

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 760**

51 Int. Cl.:

A61K 35/28 (2015.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2011 PCT/EP2011/006060**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12072268**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2011 E 11801972 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2672979**

54 Título: **Anticuerpos anti-CD4 para prevenir en particular la enfermedad del hospedante frente al injerto GvHD**

30 Prioridad:

02.12.2010 EP 10015236

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

25.02.2019

73 Titular/es:

**FRAUNHOFER GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN
FORSCHUNG E.V. (100.0%)
Hansastraße 27 c
80686 München, DE**

72 Inventor/es:

**FRICKE, STEPHAN;
EMMRICH, FRANK y
HILGER, NADJA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 701 760 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 anti-CD4 para prevenir en particular la enfermedad del hospedante frente al injerto GvHD

La invención se refiere al campo de los injertos y sus trasplantes. En particular, la invención se refiere a injertos modificados, a métodos para obtenerlos, así como a los usos relacionados. Entre otros, la invención se refiere a injertos que contienen células viables inmunocompetentes.

En otro aspecto, la descripción se refiere a anticuerpos anti-CD4 humana modificados en los que la característica inmunológica se ha modificado por medio de reducir el número de epitopos de células T, y a las cuestiones relacionadas.

Antecedentes de la invención

En la actualidad, el trasplante de células madre hematopoyéticas ("hematopoietic stem cell transplantation", HSCT) alogeneicas es el único tratamiento curativo para muchos pacientes con malignidades hematológicas. La médula ósea (Aschan, 2006), las células madre movilizadas periféricas (Bacigalupo *et al.*, 2002) y la sangre del cordón umbilical (Kestendjieva *et al.*, 2008) son las fuentes habituales para el HSCT. A pesar de emplear estrategias terapéuticas muy sofisticadas, el HSCT sigue asociado con una mortalidad considerable provocada por una serie de complicaciones, tales como la enfermedad del hospedante frente al injerto ("graft versus host disease", GvHD), enfermedades infecciosas, enfermedad veno-oclusiva, rechazo de los injertos del donante y recaídas de enfermedades subyacentes.

El uso de fármacos inmunosupresores convencionales conduce a la supresión del sistema inmunológico completo, lo cual potencia la posibilidad de infecciones o el desarrollo de tumores malignos. Además, en algunos casos, la eficacia de estos fármacos puede reducirse e incluso abrogarse. Por ejemplo, la GvHD refractaria a esteroides es uno de los problemas principales tras un trasplante de células madre hematopoyéticas alogeneicas (Auletta *et al.*, 2009; von Bonin *et al.*, 2009). Para el tratamiento de la GvHD ya se han empleado estrategias inmunosupresoras contra elementos clave de las reacciones de células T (von Bonin *et al.*, 2009). Sin embargo, debido al alto número de pacientes, estas estrategias se han empleado principalmente en la reumatología (Kameda *et al.*, 2009; Senolt *et al.*, 2009) o para pacientes después de un trasplante de riñón. Para la terapia de la GvHD aguda, la mayoría de las experiencias se han realizado con OKT3® (Benekli M. *et al.*, 2006; Knop *et al.*, 2007) o anticuerpos del receptor de interleuquina 2 (Chen *et al.*, 2004; Ji *et al.*, 2005), y para la GvHD crónica con anticuerpos anti-CD20 (Bates *et al.*, 2009). Sin embargo, estos anticuerpos pueden estar asociados con un menor éxito a largo plazo y con toxicidad debido a la aparición de complicaciones infecciosas. El uso de anticuerpos monoclonales para la aplicación clínica se ha restringido debido a que falta la humanización. Los anticuerpos murinos o los anticuerpos de otras especies son moléculas enormes con un peso molecular en el intervalo de 150 kDa que pueden ser muy inmunogénicas en seres humanos. Después de la aplicación de anticuerpos monoclonales antihumanos murinos se han observado complicaciones anafilácticas potencialmente mortales (Chester *et al.*, 1995). Además, el potencial inmunogénico de los anticuerpos depende de su estructura peptídica. Los isotipos IgG4, por ejemplo, son menos inmunogénicos que los isotipos IgG1 por su bajo potencial para la activación del complemento. Además, la humanización de anticuerpos conduce a isotipos quiméricos que son menos inmunogénicos que sus homólogos originariamente murinos (Hosono *et al.*, 1992). Hasta la fecha no existen datos claros que demuestran que los anticuerpos totalmente humanos tengan ventajas clínicas, comparados con los anticuerpos quiméricos.

Por consiguiente, aún es necesaria la investigación de estrategias o procedimientos terapéuticos alternativos o mejorados, incluyendo el uso de nuevas fuentes de células, el tratamiento con anticuerpos u otros productos biológicos.

Una posible estrategia se centra en las células T auxiliares CD4 positivas. Dichas células coordinan la reacción inmunológica fisiológica y patológica en el cuerpo humano. Por tanto, influyendo en las células T auxiliares CD4 positivas mediante la aplicación de anticuerpos anti-CD4 conduciría a una modulación dirigida del sistema inmunológico.

Anteriormente, el anticuerpo monoclonal anti-CD4 humana murino Max16H5 (IgG1) ha sido utilizado en aplicaciones clínicas en pacientes con enfermedades autoinmunitarias o como terapia protectora contra el rechazo de trasplantes (Chatenoud *et al.*, 1995; Emmrich *et al.*, 1991a; Emmrich *et al.*, 1991b). Además, en el trasplante de riñón humano, Max16H5 (IgG1) tiene el potencial de reducir con eficacia el rechazo de injertos (Reinke *et al.*, 1991; Reinke *et al.*, 1995). La aplicación de anticuerpos monoclonales específicos anti-CD4 puede provocar no solo la supresión de la actividad inmunológica, sino también la inducción de tolerancia contra el toxoide del tétanos en un modelo de ratón transgénico triple (Laub *et al.*, 2002). También se demostró la inducción de tolerancia por el anticuerpo monoclonal de rata (Kohlhaw *et al.*, 2001). Dicho anticuerpo monoclonal Max16H5 también se describe en el documento EP 1 454 137 que, entre otros, se relaciona con el uso de un ligando marcado que tiene especificidad por la molécula de CD4 humana para producir un agente de diagnóstico *in vivo*.

Las moléculas de CD4+ sobre las células T auxiliares se unen directamente a las regiones constantes de las moléculas de HLA sobre células presentadoras de antígenos ("antigen presenting cells", APC) para permitir la

activación completa de las células T. Para interferir con esto, la unión de anticuerpos monoclonales no mermanes puede inhibir esta activación mediante un bloqueo estérico total, mediante el acortamiento del contacto célula-célula entre APC y la células T (Fehervari *et al.*, 2002) o mediante la inducción de señales negativas mediante la inhibición de la fosforilación de proteínas de tirosina (Harding *et al.*, 2002) o mediante la inducción de una anergia de células T (Madrenas *et al.*, 1996). En este caso, Fehérvári *et al.* y Harding *et al.* no describen los métodos ni los usos de la invención. Entre otras cuestiones, no incubaron injertos de células madre con anticuerpos anti-CD4, sino con células CD4+ aisladas separadas de bazo (murinos) y de la capa leucocítica (humana).

Además, el documento WO 2004/112835 describe, entre otras cuestiones, métodos que implican el uso de anticuerpos que incluyen anticuerpos dirigidos contra CD4. En este caso, se emplearon anticuerpos anti-CD4 para generar células T reguladoras a lo largo de un periodo de tiempo prolongado para inducir tolerancia inmunológica.

Maraninchi D. *et al.* (Lancet, 1987, 2(8552):175-8) describen el impacto de la merma de células T sobre el resultado de un trasplante de médula ósea alogeneico para leucemias de riesgo medio.

A la vista de lo anterior, siguen siendo necesarias estrategias terapéuticas mejoradas y alternativas prometedoras, respectivamente, que carezcan de las desventajas de las metodologías de la técnica anterior.

Además, en muchos casos la eficacia de una proteína terapéutica se ve limitada por una reacción inmunológica no deseada frente a la proteína terapéutica. Varios anticuerpos monoclonales de ratón han resultado prometedores como terapias en una serie de escenarios de enfermedades humanas, pero en ciertos casos han fracasado debido a la inducción de grados significativos de respuestas de anticuerpos antimurinos humanos ("human anti-murine antibody", HAMA) (Schroff *et al.* (1985)). Se han desarrollado una serie de técnicas para los anticuerpos monoclonales para intentar reducir la respuesta de HAMA (véase, por ejemplo, el documento WOA9106667). Estas estrategias de ADN recombinante en general han reducido la información genética de ratón en la construcción de anticuerpo final, al mismo tiempo que aumentan la información genética humana en la construcción final. No obstante, los anticuerpos "humanizados" resultantes, en varios casos, han seguido suscitando una respuesta inmunológica en pacientes (Isaacs J. D. (1990)).

Los anticuerpos no son la única clase de molécula polipeptídica administrada como agente terapéutico contra la cual puede organizarse una respuesta inmunológica. Incluso proteínas de origen humano y con las mismas secuencias de aminoácidos que aparecen dentro de los seres humanos pueden inducir una respuesta inmunológica en seres humanos.

La presencia de péptidos dentro de la proteína que pueden estimular la actividad de las células T a través de la presentación sobre moléculas de MHC de clase II, los denominados "epitopos de células T", es clave para la inducción de una respuesta inmunológica.

Las moléculas de MHC de clase II son un grupo de proteínas muy polimórficas que desempeñan un papel central en la activación y la selección de células T auxiliares. El grupo DR de antígenos de leucocitos humanos ("human leukocyte antigen group DR", HLA-DR) es el isotipo predominante de este grupo de proteínas; sin embargo, los isotipos HLA-DQ y HLA-DP realizan funciones similares. En la población humana, los individuos portan de dos a cuatro alelos DR, dos alelos DQ y dos alelos DP. Se ha resuelto la estructura de una serie de moléculas de DR y estas aparecen como un surco de unión peptídico de extremo abierto con una serie de bolsillos que contienen cadenas laterales de aminoácidos (restos de bolsillo) del péptido (Stern *et al.* (1994)). Los polimorfismos que identifican los diferentes alotipos de la molécula de clase II contribuyen a que exista una amplia diversidad de diferentes superficies de unión para péptidos dentro del surco de unión peptídico y, a nivel de población, aseguran la máxima flexibilidad con respecto a la capacidad para reconocer proteínas extrañas y organizar una respuesta inmunológica frente a organismos patógenos.

Una respuesta inmunológica frente a una proteína terapéutica se desarrolla a través de la vía de presentación de péptidos de MHC de clase II. En este caso, las proteínas exógenas son rodeadas por las células presentadoras de antígenos ("antigen presenting cells", APC) y procesadas para su presentación en la superficie celular en asociación con moléculas de MHC de clase II del tipo de DR, DQ o DP. Las moléculas de MHC de clase II son expresadas por células presentadoras de antígenos profesionales, tales como macrófagos y células dendríticas, entre otras. La unión de un complejo de péptido de MHC de clase II por un receptor de células T cognado sobre la superficie de la célula T, junto con la unión cruzada de ciertos otros correceptores, tales como la molécula de CD4, puede inducir un estado activado dentro de la célula T. La activación conduce a la liberación de citoquinas que después activan a otros linfocitos, tales como las células B, para que produzcan anticuerpos o activen células T asesinas en forma de una respuesta inmunológica celular total.

La identificación del epitopo de células T es la primera etapa de la eliminación del epitopo, tal como se reconoce en los documentos WO98/52976 y WO00/34317. En estos textos, los epitopos de células T predichos se retiran empleando sustituciones de aminoácidos oportunas dentro de la proteína de interés. Además de las técnicas por ordenador, existen métodos *in vitro* para medir la capacidad de péptidos sintéticos para unirse a moléculas de MHC de clase II. Un ejemplo de método emplea líneas de células B con un alotipo de MHC definido como fuente de superficie de unión a MHC de clase II y que pueden aplicarse a la identificación de ligandos de MHC de clase II

(Marshall *et al.* (1994); O'Sullivan *et al.* (1990); Robadey *et al.* (1997)). Sin embargo, dichas técnicas no están adaptadas para la selección de múltiples epítomos potenciales frente a una amplia diversidad de alotipos de MHC ni pueden confirmar la capacidad de un péptido de unión para actuar como epítomo de células T.

5 En fechas recientes, se han empezado a usar técnicas que emplean complejos solubles de moléculas de MHC recombinantes en combinación con péptidos sintéticos (Kern *et al.* (1998); Kwok *et al.* (2001)). Estos reactivos y procedimientos se utilizan para identificar la presencia de clones de células T procedentes de muestras de sangre periférica de sujetos humanos o de animales experimentales que son capaces de unirse a complejos de MHC-péptido concretos y no están adaptados para la selección de múltiples epítomos potenciales para una amplia diversidad de alotipos de MHC.

10 La CD4 es una glicoproteína de la superficie que se expresa principalmente sobre células del linaje de los linfocitos T que incluye la mayoría de los timocitos y un subconjunto de células T periféricas. Algunas células no linfoides también expresan niveles bajos de CD4, aunque se desconoce la importancia funcional de dicha distribución celular divergente. Sobre las células T maduras, CD4 tiene una función de correconocimiento a través de la interacción con moléculas de MHC de clase II expresadas en células presentadoras de antígenos. Las células T CD4+ constituyen
15 principalmente el subconjunto auxiliar que regula las funciones de células T y B durante las respuestas dependientes de células T contra infecciones víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias.

Durante la patogénesis de las enfermedades autoinmunitarias, en particular cuando se deteriora la tolerancia a autoantígenos, las células T CD4+ contribuyen a las respuestas inflamatorias que provocan la destrucción de articulaciones y tejidos. Estos procesos se ven facilitados por el reclutamiento de células inflamatorias del linaje hematopoyético, la producción de anticuerpos, de citoquinas inflamatorias y de mediadores, y por la activación de
20 células asesinas.

En la técnica se conocen anticuerpos de CD4. Un ejemplo de anticuerpo de CD4, el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD4 humana 30F16H5, se describe en el documento DE 3919294. Dicho anticuerpo puede obtenerse a partir de la línea celular de hibridoma ECACC 88050502.

25 Para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos anti-CD4 de ratón, se han modificado anticuerpos humanizados anti-CD4 mediante la clonación de las regiones hipervariables de un anticuerpo de ratón en marcos proporcionados por inmunoglobulinas humanas (por ejemplo, Boon *et al.* (2002)). Aunque reduce la inmunogenicidad, comparado con el anti-CD4 de ratón, este anticuerpo humanizado sigue suscitando respuestas inmunológicas en varios casos.

30 Además, en la técnica se sabe que dicha "humanización" de anticuerpos a menudo produce anticuerpos con una afinidad menor o significativamente menor por la diana concreta.

Por tanto, otro objetivo es proporcionar formas modificadas de un anticuerpo anti-CD4 humana para reducir la reacción inmunológica frente a anticuerpos anti-CD4 de ratón. En particular, resulta deseable proporcionar anticuerpos anti-CD4 con un número reducido de epítomos de células T que pueden dar como resultado un potencial reducido o ausente para inducir una respuesta inmunológica en un sujeto humano. Puede esperarse que estas
35 proteínas muestren un mayor tiempo en circulación dentro de un sujeto humano capaz de organizar una respuesta inmunológica frente al anticuerpo no modificado, y pueden ser particularmente beneficiosas en escenarios de enfermedad crónica o recurrente, tal como es el caso de una serie de indicaciones para los anti-CD4. Aunque otros han proporcionado moléculas de anticuerpos anti-CD4 que incluyen formas "humanizadas", ninguna de estas indicaciones reconoce la importancia de los epítomos de células T en las propiedades inmunogénicas de la proteína ni se han concebido para influir directamente en dichas propiedades de una manera específica y controlada según el
40 presente plan.

Sumario de la invención

45 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para modificar un injerto de células que contiene células inmunológicas para lograr una tolerancia dentro de las células inmunológicas trasplantadas frente al tejido de receptor tras el trasplante de dicho injerto modificado, en el que el método comprende las etapas de a) incubar un injerto de células que contiene células inmunológicas con un anticuerpo anti-CD4, en el que dicha incubación se realiza durante 1 minuto a 7 días, b) retirar el anticuerpo no unido de dicho injerto mediante el lavado de dicho injerto, en el que dicho injerto comprende células inmunológicas que portan el antígeno CD4, y en el que dichos anticuerpos anti-CD4 se unen del 40% al 100% de los epítomos de CD4 accesibles de dicho injerto modificado.

50 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un injerto de células modificado que contiene células inmunológicas, en el que dicho injerto i) puede obtenerse según el método *in vitro* de la invención; y ii) comprende anticuerpos anti-CD4 unidos del 40% al 100% de los epítomos de CD4 accesibles de dicho injerto, en el que dicho injerto comprende células madre, y en el que dicho injerto comprende células inmunológicas que portan el antígeno CD4.

55 En otro aspecto, la presente invención se refiere al injerto de células modificado que contiene células inmunológicas de la invención para su uso en medicina, en particular para su uso en un método para tratar, en un sujeto, una o más enfermedades que pueden tratarse mediante un trasplante.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere al uso de un anticuerpo anti-CD4 para la modificación *in vitro* de un injerto de células que contiene células inmunológicas, y dicha modificación comprende incubar dicho injerto con dicho anticuerpo durante 1 minuto a 7 días.

5 En otros aspectos, la invención se refiere a los métodos, usos e injertos según se definen en las reivindicaciones. En otros aspectos, la descripción se refiere a los anticuerpos concretos descritos en la presente.

Otro aspecto adicional de la descripción se resume como sigue: una faceta de este aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un anticuerpo anti-CD4 humana que comprende un dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada (VH) y un dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera (VL), en el que al menos un epítipo de células T localizado fuera de las CDR de dichos dominios variables de inmunoglobulina se retira de dichos dominios variables de inmunoglobulina, en particular se refiere a un anticuerpo anti-CD4 humana tal como se define a continuación. En una realización preferida de dicho aspecto adicional de la presente descripción, dicho anticuerpo contiene las CDR del anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ECACC 88050502, o dicho anticuerpo contiene las CDR de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:12. En una realización concreta, el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4, 6, 8, y 10; y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:14, 16, 18, y 20. En otra faceta, dicho aspecto adicional de la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra faceta, dicho aspecto adicional de la presente descripción también se refiere al uso de dicho anticuerpo para la fabricación de un medicamento para tratar terapéuticamente un sujeto y a métodos de tratamiento que emplean dicho anticuerpo. En otra faceta, dicho aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada y/o de cadena ligera de dicho anticuerpo, y a un vector que comprende dicho ácido nucleico, en particular en el que dicho ácido nucleico está unido operablemente a una secuencia de control de la expresión. Dicho aspecto adicional de la presente descripción se refiere además a una célula hospedante que comprende dicho ácido nucleico y/o al menos un vector descrito anteriormente, así como a un método para preparar un anticuerpo de dicho aspecto adicional de la presente descripción, que comprende cultivar la célula hospedante descrita anteriormente bajo condiciones que permiten la expresión bajo el control de una o más secuencias de control de la expresión adecuadas, y purificar dicho anticuerpo a partir del medio de la célula. Dicho aspecto adicional de la presente descripción se refiere además a un anticuerpo anti-CD4 humana, en el que el anticuerpo se obtiene empleando los vectores de expresión pANTVhG4 y pANTVk. En general, se contempla que las definiciones, facetas y realizaciones descritas en el contexto de dicho aspecto adicional también puedan aplicarse a la invención en general. Preferiblemente, en dicho aspecto adicional, la especificidad y el modo de acción de los anticuerpos anti-CD4 no se verán afectados por la modificación o modificaciones.

Breve descripción de las figuras

35 La figura 1 ilustra esquemáticamente el principio de la incubación con anticuerpos de los injertos, así como el posterior trasplante a un sujeto, tal como un ser humano.

La figura 2 contiene una explicación de los ratones transgénicos triples (TTG) como donantes en un entorno de C57B1/6 estable. Los ratones TTG expresan CD4 y HLA-DR humanas, mientras las moléculas de CD4 murinas están inactivadas. Esto permite la determinación de moléculas de superficie humanas específicas después del trasplante (análisis exclusivo del quimerismo) y el ensayo directo de anticuerpos anti-CD4 humana en ratones.

45 La figura 3 muestra una explicación del diseño experimental. Se obtuvieron células de médula ósea y esplenocitos de ratones TTG, se mezclaron y se trasplantaron a ratones TTG letalmente irradiados con o sin un pretratamiento con anticuerpos anti-CD4 humana. Estos experimentos se compararon utilizando células de donante procedentes de ratones C57B1/6 de tipo salvaje. Se investigaron los efectos terapéuticos (supervivencia, reparación de los órganos, quimerismo, GvHD) después del trasplante.

50 La figura 4 muestra la tasa de supervivencia después del trasplante de BM/esplenocitos desde ratones TTG a ratones Balb/c con o sin una preincubación de los anticuerpos anti-CD4. En los ratones que recibieron las células pretratadas, la tasa de supervivencia aumentó significativamente (del 0% al 83%, $p < 0,001$). El efecto observado fue específico del trasplante desde ratones TTG a ratones Balb/c, porque cuando se utilizan ratones C57B1/6 de tipo salvaje como donantes, el efecto no se repitió. Este resultado demuestra la unión específica del anticuerpo a la CD4 humana y, por tanto, las células del donante de tipo salvaje no se vieron afectadas.

55 La figura 5 ilustra la recuperación hematopoyética después de un trasplante de BM/esplenocitos desde ratones TTG a ratones Balb/c con (A+C) o sin (A+B) una preincubación de los anticuerpos anti-CD4. En los ratones que recibieron las células pretratadas, el sistema hematopoyético recuperó sus valores iniciales después del trasplante. Comparado con receptores trasplantados sin las células preincubadas, la reconstitución de los monocitos y los granulocitos se produjo antes de la reconstitución de los linfocitos (C).

La figura 6 muestra la puntuación de GvHD (que incluye el peso corporal según Cooke *et al.*, 1996) después del trasplante de BM/esplenocitos desde ratones TTG a ratones Balb/c con o sin una preincubación de los anticuerpos

5 anti-CD4. En los ratones que recibieron las células pretratadas, la puntuación de GvHD en los ratones que recibieron los anticuerpos fue menor que en los animales que recibieron médula ósea y esplenocitos sin un pretratamiento de los anticuerpos anti-CD4, lo cual indica que no se desarrolló GvHD. El injerto también se confirmó mediante análisis inmunohistológicos. En las cavidades de la médula ósea se produce una forma extendida de hematopoyesis en los animales trasplantados y un injerto estable de las células T que expresan CD4.

La figura 7 se refiere a experimentos que implican el injerto de CD4 humana, CD4 murina, y CD8 murina después del trasplante de BM/esplenocitos desde ratones TTG a ratones Balb/c sin una preincubación de los anticuerpos anti-CD4. Doce días después del trasplante, las células con CD4 humana, CD4 murina, y CD8 murina pueden detectarse de modo estable y los ratones desarrollaron una GvHD grave.

10 La figura 8 se refiere a experimentos que implican el injerto de HLA-DR3 humana y MHC murina de clase I de TTG/C57B1/6 de (H-2Kb) después del trasplante de BM/esplenocitos desde ratones TTG a ratones Balb/c sin una preincubación de los anticuerpos anti-CD4. Doce días después del trasplante, HLA-DR3 humana y MHC de clase I de TTG/C57B1/6 de H-2Kb y los ratones desarrollaron una GvHD grave.

15 La figura 9 se refiere a experimentos que implican el injerto de CD4 humana, CD8 murina, y una cantidad menor de CD4 murina de TTG/C57B1/6 de (H-2Kb) después del trasplante de BM/esplenocitos desde ratones TTG a ratones Balb/c con una preincubación de los anticuerpos anti-CD4. Después del trasplante puede observarse un injerto estable sin desarrollo de GvHD.

20 La figura 10 muestra la tasa de supervivencia después del trasplante de BM/esplenocitos desde ratones TTG a ratones Balb/c con o sin una preincubación de los anticuerpos anti-CD4. Utilizando un anticuerpo control de isotipo IgG1 no se observa el efecto preventivo de GvHD.

La figura 11 muestra ejemplos de vectores para la expresión de cadenas ligeras y pesadas modificadas en células de mamífero. dhfr es el gen de dihidrofolato reductasa empleado para la amplificación génica mediante la exposición de las células a concentraciones crecientes de metotrexato; CMV P es el promotor de IE de CMV.

25 La figura 12 muestra las secuencias de ADN y de aminoácidos de ejemplos de regiones variables de cadena pesada modificadas.

La figura 13 muestra las secuencias de ADN y de aminoácidos de ejemplos de regiones variables de cadena ligera modificadas.

La figura 14 muestra la unión relativa de un anticuerpo anti-CD4 humana quimérico, comparado con el anticuerpo anti-CD4 de ratón de origen.

30 La figura 15 muestra la unión relativa de ejemplos de anticuerpos anti-CD4 modificados, comparado con el anticuerpo anti-CD4 de ratón de origen y un anticuerpo anti-CD4 quimérico.

La figura 16 muestra la unión relativa de ejemplos de anticuerpos anti-CD4 modificados, comparado con el anticuerpo anti-CD4 de ratón de origen y un anticuerpo anti-CD4 quimérico.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

35 La presente invención, por ejemplo, se refiere al tratamiento *in vitro* de injertos de células que contienen células inmunológicas con anticuerpos, que evita su aplicación directa *in vivo*. Es decir, los presentes inventores pueden, por ejemplo, demostrar que (preferiblemente a corto plazo) la incubación de injertos de médula ósea con un anticuerpo anti-CD4 humana antes del trasplante de estos injertos de células que contienen células inmunológicas evita el desarrollo de GvHD después del trasplante, comparado con controles de isotipo o no tratados.

40 En oposición a los trabajos de la técnica anterior, el presente trabajo trata, por ejemplo, de la incubación a corto plazo de un injerto (de células madre), tal como suspensiones de células que contienen células T, en particular células CD4, con el objetivo de inducir tolerancia o inmunosupresión para evitar, por ejemplo, la enfermedad del hospedante contra el injerto ("Graft-versus-Host-Disease", GvHD).

45 Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, los presentes inventores consideran que la incubación con anticuerpos anti-CD4 de injertos (de células madre) que comprenden células CD4 positivas (inmunológicas) y la posterior retirada de los anticuerpos no unidos produce un injerto modificado, en el que las células marcadas con anticuerpos son inactivadas selectivamente por el anticuerpo o se preparan para que sean inactivadas o para que se conviertan en células reguladoras cuando se encuentren con el antígeno específico, de modo que no se inicie, por ejemplo, una GvHD. Se supone que el anticuerpo anti-CD4 se une a células inmunológicas (tales como linfocitos) que portan CD4 y, con ello, ejerce su efecto beneficioso. Además, se considera plausible que los anticuerpos anti-CD4 preferidos descritos en la presente muestren características particularmente ventajosas debido a su unión a uno o más epitopos específicos, por ejemplo, para preparar a la célula para su posterior inactivación.

50 Tal como será evidente para los expertos en la técnica, resulta ventajoso reducir sustancialmente o evitar la

administración de anticuerpos anti-CD4 libres, es decir, anticuerpos anti-CD4 que no están unidos a un antígeno localizado sobre el injerto. En general, se considera que la presente invención está relacionada con una o más de las siguientes ventajas: i) no son necesarias aplicaciones directas de los anticuerpos a los receptores; ii) una incubación a corto plazo del injerto, tal como suspensiones de células, tejidos y órganos que contienen células T, en particular células CD4; iii) prevención de una GvHD tras el trasplante del injerto de la invención; iv) prevención de otras complicaciones inmunológicas después del trasplante del injerto de la invención (por ejemplo, síndrome de liberación de citoquinas); v) reducción de los costes debido a poder evitar o reducir el uso de fármacos inmunosupresores convencionales y al uso de una cantidad significativamente reducida de anticuerpos, comparado con la aplicación sistémica; vi) mejora de la supervivencia de los pacientes que reciben un trasplante del injerto de la invención; vii) facilitar el trasplante de injertos también para pacientes, tales como pacientes ancianos, que pueden tener problemas con los injertos normales debido a complicaciones inmunológicas esperadas; y viii) el uso de donantes con HLA distintos para el trasplante o con HLA no óptimos que sin la invención no podrían utilizarse.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para modificar un injerto de células que contiene células inmunológicas para lograr una tolerancia dentro de las células inmunológicas trasplantadas frente al tejido de receptor tras el trasplante de dicho injerto modificado, en el que el método comprende las etapas de a) incubar un injerto de células que contiene células inmunológicas con un anticuerpo anti-CD4, en especial cuando dicha incubación se realiza durante 1 minuto a 7 días, b) retirar el anticuerpo no unido de dicho injerto mediante el lavado de dicho injerto, en el que dicho injerto comprende células inmunológicas que portan el antígeno CD4, y en el que dichos anticuerpos anti-CD4 se unen del 40% al 100% de los epitopos de CD4 accesibles de dicho injerto modificado.

En general, los anticuerpos, y también los anticuerpos anti-CD4, son muy conocidos en la técnica. Tal como se emplea en la presente, un "anticuerpo" significa, entre otras cosas, una proteína de la familia de las inmunoglobulinas que es capaz de combinarse, interactuar o asociarse específicamente de otro modo con un antígeno, en la que dicha combinación, interacción o asociación realizada de otro modo (tal como unión) del anticuerpo con el antígeno está mediada por regiones determinantes de la complementariedad ("complementarity-determining regions", CDR).

De modo similar, el término "antígeno" se emplea en la presente para indicar una sustancia que es capaz de combinarse, interactuar o asociarse específicamente de otro modo con dicho anticuerpo. En el contexto del anticuerpo anti-CD4 de la presente invención, el antígeno es CD4, en particular CD4 humana.

Tal como se emplea en la presente, el término "CDR" se refiere a la "región determinante de la complementariedad" de un anticuerpo, es decir, una de las regiones hipervariables dentro de un dominio variable de inmunoglobulina que contribuye a la determinación de la especificidad del anticuerpo. Las CDR son muy conocidas por los expertos en la técnica. Generalmente, tanto el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada como el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera contienen tres CDR.

En el contexto de la presente invención, se considera que el término "anticuerpo" también se relaciona con fragmentos de anticuerpos, que incluyen, por ejemplo, fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂. Dichos fragmentos pueden prepararse por medio de métodos convencionales (por ejemplo, Coligan *et al.*, 1991-1997). La presente invención también contempla las diversas formas recombinantes de especies moleculares derivadas de anticuerpos conocidas en la técnica. Estas especies incluyen fragmentos Fv estabilizados, que incluyen formas de Fv monocatenarias (por ejemplo, scFv) que comprenden un conector peptídico que une los dominios VH y VL, o un Fv estabilizado mediante un enlace disulfuro intercatenario (dsFv) y que contiene restos cisteína adicionales modificados para que faciliten la unión de los dominios VH y VL. De igual forma, otras composiciones son conocidas en la técnica y pueden incluir especies denominadas "minicuerpos" y "dAb" de dominio variable único. Otras especies además pueden incorporar medios para aumentar la valencia del dominio de región V del anticuerpo modificado, concretamente especies que tienen múltiples sitios de unión del antígeno, por ejemplo, modificando los dominios de dimerización (por ejemplo, "cremalleras de leucina") o también estrategias de modificación química. Además, el término "anticuerpo" también se refiere a multímeros de scFv, tales como diacuerpos, triacuerpos o tetracuerpos, tandabs, flexicuerpos, anticuerpos biespecíficos y anticuerpos quiméricos, todos ellos conocidos en la técnica. Tal como se emplean en la presente, se considera que los anticuerpos también incluyen cualquier anticuerpo bivalente o multivalente. También incluyen cualquier derivado de anticuerpo y cualquier otro derivado conocido por los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En realizaciones preferidas, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

Según la invención, la expresión "anticuerpo anti-CD4" se refiere a un anticuerpo que tiene la capacidad para unirse a CD4. Preferiblemente, el anticuerpo anti-CD4 es un anticuerpo anti-CD4 humana. "CD4" o "agrupación de diferenciación 4" se refiere a una proteína, de modo más preciso una glicoproteína de superficie, muy conocida por los expertos en la técnica (cf. Bowers *et al.*, 1997). En el presente contexto, CD4 también puede indicar un fragmento de una CD4 de longitud completa o una forma modificada de otro modo de CD4, con la condición de que el fragmento o la forma modificada de otro modo siga actuando como antígeno en el contexto del anticuerpo para su uso en la presente invención.

Los anticuerpos anti-CD4 preferidos se seleccionan del grupo que consiste en Max16H5, OKT4A, OKTcdr4a, cMT-412, YHB.46. Lo más preferiblemente, dicho anticuerpo es Max16H5. Las células para la producción de Max16H5 se han depositado en ECACC (European Collection of Cell Cultures) con el número de registro ECACC 88050502. Dicho anticuerpo también se describe en el documento DE 3919294. Tal como se emplea en la presente, el anticuerpo "Max16H5" también puede denominarse "Max.16H5", "MAX16H5" o "MAX.16H5", o también "30F16H5" (este último nombre también es el nombre de las células depositadas que producen dicho anticuerpo). Max.16H5 también puede obtenerse de la línea celular MAX.16H5/30F16H5.

Otro anticuerpo anti-CD4 preferido para su uso en la invención es 16H5.chimIgG4. Tal como se emplea en la presente, dicho anticuerpo también puede denominarse "16H5.chim" o "CD4.16H5.chimIgG4" (en el que este último nombre también es el nombre de las células depositadas que producen dicho anticuerpo). El 16H5.chimIgG4 puede obtenerse a partir de la línea celular CD4.16H5.chimIgG4.

En detalle, ciertos anticuerpos anti-CD4 preferidos en el contexto de la presente invención pueden obtenerse, por ejemplo, en cualquiera de los siguientes depósitos de material biológico:

- depósito de the European Collection of Cell Cultures con el número de registro ECACC 88050502;
- depósito "MAX.16H5/30F16H5", depositado en DSMZ el 2 de diciembre de 2011;
- depósito "CD4.16H5.chimIgG4", depositado en DSMZ el 2 de diciembre de 2011.

Todos estos depósitos consisten en células o líneas celulares, respectivamente, a partir de las cuales pueden obtenerse anticuerpos anti-CD4 concretos en el contexto de la presente invención. El depósito ECACC 88050502 también se describe, por ejemplo, en la solicitud DE 3919294.

En algunas realizaciones del método, del injerto modificado o del injerto modificado para el uso de la invención, dicho anticuerpo anti-CD4 i) se selecciona del grupo que consiste en Max16H5, OKT4A, OKTcdr4a, cMT-412, YHB.46, en particular cuando dicho anticuerpo anti-CD4 es Max16H5 y/o ii) es el anticuerpo 30F16H5 y/o iii) puede obtenerse a partir de una línea celular depositada con el número de registro ECACC 88050502 y/o iv) puede obtenerse a partir de una línea celular MAX.16H5/30F16H5 depositada en DSMZ el 2 de diciembre de 2011 y/o v) es el anticuerpo 16H5.chimIgG4 y/o vi) puede obtenerse a partir de una línea celular CD4.16H5.chimIgG4 depositada en DSMZ el 2 de diciembre de 2011 y/o vii) es un anticuerpo que comprende el VH y el VK del anticuerpo 16H5.chimIgG4 y/o viii) es un anticuerpo que comprende un VH y un VK de un anticuerpo que puede obtenerse a partir de una línea celular CD4.16H5.chimIgG4 depositada en DSMZ el 2 de diciembre de 2011 y/o ix) es un anticuerpo que comprende cualquier combinación de un VH de los descritos en la figura 12, y de un VK de los descritos en la figura 13, en particular en la que dicha combinación se selecciona de VH1/VK1, VH2/VK2, VH4/VK2 y VH4/VK4, en especial en la que dicha combinación es VH2/VK2.

En realizaciones concretas, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención es "MAX.16H5". En realizaciones concretas, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención es un anticuerpo que puede obtenerse a partir de células de ECACC 88050502. En realizaciones concretas, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención es un anticuerpo que puede obtenerse a partir de un depósito de material biológico realizado por los solicitantes en DSMZ el 2 de diciembre de 2011. En realizaciones concretas, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención es un anticuerpo que puede obtenerse a partir de células depositadas por los solicitantes en DSMZ el 2 de diciembre de 2011. En realizaciones concretas, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención es un anticuerpo que puede obtenerse a partir de un depósito en the European Collection of Cell Cultures que tiene el número de registro ECACC 88050502. En realizaciones concretas, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención es un anticuerpo que puede obtenerse a partir de células "MAX.16H5/30F16H5" depositadas en DSMZ el 2 de diciembre de 2011. En realizaciones concretas, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención es un anticuerpo que puede obtenerse a partir de células "CD4.16H5.chimIgG4" depositadas en DSMZ el 2 de diciembre de 2011. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende VH1 de la figura 12. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende VH2 de la figura 12. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende VH4 de la figura 12. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende VK1 de la figura 13. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende VK2 de la figura 13. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende VK4 de la figura 13. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende SEQ ID NO:10. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende SEQ ID NO:8. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende SEQ ID NO:4. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende SEQ ID NO:20. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende SEQ ID NO:18. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende SEQ ID NO:14. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende VH1 de la figura 12 y/o VK1 de la figura 13. En algunas realizaciones particularmente preferidas, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende VH2 de la figura 12 y/o VK2 de la figura 13. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende VH4 de la figura 12 y/o VK2 de la figura 13. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende VH4 de la figura 12 y/o VK4 de la figura 13. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende SEQ ID NO:10 y/o

SEQ ID NO:20. En algunas realizaciones particularmente preferidas, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende SEQ ID NO:8 y/o SEQ ID NO:18. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende SEQ ID NO:4 y/o SEQ ID NO:18. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende SEQ ID NO:4 y/o SEQ ID NO:14.

- 5 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende el VH y el VK del anticuerpo 16H5.chimlgG4. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención comprende las CDR de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:12. En otras realizaciones preferidas, el anticuerpo anti-CD4 para su uso en la invención es un anticuerpo anti-CD4 de un aspecto adicional de la invención descrito en detalle a continuación o está de acuerdo con dicho aspecto adicional. Preferiblemente, dicho anticuerpo anti-CD4 es como se describe en sus realizaciones, y se prefieren particularmente las realizaciones preferidas. En general, el anticuerpo anti-CD4 usado en la invención puede ser cualquier anticuerpo anti-CD4 descrito en la presente.

En ciertas realizaciones preferidas, el anticuerpo anti-CD4 se selecciona de anticuerpos que reconocen el primer y/o el segundo dominio de las moléculas de CD4. En ciertas realizaciones preferidas, el anticuerpo anti-CD4 se selecciona de anticuerpos que reconocen el mismo dominio o dominios de las moléculas de CD4 que Maxl6H5.

- 15 Tal como se emplea en la presente, un "anticuerpo no unido" se refiere a un anticuerpo que, tras la etapa de incubación, no se une al injerto. En otras palabras, se refiere a un anticuerpo que no está fundamentalmente asociado con sus ligandos sobre el injerto.

- 20 Tal como se emplea en la presente, un "método *in vitro*" se refiere a un método que se lleva a cabo fuera de un sujeto vivo. En particular también incluye un "método *ex vivo*", tal como el caso en que el injerto comprende o es un tejido o un órgano, pero en particular excluye un "método *in vivo*" llevado a cabo dentro de un sujeto vivo.

- 25 Preferiblemente, según la invención, la incubación (la etapa de incubación) se realiza durante un tiempo suficiente para permitir la unión de dicho anticuerpo a dicho injerto. Preferiblemente, dicha incubación se realiza durante un tiempo suficiente para permitir la unión de los anticuerpos anti-CD4 del 40% al 100%, en particular del 50% al 100%, en particular del 60% al 100%, en particular del 70% al 100%, más en particular del 80% al 100%, más en particular del 90% al 100%, más en particular del 95% al 100%, más en particular del 99% al 100% de los epitopos de CD4 accesibles de dicho injerto. Lo más preferiblemente, después de dicha incubación, los anticuerpos anti-CD4 se unen fundamentalmente a todos los epitopos de CD4 accesibles de dicho injerto.

- 30 Los expertos en la técnica pueden determinar con facilidad un periodo de incubación apropiado. Habitualmente un periodo de incubación apropiado dependerá del tipo de injerto usado. Un periodo de incubación preferido también puede depender de la cantidad de anticuerpo usado. En general, cuando el injerto es, por ejemplo, una suspensión de células, será necesario un periodo de incubación más corto que cuando el injerto sea, por ejemplo, un órgano.

En general, cuando el injerto comprende o es un tejido o un órgano, se prefieren unos periodos de incubación más largos para permitir que el anticuerpo sea transportado, por ejemplo, mediante difusión, hacia el interior de los respectivos compartimentos.

- 35 Además, en cualquier caso, los expertos en la técnica pueden ensayar con facilidad la unión (el estado de la unión) de los anticuerpos anti-CD4 según métodos muy conocidos en la técnica que pueden implicar, por ejemplo, una citometría de flujo.

En general, se prefieren unos periodos de incubación cortos frente a unos periodos de incubación largos para minimizar cualquier posible daño al injerto debido al procesamiento *in vitro*.

- 40 Según la invención, dicha incubación se realiza durante 1 minuto a 7 días. En algunas realizaciones, dicha incubación se realiza de 1 a 150 minutos, en particular de 10 minutos a 150 minutos, más en particular de 30 minutos a 150 minutos, más en particular de 40 minutos a 120 minutos, más en particular de 45 minutos a 90 minutos, en especial de 50 minutos a 70 minutos. En otras realizaciones, dicha incubación se realiza de 150 minutos a 7 días, en particular de 150 minutos a 5 días, más en particular de 150 minutos a 3 días, más en particular de 150 minutos a 1 día, en especial de 150 minutos a 8 horas.

Con respecto a la retirada del anticuerpo (anti-CD4) no unido según los métodos y usos de la invención, la retirada del anticuerpo no unido del injerto se realiza lavando el injerto. El lavado puede realizarse, por ejemplo, empleando una centrifugación, en la que el injerto comprende o es una suspensión de células.

- 50 En la etapa de la retirada, preferiblemente al menos 40%, más en concreto al menos 50%, más en concreto al menos 60%, más en concreto al menos 70%, más en concreto al menos 80%, más en concreto al menos 90% del anticuerpo (anti-CD4) no unido se retira del injerto. Preferiblemente, hasta 100% del anticuerpo (anti-CD4) no unido se retira del injerto.

- 55 La cantidad de anticuerpo empleada en la anterior etapa de incubación no está particularmente limitada. Los expertos en la técnica pueden determinar con facilidad las cantidades apropiadas y estas pueden depender, por ejemplo, del tipo de injerto usado. Preferiblemente según la invención, dicha incubación se realiza con una cantidad

de anticuerpo de 0,1 µg a 100 mg.

En algunas realizaciones, en particular cuando el injerto es una suspensión de células, dicha incubación se realiza con una concentración de anticuerpo de 0,1 µg/ml de suspensión de células a 150 µg/ml de suspensión de células, en particular de 7 µg/ml de suspensión de células a 100 µg/ml de suspensión de células, más en concreto de 30 µg/ml de suspensión de células a 100 µg/ml de suspensión de células, en especial de 40 µg a 60 µg/ml de suspensión de células.

5

En algunas realizaciones, en particular cuando el injerto es un tejido o cuando el injerto es un órgano, dicha incubación se realiza con una concentración de anticuerpo de 0,1 mg a 10 mg, en particular de 1 mg a 10 mg, más en particular de 2 mg a 9 mg, más en particular de 3 mg a 8 mg, en especial de 4 mg a 6 mg.

10 En algunas realizaciones, en particular cuando el injerto es un tejido o cuando el injerto es un órgano, dicha incubación se realiza con una concentración de anticuerpo en la disolución de incubación de 0,1 mg/ml a 10 mg/ml, en concreto de 1 mg/ml a 10 mg/ml, más en concreto de 2 mg/ml a 9 mg/ml, más en concreto de 3 mg/ml a 8 mg/ml, en especial de 4 mg/ml a 6 mg/ml. Preferiblemente, el volumen especificado incluye el volumen de dicho tejido u órgano, así como el volumen de la disolución (que contiene anticuerpos) en la que dicho tejido u órgano se incubaba.

15 En algunas realizaciones, en particular cuando el injerto es un tejido o cuando el injerto es un órgano, dicha incubación se realiza incubando dicho tejido u órgano en una disolución que tiene una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml a 150 µg/ml, en concreto de 20 µg/ml a 100 µg/ml, más en concreto de 30 µg/ml a 100 µg/ml, en especial de 40 µg/ml a 60 µg/ml. Preferiblemente, el volumen especificado incluye el volumen de dicho tejido u órgano, así como el volumen de la disolución (que contiene anticuerpos) en la que dicho tejido u órgano se incubaba.

20 Cuando se incuban tejidos y/u órganos con una disolución que contiene anticuerpos, los expertos en la técnica realizarán con facilidad dicha incubación, tal como por medio de un recipiente adecuado.

La selección de cantidades adecuadas de anticuerpo también se encuentra dentro de los conocimientos de los expertos en la técnica. En general, se prefieren unas cantidades o concentraciones mayores, respectivamente, de anticuerpo cuando el injerto comprende o es un tejido o un órgano. Además, la selección de una cantidad o una concentración exacta, respectivamente, de anticuerpo utilizado también dependerá del tamaño de dicho tejido u órgano.

25

En realizaciones preferidas, el anterior uso o método *in vitro* se realiza para reducir la probabilidad de uno cualquiera del grupo que consiste en GvHD, rechazo del injerto por el donante, y rechazo de órganos, en particular, de GvHD, tras el trasplante de dicho injerto. En realizaciones preferidas, el anterior uso o método *in vitro* se realiza para lograr una tolerancia dentro de las células inmunocompetentes trasplantadas frente al tejido del receptor tras el trasplante de dicho injerto modificado. En realizaciones preferidas, el anterior uso o método *in vitro* se realiza para lograr una tolerancia o una tolerancia parcial dentro del tejido del receptor frente al injerto modificado tras el trasplante de dicho injerto modificado. Tal como se emplea en la presente, una "tolerancia parcial" es una inmunotolerancia parcial que produce una respuesta inmunológica reducida. En realizaciones preferidas, el anterior uso o método *in vitro* se realiza para silenciar la activación de células dentro de dicho injerto.

30

Los injertos que incluyen injertos de células que contienen células inmunológicas son muy conocidos por los expertos en la técnica. Tal como se emplea en la presente, un "injerto de células que contiene células inmunológicas" es un injerto que comprende células inmunológicas. El injerto de células que contiene células inmunológicas no está particularmente limitado.

40 Según la presente invención, el injerto puede comprender una suspensión de células, un tejido y/o un órgano. Preferiblemente, el injerto es una suspensión de células, un tejido y/o un órgano. Más preferiblemente, el injerto se selecciona del grupo que consiste en una suspensión de células, un tejido y un órgano.

Además, en algunas realizaciones preferidas de la invención, el injerto comprende células madre. Un injerto que comprende células madre también puede denominarse en la presente un injerto de células madre.

45 Según la presente invención, el injerto comprende células inmunológicas que portan el antígeno CD4. El injerto comprende células inmunológicas, en particular células inmunológicas que portan el antígeno CD4. Estas células son muy conocidas por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones preferidas, estas células inmunológicas son linfocitos T CD4 positivos o sus células precursoras. En ciertas realizaciones preferidas, estas células inmunológicas incluyen, pero no se limitan a células T auxiliares y células que pertenecen al linaje de monocitos y macrófagos, tales como monocitos y macrófagos. Otro ejemplo de dichas células son las células microgliales.

50

En algunas realizaciones, dicho injerto comprende y preferiblemente es un tejido, preferiblemente un tejido que contiene células madre. Según la presente invención, los tejidos adecuados incluyen, pero no se limitan a sangre, músculo, tejido adiposo, tejido conectivo, epitelio, tejido embrionario y celular.

En otras realizaciones, dicho injerto comprende y preferiblemente es un órgano, preferiblemente un órgano que contiene células madre. Los órganos adecuados incluyen, pero no se limitan a piel, intestino, riñón e hígado.

55

Preferiblemente, dicho órgano es un intestino.

5 En realizaciones preferidas, dicho injerto comprende y preferiblemente es una suspensión de células, preferiblemente una suspensión de células que contiene células madre. Las suspensiones de células adecuadas y los métodos para obtenerlas son muy conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede obtenerse un injerto de suspensión de células mediante la punción de huesos que comprenden médula ósea, por ejemplo, la punción de las crestas ilíacas o del esternón, o se extraen de nichos de células madre a lo largo de todo el cuerpo, por ejemplo, tejido graso, raíz dental, raíz del pelo y cualquier otra fuente mencionada anteriormente.

10 En realizaciones preferidas, la suspensión de células, en particular la suspensión de células que contiene células madre, comprende células de la médula ósea, células de la médula ósea no adherentes, células de sangre periférica, células de sangre del cordón umbilical, células procedentes de la gelatina de Wharton, células derivadas de la placenta, células derivadas de la raíz del pelo y/o células derivadas de tejido graso. En realizaciones preferidas, la suspensión de células, en particular la suspensión de células que contiene células madre, comprende linfocitos, monocitos y/o macrófagos.

15 En ciertas realizaciones preferidas, el injerto, en particular la suspensión de células, comprende cualquiera de células madre de la médula ósea, células madre de sangre periférica, células madre de sangre del cordón umbilical, células madre adultas de la médula ósea, tales como NA-BMC, células madre embrionarias y/o células madre adultas reprogramada (es decir, células pluripotentes inducidas). En algunas realizaciones concretas, el injerto no consiste o no comprende células madre embrionarias. En algunas realizaciones concretas, el injerto no consiste o no comprende células madre totipotentes.

20 En realizaciones preferidas, el injerto es una suspensión de médula ósea, que en particular comprende células madre de médula ósea. En general, el injerto, en particular la suspensión de médula ósea, puede comprender además cualquiera de las células madre comprendidas en células sanguínea, células de la sangre del cordón umbilical, linfocitos de donante, células madre de sangre periférica, células madre adultas de la médula ósea, células madre embrionarias y/o células madre adultas reprogramada (es decir, células pluripotentes inducidas).

25 El injerto, en particular la suspensión de médula ósea, puede comprender además cualquiera de las células madre comprendidas en células sanguíneas, células de la sangre del cordón umbilical, linfocitos de donante, células madre de sangre periférica y/o células madre adultas de la médula ósea.

30 En general, se pretende que la suspensión de células incluya también cualquier suspensión de células que comprenda células madre (cualquier combinación de células madre), opcionalmente junto con otras células (cualquier combinación de células).

El injerto también puede ser una combinación de injertos, tal como una combinación de uno o más de los injertos indicados anteriormente, por ejemplo, una combinación de un órgano y una suspensión de células.

35 En otro aspecto, la invención se refiere a un injerto de células modificado que contiene células inmunológicas que pueden obtenerse según un método *in vitro* de la invención, y en el que dicho injerto comprende anticuerpos anti-CD4 unidos del 40% al 100% de los epitopos de CD4 accesibles de dicho injerto, y en el que dicho injerto comprende células madre, y en el que dicho injerto comprende células inmunológicas que portan el antígeno CD4.

40 Preferiblemente, el injerto de células modificadas que contiene células inmunológicas comprende anticuerpos anti-CD4 unidos del 50% al 100%, en particular del 60% al 100%, en particular del 70% al 100%, más en particular del 80% al 100%, más en particular del 90% al 100%, más en particular del 95% al 100%, más en particular del 99% al 100% de los epitopos de CD4 accesibles de dicho injerto. Lo más preferiblemente, casi todos los epitopos de CD4 accesibles del injerto de células que contiene células inmunológicas están unidos a anticuerpos anti-CD4.

En otro aspecto, la invención se refiere a un injerto modificado de la invención para su uso en medicina.

En otro aspecto, la invención se refiere a un injerto modificado de la invención para su uso en un método para tratar, en un sujeto, una o más enfermedades que pueden tratarse mediante trasplante.

45 El uso de injertos que incluyen injertos de células que contienen células inmunológicas en el trasplante es muy conocido en la técnica. La presente invención proporciona un injerto modificado cuyo objetivo es evitar los efectos secundarios graves que están asociados con el trasplante, tal como se conoce en la técnica. Por tanto, los injertos modificados de la invención se emplean tal como se conoce para los injertos no modificados.

50 Preferiblemente, dicho sujeto es un sujeto mamífero, en particular un ser humano. Preferiblemente, dichas una o más enfermedades que pueden tratarse mediante un trasplante se seleccionan del grupo que consiste en leucemia mieloide aguda (LMA); leucemia linfocítica aguda (LLA); leucemia mieloide crónica (LMC); síndrome mielodisplásico (SMD)/síndrome mieloproliferativo; linfomas malignos, en particular seleccionados de enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano (LNH) de grado alto, linfoma de las células del manto (LCM), LNH maligno de grado bajo, leucemia linfática crónica (LLC), mieloma múltiple; anemia aplásica grave; talasemia; anemia de células falciformes; defectos inmunológicos seleccionados, en particular, de inmunodeficiencia combinada grave (IDCG), síndrome de

Wiskott-Aldrich (SWA), y linfocitosis hemofagocítica (LHH); errores congénitos del metabolismo seleccionados, en particular, de trastornos del almacenamiento lisosómico y trastornos de la función peroxisómica; enfermedades autoinmunitarias; enfermedades reumatológicas; y recaídas de cualquiera de los anteriores.

5 Aún más preferiblemente, dichas una o más enfermedades son una o más malignidades hematológicas especialmente seleccionadas de leucemia mieloide aguda (LMA); leucemia linfocítica aguda (LLA); leucemia mieloide crónica (LMC); síndrome mielodisplásico (SMD)/síndrome mieloproliferativo; linfomas malignos, en particular seleccionados de enfermedad de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano (LNH) de grado alto, linfoma de las células del manto (LCM), linfoma no hodgkiniano (LNH) maligno de grado bajo, leucemia linfática crónica (LLC), mieloma múltiple; anemia aplásica grave; talasemia; y anemia de células falciformes.

10 En general en la presente, dichas una o más enfermedades también incluyen recaídas de cualquiera de las anteriores, así como cualquier combinación de las enfermedades mencionadas en la presente.

15 En los últimos aspectos mencionados, preferiblemente el injerto se define también como se ha descrito anteriormente en la presente en conexión con los métodos *in vitro* de la invención. Es decir, el injerto puede seleccionarse preferiblemente del grupo que consiste en una suspensión de células, un tejido y un órgano. Más preferiblemente, dicho injerto se selecciona del grupo que consiste en una suspensión de células que comprende células de la médula ósea, células de la médula ósea no adherentes, células de sangre periférica, células de sangre del cordón umbilical, células procedentes de la gelatina de Wharton, células derivadas de la placenta, células derivadas de la raíz del pelo y/o células derivadas de tejido graso; una suspensión de células que comprende linfocitos, monocitos y/o macrófagos; un tejido que contiene células madre; y un órgano que contiene células madre.

20 En algunas realizaciones, el tratamiento implica la reducción en la probabilidad de desarrollar uno cualquiera del grupo que consiste en GvHD, rechazo del injerto por el donante, y rechazo de órganos, en particular, de GvHD, tras el trasplante de dicho injerto. En otras realizaciones, el tratamiento implica lograr una tolerancia dentro de las células inmunocompetentes trasplantadas frente al tejido del receptor tras el trasplante de dicho injerto modificado. En otras realizaciones, el tratamiento implica lograr una tolerancia frente al injerto modificado tras el trasplante de dicho injerto modificado. En otras realizaciones, el tratamiento implica lograr una tolerancia o una tolerancia parcial dentro del tejido del receptor frente al injerto modificado tras el trasplante de dicho injerto modificado. En otras realizaciones, el tratamiento se realiza para silenciar la activación de células dentro de dicho injerto. En realizaciones preferidas, el tratamiento implica/es para cualquier combinación de lo anterior.

30 La cantidad de células contenidas en el injerto no está particularmente limitada. Cualquier experto en la técnica será capaz de elegir con facilidad las cantidades apropiadas de un injerto y de las células del injerto para el trasplante. Además, también están disponibles indicaciones adecuadas, por ejemplo, a partir de las indicaciones específicas para el trasplante desarrolladas por "Deutsche Bundesärztekammer", por ejemplo, para células madre hematopoyéticas humanas en pacientes.

35 Preferiblemente, según la invención, en particular en el caso de que el injerto sea una suspensión de células, se administra una cantidad de 2×10^6 células a 2×10^{10} células nucleadas, en particular de 4×10^6 a 1×10^9 células nucleadas, más en particular de 1×10^7 a 1×10^8 células nucleadas a dicho sujeto, preferiblemente al sujeto humano.

40 Cuando el injerto comprende o es un tejido o un órgano, puede administrarse cualquier cantidad adecuada de dicho tejido u órgano a dicho sujeto. Tal como entenderán los expertos en la técnica, el número de células en tejidos u órganos resulta difícil de determinar. En particular por esta razón, la cantidad de células contenidas en el injerto no está particularmente limitada. Los expertos en la técnica pueden determinar o seleccionar, respectivamente, las cantidades apropiadas, por ejemplo, tomando en cuenta el tipo concreto de sujeto, injerto y/o enfermedad que se va a tratar. En el caso de órganos, se prefiere la administración de órganos completos.

45 En los métodos, los injertos modificados y los injertos modificados para el uso de la presente invención, el injerto puede incubarse además con moléculas bioactivas solubles, en particular con agentes que estimulan la inmunosupresión, la intolerancia y/o la formación de células T reguladoras o con cualquier combinación de dichos agentes. Estos agentes preferiblemente apoyan las características o ventajas, respectivamente, de los presentes métodos, usos, injertos modificados o injertos modificados para el uso descrito anteriormente, tales como para reducir la probabilidad de uno cualquiera del grupo que consiste en GvHD, rechazo del injerto por el donante, y rechazo de órganos, en particular, de GvHD, tras el trasplante de dicho injerto, o tales como lograr una tolerancia tras el trasplante de dicho injerto modificado. Dichos agentes incluyen, en particular, las citoquinas. En realizaciones preferidas, dicho agente o agentes se seleccionan del grupo que consiste en IL-2, TGF- β , rapamicina, ácido retinoico, ligando 4-1BB, y anticuerpos anti-CD28, o cualquiera de sus combinaciones.

55 De modo similar, en los injertos modificados para el uso de la presente invención, el injerto opcionalmente puede administrarse al sujeto junto con cualquier medicamento o combinación de medicamentos. Dichos uno o más medicamentos pueden administrarse antes, junto con el trasplante y/o después del trasplante. Los modos y vías de administración adecuados no están particularmente limitados y los expertos en la técnica podrán elegirlos con facilidad. Preferiblemente, dichos uno o más medicamentos apoyan las características o ventajas, respectivamente,

de los presentes métodos, usos, injertos modificados o injertos modificados para el uso descrito anteriormente, tales como para reducir la probabilidad de uno cualquiera del grupo que consiste en GvHD, rechazo del injerto por el donante, y rechazo de órganos. Los ejemplos no limitantes de dichos medicamentos incluyen rapamicina y ácido retinoico.

- 5 En otro aspecto, la descripción incluye un método para tratar a un sujeto que necesita dicho tratamiento con un injerto modificado de la invención, en particular un injerto modificado que se obtiene según el método *in vitro* de la invención. Se describe que dicho injerto, sujeto, tratamiento y/o enfermedad son como se describió anteriormente.

10 En otro aspecto, la descripción se refiere al uso de un anticuerpo anti-CD4 para la modificación *in vitro* de un injerto, en particular un injerto de células que contiene células inmunológicas, y dicha modificación comprende incubar dicho injerto con dicho anticuerpo durante 1 minuto a 7 días, en especial cuando la modificación comprende además retirar el anticuerpo no unido de dicho injerto. Se describe que dicho uso se define más a fondo como se describe en la presente para los métodos de la invención.

15 En otro aspecto, la descripción se refiere al uso de un injerto modificado de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una o más enfermedades que pueden tratarse mediante trasplante en un sujeto. Se describe que dicho uso se define más a fondo como se describe en la presente para los métodos de la invención. En particular, el injerto, sujeto, tratamiento y/o enfermedad son preferiblemente como se describió anteriormente.

20 En otro aspecto de los métodos, usos, injertos modificados o injertos modificados par el uso de la presente descripción, el anticuerpo anti-CD4 se reemplaza por cualquier otro ligando de CD4. Los ligandos de CD4 preferidos incluyen, pero no se limitan a ligandos de péptidos (que incluyen ligandos de péptidos naturales y construcciones de péptidos), así como aptámeros. Estos ligandos de CD4 son conocidos en la técnica.

25 En otro aspecto, el injerto mencionado en los métodos de la presente invención puede o no comprender células madre. Es decir, según el último aspecto, el injerto de células que contiene células inmunológicas puede ser reemplazado por cualquier injerto e incluye un injerto que comprende células madre, así como un injerto que no comprende células madre. El injerto modificado de la invención o usado según la invención comprende células madre. En ciertas realizaciones, el injerto no comprende células CD4+ aisladas.

30 Tal como se describe más a fondo en los ejemplos, los presentes inventores emplearon, por ejemplo, ratones CD4-/C57B1/6 transgénicos para CD4 y HLA-DR3 humanas (ratones transgénicos triples, TTG; cf. Laub *et al.*, 2000). Los ratones TTG tienen un sistema inmunológico murino completo funcional, pero sin CD4 murina y con CD4 humana, y además de las moléculas MHCII murinas, está presente la HLA-DR3 humana. En este escenario, las células de médula ósea pueden considerarse injertos de TTG y pueden incubarse con anticuerpos anti-CD4 humana antes del trasplante en ratones Balb/c de tipo salvaje. En este modelo de trasplante de desaparreamiento total de MHC de clase I es muy probable la inducción de una GvHD y constituye un reto para el anticuerpo anti-CD4.

35 El injerto de células donantes de TTG/C57B16 en ratones Balb/c se confirmó mediante citometría de flujo. El injerto estable de H-2Kd (C57B1/6), CD4 humana, HLA-DR, y una cantidad menor de CD4 murina después del trasplante indica una hematopoyesis completa del donante (TTG), que se observó por primera vez 12 días después del trasplante. La GvHD fue confirmada por los análisis de la supervivencia, el sistema de puntuación y la histología. La gravedad de la GvHD fue mayor empleando las células del donante TTG que las células de donante de C57B1/6 de tipo salvaje. La supervivencia de los ratones con GvHD tratados con el anticuerpo anti-CD4 aumentó significativamente del 0 al 83%. Sin tratamiento con anticuerpos, los ratones con GvHD murieron dentro de 19-35 días. El uso de anticuerpos anti-CD4 suprime con eficacia el desarrollo de GvHD después de un HSCT murino en un modelo de desaparreamiento total de MHC (ratones TTG en ratones Balb/c). Este modelo de trasplante exclusivo permite el ensayo directo de los anticuerpos anti-CD4 humana en ratones por medio de un modelo de GvHD murino estable que emplea ratones TTG como donantes. No se produjo inducción de GvHD después de un pretratamiento con anti-CD4 humana de injertos de médula ósea procedentes de ratones TTG. Estos descubrimientos se consideran pertinentes para el perfeccionamiento de las estrategias para la supresión de clones de células T reactivas.

40 En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo anti-CD4, seleccionado del grupo que consiste en i) anticuerpo 16H5.chimlgG4; ii) un anticuerpo que puede obtenerse a partir de una línea celular CD4.16H5.chimlgG4 depositada en DSMZ el 2 de diciembre de 2011; iii) un anticuerpo que comprende el VH y el VK de un anticuerpo 16H5.chimlgG4; iv) un anticuerpo que comprende un VH y un VK de un anticuerpo que puede obtenerse a partir de una línea celular CD4.16H5.chimlgG4 depositada en DSMZ el 2 de diciembre de 2011; v) un anticuerpo que comprende una combinación de un VH de los descritos en la figura 12, y de un VK de los descritos en la figura 13, en la que dicha combinación se selecciona de VH1/VK1, VH2/VK2, VH4/VK2 y VH4/VK4, en especial en la que dicha combinación es VH2/VK2.

55 En realizaciones concretas de este otro aspecto adicional, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción es "MAX.16H5". En realizaciones concretas, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción es un anticuerpo que puede obtenerse a partir de un depósito de material biológico realizado por los solicitantes en DSMZ el 2 de diciembre de 2011. En realizaciones concretas, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción es un anticuerpo que puede obtenerse a partir de

células depositadas por los solicitantes en DSMZ el 2 de diciembre de 2011. En realizaciones concretas, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción es un anticuerpo que puede obtenerse a partir de las células "MAX.16H5/30F16H5" depositadas en DSMZ el 2 de diciembre de 2011. En realizaciones concretas, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción es un anticuerpo que puede obtenerse a partir de células "CD4.16H5.chimlgG4" depositadas en DSMZ el 2 de diciembre de 2011. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción comprende VH1 de la figura 12. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción comprende VH2 de la figura 12. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción comprende VH4 de la figura 12. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción comprende VK1 de la figura 13. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción comprende VK2 de la figura 13. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción comprende VK4 de la figura 13. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción comprende SEQ ID NO:10. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción comprende SEQ ID NO:8. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción comprende SEQ ID NO:4. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción comprende SEQ ID NO:20. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción comprende SEQ ID NO:18. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción comprende VH1 de la figura 12 y/o VK1 de la figura 13. En algunas realizaciones particularmente preferidas, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción comprende VH2 de la figura 12 y/o VK2 de la figura 13. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción comprende VH4 de la figura 12 y/o VK2 de la figura 13. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción comprende VH4 de la figura 12 y/o VK4 de la figura 13. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción comprende SEQ ID NO:10 y/o SEQ ID NO:20. En algunas realizaciones particularmente preferidas, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción comprende SEQ ID NO:8 y/o SEQ ID NO:18. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción comprende SEQ ID NO:4 y/o SEQ ID NO:18. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción comprende SEQ ID NO:4 y/o SEQ ID NO:14. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD4 de la descripción comprende el VH y el VK del anticuerpo 16H5.chimlgG4.

En general, la invención también se refiere a realizaciones en las que el término "comprende", o un término equivalente, es reemplazado por "tiene", o un término equivalente. Por ejemplo, la invención en general también se refiere a realizaciones en las que el término "comprendiendo", o un término equivalente, es reemplazado por "teniendo", o un término equivalente.

A continuación se describe en detalle un aspecto adicional de la descripción.

En una faceta, dicho aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un anticuerpo anti-CD4 humana que comprende un dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada (VH) y un dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera (VL), en el que al menos un epitopo de células T localizado fuera de las CDR de dichos dominios variables de inmunoglobulina se retira de dichos dominios variables de inmunoglobulina.

Estos anticuerpos son menos inmunogénicos que sus anticuerpos de origen y, por tanto, es menos probable que estimulen o activen a las células T y, por tanto, es menos probable que provoquen una respuesta inmunológica mediada por células T indeseada contra el anticuerpo, por ejemplo, en un sujeto humano.

Además, de modo ventajoso, dichos anticuerpos sustancialmente conservan la capacidad del correspondiente anticuerpo no modificado para unirse a CD4 humana y, preferiblemente, conservan además al menos una de sus características ventajosas.

Tal como se emplea en dicho aspecto adicional de la descripción, un "anticuerpo" significa, entre otras cosas, una proteína de la familia de las inmunoglobulinas que es capaz de combinarse, interactuar o asociarse de otro modo con un antígeno.

En el contexto de dicho aspecto adicional de la presente descripción, preferiblemente se considera que el término "anticuerpo" también se relaciona con fragmentos de anticuerpos, que incluyen, por ejemplo, fragmentos Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂. Dichos fragmentos pueden prepararse mediante métodos convencionales. Dicho aspecto adicional de la presente descripción preferiblemente también contempla las diversas formas recombinantes de especies moleculares derivadas de anticuerpos conocidas en la técnica. Estas especies incluyen fragmentos Fv estabilizados, que incluyen formas de Fv monocatenarias (por ejemplo, scFv) que comprenden un conector peptídico que une los dominios VH y VL, o un Fv estabilizado mediante un enlace disulfuro intercatenario (dsFv) y que contiene restos cisteína adicionales modificados para que faciliten la unión de los dominios VH y VL. De igual forma, otras composiciones son conocidas en la técnica y pueden incluir especies denominadas "minicuerpos" y "dAb" de dominio variable único. Otras especies además pueden incorporar medios para aumentar la valencia del dominio de la región V del anticuerpo modificado, concretamente especies que tienen múltiples sitios de unión del antígeno, por ejemplo, modificando los dominios de dimerización (por ejemplo, "cremalleras de leucina") o también estrategias de modificación química. Además, el término "anticuerpo" preferiblemente se relaciona también con multímeros de scFv, tales como diacuerpos, triacuerpos o tetraacuerpos, tándems, flexicuerpos, anticuerpos biespecíficos y anticuerpos quiméricos. Según dicho aspecto adicional de la presente descripción, la expresión "anticuerpo anti-CD4 humana" preferiblemente se refiere a un anticuerpo según se definió anteriormente, que tiene la capacidad para unirse a la CD4 humana. Además, tal como se emplea en dicho aspecto adicional de la descripción, la expresión

"anticuerpo no modificado" o "anticuerpo de origen" preferiblemente se refiere al correspondiente anticuerpo anti-CD4 humana en el que, en oposición a los anticuerpo de dicho aspecto adicional de la presente descripción, no se retira ningún epítipo de células T localizado fuera de las CDR de dichos dominios variables de inmunoglobulina, de los dominios variables de inmunoglobulina. El término "antígeno" se emplea preferiblemente en dicho aspecto adicional de la descripción para indicar una sustancia que es capaz de interactuar con el anticuerpo. En el contexto del anticuerpo de dicho aspecto adicional de la presente descripción, el antígeno preferiblemente significa CD4, en particular CD4 humana. "CD4" o "agrupación de diferenciación 4" se refiere a una proteína, de modo más preciso una glicoproteína de superficie, muy conocida por los expertos en la técnica. En el presente contexto, CD4 también puede indicar un fragmento de una CD4 de longitud completa o una forma modificada de otro modo de CD4, con la condición de que el fragmento o la forma modificada de otro modo siga actuando como antígeno en el contexto del anticuerpo de dicho aspecto adicional de la presente descripción. La expresión "dominio de inmunoglobulina" se emplea preferiblemente en dicho aspecto adicional de la descripción para indicar, entre otras cosas, un dominio de proteína que comprende un plegamiento de inmunoglobulina. Las proteínas y los dominios de inmunoglobulina son muy conocidos en la técnica. El término "VH" se emplea preferiblemente en dicho aspecto adicional de la descripción para indicar la región variable de cadena pesada de la cadena pesada de un anticuerpo. La "región variable de cadena pesada" también se denomina "dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada". Estos términos y expresiones son muy conocidos en la técnica. El término "VL" se emplea preferiblemente en dicho aspecto adicional de la descripción para indicar la región variable de cadena ligera de la cadena ligera de un anticuerpo. La "región variable de cadena ligera" también se denomina "dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera". Estos términos y expresiones son muy conocidos en la técnica.

Preferiblemente, un dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada y un dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera juntos proporcionan la superficie de unión capaz de interactuar con el antígeno.

Tal como se emplea en dicho aspecto adicional de la descripción, VH preferiblemente significa un polipéptido que tiene una longitud de aproximadamente 110 a 125 restos aminoácidos, cuya secuencia se corresponde con cualquiera de las cadenas de VH especificadas en dicho aspecto adicional de la descripción que, en combinación con un VL, es capaz de unirse al antígeno CD4. De modo similar, VL preferiblemente significa un polipéptido que tiene una longitud de aproximadamente 95-130 restos aminoácidos, cuya secuencia se corresponde con cualquiera de las cadenas de VL especificadas en dicho aspecto adicional de la descripción que, en combinación con un VH, es capaz de unirse al antígeno CD4.

Las cadenas pesadas de inmunoglobulina de longitud completa tienen preferiblemente un peso molecular de aproximadamente 50 a 70 kDa y normalmente son codificadas por un gen VH en el extremo N-terminal y uno de los genes de la región constante (por ejemplo, [gamma], [alfa] o [épsilon]) en el extremo C-terminal. De modo similar, las cadenas ligeras de longitud completa tienen preferiblemente un peso molecular de aproximadamente 25 kDa y normalmente son codificadas por un gen de la región V en el extremo N-terminal y un gen de la región constante [kappa] o [lambda] en el extremo C-terminal.

La cadena ligera de un anticuerpo puede ser una cadena de tipo "lambda" ("λ") o una cadena de tipo "kappa" ("κ"). Por consiguiente, la región variable de cadena ligera puede ser una región variable de cadena ligera de tipo "lambda" ("λ", "Vλ") o una región variable de cadena ligera "kappa" ("κ", "Vk").

Resulta habitual en numerosos anticuerpos monoclonales que la cadena ligera sea preferiblemente una cadena de tipo "kappa" ("κ"). Por consiguiente, VL es preferiblemente una cadena de tipo Vk ("Vk", "Vk").

En el contexto de dicho aspecto adicional de la presente descripción, se proporciona una serie de secuencias de dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada y de secuencias de dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera diferentes. La presente descripción no proporciona límites con respecto a las posibles combinaciones de dichas secuencias de dominios variables que pueden estar incluidas en una molécula de anticuerpo completo.

Preferiblemente, el anticuerpo de dicho aspecto adicional de la presente descripción comprende dos dominios variables de inmunoglobulina de cadena pesada idénticos y dos dominios variables de inmunoglobulina de cadena ligera idénticos, en los que dichos dominios variables de inmunoglobulina de cadena pesada y dominios variables de inmunoglobulina de cadena ligera se seleccionan de los dominios variables descritos en dicho aspecto adicional de la descripción.

Según dicho aspecto adicional de la presente descripción, la expresión "epítipo de células T" preferiblemente se refiere a una secuencia peptídica que tiene el potencial para unirse a moléculas de MHC, preferiblemente a moléculas de MHC de clase II. Dichas secuencias, en forma de complejo con MHC de clase II, pueden estimular a las células T y/o unirse a las células T (sin que necesariamente las activen).

Preferiblemente, la expresión "epítipo de células T" se refiere a una secuencia peptídica que, cuando se une a moléculas de MHC de clase II, puede ser reconocida por un receptor de células T (TCR) y que puede, al menos en principio, provocar la estimulación o la activación de la correspondiente célula T uniéndose al TCR para estimular una respuesta de células T.

Para identificar los epitopos de células T de un anticuerpo puede utilizarse cualquiera de los métodos informáticos o métodos *in vitro* conocidos por los expertos en la técnica y/o que se describen o mencionan en la presente solicitud.

5 Preferiblemente, un epitopo de células T está formado por ocho o más aminoácidos, más preferiblemente de ocho a veinte aminoácidos, más preferiblemente de ocho a once aminoácidos y, particularmente preferido, por nueve aminoácidos.

10 El término "péptido", tal como se emplea en dicho aspecto adicional de la descripción, preferiblemente es un compuesto que incluye dos o más aminoácidos que están unidos entre sí mediante un enlace peptídico. Algunos péptidos pueden contener solo unas pocas unidades de aminoácidos. En la técnica, los péptidos cortos, por ejemplo, péptidos que tienen menos de diez unidades de aminoácidos, a veces se denominan "oligopéptidos", mientras que los péptidos que contienen un número mayor de restos aminoácidos, por ejemplo, de 10 a 100 o más de 100, habitualmente se denominan "polipéptidos".

A lo largo de dicho aspecto adicional de la presente descripción, se dice que un epitopo de células T preferiblemente se "retira" cuando la respuesta inmunológica mediada por células T basada en dicho epitopo contra el anticuerpo se reduce o, preferiblemente, se elimina.

15 Preferiblemente, la respuesta inmunológica mediada por células T contra el anticuerpo se reduce (y preferiblemente se elimina) cuando el potencial del epitopo de células T para unirse a moléculas de MHC, preferiblemente moléculas MHC de clase II, se reduce (y preferiblemente se elimina).

20 Según un ejemplo del método descrito en el ejemplo 2, un epitopo de células T modificado puede ensayarse por medios informáticos para su unión a alelos de MHC de clase II. En este métodos, se considera que un epitopo de células T se "retira" cuando se predice que un número menor o ninguno de los alelos de MHC de clase II se unirá al epitopo de células T modificado (véase el ejemplo 2).

25 Otros métodos para medir la reducción o la eliminación de la respuesta inmunológica mediada por células T son muy conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ensayos de unión de MHC de clase II *in vitro*, empleando moléculas de MHC de clase II purificadas o líneas de células B inmortalizadas homocigóticas, o ensayos de proliferación de células T *ex vivo*.

30 La eliminación de un epitopo de células T puede provocar que el anticuerpo muestre una inmunogenicidad disminuida, y preferiblemente ausente. El término "inmunogenicidad", entre otras cuestiones, se refiere a la capacidad para provocar, inducir o facilitar de otro modo una respuesta humoral y/o mediada por células T en un animal hospedante, en particular cuando el animal hospedante es un ser humano y/o la capacidad para suscitar una respuesta en un ensayo *in vitro* adecuado. Por ejemplo, se dice que la inmunogenicidad se ha reducido si se ha reducido comparada con un correspondiente anticuerpo de origen, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de roedor no modificado o quimérico (regiones V de roedor; regiones constantes humanas).

35 Tal como se emplea en dicho aspecto adicional de la descripción, el término "CDR" preferiblemente se refiere a la "región determinante de la complementariedad" de un anticuerpo, es decir, una de las regiones hipervariables dentro de un dominio variable de inmunoglobulina que contribuye a la determinación de la especificidad del anticuerpo. Las CDR son muy conocidas por los expertos en la técnica. Generalmente, tanto el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada como el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera contienen tres CDR.

40 Las CDR en los dominios variables de inmunoglobulina pueden identificarse y definirse, por ejemplo, según los métodos desarrollados por Kabat, que son muy conocidos por los expertos en la técnica. Según una realización preferida de dicho aspecto adicional de la presente descripción, las CDR se definen según Kabat (Kabat *et al.* (1991)).

45 Tal como se emplea en dicho aspecto adicional de la descripción, preferiblemente se dice que un epitopo de células T retirado está "localizado fuera de las CDR de los dominios variables de inmunoglobulina" cuando la secuencia del epitopo de células T que se va a retirar no se solapa con ninguna de las CDR de dichos dominios variables de inmunoglobulina. Además, también se dice que un epitopo de células T retirado está "localizado fuera de las CDR de los dominios variables de inmunoglobulina" en el caso en que la secuencia del epitopo de células T que se va a retirar no se solapa con ninguna de las CDR de dichos dominios variables de inmunoglobulina, en los que, sin embargo, todas las alteraciones que se han realizado en dicho epitopo de células T se han hecho fuera de las CDR de los dominios variables de inmunoglobulina.

50 El anticuerpo anti-CD4 humana de dicho aspecto adicional de la presente descripción puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

Según una realización preferida, el anticuerpo se deriva del anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma ECACC 88050502.

55 El anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ECACC 88050502 es un anticuerpo de CD4, y más específicamente, es un anticuerpo anti-CD4 humana de ratón monoclonal, también denominado 30F16H5, que se

describe, por ejemplo, en el documento DE 3919294. Dicho anticuerpo puede obtenerse a partir de la línea celular de hibridoma depositada en ECACC (n.º de registro 88050502).

5 Se dice que un anticuerpo de dicho aspecto adicional de la presente invención se "deriva" del anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma ECACC 88050502 cuando se ha obtenido mediante cualquier método adecuado conocido por los expertos en la técnica empleando la secuencia del anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma ECACC 88050502, o empleando la línea celular de hibridoma ECACC 88050502.

Preferiblemente, el anticuerpo tiene las CDR del anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ECACC 88050502, o el anticuerpo tiene las CDR de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:12.

10 Las CDR de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:12 tienen las secuencias indicadas en cursiva en la figura 12(a) y la figura 13(a), en donde se muestran secuencias de dominios variables de inmunoglobulina preferidas del anticuerpo anti-CD4 humana de origen 30F16H5 (SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:12). En cada una de las figuras 12(a) y 13(a) se muestran tres CDR. En este caso, las CDR de la figura 12(a) están formadas por los aminoácidos 31-35, 50-66 y 99-109 de SEQ ID NO:2, y las CDR de la figura 13(a) están formadas por los aminoácidos 24-33, 50-55 y 88-96 de SEQ ID NO:12.

15 Los anticuerpos que tienen las CDR del anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ECACC 88050502, o de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:12 tienen un alto potencial para unirse a la CD4 humana con una afinidad comparable con la del anticuerpo de origen 30F16H5.

20 En otra realización preferida del anticuerpo de dicho aspecto adicional de la presente descripción, con la excepción de las diferencias debidas a la eliminación de uno o más epítopos de células T de dichos dominios variables de inmunoglobulina, el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada es idéntico al dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada del anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ECACC 88050502, o comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:2; y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera es idéntico al dominio variable de cadena ligera del anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ECACC 88050502, o comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:12.

25 Tal como se describe en el ejemplo 2b, los presentes inventores han descubierto y describen en la presente epítopos de células T del anticuerpo anti-CD4 humana de origen 30F16H5, cuyas regiones se muestran, por ejemplo en las siguientes tablas 5 y 6.

30 Estos epítopos de células T indicados en dicho aspecto adicional de la descripción como EH1 a EH10 ("epítopo de células T de la región variable de cadena pesada" 1 a 10) se muestran individualmente en la tabla 5 (SEQ ID NO:21-30) y los epítopos de células T indicados en dicho aspecto adicional de la descripción como EL1 a EL11 EH10 ("epítopo de células T de la región variable de cadena ligera" 1 a 11) se muestran individualmente en la tabla 6 (SEQ ID NO:31-41). Cada uno de estos epítopos de células T también puede describirse basándose en su posición en las secuencias de las respectivas regiones variables de origen SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:12, respectivamente.

35 Por consiguiente, en una realización preferida de dicho aspecto adicional de la presente descripción, dicho al menos un epítopo de células T se selecciona el grupo que consiste en los epítopos de células T del dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada en la posición 4 a 12 de SEQ ID NO:2 (EH1), posición 10 a 18 de SEQ ID NO:2 (EH2), posición 11 a 19 de SEQ ID NO:2 (EH3), posición 20 a 28 de SEQ ID NO:2 (EH4), posición 37 a 45 de SEQ ID NO:2 (EH5), posición 70 a 78 de SEQ ID NO:2 (EH6), posición 73 a 81 de SEQ ID NO:2 (EH7), posición 83 a 91 de SEQ ID NO:2 (EH8), posición 107 a 115 de SEQ ID NO:2 (EH9), posición 110 a 118 de SEQ ID NO:2 (EH10), y los epítopos de células T del dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera en la posición 2 a 10 de SEQ ID NO:12 (EL1), posición 3 a 11 de SEQ ID NO:12 (EL2), posición 10 a 18 de SEQ ID NO:12 (EL3), posición 11 a 19 de SEQ ID NO:12 (EL4), posición 45 a 53 de SEQ ID NO:12 (EL5), posición 53 a 61 de SEQ ID NO:12 (EL6), posición 59 a 67 de SEQ ID NO:12 (EL7), posición 61 a 69 de SEQ ID NO:12 (EL8), posición 62 a 70 de SEQ ID NO:12 (EL9), posición 70 a 78 de SEQ ID NO:12 (EL10), y posición 97 a 105 de SEQ ID NO:12 (EL11).

45 Se entiende que, bajo ciertas circunstancias, otras regiones de la secuencia además de las descritas en dicho aspecto adicional de la descripción pueden convertirse en epítopos inmunogénicos, por ejemplo, en el caso de una infección con un patógeno que expresa una proteína o un péptido con una secuencia similar a la del presente caso.

Según una realización preferida de dicho aspecto adicional de la presente descripción, al menos un epítopo de células T se retira mediante la alteración de al menos un resto aminoácido.

50 En particular, tal como se emplea en dicho aspecto adicional de la descripción, la "alteración" o "modificación" de al menos un resto aminoácido preferiblemente puede ser cualquiera de los siguientes:

- la sustitución de al menos un resto aminoácido originariamente presente por otro resto aminoácido,
- la adición de al menos un resto aminoácido;
- la delección de al menos un resto aminoácido originariamente presente;

- la modificación química de al menos un resto aminoácido;
o sus combinaciones.

La referencia al término "alteración" de al menos un resto aminoácido también incluye una situación en la que, si es necesario, se llevan a cabo una o más alteraciones, habitualmente mediante sustitución, adición o delección de uno o más aminoácidos específicos, dentro del mismo epitopo de células T o en otra parte de la molécula de anticuerpo para conservar sustancialmente la capacidad del correspondiente anticuerpo no modificado para unirse a la CD4 humana. Más preferiblemente, dichas una o más alteraciones pueden realizarse para conservar también una o más características ventajosas del anticuerpo.

Preferiblemente, se realizan una o más alteraciones en uno o más restos de cualquiera o de todos de EH1 a EH10 y/o EL1 a EL11, preferiblemente cualquiera o todos de EH1 a EH10 y EL1 a EL11.

Se prefiere particularmente que dichas una o más alteraciones se realicen en uno o más aminoácidos habitualmente denominados "restos de bolsillo", puesto que están contenidos en los bolsillos de los surcos de unión a MHC. Tal como entenderán los expertos en la técnica, dichos restos de bolsillo constituyen restos que tienen una importancia concreta para la inmunogenicidad y, por tanto, es más probable que reduzcan, o preferiblemente que eliminen, la respuesta inmunológica mediada por células T contra el anticuerpo. En general, se prefiere en particular proporcionar moléculas de anticuerpo modificadas en las que la alteración del aminoácido se realiza dentro de las regiones más inmunogénicas del anticuerpo de origen.

Sin embargo, no es necesario que las alteraciones de aminoácidos, tanto de modo individual dentro de un epitopo concreto como en combinación dentro de un único epitopo, se realicen solo en las posiciones correspondientes con respecto al surco de unión de MHC de clase II, sino que pueden hacerse en cualquier punto dentro de la secuencia del péptido. Estas alteraciones se encuentran dentro del alcance de dicho aspecto adicional de la presente descripción.

Además, tal como será evidente para los expertos en la técnica, pueden encontrarse múltiples conjuntos alternativos de alteraciones que logren la retirada de los epitopos. Sin embargo, las secuencias resultantes seguirán siendo bastante homólogas con las composiciones específicas descritas en dicho aspecto adicional de la descripción y, por tanto, se incluyen en el alcance de la descripción. Generalmente, se encontrarán secuencias que sean aproximadamente 70%, o aproximadamente 90%, o aproximadamente 95%, o aproximadamente 99% o más homólogas con las secuencias especificadas de la presente a través de su región menos homóloga y, aun así, seguirán siendo operativamente equivalentes. Estas secuencias también se encuentran dentro del alcance de la presente.

Preferiblemente, la alteración de al menos un resto aminoácido es la sustitución de uno o más aminoácidos.

Por consiguiente, en una realización preferida del anticuerpo de dicho aspecto adicional de la presente descripción, al menos un aminoácido dentro de dicho al menos un epitopo de células T es sustituido por otro aminoácido para retirar al menos un epitopo de células T.

Se entenderá que las sustituciones de un solo aminoácido dentro de un epitopo de células T concreto son la vía preferida mediante el cual pueden eliminarse el epitopo. Además pueden contemplarse combinaciones de sustituciones dentro de un único epitopo y, por ejemplo, esto puede ser particularmente apropiado cuando epitopos definidos individualmente se solapan entre sí.

En diversas realizaciones, se realizan más de 2 sustituciones de aminoácidos, o más de 3 sustituciones de aminoácidos, o más de 4 sustituciones de aminoácidos, o más de 5 sustituciones de aminoácidos, o más de 6 sustituciones de aminoácidos, o más de 7 sustituciones de aminoácidos, o más de 8, o más de 9, o más de 10, o más de 11 o más de 12 sustituciones en la cadena pesada y/o la cadena ligera. En algunas realizaciones, se realizan entre 1 y 21, entre 5 y 20, o entre 7 y 14 sustituciones de aminoácidos en la cadena pesada y ligera.

En cada uno de los epitopos de células T EH1 a EH10 y EL1 a EL11 indicados anteriormente, pueden estar presentes 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 sustituciones, con la condición de que al menos una sustitución esté presente y de que el anticuerpo conserve su capacidad para unirse a la CD4 humana.

Preferiblemente, el número de sustituciones se selecciona de tal forma que el número de alelos de MHC II predichos para unirse o que se unen, respectivamente, disminuye. Preferiblemente, dicho número disminuye hasta al menos 50%, más preferiblemente 40%, más preferiblemente 30%, más preferiblemente 20%, más preferiblemente 10%, más preferiblemente 5%, más preferiblemente 2%, más preferiblemente 1% y lo más preferiblemente 0%, comparado con el número de alelos unidos cuando no están presentes sustituciones.

Tal como se ejemplifica en el ejemplo 2b, en un ensayo concreto, el "número de alelos de MHC II unidos" es el número de alelos de MHC de clase II dentro un panel concreto de alelos de MHC de clase II examinados en el ensayo (por ejemplo, 34 alelos de MHC de clase II) que se determina que son péptidos de unión para el epitopo de células T implicado. Se dice que dicho número "disminuye" cuando el número se reduce para un epitopo de células

T modificado cuando se compara con el epitopo de células T no modificado del anticuerpo de origen.

Tal como se describe en la presente, se han creado diversos anticuerpos anti-CD4 humana modificados, en los que uno o más epitopos de células T han sido retirados, por medio de la retirada de epitopos de MHC de clase II que implica la sustitución de aminoácidos. Los ejemplos de sustituciones particularmente útiles a este respecto se proporcionan en la figura 12 y la figura 13, que muestran sustituciones individuales particularmente útiles, concretamente las sustituciones individuales destacadas en la figura 12(e) y la figura 13(e), que pueden realizarse en SEQ ID NO:2 (cf. figura 12(a)) o SEQ ID NO:12 (cf. figura 13(a)), respectivamente. Estas sustituciones también se muestran en la tabla 5 (con relación al dominio de inmunoglobulina de cadena pesada) y la tabla 6 (con relación al dominio de inmunoglobulina de cadena ligera).

Por tanto, según una realización preferida de dicho aspecto adicional de la presente descripción, dicha al menos una sustitución se selecciona del grupo que consiste en T9S, V10E, A12K, Q19K, S28T, K38R, R40A, L701, A72R, V73D, S91T, T115L, L116V en SEQ ID NO:2, y I10T, M11L, L46A, V59S, I62S, S69D, R76S, L105I en SEQ ID NO:12.

En una realización particularmente preferida, aparecen 0, 1, 2, o 3 sustituciones dentro de cada uno de EH1 y EH6; aparecen 0, 1 o 2 sustituciones dentro de cada uno de EH2, EH5, y EH10; aparecen 0 o 1 sustituciones dentro de cada uno de EH3, EH4, EH7, EH8, y EH9; aparecen 0, 1 o 2 sustituciones dentro de cada uno de EL2, EL3, EL7, EL8, y EL9; y aparecen 0 o 1 sustituciones dentro de cada uno de EL1, EL4, EL5, EL6, EL10, y EL11, con la condición de que al menos esté presente una sustitución.

Según una realización de dicho aspecto adicional de la presente descripción, se retiran 6, 8, o 10 epitopos de células T del dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada y/o se retiran 5, 9, 10, o 11 epitopos de células T del dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera del anticuerpo de dicho aspecto adicional de la presente descripción.

Más preferiblemente, se retiran 6, 8, o 10 epitopos de células T del dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada y se retiran 5, 9, 10, o 11 epitopos de células T del dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera del anticuerpo de dicho aspecto adicional de la presente descripción.

Según una realización, todos los epitopos de células T se retiran de los dominios variables de inmunoglobulina.

Además, según dicho aspecto adicional de la presente descripción, se han elaborado ejemplos de grupos de sustituciones en los dominios variables de inmunoglobulina, y dichos grupos están incluidos en SEQ ID NO:4, 6, 8, y 10 (mostrados la figura 12(b)-(e)) y SEQ ID NO:14, 16, 18, y 20 (mostrados en la figura 13(b)-(e)).

Por tanto, otras realizaciones preferidas de dicho aspecto adicional de la presente descripción son anticuerpos anti-CD4 humana, en los que el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4, 6, 8, y 10 y/o el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:14, 16, 18, y 20.

Más preferiblemente, el dominio variable de cadena pesada comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4, 6, 8, y 10; y el dominio variable de cadena ligera comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:14, 16, 18, y 20.

Aún más preferiblemente, el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:4 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:14; el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:4 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:20; el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:6 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:14; el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:6 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:16; el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:6 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:20; el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:8 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:16; el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:8 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:20; el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:10 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:14; el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:10 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:16; o el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:10 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:20.

Tal como puede observarse a partir del ejemplo 2, los anticuerpos que comprenden estas combinaciones de secuencias de dominios variables concretas muestran características ventajosas, en particular con respecto a su afinidad de unión al antígeno CD4.

5 En particular se prefiere que el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprenda una secuencia idéntica a SEQ ID NO:4 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprenda una secuencia idéntica a SEQ ID NO:14; el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprenda una secuencia idéntica a SEQ ID NO:6 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprenda una secuencia idéntica a SEQ ID NO:16; el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprenda una secuencia idéntica a SEQ ID NO:10 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprenda una secuencia idéntica a SEQ ID NO:16; o el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprenda una secuencia idéntica a SEQ ID NO:10 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprenda una secuencia idéntica a SEQ ID NO:20.

15 Tal como se muestra en el ejemplo 2c descrito en la presente, los anticuerpos según estas realizaciones muestran unión con la CD4 humana, que es mejor cuando se compara con el anticuerpo anti-CD4 de ratón monoclonal de origen 30F16H5, que se emplea como referencia.

20 En general, tal como se indicó anteriormente, el anticuerpo modificado de la presente muestra la capacidad de unirse a la CD4 humana. Tal como se emplea en dicho aspecto adicional de la descripción, se dice que un anticuerpo preferiblemente "conserva sustancialmente" su capacidad para unirse a la CD4 humana si la afinidad por su antígeno CD4 diana es al menos 5%, más preferiblemente al menos 10%, más preferiblemente al menos 20%, más preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 100% de la afinidad mostrada por el anticuerpo anti-CD4 monoclonal no modificado.

25 Los expertos en la técnica conocen diversos métodos para la medición de la afinidad de los anticuerpos. Los métodos adecuados incluyen la medición de la afinidad mediante un ELISA de competición, tal como se describe en el ejemplo 2c de la presente, o un análisis de Scatchard o un análisis que emplea un instrumento Biacore (Perkin Elmer) o un instrumento similar.

En una realización preferida de dicho aspecto adicional de la presente descripción, la afinidad por su antígeno CD4 diana está dentro de un orden de magnitud mayor o menor que la afinidad que muestra el anticuerpo anti-CD4 monoclonal de origen.

30 Por ejemplo, la afinidad de unión del anticuerpo de dicho aspecto adicional de la presente descripción por CD4 está preferiblemente dentro de un orden de magnitud mayor o menor que la afinidad de unión del anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ECACC 88050502.

Más preferiblemente, la afinidad de unión es dos veces mayor o menor que la afinidad de unión del anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ECACC 88050502.

35 Según realizaciones particularmente preferidas, el anticuerpo tiene una afinidad de unión mayor por CD4 que el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ECACC 88050502.

40 Preferiblemente, los anticuerpos modificados descritos en dicho aspecto adicional de la descripción conservan además al menos una y lo más preferiblemente todas las actividades funcionales del anticuerpo anti-CD4 humana de origen. Por tanto, las realizaciones de dicho aspecto adicional de la presente descripción incluyen anticuerpos modificados en los que aparecen una o más, y lo más preferiblemente, todas las características técnicas beneficiosas asociadas con la eficacia terapéutica del anticuerpo de origen no modificado, al mismo tiempo que el anticuerpo presenta una capacidad reducida por unirse a moléculas de MHC de clase II y/o induce una respuesta inmunológica más débil o no induce respuesta inmunológica en un sujeto.

45 Preferiblemente, la cadena pesada del anticuerpo anti-CD4 humana comprende además un dominio de región constante de IgG4 humana, y la cadena ligera comprende además un dominio de región constante kappa humana. Por consiguiente, en otra realización preferida, la región variable de cadena pesada del anticuerpo de dicho aspecto adicional de la presente descripción está unida a un dominio de región constante de IgG4 humana, y la región variable de cadena ligera del anticuerpo de dicho aspecto adicional de la presente descripción está unida a un dominio de región constante kappa humana. La IgG4 tiene propensión a estimular funciones efectoras, tales como ADCC ("antibody dependent cell-mediated cytotoxicity", citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) y CDC ("complement-induced cell death", muerte celular inducida por el complemento) y, por tanto, no puede estimular una respuesta proinflamatoria en el paciente. En realizaciones concretas, el anticuerpo anti-CD4 humana comprende además un dominio de región constante de IgG4 humana adyacente a una secuencia de región variable de cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO:4, 6, 8, y 10 y un dominio de región constante kappa humana adyacente a una secuencia de región variable de cadena ligera seleccionada de SEQ ID NO:14, 16, 18, 20.

55 Tal como se describió en la presente anteriormente, estos ejemplos de secuencias para la región variable de cadena pesada y de cadena ligera, respectivamente, son las secuencias de la región variable preferidas.

Según otra faceta de dicho aspecto adicional de la presente descripción, el anticuerpo de dicho aspecto adicional de la presente descripción se obtiene usando los vectores de expresión pANTVhG4 y pANTVκ.

5 Como ejemplo no limitante, el anticuerpo de dicho aspecto adicional de la presente descripción puede obtenerse empleando los vectores de expresión pANTVhG4 y pANTVκ, según se describe en el ejemplo 2. Además puede emplearse cualquier otro método o métodos adecuados conocidos por los expertos en la técnica en los que se construyen anticuerpos modificados basándose en secuencias de anticuerpo concretas, tales como las que están contenidas en los vectores de expresión pANTVhG4 y pANTVκ.

En otra faceta, dicho aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un método para preparar el anticuerpo anti-CD4 humana de dicho aspecto adicional de la presente descripción, que comprende las siguientes etapas:

10 (i) proporcionar la secuencia de aminoácidos del anticuerpo que puede derivarse de la línea celular de hibridoma ECACC 88050502 o una parte de esta;

(ii) identificar uno o más epitopos de células T dentro de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo, o de una parte de este, mediante cualquier método que incluya la determinación de la unión de los péptidos a moléculas de MHC empleando técnicas *in vitro* o informáticas o ensayos biológicos;

15 (iii) diseñar nuevos variantes de secuencia con uno o más aminoácidos dentro de los epitopos de células T identificados modificados de tal forma que se reduce sustancialmente o se elimina la unión de los péptidos a moléculas de MHC medida mediante técnicas *in vitro* o informáticas o ensayos biológicos; y

(iv) construir dichos variantes de secuencia mediante técnicas de ADN recombinante y ensayar dichos variantes de secuencia para identificar uno o más variantes de secuencia que tengan las propiedades del anticuerpo anti-CD4 humana de dicho aspecto adicional de la presente descripción.

20 La identificación de epitopos de células T según la etapa (ii) puede realizarse según métodos descritos previamente en la técnica. Los métodos adecuados se describen, por ejemplo, en el documento WO 98/59244; documento WO 00/34317; solicitud de EE. UU. 20030153043. En el método descrito anteriormente, los variantes de secuencia preferiblemente se crean de tal forma que se evita la creación de nuevos epitopos de células T por las variaciones en la secuencia, a menos que dichos nuevos epitopos de células T sean modificados, a su vez, de tal como que se reduzca sustancialmente o se elimine la unión de péptidos a moléculas de MHC de clase II. En la práctica, cuando se realizan alteraciones en la secuencia de la proteína, preferiblemente se evita que los cambios contemplados introduzcan nuevos epitopos inmunogénicos volviendo a ensayar la secuencia contemplada para determinar la presencia de epitopos y/o de ligandos de MHC de clase II mediante cualquier medio adecuado.

30 En diversas realizaciones, los anticuerpos modificados de dicho aspecto adicional de la presente descripción se generan mediante la expresión de diferentes combinaciones de los genes VH y VL especificados en dicho aspecto adicional de la descripción. Todas estas combinaciones de cadena pesada y ligera se incluyen en dicho aspecto adicional de la presente descripción.

35 En general, la constitución de la molécula de anticuerpo completa puede lograrse mediante técnicas de ADN recombinante, y los métodos para purificar y manipular moléculas de anticuerpos son muy conocidos en la técnica. En la bibliografía convencional se explican a fondo las técnicas necesarias, tal como saben los expertos en la técnica.

40 Las moléculas preferidas de dicho aspecto adicional de la presente descripción puede prepararse mediante cualquiera de una serie de formas, pero, lo más preferiblemente, se consiguen aprovechando los métodos recombinantes habituales. Un procedimiento relativamente fácil consiste en usar las secuencias de las proteínas y la información proporcionada en dicho aspecto adicional de la descripción para deducir un polinucleótido (ADN) que codifica cualquiera de las regiones V de anticuerpo preferidas. Esto puede lograrse, por ejemplo, empleando herramientas de software informáticas, tales como el paquete de software DNASTar [DNASTar Inc, Madison, Wis., EE. UU.] o similares. Cualquiera de estas secuencias de ADN con la capacidad de codificar los polipéptidos preferidos de la presente o sus homólogos significativos debe considerarse como realización de dicho aspecto adicional de la presente descripción.

50 Como esquema general, puede prepararse cualquiera de los genes de la cadena VH o VL empleando la síntesis génica y clonarse en un vector de expresión adecuado. A su vez, el vector de expresión se introduce en una célula hospedante y las células se seleccionan y se cultivan. Las moléculas de anticuerpo se purifican con facilidad del medio de cultivo y se formulan en una preparación adecuada para la administración terapéutica.

55 Como ejemplo no limitante, uno de estos esquemas implica un proceso de síntesis génica empleando paneles de oligonucleótidos sintéticos. Los genes se ensamblan utilizando una reacción en cadena de ligasa ("ligase chain reaction", LCR), en la que se deja que los oligonucleótidos que contienen extremos complementarios se asocien, seguido de una amplificación y del rellenado empleando una reacción en cadena de polimerasa ("polymerase chain reaction", PCR). La PCR se conduce mediante la adición de una concentración creciente de los oligonucleótidos flanqueantes para que actúen como cebadores. Los productos de la PCR se ensamblan en genes de anticuerpo de

longitud completa mediante otra PCR a partir de vectores que contienen las regiones flanqueantes del gen de inmunoglobulina 5' y 3' y subclonando en vectores de expresión para la expresión del anticuerpo completo. Los genes de VH y VL ensamblados pueden actuar como moldes para la mutagénesis y la construcción de múltiples secuencias de anticuerpos variantes, tales como las descritas en dicho aspecto adicional de la descripción. Resulta particularmente conveniente emplear la estrategia de "PCR de extensión de solapamiento", tal como se describe en Higuchi *et al.* (1998), aunque pueden aplicarse con facilidad otras metodologías y sistemas. Los genes de inmunoglobulina de longitud completa que contienen los módulos de la región variable se ensamblan, del modo más conveniente, empleando una PCR de solapamiento y se subclonan en vectores de expresión que contienen los dominios de región constante de inmunoglobulina deseados. Los vectores de expresión pueden introducirse en una célula de mamífero u otra célula hospedante, por ejemplo, empleando técnicas de electroporación. La línea celular NS0 es un mieloma de ratón que no produce inmunoglobulinas, obtenido de the European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC), y es un ejemplo particularmente adecuado de línea de células hospedantes para este procedimiento. Las líneas celulares que segregan anticuerpos se expanden y los anticuerpos pueden purificarse con facilidad, por ejemplo, empleando una cromatografía de afinidad de proteína A (Harlow E. y Lane D. (2006)). La concentración del anticuerpo purificado puede determinarse empleando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas ("enzyme linked immunosorbent assay", ELISA) que detecta la región constante kappa humana de los anticuerpos de interés.

En la medida en que dicho aspecto adicional de la presente descripción se refiere a anticuerpos anti-CD4 modificados, también se considera que las composiciones que contienen dichos anticuerpos modificados o fragmentos de los anticuerpos modificados y las composiciones relacionadas están dentro del alcance de la descripción.

Por tanto, dicho aspecto adicional de la presente descripción se refiere además a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CD4 humana de dicho aspecto adicional de la presente descripción, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones terapéuticas del anticuerpo anti-CD4 humana de dicho aspecto adicional de la presente descripción pueden usarse junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas según dicho aspecto adicional de la presente descripción se preparan de modo convencional, y comprenden sustancias que se emplean habitualmente en productos farmacéuticos, que incluyen excipientes, vehículos, adyuvantes y tampones. Las composiciones pueden administrarse, por ejemplo, por vía parenteral, entérica, intramuscular, subcutánea, intravenosa, o por otras vías útiles para lograr un efecto. Los excipientes convencionales incluyen sustancias vehículo orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables adecuadas para la vía parenteral, entérica y otras vías de administración, que no reaccionen de manera perjudicial con los agentes. Para la aplicación parenteral, resultan particularmente adecuadas las disoluciones estériles inyectables, preferiblemente disoluciones oleosas o acuosas, así como suspensiones, emulsiones o implantes, que incluyen supositorios. Las ampollas son dosificaciones unitarias convenientes. Las preparaciones farmacéuticas pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con estabilizantes, agentes humectantes, emulgentes, sales para influir en la presión osmótica, tampones u otras sustancias que no reaccionen de manera perjudicial con los compuestos activos.

Los anticuerpos modificados descritos en dicho aspecto adicional de la descripción son útiles en una serie de enfermedades importantes en el ser humano, que incluyen, en especial, trastornos autoinmunitarios que incluyen, pero no se limitan a esclerosis múltiple, artritis reumatoide, vasculitis sistémica, uveítis, enfermedad inflamatoria del intestino y escleroderma, y también pueden usarse en trasplantes. Por tanto, los anticuerpos de dicho aspecto adicional de la presente descripción pueden usarse en un tratamiento terapéutico. Los ejemplos no limitantes incluyen un método para tratar trastornos autoinmunitarios en un paciente, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo modificado según dicho aspecto adicional de la presente descripción. En diversas realizaciones, el trastorno autoinmunitario es la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, vasculitis sistémica, uveítis, enfermedad inflamatoria del intestino o escleroderma. Otro ejemplo es un método para inmunosuprimir un paciente antes o después del trasplante de un órgano, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo según dicho aspecto adicional de la presente descripción. En una realización, el órgano para el trasplante es un trasplante renal. Dicho aspecto adicional de la presente descripción se refiere además a métodos para el tratamiento terapéutico de seres humanos usando las composiciones de anticuerpos modificadas. Para la administración a un individuo, cualquiera de las composiciones de anticuerpos modificados se producirá preferiblemente para que sea al menos 80% pura y esté exenta de pirógenos y otros contaminantes.

Por consiguiente, en otra faceta, dicho aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un método para el tratamiento terapéutico, que comprende administrar el anticuerpo a un sujeto, preferiblemente a un paciente. Preferiblemente, el método es para tratar un trastorno autoinmunitario, en particular un trastorno autoinmunitario seleccionado de la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, vasculitis sistémica, uveítis, enfermedad inflamatoria del intestino y escleroderma. Según otra realización preferida, el método es para inmunosuprimir un paciente antes o después del trasplante de un órgano, en particular un riñón. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano. Preferiblemente, se administra una cantidad eficaz del anticuerpo.

En una faceta relacionada, dicho aspecto adicional de la presente descripción se refiere al uso del anticuerpo anti-CD4 humana de dicho aspecto adicional de la presente descripción para la fabricación de un medicamento para

- 5 tratar terapéuticamente un sujeto. Preferiblemente, el medicamento es para tratar un trastorno autoinmunitario, en particular un trastorno autoinmunitario seleccionado de la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, vasculitis sistémica, uveitis, enfermedad inflamatoria del intestino y escleroderma. Según otra realización preferida, el medicamento es para inmunosuprimir un paciente antes o después del trasplante de un órgano, en particular un riñón. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano.
- 10 En otra faceta relacionada, dicho aspecto adicional de la presente descripción se refiere al anticuerpo de dicho aspecto adicional de la presente descripción para su uso en un método de tratamiento terapéutico. Preferiblemente, el método es para tratar un trastorno autoinmunitario, en particular un trastorno autoinmunitario seleccionado de la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, vasculitis sistémica, uveitis, enfermedad inflamatoria del intestino y escleroderma. Según otra realización preferida, el método es para inmunosuprimir un paciente antes o después del trasplante de un órgano, en particular un riñón. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano.
- 15 En los métodos de tratamiento y los usos médicos de dicho aspecto adicional de la presente descripción, la dosificación real de los anticuerpos anti-CD4 de dicho aspecto adicional de la presente descripción empleados dependerá de una diversidad de factores, que incluyen el tipo y la gravedad del trastorno que se está tratando y la otra modalidad o modalidades de tratamiento seleccionadas. Las indicaciones para los regímenes de dosificación se obtienen a partir de la dosificación de anti-CD4 humanizados conocidos en la técnica.
- 20 En otra faceta, dicho aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada y/o de cadena ligera del anticuerpo anti-CD4 humana de dicho aspecto adicional de la presente descripción. Preferiblemente, el ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:3, 5, 7, 9, 13, 15, 17, y 19.
- 25 También dentro de dicho aspecto adicional de la presente descripción se incluyen ácidos nucleicos que codifican un dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada y/o de cadena ligera del anticuerpo anti-CD4 humana de dicho aspecto adicional de la presente descripción, que se diferencian de SEQ ID NO:3, 5, 7, 9, 13, 15, 17, y 19 debido a la degeneración del código genético.
- 30 La degeneración, con relación a polinucleótidos, se refiere al hecho, reconocido en la técnica, de que en el código genético, muchos aminoácidos son especificados por más de un codón. La degeneración del código es la responsable de que 20 aminoácidos diferentes sean codificados por 64 posibles secuencias de tripletes de las cuatro bases diferentes.
- 35 En otra faceta, dicho aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico, tal como se describió anteriormente. Preferiblemente, el ácido nucleico está unido operablemente a una secuencia de control de la expresión.
- 40 En algunas realizaciones, el vector de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una región V de cadena pesada o ligera que comprende un variante sustituido modificado de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:12 con un número reducido de epitopos de células T, unido operablemente con una secuencia de control de la expresión. En diversas realizaciones, el vector de expresión comprende o se deriva del vector pANTVhG4 (para VH) y del vector pANTVk para VL, tal como se muestra en la figura 11.
- 45 En otra faceta, dicho aspecto adicional de la presente descripción se refiere a una célula hospedante que comprende un ácido nucleico tal como se describió anteriormente y/o al menos un vector tal como se describió anteriormente.
- 50 Preferiblemente, la célula hospedante comprende uno o más vectores y cada uno comprende un ácido nucleico tal como se describió anteriormente. Preferiblemente, la célula hospedante comprende dos vectores y cada uno comprende un ácido nucleico tal como se describió anteriormente.
- Dicho aspecto adicional de la presente descripción se refiere además a un método para preparar el anticuerpo anti-CD4 humana de dicho aspecto adicional de la presente descripción, que comprende cultivar la célula hospedante descrita anteriormente bajo condiciones que permiten la expresión bajo el control de una o más secuencias de control de la expresión adecuadas, y purificar dicho anticuerpo a partir del medio de la célula.
- En los siguientes puntos 1 a 33 se describen ciertas realizaciones de dicho aspecto adicional de la presente descripción:
- 50 1. Un anticuerpo anti-CD4 humana que comprende un dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada (VH) y un dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera (VL),
 en el que al menos un epítopo de células T localizado fuera de las CDR de dichos dominios variables de inmunoglobulina se retira de dichos dominios variables de inmunoglobulina.
2. El anticuerpo del punto 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

ES 2 701 760 T3

3. El anticuerpo del punto 2, en el que el anticuerpo se deriva del anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma ECACC 88050502.
4. El anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en el que el anticuerpo tiene las CDR del anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ECACC 88050502, o en el que el anticuerpo tiene las CDR de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:12.
5. El anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 1 a 4, en el que, con la excepción de las diferencias debidas a la retirada de uno o más epítopos de células T de dichos dominios variables de inmunoglobulina, el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada es idéntico al dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada del anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ECACC 88050502, o comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:2; y
- el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera es idéntico al dominio variable de cadena ligera del anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ECACC 88050502, o comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:12.
6. El anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 1 a 5, en el que al menos un epítopo de células T se selecciona el grupo que consiste en los epítopos de células T del dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada en la posición 4 a 12 de SEQ ID NO:2 (EH1), posición 10 a 18 de SEQ ID NO:2 (EH2), posición 11 a 19 de SEQ ID NO:2 (EH3), posición 20 a 28 de SEQ ID NO:2 (EH4), posición 37 a 45 de SEQ ID NO:2 (EH5), posición 70 a 78 de SEQ ID NO:2 (EH6), posición 73 a 81 de SEQ ID NO:2 (EH7), posición 83 a 91 de SEQ ID NO:2 (EH8), posición 107 a 115 de SEQ ID NO:2 (EH9), posición 110 a 118 de SEQ ID NO:2 (EH10), y
- los epítopos de células T del dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera en la posición 2 a 10 de SEQ ID NO:12 (EL1), posición 3 a 11 de SEQ ID NO:12 (EL2), posición 10 a 18 de SEQ ID NO:12 (EL3), posición 11 a 19 de SEQ ID NO:12 (EL4), posición 45 a 53 de SEQ ID NO:12 (EL5), posición 53 a 61 de SEQ ID NO:12 (EL6), posición 59 a 67 de SEQ ID NO:12 (EL7), posición 61 a 69 de SEQ ID NO:12 (EL8), posición 62 a 70 de SEQ ID NO:12 (EL9), posición 70 a 78 de SEQ ID NO:12 (EL10), y posición 97 a 105 de SEQ ID NO:12 (EL11).
7. El anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 1 a 6, en el que, para retirar dicho al menos un epítopo de células T, al menos un aminoácido dentro de dicho al menos un epítopo de células T es sustituido por otro aminoácido.
8. El anticuerpo del punto 7, en el que la sustitución se selecciona del grupo que consiste en T9S, V10E, A12K, Q19K, S28T, K38R, R40A, L70I, A72R, V73D, S91T, T115L, L116V en SEQ ID NO:2, y I10T, M11L, L46A, V59S, I62S, S69D, R76S, L105I en SEQ ID NO:12.
9. El anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 6 a 8, en el que se encuentran 0, 1, 2, o 3 sustituciones dentro de cada uno de EH1 y EH6; en el que se encuentran 0, 1 o 2 sustituciones dentro de cada uno de EH2, EH5, y EH10; en el que se encuentran 0 o 1 sustituciones dentro de cada uno de EH3, EH4, EH7, EH8, y EH9; en el que se encuentran 0, 1 o 2 sustituciones dentro de cada uno de EL2, EL3, EL7, EL8, y EL9; y en el que se encuentran 0 o 1 sustituciones dentro de cada uno de EL1, EL4, EL5, EL6, EL10, y EL11, con la condición de que al menos esté presente una sustitución.
10. El anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en el que se retiran 6, 8, o 10 epítopos de células T del dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada y/o en el que se retiran 5, 9, 10, o 11 epítopos de células T del dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera.
11. El anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 1 a 10, en el que dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:4, 6, 8, y 10; y/o en el que el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:14, 16, 18, y 20.
12. El anticuerpo del punto 10 u 11, en el que:
- el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:4 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:14; el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:4 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:20;

- el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:6 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:14;
- el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:6 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:16;
- 5 el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:6 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:20;
- el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:8 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:16;
- 10 el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:8 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:20;
- el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:10 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:14;
- el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:10 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:16; o
- 15 el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:10 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:20.
13. El anticuerpo del punto 12, en el que:
- el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:4 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:14;
- 20 el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:6 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:16;
- el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:10 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:16; o
- 25 el dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:10 y el dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera comprende una secuencia idéntica a SEQ ID NO:20.
14. El anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 1 a 13, en el que la afinidad de unión del anticuerpo por CD4 está dentro de un orden de magnitud mayor o menor que la afinidad de unión del anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ECACC 88050502.
- 30 15. El anticuerpo del punto 14, en el que la afinidad de unión del anticuerpo por CD4 está dentro de una cantidad dos veces mayor o menor que la afinidad de unión del anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ECACC 88050502.
16. El anticuerpo del punto 14 o 15, en el que el anticuerpo tiene una afinidad de unión mayor por CD4 que el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ECACC 88050502.
17. El anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 1 a 16,
- 35 (a) en el que el anticuerpo tiene una capacidad reducida de unirse a moléculas de MHC de clase II;
- (b) en el que el anticuerpo induce una respuesta inmunológica más débil en un sujeto;
- (c) en el que la proteína es un anticuerpo de longitud completa;
- (d) en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico; y/o
- 40 (e) en el que una o más sustituciones se encuentran dentro de las regiones más inmunogénicas de la molécula de origen.
18. El anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 1 a 17, en el que la región variable de cadena pesada está unida a un dominio de región constante de IgG4 humana, y en el que la región variable de cadena ligera está unida a un dominio de región constante kappa humana.
- 45 19. El anticuerpo del punto 18, en el que el anticuerpo se obtiene empleando los vectores de expresión pANTVhG4 y pANTVk.
20. Un método para preparar un anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 1 a 19, que comprende las siguientes

etapas:

- (i) proporcionar la secuencia de aminoácidos del anticuerpo que puede derivarse de la línea celular de hibridoma ECACC 88050502 o una parte de esta;
- 5 (ii) identificar uno o más epitopos de células T dentro de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo, o de una parte de este, mediante cualquier método que incluya la determinación de la unión de los péptidos a moléculas de MHC empleando técnicas *in vitro* o informáticas o ensayos biológicos;
- (iii) diseñar nuevos variantes de secuencia con uno o más aminoácidos dentro de los epitopos de células T identificados modificados de tal forma que se reduce sustancialmente o se elimina la unión de los péptidos a moléculas de MHC medida mediante técnicas *in vitro* o informáticas o ensayos biológicos; y
- 10 (iv) construir dichos variantes de secuencia mediante técnicas de ADN recombinante y ensayar dichos variantes de secuencia para identificar uno o más variantes de secuencia que tengan las propiedades del anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 1 a 20.
21. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 1 a 19, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 22. El uso de un anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 1 a 19, para la fabricación de un medicamento para tratar terapéuticamente un sujeto.
23. El uso del punto 22, en el que el medicamento es para tratar un trastorno autoinmunitario, en particular un trastorno autoinmunitario seleccionado de la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, vasculitis sistémica, uveítis, enfermedad inflamatoria del intestino y escleroderma; o en el que el medicamento es para inmunosuprimir un paciente antes o después del trasplante de un órgano, en particular un riñón.
- 20 24. El anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 1 a 19 para su uso en un método de tratamiento terapéutico.
25. El anticuerpo del punto 24, en el que el método es para tratar un trastorno autoinmunitario, en particular un trastorno autoinmunitario seleccionado de la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, vasculitis sistémica, uveítis, enfermedad inflamatoria del intestino y escleroderma; o en el que el método es para inmunosuprimir un paciente antes o después del trasplante de un órgano, en particular un riñón.
- 25 26. El uso o el anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 22 a 25, en el que dicho sujeto es un ser humano.
27. Un ácido nucleico que codifica un dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada y/o de cadena ligera de un anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 1 a 19.
- 30 28. El ácido nucleico del punto 27, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:3, 5, 7, 9, 13, 15, 17, y 19.
29. Un vector que comprende un ácido nucleico del punto 27 o 28.
30. El vector del punto 29, en el que el ácido nucleico está unido operablemente a una secuencia de control de la expresión.
31. El anticuerpo de uno cualquiera de estos puntos, en el que el anticuerpo es:
- 35 i) el anticuerpo 16H5.chimIgG4,
- ii) un anticuerpo que puede obtenerse a partir de una línea celular CD4.16H5.chimIgG4 depositada en DSMZ el 2 de diciembre de 2011.
32. Una célula hospedante que comprende un ácido nucleico del punto 27 o 28 y/o al menos un vector de uno cualquiera de los puntos 29 a 31.
- 40 33. Un método para preparar un anticuerpo de uno cualquiera de los puntos 1 a 19, que comprende cultivar la célula hospedante del punto 32 bajo condiciones que permiten la expresión bajo el control de una o más secuencias de control de la expresión adecuadas, y purificar dicho anticuerpo a partir del medio de la célula.
- 45 La presente invención también se refiere a realizaciones alternativas de las realizaciones descritas en la presente, en las que la expresión "ECACC 88050502" es reemplazada por "MAX.16H5/30F16H5". De modo similar, la presente invención se refiere además a realizaciones en las que la expresión "línea celular ECACC 88050502", tal como se emplea en la presente, o una expresión equivalente, es reemplazada por la expresión "línea celular MAX.16H5/30F16H5" o un término equivalente.

La presente invención también se refiere a realizaciones alternativas de las realizaciones descritas en la presente,

en las que la expresión "ECACC 88050502" es reemplazada por "CD4.16H5.chimlgG4". De modo similar, la presente invención se refiere además a realizaciones en las que la expresión "línea celular ECACC 88050502", tal como se emplea en la presente, o una expresión equivalente, es reemplazada por la expresión "línea celular CD4.16H5.chimlgG4" o un término equivalente.

5 Ejemplos

Ejemplo 1

Animales

Se criaron ratones donantes C57B1/6 CD4k/o, ratones C57B1/6 de tipo salvaje y ratones Balb/c de tipo salvaje receptores en the Animal Facility de la Universidad de Leipzig. Las razas de ratones se mantuvieron bajo condiciones convencionales. Los ratones C57B1/6 CD4k/o tienen un fondo C57B1/6 estable, en el que la molécula de CD4 murina está inactivada y expresan una CD4 humana. El transgén de CD4 incluye su propio promotor acoplado a un elemento potenciador de CD4 murino que conduce así la expresión específica de un subconjunto de células T. Las células CD8+ no están afectadas en ratones TTG. Además, estos ratones expresan la molécula HLA-DR3 además del complejo de MHC II murino. Los ratones TTG tienen un sistema inmunológico murino funcional completo que está modificado con respecto a CD4 y HLA-DR. Los ratones recibieron alimentos sin límites. Como donantes, los ratones C57B1/6 y Balb/c se adquirieron en Charles River (Sulzfeld, Alemania, <http://jaxmice.jax.org>).

Todos los ratones se alojaron, trataron o manipularon según las directrices de the University of Leipzig Animal Care Committee and the Regional Board of Animal Care for Leipzig (n.º de registro de experimentos con animales 28/08).

Análisis estadístico

20 Todos los datos se presentan como promedios \pm DE. El análisis estadístico y la presentación gráfica se realizaron empleando el programa informático SigmaPlot 10.0/SigmaStat 3.5 (SYSTAT, Erkrath, Alemania).

Protocolo de irradiación

25 Para la irradiación de los ratones, el aparato de rayos X (D3225, Orthovoltage, Gulmay Medical, Camberley, Reino Unido) se ajustó para la irradiación a animales. Cinco animales fueron irradiados en paralelo en un recipiente de plexiglás (dividido en cinco espacios de 0,5 cm x 64,0 cm), dependiendo de su peso. La dosis promedio de radiación fue de 8,5 Gy.

Preparación de las células de médula ósea y de los esplenocitos

30 Se obtuvieron células de médula ósea ("bone marrow cells", BMC) frescas de tibias y fémures de ratones C57B1/6 CD4k/o o de ratones C57B1/6 de tipo salvaje bajo condiciones estériles. Para ello se retiró la musculatura y los tendones cuidadosamente preparados del hueso y de los extremos distal y proximal. Con una aguja fina (0,4 x 19 mm), las células de médula ósea se enjuagaron con PBS estéril y se recolectaron en tubos de 50 ml. Se logró una única suspensión de células mediante una resuspensión cuidadosa a través de una aguja. Después, las células se lavaron una vez en PBS (1x) a 300 x g durante 10 min y se volvieron a resuspender en PBS (1x) para determinar los recuentos de células empleando una cámara de recuento y una tinción con disolución de tinción de Tuerk. Después de esto, las células de médula ósea se lavaron una vez más en PBS (1x) a 300 x g durante 10 min y el sedimento celular se resuspendió en medio esencial mínimo de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Perbio, Bonn, Alemania) sin FCS. Para la generación de una única suspensión de células de esplenocitos de los ratones C57B1/6 CD4k/o o los ratones C57B1/6 de tipo salvaje, se retiró el bazo inmediatamente bajo condiciones estériles después de la muerte de los ratones, se presionó contra un filtro de células (100 mm) y se recogió en un tubo de 50 ml en PBS (1x). La única suspensión de células se lavó dos veces en PBS (1x) a 300 x g durante 10 min. Después los eritrocitos se lisaron en tampón de lisis que contenía 0,155 moles de NH_4Cl , 0,01 moles de KHCO_3 y 0,01 moles de EDTA-Na (pH 7,3) en PBS estéril. Las células se volvieron a lavar, se resuspendieron en medio de cultivo DMEM sin FCS y se determinó el número de células. Las células de médula ósea y los esplenocitos se ajustaron al número de células deseado antes de la incubación con anticuerpos.

45 Tal como entenderán los expertos en la técnica, el uso de esplenocitos en los presentes ejemplos se realiza por razones operativas: realmente no se requiere una aplicación adicional de esplenocitos según la invención, en particular por lo que se refiere a sujetos humanos.

Incubación de anticuerpos

50 Para la incubación de los anticuerpos, la cantidad necesaria de anticuerpos Max16H5 se disolvió justo antes del uso hasta una concentración final de 1 mg/ml en DMEM (sin FCS). Después se incubaron $1,4 \times 10^8$ de células de médula ósea y $1,4 \times 10^8$ de esplenocitos de ratones C57B1/6 CD4k/o o C57B1/6 de tipo salvaje con 800 μg de Max16H5 en 15 ml de DMEM sin FCS durante 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Como control, también se incubaron células de médula ósea y esplenocitos de ratones C57B1/6 CD4k/o o de ratones C57B1/6 de tipo salvaje sin tratamiento con anticuerpos en DMEM sin FCS bajo las mismas condiciones. Después de 1 h de incubación, las

células se centrifugaron a 300 x g durante 10 min para sedimentarlas y se lavaron una vez en PBS (1x) a 300 x g durante 10 min para retirar los anticuerpos no unidos.

Trasplante de células

5 Para los experimentos de cotrasplante se añadieron 2×10^7 de células de médula ósea de ratones CD4k/o tratados con Max16H5 a 2×10^7 esplenocitos de ratones CD4k/o tratados con Max16H5. La concentración de células se ajustó a un volumen final de 150 μ l de NaCl al 0,9% estéril. Esto mismo se hizo para las células de médula ósea y los esplenocitos de ratones C57B1/6 de tipo salvaje tratados con Max16H5. Como control, se añadieron 2×10^7 de células de médula ósea de ratones CD4k/o a 2×10^7 esplenocitos no tratados de ratones CD4k/o, o 2×10^7 de células de médula ósea de ratones C57B1/6 de tipo salvaje a 2×10^7 esplenocitos de ratones C57B1/6 de tipo salvaje. A continuación, los injertos se trasplantaron de modo alogeneico mediante inyección intravenosa en la vena lateral de la cola de ratones receptores Balb/c de tipo salvaje letalmente irradiados. Se evaluó la supervivencia, los síntomas de GvHD según Cooke *et al.*, 1996, y los pesos cada día después del trasplante.

Citometría de flujo

15 Antes y después del trasplante, los ratones receptores Balb/c de tipo salvaje se analizaron mediante citometría de flujo.

Caracterización de los esplenocitos y las células de médula ósea de ratones donantes CD4k/o

20 Para el análisis citométrico, las células se incubaron con 2,5 μ l de anticuerpos monoclonales conjugados (CD3 murina-FITC, CD4-APC humana [ambos de Beckman Coulter, Krefeld, Alemania]; CD8 murina-PerCP, MHC-I (H-2D[b])-PE, CD4 murina-PECy7, CD19 murina-APCCy7 [BD Biosciences, Heidelberg, Alemania]). Tras 20 minutos de incubación se realizaron dos etapas de lavado en PBS/FBS al 1% (1250 rpm, 5 minutos, temperatura ambiente [TA]). Por último, el sedimento se resuspendió con 200 μ l de PBS. Además, se ensayó la viabilidad de los esplenocitos y las células de médula ósea antes del trasplante mediante tinción con 7-aminoactinomicina D (7AAD). Se incubaron 1×10^6 células con 5 μ l (0,25 μ g/ensayo) de 7AAD en 300 μ l de PBS durante 30 min a temperatura ambiente y se midió inmediatamente. Los datos se adquirieron en un citómetro de flujo BD FACSCantoII™ y se analizaron empleando el software BD FACSDIVATM (ambos de BD Biosciences, Heidelberg, Alemania).

Citometría de flujo y hematología de los ratones receptores Balb/c de tipo salvaje

30 Antes y después del procedimiento de trasplante, los ratones se analizaron mediante citometría de flujo. En momentos concretos se extrajo sangre (150 μ l) de la vena retro-orbital de cada ratón anestesiado con éter. La sangre se recogió a través de capilares heparinizados (Greiner Biochemica, Flacht, Alemania). Se determinó la concentración de hemoglobina empleando un contador de sangre para animales (SCIL, Viernheim, Alemania), que había sido calibrado para sangre de ratón dentro de las 2 horas siguientes a la extracción de sangre. Para el análisis citométrico se incubaron 100 μ l de células sanguíneas con 2,5 μ l de anticuerpos monoclonales conjugados según las muestras (CD4 murina-PECy7, MHC-I (H-2D[b])-PE, MHC-I (H-2K[d])-FITC, CD8 murina-PerCP, CD19 murina-APCCy7 [BD Biosciences, Heidelberg, Alemania]; CD3 murina-FITC, CD4 humana-APC [Beckman Coulter, Krefeld, Alemania]; HLA-DR3 humana-FITC [Immunotools, Friesoythe, Alemania]). Tras 20 minutos de incubación se realizó el lisado de los eritrocitos según las instrucciones de los fabricantes (disolución de lisado BD FACS [BD Biosciences, Heidelberg, Alemania]). Las muestras se lavaron dos veces añadiendo PBS/FBS al 1% (1250 rpm, 5 minutos, temperatura ambiente [TA]). Por último, el sedimento se resuspendió con 200 μ l de PBS. Para el análisis citométrico de FoxP3 murina para la detección de las células T reguladoras, se empleó un kit de detección de T_{reg} (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania). Se resuspendieron 1×10^6 células en 90 μ l de tampón MACS (FCS al 0,5%, EDTA 2 mM en PBS, [Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania]) y los marcadores de la superficie celular se tiñeron con 10 μ l de anticuerpos CD4-FITC y CD25-PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Después de una incubación en la oscuridad durante 10 min a 4 °C, las células se lavaron con 2 ml de tampón MACS y se centrifugaron a 300 x g durante 5 min a 4 °C. Después de retirar el sobrenadante, 1×10^6 células se permeabilizaron mediante una incubación durante 30 min a 4 °C en 1 ml de disolución de fijación/permeabilización recién preparada (que contiene formaldehído). Las células se lavaron en 2 ml de tampón MACS frío mediante centrifugación a 300 x g durante 5 min a 4 °C. Para la tinción de FoxP3 intracelular se realizó una etapa de permeabilización después de retirar el sobrenadante. Se lavaron 1×10^6 células con 2 ml de un tampón de permeabilización frío y se centrifugó a 300 x g durante 5 min a 4 °C. El sedimento celular se resuspendió en 80 μ l de tampón de permeabilización frío y se incubó durante 5 min a 4 °C. Después se añadieron 10 μ l de anticuerpo anti-FoxP3-APC (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), se mezcló cuidadosamente y se incubó durante 30 min a 4 °C. Las células se lavaron con 2 ml de un tampón de permeabilización frío y se centrifugaron a 300 x g durante 5 min a 4 °C, el sobrenadante se retiró y las células se resuspendieron en 100 μ l de tampón MACS. Los datos se adquirieron en un citómetro de flujo BD FACSCantoII™ y se analizaron empleando el software BD FACSDIVA™ (ambos de BD Biosciences, Heidelberg, Alemania).

Inmunohistología

Los órganos de los ratones se colocaron en un vaso de precipitado de acero inoxidable (que contenía 2-metilbutano;

Carl Roth, Karlsruhe, Alemania), se sumergieron en nitrógeno líquido durante 15 min y se conservaron a -80 °C hasta que estuvieron listos para los cortes. Los cortes se realizaron empleando un criostato (Leica Biosystems, Nussloch, Alemania); los objetos se trasladaron a un portaobjetos de supercongelación (Thermo Scientific, Braunschweig, Alemania) y se conservaron inmediatamente a -80 °C hasta el análisis inmunohistológico. Los portaobjetos se incubaron con H₂O₂ al 0,3% en p/v, se disolvieron en PBS durante 10 min en una cámara húmeda y después se lavaron tres veces con PBS. Los órganos se trataron con FBS al 10% en p/v en PBS durante 60 min a temperatura ambiente, se lavaron brevemente con PBS, se incubaron con una disolución de avidina (Dako North America, Carpinteria, EE. UU.) durante 10 min y se lavaron con PBS. Las preparaciones se incubaron con una disolución de biotina (Dako North America) durante 10 min, se lavaron con PBS, y se incubaron con el anticuerpo primario anti-CD4 humana (United States Biological, Massachusetts, EE. UU.) o con control de isotipo (IgG1 de rata, κ, BD Biosciences, San Diego, EE. UU.), diluidos 1:100, durante 1 h a TA. Después los portaobjetos se cubrieron con un anticuerpo secundario (anti-IgG₁ de rata de cabra conjugado con biotina, BD Biosciences, San Diego, EE. UU.), diluido 1:100, durante 30 min a TA y se lavaron con PBS. Los portaobjetos se cubrieron con estreptavidina-peroxidasa de rábano (BD Biosciences, San Diego, EE. UU.) durante 30 min, se lavaron con PBS tres veces (2 min para cada etapa de lavado) y se incubaron con una dilución de DAB (BD Biosciences, San Diego, EE. UU.) durante 5 min hasta que se logró una obvia intensidad de color y después se lavaron tres veces con ddH₂O. Las muestras se cubrieron con disolución de hemalaun de Mayer (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 1 min y después se lavaron con agua del grifo durante 10 min para visualizar la tinción azul. Los portaobjetos se hicieron pasar a través de una serie ascendente de alcohol (al 40-100% en p/v), se incubaron con xileno (Carl Roth) durante 5 min y, por último, se cubrieron con Entellan® (Merck). Los portaobjetos se analizaron bajo el microscopio (Zeiss, Axio, Imager A1, lentes del objetivo 920 EX Plan-Neofluar, AxioCam MRc5 Zeiss, AxioVision versión 4.6.3; Göttingen, Alemania).

Histología

El hígado, los huesos y el intestino de los ratones transgénicos se analizaron histológicamente. Los órganos se prepararon inmediatamente después de la muerte y se trasladaron a formol (al 4% en p/v; Merck) para la tinción con hematoxilina-eosina (HE) y caolín-anilina-naranja G (KAO). Las cajas de formol se mantuvieron en la oscuridad para evitar la precipitación del formol. Los huesos se incubaron en Osteosoft® durante al menos 7 días a temperatura ambiente. Todas las muestras se enjuagaron con agua del grifo durante 2 h y después se sumergieron en diluciones de alcohol del 70 al 100% en p/v durante 9 h. La incubación final se realizó con isopropanol (JT Baker, Deventer, Países Bajos) durante 1 h y durante la noche con metilbenzoato (Riedel de-Häen, Seelze, Alemania). Después de esto, los órganos se introdujeron en parafina durante 3 días y se cortaron (6 μm). Los portaobjetos se incubaron dos veces con xileno durante 5 min a TA, se hicieron pasar por una serie descendente de alcohol (al 100-50% en p/v) y, por último, se trasladaron a ddH₂O a TA. Los portaobjetos se colocaron en una disolución de hemalaun de Mayer durante 5 min y se lavaron con agua del grifo durante 10 min hasta alcanzar una tinción azul. Después de una incubación con eosina Y al 1% en p/v, los portaobjetos se hicieron pasar a través de una serie ascendente de alcohol (al 70-100% en p/v) y, por último, se cubrieron con Entellan® (Merck). Los portaobjetos se analizaron bajo el microscopio (Nikon, Eclipse TE2000-E 920, lentes del objetivo Plan Fluor 920/0.45 Ph1 DM ∞/0-2 WD 7.4 Histo, Software Nikon, LuciaG 5.00; Düsseldorf, Alemania). Los huesos se tiñeron con KAO tal como describe Halmi-Konecny.

Ejemplo 2

Se llevaron a cabo técnicas de ADN recombinante empleando métodos muy conocidos en la técnica y, según fuera apropiado, se siguieron las instrucciones del suministrador para el uso de las enzimas empleadas en estos métodos. Las fuentes de los métodos generales incluyen la bibliografía convencional, tales como los conocidos libros editados por Sambrook y Russel y por Ausubel. A continuación también se describen los métodos de laboratorio en detalle. Se usaron métodos informáticos, tales como los descritos en el documento WO9859244, para analizar las secuencias de cadena pesada y ligera variables de anti-CD4 de ratón para los péptidos que se predicen que se unirán a las moléculas de MHC de clase II (que se consideraron epitopos de células T).

Ejemplo 2a: Anticuerpo anti-CD4 quimérico

Se extrajo el ARNm de células de hibridoma de anti-CD4 de ratón empleando el kit de extracción de ARNm Poly A Tract System 1000 (Promega Corp., Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. El ARNm se sometió a transcripción inversa como sigue: para la cadena ligera kappa, se mezclaron 5,0 microlitros de ARNm con 1,0 microlitros de 20 pmol/microlitro de cebador MulgkVL-3' OL040 (tabla 2) y 5,5 microlitros de agua sin nucleasa (Promega Corp., Madison, WI). Para la cadena ligera lambda, se mezclaron 5,0 microlitros de ARNm con 1,0 microlitros de 20 pmol/microlitro de cebador MulgkVL-3' OL042 (tabla 2) y 5,5 microlitros de agua sin nucleasa (Promega Corp., Madison, WI). Para la cadena ligera gamma, se mezclaron 5 microlitros de ARNm con 1,0 microlitros de 20 pmol/microlitro de cebador MulgVH-3' OL023 (tabla 1) y 5,5 microlitros de agua sin nucleasa (Promega Corp., Madison, WI). Las tres mezclas de reacción se colocaron en el bloque precalentado del termociclador ajustado a 70 °C durante 5 minutos. Después se enfriaron en hielo durante 5 minutos antes de añadir a cada una 4,0 microlitros de tampón de reacción ImPromII 5x (Promega Corp., Madison, WI), 0,5 microlitros de inhibidor de ribonucleasa RNasin (Promega Corp., Madison WI), 2,0 microlitros de MgCl₂ 25 mM (Promega Corp., Madison WI), 1,0 microlitros de mezcla de dNTP 10 mM (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) y 1,0 microlitros de transcriptasa inversa Improm II (Promega Corp., Madison, WI). Las mezclas de reacción se incubaron a temperatura

ambiente durante 5 minutos antes de trasladarse a un bloque de PCR precalentado ajustado a 42 °C durante 1 hora. Después de este tiempo, la transcriptasa inversa se inactivó con calor mediante una incubación a 70 °C en un bloque de PCR durante 15 minutos.

5 Las secuencias de la cadena pesada y ligera se amplificaron a partir del ADNc como sigue: se preparó una mezcla maestra de PCR añadiendo 37,5 microlitros de 10x tampón de PCR Hi-Fi Expand (Roche, Mannheim, Alemania), 7,5 microlitros de mezcla de dNTP 10 mM (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) y 3,75 microlitros de ADN polimerasa Hi-Fi Expand (Roche, Mannheim, Alemania) a 273,75 microlitros de agua sin nucleasa. Esta mezcla maestra se dispensó en partes alícuotas de 21,5 microlitros a 15 tubos de reacción de PCR de pared fina sobre hielo. En seis de estos tubos se añadieron 2,5 microlitros de mezcla de reacción de transcriptasa inversa de MulgVH-3' y 1,0 microlitros de agrupaciones de cebadores 5' de cadena pesada HA a HF (véase la tabla 1 para las secuencias de los cebadores y los constituyentes de las agrupaciones de cebadores). A los otros siete tubos se les añadieron 2,5 microlitros de reacción de transcripción inversa de MulgVL-3' y 1,0 microlitros de agrupaciones de cebadores 5' de cadena ligera LA a LG (tabla 2). Al tubo final se le añadieron 2,5 microlitros de reacción de transcripción inversa de MulgVL-3' y 1,0 microlitros del cebador de cadena ligera lambda de MulgVL5'-LI. Las reacciones se colocaron en el bloque del termociclador y se calentaron hasta 95 °C durante 2 minutos. La reacción de PCR se realizó durante 40 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 30 segundos. Por último, los productos de la PCR se calentaron a 72 °C durante 5 minutos y después se mantuvieron a 4 °C.

Tabla 1

Código	Secuencia	Longitud	Nombre de la agrupación
OL007	ATGRASTTSKGGYTMARCTKGRTTT	25	MulgV _H 5'-HA
OL008	ATGRAATGSASCTGGGTYWTYCTCTT	26	MulgV _H 5'-HB
OL009	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCCCT	29	MulgV _H 5'-HC
OL010	ATGGCTGTCYTRGBGCTGYTCYTCTG	26	MulgV _H 5'-HC
OL011	ATGGVTTGGSTGTGGAMCTTGCYATTCCT	29	MulgV _H 5'-HC
OL012	ATGAAATGCAGCTGGRTYATSTTCTT	26	MulgV _H 5'-HD
OL013	ATGGRCAGRCTTACWTYYTCATTCCT	26	MulgV _H 5'-H-D
OL014	ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT	26	MulgV _H 5'-HD
OL015	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT	26	MulgV _H 5'-HE
OL016	ATGAAGWTGTGGBTRAACTGGRT	23	MulgV _H 5'-HE
OL017	ATGGRATGGASCKKIRTCTTTMTCT	25	MulgV _H 5'-HE
OL018	ATGAACTTYGGGYTSAGMTTGRRTT	25	MulgV _H 5'-HF
OL019	ATGTACTTGGGACTGAGCTGTGTAT	25	MulgV _H 5'-HF
OL020	ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG	23	MulgV _H 5'-HF
OL021	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG	28	MulgV _H 5'-HF
OL023	CCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG	26	MulgV _H 3'-2

20 (SEQ ID NO:70-85)

Tabla 2

Código	Secuencia	Longitud	Nombre de la agrupación
OL024	ATGRAGWCACAKWCYCAGGTCTTT	24	MuI _{gk} V _L 5' -LA
OL025	ATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT	25	MuI _{gk} V _L 5' -LB
OL026	ATGGAGWCAGACACACTSCTGYTATGGGT	29	MuI _{gk} V _L 5' -LC
OL027	ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGIWTCTT	32	MuI _{gk} V _L 5' -LD
OL028	ATGGGCWTC AAGATGRAGTCACAKWYYCWGG	31	MuI _{gk} V _L 5' -LD
OL029	ATGAGTGTGCYCACTCAGGTCCTGGS GTT	29	MuI _{gk} V _L 5' -LE
OL030	ATGTGGGGAYCGKTTYAMMCTTTTCAATTG	31	MuI _{gk} V _L 5' -LE
OL031	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC	28	MuI _{gk} V _L 5' -LE
OL032	ATGAGIMMKTCIMTTCAITTCYTGGG	26	MuI _{gk} V _L 5' -LF
OL033	ATGAKGTHCYCIGCTCAGYTYCTIRG	26	MuI _{gk} V _L 5' -LF
OL034	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG	25	MuI _{gk} V _L 5' -LF
OL035	ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT	27	MuI _{gk} V _L 5' -LF
OL036	ATGAAGTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT	29	MuI _{gk} V _L 5' -LG
OL037	ATGGATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT	29	MuI _{gk} V _L 5' -LG
OL038	ATGGTYCTYATVTCCTTGCTGTTCTGG	27	MuI _{gk} V _L 5' -LG
OL039	ATGGTYCTYATVTRCTGCTGCTATGG	27	MuI _{gk} V _L 5' -LG
OL040	ACTGGATGGTGGGAAGATGGA	21	MuI _{gk} V _L 3' -1
OL041	ATGGCCTGGAYTYCWCTYWTMYTCT	25	MuI _{gλ} V _L 5' -LI
OL042	AGCTCYTCWGWGGAIGGYGGRAA	23	MuI _{gλ} V _L 3' -1

(SEQ ID NO:86-104)

- 5 Los productos de la amplificación se clonaron en el vector pGEM-T Easy empleando el kit pGEM-T Easy Vector System I (Promega Corp., Madison WI) y se secuenciaron. Las secuencias de VH y VL de ratón resultantes se muestran como SEQ ID NO:1 y 2 (figura 12) y SEQ ID NO:11 y 12 (figura 13).

10 Para la generación de un anticuerpo quimérico, los genes de la región VH se amplificaron mediante PCR empleando los cebadores OL330 y OL331 (tabla 3); estos se diseñaron para introducirse en los sitios de enzimas de restricción 5' MluI y 3' HindIII empleando como molde ADN plasmídico procedente de uno de los clones de ADNc. A un tubo de PCR de 0,5 ml se le añadieron 5 microlitros de 10x tampón de PCR Hi-Fi Expand (Roche, Mannheim, Alemania), 1,0 microlitros de mezcla de dNTP 10 mM (Invitrogen, Paisley, Reino Unido), 0,5 microlitros de cebador OL330, 0,5 microlitros de cebador OL331, 1,0 microlitros de ADN molde y 0,5 microlitros de ADN polimerasa Hi-Fi Expand (Roche, Mannheim, Alemania) a 41,5 microlitros de agua sin nucleasa.

15

Tabla 3

Código		Secuencia	Longitud
OL	330	GATCACGCGTGTCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTC	39
OL	331	GTACAAGCTTACCTGAGGAGACGGTGACTGAGG	33

(SEQ ID NO:105-106)

- 5 Las regiones VL se amplificaron con un método similar empleando los oligonucleótidos OL332 y OL333 (tabla 4) para modificar los sitios de enzimas de restricción BssHII y BamHI. Las reacciones se colocaron en el bloque del termociclador y se calentaron hasta 95 °C durante 2 minutos. Se realizó la reacción en cadena con polimerasa (PCR) durante 30 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 30 segundos. Por último, los productos de la PCR se calentaron a 72 °C durante 5 minutos y después se mantuvieron a 4 °C. Los productos de la PCR de la región VH y VL después se clonaron en los vectores pANTVhG4 y pANTVk respectivamente (figura 11) en los sitios MluI/HinDIII y BssHII/BamHI, respectivamente. Ambos plásmidos pANTVhG4 y pANTVk son plásmidos basados en pAT153 y contienen un módulo de expresión de Ig humana. El módulo de cadena pesada en pANTVhG4 consiste en un gen de la región constante de IgG4 genómico humano dirigido por un promotor de hCMVie, con una región de poliA de IgG humana cadena abajo. El pANTVhG4 también contiene un gen dhfr de hámster dirigido por un promotor de SV40 con una región de poliA de SV40 cadena abajo.
- 10
- 15 El módulo de cadena ligera de pANTVk está formado por la región constante de kappa genómica humana dirigida por un promotor de hCMVie con una región de poliA de cadena ligera situada cadena abajo. Los sitios de clonación entre la secuencia conductora de Ig humana y las regiones constantes permiten la inserción de los genes de la región variable.

Tabla 4

Código		Secuencia	Longitud
OL	332	CATGGCGCGCGATGTGACATCCAGATGACTCAGTC	35
OL	333	TGCGGGATCCAAGTGAAGCAAAAGTTTAAATTCTACTCACGTCTCAGCTC CAGCTTGGTCC	63

(SEQ ID NO:107-108)

- 20 Se cotransfectaron células NS0 (ECACC 85110503, Porton, Reino Unido) con estos dos plásmidos mediante electroporación y se seleccionaron en DMEM (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) + FBS al 5% (Ultra low IgG, n.º de cat. 16250-078, Invitrogen, Paisley, Reino Unido) + penicilina/estreptomina (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) + metotrexato 100 nM (Sigma, Poole, Reino Unido). Se aislaron las colonias resistentes al metotrexato y el anticuerpo se purificó mediante una cromatografía de afinidad de proteína A empleando una columna de 1 ml HiTrap MabSelect Sure (GE Healthcare, Amersham, Reino Unido) usando las condiciones recomendadas por el fabricante.
- 25
- 30 Los sobrenadantes de NS0 se cuantificaron para la expresión de anticuerpos en un ELISA de IgG Fc/Kappa empleando IgG1/Kappa humana purificada (Sigma, Poole, Reino Unido) como patrón. Se revistieron placas Immunosorb de 96 pocillos (Nalgene, Hereford, Reino Unido) con un anticuerpo anti-IgG humana específico de Fc de ratón (I6260 Sigma, Poole, Reino Unido) diluido a 1:1500 en 1 x PBS (pH 7,4) a 37 °C durante 1 hora. Las placas se lavaron tres veces en PBS + Tween 20 al 0,05% antes de añadir las muestras y los patrones diluidos en BSA al 2%/PBS. Las placas se incubaron a TA durante 1 hora antes de lavar tres veces en PBS/Tween y añadir 100 µl/pocillo de anticuerpo de detección anti-cadena ligera kappa humana de cabra conjugado con peroxidasa (A7164 Sigma, Poole, Reino Unido) diluido 1:1000 en BSA al 2%/PBS. Las placas se incubaron a TA durante 1 hora antes de lavar cinco veces con PBS/Tween y se detectó el anticuerpo unido empleando el sustrato OPD (Sigma, Poole, Reino Unido). El ensayo se desarrolló en la oscuridad durante 5 minutos antes de detenerse mediante la adición de HCl 3 M. Después la placa de ensayo se leyó en un lector de placas MRX TCII (Dynex Technologies, Worthing, Reino Unido) a 490 nm.
- 35
- 40 El anticuerpo quimérico se ensayó en un ensayo de competición basado en ELISA empleando un anticuerpo anti-CD4 de ratón biotinilado empleando un kit de microbiotinilación B-Tag (Sigma, Poole, Reino Unido). Se premezcló una dilución en serie de anticuerpo IgG4 quimérico o anticuerpo de ratón control desde 10 µg/ml a 0,009 µg/ml con una concentración constante de anti-CD4 biotinilado (0,2 µg/ml) antes de incubarlo a 100 µl/pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente en una placa de microtitulación de fondo plano Nunc MaxiSorp de 96 pocillos (Fisher, Loughborough, Reino Unido) prerrevestida con 50 µl/pocillo de CD4 1 µg/ml. Se determinó la unión del mAb
- 45

biotinilado mediante la incubación durante 1 h a temperatura ambiente con 100 μ l/pocillo de una dilución 1/500 de estreptavidina-HRP (Sigma), seguido de una detección con 100 μ l/pocillo de sustrato OPD (Sigma). Después de detener la reacción con 50 μ l/pocillo de HCl 3 M se midió la absorbancia a 490 nm empleando un lector de placas MRX TC II de Dynex Technologies (Worthing, Reino Unido).

- 5 Los resultados obtenidos (figura 14) demuestran que los anticuerpos de IgG4 quimérico y anti-CD4 de ratón tienen unos perfiles de unión muy similares, con unos valores de CI50 de 0,25 μ g/ml y 0,18 μ g/ml, respectivamente. Por tanto, se han identificado y clonado las secuencias de la región variable correctas.

Ejemplo 2b: Diseño de anticuerpos anti-CD4 modificados

10 Se ensayaron por medios informáticos péptidos 9-meros secuenciales que abarcan la longitud completa de las regiones variables para la unión frente a un panel de 34 alelos de MHC de clase II. Las puntuaciones para cada alelo individual se normalizaron a una escala de 0 a 1, y una validación extensa con paneles de péptidos de unión a MHC de clase II conocidos ha demostrado que un valor de corte de 0,55 discrimina con eficacia los péptidos predichos para unirse y para no unirse. Con más detalle, se identificaron secuencias de unión a MHC de clase II potenciales dentro de los dominios variables usando el software iTope™. El software iTope™ predice las interacciones favorables entre las cadenas laterales de aminoácidos de un péptido y los bolsillos de unión específica dentro de los surcos de unión de 34 alelos de MHC de clase II humanos. La localización de los restos de unión clave se logra mediante la generación por medios informáticos de péptidos 9-meros que se solapan en un aminoácido y que abarcan la secuencia de proteína de ensayo. Cada 9-mero recibió una puntuación basándose en el potencial "de ajuste" y en las interacciones de las cadenas laterales de los aminoácidos con el surco de unión de las moléculas de MHC de clase II. Las puntuaciones de los péptidos calculadas por el software se encuentran entre 0 y 1. Los péptidos que producen una elevada puntuación promedio de unión (>0,55 en la función de puntuación de iTope™) se destacan, y si >50% de los péptidos de unión a MHC de clase II, es decir, 17 de los 34 alelos, tienen una alta afinidad de unión (puntuación >0,6), estos péptidos se definen como péptidos de unión a MHC de clase II "de alta afinidad promiscua", y se considera que tienen un riesgo elevado de contener epitopos de células T CD4+. Los péptidos de unión a MHC de clase II de afinidad moderada se unen a un alto número de alelos con alta afinidad, pero menor que los 17. Después se analizaron los ligantes de afinidad alta y moderada empleando el software iTope™ para determinar los cambios que pueden hacerse en la secuencia que reducirían o eliminarían la unión a los alelos de MHC de clase II. Cuando se realizan las selecciones de los aminoácidos, se consideró la gama de aminoácidos que se encuentran en la naturaleza en anticuerpos humanos en cualquier posición concreta. Como alternativa, pueden emplearse softwares de acceso público, por ejemplo,

ProPred (www.imtech.res.in/raghava/propred/),

Rankpep (bio.dfci.harvard.edu/RANKPEP/) o

NetMHCII (www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/)

35 Se identificaron diez péptidos de unión a MHC de clase II en la región variable de cadena pesada de ratón (tabla 5) y se identificaron once en la región variable de cadena ligera de ratón (tabla 6). Las tablas 5 y 6 listan las secuencias de unión a MHC de clase II identificadas y las series de variantes de secuencia que se emplearon en las secuencias de la figura 12 y la figura 13 para reducir la unión a MHC de clase II. Cuando se identifican las secuencias de unión a MHC de clase II, los aminoácidos en el péptido en las posiciones clave para la unión a MHC de clase II fueron reemplazados por aminoácidos alternativos para reducir o eliminar la unión a MHC de clase II. En algunos casos, es necesaria más de una mutación para eliminar completamente la unión y, en otros casos, la unión de MHC de clase II no puede eliminarse completamente aunque el número de alelos implicados sea pequeño y las puntuaciones de unión estuviesen cercanas al valor de corte.

Tabla 5

Ratón		VH4		VH3		VH2		VH1	
Secuencia	*	Secuencia	*	Secuencia	*	Secuencia	*	Secuencia	*
LQQSGTVLA	26	LQQSGTELK	13	LQQSGSELK	0	LQQSGSELK	0	LQQSGSELK	0
VLARPGASV	29	ELKRPGASV	0	ELKRPGASV	0	ELKRPGASV	0	ELKRPGASV	0
LARPGASVQ	20	LKRPGASVK	2	LKRPGASVK	2	LKRPGASVK	2	LKRPGASVK	2
MSCKASGYS	18	MSCKASGYT	7	MSCKASGYT	7	V_SCKASGYT	0	V_SCKASGYT	0
VKQRPQOGL	24	VKQAPQOGL	1	VKQAPQOGL	1	VKQAPQOGL	1	VRQAPQOGL	1
LTAVTSAST	17	LTAVTSAST	17	LTAVTSAST	17	LTADTSAST	4	ITRDTSAST	0
VTSASTAYM	31	VTSASTAYM	31	VTSASTAYM	31	DTSASTAYM	0	DTSASTAYM	0
LSSLTNEDS	20	LSSLTNEDS	20	LSSLTNEDT	2	LSSLTNEDT	2	LSSLTNEDT	2
LDYWGQGT	21	LDYWGQGT	21	LDYWGQGT	0	LDYWGQGT	0	LDYWGQGT	0
WGQGTTLTV	27	WGQGTTTV	0	WGQGTTLTV	0	WGQGTTLTV	0	WGQGTTLTV	0
SEQ ID NO: 21-30		SEQ ID NO: 42-55, 138							

(*) Número de alelos unidos

Tabla 6

Ratón		VK4		VK3		VK2		VK1	
Secuencia	*	Secuencia	*	Secuencia	*	Secuencia	*	Secuencia	*
IVLTQSPAI	27	IVLTQSPAI	27	IVLTQSPAT	3	IVLTQSPAT	3	IVLTQSPAT	3
VLTQSPAIM	11	VLTQSPAIM	11	VLTQSPATL	0	VLTQSPATL	0	VLTQSPATL	0
IMSASPGEK	10	IMSASPGEK	10	TL_SASPGEK	0	TL_SASPGEK	0	TL_SASPGEK	0
MSASPGEKV	24	MSASPGEKV	24	LSASPGEKV	2	LSASPGEKV	2	LSASPGEKV	2
LLIYDTSNL	6	LLIYDTSNL	6	LLIYDTSNL	6	LLIYDTSNL	6	ALIYDTSNL	0
LASGVPVRF	19	LASGVP_SRF	2	LASGVP_SRF	2	LASGVP_SRF	2	LASGVP_SRF	2
VRFIGSGSG	29	S_RFIGSGSG	0	S_RFIGSGSG	0	S_RFIGSGSG	0	S_RFIGSGSG	0
FIGSGSGTS	14	FIGSGSGTD	0	FIGSGSGTD	0	FSGSGSGTD	0	FSGSGSGTD	0
IGSGSGTSY	22	IGSGSGTDY	22	IGSGSGTDY	22	S_GSGSGTDY	0	S_GSGSGTDY	0
YSLTISRME	17	YSLTISSME	0	YSLTISSME	0	YSLTISSME	0	YSLTISSME	0
FGAGTKLEL	16	FGAGTKLEI	0	FGAGTKLEI	0	FGAGTKLEI	0	FGAGTKLEI	0
SEQ ID NO: 31-41		SEQ ID NO: 56-69							

5

(*) Número de alelos unidos

Ejemplo 2c: Generación de anticuerpos anti-CD4 modificados

Los genes de la región VH y VK del anticuerpo modificado inicial se generaron mediante mutagénesis de PCR de

solapamiento de las regiones variables anti-CD4 de ratón de origen a partir del ejemplo 2a (SEQ ID NO:1 (figura 12) y SEQ ID NO:11 (figura 13)). (Figura 12 y figura 13) empleando métodos conocidos en la técnica. Se construyeron otros variantes mediante mutagénesis de PCR de solapamiento a partir de SEQ ID NO:3 (figura 12) y SEQ ID NO:13 (figura 13). Los variantes ensamblados después se clonaron directamente en los vectores de expresión de la figura 11. Todos los clones se verificaron mediante secuenciación de ADN. Con más detalle, la mutagénesis de PCR se realizó como sigue: se diseñaron parejas de cebadores que abarcan la región de la secuencia de nucleótidos del molde que se va a alterar en ambas hebras de ADN sentido y antisentido. Los cebadores contienen la secuencia que se va a introducir/alterar, flanqueada por secuencias que son idénticas a la secuencia del molde y que sirven para anclar a los cebadores en la localización correcta. También fueron necesarios cebadores de los extremos 5' y 3' que contienen sitios de restricción adecuados para la clonación del producto de PCR mutado en los vectores de expresión (concretamente, MluI y HinDIII para el gen de VH, y BssHII y BamHI para el gen de VK). Las tablas 3, 4 y 7 listan todos los cebadores utilizados para la construcción de los variantes desinmunizados. Para la PCR de solapamiento, pequeños fragmentos del gen se amplifican mediante PCR individualmente y estos se solapan con fragmentos vecinos en sus extremos, y las mutaciones son introducidas por los cebadores en las regiones del solapamiento. Después los fragmentos cortos de PCR se purifican y se ensamblan en una única reacción de PCR empleando los cebadores de los extremos 5' y 3'. Para crear los genes del variante 4, se emplearon las regiones variables murinas como molde y, para todos los variantes siguientes, se emplearon los genes del variante 4 como molde para las reacciones de PCR: para VH del variante 4, se realizaron dos PCR individuales empleando OL335+OL337 y OL336+OL338, y los fragmentos se unieron empleando OL334+OL338. Para VH del variante 3, se realizaron dos PCR individuales empleando OL339+OL341 y OL340+OL342, y los fragmentos se unieron empleando OL339+OL342. Para VH del variante 2, se realizaron tres PCR individuales empleando OL330+OL344, OL343+OL346 y OL354+OL342, y los fragmentos se unieron empleando OL330+OL342. Para VH del variante 1, se realizaron tres PCR individuales empleando OL339+OL348, OL347+OL350 y OL349+OL342, y los fragmentos se unieron empleando OL339+OL342. Para VK del variante 4, se realizaron cuatro PCR individuales empleando OL332+OL352, OL351+OL354, OL353+OL356, y OL355+OL357, y los fragmentos se unieron empleando OL332+OL357. Para VK del variante 3, se realizó una PCR empleando OL358+OL357. Para VK del variante 2, se realizaron dos PCR individuales empleando OL358+OL360 y OL359+OL357, y los fragmentos se unieron empleando OL358+OL357. Para VK del variante 1, se realizaron dos PCR individuales empleando OL358+OL362 y OL361+OL357, y los fragmentos se unieron empleando OL358+OL357. Las condiciones de la PCR usadas son como se describió en el ejemplo 2a para la amplificación de los genes de la región variable quimérica. Los fragmentos de la PCR generados se digirieron con MluI y HinDIII para los genes de VH, o BssHII y BamHI para los genes de VK y se clonaron en los vectores de expresión apropiados.

Tabla 7

Código	Secuencia	Longitud
OL334	GTTGCTACGCGTGTCCACTCCGAGGTTTCAGCTCCAGCAGTCTGGGACTGaGCTGaaAAGGCCTGG	65
OL335	ACTGaGCTGaaAAGGCCTGGGGCTTCCGTGaAGATGTCTCTGCAAGGCTTCTGGCTACAcCTTTGC	65
OL336	ACAGGTCTACAATGGATTGG	21
OL337	CCAATCCATTGTAGACCCTGTCCAGGggcCTGTTTTA	37
OL338	CCCAGAAAGCTTACCTGAGGAGACTGTGAcAGTGGTGCC	39
OL339	GTTGCTACGCGTGTCCACTCCGAGGTTTCAGCTCCAGCAGTCTGGGtCTGAGCTGAAAAGG	60
OL340	CAAATGAGGACaCcGCGGTCTATT	24
OL341	AATAGACCGCgGtGTCTCATTTG	24
OL342	CCCAGAAAGCTTACCTGAGGAGACTGTGACAagGGTGCC	39
OL343	CTTCCGTGAAGgTGTCTCTGCAAGGC	25
OL344	GCCTTGCAAGAcCTTACGGAAG	25
OL345	AACTGACTGCAGaCACATCCGCCAG	25
OL346	CTGGCGGATGTGtCTGCAGTCAGTT	25
OL347	TGCACTGGGTAAgACAGGCCCTGG	25
OL348	CCAGGGCCTGTtTACCCAGTGCA	25
OL349	GTTCAAGGACAAGGCCAAAaTcACTagAGACACATCCGCCAGCACT	46
OL350	AGTGCTGGCGGATGTGTCTctAGTgAtTTTGGCCTGTCTCTTGAAC	46
OL351	CTCCAGGGGAGAAGGcCGCCATGACC	26
OL352	GGTCATGGCGgCCTTCTCCCTGGAG	26
OL353	TCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTtCTCGCTTCA	51

OL354	GTTGGATGTGTCATAAATCAGGA	23
OL355	TCTGGGACCgATTACTCTCTACAATCAGCaGcATGGAGGCTG	43
OL356	CAGCCTCCATgCtGCTGATTGTGAGAGAGTAATcGGTCCCAGA	43
OL357	ATTGCGGGATCCAACCTGAGGAAGCAAAGTTTAAATTTCTACTCACGTTTgAtCTCCAGCTTG	61
OL358	CCCAGGCGCGCATGTCAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAAcCCTGTCTGCA	55
OL359	TTCTCGCTTCAGcGGCAGTGGG	22
OL360	CCCCTGCCgCTGAAGCGAGAA	22
OL361	CTCCCCCAGAgcCCTGATTTAT	22
OL362	ATAAATCAGGgCTCTGGGGGAG	22

(SEQ ID NO:109-137)

5 Todas las combinaciones de cadenas pesada y ligera de los variantes (es decir, un total de 16 apareamientos) se transfectaron de modo estable en células NS0 mediante electroporación. Las células transfectadas se seleccionaron inicialmente empleando metotrexato 100 nM, se expandieron en metotrexato 200 nm y se ensayaron para la expresión de IgG como en el ejemplo 2a. No se observó expresión con los variantes que poseían la cadena VK3 o con los variantes VH3/VK1 y VH1/VK2. Las líneas con la mejor expresión para cada variante se expandieron y se congelaron en nitrógeno líquido. Se purificaron los variantes de anticuerpos anti-CD4 humana a partir de las transfecciones estables de NS0 a partir de los sobrenadantes del cultivo celular mediante una cromatografía de afinidad de proteína A. Se ajustó el pH de los sobrenadantes con 0,1 volúmenes de 10x PBS, pH 7,4, y se hicieron pasar sobre columnas de 1 ml Mab Select Sure Protein A (GE Healthcare, Amersham, Reino Unido). Las columnas se lavaron con 10 volúmenes de PBS, pH 7,4, antes de la elución con tampón citrato 50 mM, pH 3,0. Se recogieron fracciones de 1 ml e inmediatamente se neutralizaron con 0,1 ml de Tris-HCl 1 M, pH 9,0. Las fracciones que contenían proteínas (según se mide mediante la absorbancia a 280 nm) se reunieron, se cambió el tampón a PBS, pH 7,4, y los anticuerpos purificados se conservaron a +4 °C. Las concentraciones de los anticuerpos purificados se midieron mediante la absorbancia de UV a 280 nm. Los anticuerpos purificados se ensayaron para la unión a su diana, CD4 humana, mediante ELISA de competición. Se revistieron durante la noche placas de microtitulación de fondo plano Nunc MaxiSorp de 96 pocillos (Fisher) a 4 °C con 50 µl/pocillo de CD4 1 µg/ml en PBS, pH 7,4. Se generaron titulaciones por duplicado de muestras de anticuerpos de ratón y anticuerpos sin epitopos (en el intervalo de 0,005 µg/ml a 12 µg/ml) y se mezclaron con una concentración constante (0,2 µg/ml) de anticuerpo de ratón biotinilado en PBS, pH 7,4/BSA al 2%. Las titulaciones (volumen final de 100 µl/pocillo) se añadieron a placas de ensayo prelavadas (4x con PBS, pH 7,4/Tween 20 al 0,05%) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después las placas se lavaron como se indicó anteriormente y se añadieron 100 µl/pocillo de una dilución 1/500 de estreptavidina HRP (Sigma) en PBS, pH 7,4/Tween 20 al 0,05%, y se incubaron durante 1 hora más a temperatura ambiente. Después de otro lavado, se detectó el anticuerpo de ratón biotinilado unido con 100 µl/pocillo de sustrato de 3,3'-5,5' tetrametilbencidina (Sigma). Después de detener la reacción con 50 µl/pocillo de HCl 3 M se midió la absorbancia a 450 nm empleando un lector de placas Dynex Technologies MRX TC II y se compararon las curvas de unión de los anticuerpos de ensayo con el patrón de referencia de ratón y el anticuerpo quimérico purificado. Los resultados se muestran en la figura 15 y la figura 16. La absorbancia se representó gráficamente frente a la concentración de la muestra y se ajustaron líneas rectas entre cada uno de los conjuntos de datos. Se usaron las ecuaciones de las líneas para calcular la concentración requerida para inhibir la unión del anticuerpo de ratón biotinilado a CD4 en 50% (CI50). Los valores de CI50 de las muestras de ensayo se dividieron entre el del anticuerpo de ratón para calcular la diferencia en número de veces en las eficacias de unión. Estos valores se indican en la tabla 8, que demuestra que siete de los anticuerpos (destacados con subrayado) tienen una unión en al menos de dos veces con respecto al anticuerpo de referencia de ratón, y que cuatro anticuerpos (VH1/VK1, VH2/VK2, VH4/VK2 y VH4/VK4) muestran una unión mejorada.

Tabla 8

Unión relativa de los variantes de anti-CD4				
	VK1	VK2	VK3	VK4
VH1	<u>0,14</u>	-	-	5,06
VH2	8,66	<u>0,96</u>	-	<u>1,44</u>
VH3	-	<u>1,77</u>	-	<u>1,44</u>
VH4	3,89	<u>0,73</u>	-	<u>0,49</u>

Listado de referencias bibliográficas

- Documento DE 3919294
- Documento EP 1 454 137
- Documento US 20030153043
- 5 Documento WO 199106667
- Documento WO 1998/59244
- Documento WO 2000/34317
- Documento WO 2004/112835
- 10 Aschan, J., Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: current status and future outlook, *Br. Med Bull.*, 77-78, 23-36 (2006).
- Auletta, J. J. y Cooke, K. R., Bone marrow transplantation: new approaches to immunosuppression and management of acute graft-versus-host disease, *Curr. Opin. Pediatr.*, 21, 30-38 (2009).
- Bacigalupo, A., Frassoni, F. y Van Lint, M. T., Bone marrow or peripheral blood as a source of stem cells for allogeneic transplantation, *Haematologica*, 87, 4-8 (2002).
- 15 Bates, J. S., Engemann, A. M. y Hammond, J. M., Clinical utility of rituximab in chronic graft-versus-host disease, *Ann. Pharmacother.*, 43, 316-321 (2009).
- Benekli, M. *et al.*, Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3), methylprednisolone and cyclosporine for acute graft-versus-host disease prophylaxis in allogeneic bone marrow transplantation, *Bone Marrow Transplant*, 38, 365-370 (2006).
- 20 Boon *et al.* (2002), *Toxicology*, 172:191-203.
- Bowers, K., Pitcher, C. y Marsh, J. M., CD4:A co-receptor in the immune response and HIV infection, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29, 871-875 (1997).
- Chatenoud, L., Waldmann, H. y Emrich, F., Tolerance induction in the adult: 'danger' at Le Bischenberg, *Immunol. Today*, 16, 121-123 (1995).
- 25 Chen, H. R. *et al.*, CD25 monoclonal antibody for GVHD prophylaxis in non-T-cell depleted haploidentical bone marrow transplantation for treatment of childhood leukemia, *Zhonghua Er. Ke. Za Zhi.*, 42, 294-298 (2004).
- Chester, K. A. y Hawkins, R. E., Clinical issues in antibody design, *Trends Biotechnol.*, 13, 294-300 (1995).
- Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, 1991-1997.
- 30 Cooke K. R., Kobzik L., Martin T. R., Brewer J., Delmonte J., Crawford J. M. *et al.*, An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation .1. The roles of minor H antigens and endotoxin, *Blood*, 88(8):3230-3239 (1996).
- Emrich, F. *et al.*, An anti-CD4 antibody for treatment of chronic inflammatory arthritis, *Agents Actions Suppl.*, 32, 165-170 (1991a).
- 35 Emrich, J., Seyfarth, M., Fleig, W. E. y Emrich, F., Treatment of inflammatory bowel disease with anti-CD4 monoclonal antibody, *Lancet*, 338, 570-571 (1991b).
- Fehervari, Z., Cooke, A., Brett, S. y Turner, J., Perturbation of naive TCR transgenic T cell functional responses and upstream activation events by anti-CD4 monoclonal antibodies, *Eur. J. Immunol.*, 32, 333-340 (2002).
- 40 Harding, S., Lipp, P. y Alexander, D. R., A therapeutic CD4 monoclonal antibody inhibits TCR-zeta chain phosphorylation, zeta-associated protein of 70-kDa Tyr319 phosphorylation, and TCR internalization in primary human T cells, *J. Immunol.*, 169, 230-238 (2002).
- Harlow, E. y Lane D. (2006), *Antibody purification on protein A or protein G columns*, Cold Spring Harb. Protoc., 2006, doi:10.1101/pdb.prot4283.
- Higuchi *et al.*, 1988, *Nucleic Acids Res.*, 16:7351
- Hosono, M. *et al.*, Human/mouse chimeric antibodies show low reactivity with human anti-murine antibodies (HAMA),

- Br. J. Cancer, 65, 197-200 (1992).
- Isaacs J. D. (1990), Sem. Immunol., 2: 449-456.
- 5 Ji, S. Q. *et al.*, Anti-CD25 monoclonal antibody (basiliximab) for prevention of graft-versus-host disease after haploidentical bone marrow transplantation for hematological malignancies, Bone Marrow Transplant, 36, 349-354 (2005).
- Kabat *et al.* (1991), Sequences of proteins of immunological interest, 5^a ed., publicación NIH n.º 91-3242).
- Kameda, H. y Takeuchi, T., Rheumatoid arthritis, Nippon Rinsho, 67, 495-499 (2009).
- Kern *et al.* (1998), Nature Medicine, 4:975-978.
- 10 Kestendjieva, S. *et al.*, Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord, Cell Biol. Int., 32, 724-732 (2008).
- Knop, S. *et al.*, Treatment of steroid-resistant acute GVHD with OKT3 and high-dose steroids results in better disease control and lower incidence of infectious complications when compared to high-dose steroids alone: a randomized multicenter trial by the EBMT Chronic Leukemia Working Party, Leukemia, 21, 1830-1833 (2007).
- 15 Kohlhaw, K. *et al.*, The monoclonal anti-CD4 antibody R1B5/2 induces donor-specific tolerance in the high-responder liver transplant model in the rat, Transplant. Proc., 33, 2371-2373 (2001).
- Kwok *et al.* (2001), TRENDS in Immunol., 22:583-588.
- Laub, R. *et al.*, Anti-human CD4 induces peripheral tolerance in a human CD4+, murine CD4-, HLA-DR+ advanced transgenic mouse model, J. Immunol., 169, 2947-2955 (2002).
- 20 Laub, R. *et al.*, A multiple transgenic mouse model with a partially humanized activation pathway for helper T cell responses, J. Immunol. Methods, 246, 37-50 (2000).
- Madrenas, J., Schwartz, R. H. y Germain, R. N., Interleukin 2 production, not the pattern of early T-cell antigen receptor-dependent tyrosine phosphorylation, controls anergy induction by both agonists and partial agonists, Proc., Natl. Acad. Sci. U. S. A., 93, 9736-9741 (1996).
- Marshall *et al.* (1994), J. Immunol., 152:4946-4956.
- 25 O'Sullivan *et al.* (1990), J. Immunol., 145:1799-1808.
- Reinke, P. *et al.*, Anti-CD4 therapy of acute rejection in long-term renal allograft recipients, Lancet, 338, 702-703 (1991).
- Reinke, P. *et al.*, Anti-CD4 monoclonal antibody therapy of late acute rejection in renal allograft recipients--CD4+ T cells play an essential role in the rejection process, Transplant. Proc., 27, 859-862 (1995).
- 30 Robadey *et al.* (1997), J. Immunol., 159:3238-3246.
- Schroff *et al.* (1985), Cancer Res., 45:879-885.
- Senolt, L., Vencovsky, J., Pavelka, K., Ospelt, C. y Gay, S., Prospective new biological therapies for rheumatoid arthritis, Autoimmun. Rev. (2009).
- Stern *et al.* (1994), Nature, 368:215-221.
- 35 von Bonin, M. *et al.* Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium, Bone Marrow Transplant, 43, 245-251 (2009).

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método *in vitro* para modificar un injerto de células que contiene células inmunológicas para lograr una tolerancia dentro de las células inmunológicas trasplantadas frente al tejido de receptor tras el trasplante de dicho injerto modificado, en el que el método comprende las etapas de:
- 5 a) incubar un injerto de células que contiene células inmunológicas con un anticuerpo anti-CD4, en el que dicha incubación se realiza durante 1 minuto a 7 días,
- b) retirar el anticuerpo no unido de dicho injerto mediante el lavado de dicho injerto,
- en el que dicho injerto comprende células inmunológicas que portan el antígeno CD4, y en el que los anticuerpos anti-CD4 se unen del 40% al 100% de los epitopos de CD4 accesibles de dicho injerto modificado.
- 10 2.- El método de la reivindicación 1, en el que dicha incubación se realiza:
- i) de 1 a 150 minutos, en particular de 5 minutos a 150 minutos, más en particular de 10 minutos a 150 minutos, más en particular de 30 minutos a 150 minutos, más en particular de 40 minutos a 120 minutos, más en particular de 45 minutos a 90 minutos, en especial de 50 minutos a 70 minutos; o
- 15 ii) de 150 minutos a 7 días, en particular de 150 minutos a 5 días, más en particular de 150 minutos a 3 días, más en particular de 150 minutos a 1 día, en especial de 150 minutos a 8 horas.
- 3.- El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha incubación se realiza con una cantidad de anticuerpo de 0,1 µg a 100 mg, en particular:
- 20 i) cuando el injerto es una suspensión de células, con una concentración de anticuerpo de 0,1 µg/ml de suspensión de células a 150 µg/ml de suspensión de células, en particular de 7 µg/ml de suspensión de células a 100 µg/ml de suspensión de células, más en particular de 30 µg/ml de suspensión de células a 100 µg/ml de suspensión de células, en especial de 40 µg a 60 µg/ml de suspensión de células; o
- ii) cuando el injerto es un tejido o un órgano, con una concentración de anticuerpo de 0,1 mg a 10 mg, en particular de 1 mg a 10 mg, más en particular de 2 mg a 9 mg, más en particular de 3 mg a 8 mg, en especial de 4 mg a 6 mg.
- 4.- El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho métodos es:
- 25 i) para reducir la probabilidad de uno cualquiera del grupo que consiste en GvHD, rechazo del injerto por el donante, y rechazo de órganos, en particular, de GvHD, tras el trasplante de dicho injerto;
- ii) para lograr una tolerancia o una tolerancia parcial dentro del tejido del receptor frente al injerto modificado tras el trasplante de dicho injerto modificado; y/o
- iii) para silenciar la activación de células dentro de dicho injerto.
- 30 5.- El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho injerto:
- i) se selecciona del grupo que consiste en una suspensión de células, un tejido y un órgano y/o
- ii) comprende células madre.
- 6.- El método de la reivindicación 5, en el que dicho injerto se selecciona del grupo que consiste en una suspensión de células que comprende células de la médula ósea, células de la médula ósea no adherentes, células de sangre periférica, células de sangre del cordón umbilical, células procedentes de la gelatina de Wharton, células derivadas de la placenta, células derivadas de la raíz del pelo y/o células derivadas de tejido graso; una suspensión de células que comprende linfocitos, monocitos y/o macrófagos; un tejido que contiene células madre; un órgano que contiene células madre; un tejido que contiene células inmunológicas; y un órgano que contiene células inmunológicas.
- 7.- Un injerto de células modificado que contiene células inmunológicas, en el que dicho injerto:
- 40 i) puede obtenerse según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y
- ii) comprende anticuerpos anti-CD4 unidos del 40% al 100% de los epitopos de CD4 accesibles de dicho injerto,
- en el que dicho injerto comprende células madre,
- y en el que dicho injerto comprende células inmunológicas que portan el antígeno CD4.
- 8.- El injerto modificado según la reivindicación 7 para su uso en medicina.
- 45 9.- El injerto modificado según la reivindicación 7 para su uso en un método para tratar, en un sujeto, una o más

enfermedades que pueden tratarse mediante trasplante.

10.- El injerto modificado o el injerto modificado para el uso de la reivindicación 8 o 9, en el que dicho injerto se selecciona del grupo que consiste en una suspensión de células, un tejido y un órgano.

5 11.- El injerto modificado o el injerto modificado para el uso de la reivindicación 10, en el que dicho injerto se selecciona del grupo que consiste en una suspensión de células que comprende células de la médula ósea, células de la médula ósea no adherentes, células de sangre periférica, células de sangre del cordón umbilical, células procedentes de la gelatina de Wharton, células derivadas de la placenta, células derivadas de la raíz del pelo y/o células derivadas de tejido graso; una suspensión de células que comprende linfocitos, monocitos y/o macrófagos; un tejido que contiene células madre; un órgano que contiene células madre; un tejido que contiene células inmunológicas; y un órgano que contiene células inmunológicas.

12.- El injerto modificado para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el tratamiento:

i) implica la reducción en la probabilidad de desarrollar uno cualquiera del grupo que consiste en GvHD, rechazo del injerto por el donante, y rechazo de órganos, en particular, de GvHD, tras el trasplante de dicho injerto; y/o

15 ii) implica lograr una tolerancia dentro de las células inmunocompetentes trasplantadas frente al tejido del receptor tras el trasplante de dicho injerto modificado;

iii) implica lograr una tolerancia o una tolerancia parcial dentro del tejido del receptor frente al injerto modificado tras el trasplante de dicho injerto modificado; y/o

iv) es para silenciar la activación de células dentro de dicho injerto.

20 13.- El injerto modificado para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que el injerto es una suspensión de células, y en el que se administra una cantidad de 2×10^6 células a 2×10^{10} células nucleadas, en particular de 4×10^6 a 1×10^9 células nucleadas, más en particular de 1×10^7 a 1×10^8 células nucleadas a dicho sujeto.

14.- El método, el injerto modificado, o el injerto modificado para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo anti-CD4:

25 i) se selecciona del grupo que consiste en Max16H5, OKT4A, OKTcdr4a, cMT-412, YHB.46, en particular en el que dicho anticuerpo anti-CD4 es Max16H5; o

ii) es el anticuerpo 30F16H5; o

iii) puede obtenerse a partir de una línea celular depositada con n.º de registro ECACC 88050502; o

30 iv) puede obtenerse a partir de una línea celular MAX.16H5/30F16H5 depositada en DSMZ el 2 de diciembre de 2011, con n.º de registro DSM ACC3148; o

v) es el anticuerpo 16H5.chimIgG4; o

vi) puede obtenerse a partir de una línea celular CD4.16H5.chimIgG4 depositada en DSMZ el 2 de diciembre de 2011, con n.º de registro DSM ACC3147; o

vii) es un anticuerpo que comprende el VH y el VK del anticuerpo 16H5.chimIgG4; o

35 viii) es un anticuerpo que comprende un VH y un VK de un anticuerpo que puede obtenerse a partir de una línea celular CD4.16H5.chimIgG4 depositada en DSMZ el 2 de diciembre de 2011, con n.º de registro DSM ACC3147; o

ix) es un anticuerpo que comprende una combinación de un VH de los descritos en la figura 12, y de un VK de los descritos en la figura 13, en particular en la que dicha combinación se selecciona de VH1/VK1, VH2/VK2, VH4/VK2 y VH4/VK4, en especial en la que dicha combinación es VH2/VK2.

40 15.- El método, el injerto modificado, o el injerto modificado para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho injerto se incuba además con moléculas bioactivas solubles, en particular con agentes que estimulan la inmunosupresión, la intolerancia y/o la formación de células T reguladoras, en especial con un agente seleccionado del grupo que consiste en IL-2, TGF- β , rapamicina, ácido retinoico, ligando 4-1BB, y anticuerpos anti-CD28, o cualquiera de sus combinaciones.

45

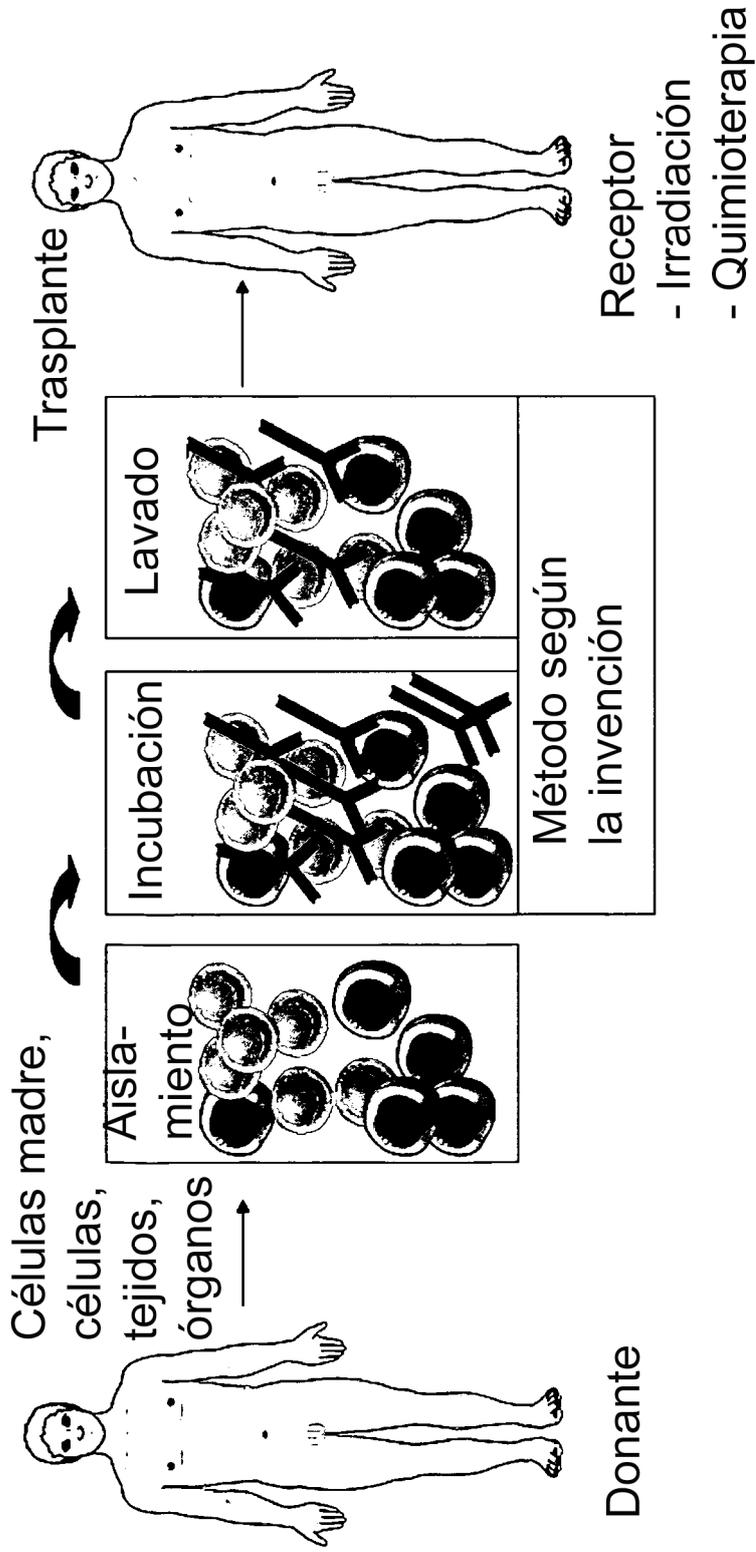
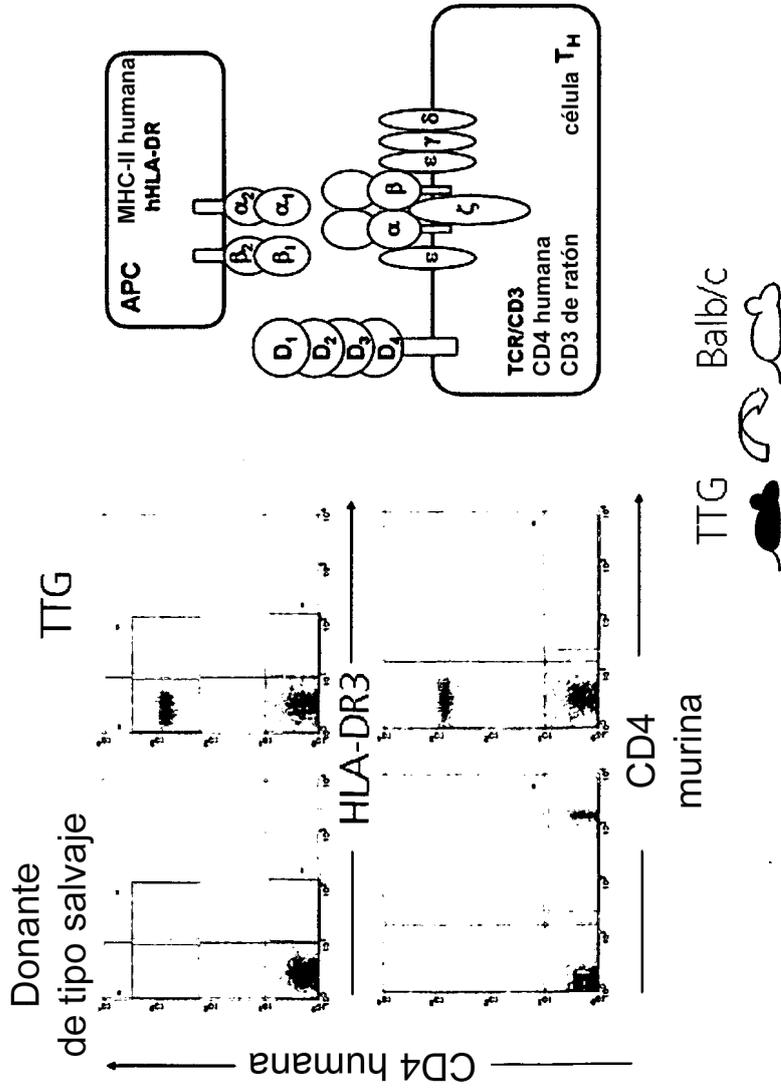


Figura 1



HLA-DR3/CD4 humana: hematopoyesis del donante
CD4 murina: hematopoyesis del hospedante

Figura 2

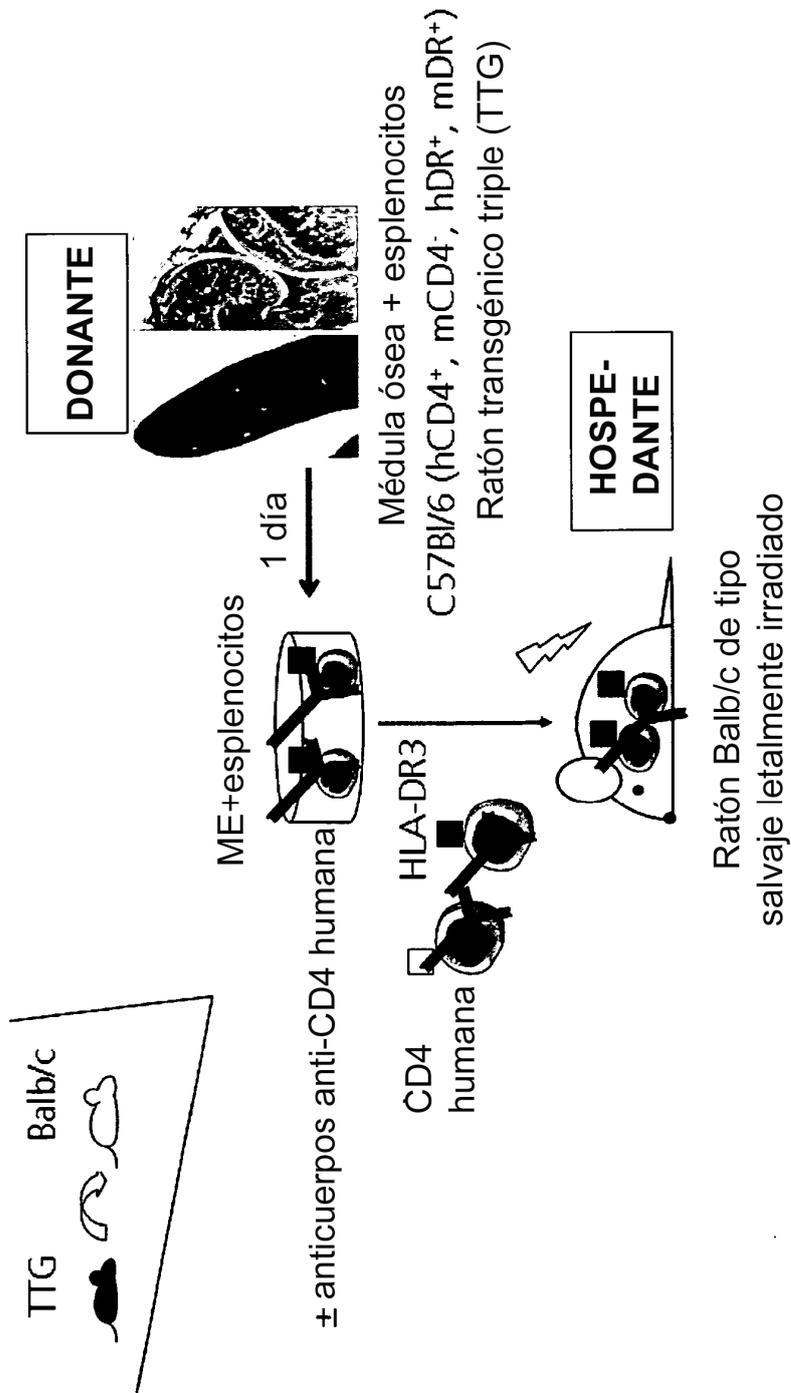


Figura 3

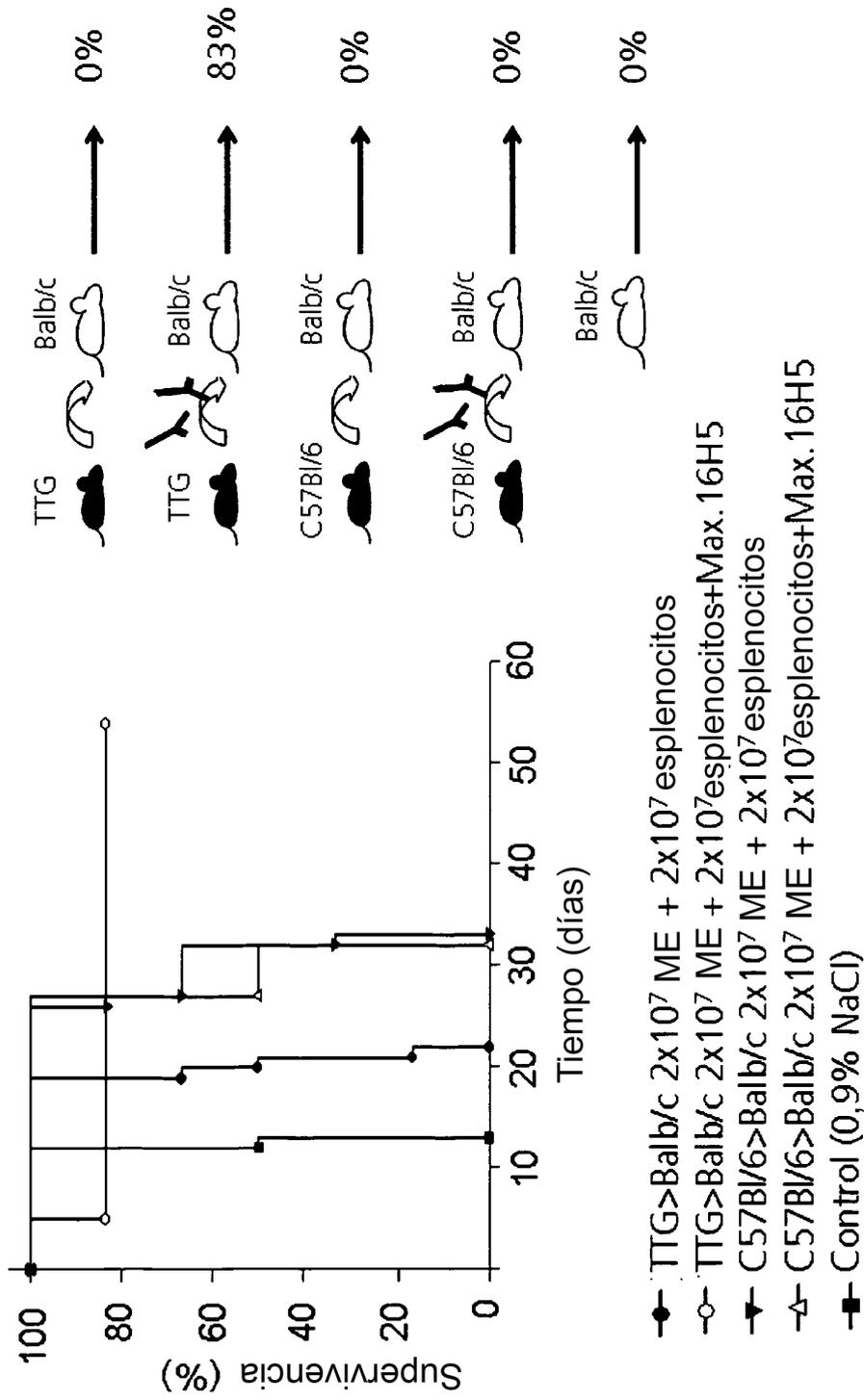


Figura 4

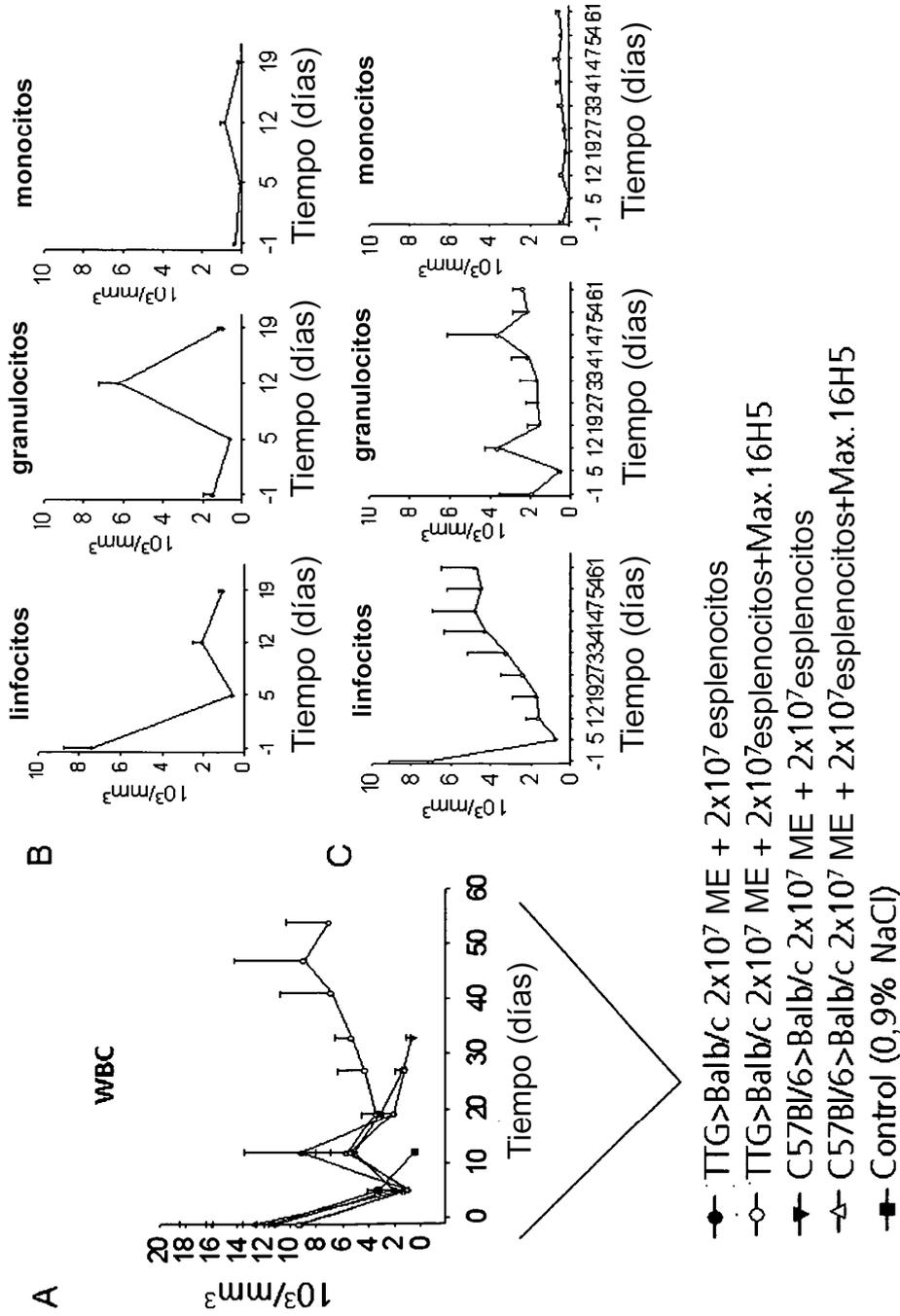
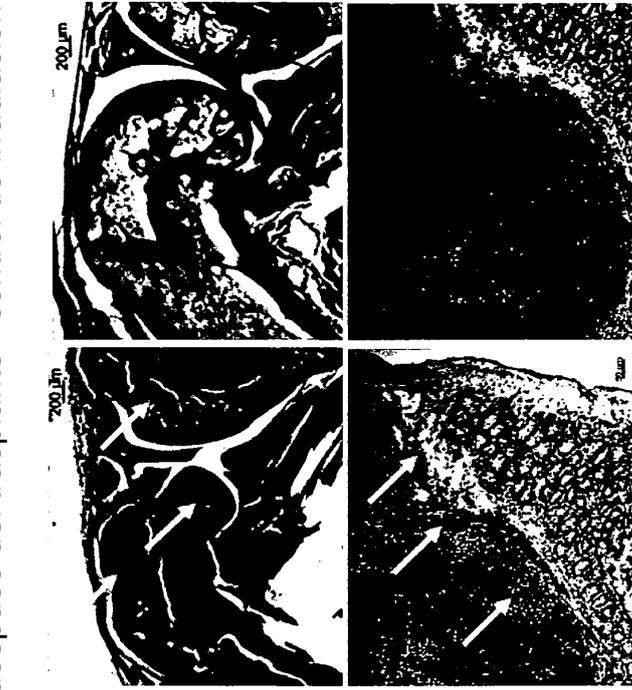
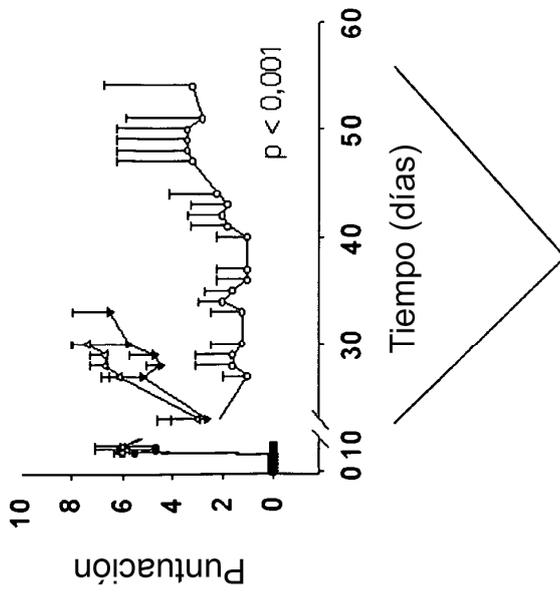


Figura 5

después del trasplante control de irradiación



Puntuación de GvHD



- TTG>Balb/c 2x10⁷ ME + 2x10⁷ esplenocitos
- TTG>Balb/c 2x10⁷ ME + 2x10⁷ esplenocitos+Max. 16H5
- ▲ C57Bl/6>Balb/c 2x10⁷ ME + 2x10⁷ esplenocitos
- △ C57Bl/6>Balb/c 2x10⁷ ME + 2x10⁷ esplenocitos+Max. 16H5
- Control (0,9% NaCl)

Figura 6

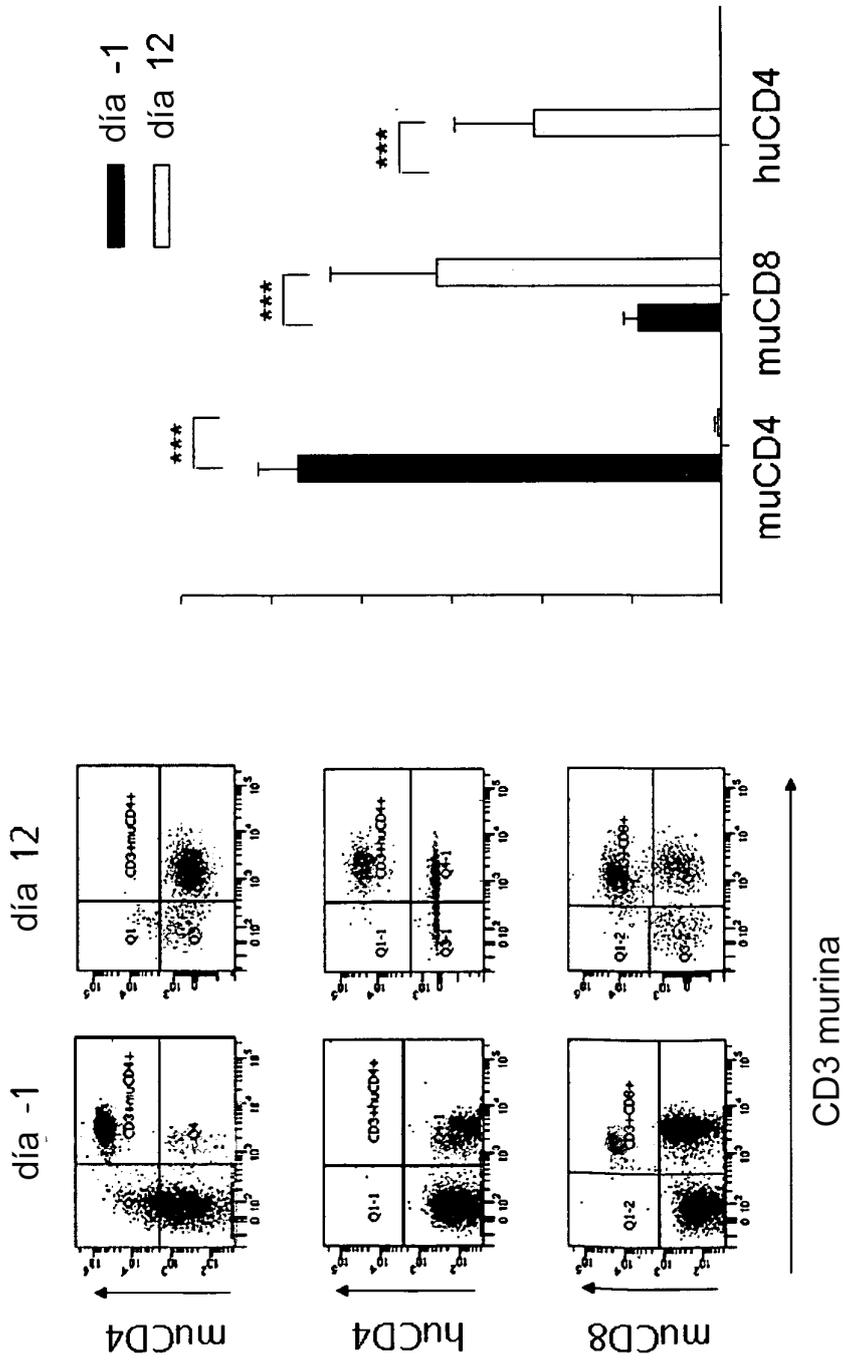


Figura 7

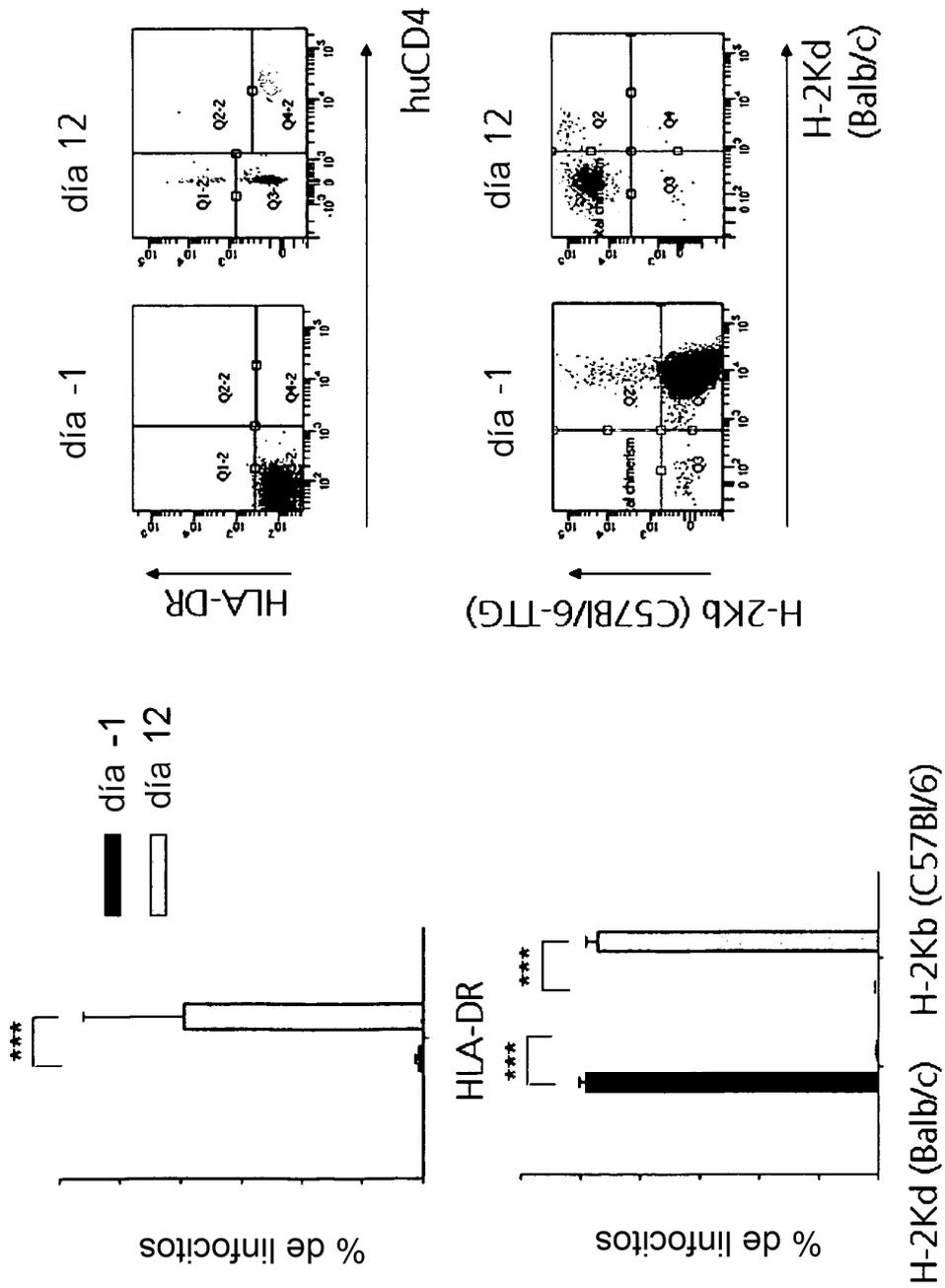


Figura 8

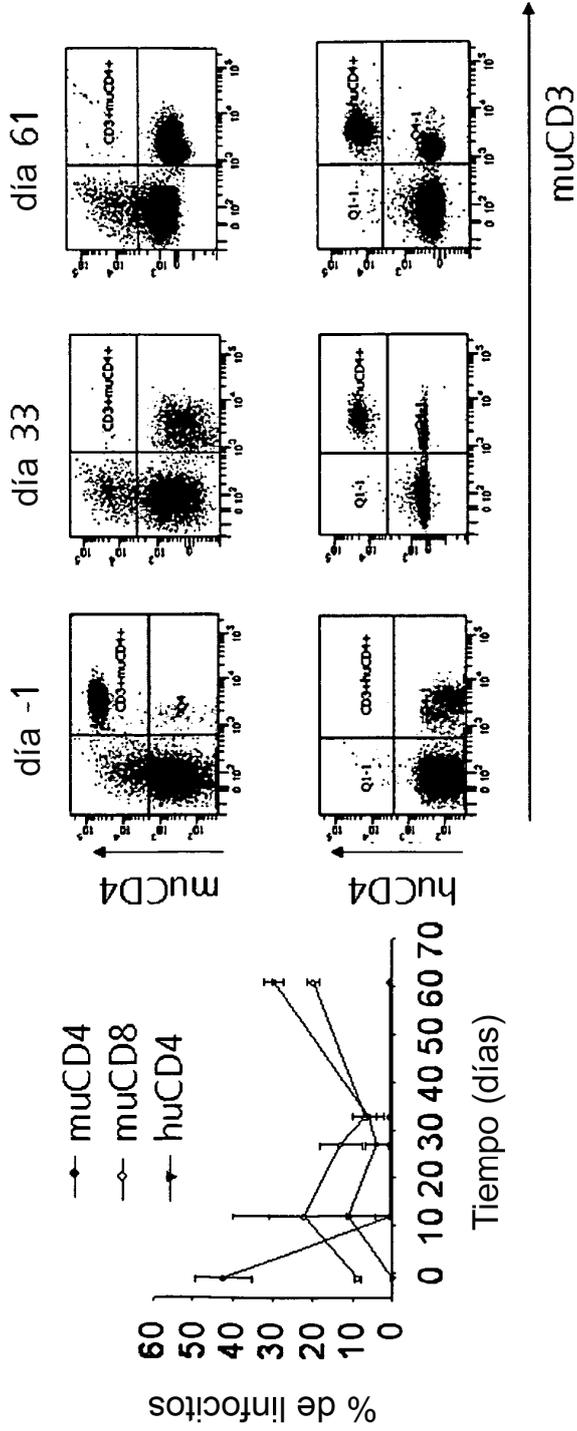


Figura 9

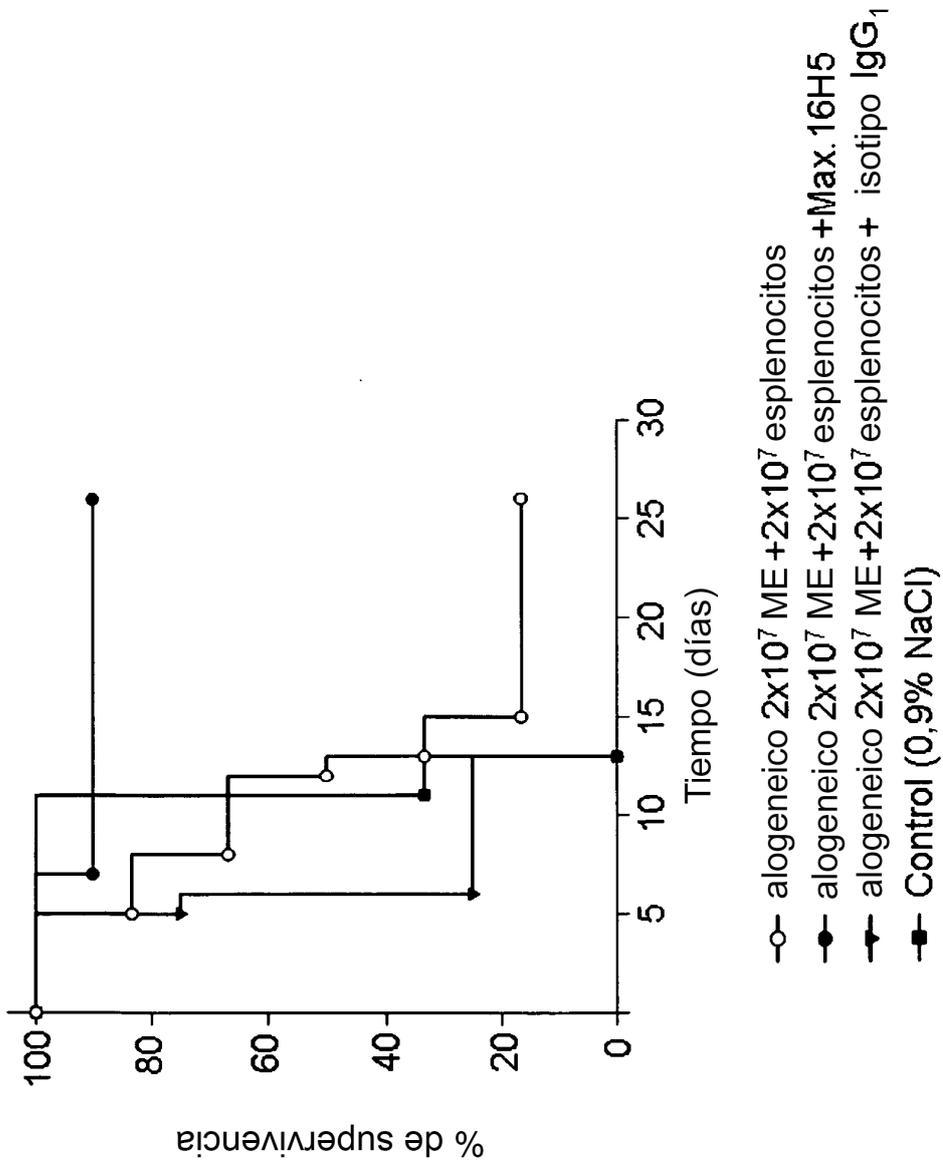


Figura 10

Fig 12: Secuencias de regiones variables de cadena pesada de anti-CD4

(a) Cadena pesada de anti-CD4 de ratón

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGGTTCAAGCTCCAGCAGTCTGGACTGTGCTGGCAAGGCTGGGGCTTCCGTGCAGATGTCCCTGCAAGGTTCTGGCTACAGCTTTGCCAACTACTGGA
E V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V Q M S C K A S G Y S F A N Y W
10      20      30
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TGCACTGGTAAACAGAGGCCTGGACAGGCTCTACAATGGATTGGTCTTTATCCCTGGAAATGTTGATACTACCTACAACCAGAAGTTCAAGGACAA
M H W V K Q R P G Q G L Q W I G A L Y P G N V D T T Y N Q K F K D K
40      50      60
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GGCCAACTGACTGCAGTCACATCCGCCAGCACTGCCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACAAAATGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTACAAGAATGGGT
A K L T A V T S A S T A Y M E L S S L T N E D S A V Y Y C T R M G
70      80      90     100
310     320     330     340     350     360
ACTACTTTAGAAGCCCCCTTGACTATTGGGGCCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
T T L E A P L D Y W G Q G T T L T V S S
(A) (B) (C) 110      120
SEQ ID NO: 1
SEQ ID NO: 2

```

Definiciones de CDR (y las letras "(A)", "(B)" y "(C)") según Kabat. Las secuencias de proteína y de nucleótidos de CDR se destacan en cursiva.

Figura 12a

(b) VH4 de cadena pesada

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGGTTCCAGCTCCAGCAGTCTGGGACTGAGCTGAAAAGGCCTGGGGCTTCCGGTGAAGATGTCCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTGCCAACTACTGGA
E V Q L Q Q S G T E L K R P G A S V K M S C K A S G Y T F A N Y W
10      20
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TGCACTGGGTAAACAGCCCTGGACAGGGTCTACAATGGATTGGTCTTTATCCCTGGAAAATGTTGATACCTACCAACCAGAAAGTTCAAGGACAA
M H W V K Q A P G Q G L Q W I G A L Y P G N V D T T Y N Q K F K D K
40      50      60
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GGCCAAACTGACTGCAGTCACATCCGCCAGCACTGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACAAAATGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGAATGGGT
A K L T A V T S A S T A Y M E L S S L T N E D S A V Y Y C T R M G
70      80      90
310     320     330     340     350     360
ACTACTTTAGAAAGCCCTTGACTATTGGGGCCCAAGCCACCCTGTCACAGTCTCCTCA
T T L E A P L D Y W G Q G T T V T V S S
(A) (B) (C) 110 120

```

Definiciones de CDR (y las letras "(A)", "(B)" y "(C)") según Kabat. Las secuencias de proteína y de nucleótidos de CDR se destacan en cursiva.
 Las diferencias con la secuencia de referencia murina se destacan mediante subrayado.

Figura 12b

(c) VH3 de cadena pesada

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GAGGTTCCAGCAGTCTGGGTCTGAGCTGAAAAGGCGCTGGGGCTTCCGTTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTGGCCAACTACTGGA
E V Q L Q Q S G S E L K R P P G A S V K M S C K A S G Y T F A N Y W
10
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TGCACTGGGTAAACAGGCCCTGGACAGGGTCTACAATGGATTGGTCTTTATCCCTGGAAATGTTGATACTACCTACAACCAGAAAGTTCAAGGACAA
M H W V K Q A P G Q A P G Q G L Q W I G A L Y P G N V D T T Y N Q K F K D K
40
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GGCCAACTGACTGCAGTCACATCCGCCAGCAGCTGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACAAAATGAGGACACCCGGGCTCTATTACTGTACAAGAAATGGGT
A K L T A V T S A S T A Y M E L S S L T N E D T A V Y Y C T R M G
70
310     320     330     340     350     360
ACTACTTTAGAAAGCCCTTGACTATTGGGGCCAAAGGCACCCCTTGTCACAGTCTCCTCA
SEQ ID NO: 5
T T L E A P L D Y W G Q G T L V T V S S
SEQ ID NO: 6
(A) (B) (C) 110
(A) (B) (C) 120

```

Definiciones de CDR (y las letras "(A)", "(B)" y "(C)") según Kabat. Las secuencias de proteína y de nucleótidos de CDR se destacan en cursiva.

Las diferencias con la secuencia de referencia murina se destacan mediante subrayado.

Figura 12c

(d) VH2 de cadena pesada

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGGTTCCAGCTCCAGCAGTCTGGGTCCTGAGCTGAAAAGCCCTGGGGCTTCCGTTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTGCCAACTACTGGA
E V Q L Q Q S G S E L K R P G A S V K V S C K A S G Y I F A N Y W
10      20
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TGCCTGGGTAAAAACAGCCCTGGACAGGGTCTACAATGGATTGGTCTTTATCCCTGGAAAATGTTGATACTACCTACAACCAGAAAGTTCAAGGACAA
M H W V K Q A P G Q G L Q W I G A L Y P G N V D T T Y N Q K F K D K
40      50      60
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GGCCAAACTGACTGGAGACACATCCGCCAGCACTGCCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACAAATGAGGACACCCGGTCTATTACTGTACAAGAATGGGT
A K L T A D T S A S T A Y M E L S S L T N E D T A V Y Y C T R M G
70      80      90
310     320     330     340     350     360
ACTACTTAGAAGCCCTTGACTATTGGGGCCAAAGGCCCTTGTACAGTCTCCTCA
T T L E A P L D Y W G Q G T L V T V S S
(A) (B) (C) 110 120

```

SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 8

Definiciones de CDR (y las letras "(A)", "(B)" y "(C)") según Kabat. Las secuencias de proteína y de nucleótidos de CDR se destacan en cursiva.
Las diferencias con la secuencia de referencia murina se destacan mediante subrayado.

Figura 12d

(e) VH1 de cadena pesada

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GAGGTTCCAGCTCCAGCAGTCTGGGTCAGCTGAGCTGAAAAGGCCTGGGGCTCCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTGCCAACTACTGGA
E V Q L Q Q S G S E L K R P G A S V K V S C K A S G Y T F A N Y W
10      20
TGC ACTGGGTAAGACAGGCCCTGGACAGGGTCTACAATGGATTGGTCTTTATCCCTGGAAATGTGATACTACCTACAACCAGAAAGTTCAAGGACAA
M H W V R Q A P G Q A P G Q L Q W I G A L Y P G N V D T T Y N Q K F K D K
40      50      60
GGCCAAATCACTAGAGACACATCCGCCAGCACTGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACAAATGAGGACACCCGGGTCTATTACTGTACAAGAAATGGGT
A K I T R D T S A S T A Y M E L S S L T N E D T A V Y Y C T R M G
70      80      90      100
ACTACTTAGAAGCCCCCTTGACTATTGGGGCCCAAGGCCCTTGTACAGTCTCCCTCA
T T L E A P L D Y W G Q G T L V T V S S
(A) (B) (C) 110 120
310 320 330 340 350 360
SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 10

```

Definiciones de CDR (y las letras "(A)", "(B)" y "(C)") según Kabat. Las secuencias de proteína y de nucleótidos de CDR se destacan en cursiva.
 Las diferencias con la secuencia de referencia murina se destacan mediante subrayado.

Figura 12e

Fig 13: Secuencias de regiones variables de cadena ligera de anti-CD4

(a) Cadena ligera de anti-CD4 de ratón

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCAATCTCCAGGGGAGAAGGTCGCCCATGACCTGCAGTCCAGGTC AAGTGAAGTTACTTGTACT
Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V A M T C S A R S S V S Y L Y
10
110    120    130    140    150    160    170    180    190    200
GGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGTTCCGCTTCATTTGCCAGTGGGTCTGG
W Y Q Q K P G S S P R L L I Y D T S N L A S G V P V R F I G S G S G
40
210    220    230    240    250    260    270    280    290    300
GACCTTACTCTCACAATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTGATTACCCCGCTCACGTTCCGGTGGTGGG
T S Y S L T I S R M E A E D A A T Y Y C Q W S D Y P L T F G A G
70
310
ACCAAGCTGGAGCTGAAA      SEQ ID NO: 11
T K L E L K              SEQ ID NO: 12
(A)

```

Definiciones de CDR (y las letras "(A)", "(B)" y "(C)") según Kabat. Las secuencias de proteína y de nucleótidos de CDR se destacan en cursiva.

Figura 13a

(b) VK4 de cadena ligera

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
CAAATGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCAATCTCCAGGGGAGAAGCCGCCCATGACCTGCAGTGCCAGGTCAAGTGTAAGTTACTTGTACT
Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K A A M T C S A R S S V S Y L Y
10
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GGTACCAGCAGAAGCCAGGGTCCCTCCCCAGACTCCTGATTTATGACACATCCAAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTTCICGCTTCATTTGGCAGTGGGTCTGG
W Y Q Q K P G S S P R L L I Y D T S N L A S G V P S R F I G S G S G
40
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GACCGATTACTCTTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTGATTACCCCGCTCACGTTCCGGTCTGGG
T D Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C Q Q W S D Y P L T F G A G
70
310
ACCAAGCTGGAGATCAAA      SEQ ID NO: 13
T K L E I K              SEQ ID NO: 14
(A)

```

Definiciones de CDR (y las letras "(A)", "(B)" y "(C)") según Kabat. Las secuencias de proteína y de nucleótidos de CDR se destacan en cursiva.

Las diferencias con la secuencia de referencia murina se destacan mediante subrayado.

Figura 13b

(c) VK3 de cadena ligera

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAACCCTGCTGCATCTCCAGGGGAGAGCCGCCATGACCTGGCAGTGCAGGTCAAAGTGAAGTTACTTGTACT
Q I V L T Q S P A T L S A S P G E K A A M T C S A R S S V S Y L Y
10      20      30
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GGTACCAGCAGAAGCCAGGGTCCCTCCCCAGACTCCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCATTGGCAGTGGGTCTGG
W Y Q Q K P G S S P R L L I Y D T S N L A S G V P S R F I G S G S G
40      50      60
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GACCGATTACTCTCACAAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGTGGAGTGAATTACCCGCTCACGTTCCGGTGTGGTGGG
T D Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C Q Q W S D Y P L T F G A G
70      80      90     100

310
ACCAAGCTGGAGATCAA
T K L E I K
(A)

```

Definiciones de CDR (y las letras "(A)", "(B)" y "(C)") según Kabat. Las secuencias de proteína y de nucleótidos de CDR se destacan en cursiva.
 Las diferencias con la secuencia de referencia murina se destacan mediante subrayado.

Figura 13c

(d) VK2 de cadena ligera

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
CAAATGTTCTCACCCAGTCCAGCAACCCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAGGCCCGCCCATGACCTGCAGTCCAGGTC AAGTGAAGTTACTTGTACT
Q I V L T Q S P A I L S A S P G E K A A M T C S A R S S V S Y L Y
10      20
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GGTACCAGCAGAAGCCAGGGTCCCTCCCCAGACTCCCTGATTTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCAGCGGCAGTGGGTCTGG
W Y Q Q K P G S S P R L L I Y D T S N L A S G V P S R F S G S G S G
40      50
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GACCGATTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGTGGAGTGAATTACCCCGCTCACCGTCCGGTGCCTGGG
T D Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C Q W S D Y P L T F G A G
70      80      90      100
310
ACCAAGCTGGAGATCAAA      SEQ ID NO: 17
T K L E I K      SEQ ID NO: 18
      (A)

```

Definiciones de CDR (y las letras "(A)", "(B)" y "(C)") según Kabat. Las secuencias de proteína y de nucleótidos de CDR se destacan en cursiva.
 Las diferencias con la secuencia de referencia murina se destacan mediante subrayado.

Figura 13d

(e) VK1 de cadena ligera

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAACCCCTGTCTGTCATCTCCAGGGGAGAAAGGCCCCCATGACCTGCAGTGCCAGGTCAAAGTGAAGTTACTTGTACT
Q I V L T Q S P A T L S A S P G E K A A M T C S A R S S V S Y L Y
10      20
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GGTACCAGCAGAAGCCAGGGTCCCTCCCCAGAGCCCTGATTTATGACACATCCAAACCTGGGTTCTGGAGTCCCTTCICGCTTCAGCGGCAGTGGGTCCTGG
W Y Q Q K P G S S P R A L I Y D T S N L A S G V P S R F S G S G S G
40      50
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GACCGATTACTCTTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTGATTACCCCGCTCACGTTCCGGTGGTGGG
T D Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C Q Q W S D Y P L T F G A G
70      80      90     100

310
ACCAAGCTGGAGATCAAA      SEQ ID NO: 19
T K L E I K      SEQ ID NO: 20
(A)

```

Definiciones de CDR (y las letras "(A)", "(B)" y "(C)") según Kabat. Las secuencias de proteína y de nucleótidos de CDR se destacan en cursiva.

Las diferencias con la secuencia de referencia murina se destacan mediante subrayado.

Figura 13e

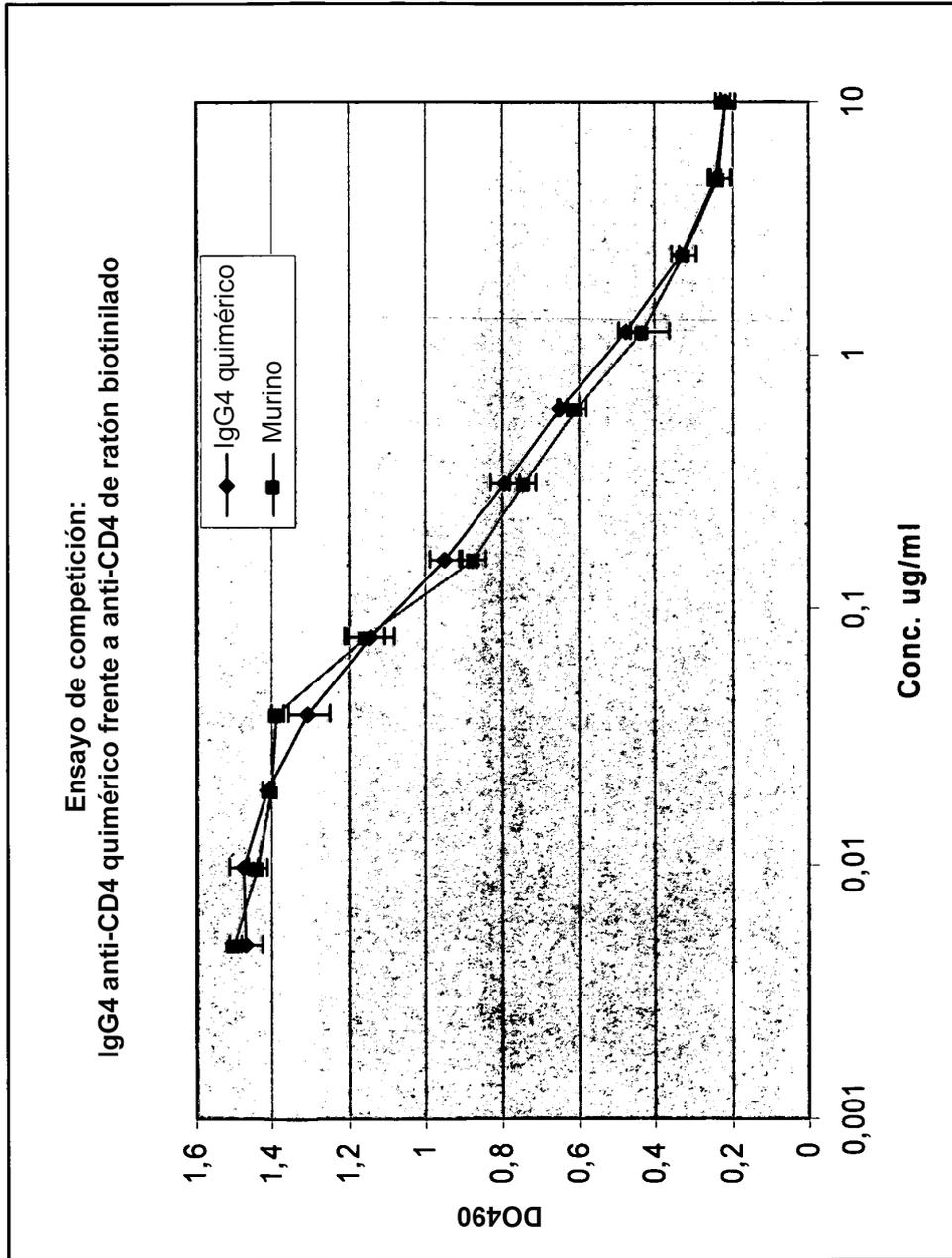


Figura 14

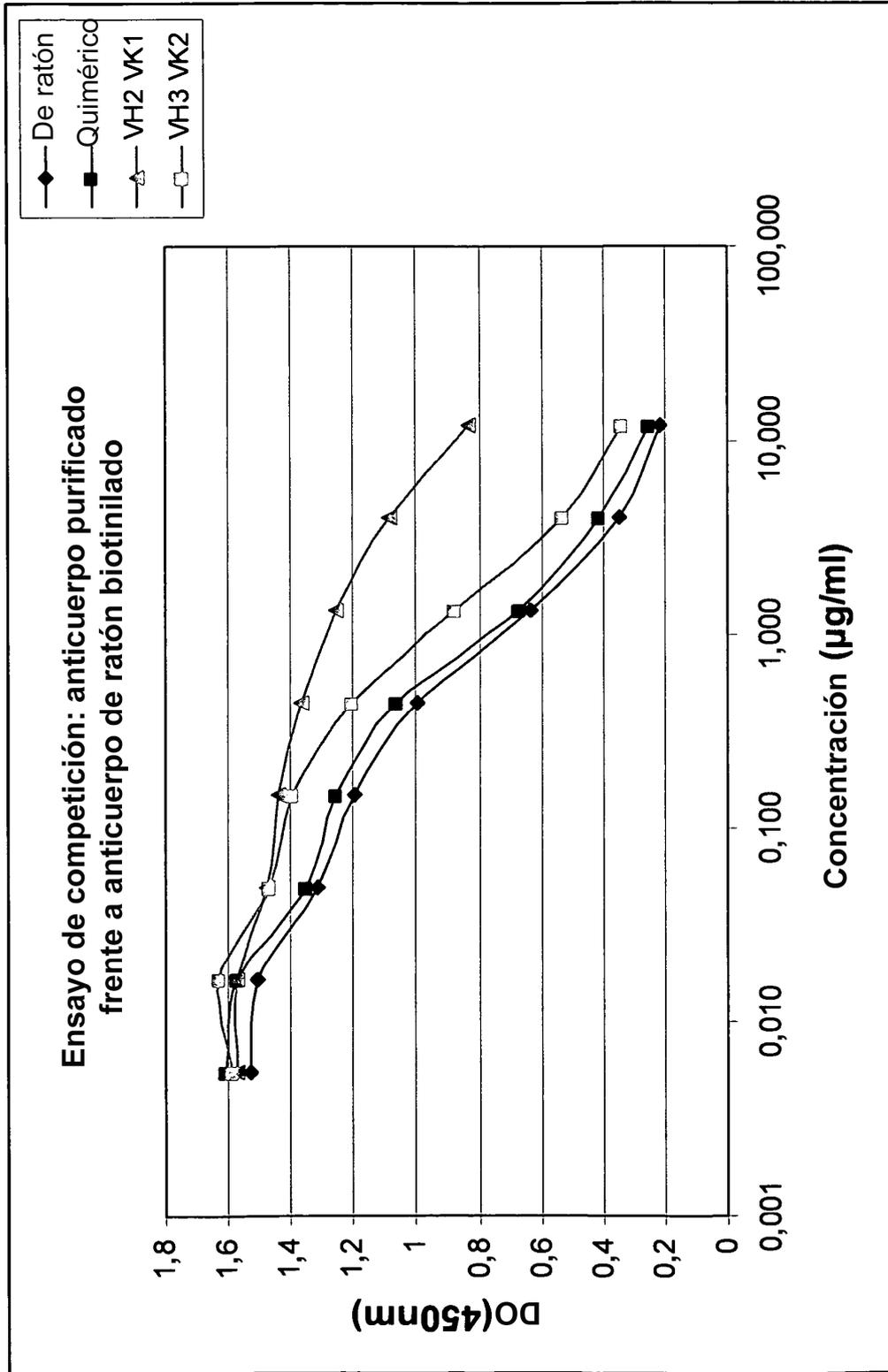


Figura 15A

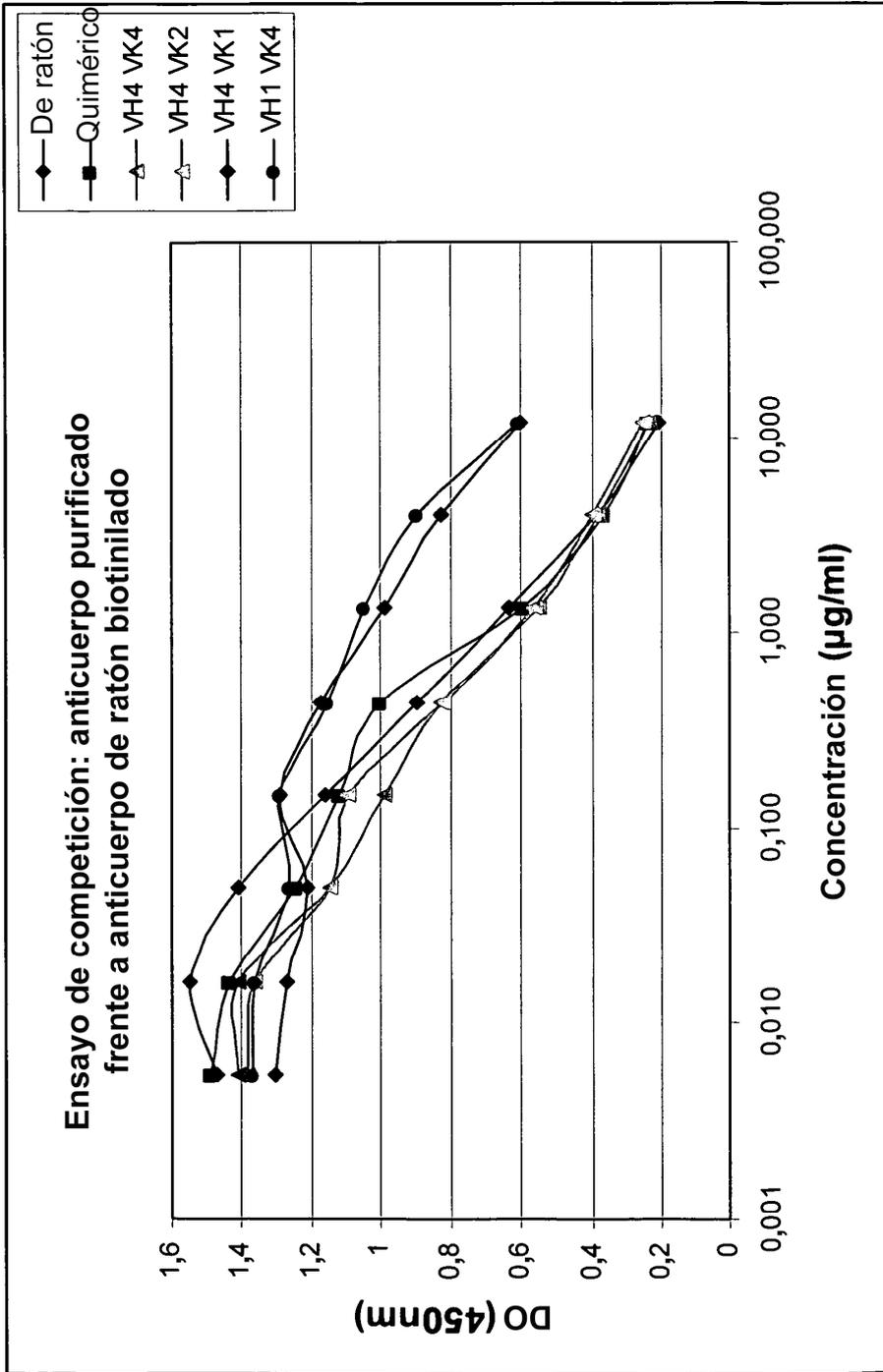


Figura 15B

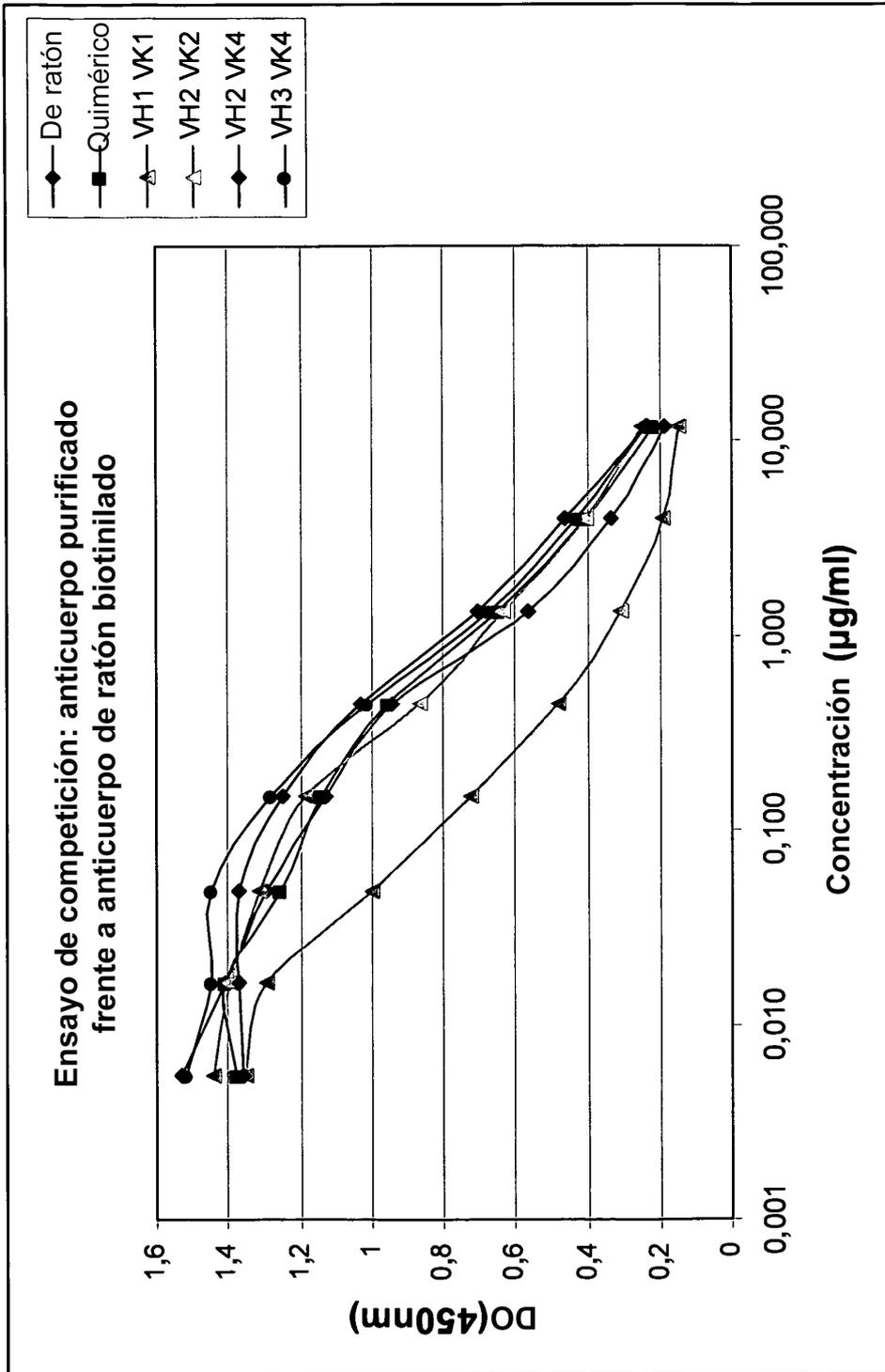


Figura 16