

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 552**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.09.2013** **PCT/EP2013/068199**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014** **WO14033327**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2013** **E 13773624 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018** **EP 2892928**

54 Título: **Anticuerpos dirigidos contra ICOS para tratar la enfermedad de injerto contra hospedador**

30 Prioridad:

03.09.2012 EP 12306046

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.10.2018

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
CENTRE LEON BERARD (33.3%) y
UNIVERSITÉ D'AIX MARSEILLE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**MARODON, GILLES;
OLIVE, DANIEL y
MENETRIER-CAUX, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 684 552 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos dirigidos contra ICOS para tratar la enfermedad de injerto contra hospedador

5 Sector de la técnica

La invención se refiere al uso de anticuerpos dirigidos contra ICOS en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra hospedador.

10 Estado de la técnica

La enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) es un efecto secundario principal debilitante y potencialmente mortal del trasplante de médula ósea. Se produce cuando los linfocitos del donador presentes en el inóculo de médula ósea atacan y destruyen los tejidos sanos del destinatario. Se cree que la GVHD es útil, sin embargo, para eliminar los tumores residuales persistentes después de tratamientos químicos. Los medios biológicos para mejorar el tratamiento de GVHD, por lo tanto, tendrán un impacto principal en la salud pública.

Entre las numerosas señales coestimuladores necesarias para la activación de los linfocitos T, la inhibición de la interacción de ICOS-LICOS ha demostrado evitar o retardar la GVHD en modelos de ratón (Taylor *et al.* (2005) Blood 105(8): 3372-3380).

El documento US 7465445, Sulaiman *et al.* (American Journal of Transplantation, 2004, vol. 4, n.º 4, páginas 526-536), el documento US 2011/293605 y el documento US 2011/243929 divulgan el uso de diversos anticuerpos anti-ICOS en modelos murinos.

Tajima *et al* (Experimental Hematology, 2008, vol. 36, n.º 11, páginas 1514-1523) divulga la administración de JTA-009, un anticuerpo anti-ICOS humano, en un modelo de ratones SCID injertados con PBMC humanas.

Los tratamientos actuales para GVHD son glucocorticoides administrados por vía intravenosa, tales como prednisona. El uso de estos glucocorticoides está diseñado para suprimir el ataque violento inmunitario mediado por linfocitos T en los tejidos del hospedador; sin embargo, en altas dosis, esta supresión inmunitaria eleva el riesgo de infecciones y recidiva cancerosa.

Por lo tanto, aún existe una gran necesidad de proporcionar estrategias terapéuticas eficaces dirigidas a GVHD, con menos efectos secundarios.

Los autores de la invención descubrieron sorprendentemente que un anticuerpo monoclonal contra ICOS humano, llamado 314.8, impacta significativamente en GVHD xenogénica (xeno-GVHD) inducida después de transferencia de células humanas en ratones inmunodeficientes. Xeno-GVHD es un modelo más cercano de GVHD que los modelos de ratón respecto a la enfermedad humana. Por tanto, dicho anticuerpo puede constituir una estrategia terapéutica prometedora de GVHD.

Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo dirigido contra ICOS, que tiene las siguientes 6 CDR, para su uso para tratar la GVHD:

	Secuencia de aminoácidos
H-CDR1	GYTFTTYWMH (SEQ ID NO: 7)
H-CDR2	EIDPSDSYVNYNQNFKG (SEQ ID NO: 8)
H-CDR3	FDY (SEQ ID NO: 9)
L-CDR1	RSSKSPLHSNGNIYLY (SEQ ID NO: 10)
L-CDR2	RMSNLAS (SEQ ID NO: 11)
L-CDR3	MQHLEYPYT (SEQ ID NO: 12)

como se define por las reivindicaciones.

Dicho anticuerpo es Icos 314-8, que se puede obtener del hibridoma depositado en la "Collection Nationale de Cultures de Microorganismes" (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia), de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest, el 2 de julio de 2009 con el número de acceso CNCM 1-4180.

5 Descripción detallada de la invención

Definición

- Como se usa en este documento, los términos **"ICOS"** o **"coestimulador de linfocitos T inducible"** se refiere a una glucoproteína homodimérica transmembranaria de 55 a 60 kDa que presenta un dominio de tipo IgV en su parte extracelular y una tirosina dentro de un motivo YMFM en su parte citoplasmática. Se ha demostrado que el acoplamiento de ICOS con su ligando induce la fosforilación de la tirosina en la parte citoplasmática de ICOS. Dicha fosforilación es responsable del reclutamiento de la subunidad reguladora de PI3K p85, que activa la ruta de señalización de PI3K/AKT.
- También se describe que el acoplamiento de ICOS induce la expresión de CD40L en la superficie celular. Se sabe que CD40L tiene un efecto importante en la cooperación entre los linfocitos T y los linfocitos B. Se ha descubierto que ICOS se expresa, después de la activación de TCR, en linfocitos T convencionales (subconjuntos Tconv CD4+, CD8+), así como en Treg.
- Como se usa en este documento, los términos **"ICOSL"**, **"ICOS-L"** y **"B7-H2"** se refieren a un ligando de ICOS. Dicho ligando está presente en células linfoides tales como linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, así como en células no linfoides tales como células endoteliales o epiteliales. El acoplamiento de ICOS tiene una función importante en la activación de linfocitos, e induce la proliferación y supervivencia de linfocitos T, especialmente Treg.
- Como se usa en este documento, el término **"JICOS 1"** se refiere a una línea celular específica que expresa ICOS.

- Como se usa en este documento, un **"anticuerpo monoclonal"** en sus diversas formas gramaticales se refiere a una población de anticuerpos que contiene únicamente una especie de sitios de combinación de anticuerpo que pueden inmunorreaccionar con un epítipo particular. Un anticuerpo monoclonal, por tanto, típicamente presenta una única afinidad de unión por cualquier epítipo con que inmunorreacciona. Un anticuerpo monoclonal, por lo tanto, puede contener una molécula de anticuerpo que tiene una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpo, cada una inmunoespecífica para un epítipo diferente, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal biespecífico. Aunque históricamente un anticuerpo monoclonal se produjo por immortalización de una línea celular de secreción de inmunoglobulina clonalmente pura, una población monoclonalmente pura de moléculas de anticuerpo también puede prepararse por los métodos de la presente invención. Los métodos de laboratorio para preparar anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, 1988). Los anticuerpos monoclonales (mAb) pueden prepararse inmunizando TXAS mutados purificados en un mamífero, por ejemplo, un ratón, rata, ser humano y mamíferos similares. Las células productoras de anticuerpo en el mamífero inmunizado se aíslan y fusionan con células de mieloma o heteromieloma para producir células híbridas (hibridoma). Las células de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales se utilizan como una fuente del anticuerpo monoclonal deseado. Este método convencional del cultivo de hibridoma se describe en Kohler y Milstein (1975). Aunque los mAb pueden producirse por cultivo de hibridoma, la invención no está limitada a ello. También se contempla el uso de mAb producidos por un ácido nucleico de expresión a partir de un hibridoma de esta invención. Es decir, el ácido nucleico que expresa las moléculas secretadas por un hibridoma de esta invención puede transferirse a otra línea celular para producir un transformante. El transformante es genotípicamente distinto del hibridoma original, pero también puede producir moléculas de anticuerpo de esta invención, incluyendo fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de anticuerpo completo, correspondientes a los secretados por el hibridoma. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.642.334 de Reading; la publicación PCT n.º; las publicaciones de patente europea n.º 0239400 de Winter *et al.* y n.º 0125023 de Cabilly *et al.* También se contemplan técnicas de generación de anticuerpos que no implican inmunización tales como, por ejemplo, el uso de la tecnología de presentación en fagos para examinar colecciones vírgenes (de animales no inmunizados); véase Barbas *et al.* (1992) y Waterhouse *et al.* (1993).

- Como se usa en este documento, la expresión **"fragmento de un anticuerpo"** se refiere a una parte de dicho anticuerpo que comprende al menos el dominio de unión a antígeno. Dichos fragmentos son, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv.

- Como se usa en este documento, la expresión **"derivado de un anticuerpo"** se refiere a un anticuerpo que comprende al 6 CDR de dicho anticuerpo.

- Por **fragmentos conservativos del mAb 314.8** y **derivados conservativos del mAb 314.8**, se entiende respectivamente fragmentos y derivados que retienen la afinidad de unión y especificidad de 314.8 por ICOS. El fragmento puede ser una parte de dicho anticuerpo, como una cadena pesada, una cadena ligera, un VL, un VH, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, F(ab')₂ o dAb, pero también cualquier unidad mínima que consista en los restos de aminoácido que imitan la región hipervariable, tal como una CDR (CDR1H, CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L, CDR3L). Los fragmentos conservativos también comprenden dAb. Los dAb (anticuerpos de un único dominio) son

anticuerpos que comprenden únicamente una cadena proteínica que deriva de uno de los dos dominios de la estructura normal de un anticuerpo. De hecho, en determinados casos, la mitad de un anticuerpo puede unirse a su antígeno diana con una afinidad comparable a la afinidad del anticuerpo de tipo silvestre. Los fragmentos conservativos pueden producirse usando métodos bien conocidos en la técnica anterior. Dichos fragmentos pueden obtenerse por métodos rutinarios, tales como una digestión proteolítica (por ejemplo, digestión con pepsina para generar F(ab')₂; digestión con papaína para generar Fab).

Como se usa en este documento, la expresión **mAb 314.8** o **"Icos 314-8"** o **"Icos R 314-8."** se refiere a un anticuerpo monoclonal dirigido contra ICOS depositado en CNCM el 2 de julio de 2009 con el número de acceso CNCM 1-4180.

La 6 CDR del mAb 314.8 son como en la siguiente tabla 1:

Tabla 1

	Secuencia de ADN	Secuencia de aminoácidos
H-CDR1	GGCTACACCTTCACCACCTACTGGATGCA C (SEQ ID NO:1)	GYTFTTYWMH (SEQ ID NO:7)
H-CDR2	GAGATTGATCCTTCTGATAGTTATGTTAA CTACAATCAAACTTTAAGGGC (SEQ ID NO:2)	EIDPSDSYVNYNQNFKG (SEQ ID NO:8)
H-CDR3	TTTGATTAC (SEQ ID NO:3)	FDY (SEQ ID NO:9)
L-CDR1	AGGTCTAGTAAGAGTCCCCTGCATAGTAA CGGCAACATTTACTTATAT (SEQ ID NO:4)	RSSKSPLHSNGNIYLY (SEQ ID NO:10)
L-CDR2	CGGATGTCCAACCTTGCCTCA (SEQ ID NO:5)	RMSNLAS (SEQ ID NO:11)
L-CDR3	ATGCAACATCTAGAATATCCGTACACG (SEQ ID NO:6)	MQHLEYPYT (SEQ ID NO:12)

Las secuencias completas de las regiones variables (VH y VL) del mAb 314.8 son las siguientes:

Cadena pesada: Secuencia de ADN (426 pb): Secuencia líder-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGGGATGGCGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTATCAACAGCTACAGGTGTCCACTCC
AACTACAGCAGCCTGGGACTGAACTTATGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGC
TTCTGGCTACACCTTCACCACCTACTGGATGCAC
TGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTT
GAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTCTGATAGTTATGTTAACTACAATCAAACTTTAAGGGCA
AGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATACAGCTCAGCAGCCTGACATC
TGAGGACTCTGCGGTCTATTTTGTGCGAGATCCCCTGATTACTACGGTACTAGTCTTGCCTGG
TTTGATTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTACA (SEQ ID NO:13)

Cadena pesada: Secuencia de aminoácidos (142 AA): Secuencia líder-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MGWRCIIILFLVSTATGVHS
QVQLQQPGTELMKPGASVKLSCKASGYTFTTYWMHWVKQRPQGGL
EWIGEIDPSDSYVNYNQNFKGATLTVDKSSSTAYIQLSSTLSEDSAVYFCARSPDYGTSLAW
FDYWGQGTLVTVST (SEQ ID NO:14)

Cadena ligera: Secuencia de ADN (396 pb): Secuencia líder-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

ATGAGGTGCCTAGCTGAGTTCCTGGGGCTGCTTGTGCTCTGGATCCCTGGAGTCATTGGGGATA
TTGTGATGACTCAGGCTGCACCCTCTGTACCTGTCACCTCCTGGAGAGTCAGTATCCATCTCCTG
CAGGTCTAGTAAGAGTCCCCTGCATAGTAACGGCAACATTTACTTATAT**TGGTTCCTGCAGAGG**
CCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGATATATCGGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACA
GGTTCAGTGGCAGTGGGTGAGGAACACTACTTTTACACTGAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGA
TGTGGGTGTTTATTACTGTATGCAACATCTAGAATATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAG
CTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:15)

Cadena ligera: Secuencia de aminoácidos (132 AA): Secuencia líder-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MRCLA⁵EFLGLLVLWIPGVIG**DIVMTQAAPSVPVTPGESVSI****SCRSSKSPLHSNGNIYLYWFLQR**
PGQSPQLLIYRMSNLAGV**PDFSGSGSGTTFTLKISRVEADVGVYYCMQHLEYPYTFGGG****TK**
LEIK (SEQ ID NO:16)

La presente invención también se refiere a anticuerpos que comprenden la SEQ ID NO: 18 en su cadena pesada y la SEQ ID NO: 20 en su cadena ligera. También se refiere a anticuerpos codificados por al menos las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 17, para la cadena pesada y SEQ ID NO: 19 para la cadena ligera:

Cadena pesada: Secuencia de ADN: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

CAGGTCCAACTACAGCAGCCTGGGACTGAACTTATGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCTCT
GCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCACCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACA
AGGCCTTGAGTGGATCGGAGAGATTGATCCTTCTGATAGTTATGTTAACTACAATCAAACTTT
AAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATACAGCTCAGCAGCC
TGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTTTGTGCGAGATCCCCTGATTACTACGGTACTAGTCT
TGCCTGGTTTGATTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTACA (SEQ ID NO:17)

Cadena pesada: Secuencia de aminoácidos: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

QVQLQQPGTELMKPGASVKLSCKASGYTFTTYWMHWVKQRPGQGLEWIGEIDPSDSYVNYNQNF
KGKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYFCARSPDYYGTS¹⁵LAWFDYWGQGT**LVTVST** (SEQ ID NO:18)

Cadena ligera: Secuencia de ADN: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

GATATTGTGATGACTCAGGCTGCACCCTCTGTACCTGTCACCTCCTGGAGAGTCAGTATCCATCT
CCTGCAGGTCTAGTAAGACTCCCCTGCATAGTAACGGCAACATTTACTTATAT**TGGTTCCTGCA**
GAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGATATATCGGATGTCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCA
GACAGGTTCACTGGCAGTGGGTGAGGAACACTACTTTTACACTGAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTG
AGGATGTGGGTGTTTATTACTGTATGCAACATCTAGAATATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGAC
CAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:19)

Cadena ligera: Secuencia de aminoácidos: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

DIVMTQAAPSVPVTPGESVSI**SCRSSKSPLHSNGNIYLYWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLAGV****P**
DRFSGSGSGTTFTLKISRVEADVGVYYCMQHLEYPYTFGGG**TKLEIK** (SEQ ID NO:20)

La enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) es una complicación habitual después de un trasplante de tejido alogénico. Está habitualmente asociada con trasplante de células madre o médula ósea. La GVHD también puede producirse después de una transfusión de sangre si no se usan productos sanguíneos irradiados.

Como se usa en este documento, **la enfermedad de injerto contra hospedador** se divide en formas agudas y crónicas:

- la forma *aguda* o *fulminante* de la enfermedad (aGVDH) se observa normalmente en los primeros 100 días después del trasplante, y es un problema principal para los trasplantes debido a la morbilidad y mortalidad asociadas;
- la forma *crónica* de la enfermedad de injerto contra hospedador (cGVHD) normalmente se produce después de 100 días. La aparición de casos moderados a graves de cGVHD influye de forma adversa la supervivencia a largo plazo.

Esta distinción no es arbitraria: la enfermedad de injerto contra hospedador aguda y crónica parece implicar diferentes subconjuntos de células inmunitarias, diferentes perfiles de citocinas y dianas del hospedador algo diferentes.

Como se usa en este documento, los términos **"tratar"** o **"tratamiento"** significa revertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o afección al que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección.

Una **"cantidad terapéuticamente eficaz"** se entiende para una cantidad mínima de agente activo que es necesaria para impartir un beneficio terapéutico a un sujeto. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad que induce, mejora o causa de otro modo una mejora en los síntomas patológicos, en la progresión de la enfermedad o el estado fisiológico asociado con una enfermedad o que mejora la resistencia un trastorno.

Como se usa en este documento, el término **"prevención"** se refiere a aliviar la aparición de la enfermedad o afección en un sujeto en el que aún no se ha diagnosticado que la tiene. Como se usa en este documento, el término "sujeto" indica un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferiblemente, un sujeto de acuerdo con la invención es un ser humano.

La presente invención se refiere a un anticuerpo dirigido contra ICOS, que tiene las siguientes 6 CDR, para su uso para tratar la GVHD:

	Secuencia de aminoácidos
H-CDR1	GYTFTTYWMH (SEQ ID NO: 7)
H-CDR2	EIDPSDSYVNYNQNFKG (SEQ ID NO: 8)
H-CDR3	FDY (SEQ ID NO: 9)
L-CDR1	RSSKSPLHSNGNIYLY (SEQ ID NO: 10)
L-CDR2	RMSNLAS (SEQ ID NO: 11)
L-CDR3	MQHLEYPYT (SEQ ID NO: 12)

Dicho anticuerpo es Icos 314-8, que se puede obtener del hibridoma depositado en la "Collection Nationale de Cultures de Microorganismes" (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 París Cedex 15, Francia), de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest, el 2 de julio de 2009 con el número de acceso CNCM 1-4180.

Secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención

Una realización adicional de la invención se refiere a un anticuerpo dirigido contra ICOS para su uso para tratar la GVHD, en el que las secuencias nucleotídicas que codifican las 6 CDR de dicho anticuerpo son las siguientes:

	Secuencia de ADN
H-CDR1	GGCTACACCTTCACCACCTACTGGATGCAC (SEQ ID NO: 1)
H-CDR2	GAGATTGATCCTTCTGATAGTTATGTAACTACAATCAAACTTTAAGGGC (SEQ ID NO: 2)

	Secuencia de ADN
H-CDR3	TTTGATTAC (SEQ ID NO: 3)
L-CDR1	AGGTCTAGTAAGAGTCCCCTGCATAGTAACGGCAACATTACTTATAT (SEQ ID NO: 4)
L-CDR2	CGGATGTCCAACCTTGCCTCA (SEQ ID NO: 5)
L-CDR3	ATGCAACATCTAGAATATCCGTACACG (SEQ ID NO: 6)

También se describe una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio VH o el dominio VL de uno de los anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en mAb 314.8, sus fragmentos conservativos y sus derivados conservativos.

5 Típicamente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que puede incluirse en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o un vector vírico.

10 Los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo por el que una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen exógeno) puede introducirse en una célula hospedadora, para transformar el hospedador y promover la expresión (por ejemplo, la transcripción y la traducción) de la secuencia introducida. De esa manera, un objetivo adicional de la invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico de la invención. Dichos vectores pueden comprender elementos reguladores, tales como un promotor, potenciador, terminador y similares, para causar o dirigir la expresión de dicho anticuerpo tras la administración a un sujeto. Los
15 ejemplos de promotores y potenciadores usados en el vector de expresión para células animales incluyen el promotor temprano y el potenciador de SV40, el promotor LTR y el potenciador del virus de leucemia murina de Moloney, el promotor y el potenciador de la cadena H de inmunoglobulina y similares.

20 Puede usarse cualquier vector de expresión para células animales, siempre que pueda insertarse y expresarse un gen que codifique la región C del anticuerpo humano. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107, pAGE103, pHSG274, pKCR, pSG1, beta d2-4- y similares. Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos de replicación que comprenden un origen de replicación, o plásmidos de integración, tales como, por ejemplo, pUC, pcDNA, pBR y similares. Otros ejemplos de vectores víricos incluyen vectores adenovíricos, retrovíricos, del virus del herpes y de AAV. Dichos virus recombinantes pueden producirse por técnicas conocidas en la técnica, tales como
25 por transfección de células de empaquetamiento o por transfección transitoria con plásmidos auxiliares o virus. Los ejemplos típicos de células empaquetadoras de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. Pueden encontrarse protocolos detallados para producir dichos virus recombinantes defectuosos en la replicación, por ejemplo, en el documento WO 95/14785, el documento WO 96/22378, el documento US 5.882.877, el documento US 6.013.516, el documento US 4.861.719, el documento US 5.278.056 y el
30 documento WO 94/19478.

Un objetivo adicional de la presente invención se refiere a una célula que se ha transfectado, infectado o transformado por un ácido nucleico y/o un vector de acuerdo con la invención. El término "transformación" se refiere a la introducción de un gen "exógeno" (es decir, extrínseco o extracelular), secuencia de ADN o ARN en una
35 célula hospedadora, de modo que la célula hospedadora exprese el gen o secuencia introducida para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducida. Una célula hospedadora que recibe y expresa el ADN o ARN introducido se ha "transformado". Los ácidos nucleicos de la invención pueden usarse para producir un anticuerpo de la invención en un sistema de expresión adecuado. La expresión "sistema de expresión" significa una célula hospedadora y vector compatible en condiciones adecuadas, por ejemplo, para la expresión de una proteína codificada por el ADN exógeno portado por el vector e introducido en la célula hospedadora.

Los sistemas de expresión habituales incluyen células hospedadoras de *E. coli* y vectores plasmídicos, células hospedadoras de insecto y vectores de baculovirus y células hospedadoras de mamífero y vectores. Otros ejemplos
45 de células hospedadoras incluyen, sin limitación, células procariotas (tales como bacterias) y células eucariotas (tales como células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, etc.). Los ejemplos específicos incluyen *E. coli*, levaduras *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, líneas celulares de mamífero (por ejemplo, células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.), así como cultivos celulares de mamífero primarios o establecidos (por ejemplo, producidos a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales,
50 células nerviosas, adipocitos, etc.). Los ejemplos también incluyen la célula SP2/0-Ag14 de ratón (ATCC CRL1581), la célula P3X63-Ag8.653 de ratón (ATCC CRL1580), la célula CHO en que un gen de la dihidrofolato reductasa (a partir de ahora mencionado como "gen DHFR") es defectuoso, la célula YB2/3HL.P2.G11.16Ag.2O de rata (ATCC

CRL1662, a partir de ahora en este documento mencionada como "célula YB2/0") y similares.

La presente invención también se refiere a un método de producción de una célula hospedadora recombinante que expresa un anticuerpo de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho método las etapas de:

- (i) introducir *in vitro* o *ex vivo* un ácido nucleico recombinante o un vector como se describe anteriormente en una célula hospedadora competente,
- (ii) cultivar *in vitro* o *ex vivo* la célula hospedadora recombinante obtenida, y
- (iii) opcionalmente, seleccionar las células que expresan y/o secretan dicho anticuerpo. Dichas células hospedadoras recombinantes pueden usarse para la producción de anticuerpos de la invención.

Composición farmacéutica de acuerdo con la invención

La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención.

Por lo tanto, un anticuerpo de la invención puede combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

"Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción no deseada cuando se administran a un mamífero, especialmente un ser humano, según lo apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un relleno, diluyente, material de encapsulación o formulación auxiliar de cualquier tipo, sólido, semisólido o líquido no tóxico.

La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosificación y el régimen dependen de forma natural de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el género del paciente, etc.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para administración tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular y similares.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que puede inyectarse. Estas pueden estar en soluciones particulares isotónicas, estériles, salinas (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de dichas sales) o en polvo, especialmente composiciones secadas por congelación que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de las soluciones inyectables.

Las dosis usadas para la administración pueden adaptarse como una función de diversos parámetros, y en particular como una función del modo de administración usado, de la patología pertinente o como alternativa de la duración deseada del tratamiento. Para preparar composiciones farmacéuticas, puede disolverse o dispersarse una cantidad eficaz del anticuerpo en un vehículo farmacéuticamente aceptable o medio acuoso. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; incluyendo las formulaciones aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista facilidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Un anticuerpo de la invención puede formularse en una composición en una forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden obtenerse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales.

La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina,

mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos.

La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio.

La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con otros diversos ingredientes enumerados anteriormente, según lo necesario, seguido por esterilización por filtración.

En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son técnicas de secado al vacío y secado por congelación que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de la solución filtrada a esterilidad previamente de los mismos.

También se contempla la preparación de soluciones más concentradas o altamente concentradas para inyección directa, donde se prevé que el uso de DMSO como disolvente producirá una penetración extremadamente rápida, suministrando concentraciones elevadas de los agentes activos a una pequeña área de tumor.

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una diversidad de formas de dosificación, tal como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse adecuadamente si fuera necesario y el diluyente líquido en primer lugar tiene que volverse isotónico con suficiente solución salina o glucosa.

Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, el medio acuoso estéril que puede emplearse será conocido para los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación podría disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y añadirse a 1000 ml de líquido de hipodermoclastia o inyectarse en el sitio propuesto de infusión, (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences" 15.^a Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Alguna variación en la dosificación se producirá necesariamente dependiendo de la afección del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual.

Los anticuerpos de la invención pueden formularse dentro de una mezcla terapéutica para que comprenda de aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, o de aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, o de aproximadamente 0,1 a 1,0 o incluso de aproximadamente 10 miligramos por dosis o similares. También pueden administrarse múltiples dosis. Además de los compuestos formulados para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; cápsulas de liberación temporalizada; y cualquier otra forma actualmente usada.

En determinadas realizaciones, el uso de liposomas y/o nanopartículas se contempla para la introducción de anticuerpos en células hospedadoras. La formulación y uso de liposomas y/o nanopartículas son conocidos para los expertos en la materia.

Las nanocápsulas pueden atrapar en general compuestos de una manera estable y reproducible. Para evitar los efectos secundarios debido a sobrecarga polimérica intracelular, dichas partículas ultrafinas (con tamaño de aproximadamente 0,1 µm) generalmente se diseñan usando polímeros que pueden degradarse *in vivo*. Se contemplan nanopartículas de polialquil-cianoacrilato biodegradables que cumplen estos requisitos para su uso en la presente invención, dichas partículas pueden generarse fácilmente.

Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas de bicapa concéntrica de múltiples láminas (también llamadas vesículas multilaminares (MLV)). Las MLV generalmente tienen diámetros de 25 nm a 4 µm. La sonicación de MLV provoca la formación de vesículas unilaminares pequeñas (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una solución acuosa en el centro. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

Método para producir anticuerpos de la invención

Los anticuerpos de la invención pueden producirse por cualquier técnica conocida en la técnica, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, en solitario o en combinación.

Conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la materia puede producir fácilmente dichos anticuerpos, por técnicas convencionales para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse usando un método en fase sólida bien conocido, preferiblemente usando un aparato de síntesis de péptidos disponible en el mercado (tal como el fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Como alternativa, los anticuerpos de la invención pueden sintetizarse por técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden obtenerse como productos de expresión de ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican los anticuerpos en vectores de expresión y la introducción de dichos vectores en hospedadores eucariotas o procariotas adecuados que expresarán los anticuerpos deseados, a partir de los cuales después pueden aislarse usando técnicas bien conocidas.

En particular, la invención divulga además un método de producción de un anticuerpo de la invención, comprendiendo dicho método las etapas que consisten en:

- (i) cultivar una célula hospedadora transformada de acuerdo con la invención en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho anticuerpo; y
- (ii) recuperar el anticuerpo expresado.

En otra realización particular, el método comprende las etapas de:

- (i) cultivar el hibridoma depositado como CNCM 1-4180 en condiciones adecuadas para permitir la expresión del anticuerpo; y
- (ii) recuperar el anticuerpo expresado.

Los anticuerpos de la invención se separan adecuadamente del medio de cultivo por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

En una realización particular, el anticuerpo quimérico humano de la presente divulgación puede producirse obteniendo secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios VL y VH como se describe previamente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo quimérico humano insertándolos en un vector de expresión para células animales que tiene genes que codifican CH de anticuerpo humano y CL de anticuerpo humano y expresando la secuencia codificante introduciendo el vector de expresión en una célula animal. Como dominio CH de un anticuerpo quimérico humano, puede ser cualquier región que pertenezca a inmunoglobulina humana, pero aquellos de la clase IgG son adecuados y uno cualquiera de las subclases que pertenecen a la clase IgG, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, también puede usarse. Además, como CL de un anticuerpo quimérico humano, puede ser cualquier región que pertenezca a Ig, y aquellos de la clase kappa o la clase lambda se pueden usar. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas convencionales de ADN recombinante y transfección génica que son bien conocidas en la técnica (véanse los documentos de patente US 5.202.238; y US 5.204.244).

El anticuerpo humanizado de la presente divulgación puede producirse obteniendo secuencias de ácido nucleico que codifican dominios CDR, como se describe previamente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo humanizado insertándolas en un vector de expresión para células animales que tiene genes que codifican (i) una región constante de cadena pesada idéntica a la de un anticuerpo humano y (ii) una región constante de cadena ligera idéntica a la de un anticuerpo humano, y expresando los genes introduciendo el vector de expresión en una célula animal.

El vector de expresión de anticuerpo humanizado puede ser de un tipo en que un gen que codifica una cadena pesada de anticuerpo y un gen que codifica una cadena ligera de anticuerpo existe en vectores diferentes o de un tipo en que ambos genes existen en el mismo vector (de tipo en tándem). Respecto a la facilidad de construcción de un vector de expresión de anticuerpo humanizado, la facilidad de introducción en células animales y el equilibrio entre los niveles de expresión de cadenas H y L de anticuerpo en células animales, se prefiere el vector de expresión de anticuerpo humanizado del tipo en tándem. Los ejemplos de vector de expresión de anticuerpo humanizado del tipo en tándem incluyen pKANTEX93 (documento WO 97/10354), pEE18 y similares.

Los métodos para producir anticuerpos humanizados basados en técnicas convencionales de ADN recombinante y transfección génica son bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos pueden humanizarse usando una diversidad de técnicas conocidas en la técnica incluyendo, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación PCT WO 91/09967; patentes de Estados Unidos n.º 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), rechapado o rebarnizado (documento EP 592.106; EP 519.596) y reordenamiento de cadenas (patente de Estados Unidos n.º 5.565.332). La tecnología de ADN recombinante general para la preparación de dichos anticuerpos también es conocida (véase la

solicitud de patente europea EP 125023 y la solicitud de patente internacional WO 96/02576).

El Fab de la presente divulgación puede obtenerse tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con ICOS con una proteasa, papaína. Además, el Fab puede producirse insertando ADN que codifica Fab del anticuerpo en un vector para un sistema de expresión procariota, o para un sistema de expresión eucariota, e introduciendo el vector en un procariota o eucariota (según lo apropiado) para expresar el Fab.

El F(ab')₂ de la presente divulgación puede obtenerse tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con ICOS con una proteasa, pepsina.

Además, el F(ab')₂ puede producirse uniendo el Fab' descrito a continuación mediante un enlace tioéter o un enlace disulfuro.

El Fab' de la presente divulgación puede obtenerse tratando el F(ab')₂ que reacciona específicamente con ICOS humano con un agente reductor, ditiotreitól. Además, el Fab' puede producirse insertando el ADN que codifica el fragmento Fab' del anticuerpo en un vector de expresión para procariotas, o un vector de expresión para eucariotas, e introduciendo el vector en un procariota o eucariota (según lo apropiado) para realizar su expresión.

El scFv de la presente divulgación puede producirse obteniendo el a ADNc que codifica los dominios VH y VL como se describe previamente, construyendo el ADN que codifica scFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procariotas, o un vector de expresión para eucariotas, y después introduciendo el vector de expresión en un procariota o eucariota (según lo apropiado) para expresar el scFv. Para generar un fragmento scFv humanizado, puede usarse una tecnología bien conocida llamada injerto de CDR, que implica seleccionar las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un fragmento scFv donador e injertándolas en una región flanqueante del fragmento scFv humano de estructura tridimensional conocida (véanse, por ejemplo, los documentos WO 98/45322; WO 87/02671; US 5.859.205; US 5.585.089; US 4.816.567; EP 0173494).

Se contemplan una o más modificaciones de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en este documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se sabe que cuando un anticuerpo humanizado se produce injertando simplemente únicamente las CDR en VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano en las FR del VH y VL de un anticuerpo humano, la actividad de unión a antígeno se reduce en comparación con la del anticuerpo original derivado de un animal no humano. Se considera que varios restos de aminoácido del VH y VL del anticuerpo no humano, no únicamente en las CDR, sino también en las FR, están directa o indirectamente asociados con la actividad de unión al antígeno. Por tanto, la sustitución de estos restos de aminoácido con diferentes restos de aminoácido derivados de las FR del VH y VL del anticuerpo humano reducirían la actividad de unión.

Para resolver el problema, en anticuerpos a los que se han injertado CDR humanas, tienen que hacerse intentos por identificar, entre las secuencias de aminoácidos de la FR del VH y VL de anticuerpos humanos, un resto de aminoácido que esté directamente asociado con la unión al anticuerpo, o que interactúe con un resto de aminoácido de la CDR, o que mantenga la estructura tridimensional del anticuerpo y que esté directamente asociado con la unión al antígeno. La actividad de unión al antígeno reducida podría aumentarse reemplazando los aminoácidos identificados con restos de aminoácido del anticuerpo original derivado de un animal no humano.

Pueden hacerse modificaciones y cambios en la estructura de los anticuerpos de la presente invención, y en las secuencias de ADN que los codifican, y aún obtener una molécula funcional que codifique un anticuerpo con características deseables. Al hacer los cambios en las secuencias de amino, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice de aminoácidos hidropáticos a la hora de conferir función biológica interactiva en una proteína está generalmente comprendida en la técnica. Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos y similares.

Cada aminoácido tiene un índice hidropático asignado basándose en su hidrofobia y características de carga que son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Los derivados conservativos de acuerdo la divulgación son aquellos en que un resto de aminoácido dado en una proteína o enzima se ha cambiado sin alterar la conformación global y función del polipéptido, incluyendo, aunque sin limitación, el reemplazo de un aminoácido con uno que tiene propiedades similares (tales como, por ejemplo, la polaridad, potencial de enlaces de hidrógeno, acidez, basicidad, hidrofobicidad, aromaticidad y similares).

Los aminoácidos diferentes a los indicados como conservados pueden diferir en una proteína de modo que el porcentaje de similitud de secuencia proteínica o de aminoácidos entre dos proteínas cualesquiera de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, de un 70 % a un 99 % determinada de acuerdo con un esquema de

alineación tal como por el Método de Agrupación, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN.

Un derivado conservativo de acuerdo con la divulgación también incluye un polipéptido que tiene al menos un 60 % de identidad de aminoácidos determinada por los algoritmos BLAST o FASTA, preferiblemente al menos un 75 %, más preferiblemente al menos 85 %, aún preferiblemente al menos un 90 % e incluso más preferiblemente al menos un 95 %, y que tiene las mismas propiedades o funciones o propiedades o funciones sustancialmente similares que la proteína natural o precursora con la que se compara. Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando más de un 80 %, preferiblemente más de un 85 %, preferiblemente más de un 90 % de los aminoácidos son idénticos, o más de aproximadamente un 90 %, preferiblemente más de un 95 %, son similares (funcionalmente idénticos) sobre la longitud completa de la secuencia más corta. Preferiblemente, las secuencias similares u homólogas se identifican por alineación usando, por ejemplo, el programa pileup de GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Versión 7, Madison, Wisconsin) o cualquier algoritmo de comparación de secuencias tales como BLAST, FASTA, etc.

Por ejemplo, determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura proteínica sin pérdida apreciable de actividad. Como la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína definen la actividad funcional biológica de la proteína, pueden hacerse determinadas sustituciones de aminoácido en una secuencia proteínica y, por supuesto, en su ADN que codifica la secuencia, mientras, no obstante se obtiene una proteína con propiedades similares. Por tanto, se contempla que pueden hacerse diversos cambios en las secuencias de los anticuerpos de la invención, o las secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos anticuerpos, sin pérdida apreciable de su actividad biológica.

Se sabe en la técnica que determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice o valor hidropático similar y aún producir una proteína con actividad biológica similar, es decir, aún obtener una proteína funcionalmente equivalente biológica. Como se resume anteriormente, las sustituciones de aminoácido, generalmente, se basan, por lo tanto, en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral de aminoácido, por ejemplo, su hidrofobia, hidrofilia, carga, tamaño y similares.

Las sustituciones ejemplares que adoptan diversas de las características anteriores en consideración son bien conocidas para los expertos en la materia e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina. Otro tipo de modificación de aminoácido del anticuerpo de la invención puede ser útil para alterar el patrón de glucosilación original del anticuerpo.

Por "alterar" se entiende eliminar uno o más restos de carbohidrato encontrados en el anticuerpo, y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glucosilación de anticuerpos está típicamente ligada a N. "Ligada a N" se refiere a la adhesión del resto carbohidrato a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la adhesión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glicosilación ligados a N). Otro tipo de modificación covalente implica el acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al anticuerpo. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren producción del anticuerpo en una célula hospedadora que tiene capacidades de glucosilación para glucosilación ligada a N u O. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el azúcar o los azúcares pueden adherirse a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) restos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano, o (F) el grupo amida de glutamina. Por ejemplo, dichos métodos se describen en el documento WO 87/05330.

La eliminación de cualquier resto carbohidrato presente en el anticuerpo puede conseguirse de forma química o enzimática. La desglucosilación química requiere exposición del anticuerpo al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento provoca la escisión de la mayoría o de todos los azúcares excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras deja el anticuerpo intacto.

La escisión enzimática de los restos carbohidrato en los anticuerpos puede conseguirse mediante el uso de una diversidad de endo- y exoglucosidasas.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende la unión del anticuerpo a uno de una diversidad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, propilenglicol o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las patentes de Estados Unidos n.º 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337. También puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, para potenciar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones de aminoácido

en una región Fc del anticuerpo. Como alternativa o adicionalmente, pueden introducirse uno o más restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener capacidad de internalización mejorada y/o eliminación celular mediada por el complemento y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mejorada (Caron PC. *et al.* J Exp Med. 1 de octubre de 1992; 176(4): 1191-5 y Shopes B. J Immunol. 1 de mayo de 1992; 148(9):2918-22).

La invención se ilustrará adicionalmente en vista de las siguientes figuras y ejemplo.

Descripción de las figuras

Figura 1. El anticuerpo anti-hulCOS (314.8) evita la pérdida de peso y mejora la supervivencia durante xeno-GVHD.

Se irradiaron (2Gy) ratones inmunodeficientes hembra (7-20 semanas NSG o NOG) y se injertaron con $2 \cdot 10^6$ PBMC humanas por inyección retroorbital. Se inyectó anticuerpo anti-hulCOS (314.8) o control de isotipo (500 µg/por ratón) por vía intraperitoneal. **A.** Peso promedio (porcentaje + desviación típica) para ratones que reciben PBMC más IgG de control (500 µg, línea gris), anti-ICOS (500 µg, línea negra). **B.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para diferentes grupos de ratones como se muestra en (A). ***Pueba del orden logarítmico (Mantel-Cox) $p < 0,001$.

Figura 2. El tratamiento con 314.8 reduce las infiltraciones de células mononucleares (MNC) en órganos periféricos. Tinción con hematoxilina-eosina de hígado (D16 después de la transferencia) y pulmón (-PBMC D90, +PBMC +Iso D70, +PBMC +314.8 D98 después de la transferencia). *** $p < 0,05$ Prueba de la t para datos independientes.

Figura 3. El anticuerpo anti-hulCOS evita la expansión de linfocitos T humanos en la sangre. Se realizó la cinética de la expansión de linfocitos T CD3+ en la sangre de ratones de control (n=11) y tratados con 314.8 (n=5) usando las microesferas Truecount.

Figura 4. El tratamiento con anti-ICOS únicamente retarda la muerte causada por GVHD establecida. Dx = ratones en o por debajo de un 85 % de IW (PBMC en D0). D8 = inyección de mAb respecto a PBMC (D0).

Ejemplo: Uso de mAb anti-ICOS 314.8 en un modelo murino de GVHD

MATERIAL Y MÉTODOS

Se irradiaron ratones NOD.SCID.yc-/- (NSG) inmunodeficientes (de Jackson Laboratory) a 2 Gy antes de inyección de $2 \cdot 10^6$ células mononucleares de sangre periférica (PBMC) totales de donadores sanos. En estos experimentos, los autores de la invención evaluaron la pérdida de peso y la supervivencia de los ratones a los que se ha inyectado en el tiempo, como parámetros clínicos de la aparición de GVHD y la gravedad. La pérdida de peso se representó como el porcentaje de peso inicial de los ratones a los que se ha inyectado en los diferentes puntos temporales después de la inyección de PBMC. En algunos experimentos, se recogió sangre y células esplénicas y se determinaron las frecuencias de linfocitos T por citometría de flujo usando mAb fluorescentes específicos de ser humano. Se realizaron cinco experimentos independientes con cinco donadores de PBMC sanos humanos diferentes.

RESULTADOS

El primer panel mostró una rápida pérdida de peso en ratones a los que se inyectó PBMC y el mAb irrelevante de control en comparación con ratones que habían recibido PBMC y el mAb anti-ICOS (figura 1A). Esta pérdida estuvo acompañada por muerte de todos los ratones (figura 1B). Por el contrario, un 60 % de los ratones tratados con anti-ICOS sobrevivieron hasta el final del experimento (figura 1B). Esta protección se correlacionó con una menor infiltración de células mononucleares en el hígado y en los pulmones de los ratones (figura 2). Se detectó infiltración masiva alrededor de estructuras vasculares en ratones de control mientras que se detectaron muy pocas células en la misma zona en animales tratados con 314.8 (figura 2). La cuantificación visual demostró que las cantidades de vasos infiltrados eran significativamente inferiores en los grupos tratados con anti-ICOS. Las cantidades de linfocitos T humanos se determinaron en la sangre de los animales tratados usando los reactivos TrueCount en diversos momentos después de la inyección. Los resultados demostraron una expansión masiva de linfocitos T en el primer mes después de la inyección en el grupo de control. Por el contrario, los ratones tratados con anti-ICOS presentaron cantidades menores de linfocitos T en la sangre (figura 3) y en el bazo (no mostrado). Por tanto, el mAb anti-ICOS evitaba la expansión de linfocitos T humanos en el entorno xeno-GVHD. Finalmente, después de haber demostrado que el anticuerpo tenía un efecto preventivo en GVHD, se quiso evaluar el efecto curativo del anticuerpo (figura 4). Para hacer esto, a los ratones se les inyectaron PBMC recién aisladas y se esperó durante 8 días antes de la inyección del anticuerpo 314.8 o hasta que el ratón perdió un 85 % de su peso inicial. En este último entorno, los ratones murieron a la misma tasa y al mismo ritmo que los controles no tratados. Por el contrario, el tiempo de supervivencia se duplicó en el grupo que recibió el anticuerpo en el día 8. En conjunto, los resultados muestran una protección significativa del mAb anti-ICOS 314.8 contra xeno-GVHD, correlacionada con una expansión limitada de

linfocitos T humanos *in vivo*.

Además, los resultados muestran que el mAb anti-ICOS representa una nueva opción terapéutica para tratar la GVHD.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM

10

<120> Anticuerpos dirigidos contra ICOS para tratar la enfermedad de injerto contra hospedador

<130> BEP120491 EP

<160> 20

15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 30

20

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 1

ggctacacct tcaccaccta ctggatgcac 30

25

<210> 2

<211> 51

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

30

<400> 2

gagattgatc ctctgatag ttatgttaac tacaatcaaa actttaaggg c 51

35

<210> 3

<211> 9

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 3

40

tttgattac 9

<210> 4

<211> 48

<212> ADN

45

<213> *Mus musculus*

<400> 4

agggtctagta agagtcacct gcatagtaac ggcaacattt acttatat 48

50

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

55

<400> 5

cggatgtcca accttgctc a 21

<210> 6

<211> 27

60

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 6

atgcaacatc tagaatatcc gtacacg 27

65

<210> 7

ES 2 684 552 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 5 <400> 7
 Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Met His
 1 5 10
 <210> 8
 10 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 8
 15 Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Val Asn Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 9
 20 <211> 3
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 9
 Phe Asp Tyr
 1
 25
 <210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> *Mus musculus*
 <400> 10
 Arg Ser Ser Lys Ser Pro Leu His Ser Asn Gly Asn Ile Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15
 35
 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 40 <400> 11
 Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 45
 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 50 <400> 12

ES 2 684 552 T3

Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 13
<211> 426
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 13

```
atgggatggc gctgtatcat cctcttcttg gtatcaacag ctacaggtgt ccactcccag      60
gtccaactac agcagcctgg gactgaactt atgaagcctg gggcttcagt gaagctgtcc      120
tgcaaggctt ctggctacac cttcaccacc tactgggatgc actgggtgaa gcagaggcoct      180
ggacaaggcc ttgagtggat cggagagatt gatccttctg atagttatgt taactacaat      240
caaaacttta agggcaaggc cacattgact gtagacaaat cctccagcac agcctacata      300
cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcggctctatt tttgtgcgag atccccctgat      360
tactacggta ctagtcttgc ctggtttgat tactggggcc aagggaactct gggtcactgtc      420
tctaca                                           426
```

<210> 14
<211> 142
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 14

```
Met Gly Trp Arg Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ser Thr Ala Thr Gly
1           5           10           15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Glu Leu Met Lys
          20           25           30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
          35           40           45

Thr Thr Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
          50           55           60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Val Asn Tyr Asn
65           70           75           80

Gln Asn Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
          85           90           95
```


ES 2 684 552 T3

Thr Ala Tyr Ile Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Pro Asp Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu Ala Trp
115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr
130 135 140

<210> 15
<211> 396
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 15

atgaggtgcc tagctgagtt cctggggctg cttgtgctct ggatccctgg agtcattggg 60
gatattgtga tgactcaggc tgcacctct gtacctgtca ctctggaga gtcagtatcc 120
atctcctgca ggtctagtaa gagtccctg catagtaacg gcaacattta cttatattgg 180
ttcctgcaga ggccaggcca gtctcctcag ctctgatat atcggatgtc caaccttgcc 240
tcaggagtcc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggaa ctactttcac actgaaaatc 300
agtagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgta tgcaacatct agaatatccg 360
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 396

<210> 16
<211> 132
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 16

ES 2 684 552 T3

Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
1 5 10 15

Gly Val Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
35 40 45

Pro Leu His Ser Asn Gly Asn Ile Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Thr Phe
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys
130

<210> 17
<211> 369
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 17

cagggtccaac tacagcagcc tgggactgaa cttatgaagc ctggggcttc agtgaagctg 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc acctactgga tgcactgggt gaagcagagg 120
cctggacaag gccttgagtg gatcggagag attgatcctt ctgatagtta tgtaactac 180
aatcaaaaact ttaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
atacagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct atttttgtgc gagatccct 300
gattactacg gtactagtct tgccctggtt gattactggg gcccaaggac tctggtcact 360
gtctctaca 369

<210> 18
<211> 123
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

ES 2 684 552 T3

<400> 18

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Thr	Glu	Leu	Met	Lys	Pro	Gly	Ala	
1				5					10					15		
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Thr	Tyr	
			20					25					30			
Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	
		35					40					45				
Gly	Glu	Ile	Asp	Pro	Ser	Asp	Ser	Tyr	Val	Asn	Tyr	Asn	Gln	Asn	Phe	
	50					55					60					
Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	
65					70					75					80	
Ile	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Ser	Pro	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Ser	Leu	Ala	Trp	Phe	Asp	Tyr	
			100					105					110			
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Thr						
		115					120									

5

<210> 19
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 19

gatattgtga	tgactcaggc	tgacacctct	gtacctgtca	ctcctggaga	gtcagtatcc	60
atctcctgca	ggtctagtaa	gagtcccctg	catagtaacg	gcaacattta	ottatattgg	120
ttcctgcaga	ggccaggcca	gtctcctcag	ctcctgatat	atcggatgtc	caaccttgcc	180
tcaggagtcc	cagacagggt	cagtggcagt	gggtcaggaa	ctactttcac	actgaaaatc	240
agtagagtgg	aggctgagga	tgtgggtgtt	tattactgta	tgcaacatct	agaatatccg	300
tacacgttcg	gaggggggac	caagctggaa	ataaaa			336

15

<210> 20
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20

<400> 20

ES 2 684 552 T3

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

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Pro Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Ile Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Thr Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo dirigido contra ICOS que tiene las 6 siguientes CDR:

	Secuencia de aminoácidos
H-CDR1	GYTFTTYWMH (SEQ ID NO: 7)
H-CDR2	EIDPSDSYVNYNQNFKG (SEQ ID NO: 8)
H-CDR3	FDY (SEQ ID NO: 9)
L-CDR1	RSSKSPLHSNGNIYLY (SEQ ID NO: 10)
L-CDR2	RMSNLAS (SEQ ID NO: 11)
L-CDR3	MQHLEYPYT (SEQ ID NO: 12)

5 para su uso para tratar una enfermedad de injerto contra hospedador, en el que dicho anticuerpo es Icos 314-8, que se puede obtener del hibridoma depositado en la CNCM el 2 de julio de 2009 con el número de acceso CNCM 1-4180.

10 2. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las secuencias nucleotídicas que codifican las 6 CDR de dicho anticuerpo son las siguientes:

	Secuencia de ADN
H-CDR1	GGCTACACCTTCACCACCTACTGGATGCAC (SEQ ID NO: 1)
H-CDR2	GAGATTGATCCTTCTGATAGTTATGTAACTACAATCAAACTTTAAGGGC (SEQ ID NO: 2)
H-CDR3	TTTGATTAC (SEQ ID NO: 3)
L-CDR1	AGGTCTAGTAAGAGTCCCCTGCATAGTAACGGCAACATTTACTTATAT (SEQ ID NO: 4)
L-CDR2	CGGATGTCCAACCTTGCCTCA (SEQ ID NO: 5)
L-CDR3	ATGCAACATCTAGAATATCCGTACACG (SEQ ID NO: 6)

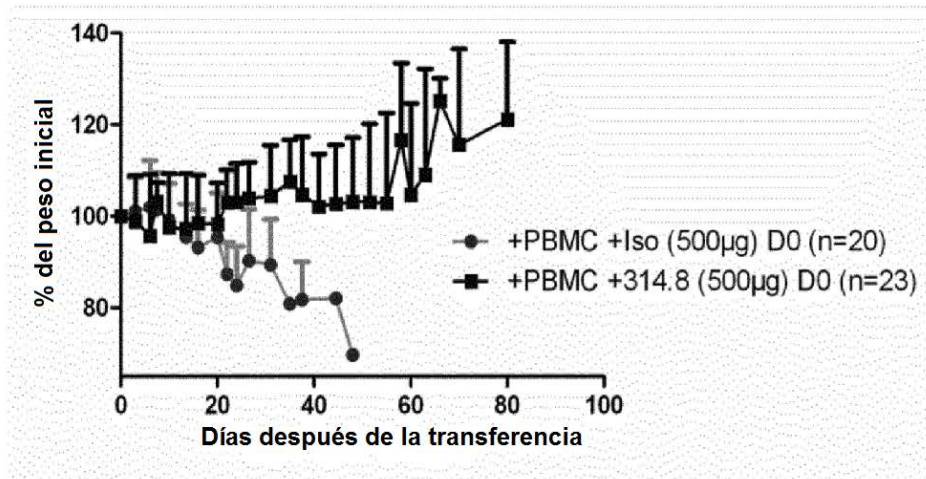
15 3. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 18 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 20.

4. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo está codificado por al menos la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 17 para la cadena pesada y al menos la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO: 19 para la cadena ligera.

20 5. El anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la enfermedad de injerto contra hospedador se elige de la forma *aguda* o *fulminante* de la enfermedad (aGVHD) y la forma *crónica* de la enfermedad de injerto contra hospedador (cGVHD).

Figura 1

A



B

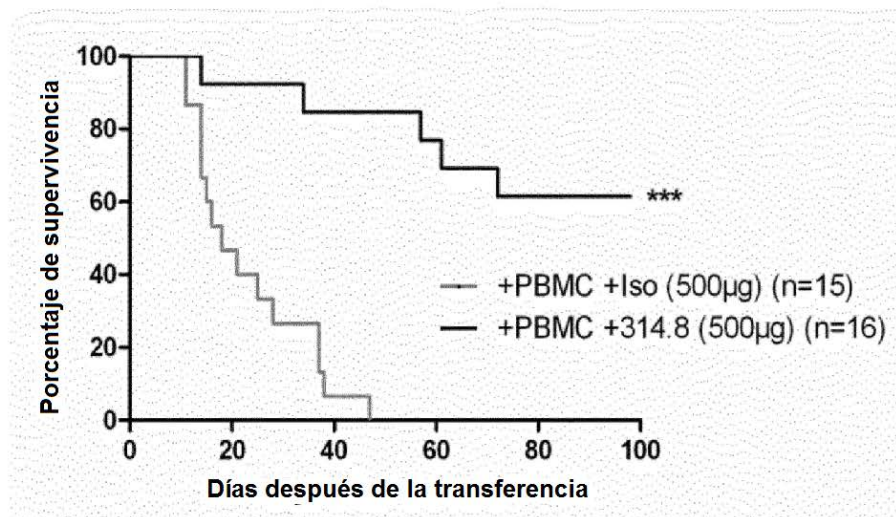
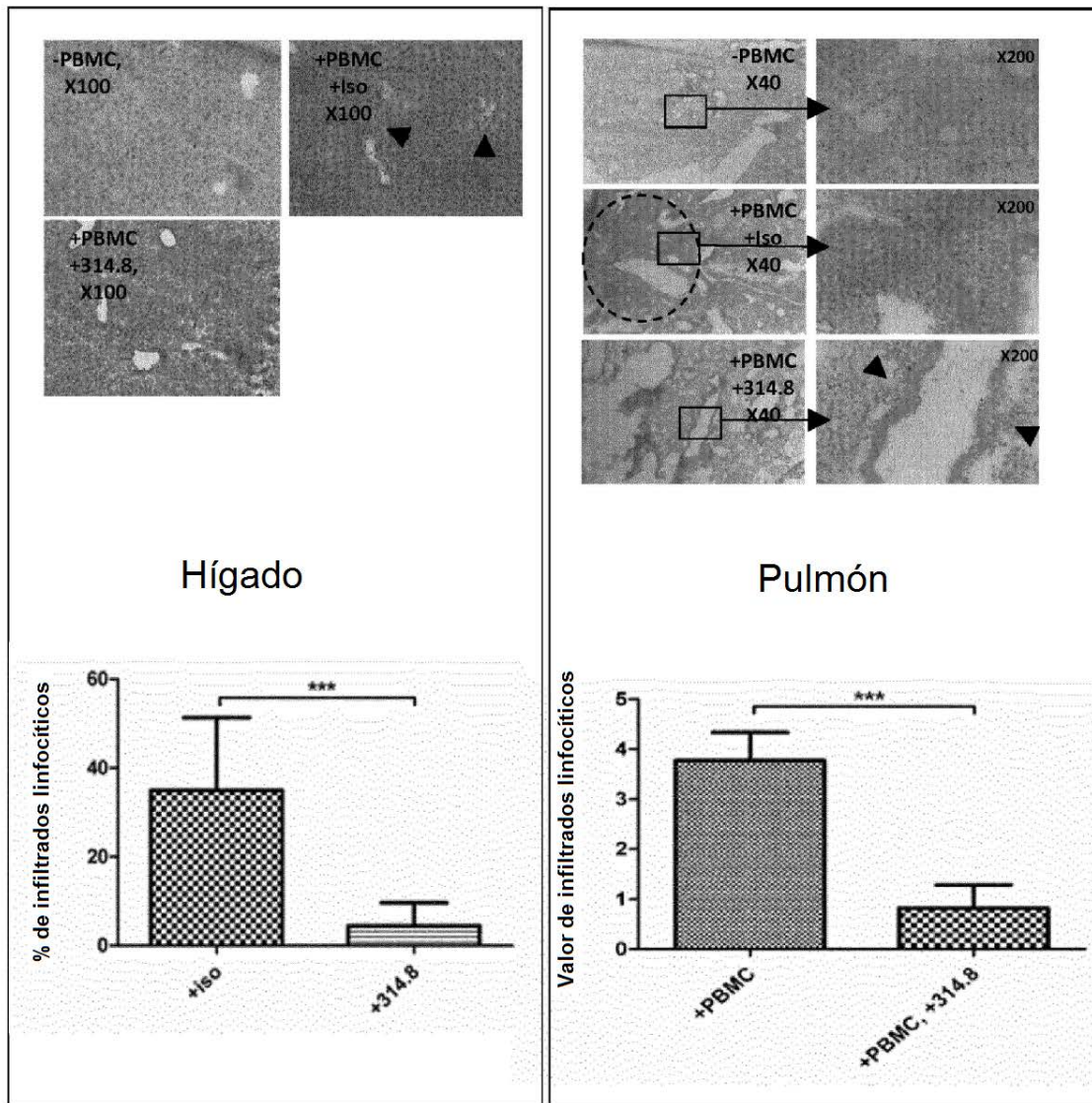


Figura 2



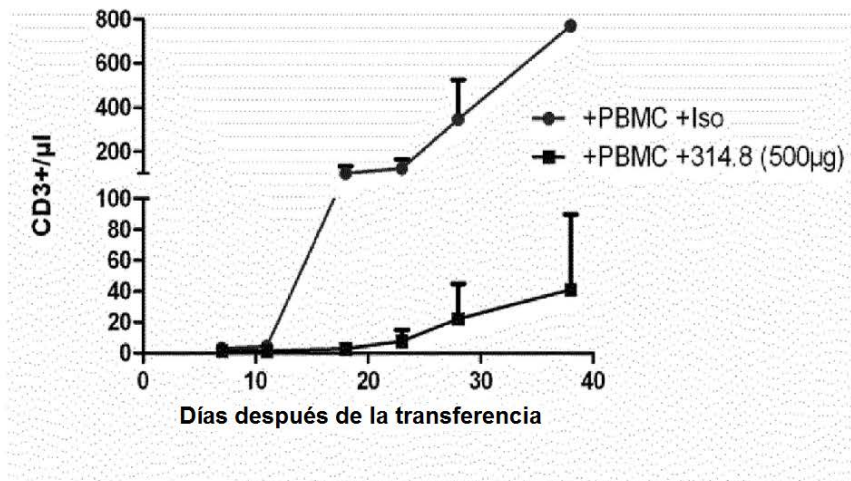


Figura 3

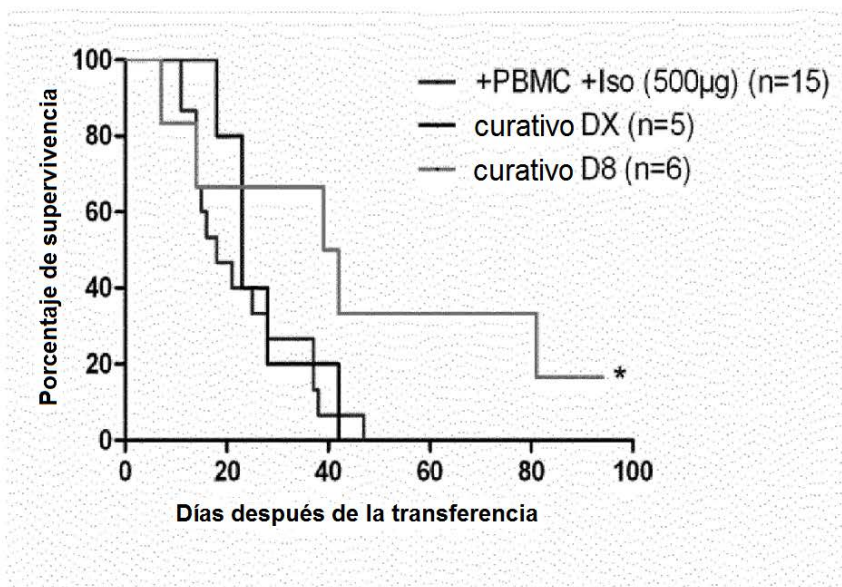


Figura 4