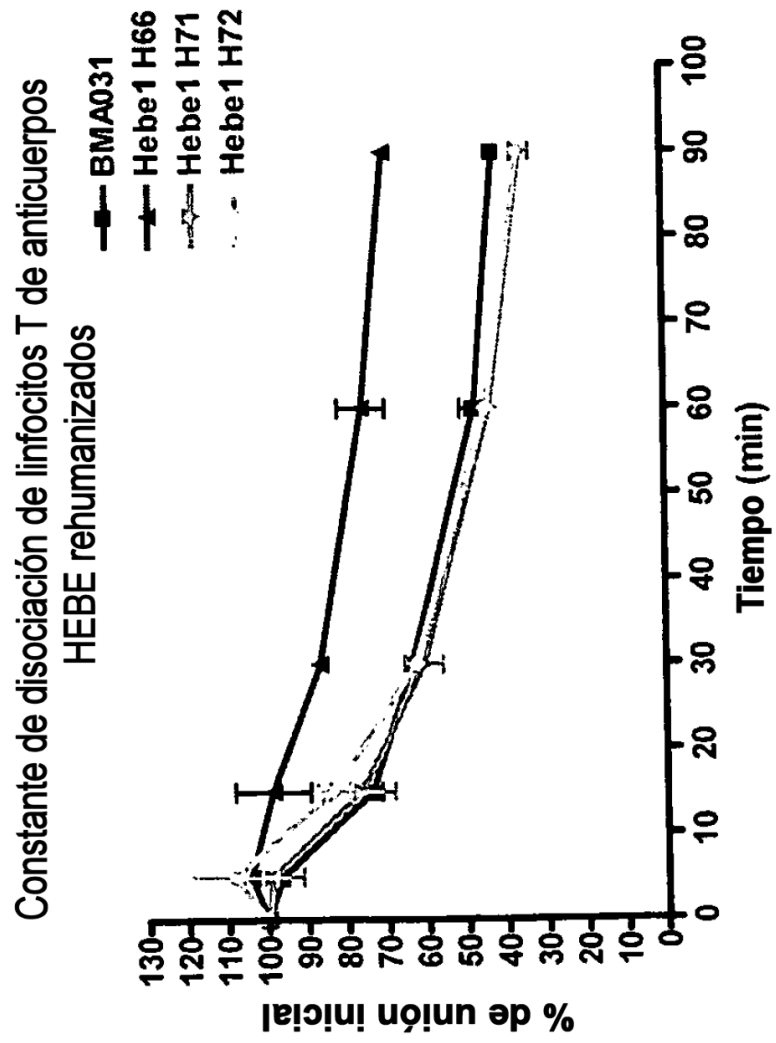


Figura 7

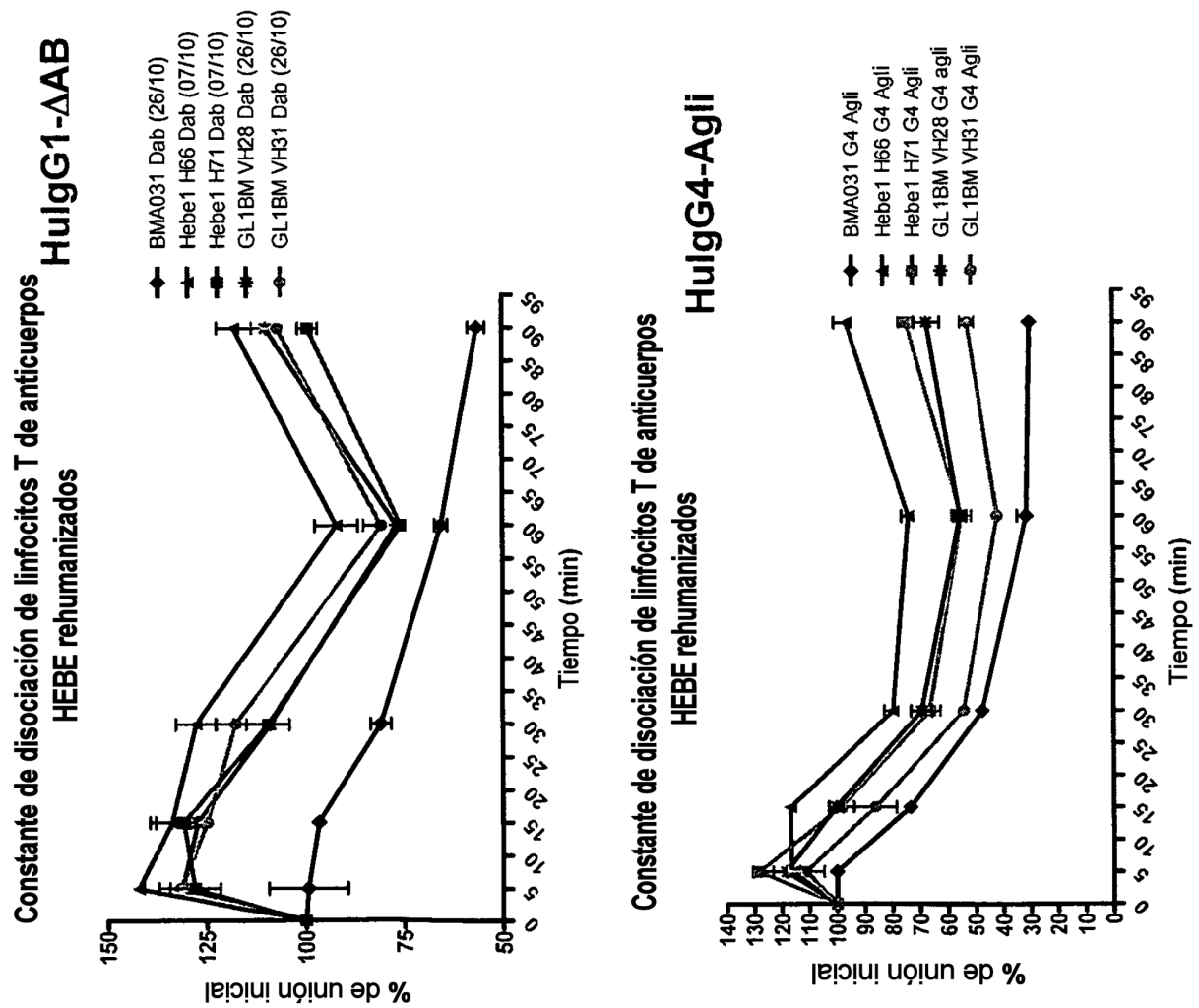


Figura 8

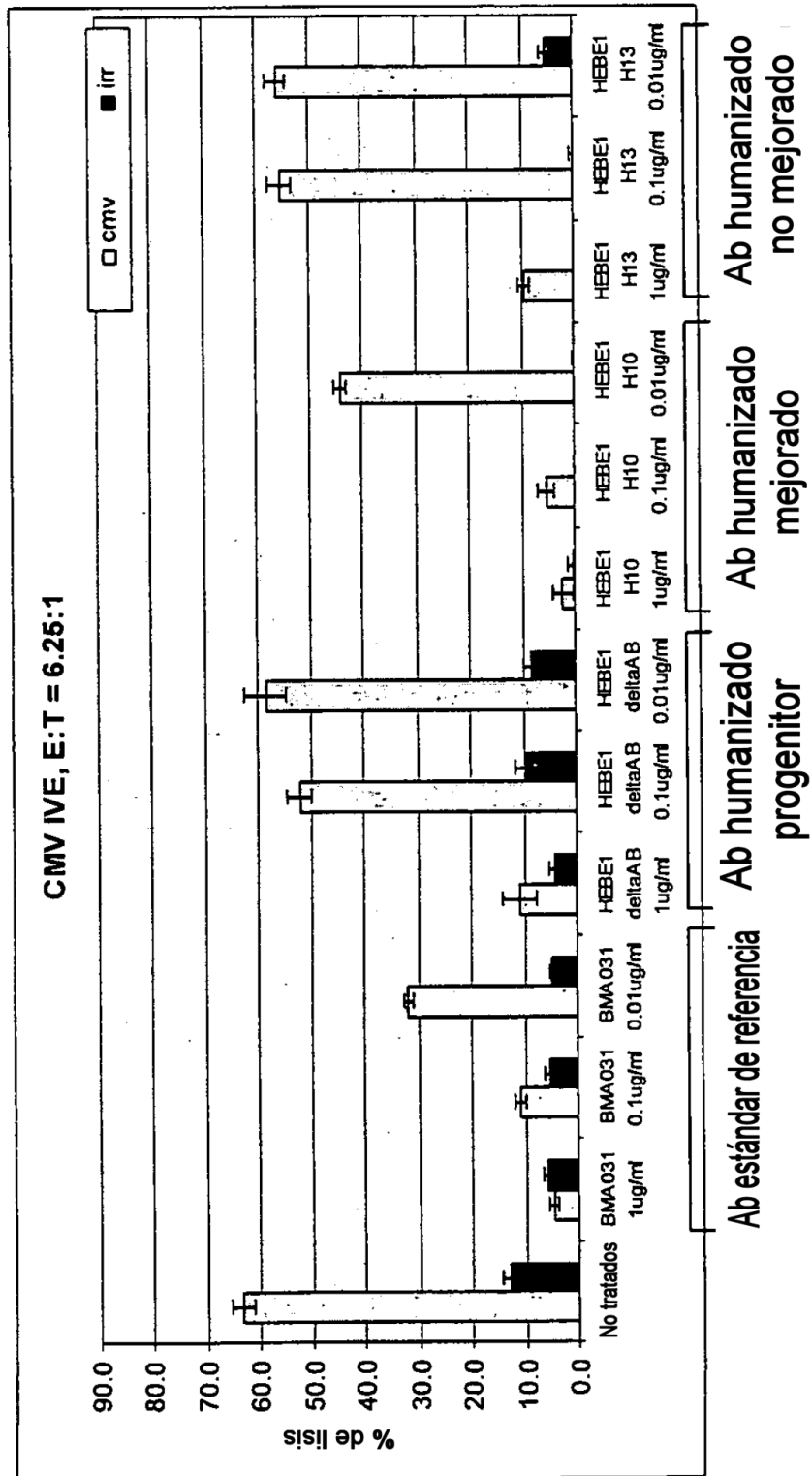
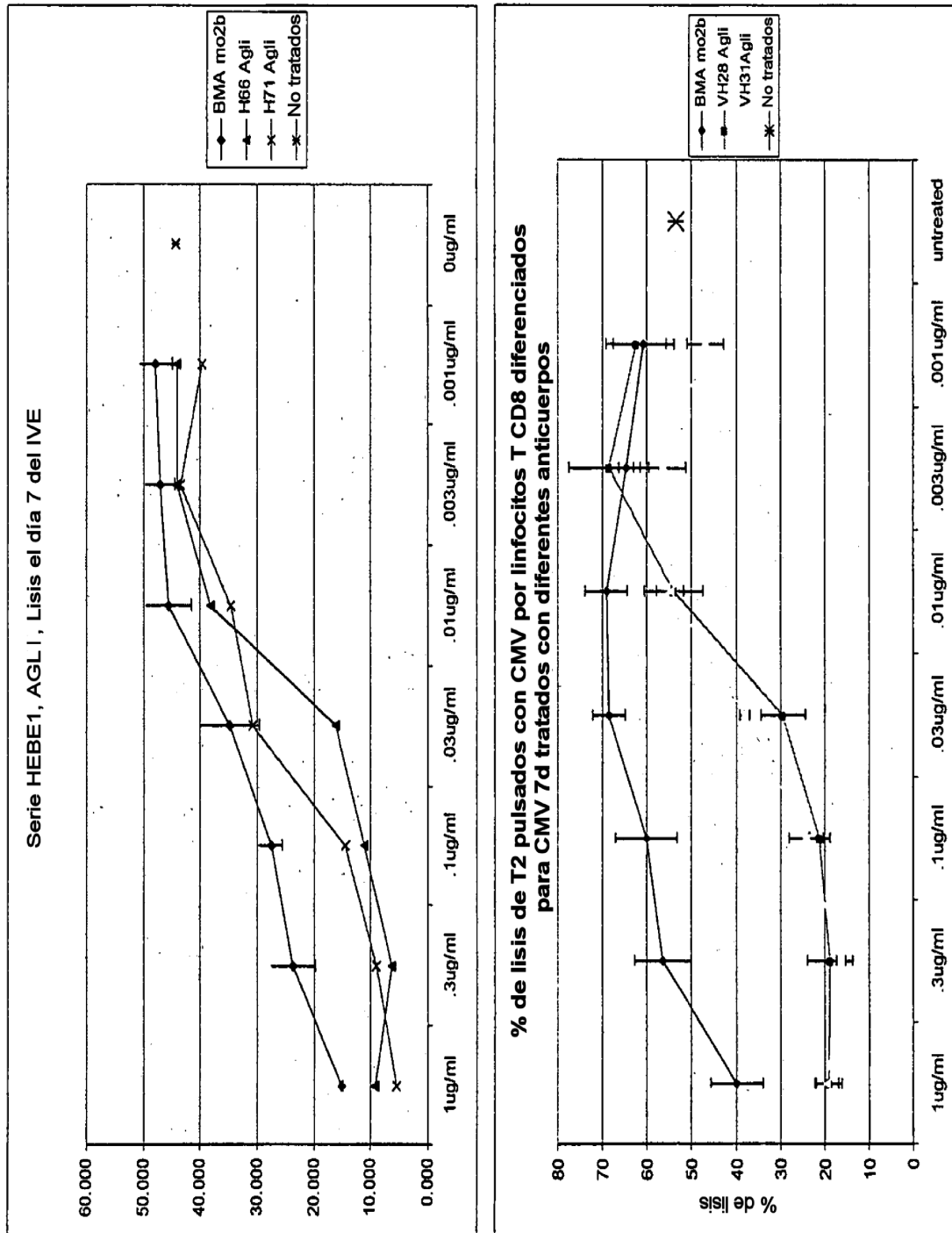


Figura 9



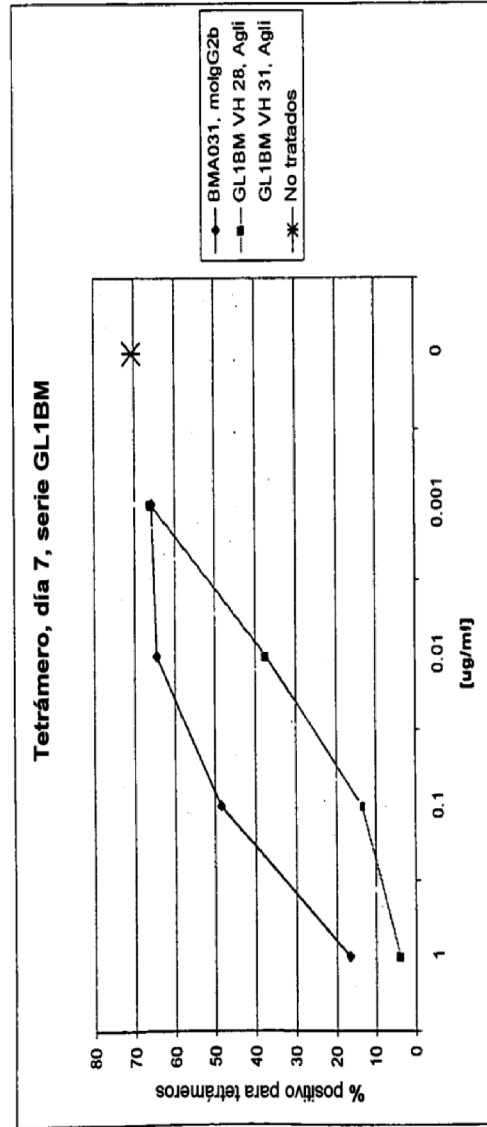
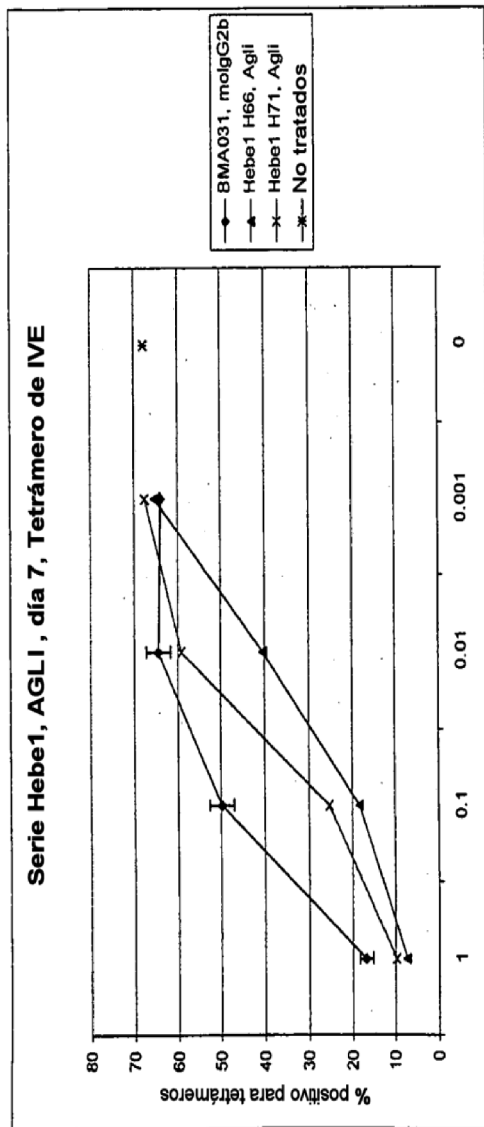


Figura 11

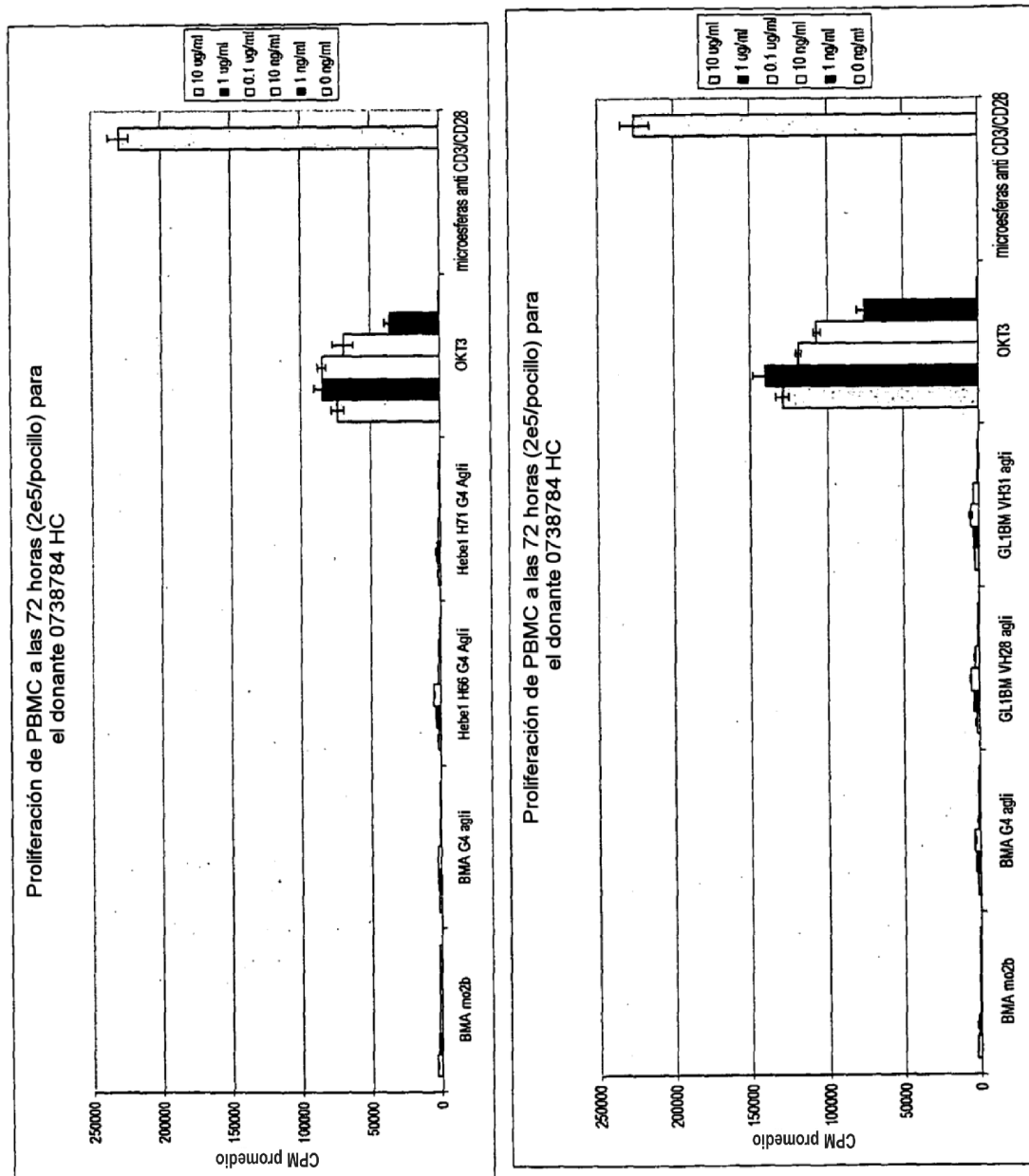


Figura 12

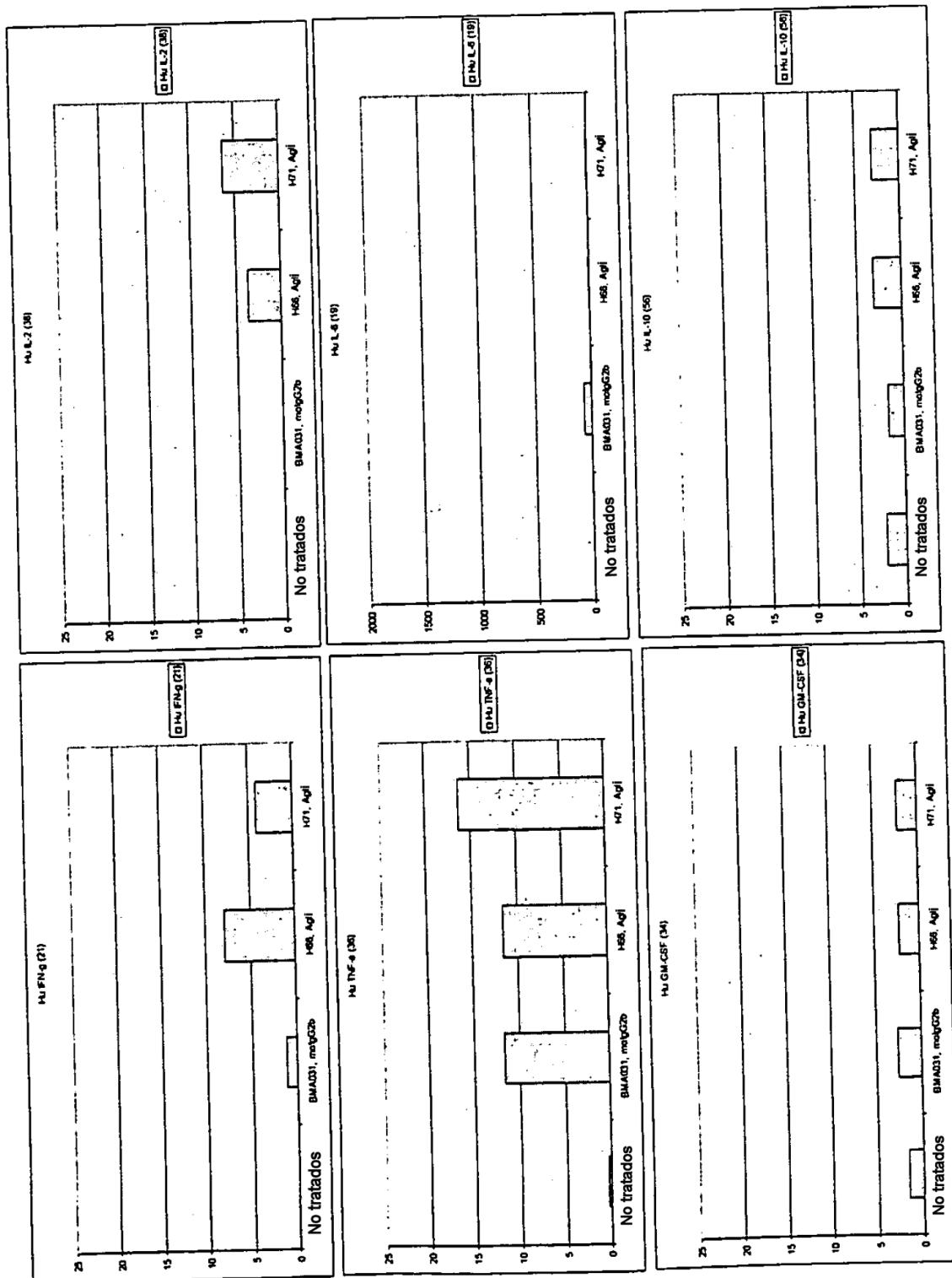


Figura 13

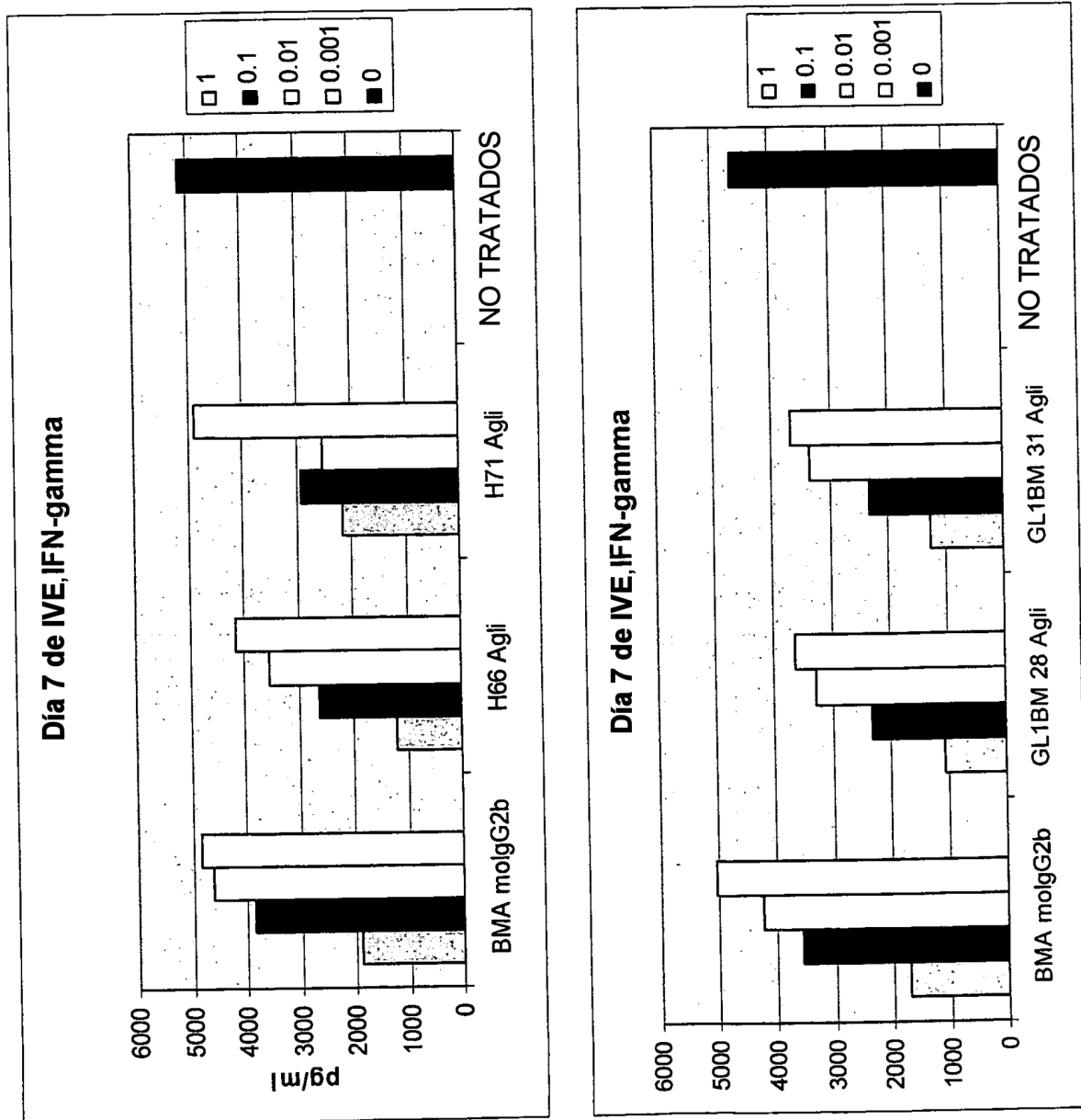


Figura 14

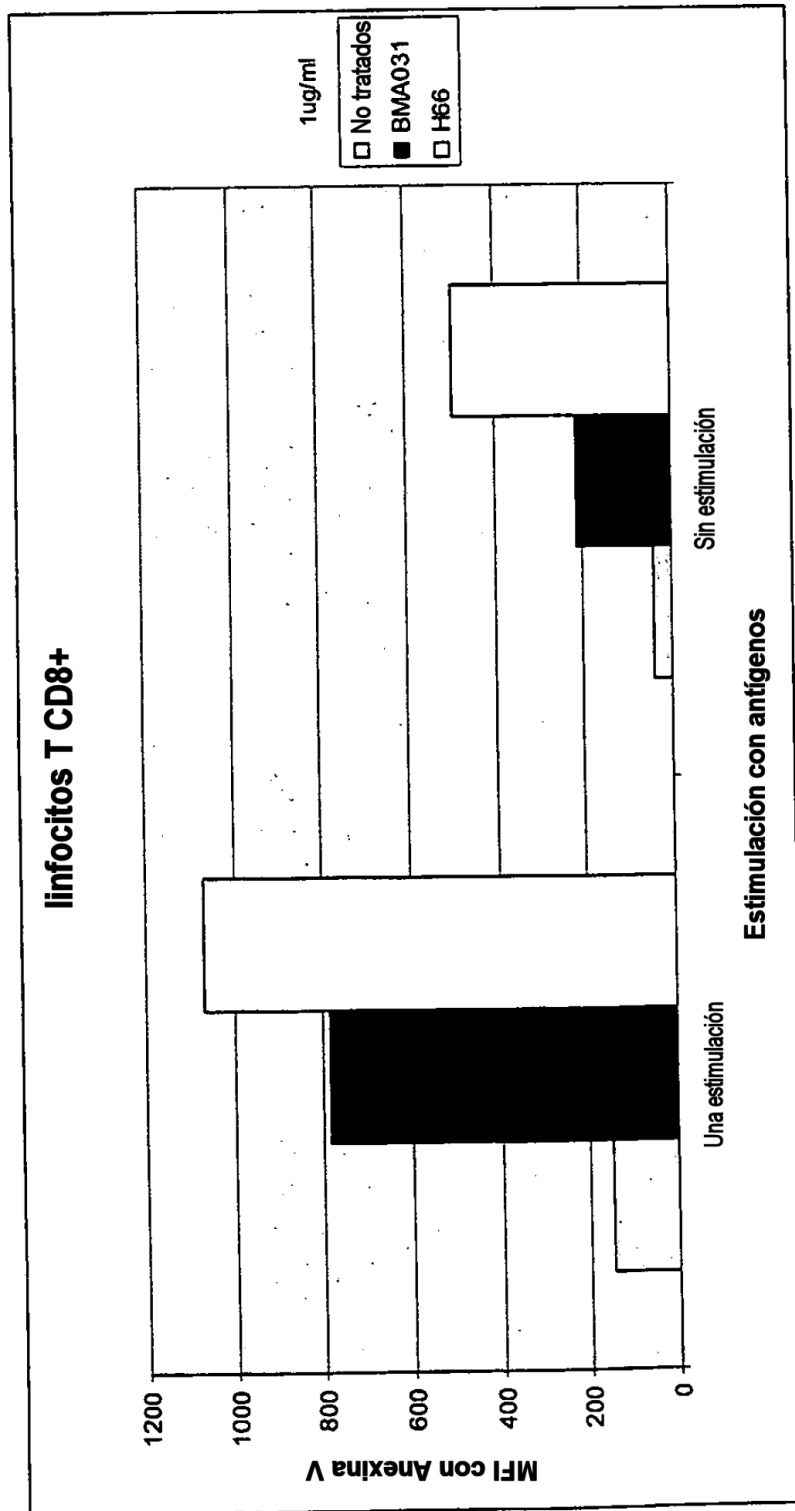


Figura 15

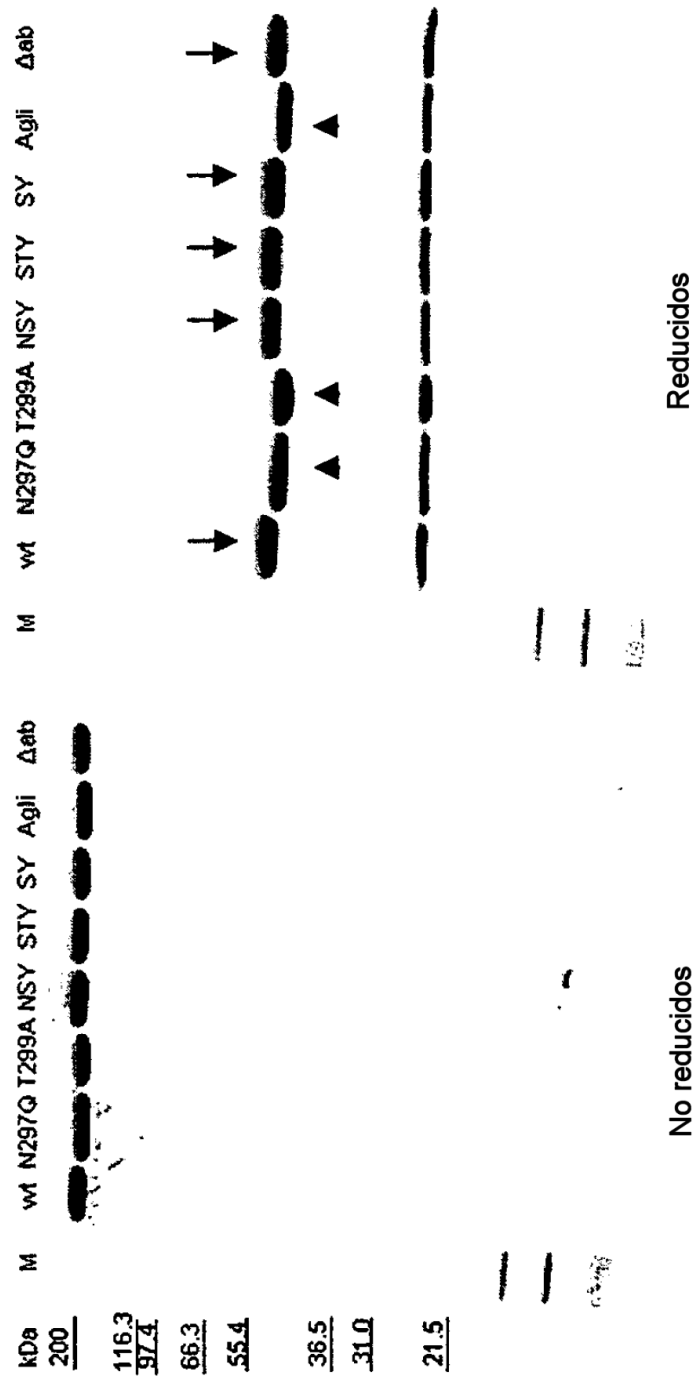
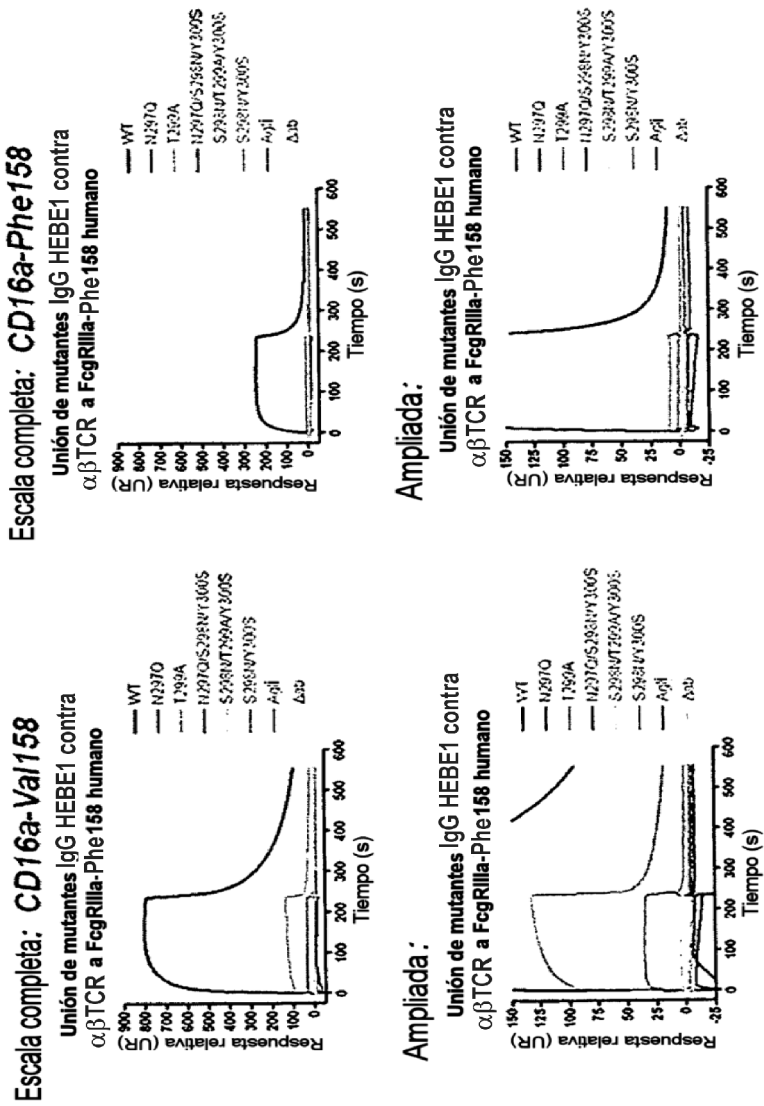


Figura 16

Unión a FcγRIII humano

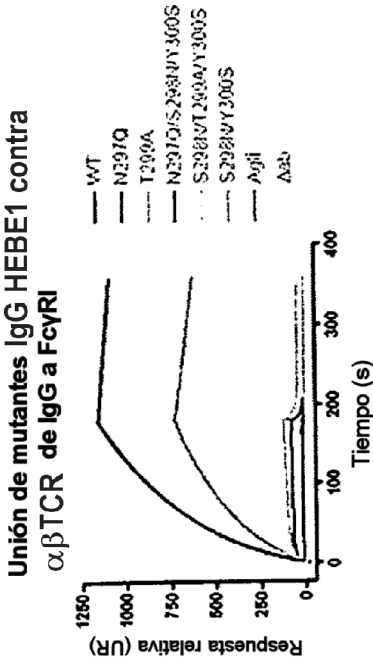


○ Muy poca unión a FcγRIIIa por parte de los mutantes, H66 S298NT299AY300S en particular.

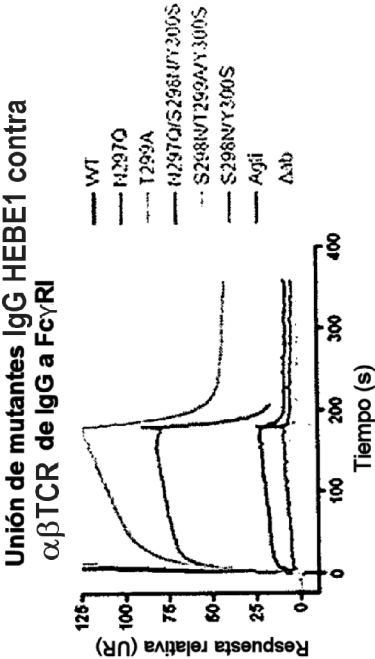
Figura 17

Unión a FcγRI humano

Escala completa :



Aumentada:



○ Muy poca unión a FcγRI por parte de los mutantes, H66 S298N/T299A/Y300S en particular.

Figura 18

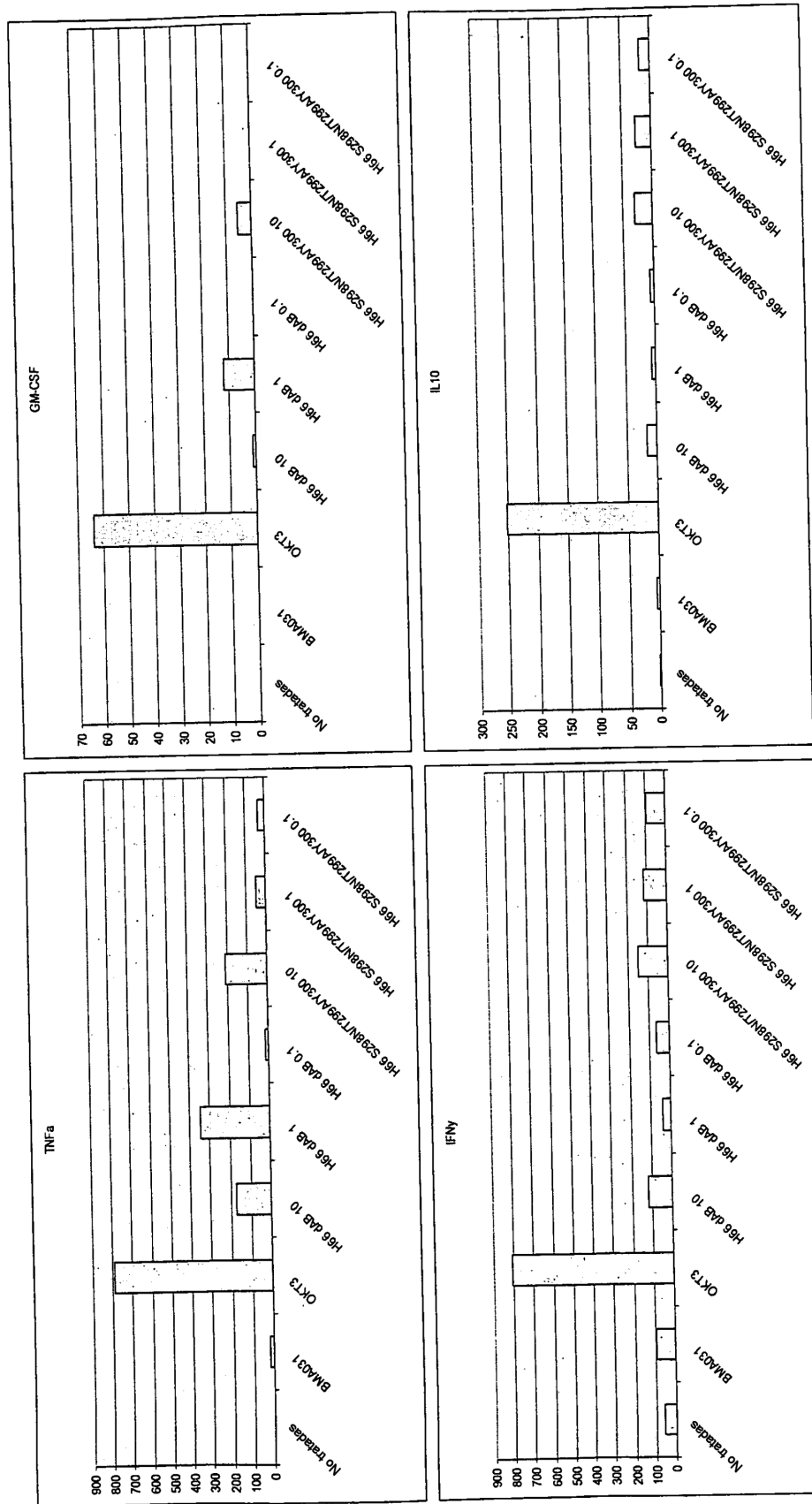


Figura 19

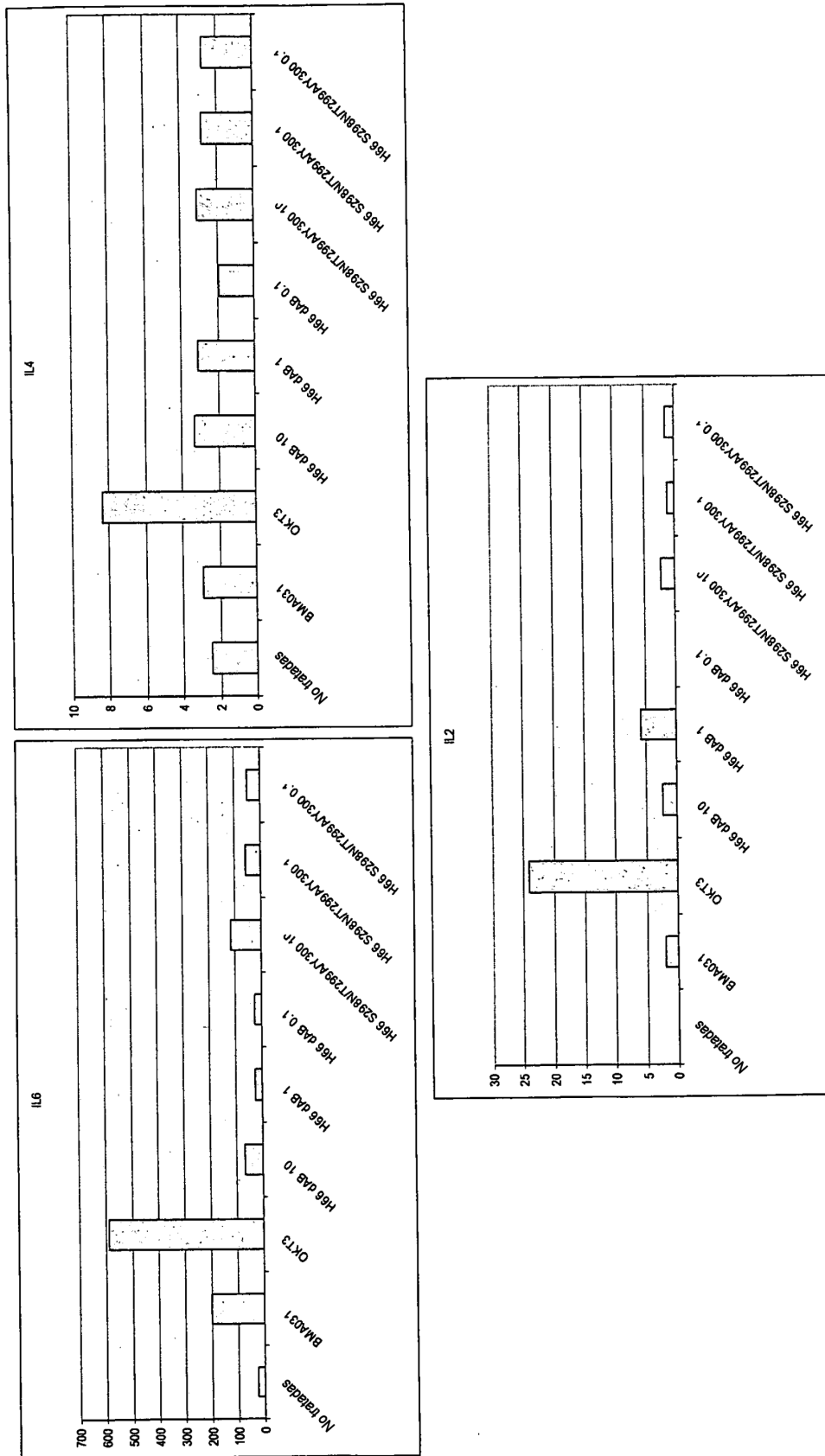


Figura 20

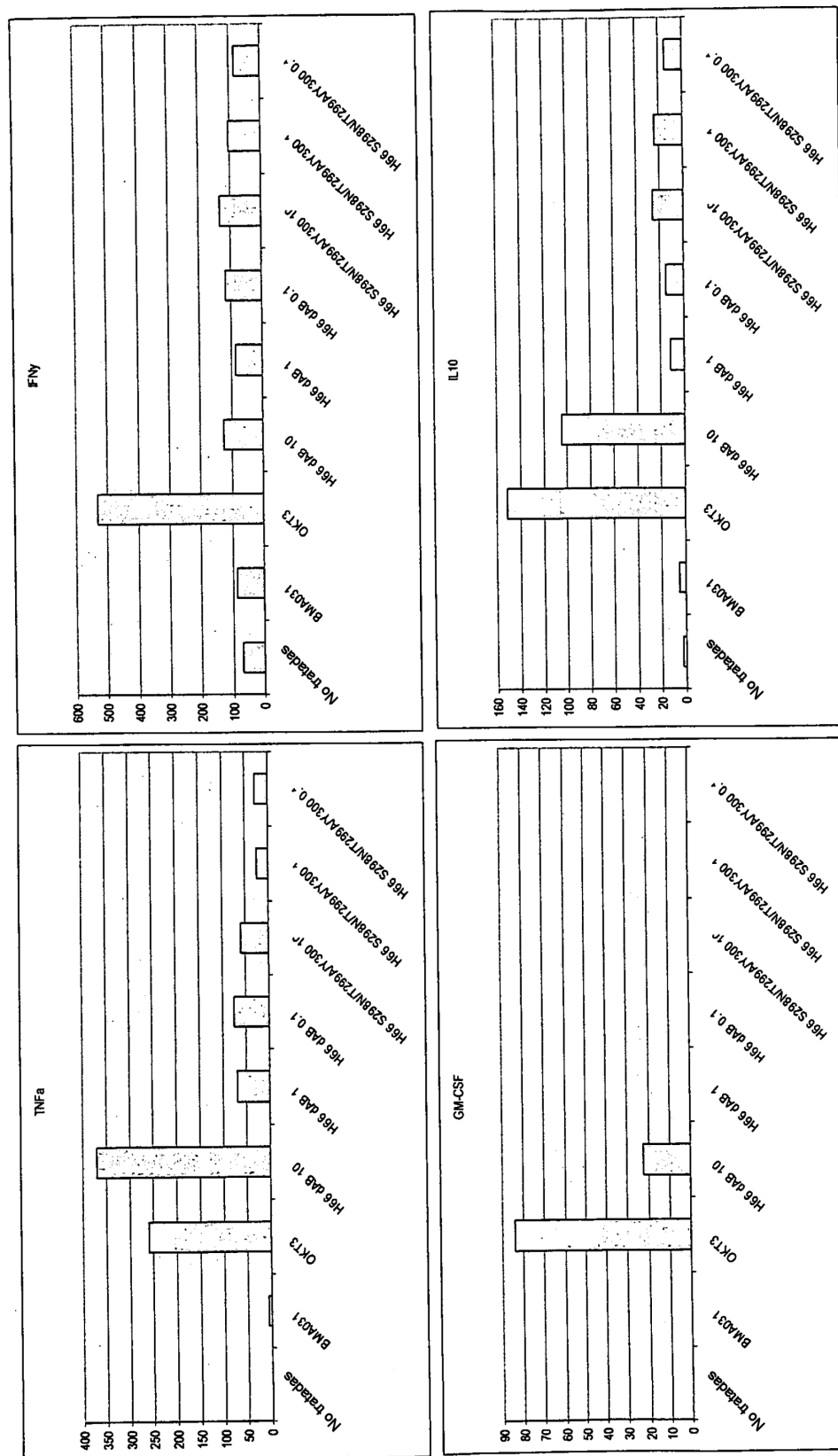


Figura 21

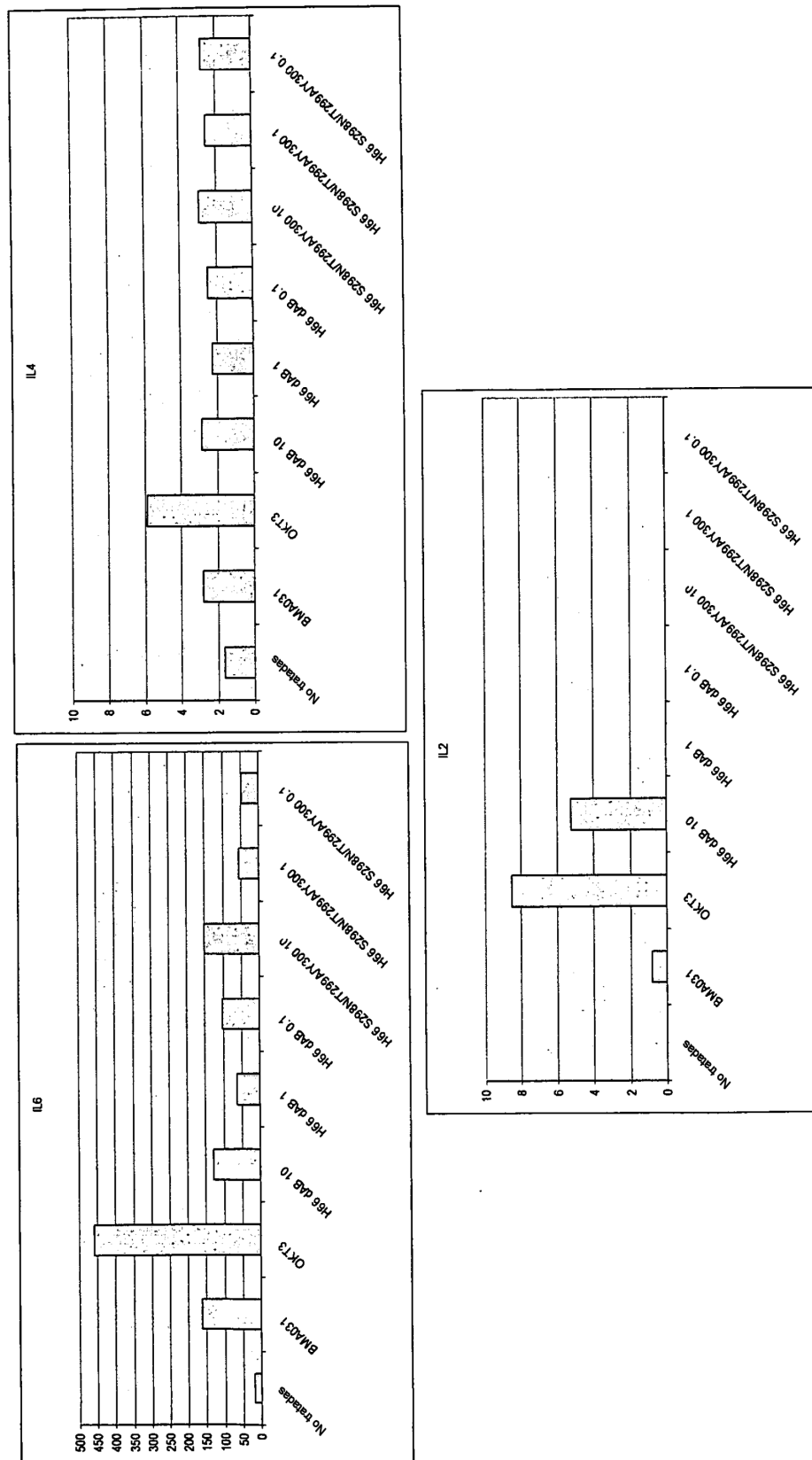
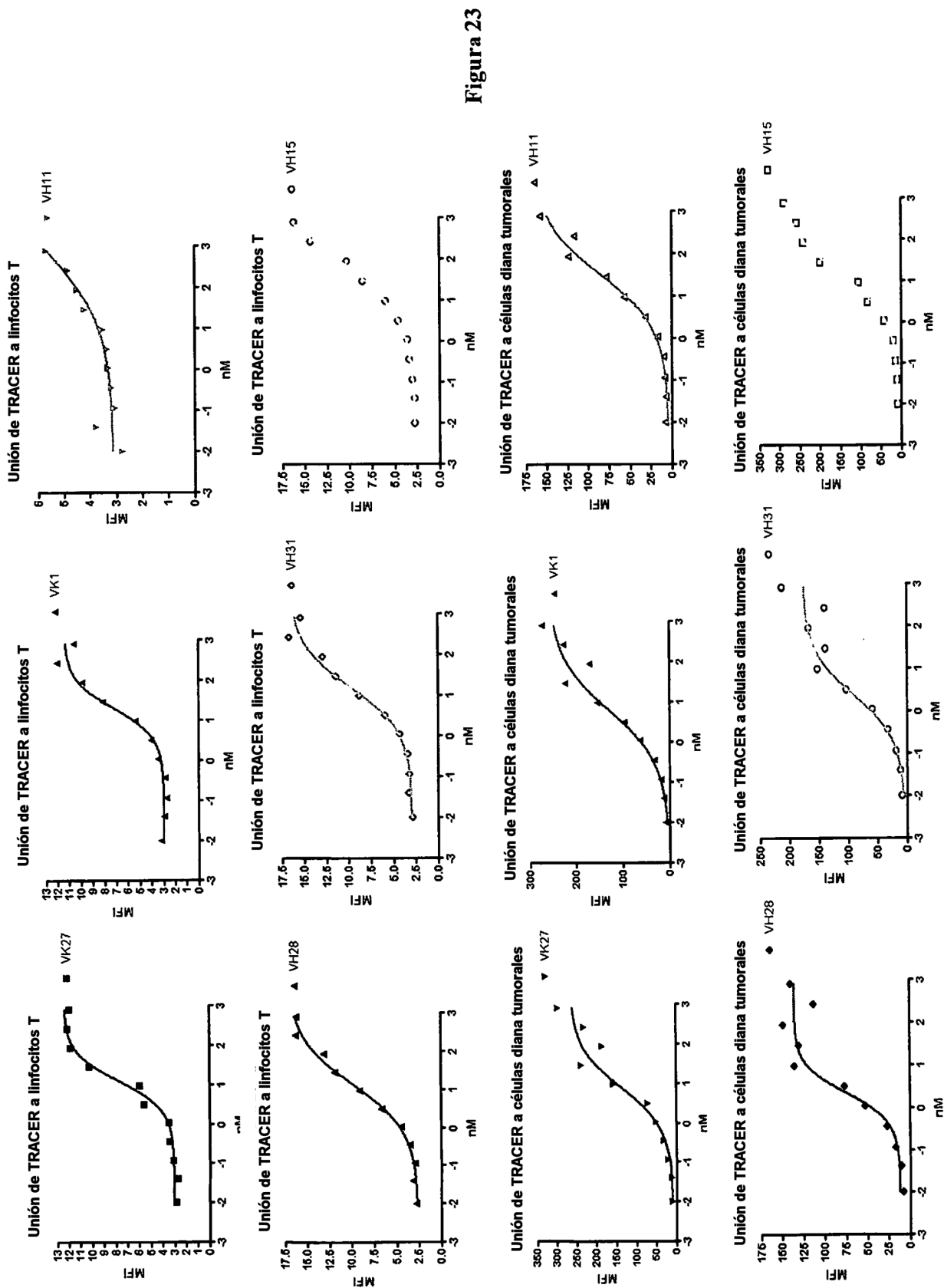


Figura 22



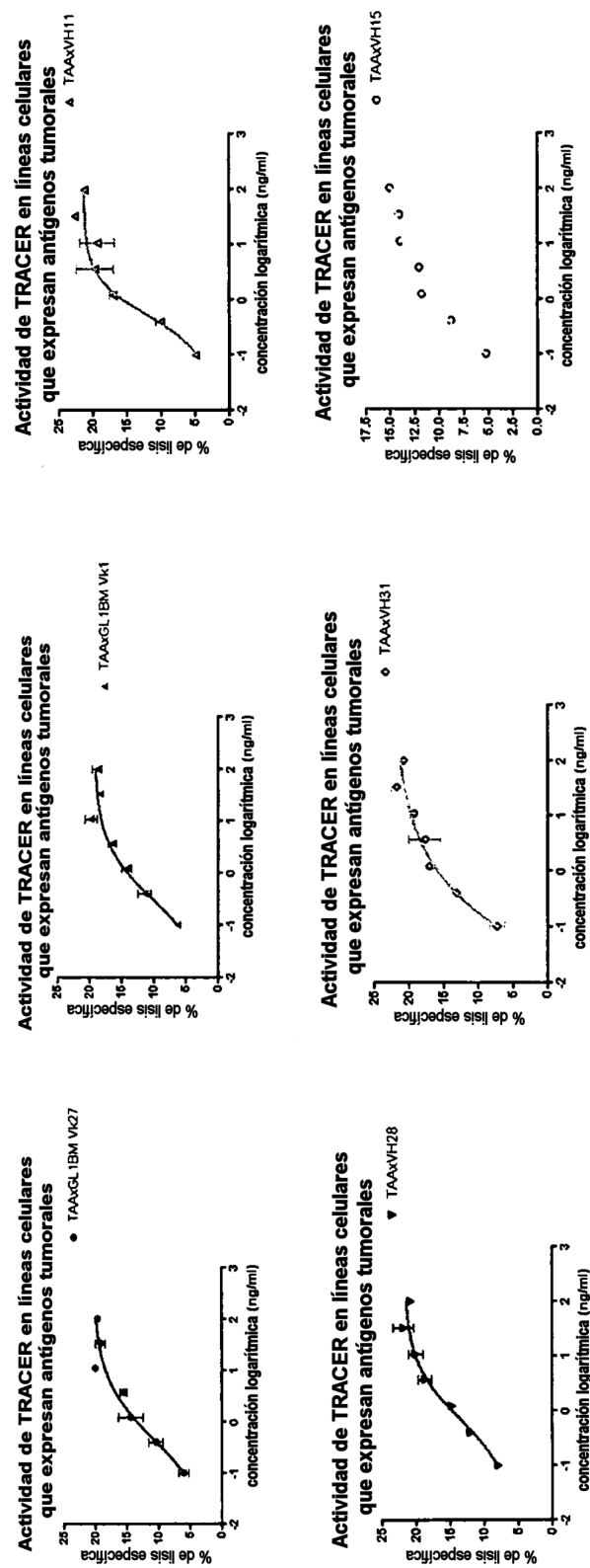


Figura 24

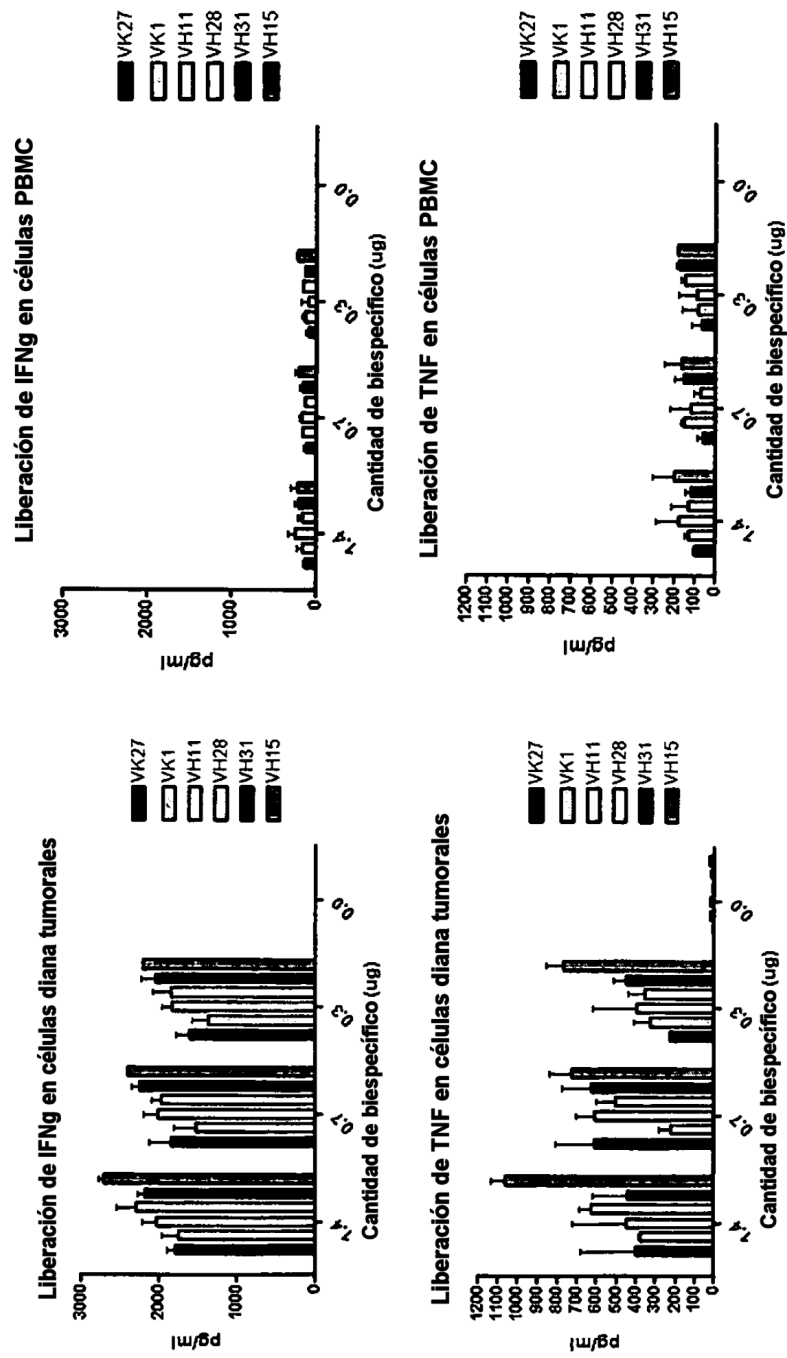
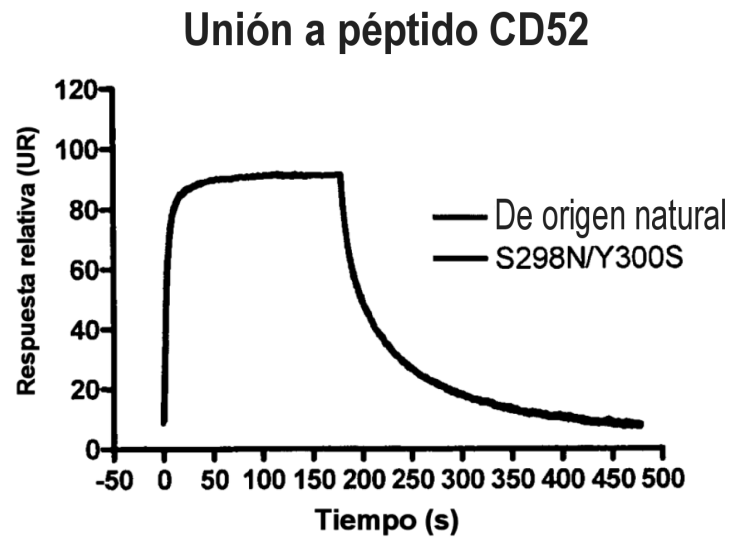
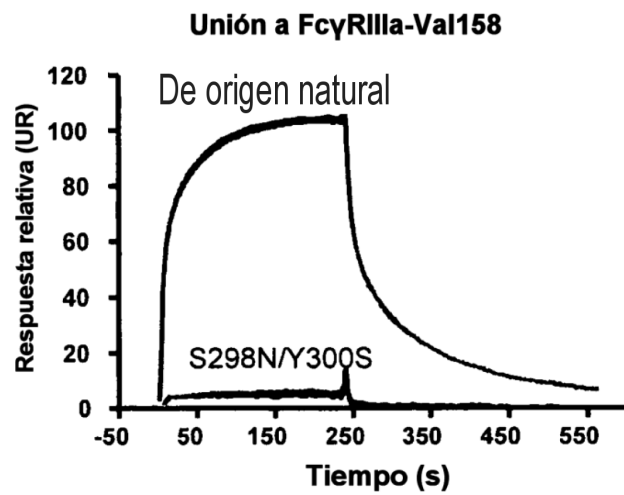


Figura 25

A.



B.



C.

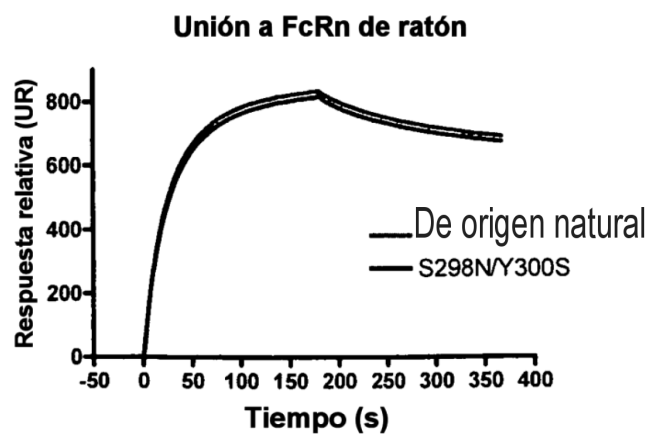


Figura 26