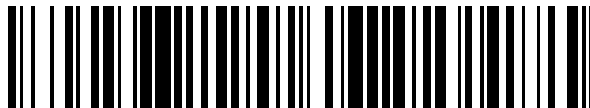


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 645**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61P 37/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2015 PCT/EP2015/067707**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016 WO16016442**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2015 E 15744591 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 3174902**

54 Título: **Un anticuerpo anti-CD45RC para usar como medicamento**

30 Prioridad:

**01.08.2014 EP 14306231**

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

**08.10.2019**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA  
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (50.0%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR y  
UNIVERSITE DE NANTES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GUILLONNEAU, CAROLE y  
ANEGON, IGNACIO**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 726 645 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Un anticuerpo anti-CD45RC para usar como medicamento

**Campo de la invención**

La presente descripción pertenece al campo de la inmunoterapia.

**5 Antecedentes de la invención**

Un enfoque en el tratamiento de una variedad de enfermedades es lograr la eliminación o la inactivación de los leucocitos patógenos y el potencial de inducción de tolerancia para inactivar las respuestas inmunes patológicas. La prevención del rechazo de trasplantes de células, tejidos u órganos y el tratamiento de enfermedades autoinmunes requieren la inducción o el restablecimiento de la tolerancia inmunológica, respectivamente. En general, se piensa que la descomposición de la tolerancia asociada con los trastornos autoinmunes y la falta de tolerancia para los aloinjertos asociados con el rechazo del trasplante son principalmente respuestas inmunes mediadas por células T.

En la mayoría de las enfermedades humanas, la identificación de dianas celulares para la terapia con anticuerpos monoclonales representa desafíos importantes, ya que tales terapias se utilizan cada vez más con gran éxito, especialmente en los trasplantes (1). Estas nuevas estrategias también permiten una inmunosupresión específica en lugar de una general asociada con la inducción de células T reguladoras (Treg) (1, 2). La proteína CD45 es una tirosina fosfatasa transmembrana altamente glicosilada expresada por células hematopoyéticas y descrita como un regulador esencial de la señalización del receptor de antígeno de células T y B. El dominio citoplasmático de CD45 regula la actividad de Lck y JAK, que son componentes esenciales del proceso de transducción de señales de reconocimiento de antígenos por parte de las células T y B. Hay varias isoformas de la proteína CD45, generadas por el empalme alternativo de los exones 4 (A), el exón 5 (B) y el exón 6 (C) (la inclusión de los exones 4 y 6 en el ARNm de CD45 está estrechamente regulada, mientras que la inclusión del exón 5 aparece estocástico). Estos diferentes dominios extracelulares difieren en tamaño y carga (3, 4). Los individuos expresan diferentes niveles de isoformas CD45 (5) y, aunque la función de las diferentes isoformas CD45 no está clara, la expresión diferencial de estas isoformas se ha asociado con el nivel de activación de las células T y permite la disociación de las células T sin tratamiento previo frente a las de memoria (6). Es importante destacar que este patrón de expresión de isoformas está altamente conservado en todas las especies, destacando su función e importancia funcionales (7).

Las isoformas CD45RA, CD45RB y CD45RC se expresan principalmente en las células sin tratamiento previo, mientras que la isoforma más corta CD45RO se expresa en las células T activadas/memoria. Las células CD45RC<sup>+</sup> también expresan las isoformas A y B mientras que las CD45RC<sup>-</sup> no lo hacen (8). Las células T activadas/memoria CD45RO también pueden revertir y expresar de nuevo las isoformas A, B o C (8). En general, las células T CD4 y CD8 con formas moleculares altas de CD45R (es decir, A, B o C) expresaron el ARNm para los exones ABC (bajo y variable), AB, BC, B y O. Células T CD4 y CD8<sup>+</sup> CD45RO<sup>+</sup> tuvieron niveles altos de mensaje para el exón B con expresión variable de los exones dobles AB y BC (8).

Se ha demostrado en ratones y primates que una población de Treg CD4 se puede definir como CD45RB<sup>bajo</sup>. El tratamiento de ratones con anticuerpos anti-CD45RB puede prevenir y revertir el rechazo del aloinjerto renal (9, 10). También se demostró que este anticuerpo previene la aparición de diabetes en un modelo de ratón diabético no obeso (11). Al comparar dos mAbs específicos de CD45RB diferentes, se ha encontrado que el anticuerpo que fue efectivo para la inducción de tolerancia también mostró una cierta capacidad de eliminación de células periféricas más efectiva (9). Además, el mAb tolerógeno fue capaz de estimular la actividad de la tirosina fosfatasa en las membranas de linfocitos esplénicos, lo que sugiere una posible capacidad inmunorreguladora de este anticuerpo. Finalmente, describieron que los mecanismos de los mAbs CD45RB eran la inducción de la muerte celular apoptótica o la desregulación del aparato de señalización que causaba la falta de función de las células efectoras seguida de la muerte celular inducida por activación.

CD45RC ha sido descrito en roedores y humanos (12). En roedores, se ha demostrado que tanto las células T CD4<sup>+</sup> como las células T CD8<sup>+</sup> CD45RC<sup>+</sup> son células efectoras Th1 potentes capaces de promover el rechazo del trasplante y la inflamación de órganos (13, 14), mientras que las células T expresan niveles indetectables o bajos. Los niveles de CD45RC son Th2 y las células T reguladoras inhiben el rechazo de aloinjerto, GVHD y las enfermedades autoinmunes mediadas por células (15-17).

Recientemente se ha demostrado que el tratamiento con CD40lg, una molécula de fusión capaz de bloquear la interacción CD40-CD40L, proporciona una extensión indefinida de la supervivencia del injerto a través de la inducción de las células T CD8<sup>+</sup> CD45RC<sup>-bajo</sup> en ratas (16, 18). Solo estas Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>-bajo</sup> son capaces de transferir una tolerancia dominante específica de donante. También se ha demostrado que los efectos tolerogénicos de las células Treg CD8<sup>+</sup> de los animales tratados con CD40lg dependen de la producción de IFN $\gamma$  y la expresión de la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) por parte de las células endoteliales de injerto y las células dendríticas (DC) del bazo (16, 19, 20). En seres humanos, un aumento en las células CD8<sup>+</sup> T CD45RC<sup>alto</sup> se ha correlacionado recientemente con una disminución de la supervivencia del injerto (21). También se ha demostrado que un subconjunto de células T CD45RC<sup>+</sup> humanas exhiben diferentes perfiles de citoquinas después de la estimulación policlinal y que la frecuencia de estas células está desequilibrada en pacientes con vasculitis (5).

La solicitud de patente internacional WO 98/11918 se refiere al uso de anticuerpos contra antígenos de leucocitos CD45R para la inmunomodulación basado en los resultados obtenidos principalmente con anticuerpos anti-CD45RB correspondientes a los resultados descritos anteriormente (9, 11) y, muy sucintamente, con anticuerpos anti-CD45RO. Sin embargo, dicha solicitud también ha sugerido que un anticuerpo anti-CD45RC podría ser útil en la

5 prevención y/o tratamiento del rechazo de trasplantes, así como en el tratamiento de enfermedades autoinmunes en términos genéricos. Sin embargo, ningún efecto profiláctico o terapéutico se ha evaluado concretamente en este documento. Por lo tanto, la prevención y/o el tratamiento propuestos para tal enfermedad no están justificados.

Además, quince años más tarde, también se llegó a la conclusión de que el CD45RC anti-porcino (IgM, MIL 15) no fue eficaz para bloquear la respuesta inmune xenogénica en un ensayo de MLR en el que las PBMC humanas se incubaron con PBMC porcinas en comparación con Abs anti-CD45 y anti-CD45RA (25). Lo más importante es que no se usaron anticuerpos de control de isotipos IgM en este ensayo y, por lo tanto, la pequeña inhibición del 15% de las respuestas xenogénicas debe atribuirse a una unión no específica, lo que demuestra que el anticuerpo anti-porcino CD45RC (MIL 15), en contraste con los anticuerpos anti-CD45 (K252. IE4) y anti-CD45RA (MIL13) no modularon las respuestas xenogénicas inmunes y no se pudieron usar para modular las respuestas de las células T

10 anti-cerdo humanas después del xenotrasplante.

En consecuencia, resulta que hasta ahora nunca se había divulgado ni se había sugerido a los expertos en la materia que la administración directa de un anticuerpo anti-CD45RC, en particular un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC, puede ser útil en terapia, especialmente para prevenir los rechazos allogénicos de trasplantes, como GVHD en un paciente que lo necesite.

## 20 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC aislado para su uso en la prevención o reducción del rechazo de trasplantes en un paciente que lo necesite, donde el anticuerpo monoclonal anti-CD45RC es un anticuerpo reductor de células CD45RC+. En particular, la presente invención se define en las reivindicaciones.

## 25 **Descripción detallada**

Los inventores satisfacen esta necesidad al proporcionar anticuerpos que tienen la capacidad de disminuir las células T efectoras agresivas o las células B mientras aumentan las células T reguladoras tolerogénicas.

La presente descripción se basa de hecho en el descubrimiento de que la inducción de la tolerancia al trasplante se obtiene con un tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC. En consecuencia, los inventores reconocieron las poblaciones celulares que expresaban CD45RC usando un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC (clon OX22) administrado durante 10 a 20 días cada 2,5 días y demostraron la potencia y ventajas de dicha estrategia para la supervivencia de aloinjertos en un modelo de trasplante cardíaco de rata. Mostraron que el tratamiento con anticuerpos anti-CD45RC a corto plazo daba como resultado la supervivencia permanente del aloinjerto sin signos de rechazo crónico y que estaba asociado a la inhibición de las células T efectoras, así como a la inducción de células T reguladoras de mayor actividad y que esta tolerancia podía transferirse a receptores irradiados secundarios. Tanto las Tregs CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> transfirieron tolerancia. Además, demostraron que las respuestas de anticuerpos anti-donante se inhibieron completamente, mientras que las respuestas inmunitarias contra antígenos afines se conservaron. En conjunto, mostraron por primera vez el potencial de un tratamiento anti-CD45RC a corto plazo como una nueva terapia inmunosupresora en trasplantes capaz de inducir potentes mecanismos celulares tolerogénicos activos.

Definiciones:

A lo largo de la memoria descriptiva, se emplean varios términos y se definen en los párrafos siguientes.

Como se usa en el presente documento, el término "CD45" (también conocido como CD45R o PTPRC) se refiere a una glicoproteína transmembrana que existe en diferentes isoformas. Estas distintas isoformas de CD45 difieren en sus estructuras de dominio extracelular que surgen del empalme alternativo de 3 exones variables que codifican parte de la región extracelular de CD45 (3). Las diversas isoformas de CD45 tienen diferentes dominios extracelulares, pero tienen los mismos segmentos transmembrana y citoplásmicos que tienen dos dominios de fosfatasa altamente conservados, homólogos, de aproximadamente 300 residuos.

Como se usa en el presente documento, el término "CD45RC" se refiere a una glicoproteína de membrana de tipo I de cadena simple de 200-220 kD muy conocida por los expertos en la materia (3). Es una variante de empalme del exón 6 (exón C) de la tirosina fosfatasa CD45. La isoforma CD45RC se expresa en células B, la mayoría de las células T CD8<sup>+</sup> y un subconjunto de células T CD4<sup>+</sup>, pero no en células mieloides. CD45 y sus isoformas se asocian de manera no covalente con la fosfoproteína asociada a fosfatasa linfocítica (LPAP) en linfocitos T y B. Se ha mostrado que CD45 está asociado con varios otros antígenos de la superficie celular, incluidos CD1, CD2, CD3 y CD4. CD45 está involucrado en la señalización de la activación de los linfocitos.

5 Algunos anticuerpos monoclonales (mAbs) reconocen un epítipo en la porción de CD45 común a todas las diferentes isoformas (anti-CD45R), mientras que otros mAbs tienen una especificidad restringida, dependiendo de cuál de los exones empalmados alternativamente (A, B o C) reconocen. Por ejemplo, los mAbs que reconocen el producto del exón A se designan en consecuencia como anti-CD45RA, los que reconocen el producto del exón B se designan como anti-CD45RB y los que reconocen el producto del exón C se designan como anti-CD45RC. Por consiguiente, un anticuerpo que se une específicamente a CD45RC se une a una secuencia polipeptídica definida por la SEQ ID NO: 2 y es codificada por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 (exón 6, isoforma C) como se indica en la Tabla A:

Exón 6 (SEQ ID NO:1)	Producto del exón 6 (SEQ ID NO:2)
atgtcccaggagagaggagtacagccagcacctttctacagac ccagtttccccattgacaaccaccctcagccttgacaccacagc tctgctgccttacctgcacgcacctccaacaccaccatcacagcg aacacctcag	CPRREEYSQHLSYRPSFPIDNHPQPCTP QLCCLTCTHLQHSHHSEHL

10 Tabla A: Secuencias de nucleótidos y polipéptidos del exón 6

Un "anticuerpo aislado", como se usa en este documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a una proteína CD45RC está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de las proteínas CD45RC). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a una proteína CD45RC humana puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, como las proteínas CD45RC de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otros materiales celulares y/o químicos.

De acuerdo con la invención, los términos "anticuerpo" o "inmunoglobulina" tienen el mismo significado y se usarán igualmente en la presente descripción. El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une de forma inmuno-específica a un antígeno. Como tal, el término anticuerpo abarca no solo moléculas de anticuerpo completas, sino también fragmentos de anticuerpos así como variantes (incluyendo derivados) de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. En los anticuerpos naturales, dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro y cada cadena pesada está unida a una cadena ligera por un enlace disulfuro. Hay dos tipos de cadenas ligeras, lambda (l) y kappa (k). Existen cinco clases principales de cadena pesada (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene dominios de secuencia distintos. La cadena ligera incluye dos dominios, un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, denominados colectivamente CH). Las regiones variables de ambas cadenas ligera (VL) y pesada (VH) determinan el reconocimiento de unión y la especificidad al antígeno. Los dominios de la región constante de las cadenas ligeras (CL) y pesadas (CH) confieren importantes propiedades biológicas, como la asociación de la cadena de anticuerpos, la secreción, la movilidad transplacentaria, la unión al complemento y la unión a los receptores Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina y consiste en las porciones variables de una cadena ligera y una cadena pesada. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de combinación del anticuerpo y el determinante antigénico. Los sitios de combinación de anticuerpos están formados por residuos que provienen principalmente de las regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR). Ocasionalmente, los residuos de las regiones no hipervariables o marco (FR) influyen en la estructura global del dominio y, por lo tanto, en el sitio de combinación. Las regiones determinantes de complementariedad o CDR se refieren a secuencias de aminoácidos que juntas definen la afinidad y especificidad de unión de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina nativa. Las cadenas ligeras y pesadas de una inmunoglobulina tienen cada una tres CDR, denominadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente. Un sitio de unión a antígeno, por lo tanto, incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada una de las regiones V de cadena pesada y ligera. Las regiones marco (FR) se refieren a secuencias de aminoácidos interpuestas entre CDR.

En el contexto de la invención, el anticuerpo monoclonal anti-CD45RC tiene preferiblemente un isotipo IgG (tal como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4).

El término "Fab" denota un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y una actividad de unión a antígeno, en la cual aproximadamente la mitad del lado N-terminal de la cadena H y la cadena L completa, entre los fragmentos obtenidos al tratar IgG con una proteasa, la papaína, están unidas entre sí mediante un enlace disulfuro. El término "F(ab')2" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de

aproximadamente 100.000 y una actividad de unión a antígeno, que es ligeramente más grande que el Fab unido a través de un enlace disulfuro de la región bisagra, entre los fragmentos obtenidos por el tratamiento de IgG con una proteasa, la pepsina. El término "Fab" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y una actividad de unión al antígeno, que se obtiene al cortar un enlace disulfuro de la región bisagra de F(ab')<sub>2</sub>. Un polipéptido Fv de cadena única ("scFv") es un heterodímero VH::VL enlazado covalentemente que generalmente se expresa a partir de una fusión de genes que incluye genes que codifican VH y VL unidos por un enlazador que codifica péptidos. "dsFv" es un heterodímero VH::VL estabilizado por un enlace disulfuro. Los fragmentos de anticuerpos divalentes y multivalentes pueden formarse espontáneamente por asociación de los scFv monovalentes, o pueden generarse mediante el acoplamiento de scFv monovalentes por un enlazador peptídico, tal como sc(Fv)<sub>2</sub> divalente. El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Al utilizar un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno.

Los anticuerpos dirigidos contra el marcador de superficie CD45RC pueden generarse de acuerdo con métodos conocidos al administrar el antígeno o epítipo apropiado (como el péptido de la SEQ ID NO: 2) a un animal huésped seleccionado, por ejemplo, de ratas, cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas, camélidos (camellos, dromedarios, llamas) y ratones, entre otros. Se pueden usar diversos adyuvantes conocidos en la técnica para potenciar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles en la práctica de la invención pueden ser policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar y aislar usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas para la producción y el aislamiento incluyen, entre otros, la técnica de hibridoma, la técnica de hibridoma de células B humanas y la técnica de hibridoma EBV. Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena única (ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena única contra el marcador de superficie CD45RC.

Los anticuerpos útiles de acuerdo con la invención también incluyen fragmentos de anticuerpos que incluyen pero no se limitan a fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, que pueden generarse por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo intacta, y fragmentos Fab, que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, así como scFv y dsFv como se mencionó anteriormente. Alternativamente, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab y/o scFv para permitir la identificación rápida de fragmentos que tienen la especificidad deseada para el marcador de superficie CD45RC. Los anticuerpos útiles según la invención también incluyen diferentes formatos de anticuerpos creados a partir de estos fragmentos, en particular formatos de anticuerpos quimerizados o humanizados, multiespecíficos y/o multivalentes. Los "formatos de anticuerpos" como se refiere en este documento corresponden a diferentes combinaciones de dominios y regiones tales como dominios variables de anticuerpos de cadena simple pesada (VHH) de Camelidae (camello, dromedario, llama), reconociendo específicamente un tipo de antígeno.

Los ejemplos de anticuerpos que se unen al antígeno CD45RC que se contemplan en la presente descripción incluyen los anticuerpos monoclonales de ratón OX-22 (CD45RC anti-rata), OX-32 (CD45RC anti-rata), MT2 (CD45RC anti-humano) y RP1/12 (CD45RC anti-rata).

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD45RC son muy conocidos por los expertos en la técnica, tales como los anticuerpos comercializados por Santa Cruz Biotech. Los ejemplos de anticuerpos que se unen al antígeno CD45RC que se contemplan en la presente descripción incluyen anticuerpos tales como el anticuerpo monoclonal OX-22 o un derivado de éste. Dicho anticuerpo monoclonal es muy conocido por los expertos en la materia y se ha descrito inicialmente en Spickett et al. 1983 y es comercializado por varias empresas.

En una realización, el anticuerpo monoclonal anti-CD45RC es un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC humano. Los ejemplos de anticuerpos que se unen al antígeno CD45RC humano que se contemplan en la presente descripción incluyen anticuerpos tales como el anticuerpo monoclonal MT2 o un derivado del mismo y el anticuerpo monoclonal RP1/12 o un derivado del mismo. Tales anticuerpos monoclonales son muy conocidos por los expertos en la técnica y son comercializados por varias compañías.

La expresión "un derivado de MT2" se refiere a un anticuerpo anti-CD45RC que se une específicamente a CD45RC humano y que comprende las 6 CDR de MT2.

En una realización, el derivado de MT2 es un anticuerpo que comprende la cadena VL y la cadena VH de MT2.

En otra realización, el derivado de MT2 es un anticuerpo quimérico o anticuerpo humanizado, que comprende los dominios variables de MT2.

La expresión "un derivado de RP1/12" se refiere a un anticuerpo anti-CD45RC que se une específicamente a CD45RC humano y que comprende las 6 CDR de RP1/12.

En una realización, el derivado de RP1/12 es un anticuerpo que comprende la cadena VL y la cadena VH de RP1/12.

En otra realización, el derivado de RP 1/12 es un anticuerpo quimérico o anticuerpo humanizado, que comprende los dominios variables de RP1/12.

5 La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a una fusión modificada por ingeniería genética de partes de un anticuerpo animal, típicamente un anticuerpo de ratón, con partes de un anticuerpo humano. En general, los anticuerpos quiméricos contienen aproximadamente 33% de proteína de ratón y 67% de proteína humana. Desarrollados para reducir la respuesta de anticuerpos humanos contra animales provocada por anticuerpos animales, combinan la especificidad del anticuerpo animal con la eficiente interacción del sistema inmunitario humano de un anticuerpo humano.

10 Los anticuerpos humanizados y los fragmentos de anticuerpos de estos también pueden prepararse de acuerdo con técnicas conocidas. Los "anticuerpos humanizados" son formas de anticuerpos quiméricos no humanos (por ejemplo, roedores) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de una región hipervariable (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata, conejo, primate no humano que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos, o sustancialmente todos, los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y la totalidad o sustancialmente todos los FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Los métodos para preparar anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, en Winter (Patente de Estados Unidos N° 5.225.539) y Boss (Celltech, Patente de Estados Unidos N° 4.816.397).

15 El anticuerpo quimérico humano descrito en este documento puede producirse obteniendo secuencias nucleicas que codifican los dominios VL y VH como se describió previamente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo quimérico humano insertándolos en un vector de expresión para células animales que tienen genes que codifican el anticuerpo CH humano y el CL humano y expresando la secuencia de codificación introduciendo el vector de expresión en una célula animal. Como el dominio CH de un anticuerpo quimérico humano, puede ser cualquier región que pertenezca a inmunoglobulina humana, pero las de la clase IgG son adecuadas y cualquiera de las subclases que pertenecen a la clase IgG, como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, también puede ser usadas. Además, como la CL de un anticuerpo quimérico humano, puede ser cualquier región que pertenezca a Ig, y se pueden usar las de la clase kappa o la clase lambda. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos incluyen el ADN recombinante convencional y las técnicas de transfección de genes son muy conocidas en la técnica (véanse los documentos de patente US 5.202.238 y US 5.204.244).

20 El anticuerpo humanizado descrito en este documento puede producirse obteniendo secuencias de ácido nucleico que codifican dominios CDR, como se describió previamente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo humanizado insertándolos en un vector de expresión para células animales que tienen genes que codifican (i) una región constante de cadena pesada idéntica a la de un anticuerpo humano y (ii) una región constante de la cadena ligera idéntica a la de un anticuerpo humano, y expresando los genes mediante la introducción del vector de expresión en una célula animal. El vector de expresión del anticuerpo humanizado puede ser de un tipo en el que un gen que codifica una cadena pesada de anticuerpo y un gen que codifica una cadena ligera de anticuerpo existe en vectores separados o de un tipo en el que ambos genes existen en el mismo vector (tipo tándem). Con respecto a la facilidad de construcción de un vector de expresión de anticuerpo humanizado, la facilidad de introducción en células animales y el equilibrio entre los niveles de expresión de las cadenas H y L de anticuerpo en células animales, se prefiere un vector de expresión de anticuerpo humanizado del tipo tándem. Los ejemplos de vectores de expresión de anticuerpos humanizados de tipo tándem incluyen pKANTEX93 (documento WO 97/10354), pEE18 y similares.

25 Los métodos para identificar CDR de un anticuerpo monoclonal son muy conocidos en la técnica (véase Antibody Engineering: Methods and Protocols, 2004).

30 En otra realización, también se contemplan modificaciones de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo MT2 o RP1/12. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se sabe que cuando se produce un anticuerpo humanizado simplemente injertando CDR en VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano en las FR de VH y VL de un anticuerpo humano, la actividad de unión al antígeno se reduce en comparación con la del anticuerpo original derivado de un animal no humano. Se considera que varios residuos de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo no humano, no solo en las CDR sino también en las FR, están asociados directa o indirectamente con la actividad de unión al antígeno. Por lo tanto, la sustitución de estos residuos de aminoácidos con diferentes residuos de aminoácidos derivados de las FR de las VH

y VL del anticuerpo humano reduciría la actividad de unión. Para resolver el problema, en los anticuerpos injertados con CDR humana, se deben hacer intentos para identificar, entre las secuencias de aminoácidos de la FR de la VH y la VL de los anticuerpos humanos, un residuo de aminoácido que esté directamente asociado con la unión al anticuerpo, o que interactúe con un residuo de aminoácido de CDR, o que mantenga la estructura tridimensional del anticuerpo y que esté directamente asociado con la unión al antígeno. La actividad reducida de unión al antígeno podría aumentarse reemplazando los aminoácidos identificados con los residuos de aminoácidos del anticuerpo original derivado de un animal no humano. Pueden realizarse modificaciones y cambios en la estructura de los anticuerpos de la presente invención, y en las secuencias de ADN que los codifican, y aún obtener una molécula funcional que codifique un anticuerpo con características deseables. Al realizar los cambios en las secuencias de aminoácidos, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice de aminoácidos hidropáticos para conferir una función biológica interactiva a una proteína se entiende generalmente en la técnica. Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en función de su hidrofobicidad y características de carga, que son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

En una realización preferida, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales completamente humanos. Dichos anticuerpos monoclonales completamente humanos dirigidos contra CD45RC humano pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que lleven partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen los ratones referidos en este documento como HuMAb Mouse® y KM Mouse®, respectivamente, y se denominan colectivamente en este documento como "ratones Ig humanos".

El HuMAb Mouse® (Medarex®, Inc.) contiene el gen de la inmunoglobulina humana miniloci que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena ligera  $\kappa$  y pesada humana no reordenadas ( $\mu$  y  $\gamma$ ), junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de las cadenas  $\mu$  y  $\kappa$  endógenas (ver, por ejemplo, Lonberg y otros (1994) *Nature* 368 (6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones muestran una expresión reducida de IgM o  $\kappa$  de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humanos introducidos experimentan un cambio de clase y una mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgGK humanos de alta afinidad (Lonberg et al. (1994), supra; revisado en Lonberg (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, y Harding y Lonberg (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:536-546). La preparación y el uso del HuMAb Mouse®, y las modificaciones genómicas llevadas a cabo por dichos ratones, se describen con más detalle en Taylor et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20: 6287-6295; Chen et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaille et al. (1993) *Proc. Natl Acad Sci. USA* 90: 3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4: 117 -123; Chen et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaille et al. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor et al. (1994) *International Immunology* 6: 579-591; y Fishwild et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851. Véanse además, las patentes de EE.UU. nº 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; 5.770.429; y 5.545.807; Números de publicación PCT. WO 92/03918; WO 93/12227; WO 94/25585; WO 97/13852; WO 98/24884; WO 99/45962 y WO 01/14424.

Los anticuerpos completamente humanos de la invención también pueden generarse usando un ratón que transporte secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que porte un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana. Este ratón se menciona en este documento como un "ratón KM" y se describe en detalle en la publicación PCT WO 02/43478. Una forma modificada de este ratón, que además comprende una alteración homocigótica del gen del receptor Fc $\gamma$ RIIB endógeno, también se describe en la publicación PCT WO 02/43478 y se menciona en este documento como un "ratón KM/FCGR2D®". Además, se pueden usar ratones con los transgenes de cadena pesada HCo7 o HCo2 o ambos.

Las realizaciones de animales transgénicos adicionales incluyen el Xenomouse (Abgenix, Inc., las patentes de EE.UU. nº 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963). Otras realizaciones incluyen "ratones TC" (Tomizuka et al. (2000) *Proc. Natl Acad Sci USA* 97: 722-727) y vacas portadoras de transcromosomas humanos de cadena ligera y pesada (Kuroiwa et al. (2002) *Nature Biotechnology* 20: 889-894; Publicación PCT WO 02/092812).

Otras formas de realización de animales transgénicos adicionales incluyen el OmniRat™ (OMT, Inc., Nº de publicación PCT WO2008/151081; Geurts et al. (2009) *Science*, 24 de julio; 325 (5939): 433 y Menoret et al. (2010) *Eur J Immunol.* Oct; 40 (10): 2932-41.

En una realización, el anticuerpo anti-CD45RC es un anticuerpo que modula la respuesta inmune compitiendo con CD45RC por su sitio de unión in vivo.

Dicho anticuerpo modulador anti-CD45RC incluye fragmentos de anticuerpos y diferentes formatos de anticuerpos creados a partir de estos fragmentos, en particular formatos de anticuerpos quimerizados o humanizados, multiespecíficos y/o multivalentes.

Como se describe en este documento, el anticuerpo anti-CD45RC es un anticuerpo reductor de células CD45RC<sup>+</sup>.

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpos que agotan las células CD45RC<sup>+</sup>" se define como aquellos anticuerpos que se unen a un marcador de superficie celular CD45RC<sup>+</sup> en la superficie de las células CD45RC<sup>+</sup> (preferiblemente CD45RC) y median su destrucción o agotamiento (es decir, reducir los niveles de células T CD45RC<sup>+</sup> en circulación en un paciente tratado con ellos) cuando se unen a dicho marcador de superficie celular. Dicho agotamiento se puede lograr a través de diversos mecanismos, como la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la inhibición de la proliferación de células CD45RC<sup>+</sup> y/o la inducción de la muerte celular de CD45RC<sup>+</sup> (por ejemplo, vía apoptosis). Los anticuerpos que agotan las células CD45RC<sup>+</sup>, más preferiblemente un anticuerpo anti-CD45RC, se conjugan opcionalmente o se fusionan con un agente citotóxico. El término incluye fragmentos de anticuerpos y diferentes formatos de anticuerpos creados a partir de estos fragmentos, en particular formatos de anticuerpos quimerizados o humanizados, multiespecíficos y/o multivalentes. Los "formatos de anticuerpos" corresponden a diferentes combinaciones de dominios y regiones tales como los dominios variables de anticuerpos de cadena simple pesada (VHH) de Camelidae (camello, dromedario, llama), reconociendo específicamente un tipo de antígeno.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "marcador de superficie celular CD45RC<sup>+</sup>" o "antígeno celular CD45RC<sup>+</sup>" se refieren a un antígeno expresado en la superficie de las células CD45RC<sup>+</sup> (incluidas las células T y B) que pueden seleccionarse como diana con un agente anti-CD45RC que se une al mismo (como un anticuerpo o un aptámero). Los marcadores de la superficie de las células T CD45RC<sup>+</sup> incluyen, entre otros, los CD45RC descritos anteriormente u otros antígenos que caracterizan dicha población de células T. El marcador de superficie de células T CD45RC<sup>+</sup> de interés particular se expresa preferentemente en células T CD45RC<sup>+</sup> en comparación con otras células T no CD45RC<sup>+</sup> de un mamífero.

Luego, después de generar anticuerpos dirigidos contra el marcador de superficie celular CD45RC como se describió anteriormente, el experto en la técnica puede seleccionar fácilmente aquellos que agotan las células CD45RC<sup>+</sup>, por ejemplo aquellos que agotan las células CD45RC<sup>+</sup> a través de la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), inhibición de la proliferación celular CD45RC<sup>+</sup> o inducción de la muerte celular CD45RC<sup>+</sup> (por ejemplo, a través de la apoptosis).

La expresión "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" (ADCC) se refiere a una forma de citotoxicidad en la que los anticuerpos secretados se unen a los receptores Fc (FcRs) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, las células NK, neutrófilos, monocitos y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana portadora de antígeno y, posteriormente, destruyan la célula diana. Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo in vitro de ADCC, como el que se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.500.362 o 5.821.337.

La expresión "citotoxicidad dependiente del complemento" (CDC) se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento a los anticuerpos que se unen a su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, un ensayo de CDC, p. ej. como se describe en Gazzano-Santoro et al. (1997) se puede realizar.

En una realización particular, el anticuerpo anti-CD45RC puede consistir en un anticuerpo dirigido contra el marcador de superficie CD45RC que está conjugado con un agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento.

Por consiguiente, la invención contempla el uso de inmunocombinados que comprenden un anticuerpo contra el marcador de superficie CD45RC conjugado con un agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento. Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa en este documento, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente células CD45RC<sup>+</sup>, ya sea in vitro o in vivo. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular, tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueadores clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II, como la doxorubicina, la epirubicina, la daunorrubicina, el etopósido y la bleomicina. Los agentes que detienen G1 también se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, los agentes alquilantes de ADN como el tamoxifeno, la prednisona, la dacarbazina, la mecloretamina, el cisplatino, el metotrexato y el 5-fluorouracilo. La expresión "agente citotóxico", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o causa la destrucción de las células. La expresión pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, p. ej., metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercaladores, enzimas y fragmentos de los mismos, como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas, tales como las toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas, por ejemplo, gelonina, ricina, saporina y los diversos agentes antitumorales o anticancerosos descritos a continuación.



La conjugación de los anticuerpos de la invención con agentes citotóxicos o agentes inhibidores del crecimiento se puede hacer usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales que incluyen, entre otros, propionato de N-succinimidilo (2-piridilditio) (SPDP), ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (N-maleimidometilo), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (como el suberato de disuccinimidilo), aldehídos (como glutaraldehído), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor activos (como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar como se describe en Vitetta et al (1987). El ácido 1-isotiocianatobencilo metildietilen triaminopentaacético marcado con carbono (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótidos con el anticuerpo (documento WO 94/11026).

Métodos terapéuticos y usos:

La invención proporciona métodos y composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) para su uso en la inducción de tolerancia inmune en un paciente que lo necesite.

La invención también proporciona métodos y composiciones para usar en la prevención o reducción del rechazo de trasplantes en un paciente que lo necesite.

La invención proporciona además métodos y composiciones para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunes, respuestas inmunes no deseadas contra proteínas terapéuticas, alergias y linfomas o cáncer, que se asocian con células CD45RC<sup>+</sup> en un paciente del mismo.

La invención se refiere a un anticuerpo anti-CD45RC aislado para uso como fármaco.

En una realización particular, el anticuerpo anti-CD45RC es un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC, más particularmente un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC humano como se describe anteriormente.

La invención se refiere a un anticuerpo anti-CD45RC aislado para su uso en la inducción de tolerancia inmune en un paciente que lo necesite.

En una realización particular, el anticuerpo anti-CD45RC es un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC, más particularmente un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC humano como se describe anteriormente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "tolerancia inmune" se refiere a un estado de falta de respuesta del sistema inmune a sustancias o tejidos específicos que tienen la capacidad de provocar una respuesta inmune al tiempo que preserva las respuestas inmunes contra otras sustancias o tejidos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "respuesta inmune" incluye respuestas inmunes mediadas por células T y/o células B. Las respuestas inmunes ejemplares incluyen respuestas de células T, por ejemplo, producción de citoquinas y citotoxicidad celular, además, la expresión respuesta inmune incluye respuestas inmunes que están afectadas indirectamente por la activación de células T, por ejemplo, la producción de anticuerpos (respuestas humorales) y la activación de células sensibles a citoquinas, por ejemplo, macrófagos. Las células inmunitarias implicadas en la respuesta inmunitaria incluyen linfocitos, como las células B y las células T (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, células Th1 y Th2); células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células presentadoras de antígeno profesionales tales como células dendríticas); células asesinas naturales; células mieloides, como macrófagos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y granulocitos.

La invención se refiere a un anticuerpo anti-CD45RC aislado para uso en la expansión y/o potenciación de células T reguladoras en un paciente que lo necesita.

Como se usa en el presente documento, la expresión "células T reguladoras" (Treg) se refiere a las células T que suprimen una respuesta inmune anormal o excesiva y desempeñan un papel en la tolerancia inmunológica. Las células T reguladoras suelen ser células T reguladoras P3 forkhead box (Foxp3<sup>+</sup>) y "células CD45RC<sup>bajo</sup>". Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "células T reguladoras forkhead box P3 (Foxp3<sup>+</sup>)" o "células Treg Foxp3<sup>+</sup>" se refieren al 2-10% de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en humanos y roedores (ratas o ratones) cuyo marcador característico es el factor de transcripción Foxp3.

Como se usa en el presente documento, el término "expansión" se refiere al proceso de conversión y/o amplificación de una población dada de células (por ejemplo, células inmunes tales como células Treg).

Como se usa en este documento, el término "potenciar" se refiere al proceso de aumentar la función de una población dada de células (por ejemplo, aumentar la capacidad supresora de las células Treg como se detalla en los Ejemplos de la Sección a continuación).

En una realización, dichas células Treg son células Treg Foxp3<sup>+</sup> y/o CD45RC<sup>bajo</sup>.

La invención se refiere a un anticuerpo anti-CD45RC aislado para su uso en la prevención o reducción del rechazo de trasplantes en un paciente que lo necesite.

En una realización particular, el anticuerpo anti-CD45RC es un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC, más particularmente un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC humano como se describe anteriormente.

5 Como se usa en este documento, la expresión "prevenir o reducir el rechazo del trasplante" pretende abarcar la prevención o inhibición del rechazo del trasplante inmunitario, así como retrasar la aparición o la progresión del rechazo del trasplante inmunitario. También se pretende que la expresión abarque prolongar la supervivencia de un trasplante en un paciente, o revertir el fracaso de un trasplante en un paciente. Además, la expresión pretende abarcar la mejora de un síntoma de un rechazo de trasplante inmunitario, que incluye, por ejemplo, la mejora de una complicación inmunológica asociada con el rechazo inmunitario, como, por ejemplo, fibrosis intersticial, arteriosclerosis de injerto crónica o vasculitis.

10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "rechazo de trasplante" abarca tanto el rechazo de trasplante agudo como el crónico. El "rechazo agudo" es el rechazo por parte del sistema inmunitario de un receptor de trasplante de tejido cuando el tejido trasplantado es inmunológicamente extraño. El rechazo agudo se caracteriza por la infiltración del tejido del trasplante por las células inmunes del receptor, que llevan a cabo su función efectora y destruyen el tejido del trasplante. El inicio del rechazo agudo es rápido y generalmente ocurre en seres humanos a las pocas semanas después de la cirugía del trasplante. En general, el rechazo agudo puede inhibirse o suprimirse con fármacos inmunodepresores como la rapamicina, la ciclosporina, el anticuerpo monoclonal anti-CD40L y similares. El "rechazo crónico" generalmente ocurre en seres humanos a los varios meses o años después del injerto, incluso en presencia de una inmunodepresión exitosa de rechazo agudo. La fibrosis es un factor común en el rechazo crónico de todos los tipos de trasplantes de órganos.

20 El término "trasplante" y sus variaciones se refieren a la inserción de un trasplante (también llamado injerto) en un receptor, si el trasplante es singénico (cuando el donante y el receptor son genéticamente idénticos), alogénico (cuando el donante y el receptor son de orígenes genéticos diferentes pero de la misma especie), o xenogénicos (cuando el donante y el receptor son de diferentes especies). Así, en un escenario típico, el huésped es humano y el injerto es un isoinjerto, derivado de un humano de los mismos orígenes genéticos o diferentes. En otro escenario, el injerto se deriva de una especie diferente de aquella a la que se trasplanta, incluidos los animales de especies separadas filogenéticamente, por ejemplo, un corazón de babuino que se trasplanta a un huésped humano.

25 En una realización particular, el rechazo de trasplante es un rechazo alogénico de trasplante. Por consiguiente, en una realización, el donante del trasplante es un ser humano. El donante del trasplante puede ser un donante vivo o un donante fallecido, es decir, un donante cadáver.

30 En una realización, el trasplante es un órgano, un tejido o células.

35 Como se usa en este documento, el término "órgano" se refiere a un órgano vascularizado sólido que realiza una función específica o grupo de funciones dentro de un organismo. El término órgano incluye, entre otros, corazón, pulmón, riñón, hígado, páncreas, piel, útero, hueso, cartílago, intestino delgado o grueso, vejiga, cerebro, seno, vasos sanguíneos, esófago, trompa de Falopio, vesícula biliar, ovarios, páncreas, próstata, placenta, médula espinal, extremidades que incluyen las superiores e inferiores, bazo, estómago, testículos, timo, tiroides, tráquea, uréter, uretra, útero. Como se usa en este documento, el término "tejido" se refiere a cualquier tipo de tejido en humanos o animales, e incluye, entre otros, tejido vascular, tejido de la piel, tejido hepático, tejido pancreático, tejido neural, tejido urogenital, tejido gastrointestinal, tejido esquelético incluyendo hueso y cartílago, tejido adiposo, tejido conjuntivo incluyendo tendones y ligamentos, tejido amniótico, tejido coriónico, duramadre, pericardio, tejido muscular, tejido glandular, tejido facial, tejido oftálmico.

40 En una realización particular, el trasplante es un alotrasplante cardíaco.

Como se usa en el presente documento, el término "células" se refiere a una composición enriquecida para células de interés, preferiblemente una composición que comprende al menos el 30%, preferiblemente al menos el 50%, incluso más preferiblemente al menos el 65% de dichas células.

45 En ciertas realizaciones, las células se seleccionan del grupo que consiste en células madre hematopoyéticas multipotentes derivadas de médula ósea, sangre periférica o sangre del cordón umbilical; o pluripotentes (es decir, células madre embrionarias (ES) o células madre pluripotentes inducidas (iPS)) o células diferenciadas derivadas de células madre multipotentes de diferentes linajes celulares tales como cardiomiocitos, células beta-pancreáticas, hepatocitos, neuronas, etc.

50 En una realización, la composición celular se usa para el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (TCMH) y, por lo tanto, comprende células madre hematopoyéticas multipotentes, generalmente derivadas de médula ósea, sangre periférica o sangre del cordón umbilical.

55 El TCMH puede ser curativo para pacientes con leucemia y linfomas. Sin embargo, una limitación importante de la HCT alogénica es el desarrollo de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD, por sus siglas en inglés), que se presenta de forma grave en aproximadamente el 30-50% de los humanos que reciben esta terapia.

Los anticuerpos de la invención son útiles para prevenir o reducir la enfermedad de injerto contra huésped (GvHD).

Por consiguiente, en una realización, el paciente que lo necesita se ve afectado con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en leucemia mieloide aguda (AML); leucemia linfoide aguda (ALL); leucemia mieloide crónica (LMC); síndrome de mielodisplasia (MDS)/síndrome mieloproliferativo; linfomas como los linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, la leucemia linfática crónica (CLL) y el mieloma múltiple.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo anti-CD45RC aislado para su uso en la prevención o tratamiento de enfermedades autoinmunes, respuestas inmunes no deseadas contra proteínas expresadas en el curso de la terapia génica o proteínas terapéuticas, alergias y linfomas o cáncer que están asociados con células CD45RC<sup>+</sup> en un paciente del mismo.

10 En una realización particular, el anticuerpo anti-CD45RC es un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC como se describe anteriormente.

15 Tal como se usa en el presente documento, los términos "prevenir", "previniendo" y "prevención" se refieren a la administración de terapia a un individuo que en última instancia puede manifestar al menos un síntoma de una enfermedad, trastorno o afección, pero que aún no lo ha hecho, para reducir la posibilidad de que el individuo desarrolle el síntoma de la enfermedad, trastorno o afección durante un período de tiempo determinado. Dicha reducción puede reflejarse, por ejemplo, en un inicio tardío de al menos un síntoma de la enfermedad, trastorno o afección en el paciente. Como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "que trata" o "tratamiento" se refieren a la administración de terapia a un individuo en un intento de reducir la frecuencia y/o la gravedad de los síntomas de una enfermedad, defecto, trastorno o condición adversa de un paciente.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad autoinmune" se refiere a una enfermedad en la que el sistema inmunológico produce una respuesta inmune (por ejemplo, una respuesta de células B o de células T) contra un antígeno que forma parte del huésped normal (que es un auto-antígeno), con el consiguiente daño a los tejidos. En una enfermedad autoinmune, el sistema inmunitario del huésped no reconoce un antígeno particular como "auto" y se produce una reacción inmunitaria contra los tejidos del huésped que expresan el antígeno.

25 Las enfermedades autoinmunes ejemplares que afectan a los seres humanos incluyen artritis reumatoide, oligoartritis juvenil, artritis inducida por colágeno, artritis inducida por adyuvante, síndrome de Sjogren, esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmune experimental, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), atrofia autoinmune gastronómica, pénfigo vulgar, psoriasis, vitiligo, diabetes tipo 1, diabetes no obesa, miastenia gravis, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, colangitis esclerosante, sialadenitis esclerosante, lupus eritematoso sistémico, trombocitopenia púrpura autoinmune, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Addison, esclerosis sistémica, polimiositis, dermatomiositis, hemofilia adquirida, púrpura trombocitopénica trombótica y similares.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "respuesta inmune no deseada contra una proteína terapéutica" se refiere a cualquier reacción inmune no deseada dirigida a proteínas expresadas en el curso de la terapia génica y/o proteínas terapéuticas, como el factor VIII (hemofilia A) y otros factores de coagulación, terapias de reemplazo de enzimas, anticuerpos monoclonales (por ejemplo, natalizumab, rituximab, infliximab), anticuerpos policlonales, enzimas o citoquinas (por ejemplo, IFN  $\beta$ ).

35 Por ejemplo, este enfoque puede aplicarse de hecho para suprimir una respuesta inmune, especialmente para prevenir reacciones inmunes frente a proteínas específicas cuando su expresión es restaurada por terapia génica en individuos con deficiencias genéticas correspondientes. Por lo tanto, un anticuerpo anti-CD45RC aislado de acuerdo con la invención puede usarse para prevenir la reactividad inmune frente a proteínas normalmente ausentes en el paciente debido a mutaciones, mientras que su reconstitución se logra mediante terapia génica.

40 Además, la terapia de proteínas es un área de innovación médica que se está generalizando e implica la aplicación de proteínas, como enzimas, anticuerpos o citoquinas, directamente a los pacientes como productos terapéuticos. Uno de los principales obstáculos en la administración de tales medicamentos es la respuesta inmune dirigida contra la proteína terapéutica. La administración de terapias basadas en proteínas suele ir acompañada de la administración de supresores inmunitarios, que se utilizan para facilitar una vida útil más larga de la proteína y, por lo tanto, una mayor captación de la proteína en las células y tejidos del organismo. Sin embargo, los supresores inmunitarios generales pueden ser desventajosos debido a la naturaleza inespecífica de la supresión inmunitaria que se lleva a cabo, dando como resultado efectos secundarios no deseados en el paciente. Por lo tanto, este enfoque puede aplicarse para suprimir una respuesta inmune contra proteínas y péptidos terapéuticos, como anticuerpos terapéuticos, citoquinas, enzimas o cualquier otra proteína administrada a un paciente.

45 Como se usa en el presente documento, el término "alergia" o "alergias" se refiere a un trastorno (o reacción inadecuada) del sistema inmunológico. Las reacciones alérgicas ocurren frente a sustancias ambientales normalmente inocuas conocidas como alérgenos; estas reacciones son adquiridas, predecibles y rápidas. Estrictamente, la alergia es una de las cuatro formas de hipersensibilidad y se denomina hipersensibilidad de tipo I (o inmediata). Se caracteriza por la activación excesiva de ciertos glóbulos blancos llamados mastocitos y basófilos por un tipo de anticuerpo conocido como IgE, que resulta en una respuesta inflamatoria extrema. Las reacciones

alérgicas comunes incluyen eczema, urticaria, fiebre del heno, asma, alergias alimentarias y reacciones al veneno de insectos que pican, como las avispas y las abejas.

#### Composiciones farmacéuticas

5 La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CD45RC aislado de la invención, tal como un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC.

En una realización, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo monoclonal CD45RC antihumano aislado.

En una realización particular, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC aislado seleccionado del grupo que consiste en MT2 o un derivado del mismo, RP1/12 o un derivado del mismo y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 Por lo tanto, un anticuerpo de la invención puede combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas. "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra antagonista cuando se administran a un mamífero, especialmente a un ser humano, según corresponda. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente  
15 aceptable se refiere a un relleno no sólido, semisólido o líquido no tóxico, diluyente, material de encapsulación o agente auxiliar de formulación de cualquier tipo. La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosis y el régimen dependen naturalmente de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del paciente, etc. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para administración tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular y  
20 similares.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estas pueden ser en particular soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales), o  
25 composiciones secas, especialmente liofilizadas que, además, dependen del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permite la constitución de soluciones inyectables. Las dosis utilizadas para la administración pueden adaptarse en función de diversos parámetros y, en particular, en función del modo de administración utilizado, de la patología relevante o, alternativamente, de la duración deseada del tratamiento. Para preparar composiciones farmacéuticas, una cantidad eficaz del anticuerpo puede disolverse o dispersarse en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen  
30 soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil capacidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, como bacterias y hongos.

35 Las dosis a administrar dependen de las necesidades individuales, del efecto deseado y de la vía de administración elegida. Se entiende que la dosis administrada dependerá de la edad, el sexo, la salud y el peso del receptor, el tratamiento simultáneo, si corresponde, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado. La dosis total requerida para cada tratamiento se puede administrar en dosis múltiples o en una sola dosis.

Las dosis utilizadas para la administración pueden adaptarse en función de diversos parámetros y, en particular, en  
40 función del modo de administración utilizado de la patología relevante o, alternativamente, de la duración deseada del tratamiento. Por ejemplo, está dentro de la experiencia de la técnica iniciar dosis de anticuerpos a niveles más bajos que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosis diaria de los anticuerpos puede variar en un amplio intervalo de 0,01 a 1,000 mg por adulto al día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0;  
45 15,0; 25,0; 50,0; 100; 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosis al sujeto a tratar. Un medicamento contiene típicamente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Una cantidad efectiva del medicamento se suministra a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal por día.

50 La composición farmacéutica de la invención puede comprender además un fármaco inmunodepresor.

En una realización, el fármaco inmunosupresor se selecciona del grupo que consiste en agentes citostáticos tales como dianas de mamíferos de inhibidores de rapamicina (mTOR) y la rapamicina (sirolimus); agentes alquilantes (ciclofosfamida) y antimetabolitos (azatioprina, mercaptopurina y metotrexato); anticuerpos terapéuticos (tales como anticuerpos monoclonales anti-CD40L, anticuerpos monoclonales anti-IL-2R, anticuerpos monoclonales anti-CD3,  
55 globulina anti-linfocito (ALG) y globulina anti-timocito (ATG)); inhibidores de la calcineurina (ciclosporina); glucocorticoides y micofenolato mofetilo.

La invención se refiere también a métodos de inducción in vivo de tolerancia. Los métodos incluyen tratamientos previos a las terapias in vivo para prevenir el rechazo de órganos, tejidos o células trasplantados y terapias in vivo posteriores al trasplante para revertir una respuesta inmunitaria.

5 La invención se refiere a un método para inducir tolerancia inmune en un paciente que lo necesita, que comprende una etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD45RC (tal como un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC).

La invención se refiere a un método para expandir y/o potenciar células T reguladoras en un paciente que lo necesite, que comprende una etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD45RC (tal como un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC).

10 La invención se refiere a un método para prevenir o reducir el rechazo de trasplantes en un paciente que lo necesite, que comprende una etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD45RC (tal como un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC) previamente y/o de forma simultánea y/o posterior al trasplante.

En una realización particular, el rechazo de trasplante es un rechazo alogénico de trasplante.

15 La invención se refiere a un método para prevenir o reducir la GVHD en un paciente que lo necesite, que comprende una etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD45RC (tal como un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC) previamente y/o simultáneamente y/o posteriormente al trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (TCMH).

20 Como se usa en este documento, el término "previamente" significa que el anticuerpo de interés se administra al paciente receptor antes del trasplante, por ejemplo, 20, 15, 10, 5 días antes del trasplante.

Como se usa en el presente documento, el término "simultáneamente" significa que el anticuerpo de interés se administra al paciente receptor el mismo día que el trasplante.

Como se usa en este documento, el término "posteriormente" significa que el anticuerpo de interés se administra al paciente receptor después del trasplante, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 días después del trasplante.

25 La invención se refiere a un método para mejorar la supervivencia del trasplante en un paciente (receptor) trasplantado, comprendiendo dicho método una etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD45RC (tal como un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC).

30 La invención se refiere a un método para prevenir o reducir la GVHD en un paciente que lo necesite, que comprende las etapas de (a) tratar previamente las células madre hematopoyéticas alogénicas (o un injerto de células madre hematopoyéticas) con una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD45RC; y (b) administrar al paciente que lo necesite las células madre hematopoyéticas alogénicas tratadas previamente obtenidas en la etapa (a).

Por consiguiente, la invención se refiere a una población de células madre hematopoyéticas alogénicas (o un injerto de células madre hematopoyéticas) tratadas con un anticuerpo anti-CD45RC.

35 La invención se refiere a un método para prevenir o tratar enfermedades autoinmunes, respuestas inmunes no deseadas contra proteínas terapéuticas, alergias y linfoma o cáncer que están asociados con células CD45RC<sup>+</sup> en un paciente que lo necesita, que comprende una etapa de administración a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD45RC (como un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC).

40 Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente para lograr una concentración de anticuerpos que sea capaz de prevenir, tratar o ralentizar la enfermedad a tratar. Dichas concentraciones pueden ser determinadas rutinariamente por los expertos en la materia. La cantidad del polipéptido realmente administrado generalmente será determinada por un médico o un veterinario, a la luz de las circunstancias relevantes, incluida la condición a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto real administrado, la edad, el peso y la respuesta del paciente, la gravedad de los síntomas del sujeto y similares. Los expertos en la materia también apreciarán que  
45 la dosificación puede depender de la estabilidad del polipéptido administrado.

En una realización, el tratamiento con un anticuerpo anti-CD45RC (como un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC) se administra en más de un ciclo, es decir, la administración de un anticuerpo anti-CD45RC (como un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC) es repite al menos una vez.

50 Por ejemplo, se pueden administrar de 2 a 10 ciclos o incluso más, dependiendo del estado y la respuesta específicos del paciente. Los intervalos, es decir, el tiempo entre el inicio de dos ciclos subsiguientes, son típicamente de varios días.

Composiciones del kit en partes:

El anticuerpo anti-CD45RC (como un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC) y el fármaco inmunosupresor se pueden combinar dentro de una formulación y administrar simultáneamente. Sin embargo, también pueden administrarse por separado, utilizando composiciones separadas. Se señala además que pueden administrarse en diferentes momentos.

- 5 La invención se refiere a una composición de kit en partes que comprende un anticuerpo anti-CD45RC y un fármaco inmunodepresor.

La invención se refiere a una composición de kit en partes que comprende un anticuerpo anti-CD45RC y un fármaco inmunodepresor para su uso en la prevención o reducción del rechazo de trasplantes en un paciente que lo necesite.

En una realización particular, el rechazo de trasplantes es un rechazo allogénico de trasplantes.

- 10 La invención se refiere a una composición de kit en partes que comprende un anticuerpo anti-CD45RC y un fármaco inmunodepresor para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunes, respuestas aloinmunes, alergias y linfomas o cáncer que están asociados con células CD45RC<sup>+</sup> en un paciente que lo necesite.

- 15 Los términos "kit", "producto" o "preparación combinada", como se usan en este documento, definen especialmente un "kit en partes" en el sentido de que las parejas de combinación, como se definieron anteriormente, se pueden dosificar independientemente o mediante el uso de diferentes combinaciones fijas con cantidades distinguidas de las parejas de combinación, es decir, simultáneamente o en diferentes momentos. Las partes del kit en partes se pueden administrar, por ejemplo, de forma simultánea o cronológicamente escalonada, es decir, en diferentes momentos y con intervalos de tiempo iguales o diferentes para cualquier parte del kit en partes. La proporción de las cantidades totales de las parejas de combinación que se administrarán en la preparación combinada puede variar.
- 20 Las parejas de combinación pueden administrarse por la misma ruta o por rutas diferentes. Cuando la administración es secuencial, la primera pareja puede administrarse, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, días antes de la segunda pareja.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente descripción.

- 25 FIGURAS:

Figura 1: Inducción de tolerancia después del tratamiento a corto plazo anti-CD45RC.

Los receptores fueron no tratados (n = 9), tratados 5 días (n = 3), 10 días (n = 3) o 20 días (n = 3) en la combinación de cepas LEW.1W/LEW.1A o no tratados (n = 4) o tratados 20 días en la combinación de cepas LEW.1A/LEW.1W. Se administraron mAbs anti-CD45RC (OX22) i.v a 0,8 mg/kg/inyección. \*\*p <0,01 versus no tratado.

- 30 Figura 2: Fenotipado de linfocitos en la sangre durante y después de 10 días de tratamiento anti-CD45RC. Los PBMC se recuperaron los días 0, 4 y 10 de los receptores tratados con anti-CD45RC y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar el número absoluto de subpoblaciones.

- 35 Figura 3: Las células reguladoras aumentan en el bazo de los receptores tratados con anti-CD45RC de larga supervivencia. Los esplenocitos se recuperaron el día 120 de los receptores tratados con anti-CD45RC en comparación con los esplenocitos sin tratamiento previo y se analizaron mediante citometría de flujo para los números absolutos de subpoblaciones.

- 40 Figura 4: Transferencia adoptiva de tolerancia. Los receptores de LEW.1A se irradiaron subletalmente (4,5 Gy) en el día -1 y recibieron aloinjertos de corazón e inyecciones i.v. en el día 0 de esplenocitos o subpoblaciones clasificadas de receptores tratados con anti-CD45RC de larga supervivencia. La supervivencia del injerto se monitorizó mediante palpación abdominal.

Figura 5: Aumento de la capacidad depresora de Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> después del tratamiento anti-CD45RC. Se analizaron células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> divididas en LEW.1A marcadas con CFSE estimuladas con pDC LEW.1W donantes después de 6 días de cultivo en ausencia o presencia de dI20 LEW.1A sin tratamiento previo o Tregs CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> tratadas con anti-CD45RC a diferentes relaciones efectoras/supresoras;

- 45 Figura 6: Tratamiento con mAb anti-CD45RC reduce la letalidad y la pérdida de peso en un modelo de GVHD. Las ratas que recibieron 200.10<sup>6</sup> esplenocitos se trataron con mAb anti-CD45RC o control de isotipos para evaluar la potencia para prevenir la GVHD. La pérdida de peso promedio (porcentaje del inicial) para ratas que sobrevivieron en un día determinado se mostró +/- SEM. \*\*\*p <0,001. n = 3.

- 50 EJEMPLO 1: Tratamiento a corto plazo del anticuerpo anti-CD45RC produce una tolerancia al trasplante asociada con la inducción de células reguladoras potentes;

Materiales y métodos;

Animales y modelos de trasplante cardíaco: Se realizaron alotrasplantes cardíacos entre ratas LEW-1W macho y LEW-1A incompatibles con MHC completas como se describió anteriormente (16, 22, 23). La supervivencia cardíaca se evaluó mediante palpación a través de la pared abdominal y el latido cardíaco se clasificó de +++ a.

Los experimentos fueron aprobados por el comité de ética regional para la experimentación con animales.

5 Administración de anti-CD45RC: El hibridoma de ratón OX22 (IgG1 anti-rata CD45RC) se usó para producir el anticuerpo monoclonal anti-CD45RC. Los mAb anti-CD45RC se administraron a una dosis de 0,8 mg/kg/2,5 días i.v. del día 0 al 5, 10 ó 20 post-trasplante. Se utilizó IgG1 de control (3G8, CD16 antihumano, sin reacción cruzada con la rata) a la misma dosis.

10 Estudios de histopatología: las muestras de tejido se analizaron en busca de rechazo crónico en el día 120 posterior al trasplante, tal como se describió anteriormente. En resumen, los tejidos se fijaron en paraformaldehído, se embebieron en parafina, se cortaron en secciones de 5 µm de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina-azafrán. (24)

15 Preparación de linfocitos, aislamiento de subpoblaciones y transferencia adoptiva: El bazo se recogió el día 120 y los esplenocitos o subpoblaciones se purificaron como se describió anteriormente (16). Las transferencias celulares fueron realizadas por inyección i.v. de esplenocitos totales o subpoblaciones purificadas el día del trasplante de LEW.1W en receptor LEW.1A de radiación subletal (4,5 Gy día -1);

20 Anticuerpos monoclonales y tinción: las células T y pDC se purificaron y clasificaron como se describió anteriormente (20). La citometría de flujo y la clasificación celular se realizaron utilizando anticuerpos dirigidos a las células T (TCRαβ, clon R7/3), células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (clones OX35 y OX39), células T CD8<sup>+</sup> (clon OX8), células T CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>bajo</sup> (clones OX8 y OX22), y pDC CD4<sup>+</sup>CD45R<sup>+</sup>85C7<sup>+</sup> (clones His24, OX35 y 85C7), CD11b y células B CD45RA<sup>+</sup> (OX33) obtenidas de la Colección Europea de Cultivos Celulares (Salisbury, Reino Unido). Todos los mAbs marcados con biotina se visualizaron utilizando estreptavidina-PE-Cy7 (BD Biosciences) o estreptavidina-Alexa405. Se utilizó un citómetro Canto II (BD Biosciences, Mountain View, CA) para medir la fluorescencia, y los datos se analizaron utilizando el software FLOWJO (Tree Star, Inc. EE.UU.). Las células se clasificaron por primera vez por su morfología excluyendo las células muertas mediante la selección de células viables DAPI.

25 Reacción mixta de linfocitos: Se clasificaron células T sin tratamiento previo Lewis 1A CD4<sup>+</sup>, pDC alogénicas Lewis 1W sin tratamiento previo y subconjuntos de Tregs Lewis 1A CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> singénicos tratados como se describió anteriormente (19). La proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> marcados con CFSE se analizó mediante citometría de flujo 6 días después, mediante la selección de células TCR<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (R7/3-APC, Ox35-PECY7) entre células vivas (DAPI negativo).

30 Detección de anticuerpos: Aloanticuerpos. Los bazos de los donantes se digirieron con colagenasa D, se detuvieron con 400 µl de EDTA 0,1 mM y se lisaron los glóbulos rojos. El suero de los receptores se añadió a los esplenocitos del donante a una dilución 1/8, y se incubó con IgG-FITC anti-rata (Jackson ImmunoResearch Labs INC, Baltimore, EE. UU.), IgG1 anti-rata (MCA 194, Serotec), IgG2a anti-rata (MCA 278, Serotec), o IgG2b anti-rata (STAR114F, Serotec) y anti-Ms Ig-FITC (115-095-164, Jackson ImmunoResearch). Se utilizó un Canto FACS (BD Biosciences, Mountain View, CA) para medir la fluorescencia, y los datos se analizaron utilizando el software FLOWJO (Tree Star, Inc. EE. UU.). La media geométrica de fluorescencia (MFI) de los sueros analizados se dividió por medio de 5 sueros MFI de Lewis 1A sin tratamiento previo como control.

35 Inmunización y detección de anticuerpos anti-KLH: Se inyectó hemocianina de lapa californiana (KLH, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) a > 100 días después del trasplante en la almohadilla de la pata (50 µg emulsionada en 200 µl de adyuvante completo de Freund). Se detectaron repetidamente anti-KLH IgM e IgG Abs en los días 4 y 13 después de la inmunización mediante ELISA como se describió anteriormente (18).

40 Análisis estadístico: Se usó la prueba ANOVA Kruskal Wallis de una vía y el postest de Dunn para los experimentos de cocultivo, la prueba ANOVA bidireccional y el post test de Bonferroni para los anticuerpos dirigidos por el donante, y la caracterización del fenotipo de los esplenocitos, y la prueba de Mantel Cox se usó para analizar las curvas de supervivencia.

Resultados;

Inducción de tolerancia después del tratamiento con el anticuerpo anti-CD45RC a corto plazo:

50 Como se ha demostrado previamente la presencia y el potencial de las células T CD8<sup>+</sup> con expresión ausente o baja del marcador de superficie CD45RC, se especula que una estrategia de reconocimiento que usa un MAb anti-CD45RC promovería la tolerancia en los receptores transplantados cardíacos. Por lo tanto, se ha administrado un anticuerpo anti-CD45RC (OX22, 0,8 mg/kg/iv) cada 2,5 días durante 20, 10 ó 5 días a receptores de ratas trasplantadas (aloinjerto cardíaco MHC no coincidente, LEW.1W injertado en LEW.1A), a partir del día del trasplante.

55 Se obtuvo la supervivencia indefinida de aloinjertos en los receptores tratados 20 ó 10 días con el anticuerpo anti-CD45RC en comparación con los receptores control no tratados y los receptores tratados 5 días (Figura 1),

demonstrando por primera vez que la terapia a corto plazo con el anticuerpo anti-CD45RC fue eficiente promover la supervivencia indefinida del aloinjerto.

5 Para probar adicionalmente el potencial tolerogénico del anticuerpo anti-CD45RC in vivo, los receptores se injertaron en una combinación más fuerte de rechazo de aloinjerto (LEW.1A injertado en LEW.1W) y se administró el anticuerpo anti-CD45RC durante 20 días. En esta combinación de injerto, también se observó la supervivencia indefinida del aloinjerto en todos los receptores (Figura 1), lo que demuestra el alto efecto depresor del tratamiento anti-CD45RC.

10 El análisis histopatológico cardíaco reveló una ausencia completa de fibrosis, infiltrado y esclerosis vascular en el día 120 en 20 días de los receptores tratados con anti-CD45RC, lo que demuestra que este tratamiento a corto plazo inhibe eficazmente el rechazo agudo y crónico.

15 Finalmente, se analizó en estos receptores la presencia de anticuerpos anti-donante y la capacidad de producir respuestas de anticuerpos contra antígenos exógenos (KLH) el día 120 posterior al trasplante. Se observó una ausencia completa de anticuerpos IgG, IgG1, IgG2a e IgG2B anti-donante en receptores tratados 20 días con el anticuerpo anti-CD45RC en comparación con los controles. En contraste, se observó que la inmunización en el día 120 de los receptores sobrevivientes a largo plazo tratados durante 20 días con antígeno exógeno (KLH mezclado con CFA) resultó en una producción de alto nivel de anticuerpos tanto IgM como IgG en comparación con los receptores sin tratamiento previo.

20 En conjunto, se demostró que el tratamiento con anticuerpos anti-CD45RC dio como resultado la inhibición tanto del rechazo agudo como crónico, sin comprometer la inmunidad y la capacidad de los receptores para provocar las respuestas de los anticuerpos contra los antígenos afines.

25 El tratamiento a corto plazo con el anticuerpo anti-CD45RC dio como resultado una reducción temporal de los linfocitos pero aumentó las poblaciones reguladoras: Para analizar el efecto del anticuerpo anti-CD45RC en el fenotipo de los subconjuntos de células en la sangre de receptores tratados durante 10 días en el día 0, 4 y 10 después del trasplante, se analizaron los diferentes subconjuntos de células (Figura 2). En el día 4 se observó una ausencia completa de células CD45RC<sup>+</sup> y una ligera disminución de las células T y B (ya que ambas poblaciones expresaban CD45RC). En el día 10, se observó que todos los subgrupos volvieron a su nivel normal y se observó también un fuerte incremento en las poblaciones de T CD4<sup>+</sup> CD45RC<sup>-</sup>, T CD8<sup>+</sup>, CD45RC<sup>-</sup> y B<sup>+</sup>CD45RC<sup>-</sup> así como MDSC (Figura 2).

30 Dada la inducción de tolerancia a largo plazo que resultó del tratamiento anti-CD45RC de 10 y 20 días, se analizó la proporción de células regulatorias T<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>-bajo</sup>, T<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>-bajo</sup> o B<sup>+</sup>CD45RC<sup>-bajo</sup> en el bazo. En el día 120 después del tratamiento, el análisis del fenotipo de los receptores en el bazo reveló un fuerte enriquecimiento en el número absoluto de células T y, en particular, de T CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>int/-</sup>, T CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>-</sup>, mientras que otros subconjuntos de células no fueron modificados (Figura 3).

35 En conjunto, se demostró que el tratamiento a corto plazo con anti-CD45RC dio como resultado una disminución temporal de CD45RC<sup>+</sup>, células T y B, mientras que T<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>-bajo</sup>, T<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>-bajo</sup> y B<sup>+</sup>CD45RC<sup>-bajo</sup> se incrementaron pronto y el día 120, lo que sugiere un papel para las células reguladoras en la inducción de la tolerancia.

40 El tratamiento con anticuerpos anti-CD45RC a corto plazo produjo una potenciación de Tregs CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>-bajo</sup> y una tolerancia transferible: Para confirmar in vivo que el tratamiento a corto plazo con anticuerpos anti-CD45RC daba lugar a la inducción de potentes células reguladoras de la supresión, se realizó la transferencia de células adoptivas de esplenocitos o subpoblaciones a receptores de injertos cardíacos irradiados secundarios (Figura 4). Se observó que la transferencia de células adoptivas de 150.10<sup>6</sup> esplenocitos daba lugar a una supervivencia indefinida del aloinjerto en todos los receptores en comparación con los receptores transferidos con esplenocitos sin tratamiento previo o no transferidos. Para determinar más a fondo la subpoblación responsable de la inducción de tolerancia, se clasificaron las células CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>-bajo</sup>, CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>-bajo</sup> y B<sup>+</sup>CD45RC<sup>-bajo</sup> y se realizó la transferencia de células adoptivas. Mientras se observaba una ligera prolongación de la supervivencia del aloinjerto en los receptores transferidos de forma adoptiva con células B, se observó un 100% de supervivencia del aloinjerto en los receptores transferidos con las células Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> y células T CD4<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup>, demostrando que el agotamiento de las células CD45RC<sup>+</sup> desde el día 0 hasta el 20 había inducido y activado las células reguladoras con una fuerte capacidad depresora.

50 Como se había descrito anteriormente, un ensayo ex vivo para caracterizar la actividad depresora de Tregs CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> (19) y para evaluar después y comparar aún más la capacidad depresora de Tregs CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> inducido con el Ab anti-CD45RC a Tregs CD8<sup>+</sup>CD4RC<sup>bajo</sup> sin tratamiento previo, Treg CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>bajo</sup> se clasificaron el día 120 y se agregaron de forma dependiente de la dosis en un ensayo en el que células T efectoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> marcadas con CFSE se cocultivaron con células dendríticas plasmocitoides derivadas del donante (pDC) (Figura 5). En ausencia de Treg, se observó una fuerte proliferación de las células Teff CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>. Esta proliferación se redujo en presencia de Tregs CD8<sup>+</sup> CD45RC<sup>bajo</sup> sin tratamiento previo como se ha descrito anteriormente (19). Es interesante que, en presencia de Tregs CD8<sup>+</sup> CD45RC<sup>bajo</sup> inducidos por anti-



CD45RC de receptores d120, se observara una inhibición casi total de la proliferación de las células Teff CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de una manera dependiente de la dosis hasta menos una relación efector:depresor de 16:1, lo que demuestra el gran potencial de la terapia con Ab en la inducción de depresores fuertes Tregs CD8<sup>+</sup> CD45RC<sup>bajo</sup>.

EJEMPLO 2: El tratamiento con mAb anti-CD45RC reduce la letalidad y la pérdida de peso en un modelo de GVHD.

5 Materiales y métodos

Inducción de la enfermedad del injerto contra el huésped in vivo: Se inyectaron por vía intravenosa 200x10<sup>6</sup> esplenocitos en ratas singénicas o alogénicas tratadas 24 horas antes con irradiación subletal de todo el cuerpo de 7,8 Gy. Los receptores recibieron mAbs anti-CD45RC (OX22) o mAbs de control irrelevantes a partir del día 0 y cada 3 días a 2 mg/kg/inyección. Los receptores se pesaron todos los días y se sacrificaron cuando el porcentaje de pérdida de peso fue > 20% de su peso inicial.

Resultados

El tratamiento con mAb anti-CD45RC reduce la letalidad y la pérdida de peso en un modelo de GVHD: Para determinar si la administración de anti-CD45RC podía prevenir el desarrollo de enfermedad aguda de injerto contra huésped (GVHD), los receptores recibieron esplenocitos singénicos o alogénicos después de la irradiación subletal de todo el cuerpo. Los mAb anti-CD45RC o de control irrelevantes se administraron entonces i.p. cada 3 días. Se observó que los receptores que recibieron esplenocitos singénicos comenzaban a perder peso pero luego se recuperaban de la irradiación de todo el cuerpo y aumentaban de peso hasta el final del experimento. Curiosamente, se observó que los receptores a los que se les administraba esplenocitos alogénicos y el anticuerpo anti-CD45RC perdían significativamente menos peso que los receptores que habían recibido el anticuerpo irrelevante de control e incluso comenzaban a ganar peso el día 10, mientras que el grupo de control había perdido > 20% de su peso sacrificándose el día 12, demostrando en conjunto el potencial de la terapia anti-CD45RC para controlar la GVHD (Figura 6).

**REFERENCIAS:**

A lo largo de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

- 25 1. Gurkan, S., Luan, Y., Dhillon, N., Allam, S.R., Montague, T., Bromberg, J.S., Ames, S., Lerner, S., Ebcioğlu, Z., Nair, V., et al. 2010. Immune reconstitution following rabbit antithymocyte globulin. *Am J Transplant* 10:2132-2141.
2. Mai, H.L., Boeffard, F., Longis, J., Danger, R., Martinet, B., Haspot, F., Vanhove, B., Brouard, S., and Souillou, J.P. 2014. IL-7 receptor blockade following T cell depletion promotes long-term allograft survival. *J Clin Invest* 124:1723-1733.
- 30 3. Streuli, M., Hall, L.R., Saga, Y., Schlossman, S.F., and Saito, H. 1987. Differential usage of three exons generates at least five different mRNAs encoding human leukocyte common antigens. *J Exp Med* 166:1548-1566.
4. Thomas, M.L. 1989. The leukocyte common antigen family. *Annu Rev Immunol* 7:339-369.
5. Ordonez, L., Bernard, I., L'Faqihi-Olive, F.E., Tervaert, J.W., Damoiseaux, J., and Saoudi, A. 2009. CD45RC isoform expression identifies functionally distinct T cell subsets differentially distributed between healthy individuals and AAV patients. *PLoS One* 4:e5287.
6. Birkeland, M.L., Johnson, P., Trowbridge, I.S., and Pure, E. 1989. Changes in CD45 isoform expression accompany antigen-induced murine T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6734-6738.
7. Hermiston, M.L., Xu, Z., and Weiss, A. 2003. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* 21:107-137.
- 40 8. Hargreaves, M., and Bell, E.B. 1997. Identical expression of CD45R isoforms by CD45RC+ 'revertant' memory and CD45RC+ sin tratamiento previo CD4 T cells. *Immunology* 91:323-330.
9. Lazarovits, A.I., Poppema, S., Zhang, Z., Khandaker, M., Le Feuvre, C.E., Singhal, S.K., Garcia, B.M., Ogasa, N., Jevnikar, A.M., White, M.H., et al. 1996. Prevention and reversal of renal allograft rejection by antibody against CD45RB. *Nature* 380:717-720.
- 45 10. Basadonna, G.P., Auersvald, L., Khuong, C.Q., Zheng, X.X., Kashio, N., Zekzer, D., Minozzo, M., Qian, H., Visser, L., Diepstra, A., et al. 1998. Antibody-mediated targeting of CD45 isoforms: a novel immunotherapeutic strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3821-3826.
11. Abu-Hadid, M.M., Lazarovits, A.I., and Madrenas, J. 2000. Prevention of diabetes mellitus in the non-obese diabetic mouse strain with monoclonal antibodies against the CD45RB molecule. *Autoimmunity* 32:73-76.

12. Rogers, P.R., Pilapil, S., Hayakawa, K., Romain, P.L., and Parker, D.C. 1992. CD45 alternative exon expression in murine and human CD4+ T cell subsets. *J Immunol* 148:4054-4065.
13. Spickett, G.P., Brandon, M.R., Mason, D.W., Williams, A.F., and Woollett, G.R. 1983. MRC OX-22, a monoclonal antibody that labels a new subset of T lymphocytes and reacts with the high molecular weight form of the leukocyte-common antigen. *J Exp Med* 158:795-810.
14. Xystrakis, E., Bernard, I., Dejean, A.S., Alsaati, T., Druet, P., and Saoudi, A. 2004. Alloreactive CD4 T lymphocytes responsible for acute and chronic graft-versus-host disease are contained within the CD45RChigh but not the CD45RClow subset. *Eur J Immunol* 34:408-417.
15. Xystrakis, E., Dejean, A.S., Bernard, I., Druet, P., Liblau, R., Gonzalez-Dunia, D., and Saoudi, A. 2004. Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood* 104:3294-3301.
16. Guillonnet, C., Hill, M., Hubert, F.X., Chiffolleau, E., Herve, C., Li, X.L., Heslan, M., Usal, C., Tesson, L., Menoret, S., et al. 2007. CD40lg treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 117:1096-1106.
17. Powrie, F., and Mason, D. 1990. OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. *J Exp Med* 172:1701-1708.
18. Guillot, C., Guillonnet, C., Mathieu, P., Gerdes, C.A., Menoret, S., Braudeau, C., Tesson, L., Renaudin, K., Castro, M.G., Lowenstein, P.R., et al. 2002. Prolonged blockade of CD40-CD40 ligand interactions by gene transfer of CD40lg results in long-term heart allograft survival and donor-specific hyporesponsiveness, but does not prevent chronic rejection. *J Immunol* 168:1600-1609.
19. Li, X.L., Menoret, S., Bezie, S., Caron, L., Chabannes, D., Hill, M., Halary, F., Angin, M., Heslan, M., Usal, C., et al. 2010. Mechanism and localization of CD8 regulatory T cells in a heart transplant model of tolerance. *J Immunol* 185:823-833.
20. Picarda, E., Bezie, S., Venturi, V., Echasserieau, K., Merieau, E., Delhumeau, A., Renaudin, K., Brouard, S., Bernardeau, K., Anegon, I., et al. 2014. MHC-derived allopeptide activates TCR-biased CD8+ Tregs and suppresses organ rejection. *J Clin Invest* 124:2497-2512.
21. Ordonez, L., Bernard, I., Chabod, M., Augusto, J.F., Lauwers-Cances, V., Cristini, C., Cuturi, M.C., Subra, J.F., and Saoudi, A. 2013. A higher risk of acute rejection of human kidney allografts can be predicted from the level of CD45RC expressed by the recipients' CD8 T cells. *PLoS One* 8:e69791.
22. Haspot, F., Seveno, C., Dugast, A.S., Coulon, F., Renaudin, K., Usal, C., Hill, M., Anegon, I., Heslan, M., Josien, R., et al. 2005. Anti-CD28 antibody-induced kidney allograft tolerance related to tryptophan degradation and TCR class II B7 regulatory cells. *Am J Transplant* 5:2339-2348.
23. Josien, R., Heslan, M., Brouard, S., Soullillou, J.P., and Cuturi, M.C. 1998. Critical requirement for graft passenger leukocytes in allograft tolerance induced by donor blood transfusion. *Blood* 92:4539-4544.
24. Guillonnet, C., Louvet, C., Renaudin, K., Heslan, J.M., Heslan, M., Tesson, L., Vignes, C., Guillot, C., Choi, Y., Turka, L.A., et al. 2004. The role of TNF-related activation-induced cytokine-receptor activating NF-kappa B interaction in acute allograft rejection and CD40L-independent chronic allograft rejection. *J Immunol* 172:1619-1629.
25. Bedke T, Baars W, Schwinzer R. Modulation of human anti-pig T cell responses by monoclonal antibodies directed to porcine CD45 molecules. *Ann Transplant*. 2003;8(3):35-8.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSERM UNIVERSITE DE NANTES

5 <120> UN ANTICUERPO ANTI-CD45RC PARA USAR COMO MEDICAMENTO

<130> BIO13345 - GUILLONNEAU/AS  
 <150> EP 14 306 231.3

10 <151> 01-08-2014

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1  
 <211> 144  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 1  
 atgtcccagg agagaggagt acagccagca cctttcctac agaccagtt tccccattga 60  
 caaccaccct cagccttgca caccacagct ctgctgcctt acctgcacgc acctccaaca 120  
 ccaccatcac agcgaacacc tcag 144

<210> 2  
 <211> 47  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 2  
 Cys Pro Arg Arg Glu Glu Tyr Ser Gln His Leu Ser Tyr Arg Pro Ser  
 1 5 10 15  
 Phe Pro Ile Asp Asn His Pro Gln Pro Cys Thr Pro Gln Leu Cys Cys  
 20 25 30  
 Leu Thr Cys Thr His Leu Gln His His His His Ser Glu His Leu  
 35 40 45

30

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC aislado para usar en la prevención o reducción del rechazo de trasplantes en un paciente que lo necesite, en el que el anticuerpo monoclonal anti-CD45RC es un anticuerpo que destruye las células CD45RC<sup>+</sup>.
- 5 2. El anticuerpo monoclonal anti-CD45RC para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho rechazo de trasplante se selecciona del grupo que consiste en rechazo de células madre hematopoyéticas alogénicas (GVHD), rechazo al trasplante de corazón, islote pancreático, tejido vascular, riñón, pulmón e hígado en pacientes que lo necesiten.
- 10 3. El anticuerpo monoclonal anti-CD45RC para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho rechazo del trasplante es GVHD.
4. El anticuerpo monoclonal anti-CD45RC para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho rechazo de trasplante es un rechazo de alotrasplante cardíaco.
5. El anticuerpo monoclonal anti-CD45RC para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-CD45RC es un anticuerpo monoclonal anti-CD45RC humano.
- 15 6. El anticuerpo monoclonal anti-CD45RC para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-CD45RC es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo completamente humano.
7. El anticuerpo monoclonal anti-CD45RC para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-CD45RC es un anticuerpo quimérico.
- 20 8. El anticuerpo monoclonal anti-CD45RC para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-CD45RC media la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).
9. El anticuerpo monoclonal anti-CD45RC para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-CD45RC es un isotipo IgG1.
- 25 10. El anticuerpo monoclonal anti-CD45RC para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-CD45RC está conjugado con un agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento.
11. El anticuerpo monoclonal anti-CD45RC para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el trasplante es singénico, alogénico o xenogénico.
12. El anticuerpo monoclonal anti-CD45RC para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho rechazo de trasplante es un rechazo de trasplante agudo o crónico.
- 30 13. El anticuerpo monoclonal anti-CD45RC para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el paciente se trasplanta con células madre hematopoyéticas alogénicas para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en leucemia mieloide aguda (AML); leucemia linfoide aguda (ALL); leucemia mieloide crónica (LMC); síndrome de mielodisplasia (MDS)/síndrome mieloproliferativo; linfomas como los linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, la leucemia linfática crónica (CLL) y el mieloma múltiple.
- 35 14. Una composición farmacéutica o un kit en partes para su uso en la prevención o el tratamiento del rechazo alogénico de trasplantes que comprende un anticuerpo monoclonal aislado anti-CD45RC que es un anticuerpo reductor de células CD45RC<sup>+</sup> y un fármaco inmunodepresor seleccionado del grupo que consiste en agentes citostáticos, agentes alquilantes, anticuerpos antimetabolitos terapéuticos; inhibidores de la calcineurina; glucocorticoides y micofenolato mofetilo.

40

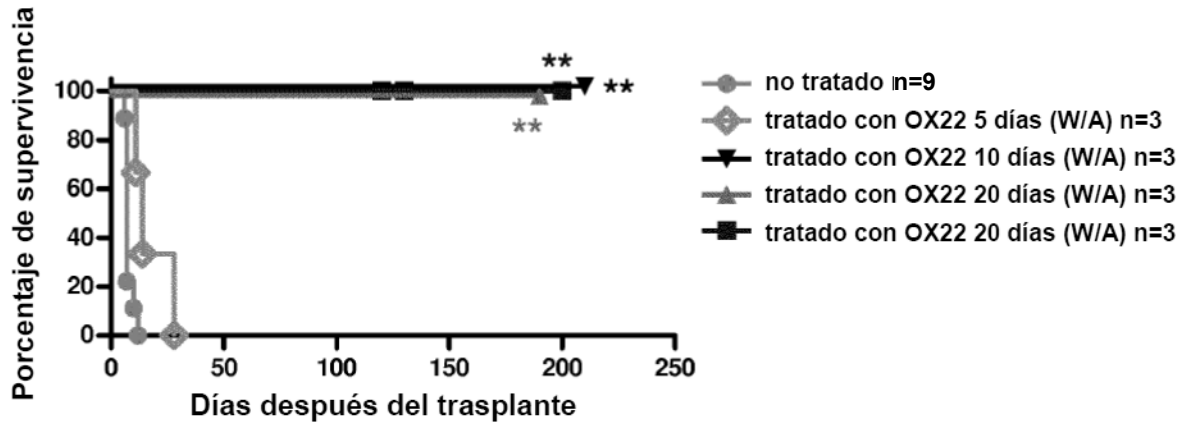


Figura 1

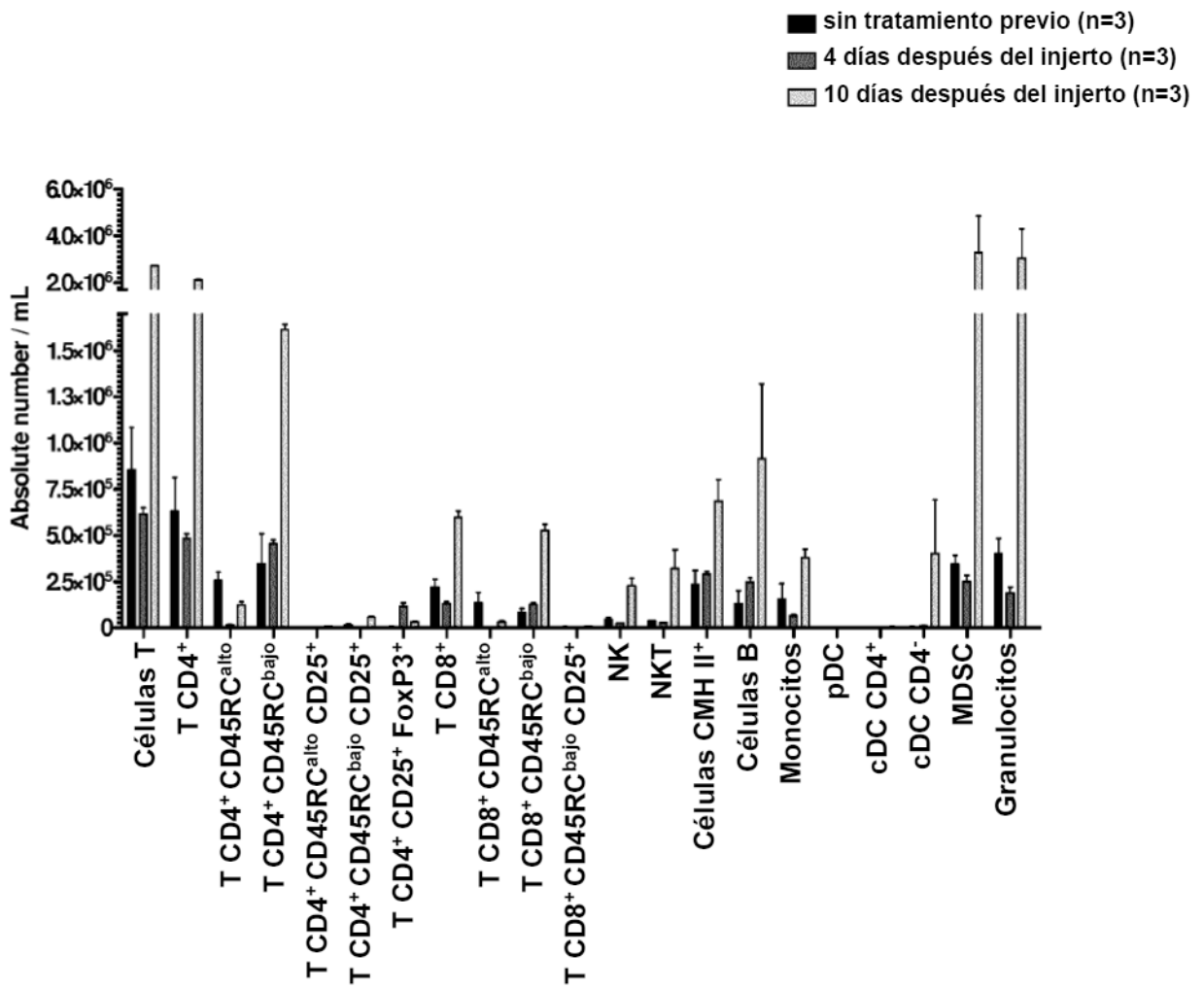


Figura 2

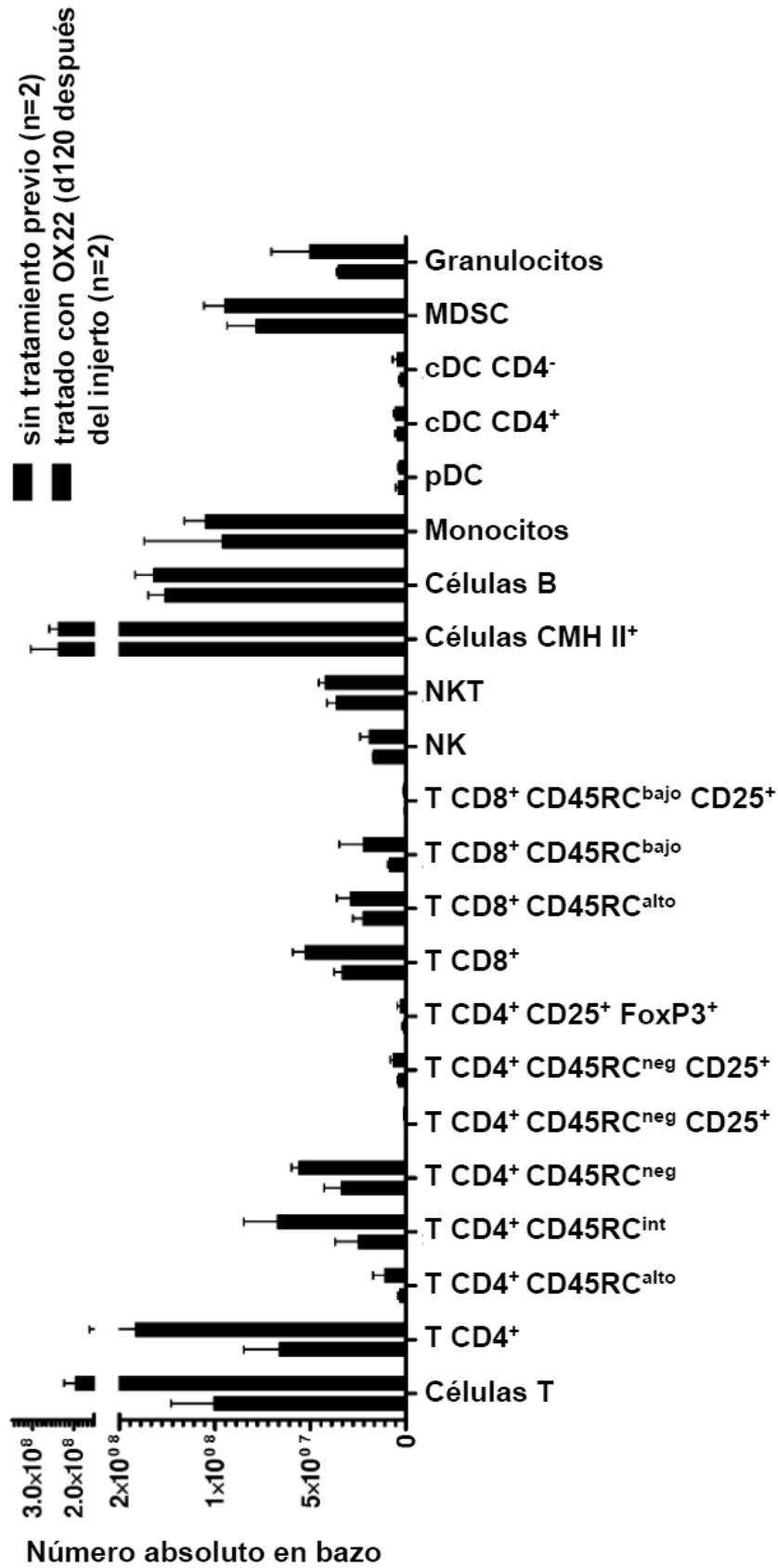


Figura 3

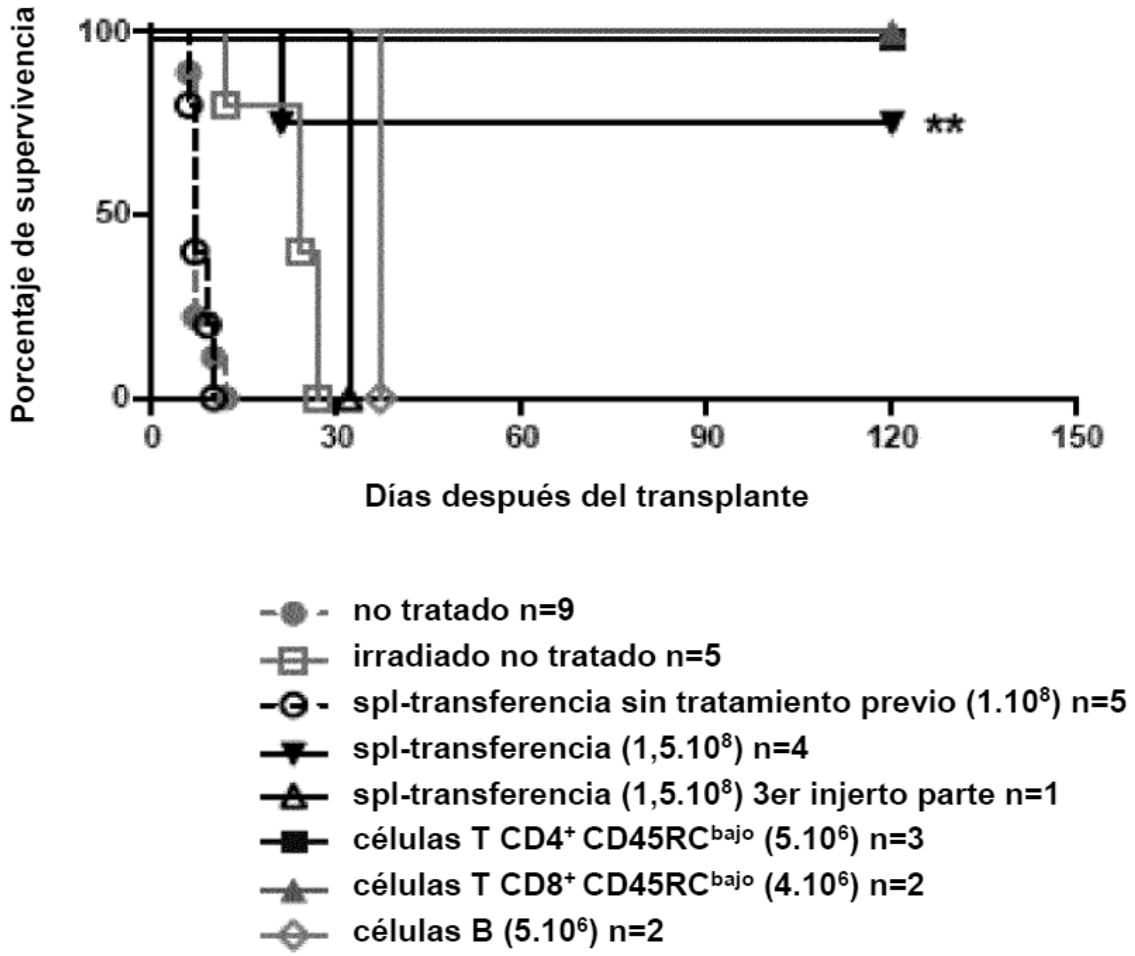


Figura 4

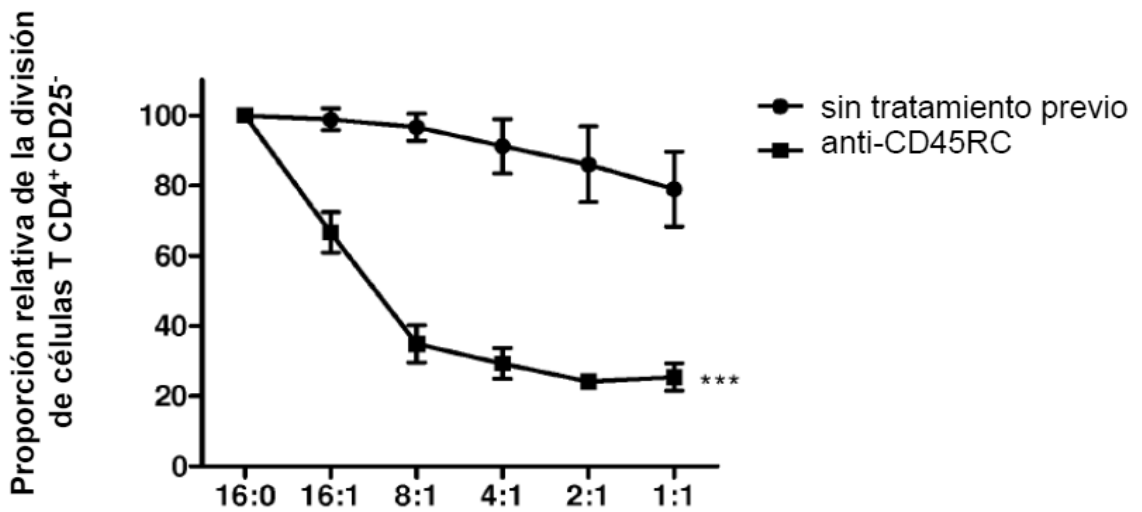


Figura 5

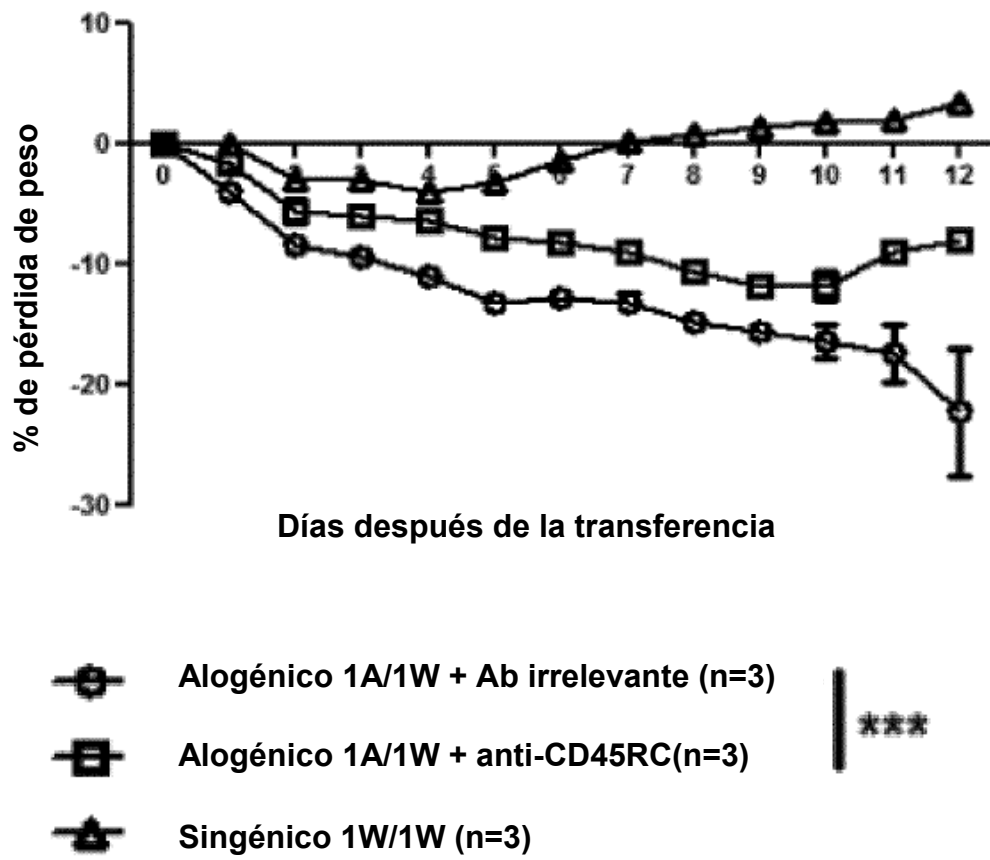


Figura 6