

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 075**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01)
A61P 17/06	(2006.01)
A61P 37/06	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61P 19/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2008 E 15171431 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 2993186**

54 Título: **Un anticuerpo monoclonal y un método del mismo**

30 Prioridad:

14.03.2008 IN CH06502008

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

07.05.2020

73 Titular/es:

**BIOCON LIMITED (50.0%)
20th K.M. Hosur Road Electronics City P.O.
Bangalore 560 100
Karnataka, IN y
CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**MELARKODE, RAMAKRISHNAN;
NAIR, PRADIP;
RAJKUMAR, SUNDARAJ, DAVID;
SASTRY, KEDARNATH, NANJUND;
CHATTERJI, MONALISA;
ADHIKARY, LAXMI;
BALASUBRAMANIAN, HEMA;
CASIMIRO, JOSE, ENRIQUE, MONTERO;
VALLADARES, JOSEFA, LOMBARDEO y
RODRIGUEZ, ROLANDO, PEREZ**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 759 075 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 monoclonal y un método del mismo

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método de tratamiento de diversas indicaciones de enfermedad usando un anticuerpo anti-CD6 que se une al dominio 1 SRCR (D1) de CD6.

10 Antecedentes de la invención

La CD6 es una proteína importante de la superficie celular expresada predominantemente por las células T humanas y un subconjunto de células B, así como por algunas leucemias linfocíticas crónicas de células B y neuronas [Aruffo et al., J. Exp. Med. 1991, 174: 949; Kamoun et al., J. Immunol. 1981, 127:987; Mayer et al., J. Neuroimmunol. 1990, 29: 193]. CD6 es un miembro de una gran familia de proteínas caracterizadas por tener al menos un dominio homólogo al dominio rico en cisteína del receptor del captador (SRCR) de macrófagos de tipo I [Matsumoto, et al., J. Exp. Med. 1991, 173:55 and Resnick et al., Trends Biochem. Sci. 1994, 19:5]. Otros miembros de esta familia incluyen CD5 [Jones et al., Nature. 1986, 323:346]; ciclofilina C [Friedman et al. 1993, PNAS 90:6815]; factor I del complemento, que se une a las proteínas C3b y C4b del complemento activadas [Goldberger, et al., J. Biol. Chem 1987, 262: 10065]; bovino WC-1 expresado por .tau./delta. Células T [Wijingaard et al., J. Immunol. 1992, 149:3273] y M130 [Law et al., Eur J. Immunol. 1993, 23:2320] un marcador de activación de macrófagos.

Los estudios de bloqueo que usan anticuerpos monoclonales (mAb) anti-CD6 sugieren que CD6 juega un papel importante en el desarrollo de células T al regular las interacciones adhesivas de células T con células epiteliales tímicas (TE) [Patel et al., J. Exp. Med. 1995 181:1563-1568]. Estudios adicionales han demostrado que CD6 puede funcionar como una molécula accesoria importante en la activación de células T. Por ejemplo, ciertos mAb anti-CD6 son directamente mitogénicos para las células T [Gangemi et al., J. Immunol, 1989, 143: 2439 y Bott et al., 1993 Int. Immunol 7:783], mientras que otros pueden coestimular la proliferación de células T junto con anti-CD3, anti-CD2 o acetato de miristato 13 de forbol 12 (PMA) [Gangemi et al., J. Immunol. 1989, 143:2439; Morimoto et al., J. Immunol. 1988, 140: 2165-2170; y Osorio et al., Cell. Immunol 1994, 154: 23]. Sin embargo, la evidencia adicional del papel de CD6 en la activación de células T proviene de estudios que muestran que CD6 se hiperfosforila en los residuos Ser y Thr [Swack et al., Mol. Immunol 1989 26: 1037-1049 and J. Biol. Chem 1991, 266:7137; Cárdenas et al., J. Immunol. 1990, 145:1450-1455] y fosforilada en residuos Tyr [Wee et al., J. Exp. Med. 1993, 177: 219-223] después de la activación de células T. Estos y otros estudios implican a CD6 como un modulador importante de la función de células T inmaduras y maduras in vivo, afectando tanto la activación de las células T como la transducción de señales.

El dominio extracelular de la proteína CD6 madura está compuesto por tres dominios SRCR (en lo sucesivo denominados D1, D2 y D3). D3 correspondientes al dominio SRCR proximal de la membrana seguido de una región corta de tallo de 33 aminoácidos. Estos dominios extracelulares están anclados a la membrana celular a través de un dominio transmembrana corto seguido de un dominio citoplasmático de longitud variable [Aruffo et al., J. Exp. Med. 1991, 174:949].

Los estudios que utilizan proteínas de fusión de inmunoglobulina CD6, que contienen dominios extracelulares seleccionados de CD6 fusionados a dominios constantes de IgG₁ humana (CD6-Rgs), condujeron a la identificación y clonación de un ligando CD6, denominado "molécula de adhesión celular leucocitaria activada" (ALCAM) [Wee, et al., Cell. Immunol 1994, 158:353-364; Patel et al., J. Exp. Med. 1995. 181:1563-1568; Bowen et al., J. Exp. Med. 1995, 181:2213-2220]. ALCAM se une al dominio 3 de CD6 correspondiente al dominio SRCR proximal de la membrana [Whitney, et. al., J. Biol. Chem 1995, 270: 18187-18190].

Estudios sobre el papel de las interacciones CD6/ALCAM en la regulación de células T han demostrado que este par receptor-ligando puede mediar la adhesión de las células que expresan CD6 a las células epiteliales tímicas [Bowen et al., J. Exp. Med. 1995, 181:2213]. Esta y otra evidencia sugiere que las interacciones CD6/ALCAM son importantes para modular el desarrollo y la activación de las células T.

Aunque la caracterización funcional de CD6 sigue siendo incompleta, se ha aplicado con éxito un mAb anti-CD6 en un entorno clínico para purgar la médula ósea de células T y precursores de células T. El hallazgo de que los pacientes que recibieron médula ósea alogénica tratada con anti-CD6 tuvieron una baja incidencia de enfermedad de injerto contra huésped junto con altos niveles de injerto [Soiffer R J, 1993, Bone Marrow Transplant; 12 Suppl 3:S7-10] condujo al descubrimiento de un pequeño subconjunto de células T de sangre periférica (5-6%) que son CD6 negativas (Rasmussen J Immunol 1994. 152: 527-536). Una subpoblación de células T CD6 negativas mostró una menor alorreactividad en MLR en comparación con las células T CD6⁺ normales. (Rasmussen. J Immunol 1994. 152: 527-536). La caracterización funcional de estas células T CD6 negativas también ha demostrado que no responden a la aloestimulación, pero que pueden proliferar cuando se estimulan con fitohemaglutina (PHA). Estos hallazgos respaldan aún más la hipótesis de que CD6 juega un papel importante en la modulación de la función de las células T in vivo. También se informa que CD6 es parte de la sinapsis inmunológica que media la interacción TPA temprana y tardía APC. (Gimferrer I.J Immunol 2004. 173: 2262-2270).

5 La molécula CD6 está glicosilada en N con un sitio sensible a la proteasa y posee enlaces disulfuro intracadena. Informes anteriores indicaron que CD6 existe en dos formas moleculares, una forma fosforilada de 105 kDa en células T en reposo y una forma hiperfosforilada de 130kDa en células después de la activación de la proteína quinasa C por el promotor tumoral, forbol 12 acetato de miristato 13 (PMA) (Osorio M. Cellular Immunology, 1994154:123-133).

10 El documento US 6,372,215 divulga anticuerpos y otros agentes de unión que se unen específicamente a dominios SRCR 3 (D3) de CD6 humano (hCD6) o dominio de tallo de CD6 humano (CD6S) e inhiben la unión de la molécula de adhesión celular leucocitaria activada (ALCAM) a CD6 los cuales se incorporan aquí como referencia.

15 El documento WO 2008/077355 titulado "Pharmaceutical composition comprising the Anti-CD6 monoclonal antibody useful for the diagnosis and treatment of Rheumatoid Arthritis" divulga que T1h se une a CD6 sin inhibir la unión de CD6 al ligando ALCAM.

20 El anticuerpo CD6 para uso en la presente invención evita la activación de células T al inhibir la proliferación de células T uniéndose a un dominio independiente del dominio que interactúa con el ligando conocido a CD6, a saber, ALCAM.

25 Las publicaciones y patentes anteriores describen secuencias del anti-CD6 murino (IOR-T1) monoclonal y las modificaciones de aminoácidos que se llevaron a cabo para humanizar IOR-T1 a T1h (IOR-T1 humanizado). El documento US 5712120 y su equivalente EP 0699755 describen métodos específicos para humanizar anticuerpos monoclonales murinos y la secuencia de IOR-T1 y T1h. El documento US 6572857 y su equivalente EP 0807125 describen la secuencia de IOR-Ti y T1h (IOR-T1 humanizado) y su efectividad en pacientes con psoriasis. La publicación [Roque-Navarro, L., et.al., Hybridoma and Hybridomics 2003.22:245-257] discute métodos específicos para humanizar los anticuerpos monoclonales murinos y la secuencia de IOR-T1 y T1h.

30 Los aspectos de la presente divulgación se refieren a secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y ligera de T1h. Esto establece la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de T1h expresada por la línea celular utilizada para fabricar T1h. El anticuerpo monoclonal para uso en la presente invención es capaz de unirse al dominio 1 (D1) de CD6 e inhibe la proliferación de células T sin interferir con la unión de ALCAM. El anticuerpo monoclonal para uso en la presente invención no induce citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) y apoptosis in vitro.

Objetivo de la invención

35 El objetivo principal de la presente invención es obtener un anticuerpo monoclonal capaz de unirse al dominio 1 (D1) de CD6 e inhibir la proliferación de células T sin interferir con la unión de ALCAM para su uso según las reivindicaciones.

40 También se divulga un método para modular condiciones inflamatorias usando el anticuerpo monoclonal.

También se divulga un método para modular afecciones inflamatorias usando el anticuerpo monoclonal en combinación con inmunosupresores.

45 Se divulga además un método para modular afecciones inflamatorias usando el anticuerpo monoclonal en combinación con antígenos capaces de provocar una respuesta inmunitaria antiinflamatoria como Insulina, GAD, MOG, MBP y HSP60.

Declaración de la invención

50 El alcance de la invención está determinado por las reivindicaciones. La presente divulgación se refiere a un anticuerpo monoclonal capaz de unirse al dominio I (D1) de CD6 e inhibe la proliferación de células T sin interferir con la unión de ALCAM; un método para modular afecciones inflamatorias como la artritis reumatoide o las respuestas autoinmunes en pacientes como respuestas adversas asociadas con esclerosis múltiple o rechazo de trasplantes, enfermedad de injerto contra huésped, diabetes tipo 1, linfoma cutáneo de células T, tiroiditis y otras enfermedades autoinmunes mediadas por células T usando el anticuerpo monoclonal; un método para modular afecciones inflamatorias como la artritis reumatoide o las respuestas autoinmunes en pacientes como respuestas adversas asociadas con esclerosis múltiple o rechazo de trasplantes, enfermedad de injerto contra huésped, diabetes tipo 1, linfoma cutáneo de células T, tiroiditis y otras enfermedades autoinmunes mediadas por células T usando el anticuerpo monoclonal en combinación con inmunosupresores; y un método para modular afecciones inflamatorias como esclerosis múltiple o rechazo de trasplantes, enfermedad de injerto contra huésped, diabetes tipo 1, usando el anticuerpo monoclonal en combinación con antígenos capaces de provocar una respuesta inmunitaria antiinflamatoria como Insulina, GAD, MOG, MBP y HSP60.

60 Breve descripción de las figuras acompañantes:

65

Figura 1:

Figura 1a: Secuencia de nucleótidos de VH y Vk de T1h derivada de plásmido y ADN genómico.

Figura 1b: Secuencia de aminoácidos de VH y Vk

Figura 1c: Comparación de la secuencia de aminoácidos Vk descrita en publicaciones anteriores en comparación con la secuencia descrita en esta patente para resaltar las diferencias de secuencia.

Figura 2: Lectura de ELISA de placa atada con CD6-Fc en presencia de T1h y ALCAM o T1h solo.

Figura 3: Cuando MEM 98, un anticuerpo que se une al dominio 1 (Castro AA M et al, J of Immunol, 178 (2007) 4351-4361.), compete con T1h, se observa una competencia dependiente de la dosis, lo que sugiere que ambos se unen al mismo dominio, es decir, el dominio 1.

Figura 4: Células HUT 78 tratadas con anticuerpo T1h (5 µg/ml), anticuerpo hR3 (5 µg/ml) y rapamicina (1.2 µg/ml) o sin anticuerpo (como control) e incubadas durante la noche a 37°C en una incubadora de CO₂. Luego, las células se trataron con solución de marcaje de anexina V, seguido de análisis de citometría de flujo. Anexina V FITC log en eje horizontal, PI/PE Texas rojo en eje vertical.

Figura 5: Gráfico de calibración Sphero para el canal FITC.

Figura 6: Densidad de los receptores CD6 en los linfocitos T y B de los distintos individuos sanos. Las células T muestran 10 veces más receptores CD6 que las células B positivas para CD6

Figura 7: El análisis de ADCC se analizó usando Rituxan como control positivo en células Daudi. Las células Daudi se marcaron con CFSE y se incubaron con o sin Rituxan (2.5, 5 y 10 µg/ml), hR3 (10 µg/ml) se usó como control no específico y las PBMC se usaron como células efectoras en una proporción de 1:25, 1:50, 1:100. Las células se incubaron durante 6 horas. Se usó 7AAD para detectar las células citotóxicas. Las células se analizaron en citometría de flujo CYAN ADP.

Figura 8: Ensayo de ADCC en células Daudi por Rituxan en diagrama de puntos 2 D

Figura 9: Ensayo de ADCC en HUT 78 en diagrama de puntos 2 D con 5 µg/ml de T1h

Figura 10: El papel de T1h en el ensayo ADCC. HUT 78 se marcó con CFSE y se incubó con y sin anticuerpo T1h, hR3 se usa como control no específico y las PBMC se usaron como células efectoras en una proporción de 1:1, 1:25, 1:50. La diana: las células efectoras se incubaron durante la noche. Se usó 7AAD para detectar las células citotóxicas. Las células se analizaron por citometría de flujo.

Figura 11: El papel de T1h en el ensayo ADCC. HUT 78 se marcó con CFSE y se incubó con y sin anticuerpo T1h (5 y 10 µg/ml), hR3 (10 µg/ml) se usó como control no específico y las PBMC se usaron como células efectoras en una proporción de 1:1, 1:25, 1:50. La diana: las células efectoras se incubaron durante la noche. Se usó 7AAD para detectar las células citotóxicas. Las células se analizaron por citometría de flujo.

Figura 12: a, b y c, d representan dos experimentos independientes a 5 µg/ml y 10 µg/ml respectivamente de T1h y hR3 (anticuerpo no específico) respectivamente. Los gráficos representan el porcentaje de células muertas en diferentes relaciones diana:efector.

Figura 13: Diferencia de veces de citotoxicidad entre Rituxan y T1h en el ensayo de CDC usando Azul de Alamar.

Figura 14: Gráfico de histograma de CFSE que muestra la intensidad de fluorescencia de las células no estimuladas y estimuladas con fitohemaglutina (PHA-M). Registro FITC en eje horizontal, no de celdas en el eje vertical. La región (R 14) por encima de los picos se utilizó para enumerar eventos como proliferación.

Figura 15: Inhibición dependiente de la dosis de T1h en linfocitos como gráfico de barras. La figura representa el % de inhibición de T1h en linfocitos activadores de PHA a diversas concentraciones (50 µg/ml, 25 µg/ml, 12.5 µg/ml, 6.25 µg/ml). Se usó hR3 (anticuerpo no específico) a la misma concentración.

Figura 16: Repetición del experimento anterior como un experimento independiente. Inhibición dependiente de la dosis de T1h en linfocitos. La figura representa el % de inhibición de T1h en linfocitos activadores de PHA a diversas concentraciones (50 µg/ml, 25 µg/ml, 12.5 µg/ml y 6.25 µg/ml). Se usó hR3 (anticuerpo no específico) a la misma concentración

Figura 17: La presencia de T1h soluble, a una concentración de 10 µg/ml, inhibió significativamente la proliferación de linfocitos mediada por PHA en un ensayo con Azul de Alamar basado en placa de 96 pozos.

Figura 18: Placa preparada para los experimentos relacionados de Anti-CD3, Anti-CD3+ T1h y Anti-CD3+ ALCAM-Fc.

Figura 19: Comparación entre los efectos sobre la proliferación de linfocitos por sT1h y shR3 (10 µg/ml) respectivamente en presencia de Anti-CD3 unido, Anti-CD3+ T1h y Anti-CD3+ ALCAM-Fc. Como se menciona en el protocolo, se usaron cantidades variables de Anti-CD3 unido con concentración fija de T1h o ALCAM.

Figura 20: Análisis de los datos anteriores en BLISS donde la línea inferior es la curva experimental obtenida con una concentración variable de anticuerpo Anti-CD3 y anticuerpo ALCAM-Fc o Anti-CD6 respectivamente. La línea punteada es la curva predicha si la combinación es aditiva. La línea superior es la curva obtenida experimentalmente y en ambos casos se encuentra por encima de la curva teórica predicha, lo que sugiere que la combinación es sinérgica.

Figura 21: Proliferación de células T nativas inducidas por IL2 a concentraciones variables. La T1h soluble y la hR3 soluble no mostraron ningún efecto. Se agrega PHA como control positivo.

Figura 22: CD3 unido y CD3+ ALCAM-Fc causaron la proliferación de linfocitos que fue inhibida por T1h soluble. IL2 junto con T1h soluble mostró una recuperación parcial de la inhibición en ambas condiciones.

Figura 23: La expresión de IL10, IFNγ, IL6 y TFNγ se reduce mediante T1h soluble en comparación con un control (anticuerpo no específico hR3 soluble) en los pozos unidos Anti-CD3 y Anti-CD3+ ALCAM. La IL2 exógena añadida junto con la T1h soluble muestra una recuperación parcial de la inhibición, lo que sugiere que la inhibición de la T1h soluble está mediada por la regulación negativa de la IL2. El experimento muestra la media de los datos de dos experimentos independientes.

Figura 24: Hay una reducción parcial de los recuentos celulares absolutos que expresan CD4 y CD25 en presencia de T1h soluble (sT1h) que se recupera tras la adición de sT1h e IL2 exógena. Sin embargo, en la intensidad fluorescente media que puede correlacionarse con los recuentos absolutos de receptores, hay una reducción significativa de MFI en CD4 y más espectacularmente en los recuentos de CD25. Ambas reducciones pueden recuperarse total o parcialmente, respectivamente, mediante la adición de IL2 exógena (1.2 ng/ml). Este fenómeno se observa tanto en los pozos unidos Anti-CD3 como en los Anti-CD3 y ALCAM-Fc.

Figura 25: La inhibición de la proliferación por T1h soluble no está mediada por un aumento de la apoptosis. Las células PI positivas son células necróticas, mientras que las células positivas anexina V FITC son células apoptóticas y ambas positivas son células apoptóticas tardías. A partir de los datos, está claro que, en comparación con el control, no hay un aumento o disminución significativa en cada uno de los parámetros de muerte en diferentes combinaciones.

Figura 26: Las PBMC se trataron con anticuerpo T1h (10 µg/ml), hR3 (control de isotipo) o sin anticuerpo (como control) y se incubaron durante 5 días a 37°C en una incubadora de CO₂.

Las células fueron estimuladas con el toxoide tetánico antes de la incubación. La proliferación se midió con colorante Azul de Alamar. No se observó inhibición de la proliferación en presencia de T1h.

Figura 27: Las células Raji se muestran aquí por inmunofluorescencia como se mencionó anteriormente (Procedimiento II) como verdaderas células B y también expresan antígenos MHC II.

Figura 28: PBMCs proliferativas en presencia de células Raji tratadas con mitomicina. El control positivo muestra que las PBMCs crecen en presencia de PHA. sT1h inhibe la proliferación de células T (significativamente por la prueba t) en comparación con los controles sin anticuerpos o hR3. Cada experimento es una desviación media y estándar obtenida de seis pozos diferentes.

Figura 29: Reacción de linfocitos mixtos de células dendríticas alogénicas-Configuración de placa.

Figura 30: La reacción de linfocitos mixtos de células dendríticas alogénicas T1h muestra una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de PBMC. Control positivo Pimecrolimus, que es un inhibidor conocido de IL2 inhibido en todas las concentraciones probadas. El control negativo hR3 fue similar al control experimental. El eje Y es Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU).

Figura 31: Reacción mixta de linfocitos de células dendríticas alogénicas. Evaluación de los niveles de citoquinas. IL6 e IFNγ se inhiben de una manera dependiente de la dosis por T1h así como por Pimecrolimus, un inhibidor de IL2 conocido.

Breve descripción de la lista de secuencia acompañante:

SEQ ID NO: 1: Secuencia de aminoácidos de la secuencia VH

5 SEQ ID NO: 2: Secuencia de aminoácidos de la secuencia VK

SEQ ID NO: 3: Secuencia de nucleótidos (ADN) de la secuencia VH

10 SEQ ID NO: 4: Secuencia de nucleótidos (ADN) de la secuencia VK

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal capaz de unirse al dominio 1 (D1) de CD6 e inhibir la proliferación de células T sin interferir con la unión de ALCAM, que comprende la secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 para uso en el tratamiento de un trastorno autoinmune, en donde el anticuerpo inhibe la proliferación de células T nativas al disminuir las citoquinas proinflamatorias, pero no inhibe la proliferación de células T de memoria y el trastorno autoinmune se selecciona del grupo que consiste en esclerosis múltiple, rechazo de trasplantes, diabetes tipo 1 y artritis reumatoide.

20 En otra realización más de la presente invención, el anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos como se establece en SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

25 En aún otra realización de la presente invención, el anticuerpo no induce citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) in vitro.

En aún otra realización de la presente invención, el anticuerpo no induce citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) in vitro.

30 En aún otra realización de la presente invención, el anticuerpo no induce apoptosis in vitro.

En aún otra realización de la presente invención, el anticuerpo inhibe la proliferación de PBMC nativos inducidos por anti-CD3 unido; combinación de anti-CD3 unido y anti-CD6 o combinación de anti-CD3 unido y ALCAM.

35 En aun otra realización de la presente invención, el anticuerpo inhibe específicamente la MLR unidireccional donde las células Raji son las células presentadoras de antígeno y proliferan las PBMC.

En aun otra realización de la presente invención, el anticuerpo inhibe específicamente la MLR autóloga unidireccional mediada por PBMC.

40 En aun otra realización de la presente invención, el anticuerpo provoca la inhibición de la proliferación de células T nativas por reducción en los recuentos de CD25 y CD4.

45 En aun otra realización de la presente invención, el anticuerpo inhibe la proliferación de células T mediando la supresión de IL2.

En aun otra realización de la presente invención, el anticuerpo muestra ganancia de función con la adición de IL2 exógena.

50 En aun otra realización de la presente invención, el anticuerpo está implicado en la regulación descendente de las citoquinas proinflamatorias IL6 e IFN γ .

55 La presente divulgación se refiere a un método para modular afecciones inflamatorias como esclerosis múltiple o rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped, diabetes tipo 1, usando el anticuerpo monoclonal en combinación con antígenos capaces de provocar una respuesta inmunitaria antiinflamatoria como Insulina, GAD, MOG, MBP y HSP60.

60 En otra realización de la presente divulgación, el método incluye la administración a un paciente de una cantidad terapéutica o farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD6 que se une específicamente al dominio 1 de CD6 SRCR humano (D1) y no inhibe la unión de ALCAM a hCD6.

En otra realización más de la presente invención, la dosis farmacéuticamente efectiva es de 0.1-25 mg/kg/semana.

65 Se hará referencia ahora en detalle a las realizaciones actualmente preferidas de la invención que, junto con los siguientes ejemplos, servirán para explicar los principios de la invención.

Los siguientes ejemplos se exponen para ayudar a comprender la invención. Los ejemplos no incluyen descripciones detalladas de los métodos convencionales empleados en los procedimientos de ensayo. Dichos métodos son bien conocidos por los expertos en la materia y se describen en numerosas publicaciones, incluso a modo de ejemplos.

5 A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que comúnmente entienden los expertos en la materia. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular.

10 En la descripción y reivindicación de la presente invención, se utilizará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones establecidas en el presente documento.

15 El "anticuerpo anti-CD6" es un anticuerpo que se une específicamente al dominio SRCR 1 (D1) del CD6 humano (hCD6). Los anticuerpos y otras inmunoglobulinas, incluidos los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos nativos y modificados artificialmente, se unen específicamente al dominio SRCR humano 1 de CD6 y no interfieren con la unión de la molécula de adhesión celular leucocitaria activada (ALCAM) a CD6.

20 El anticuerpo monoclonal que se une específicamente al dominio 1 del captador de receptor rico en cisteína (SRCR) 1 (D1) de CD6 comprende una región variable de cadena pesada y una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

25 Otra realización preferida de la invención representa un anticuerpo monoclonal el cual se une específicamente al dominio 1 (D1) rico en cisteína del captador (SRCR) del receptor de CD6 el cual comprende una región variable de cadena pesada y cadena liviana codificada por la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 3; y (b) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ ID NO: 4 para usar de acuerdo con las reivindicaciones.

El anticuerpo para uso en la presente invención no induce citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) in vitro.

30 El anticuerpo para uso en la presente invención no induce citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) in vitro.

El anticuerpo para uso en la presente invención no induce apoptosis in vitro.

35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona además un agente preventivo, terapéutico o de diagnóstico para diversas enfermedades que incluyen trastornos autoinmunes, que contiene el anticuerpo sujeto de la presente divulgación o un fragmento funcional del mismo como ingrediente activo.

40 La citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) se refiere a un tipo de citotoxicidad inducida por la activación de macrófagos, células NK, células de neutrófilos o similares que se reconocen mediante la unión de regiones constantes de anticuerpos a receptores Fc expresados en las superficies de las células anteriores. Por el contrario, la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) se refiere a un tipo de citotoxicidad inducida por la activación de un sistema del complemento que ocurre mediante la unión de un anticuerpo a un antígeno. Se sabe que la intensidad de estas actividades varía según las subclases de anticuerpos. También se sabe que tales diferencias se deben a diferencias estructurales entre las regiones constantes de anticuerpos (Charles A. Janeway et al., *Immunobiology*, 1997, Current Biology Ltd/Garland Publishing Inc.).

50 Se describen las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de una cadena pesada y ligera de T1h. Esto establece la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de T1h expresada por la línea celular utilizada para fabricar T1h.

Se proporcionan métodos de cribado para identificar agentes de unión adicionales que se unen específicamente a hCD6. Estos métodos implican el contacto con un anticuerpo monoclonal anti-hCD6 de referencia que se une específicamente al dominio 1 humano (D1) de CD6 SRCR y no inhibe la unión de ALCAM a hCD6.

55 Cuando se incubaron concentraciones variables de ALCAM-Fc junto con una concentración fija de T1h en una placa ELISA recubierta con CD6-Fc, se detectó T1h a toda la concentración de ALCAM-Fc. Este experimento sugirió que T1h se une a un dominio diferente del dominio de unión ALCAM (Dominio 3).

60 Cuando MEM 98, un anticuerpo que se une al dominio 1 [Castro AA M et al, *J of Immunol*, 178 (2007) 4351-4361.], compete con T1h, se observa una competencia dependiente de la dosis, lo que sugiere que ambos se unen al mismo dominio, es decir, Dominio 1.

65 En otros aspectos de la divulgación, se proporcionan métodos para modular afecciones inflamatorias como esclerosis múltiple, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped (GvHD) y diabetes tipo 1. El anticuerpo monoclonal T1h puede inhibir la proliferación de células T nativas como se observa en una reacción de linfocitos mixtos, en un ensayo de proliferación de PBMC mediada por PHA y finalmente la proliferación de PBMC en presencia

de anticuerpo Anti-CD3 unido y anticuerpo Anti-CD3+ ALCAM-Fc. Reduce las citoquinas proinflamatorias y reduce la expresión del receptor de IL2 (CD25) y CD4 en las células.

5 La diabetes tipo 1 depende de la insulina y se considera una enfermedad autoinmune mediada por células T. Esto sugeriría que el anticuerpo T1h tiene la función de prevenir el agotamiento de las células β de los islotes al interferir con la proliferación de células T autorreactivas. Si la masa de estas células está intacta, se reduciría la dependencia de la insulina. Por lo tanto, es posible que, de acuerdo con el perfil de acción del anticuerpo T1h, pueda ser eficaz en la diabetes tipo 1 al promover una respuesta antiinflamatoria en combinación con insulina, ácido glutámico descarboxilasa (GAD) y proteína de choque térmico 60 (HSP60). Al extender la misma lógica, sería razonable suponer que la molécula puede funcionar más eficazmente con un péptido similar al glucagón -1 (GLP1) o su imitador relacionado Exendina-4, tal vez de forma aditiva o incluso sinérgica. GLP-1 y Exendina-4 aumentan la liberación de insulina mediada por glucosa, disminuyen los niveles de glucagones y aumentan las células β al inhibir la apoptosis y promover la neogénesis de estas células.

15 La T1h puede ser eficaz en la esclerosis múltiple en combinación con la proteína básica de mielina (MBP) o la glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG).

Además, T1h en combinación con otras moléculas pequeñas que desempeñan funciones antiinflamatorias e inmunosupresoras como Sirolimus, Tacrolimus y Micofenolato de Mofetil puede tener beneficios terapéuticos específicos en trastornos autoinmunes, rechazo de trasplantes y GvHD.

20 Estos métodos incluyen la administración a un paciente de una cantidad terapéutica o farmacéuticamente efectiva de un agente de unión anti-CD6 que se une específicamente al dominio 1 de CD6 SRCR humano (D1) y no inhibe la unión de ALCAM a hCD6. Los agentes de unión anti-CD6 preferidos para usar en estos métodos son anticuerpos monoclonales, incluidos anticuerpos monoclonales humanizados y humanos, así como inmunoglobulinas modificadas tales como fragmentos de anticuerpos y formas mutagenizadas de anticuerpos nativos que tienen una identidad de secuencia de aminoácidos sustancial con un anticuerpo nativo correspondiente, y compartiendo sustancialmente la misma especificidad vinculante con el mismo.

25 En aspectos aún adicionales de la divulgación, se proporcionan composiciones y métodos de diagnóstico para detectar células CD6, CD6⁺ y/o actividad mediada por CD6, por ejemplo, actividad CD6 relacionada con la activación de células T, en ensayos in vitro e in vivo. Estos métodos también emplean agentes de unión anti-CD6 que se unen específicamente al dominio I de CD6 SRCR humano (D1) y no inhiben la unión de ALCAM a hCD6.

30 Las diversas características funcionales del anticuerpo sujeto para su uso en la presente invención pueden seleccionarse usando una variedad de métodos, que incluyen, pero no se limitan a aquellos que usan ensayos in vitro, ensayos in vivo y basados en células, y tecnologías de selección. Se pueden seleccionar múltiples propiedades simultáneamente o individualmente. Las proteínas se pueden purificar o no, según los requisitos del ensayo. En una realización, la pantalla es un ensayo de unión cualitativa o cuantitativa para la unión de anticuerpos anti-CD6 a una molécula de proteína que se sabe o se piensa que se une al anticuerpo anti-CD6. Dichos ensayos a menudo implican monitorizar la respuesta de las células al anticuerpo anti-CD6, por ejemplo, supervivencia celular, muerte celular, fagocitosis celular, lisis celular, cambio en la morfología celular o activación transcripcional, como la expresión celular de un gen natural o gen indicador. Por ejemplo, dichos ensayos pueden medir la capacidad de los anticuerpos anti-CD6 para provocar ADCC o CDC. Para algunos ensayos, es posible que se deban agregar células o componentes adicionales, es decir, además de las células diana, por ejemplo, complemento de suero o células efectoras tales como monocitos de sangre periférica (PBMC), células NK, macrófagos y similares.

35 Las dosis óptimas y los regímenes de dosificación que se van a administrar pueden ser determinados fácilmente por los expertos en la materia, y variarán con las características farmacodinámicas del agente particular, su tiempo y modo de administración, la fuerza de la preparación y el avance de la condición de la enfermedad (incluyendo la naturaleza y extensión de los síntomas de la enfermedad). Además, los factores asociados con el paciente particular que se está tratando, incluidos el sexo, la edad, el peso, la dieta, la actividad física y las enfermedades concomitantes del paciente, darán lugar a la necesidad de ajustar las dosis y/o regímenes. La dosis farmacéuticamente efectiva es de 0.1-25 mg/kg/semana.

40 Las propiedades biológicas de los anticuerpos anti-CD6 para uso en la presente invención pueden caracterizarse en experimentos con células, tejidos y organismos completos. Como se sabe en la técnica, los medicamentos a menudo se prueban en animales, incluidos, entre otros, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos, para medir la eficacia de un medicamento para el tratamiento contra una enfermedad o modelo de enfermedad, o para medir la farmacocinética, toxicidad y otras propiedades de un medicamento.

45 Las realizaciones descritas a continuación en el presente documento tienen la intención adicional de explicar los mejores modos conocidos de practicar la invención y permitir que otros expertos en la técnica utilicen la invención en tal.

65 1. Nucleótido (tanto genómico como plásmido) y secuencia de aminoácidos de T1h.

Se usaron múltiples reacciones de PCR usando ADN genómico y plásmido como molde para determinar la secuencia de nucleótidos de T1h. El ADN genómico se preparó a partir de células NSO que expresan T1h. La secuencia de aminoácidos se determinó usando ESI-TOF y MALDI-TOF. El mapeo de péptidos usando diferentes enzimas, incluyendo tripsina, Lys-C y Glu-C, se usaron para desarrollar la secuencia final de aminoácidos. La secuencia descrita en la Figura 1 es ligeramente diferente de la secuencia ya publicada de T1h en US 5712120, su equivalente EP 0699755, US 6572857 y su equivalente EP 0807125. Se ha establecido que la secuencia descrita en esta patente tiene actividad funcional completa en su objetivo CD6 como se menciona en los numerosos ejemplos mencionados a continuación.

2. T1h se une al dominio 1 (D1) del receptor CD6

El experimento ELISA mostró claramente que la presencia de ALCAM en concentraciones variables no impide que T1h se una a CD6-Fc. La ausencia de competencia entre ALCAM y T1h sugiere que los dominios de unión para los dos son diferentes.

Cuando MEM 98, un anticuerpo que se une al dominio 1 (D1) (Castro AA M et al, J of Immunol, 178 (2007) 4351-4361.), compete con T1h, se observa una competencia dependiente de la dosis, sugiriendo que ambos se unen al mismo dominio, es decir, el Dominio 1.

3. T1h no induce apoptosis en células HUT 78

Una de las características de la apoptosis es la translocación de fosfatidilserina (PS) desde la parte interna de la membrana plasmática hacia el exterior [J Biol Chem 1990. 265: 4923-4928]. El análisis de fosfatidil serina en la valva externa de las membranas celulares apoptóticas se realiza utilizando anexina-V-fluoresceína y yoduro de propidio (PI) para la diferenciación de células apoptóticas y necróticas. La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} con una alta afinidad por la fosfatidil serina [J Immunol Methods 1995. 184: 39-51]. Mientras que PI se une a distintas células necróticas, la anexina-V-fluoresceína se une a las células apoptóticas. Este método ayuda a distinguir las poblaciones de células apoptóticas y necróticas. La población apoptótica temprana es solo anexina V positiva, mientras que la apoptosis tardía es anexina V y PI positiva.

En este experimento observamos que T1h tiene un potencial apoptótico limitado en las células HUT78, una línea celular de linfoma T que expresa CD6. Las células HUT 78 tratadas con T1h mostraron 40% de apoptosis, que es casi igual al control no tratado en el canal de FITC de anexina V. Las células tratadas sin tratar y con el control de isotipo inespecífico, hR3 (un anticuerpo monoclonal que se une al EGFR) mostraron 35.3% y 36.5% de apoptosis respectivamente, mientras que el control positivo de rapamicina mostró 54.3% de apoptosis. Estos datos sugieren que T1h no media en la apoptosis en la línea celular HUT 78.

4. Las células T y B positivas para CD6 muestran diferencias en la expresión de los receptores CD6.

Los timocitos, las células T maduras, un subconjunto de células B llamado subtipo B-1 y algunas células del cerebro expresan CD6 [J Exp Med 1991. 174: 949-952; J Immunol 1997. 158: 1149-1156]. El objetivo del experimento es cuantificar la densidad del receptor y la diferencia en la expresión de CD6 en las células T y B, respectivamente.

Los experimentos sugieren que la densidad del receptor CD6 es 10 veces más en las células T en comparación con las células B. El método no pretende cuantificar la densidad absoluta del receptor ya que no se utilizaron cantidades saturantes de anticuerpos. Sin embargo, la diferencia de multiplicidad en el patrón de expresión en las células T y B es definitivamente discernible.

5. T1h induce ADCC leve (citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos)

Cuando el anticuerpo se une a las células diana o infectadas, la porción Fc del anticuerpo se une a los receptores Fc presentes en la superficie de las células, particularmente las células Natural Killer (NK). Esto provoca la activación de estas células. Estas células activadas liberan citoquinas y gránulos citotóxicos y promueven la muerte celular al desencadenar la apoptosis. Esto se conoce como citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC).

En la presente invención, la población de células diana (HUT 78/Daudi) se marca con el colorante de seguimiento celular CFSE (éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína). El colorante a base de fluoresceína CFSE tiene propiedades bioquímicas que lo hacen particularmente adecuado para el marcado de células vivas [J Immunol Methods 2000. 243: 147-154]. CFSE consiste en una molécula de fluoresceína que contiene dos restos acetato y un grupo funcional de succinimidil éster. De esta forma, es permeable a la membrana y no fluorescente. Después de la difusión en el entorno intracelular, las esterasas endógenas eliminan los grupos acetato, haciendo que la molécula sea altamente fluorescente y no permeable a la membrana celular [J Immunol Methods 2000. 243: 147-154]. Las células diana, células HUT 78, se incuban en presencia o ausencia del anticuerpo, T1h. Las células efectoras (son PBMCS recolectadas por el método Ficoll paque) se agregan en diferentes proporciones (Diana: efector; 1:1, 1:25, 1:50, 1:100)

y se incuban a 37°C durante un tiempo óptimo. 7AAD se usa para medir la muerte celular 7 amino actinomicina D (7AAD) ingresa a las células muertas y se une al ADN. Las células marcadas con CFSE se seleccionan para evaluar la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos de las células diana. Se usaron células Daudi para calificar el ensayo usando Rituxan, que es bien conocido por tener una potente actividad ADCC. Rituxan mostró una citotoxicidad mayor del 50% en 6 horas. En condiciones similares, cuatro experimentos independientes sugirieron que T1h induce ADCC leve en células HUT 78, con incubación durante la noche en presencia de células efectoras.

6. T1h no media la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

El ensayo basado en Azul de Alamar (resazurina) se usa para medir la capacidad de un anticuerpo para promover la muerte celular. Esto es inducido por la unión del anticuerpo a un antígeno de la superficie celular fijando y activando el complemento, lo que resulta en la lisis de la célula diana. La resazurina es un colorante rédox activo que, cuando se reduce, cambia de color de azul a rosa. Los datos recientes sugieren que la resazurina ingresa al citoplasma de las células donde se redujo al producto fluorescente y luego se excreta nuevamente al medio [Eur J Biochem 2000. 267: 5421-5426].

Los resultados de estos experimentos concluyentes demuestran que el anticuerpo no induce CDC en una línea celular que expresa CD6, concretamente HUT 78.

7. T1h inhibe la proliferación de linfocitos mediada por PHA

La fitohemaglutinina (PHA-M) se usa para la estimulación de la división celular en cultivos de linfocitos. PHA, el extracto de lectina del frijol rojo (*Phaseolus vulgaris*), contiene potentes actividades de aglutinación celular y mitogénicas [Proc Natl Acad Sci U S A 1982. 79: 1611-1615]. PHA contiene una familia de cinco isolectinas (L₄E₀, L₃E₁, L₂E₂, L₁E₃, L₀E₄), cada una de las cuales es un tetrámero unido por fuerzas no covalentes. Las subunidades son de dos tipos diferentes, designadas como leucocitos reactivos (L) y eritrocitos reactivos (E). L tiene una alta afinidad por los receptores de superficie de linfocitos, pero poco por los de los eritrocitos y es responsable de las propiedades mitogénicas de las isolectinas. E es responsable de las propiedades de aglutinación de los eritrocitos. PHA-P es la forma de proteína y PHA-M es la mucoproteína de estas isolectinas [J Biol Chem 1977. 252: 9018-9023].

Las PBMC se marcan con el colorante de seguimiento celular CFSE (éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína). Luego, las células se incuban con o sin anticuerpos a diversas concentraciones. Las fitohemaglutinas (PHA) estimulan las células para que proliferen durante tres días a 37°C. A medida que las células proliferan, CFSE se distribuye por igual a las células hijas, cada generación sucesiva tendrá la mitad de la intensidad de fluorescencia celular [J Immunol Methods 1994. 171: 131-137]. El porcentaje de inhibición de la proliferación se considera como el efecto del anticuerpo. El % de inhibición de la proliferación se estima mediante la siguiente fórmula $[(PHA-(T1h+PHA))/PHA]*100$, donde, PHA es la proliferación inducida por PHA, T1h+PHA es la proliferación inducida en presencia de T1h y PHA.

Estos datos sugieren que el anticuerpo T1h media en la inhibición de la proliferación de linfocitos estimulados con PHA de una manera dependiente de la dosis. El porcentaje de inhibición puede variar entre los individuos debido a la variación inherente entre los individuos normales. Sin embargo, en general, se observó una inhibición dependiente de la dosis de linfocitos estimulados con PHA con T1h, pero no con un anticuerpo isotipo IgG1 no específico hR3.

8. T1h inhibe la proliferación de linfocitos mediada por PHA incluso en un ensayo de Azul de Alamar basado en placa de 96 pozos

El experimento anterior fue alterado a un ensayo basado en placa de alto rendimiento en donde las PBMC recién cosechadas se incuban en platos de 96 pozos con o sin T1h o un anticuerpo de isotipo IgG1 no específico hR3. Posteriormente se agrega PHA para estimular la proliferación de linfocitos durante tres días. La proliferación se mide usando Azul de Alamar. La prueba de significación se realiza mediante la prueba T.

Este ensayo reitera el hecho de que la proliferación de linfocitos mediada por PHA se inhibe significativamente en presencia de T1h soluble pero no en presencia de un anticuerpo de isotipo de IgG1 no específico hR3. Esto junto con el experimento anterior sugeriría un papel para T1h en la inhibición de la proliferación de células T sin tratamiento previo.

9. T1h reduce la proliferación de linfocitos inducida por Anti-CD3 unido, Anti-CD3+ T1h y Anti-CD3+ ALCAM Fc

Se sabe que la estimulación a través del receptor de células T (TCR) y los receptores coestimuladores desencadena un cambio en la diferenciación de células T de un estado inactivo (reposo) a un estado activado caracterizado por tasas rápidas de crecimiento y proliferación y la adquisición de función efectora [Immunity 2007. 27: 173-178]. El receptor CD6 humano es una glucoproteína tipo 1 de 105-130 kDa expresada en timocitos inmaduros, T madura y un subconjunto de linfocitos B llamado subconjunto B1a, leucemia linfocítica crónica de células B y varias regiones del cerebro [J Immunol 2006. 177: 1152-1159]. CD6 es un miembro del grupo B de la superfamilia de receptores de proteínas ricas en cisteína del receptor del captador basado en la presencia en la región extracelular de tres dominios

ricos en cisteína de 100 a 110 aa característicos de la familia [J Exp Med 1991. 174: 949-952]. La evidencia disponible indica que CD6 es una molécula accesoria involucrada en la modulación de los procesos de activación y diferenciación de linfocitos [J Immunol 2006. 177: 1152-1159]. En timocitos y células T maduras en reposo, CD6 se asocia parcialmente con el complejo TCR/CD3 [J Immunol 2004. 173: 2262-2270] y con CD5, un miembro cercano de la superfamilia SRCR [J Biol Chem 2003. 278: 8564-8571]. Además, el CD6 se acumula en la parte central de la sinapsis inmunológica madura (IS), donde se localiza junto con el TCR/CD3 y el CD5. CD6 también se ha implicado en los primeros contactos de APC de células T que influyen en la maduración de IS y también en las respuestas proliferativas de células T [J Immunol 2006. 177: 1152-1159, Eur J Immunol 2004. 34: 930-940].

5

10 Está bien establecido que la activación óptima de las células T que conduce a la proliferación celular requiere al menos dos señales estimuladoras. Uno involucra el complejo TCR-CD3 que reconoce fragmentos peptídicos unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I o clase II en las células presentadoras de antígeno (APC), la segunda señal que no es específica de antígeno, se ha denominado coestimuladora o señal accesoria, porque, aunque esencial, no causa la proliferación de células T por sí misma [Immunology 1998. 93: 358-365]. Se han identificado varios receptores de señal coestimuladores potenciales y sus ligandos, que incluyen las interacciones entre CD4 con MHC de Clase II, CD8 con MHC de Clase I, CD2 con antígeno asociado a la función linfocítica 3, CD5 con CD72, CD28 con B7-1/B7-2 y también CD6 con ligando CD6 (D166 o ALCAM) [Immunology 1998. 93: 358-365; Curr Opin Immunol 1995. 7: 389-395].

15

20 Existe literatura previa sobre el efecto del anticuerpo Anti-CD3 unido con o sin anticuerpo de molécula antioestimuladora que conduce a la proliferación de linfocitos. Tras la estimulación con CD3, ya sea solo o mediante reticulación conjunta con CD2 o CD4, CD6 se fosforila de forma transitoria en los dos residuos de la tripsina más terminales C (Y629 e Y662) [J Exp Med 1993. 177: 219-223]. Por consiguiente, se ha demostrado que los efectos mediados por CD6 sobre la proliferación de células T implican una actividad de tirosina quinasa, que depende de la activación de PKC [Cell Immunol 1995. 166: 44-52]. Aunque la vía de señalización de CD6 está menos caracterizada en comparación con la de CD28, otra molécula coestimuladora, existen algunas similitudes entre los efectos de estos dos antígenos de superficie celular. Por ejemplo, la ligadura de cualquiera de los dos receptores sinérgicos con señales a través del complejo TCR para mejorar la proliferación de células T [J Immunol 1989. 143: 2439-2447]. También son capaces de desencadenar la proliferación de células T en presencia de activador de plasminógeno tisular (TPA), lo que resulta en la regulación positiva de los receptores de IL-2 (IL-2R) y el ARNm de IL-2 [Cell Immunol 1995. 166: 44-52, Proc Natl Acad Sci USA 1989. 86: 1333-1337]. También se muestra que la unión de los anticuerpos Anti-CD6 y Anti-CD28 causó la proliferación de linfocitos en reposo independientemente de la estimulación por el anticuerpo Anti-CD3 [Immunology 1998. 93: 358-365].

25

30

35 En la presente invención, mostramos que el anticuerpo T1h soluble inhibe la proliferación de células T mediada por Anti-CD3 unido, Anti-CD3 + T1h y Anti-CD3 + ALCAM Fc. De hecho, observamos que la combinación de Anti-CD3 + T1h y Anti-CD3 + ALCAM es de hecho sinérgica sobre Anti-CD3 solo como se observa en un análisis Bliss de los datos. Además, mostramos que la adición de IL2 extraña (1.25 ng/ml) provoca una recuperación parcial de la inhibición de la proliferación de células T mediada por T1h soluble. Mediante el análisis de citoquinas, mostramos que T1h inhibe predominantemente IFN γ , IL10 y TNF y la adición extraña de IL2 induce la recuperación parcial de estas citoquinas proinflamatorias. La estimación de la densidad del receptor de CD25 y CD4 en linfocitos en proliferación sugirió que la T1h soluble causa la regulación negativa de ambos marcadores, mientras que la IL2 extraña recupera parcialmente estas expresiones de marcador. En conjunto, estos datos sugieren que T1h inhibe la proliferación de células T al inhibir las citoquinas proinflamatorias como IFN γ y la disminución de la expresión del receptor de IL2. Dado que la adición de IL2 foránea muestra una 'ganancia de función' parcial, nuestros resultados parecen sugerir que T1h puede estar inhibiendo la síntesis de IL2 mediada por Anti-CD3 unido, Anti-CD3 + T1her relacionado y Anti-CD3 + ALCAM Fc relacionado.

40

45

50 9a. Titulación de IL2 en PBMC nativos (células mononucleadas de sangre periférica)

La IL2 es una citoquina que es necesaria y suficiente para la activación de las células T. Señala a través del Receptor IL2 que regula al alza. Tiene un papel crítico en el desarrollo de células T, la memoria inmunológica de las células T y el desarrollo de células T reguladoras. [J Immunol 1995. 155: 1151-1164]. A partir de este experimento, se usó una concentración óptima de IL2 a 1.25 ng/ml en otros experimentos.

55

9b. La T1h causa la reducción de las citoquinas proinflamatorias, la expresión de los receptores CD4 y CD25 sin inducir apoptosis y esta inhibición se elimina parcialmente en presencia de IL2 extraña.

La citometría de flujo es una herramienta analítica que permite la discriminación de diferentes partículas en función del tamaño y el color. El BD™ CBA emplea una serie de partículas con intensidades de fluorescencia discretas para detectar simultáneamente múltiples analitos solubles. El BDA™ CBA se combina con citometría de flujo para crear un potente ensayo multiplexado. La citoquina Il Th1/Th2 humana BDA CBA se usa para medir cuantitativamente los niveles de interleucina-2, interleucina-4, interleucina-6, interleucina-10, TNF e interferón gamma en una sola muestra [J Immunol Methods 2001. 254: 109-118].

60

65

Seis poblaciones de perlas con intensidades de fluorescencia distintas se han recubierto con anticuerpos de captura específicos para las proteínas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ . Las seis poblaciones de perlas se mezclan para formar el BD™ CBA que se resuelve en el canal FL3 de un citómetro de flujo DAKO Cyan ADP. Las perlas de captura de citoquinas se mezclan con los anticuerpos de detección conjugados con PE y luego se incuban con patrones recombinantes o muestras de prueba para formar complejos sándwich. Después de la adquisición de los datos de la muestra utilizando el citómetro de flujo, los resultados de la muestra se generan en formato gráfico y tabular.

A partir de estos experimentos, está claro que T1h provoca la inhibición de la proliferación de células T nativas y esto está mediado por una disminución sustancial de las citoquinas proinflamatorias y también una reducción en los recuentos de CD25 y CD4. La adición de IL2 exógena es capaz de recuperar la inhibición, así como aumentar la expresión de las citoquinas proinflamatorias y también aumentar el recuento absoluto de receptores tanto de CD4 como de CD25. Estos resultados sugerirían que la inhibición de la proliferación de células T por T1h está mediada por la supresión de IL2 y la adición de IL2 exógena provoca una "ganancia de función". También observamos que la reducción en la proliferación de células T no está mediada por la inducción de apoptosis.

10. T1h no inhibe la proliferación de células T de memoria.

Después de reconocer un antígeno extraño en las células presentadoras de antígeno, las células T proliferan y generan una respuesta inmune. Algunas de estas células T se transforman en células T de memoria que están en circulación en el sistema y cuando se las desafía nuevamente con el mismo antígeno, estas células proliferan y generan una respuesta inmune. La mayoría de los humanos están inmunizados contra el toxoide tetánico y cuando las células T de ellos son expuestas al mismo antígeno, las células T de memoria en la población proliferan. Los resultados experimentales muestran que el toxoide tetánico estimula la proliferación de células T de una manera dependiente de la dosis, pero la sT1h no muestra ninguna inhibición de la proliferación de estas células. Esto sugiere fuertemente que T1h no inhibe la proliferación de células T de memoria. Esto es favorable para la terapia con T1h porque la proliferación de células T con memoria circulante no se ve afectada y los pacientes en terapia con T1h no serían susceptibles a la infección.

11. T1h inhibe la proliferación de células T en una reacción mixta de linfocitos mediada por PBMC y células Raji.

Cuando las mezclas de células linfoides de individuos genéticamente dispares se cultivan in vitro, experimentan una respuesta característica que se ha denominado reacción mixta de linfocitos (MLR) [Proc Natl Acad Sci U S A 1973.70: 2707-2710]. Esta reacción se caracteriza por una fase proliferativa temprana seguida de la aparición de linfocitos efectores que exhiben citotoxicidad específica para células diana que portan antígenos utilizados para estimular la reacción original.

Ambas poblaciones de linfocitos T alogénicos proliferan en un MLR a menos que una población deje de responder por tratamiento con mitomicina C o irradiación letal con X. En el último sistema llamado MLR unidireccional, la población que no responde proporciona células estimuladoras que expresan aloantígenos de las células estimuladoras. De una manera, las células T_H respondedoras de MLR reconocen moléculas de MHC alogénicas de clase II en las células estimuladoras y proliferan en respuesta a estas diferencias. La eliminación de las células T_H CD4+ de la población de respuesta con el complemento Anti-CD 4 plus elimina la MLR y evita la generación de CTL. También se ha demostrado que las células accesorias como los macrófagos son importantes para la MLR. Ahora se sabe que el papel de los macrófagos es activar las células T_H restringidas de clase II-MHC cuya proliferación se mide en MLR.

En la presente invención, se realiza una MLR de una forma con células Raji tratadas con mitomicina, por lo que son las células presentadoras de antígeno, mientras que la proliferación se mide en PBMC. La literatura previa mostró que las células Raji expresan ALCAM [J Immunol 2004. 173:2262-2270].

A partir de este experimento, se concluye que T1h inhibe específicamente MLR unidireccional donde las células Raji son las células presentadoras de antígeno y proliferan las PBMC.

12. T1h inhibe la proliferación de células T en una reacción mixta de linfocitos mediada por PBMC y células dendríticas maduras.

En una reacción mixta alogénica (células presentadoras de antígeno tomadas de un individuo y las PBMC tomadas de otro individuo), en la que las células dendríticas maduras (células presentadoras de antígeno) causan la proliferación de PBMC nativas, T1h inhibe esta proliferación de una manera dependiente de la dosis. Los datos mostraron que el modo de acción implicaba la regulación descendente de al menos dos citoquinas proinflamatorias principales, a saber, IL6 e IFN γ .

Materiales y métodos

Líneas celulares y cultivo celular:

ES 2 759 075 T3

Se usan HUT 78 (Línea de células humanas de linfoma de células T de ATCC) como células diana. Las células se cultivan en DMEM de Iscove suplementado, que contiene 2 mg/ml de NaHCO₃, Hepes 20 mM, L-Glutamina 2 mM y 20% de FBS (Invitrogen).

5 Las células Daudi (Linfoma de células B, ATCC), las células se cultivan en RPMI 1640; que contiene 2 mg/ml de NaHCO₃, Hepes 20 mM, L-Glutamina 2 mM y 10% de FBS (Invitrogen).

Células WIL2S (Linfoma de células B): las células se cultivan en DMEM; que contiene 2 mg/ml de NaHCO₃, Hepes 20 mM, L-Glutamina 2 mM y 10% de FBS (Invitrogen).

10 Se usaron PBMC (Células mononucleares de sangre periférica) como células efectoras: las PBMC se aislaron mediante centrifugación de densidad mediada por Ficoll-Paque (Amersham Cat No: 17-14403-03). Las capas leucocíticas se obtienen de donantes sanos y siempre se cosechan frescas. Las células se cultivan en RPMI 1640 (Invitrogen), que contiene 2 mg/ml de NaHCO₃, Hepes 20 mM, L-Glutamina 2 mM y FBS al 5% (Invitrogen).

15 Anticuerpos: Los siguientes MAb anti-CD6 se usaron in vitro: anticuerpo Rituxan (Genentech) hR3 (CIM, La Habana, Cuba).

20 1X PBS (Invitrogen Cat No: 10010). Regulador de recubrimiento (NaHCO₃-8.4 g, Na₂CO₃-3.56 g, en H₂O 1000 ml pH 9.5) PBS/Tween (0.5 ml de Tween-20, SIGMA en 1000 ml de PBS)

Solución de bloqueo (1% de BSA en PBS)

25 RPMI 1640 (Cat No: 11875 Invitrogen)

DMEM de Iscove (Invitrogen Cat No: 12200-036)

Azul de Alamar (Invitrogen DAL-1100)

30 Lector de placas Biotek (Synergy™ HT)

Suero humano agrupado

35 Forma de sangre periférica Individuo sano recogido en recipientes EDTA (BD vacutainer cat No: 368457)

Medio DMEM de Iscove (Invitrogen) suplementado con 1% de FBS (suero bovino fetal)

Kit de apoptosis-Cat. No 1 988 549 (Roche)

40 Citómetro de flujo: Dako Cyan ADP

Ficoll-Paque (Amersham Cat No: 17-14403-03), RPMI 1640 Cat No: 11875 (Invitrogen),

FBS. (Suero bovino fetal) Gibco Cat No: 10082-147

45 Anti-CD6-PE, Anti-CD6-FITC, Anti D19-PECy5, Anti-CD3-FITC y Anti-CD4-Alexa AbD Serotec, Reino Unido)

Partículas de calibración SPHERO™ Rainbow (Cat No: RCP-30-5A)

50 CFSE (Sigma Cat No: 21888), 7AAD (Invitrogen Cat No: V 35124).

RPMI 1640 (Invitrogen), que contiene 2 mg/ml de NaHCO₃, Hepes 20 mM, L-Glutamina 2 mM y FBS al 5% (Invitrogen).

Placa de 96 pozos Fluotrac 600-Cat No. 655077 (Greiner Bio)

55 Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, no a modo de limitación.

Ejemplo 1a

60 T1h y ALCAM no se unen al mismo dominio por ELISA

El rhCD6FC/Quimera (sistemas R y D) (100 µg/ml) se diluyó en regulador de recubrimiento y se añadieron 100 µl a cada pozo de una placa Nunc- Maxisorp de 96 pozos. La placa se incubó a 4°C durante la noche. La placa se lavó tres veces con PBS Tween 20. Posteriormente, se añadieron 200 µl de solución de bloqueo (BSA al 2% + Tween 20 al 0.1% en PBS 1X) y se incubó durante 1 hora a 37°C. Después de la incubación, la placa se lavó nuevamente con PBS Tween tres veces, seguido de la adición de anticuerpo monoclonal T1h (0.2 mg/ml) y rhALCAMFc (sistemas R y

D) a concentraciones variables. Esto se incubó luego durante una hora a 37°C. La placa se lavó 3 veces posteriormente con PBS Tween. A los pozos se añadieron 200 µl de IgG anti-humana (Fab)₂ ALP (1:20000) diluido en regulador de bloqueo y se incubó durante 1 hora a 37°C. La placa se lavó tres veces con PBS Tween y se añadieron 200 µl de sustrato de fosfato de p-nitrofenilo (PNPP) a cada pozo y se incubó a 37°C hasta que se desarrolló el color alrededor de 15 minutos. La lectura se tomó a 405 nm usando un lector de microplacas BIOTEK. El experimento indica que la presencia de ALCAM en concentraciones variables no impide que T1h se una a un receptor CD6. La ausencia de competencia entre ALCAM y T1h sugiere que los dominios de unión para los dos son diferentes (Figura 2)

Ejemplo 1b

T1h se une al dominio 1 (D1) de CD6

Cuando MEM 98, un anticuerpo que se une al dominio 1 (Castro AA M et al, J of Immunol, 178 (2007) 4351-4361.), compete con T1h, se observa una competencia dependiente de la dosis, lo que sugiere que ambos se unen al mismo dominio, es decir, el Dominio 1 (Figura 3).

Ejemplo 2

T1h no induce apoptosis en las células HUT78.

Se recolectaron las células y se sembraron 1.5 ml de 3.3 x 10⁵ células/ml (células finales: 5X10⁵ células) en cada placa de 35 mm. La cantidad requerida de anticuerpo se añadió a los platos respectivos para obtener una concentración final de (5 µg/ml). En la placa de control, no se añadió anticuerpo. Como control positivo, las células se incubaron con rapamicina a una concentración de 1.2 µg/ml. Las células se incubaron durante la noche a 37°C en una incubadora con CO₂ al 5%. Las células se transfirieron luego al tubo FACS BD Falcon Cat No: 352054 y se centrifugaron a 1200 RPM durante 5 minutos a temperatura ambiente (RT). El sobrenadante se desechó y se resuspendió en 2 ml de PBS y se centrifugó a 1200 RPM durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó y se añadieron 100 µl de solución de marcaje de anexina-V-fluoresceína y se incubaron durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con 2 ml de PBS y se centrifugaron a 1200 RPM durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado. Las células se resuspendieron en 0.5 ml de PBS y se adquirieron mediante citómetro de flujo (se cerraron 3000 células) con excitación de 488 nm. Las muestras se leyeron en el canal FITC para anexina V y el canal rojo PE Texas para PI. Las muestras de anexina V sola y PI sola en el brazo tratado con rapamicina se procesaron para permitir la compensación.

Las células HUT 78 que fueron tratadas con T1h mostraron un 40% de apoptosis, que es casi igual al control no tratado en el canal FITC de anexina V. Las células no tratadas y las tratadas con anticuerpos inespecíficos (anticuerpo hR3) mostraron 35.3% y 36.5% de apoptosis respectivamente, mientras que el control positivo de rapamicina mostró 54.3% de apoptosis. Estos datos sugieren que la T1h no media en la apoptosis en las células HUT 78 (Figura 4).

Ejemplo 3

Diferencia en la expresión de receptores CD 6 en linfocitos T y B de individuos normales.

Las PBMC se aislaron mediante Ficoll-Paque (Cat. Amersham No: 17-14403-03), centrifugación de densidad mediada. Las capas leucocíticas se obtuvieron de donantes sanos y siempre se recolectaron frescas. Las PBMC se lavaron luego en PBS. Las PBMC se volvieron a suspender en 5 ml de 1X PBS a una densidad celular de 1.5 x 10⁶ células/ml y se añadieron 100 µl a cada tubo Falcon. Se añadieron 10 µl de anticuerpo conjugado (dilución 1:10) al tubo respectivo y se agitó en vórtice y luego se incubó a 4°C durante 30 minutos. Después de la incubación, se añadieron 2 ml de 1X PBS a cada tubo y luego se centrifugó a 1200 RPM durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 0.5 ml de 1X PBS para adquirir células en el citómetro de flujo. Las células (linfocitos) se cerraron para una población requerida (3000 células) en FSC y SSC. SPHERO™ (Cat No: RCP-30-5A) Las partículas de calibración Rainbow también se adquieren junto con los tubos anteriores en la misma configuración de voltaje. Se registró el número de canal medio de fluorescencia (es decir, brillo relativo) para cada pico. El número de canal medio se convirtió en número de canal relativo utilizando la siguiente fórmula.

$$\text{Canal Relativo \#} = (R/4) \log/\text{Canal medio \#} \times 10$$

ii) Donde R = Resolución (es decir, 256)

Se trazó un gráfico con el valor MEF asignado para cada pico frente al número de canal relativo en una hoja de Excel para obtener un gráfico de calibración como se muestra en la figura 5. Se obtuvo el RCN para el anticuerpo CD6 en células T y B, que se trazó en el gráfico de calibración de Sphero para cuantificar la densidad del receptor CD6 en las células individuales de los distintos subconjuntos de linfocitos.

La fórmula que se deriva del gráfico para calcular el número de receptores en los linfocitos fue;

a. Canal FITC: $y = 134 \cdot 95^{e^{0.0366} x}$

b. Canal PE: $y = 23.6 \cdot e^{0.03736 x}$

5 La densidad del receptor CD6 es 10 veces más en las células T en comparación con las células B. Se encontró que la diferencia en el patrón de expresión en las células T y B era discernible (Figura 6).

Ejemplo 4

10 T1h causa ADCC leve (citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos)

15 Las líneas celulares diana (HUT 78/Daudi) se recolectaron y se lavaron en PBS dos veces. Las células (2×10^5) se resuspendieron en 1 ml de concentración de CFSE 0.25 μ M (se requiere una valoración de CFSE para cada tipo de célula para elegir una concentración de CFSE que no se filtre en el canal PE Cy5). Las células se incubaron durante 10 minutos exactamente a 37°C. Se añadieron 2 ml de RPMI, FBS al 5% para detener la reacción. Las células se lavaron dos veces con 2 ml de RPMI al 5% de FBS cada una para eliminar el CFSE. La preparación de células diana se resuspendió luego en medio RPMI a una densidad celular de 1×10^5 células/ml y se añadieron 100 μ l (10^4 células) a cada tubo Falcon. Se añadieron 50 μ l de anticuerpo (5 μ g/ml, 10 μ g/ml) en los tubos respectivos y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron PBMC (células efectoras) a relaciones T/E de 1:1, 1:25, 1:50 y 1:100 a los tubos respectivos. El volumen final se realizó a 250 μ l con medio en cada tubo. Cada tubo se centrifugó durante 2 minutos a 1200 rpm para promover la interacción célula a célula y se incubó a 37°C para que se produzca ADCC. Las células Daudi se incubaron durante 6 horas con Rituxan y se procesaron junto con las muestras como control positivo. Las células se lavaron luego con IX PBS. Se añadieron 100 μ l de 7 AAD (6.25 μ g/ml) y se incubaron a 4°C durante 15 minutos. Las células se lavaron con 1XPBS centrifugado a 1200 RPM a 4°C durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en 500 μ l de 1X PBS. Las células se adquirieron a alrededor de 200 eventos/segundo y se vieron en los canales FITC y PE Cy 5 del citómetro de flujo. Las células positivas para CFSE fluorescentes entre la segunda y tercera década en la escala logarítmica sin derrame en el canal PE Cy5. Se cerró un total de 3000 células positivas para FITC y, en esta población, se evaluó el porcentaje de células que mostraban 7AAD (positividad de PE Cy5) (Figura 7 y Figura 8). También se incluyeron en el ensayo, aparte del control de anticuerpos no específicos, células efectoras/diana solas en la proporción 1:1, 1:25, 1:50 y 1:100. El % de apoptosis se tomó como % de células en el cuadrante superior derecho en la dispersión de diagrama de puntos FITC/PEcy5. (Figura 9).

35 Ejemplo 5

ADCC por T1h en HUT 78

40 Con base en el ejemplo 4, el ensayo de ADCC se realizó en el mismo procedimiento de ensayo para examinar el efecto de T1h en HUT 78. Las células se incubaron desde 4 horas a toda la noche. El resultado óptimo y consistente se obtuvo con incubación durante la noche.

45 Los resultados in vitro de cuatro experimentos individuales diferentes sugieren que T1h induce ADCC leve en células HUT 78, con incubación durante la noche en presencia de células efectoras (Figura 10, 11 y 12)

Ejemplo 6

T1h no media la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

50 Se recogió suero humano agrupado (mínimo tres) de sangre completa en un tubo estéril, se permitió que la sangre coagulara a temperatura ambiente durante al menos 4 horas y se centrifugó a 900 g durante 20 minutos. El suero se recogió, se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C. Las células diana (Wil-2S/HUT-78) se lavaron en regulador de dilución y se resuspendieron a 2×10^5 células/ml. El anticuerpo se diluyó en regulador de dilución a 4x de la concentración final deseada. El complemento se diluyó a 4 veces la concentración final deseada (es decir, diluciones 1:2.5 para una concentración final de 1:10). Se añadieron 50 μ l de anticuerpo diluido, complemento diluido y 50 μ l de suspensión celular (10.000 células/pozo) a cada pozo de una placa de fondo plano de 96 pozos. Se incluyeron los siguientes pozos de control: células diana + Ab solo (muerte celular espontánea), células diana + suero solamente (lisis de fondo) y células diana + SDS al 10% (para la muerte celular máxima). El control positivo fue células Wil-2S tratadas con Rituxan a diferentes concentraciones. La placa de 96 pozos se incubó durante 2 horas a 37°C. Se añadieron 50 μ l/pozo de Azul de Alamar a cada pozo, y la placa se incubó durante la noche a 37°C. La fluorescencia se mide en un espectrofotómetro Biotek Synergy™ HT con excitación de 530 nm, emisión de 590 nm y sensibilidad=35. Los resultados sugieren que T1h no induce CDC en comparación con Rituxan (Figura 13).

Ejemplo 7

65 T1h inhibe la proliferación de linfocitos mediada por PHA.

Líneas celulares y cultivo celular:

5 Se extrajo sangre completa de individuos normales después de su consentimiento siguiendo los procedimientos estándar de flebotomía. Las PBMC se aislaron mediante centrifugación de densidad mediada por Ficoll-Paque (e Amersham Cat No: 17-14403-03). Las capas leucocíticas se obtuvieron de donantes sanos y siempre se recolectaron frescas. Las células se cultivaron en RPMI 1640 (Invitrogen), que contenía 2 mg/ml de NaHCO₃, Hepes 20 mM, L-Glutamina 2 mM y FBS al 10% (Invitrogen).

10 Inhibición de la proliferación de linfocitos por citometría de flujo utilizando CFSE

Se recolectaron PBMC y se lavaron en PBS. Las células (7.5 x 10⁶) se resuspendieron en 1 ml de concentración de CFSE 2 μM en PBS. Las células se incubaron durante 10 minutos exactamente a 37°C. Se añadieron 10 ml de RPMI, FBS al 10% para detener la reacción. Las células se lavaron dos veces con 10 ml de PBS. La preparación celular se volvió a suspender en 5 ml de PBS a una densidad celular de 1.5 x 10⁶ células/ml y se añadieron 200 μl a cada tubo BD FACS, 200 μl de anticuerpo requerido y no específico a diversas concentraciones (50 μg/ml, 25 μg/ml, 12.5 μg/ml y 6.25 μg/ml respectivamente) se añadieron y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Se añadieron 2 ml de PBS a cada tubo y se centrifugó a 1200 RPM durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar el anticuerpo no unido. Se añadió 1 ml de RPMI, FBS al 10% al sedimento en cada tubo. Se añadió 1 ml de PHA 20 μg/ml en RPMI FBS al 10% al tubo respectivo para estimular la proliferación. El volumen total en el tubo es de 2 ml y la concentración final de PHA fue de 10 μg/ml. El tubo se agitó en vórtice y se incubó durante 3 días a 37°C en una incubadora con CO₂. Las células se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1200 RPM a 4°C durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó y se resuspendió en 500 ul de 1X PBS. Se adquirieron 20000 eventos en total en alrededor de 200 eventos/segundo y se vieron en el canal FITC.

25

$$\% \text{ de inhibición} = \{[\text{PHA- (T1h + PHA)}] / \text{PHA}\} * 100$$

(Donde PHA = PHA-células solas

30 PHA + T1h = (PHA+T1h)-Células solas

PHA + hR3 = (PHA+hR3)-Células solas)

Las células solas son las células CFSE+.

35

Estos datos sugieren que el anticuerpo T1h media en la inhibición de la proliferación de linfocitos estimulados con PHA de una manera dependiente de la dosis. El porcentaje de inhibición puede variar entre los individuos debido a la variación inherente entre los individuos normales. Sin embargo, en general, se observó una inhibición dependiente de la dosis de linfocitos estimulados con PHA con T1h, pero no con un anticuerpo no específico hR3 (Figura 14, Figura 15 y Figura 16).

40

Ejemplo 8

45 T1h inhibe la proliferación de linfocitos mediada por PHA incluso en un ensayo de Azul de Alamar basado en placa de 96 pozos

Las PBMC se recolectaron frescas y se resuspendieron en RPMI 5% FBS a una concentración de 4 x 10⁵ células/ml. Se añadieron 50 μl de células a cada pozo. Se añadieron 100 μl de anticuerpo (T1h o hR3) a una concentración 2X (20 μl/ml) al pozo respectivo. Se añadieron 100 μl de medio solo a los pozos sin anticuerpo. La placa se incubó luego durante media hora a 37°C. Se añadieron 50 μl de PHA a una concentración 4X (20 μg/ml) a los pozos respectivos para estimular la proliferación de linfocitos. En los pozos restantes, se añadieron 50 μl de medio para hacer un volumen final de 200 μl/pozo en todos los pozos. Las placas se incubaron durante tres días en la incubadora de CO₂ a 37°C. Se añadieron 65 μl de Azul de Alamar a cada pozo y se incubaron durante la noche en una incubadora de CO₂ a 37°C. La fluorescencia se midió en un espectrofotómetro Biotek Synergy™ HT con 530 nm de excitación, 590 nm de emisión y sensibilidad = 35.

55

Este ensayo reitera el hecho de que la proliferación de linfocitos mediada por PHA se inhibe significativamente en presencia de T1h soluble pero no en presencia de un anticuerpo no específico hR3. Esto junto con el experimento anterior sugeriría un papel para T1h en la inhibición de la proliferación de células T sin tratamiento previo. Este experimento también muestra que la inhibición de la proliferación de células T mediada por PHA se puede convertir en un formato de ensayo basado en placa conveniente en comparación con el experimento anterior que estaba basado en flujo (Figura 17).

60

Ejemplo 9

65

T1h reduce la proliferación de linfocitos inducida por Anti-CD3 unido, T1h relacionado con Anti-CD3+ y ALCAM relacionado con Anti-CD3+

5 Se añadieron 50 µl de regulador de recubrimiento a una placa de 96 pozos, 50 µl de anticuerpo Anti-CD3 de 2 x, se añadió concentración (1 µg/ml) a la fila A como en la Figura 18. 50 µl de dilución de anticuerpo de la primera se tomó la fila A y se diluyó en serie por la placa hasta la fila E usando una pipeta electrónica de 12 canales. Se agregaron 50 µl de regulador de recubrimiento a la columna 1-4 de la Fila A-E., Se agregaron 50 µl de anticuerpo (T1h (5-8) o ALCAM Fc (9-12)) de concentración 2X (2 µg/ml) respectivos pozos, de modo que la concentración final de los pozos tenía 1 µg/ml constante del anticuerpo y las diversas concentraciones de anticuerpo Anti-CD3 (la fila A-E tenía 1, 0.5, 10 0.25, 0.625 µg/ml) (Figura 18). Se agregaron 100 µl de T1h o hR3 o ALCAM 1 µg/ml a los pozos respectivos como control (como se muestra en la plantilla). El conjunto anterior se realizó en tres placas, para el control de medios, sT1h y shR3. La placa se incubó a 4°C durante la noche para que el anticuerpo se una a la placa.

15 Bloqueo de la placa

La placa se llevó a temperatura ambiente y se aspiró el anticuerpo en regulador de recubrimiento usando Vaccusafe (IBS Integra BioSciences), los sitios de unión no específicos se bloquearon agregando 200 µl de solución de bloqueo a cada pozo. La placa se incubó a 37°C durante 1 hora y se lavó dos veces con PBS/Tween. El tercer lavado se realizó con los medios RPMI. El volumen residual de medio se eliminó cuidadosamente.

20 Añadir suspensión celular:

25 Se agregaron 100 µl de PBMC (30.000 células) a cada pozo. Se añadieron 100 µl del anticuerpo requerido (T1h o hR3) 2X a las placas respectivas. Se añadieron 100 µl de los medios en la placa de medios. Las placas de 96 pozos se incubaron durante 72 horas a 37°C en la incubadora con CO₂ al 5%. Se añadieron 65 µl de solución de Azul de Alamar a cada pozo y se incubaron durante la noche a 37°C en la incubadora con CO₂ al 5%. La fluorescencia usando un fluorímetro de 96 pozos (Synergy HT con software Gen 5) se leyó con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm (Sensibilidad = 35) (Figura 19).

30 La combinación de anti-CD3 + T1h relacionado y anti-CD3 + ALCAM es sinérgica sobre anti-CD3 unido solo con respecto al análisis de Bliss (Figura 20).

Ejemplo 9a

35 Titulación de IL2 en PBMC nativas

40 Se añadieron 100 µl de medio a todos los pozos. Se añadieron 100 µl de concentración 2x de IL2 (20 ng/ml) a la primera fila A2 a A10. Desde la primera fila, se tomaron 100 µl para hacer una dilución en serie en la placa hasta la fila H. Se agregaron 50 µl de la suspensión de PBMC (6 x 10⁵ células/ml) a todos los pozos. Se añadieron 50 µl del medio o anticuerpo (T1h o hR3 10 µg/ml) o PHA 10 µg/ml en el pozo respectivo para obtener un volumen final de 200 µl. La placa se incubó durante 5 días a 37°C en la incubadora de CO₂ al 5%, se añadieron 65 µl de solución de Azul de Alamar a cada pozo y se incubó durante la noche a 37°C en la incubadora de CO₂ al 5%. La fluorescencia se leyó usando un fluorímetro de 96 pozos (Synergy HT con software Gen 5) con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm (Sensibilidad = 35). En base a este experimento, se decidió elegir 1.25 ng/ml de IL2 en experimentos posteriores (Figura 21).

45 Ejemplo 9b

50 La T1h provoca la reducción de las citoquinas proinflamatorias y esta inhibición se elimina parcialmente en presencia de IL2 exógena.

Análisis de citoquinas

55 Preparación de patrones de citoquinas Th1/Th2 humanas

Se reconstituyó 1 vial de patrones de citoquina Th1/Th2 humana liofilizada con 0.2 ml de diluyente de ensayo para preparar un estándar a granel 10x y se dejó equilibrar durante al menos 15 minutos antes de hacer las diluciones. Los tubos de 12 x 75 mm (BD Falcon Cat. No. 352008) fueron etiquetados y dispuestos en el siguiente orden: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256.

60 Se pipetearon 900 µl de diluyente de ensayo al tubo estándar superior. Se pipetearon 300 µl de diluyente de ensayo a cada uno de los tubos restantes. Se realizó una dilución en serie transfiriendo 300 µl del estándar superior al tubo de dilución 1:2 y se mezcló a fondo. Se realizaron diluciones en serie adicionales transfiriendo 300 µl del tubo 1:2 al tubo 1:4 y así sucesivamente al tubo 1:256, y se mezclaron completamente. Se preparó un tubo que contenía diluyente de ensayo para servir como control negativo de 0 pg/ml.

65

Preparación de perlas de citoquinas Th1/Th2 humanas mixtas

Las perlas de captura se embotellaron individualmente y es necesario agrupar los reactivos de las perlas (A1-A6) inmediatamente antes de mezclarlos con el reactivo de detección de PE, los estándares y las muestras. Se determinó el número de tubos de ensayo (incluidos estándares y controles) que se requieren para el experimento. Cada suspensión de perla de captura se sometió a vórtice durante unos segundos antes de mezclar. Se agregaron alícuotas de 10 µl de cada perla de captura, para cada tubo de ensayo que se va a analizar, en un solo tubo etiquetado como "perlas para captura mixtas" (por ejemplo, 10 µl de perlas para captura IL-2 × 18 tubos de ensayo = 180 µl de IL-2 de perlas para captura requeridas).

Preparación de muestras:

Las muestras de prueba se diluyeron mediante el factor de dilución deseado (es decir, 1:2, 1:10 o 1:100) usando el volumen apropiado de diluyente de ensayo. Las diluciones de la muestra se mezclaron completamente antes de transferir las muestras a los tubos de ensayo apropiados que contenían perlas de captura mixtas y reactivo de detección de PE.

Procedimiento de ensayo de sobrenadante de cultivo

Se añadieron 50 µl de las perlas de captura mixtas (preparadas usando el procedimiento descrito en la preparación de perlas de captura de citoquinas Th1/Th2 humanas mixtas) a los tubos de ensayo apropiados. Las perlas de captura mixtas se agitaron en vórtice antes de agregarlas a los tubos de ensayo. Se añadieron 50 µl del reactivo de detección de PE humano Th1/Th2-II a los tubos de ensayo. Se añadieron 50 µl de las diluciones del estándar de Citoquina Th1/Th2 Humana a los tubos de ensayo de control. Se añadieron 50 µl de cada muestra de prueba a los tubos de ensayo de prueba. Los tubos de ensayo se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente y se protegieron de la exposición directa a la luz. Se añadió 1 ml de regulador de lavado a cada tubo de ensayo y se centrifugó a 200 × g durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró cuidadosamente y se desechó de cada tubo de ensayo. Se agregaron 300 µl de regulador de lavado a cada tubo de ensayo para resuspender el sedimento de perlas. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo (Figura 22 y Figura 23).

La T1h soluble inhibe la expresión del receptor CD4 y CD25 en las células T proliferantes.

El ensayo se configuró como se describe en el procedimiento de ensayo de unión, es decir, el recubrimiento de la placa y el cultivo de los PBMC, mencionados en la Figura 18. Las células se tomaron de la placa de 96 pozos en un tubo Falcon BD. Se añaden 2 ml de 1X PBS a cada tubo y se centrifuga a 1200 RPM durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó y se añadieron 100 µl de 1X PBS al sedimento celular. Se tomaron 100 µl de células en cada tubo y se agregaron 10 µl de Flourchrome, Anti-CD4 Alexa conjugado o Anti-CD25 PE y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, se añadieron 2 ml de 1X PBS a cada tubo y luego se centrifugó a 1200 RPM durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue descartado. Las células se resuspenden en 0.5 ml de PBS 1X y las células se adquieren en el citómetro de flujo. Las células (linfocitos) se cerraron para una población requerida (3000 células) en FSC y SSC. Se estimó tanto el porcentaje de células como la intensidad de fluorescencia media. Este experimento se realizó tres veces y se muestra una figura representativa. Los resultados fueron repetibles en experimentos independientes (Figura 24).

Ningún aumento en la apoptosis en el ensayo mencionado anteriormente.

En el ensayo establecido como se describe en el ejemplo 9 del procedimiento de ensayo de anclaje, las células se tomaron de la placa de 96 pozos en un tubo Falcon BD y se marcaron para el ensayo de apoptosis. Se añadieron 2 ml de 1X PBS a cada tubo y se centrifugó a 1200 RPM durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó y se añadieron 100 µl de 1X PBS al sedimento celular. Se añadieron 100 µl de solución de etiquetado de PI/anexina V y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, se agregan 2 ml de 1X PBS a cada tubo y luego se centrifuga a 1200 RPM durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue descartado. Las células se resuspendieron en 0.5 ml de 1X PBS y las células se adquirieron en el citómetro de flujo. Las células (linfocitos) están cerradas para una población requerida (3000 células) en FSC y SSC (Figura 25).

A partir de estos experimentos, está claro que T1h provoca la inhibición de la proliferación de células T nativas y esto está mediado por una disminución sustancial de las citoquinas proinflamatorias y también una reducción en los recuentos de CD25 y CD4. La adición de IL2 exógena es capaz de recuperar la inhibición, así como de aumentar la expresión de las citoquinas proinflamatorias y también aumentar el recuento absoluto de receptores tanto de CD4 como de CD25. Estos resultados sugerirían que la inhibición de la proliferación de células T por T1h está mediada por la supresión de IL2 y la adición de IL2 exógena provoca una "ganancia de función". También observamos que la reducción en la proliferación de células T no está mediada por la inducción de apoptosis.

Ejemplo 10

Ninguna inhibición de las células T de memoria por T1h en un ensayo de proliferación de células T mediada por toxoide tetánico

5 Las PBMC se aislaron mediante Ficoll-Paque (Amersham Cat No.: 17-14403-03), centrifugación en gradiente de densidad. Las capas leucocíticas se obtuvieron de donantes sanos y siempre se recolectaron frescas. Las PBMC se lavaron luego en PBS (Invitrogen). Las PBMC se volvieron a suspender en 2 ml de medio RPMI con FBS al 5% suplementado a una densidad celular de 0.3×10^6 células/ml. Las células fueron incubadas durante 30 minutos con o sin T1h 10 ug/ml y hR3, que se utiliza como control no específico en un tubo estéril BD FACS de 5 ml. Después de la incubación, las células se sometieron a vórtice y se añadieron 100 ul de la suspensión celular a los pozos respectivos. 10 Se añadieron 100 ul de la solución de trabajo de toxoide tetánico (Cat #582231, CALBIOCHEM) (10 ug/ml) (medio RPMI con 5% de FBS) a los pozos respectivos para estimular la proliferación de células T de memoria. Las placas se incubaron durante cinco días en la incubadora de CO₂ a 37°C. Se añadieron 65 µl de Azul de Alamar a cada pozo y se incubaron durante la noche en una incubadora de CO₂ a 37°C. La fluorescencia se midió en un espectrofotómetro Biotek Synergy™ HT con excitación de 530 nm, emisión de 590 nm y sensibilidad=35 (Figura 26).

15 Los resultados experimentales muestran que el toxoide tetánico estimula la proliferación de células T de una manera dependiente de la dosis, pero la sT1h no muestra ninguna inhibición de la proliferación de estas células. Esto sugiere fuertemente que T1h no inhibe la proliferación de células T de memoria. Esto es favorable para la terapia con T1h porque la proliferación de células T con memoria circulante no se ve afectada y los pacientes en terapia con T1h no serían susceptibles a la infección. 20

Ejemplo 11

T1h inhibe la proliferación de células T en una reacción mixta de linfocitos mediada por PBMC y células Raji

25 Las células Raji/PBMC se recolectaron y se resuspendieron en 1X PBS. Se volvieron a suspender 8×10^5 células/ml de células Raji/PBMC en 1 ml de mitomicina (25 ug/ml). Las células se incubaron durante 30 minutos en una incubadora de CO₂ a 37°C. Después de la incubación, se añadieron 2 ml de RPMI con FBS al 5% a cada tubo y se centrifugó a 1200 RPM durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar la mitomicina. El sobrenadante se desechó y nuevamente se añadieron 2 ml de RPMI con 5 FBS y se centrifugó. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en el medio RPMI. Se añadieron 50 ul de PBMC (4×10^5 células/ml) a los pozos respectivos de placas de fondo redondo de 96 pozos. Se añadieron 100 µl de la dilución de anticuerpos T1h o hR3 (10 µg/ml) a los pozos respectivos y se incubaron durante 30 minutos en una incubadora de CO₂ a 37°C. Se añadieron 50 ul de las células Raji tratadas con mitomicina (4×10^5 células/ml) en los pozos respectivos. Junto con el ensayo, los controles que se incluyeron fueron células Raji tratadas con mitomicina solo, PBMC solo, células Raji tratadas con mitomicina + PHA, PBMC + PHA, mitomicina tratada con Raji y PBMC. La placa se incubó durante 5 días en una incubadora de CO₂ a 37°C. Se añadieron 65 µl de Azul de Alamar a cada pozo y se incubaron durante la noche en una incubadora de CO₂ a 37°C. La fluorescencia se midió en un espectrofotómetro Biotek Synergy™ HT con 530 nm de excitación, 590 nm de emisión y sensibilidad=35. 35

40 En conclusión, se observó que T1h puede inhibir específicamente la MLR unidireccional donde las células Raji son las células presentadoras de antígeno y proliferan las PBMC (Figura 27 y Figura 28).

Ejemplo 12:

45 Reacción mixta de linfocitos (células dendríticas y linfocitos de sangre periférica (PBL):

Ensayo MLR:

50 El ensayo de MLR se realizó como DC: PBL = relación 1:2. La plantilla del experimento se diseñó con tres concentraciones de T1h con control positivo Pimecrolimus y control negativo hR3. Se muestra la plantilla. (Figura 29). Las diluciones en serie se realizaron en consecuencia a través de la placa.

55 Se añadieron PBL y/o DC según el diseño de la placa. Los PBL tratados con mitomicina C se agregaron a los pozos correspondientes en la placa. En todos los pozos el volumen final fue de 200 ul. La MLR se realizó por duplicado. Una placa para el ensayo de proliferación y la otra para el ensayo de citoquinas. Finalmente, ambas placas recibieron una breve rotación y se mantuvieron en una incubadora de CO₂ durante 6 días.

Ensayo de proliferación:

60 Después de la incubación, se verificó la placa al microscopio en busca de contaminación y se añadieron 20 ul de Azul de Alamar (10% del volumen total por pozo) a cada pozo. Se tomaron lecturas a una sensibilidad de 35 en diferentes períodos de tiempo, comenzando a las 4 horas hasta la noche (Figura 30).

65 Ensayo de citoquinas:

Se recogió el sobrenadante de cada pozo y para cada grupo se reunió el sobrenadante. Las citoquinas se analizaron en citometría de flujo utilizando BD CBA Th1/Th2 kit II (Figura 31).

5 En una reacción mixta alogénica (células presentadoras de antígeno tomadas de un individuo y las PBMC tomadas de otro individuo), en donde las células dendríticas maduras (células presentadoras de antígeno) causan la proliferación de PBMC nativas, T1h inhibe esta proliferación de una manera dependiente de la dosis. Los datos mostraron que el modo de acción implicaba la regulación negativa de al menos dos citoquinas proinflamatorias principales, a saber, IL6 e IFN γ .

10 Ejemplo 13:

Modelo animal de diabetes Tipo I

15 Se sabe que los ratones hembra NOD (diabéticos no obesos) desarrollan diabetes espontánea autoinmune mediada por células T, medida por el aumento de glucosa, con el tiempo. Este modelo de diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) es un excelente modelo para estudiar el efecto terapéutico y profiláctico de las drogas. Este ratón se usó para estudiar el beneficio terapéutico y profiláctico del anticuerpo sustituto para CD6 (monoclonal de rata que se une al CD6 murino de manera similar a como T1h se une al CD6 humano).

20 En el experimento piloto, se demostró que los animales procedentes de Harlan desarrollaron la enfermedad en 8-10 semanas. La edad al inicio del experimento de estos ratones es de 6-7 semanas. Dosis que van desde 2.46 a 19.68 mg/kg/semana redujeron significativamente los niveles de glucosa y de hecho a la dosis más alta redujeron los niveles de glucosa a la normalidad.

25 Un experimento similar en diez ratones en un entorno terapéutico retrasó el inicio de la enfermedad de una manera dependiente de la dosis. El retraso fue de hasta tres semanas con la dosis más alta.

Ejemplo 14:

30 Modelo de artritis inducida por colágeno

El modelo de ratón para la artritis inducida por colágeno (CIA) es particularmente ventajoso para estudiar la artritis reumatoide en un modelo animal. El modelo también se ha usado históricamente para estudiar los efectos de las moléculas contra la artritis reumatoide, incluidos los anticuerpos.

35 Se utilizaron ratones macho C57BL/6 en el estudio. En resumen, se disolvió colágeno de pollo (CII) procedente de Sigma en ácido acético 10 mM y se esterilizó por filtración usando un filtro de 0.2 μ m. Se usaron volúmenes de inyección de 50 μ l en el estudio. La CII se disolvió a 4 mg/ml para volúmenes de 100 μ l. Todos los procedimientos se realizaron a 2-8 °C.

40 Mycobacterium tuberculosis muerto por calor se trituró finamente en un mortero y mano combinados con adyuvante incompleto de Freund (IFA). El CII se emulsionó en esta solución mezclando los dos. Todos los procedimientos se realizaron a 2-8 C.

45 La primera dosis se administra en la base de la cola después de dos semanas se inyecta una dosis de potenciador. Luego se monitoriza el desarrollo de la artritis.

50 En diez ratones que desarrollaron la enfermedad, se usó el anticuerpo sustituto Anti-CD6 que detectaba específicamente ratones CD6 en un dominio similar a T1h. Dosis que van desde 2.46 a 19,68 mg/kg/semana redujeron significativamente la artritis reumatoide de una manera dependiente de la dosis en estos ratones en comparación con los controles no tratados. Estos experimentos establecen el hecho de que la artritis reumatoide puede ser controlada por un anticuerpo sustituto de T1h.

Ejemplo 15:

55 Encefalomiелitis autoinmune (EAE)

60 La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) es un modelo animal de inflamación cerebral. Es una enfermedad inflamatoria desmielinizante del sistema nervioso central (SNC) y se estudia como un modelo para las enfermedades desmielinizantes del SNC humano, incluida la enfermedad de la esclerosis múltiple.

65 Se sabe que los ratones C57BL/6 son susceptibles a esta enfermedad cuando se les inyecta proteína básica de mielina de rata y un protocolo de refuerzo en donde los ratones se inmunizaron con 200 μ g de MBP de rata en CFA en los días 0 y 17 seguido de toxina pertussis estándar. Este protocolo dio como resultado un curso monofásico de enfermedad moderada que comenzó el día 20 con los signos histológicos de inflamación y daño en los axones pero sin desmielinización significativa. 10 ratones en el brazo tratado fueron expuestos a concentraciones variables del

anticuerpo sustituto de T1h que se une a un dominio similar a los ratones CD6 como lo hace T1h con CD6 humano. La dosis varió de 2.46 a 19.68 mg/kg/semana. El tratamiento controló significativamente la enfermedad en comparación con la población de placebo de una manera dependiente de la dosis, especialmente a la dosis más alta.

5 Ejemplo 16:

Injerto Alogénico

10 El injerto de piel puede ser rechazado de una manera específica cuando la piel de ratones endogámicos de la cepa A se trasplanta a ratones B, la piel primero se vasculariza entre el día 3 y el día 7. La piel vascularizada se infiltra luego con linfocitos, monocitos, neutrófilos y otras células inflamatorias. Hay una disminución de la vascularización del tejido trasplantado en 7-10 días y necrosis visible en 10 días.

15 Este experimento fue probado en veinte ratones (BALBc-WT) que recibieron injertos de piel de ratones C57BL6/WT. La piel se extirpó y se injertó en los diferentes ratones BALBc usando un procedimiento quirúrgico estándar. Diez ratones en el brazo de tratamiento fueron expuestos a concentraciones variables del anticuerpo sustituto de T1h que se une a un dominio similar a los ratones CD6 como lo hace T1h con CD6 humano. La dosis varió de 2.46 a 19.68 mg/kg/semana. La primera inyección se administró una semana antes de que los ratones BALB c recibieran el injerto y continuó durante 6 semanas después.

20 Los datos parecen sugerir que los injertos de piel fueron tolerados con mayor frecuencia en los ratones que recibieron los fármacos en comparación con los animales no tratados. En todos los animales no tratados, los injertos se volvieron necróticos en tres semanas. La tolerancia al injerto también dependía de la dosis, ya que los animales que recibieron la dosis más alta sostuvieron más los injertos.

25 Listado de secuencias

30 <110> Biocon Ltd

Melarkode, Ramakrishan

Nair, Pradip

35 Rajkumar, Sundaraj D

Sastry, Kedarnath N

40 Chatterji, Monalisa N

Adhikary, Laxmi N

Balasubramanian, Hema N

45 Casimiro, Jose N

Valladares, Josefa N

50 Rodriguez, Rolando N

<120>Un anticuerpo monoclonal y un método del mismo

<130> PCT0854

55 <150> IN 00650/CHE/2008

<151> 2008-03-14

60 <160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

65 <211> 119

ES 2 759 075 T3

<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<220>
<221> PÉPTIDO
10 <222> (1)..(119)
<400> 1
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Arg Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg Asp Tyr Asp Leu Asp Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115
15 <210> 2
<211> 107
20 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
25 <221> PÉPTIDO
<222> (1)..(107)
30 <400> 2

ES 2 759 075 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Arg Asp Ile Arg Ser Tyr
 20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
 65 70 75 80

Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Phe
 85 90 95

Thr Leu Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 3

5 <211> 357

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <220>

<221> exón

15 <222> (1)..(357)

<400> 3

ES 2 759 075 T3

gaa	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	tta	gtg	aag	cct	gga	ggg	48
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	
1				5				10						15		
tcc	ctg	aaa	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	ttc	aag	ttt	agt	aga	tat	96
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Lys	Phe	Ser	Arg	Tyr	
			20					25					30			
gcc	atg	tct	tgg	gtt	cgc	cag	gct	ccg	ggg	aag	agg	ctg	gag	tgg	gtc	144
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Arg	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
gca	acc	att	agt	agt	ggt	ggt	agt	tac	atc	tac	tat	cca	gac	agt	gtg	192
Ala	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
aag	ggt	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	gtc	aag	aac	acc	ctg	tat	240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Val	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
65					70					75				80		
ctg	caa	atg	agc	agt	ctg	agg	tct	gag	gac	acg	gcc	atg	tat	tac	tgt	288
Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
gca	aga	cga	gat	tac	gac	ctg	gac	tac	ttt	gac	tcc	tgg	ggc	caa	ggc	336
Ala	Arg	Arg	Asp	Tyr	Asp	Leu	Asp	Tyr	Phe	Asp	Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	
			100					105					110			
acc	ctt	gtc	acc	gtc	tcc	tca										357
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
		115														

<210> 4

5

<211> 321

<212> ADN

10

<213> Homo sapiens

<220>

<221> exón

15

<222> (1)..(321)

<400> 4

ES 2 759 075 T3

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tcg gtg gga Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly 1 5 10 15	48
gac aga gtc act atc act tgc aag gcg agt cgg gac att aga agc tat Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Arg Asp Ile Arg Ser Tyr 20 25 30	96
tta acc tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gct cct aag acc ctg atc Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile 35 40 45	144
tat tat gca aca agc ttg gca gat ggg gtc ccg tcg aga ttc agt ggc Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50 55 60	192
agt gga tct ggg caa gat tat tct ctc acc atc agc agc ctg gag tct Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser 65 70 75 80	240
gac gat aca gca act tac tac tgt cta caa cat ggt gag agt cca ttc Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Phe 85 90 95	288
acg ctc ggc tcg ggg acc aag ctg gaa atc aaa Thr Leu Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105	321

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal anti-CD6 que comprende una región variable de polipéptido de cadena pesada y una región variable de polipéptido de cadena liviana como se establece en la secuencia ID No. 1 y 2 respectivamente, la cual se une específicamente al dominio 1 (D1) de CD6 e inhibe la proliferación de células T sin interferir con la molécula de adhesión celular leucocitaria activada (ALCAM) para su uso en el tratamiento de un trastorno autoinmune, en donde el anticuerpo inhibe la proliferación de células T nativas al disminuir las citoquinas proinflamatorias, pero no inhibe la proliferación de células T de memoria y el trastorno autoinmune se selecciona del grupo que consiste en esclerosis múltiple, rechazo de trasplantes, diabetes tipo 1 y artritis reumatoide.
- 10 2. El anticuerpo monoclonal anti-CD6 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la dosis farmacéuticamente efectiva del anticuerpo anti-CD6 es 0.1-25 mg/kg/semana.
- 15 3. El anticuerpo monoclonal anti-CD6 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichos polipéptidos son codificados por las secuencias de nucleótidos como se establece en las Secuencias ID Nos. 3 y 4, respectivamente.
- 20 4. El anticuerpo monoclonal anti-CD6 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo no induce citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad dependiente de anticuerpo o apoptosis in vitro.
- 25 5. El anticuerpo monoclonal anti-CD6 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo inhibe la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) sin tratar inducidas por anti-CD3 unido; combinación de anti-CD3 unido y anti-CD6 o combinación de anti-CD3 unido y ALCAM.
- 30 6. El anticuerpo monoclonal anti-CD6 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo inhibe específicamente la reacción linfocítica mixta unidireccional (MLR) en la que las células Raji son células presentadoras de antígeno y proliferan las PBMC.
- 35 7. El anticuerpo monoclonal de anticuerpo anti-CD6 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo inhibe específicamente la MLR autóloga unidireccional mediada por las PBMC.
- 40 8. Anticuerpo monoclonal anti-CD6 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo provoca la inhibición de la proliferación de células T nativas por reducción en los recuentos de CD25 y CD4.
- 45 9. El anticuerpo monoclonal anti-CD6 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo inhibe la proliferación de células T mediante la supresión mediadora de IL2.
10. El anticuerpo monoclonal anti-CD6 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo muestra ganancia de función con la adición de IL2 exógena.
11. El anticuerpo monoclonal anti-CD6 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo está implicado en la regulación descendente de las citoquinas proinflamatorias IL6 e IFN γ .
12. El anticuerpo monoclonal anti-CD6 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se administra en combinación con antígenos capaces de provocar una respuesta inmunitaria antiinflamatoria seleccionada del grupo que comprende insulina, descarboxilasa de ácido glutámico (GAD), glucoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOD), proteína básica de mielina (MBP) y proteína de choque térmico 60 (HSP60).

Secuencia VH:

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCC
TGTGCAGCCTCTGGATTCAAGTTTAGTAGATATGCCATGTCTTGGGTTCCGCCAGGCTCCGGGGA
AGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTAGTGGTGGTAGTTACATCTACTATCCAGACAGTG
TGAAGGGTCGATTACCCATCTCCAGAGACAATGTCAAGAACACCCTGTATCTGCAÀATGAGCA
GTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGACGAGATTACGACCTGGACTACT
TTGACTCCTGGGGCCAAGGCACCCTTGTCACCGTCTCCTCA

Secuencia Vk:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCGGTGGGAGACAGAGTCACTATC
ACTTGCAAGGCGAGTCGGGACATTAGAAGCTATTTAACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAA
AGCTCCTAAGACCCTGATCTATTATGCAACAAGCTTGGCAGATGGGGTCCCGTCGAGATTAG
TGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGACGATACAGC
AACTTACTACTGTCTACAACATGGTGAGAGTCCATTCACGCTCGGCTCGGGGACCAAGCTGGA
AATCAAA

Figura 1a

Secuencia VH:

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFKFSRYAMSWVRQAPGKRLEW
VATISSGGSYIYYPDSVKGRFTISRDNVKNLTLQLQMSLRSEDTAMYY
CARRDYDLDFDSWGGQGLVTVSS

Secuencia Vk:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDIRSYLTWYQQKPGKAPKTLI
YYATSLADGVPSRFSGSGSGQDYSLTISLESDDTATYYCLQHGESPT
LGSGTKLEIK

Figura 1b

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDIRS¹YLTWYQQK²P
DIQMTQSPSSLSASVGDEVTITCKASRDIR³SYLTWYQQ⁴K⁵P
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDIR⁶SYLTWYQQ⁷K⁸P

GKAPKTLIYYATSLADGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSELD
GKAPKTLIYYATSLADGVPERFSGSGSGQDYSLTISSELD
GKAPKTLIYYATSLADGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSELD

DTATYYCLQHGESPF⁹FGSGTKLEIK¹⁰RA EP0807125 BI,

DTATYYCLQHGESPF¹¹FGSGTKLEIK-- Translated Nucleotide seq. n.º 1 (Gen. 1991)

DTATYYCLQHGESPF¹²FGSGTKLEIK-- Secuencia de aminoácidos

Figura 1c

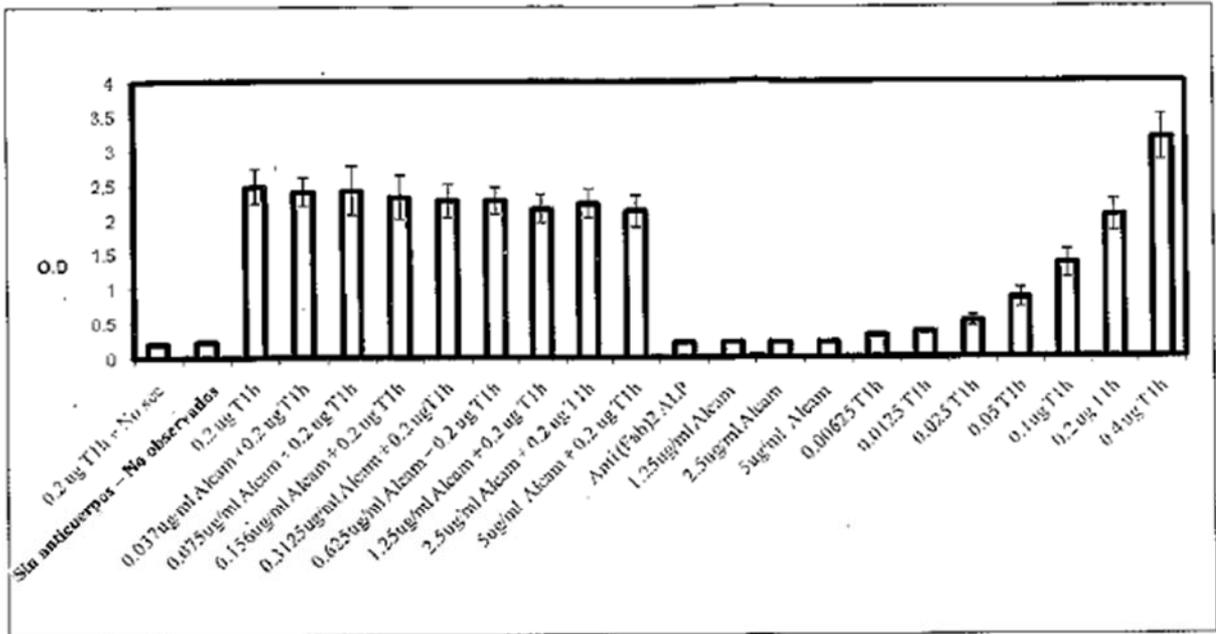


Figura 2

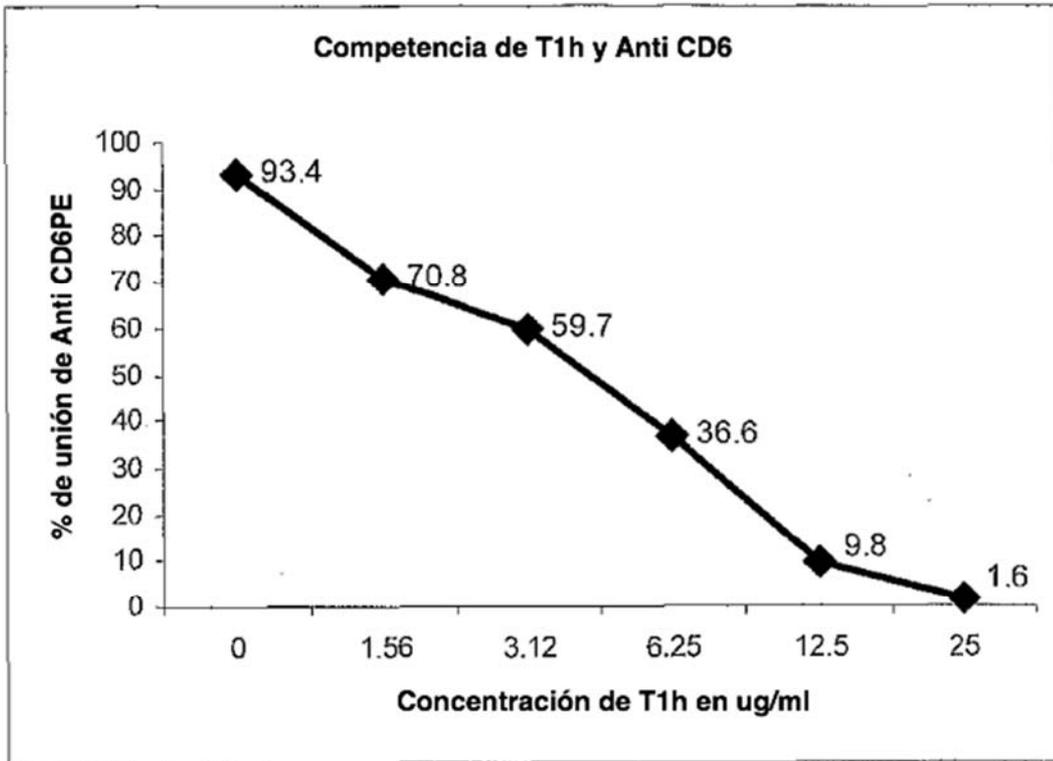


Figura 3

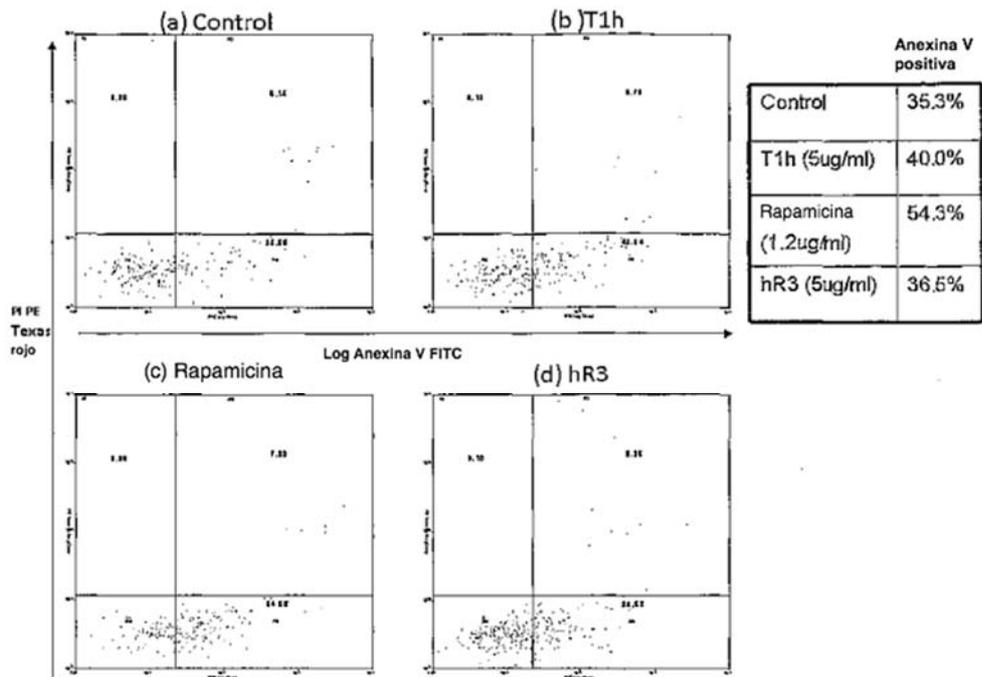


Figura 4

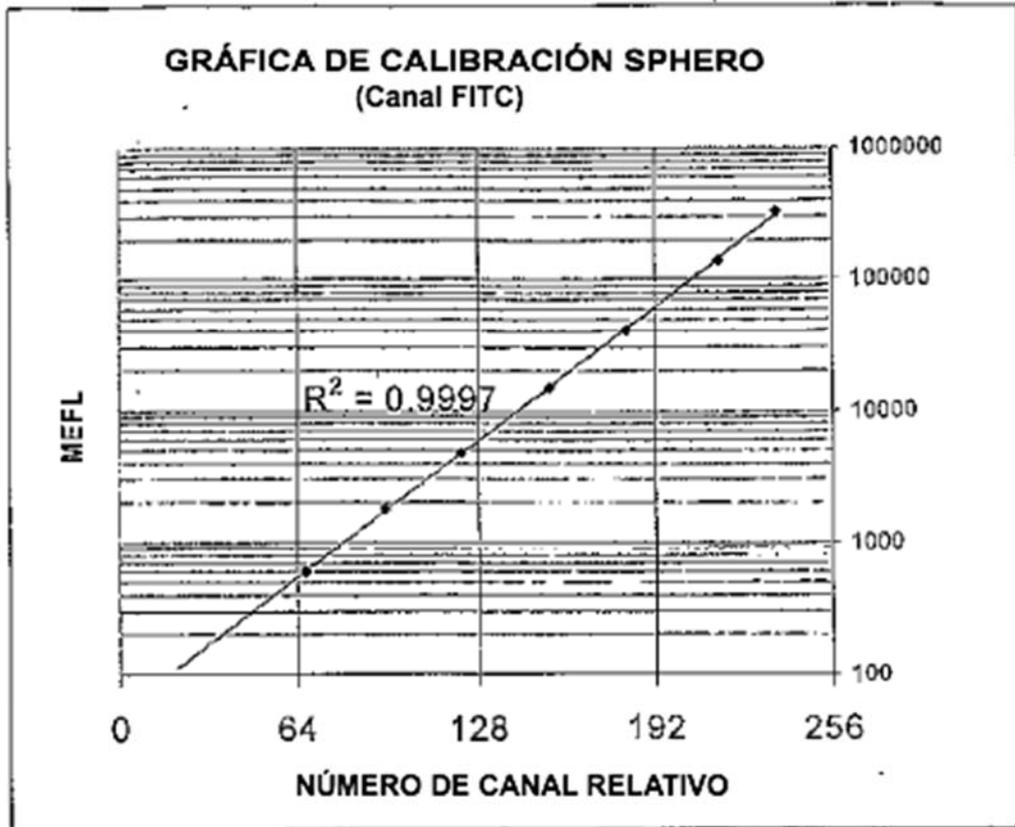
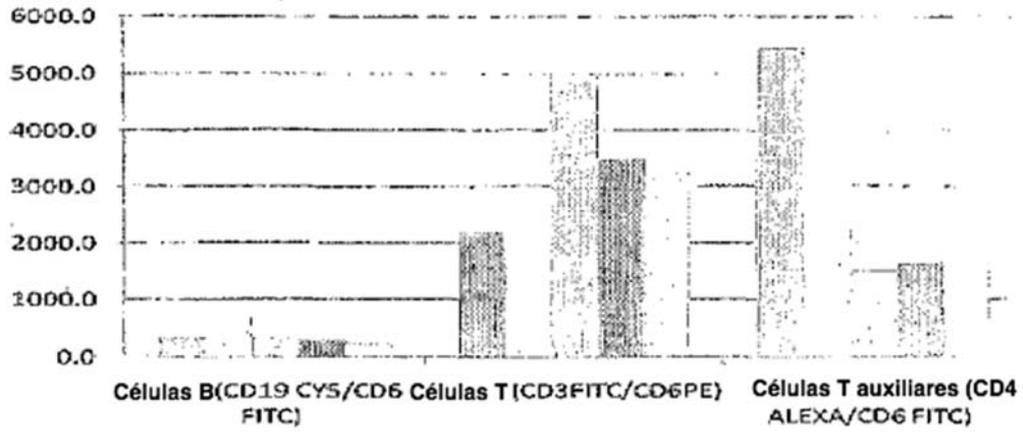


Figura 5

Receptores T1h en linfocitos T y B



	Células B (CD19 CYS/CD6 FITC)	Células T (CD3FITC/CD6PE)	Células T auxiliares (CD4 ALEXA/CD6 FITC)
v1	320.0	2174.0	5439.8
v2	762.1	2739.0	4910.0
v3	340.0	4962.2	1505.4
v4	280.6	3483.4	1631.7
v5	257.9	3230.4	1686.3

V1 – V5 SON DONANTES NORMALES

Figura 6

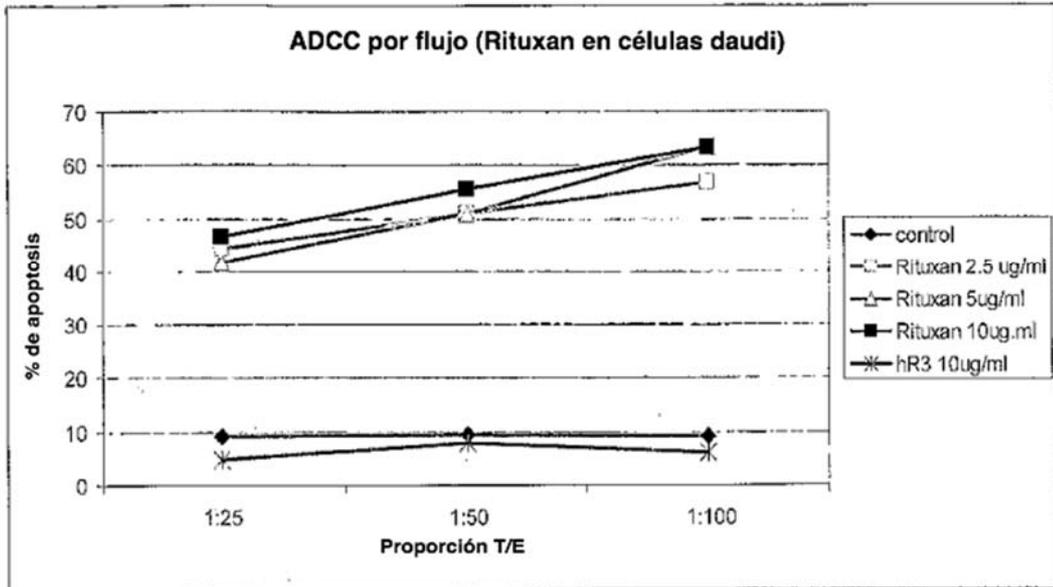


Figura 7

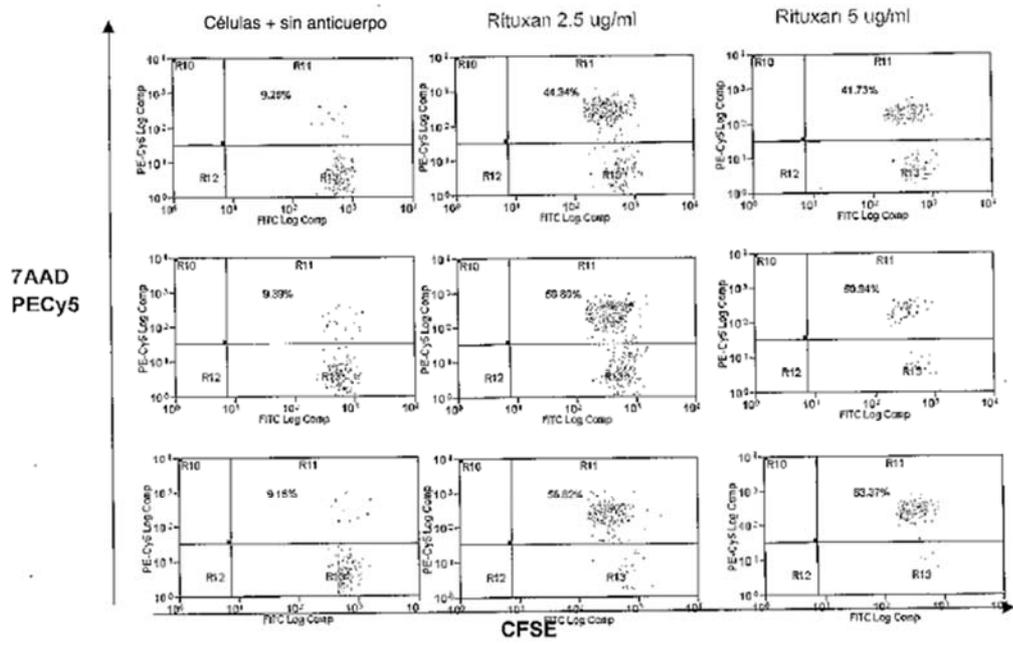


Figura 8

ADCC sin células HUT 78 (5ug/ml)

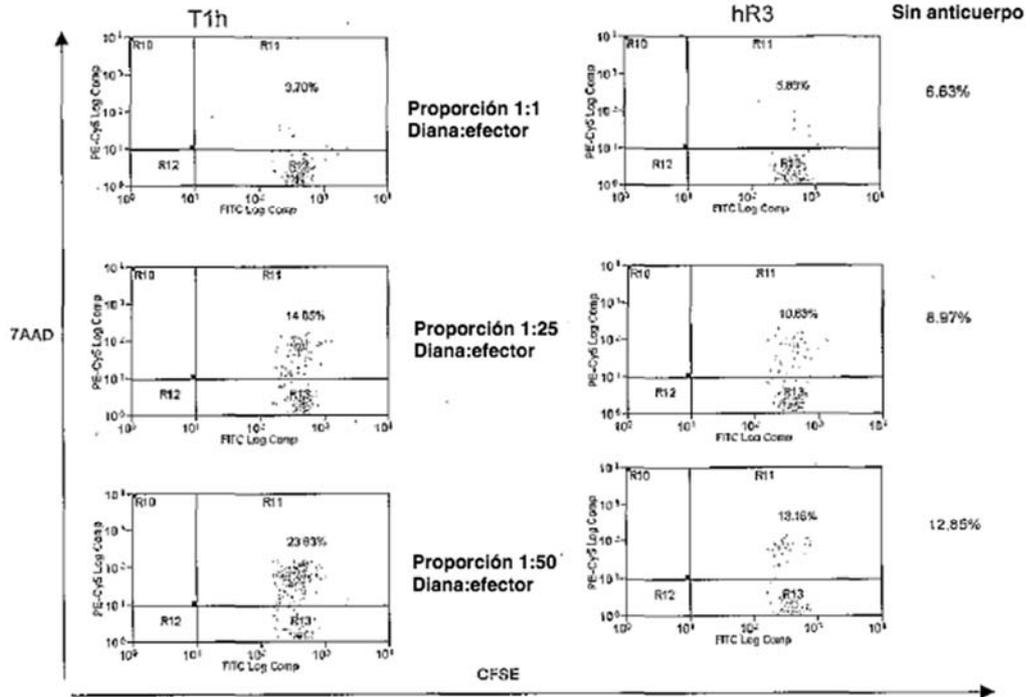


Figura 9

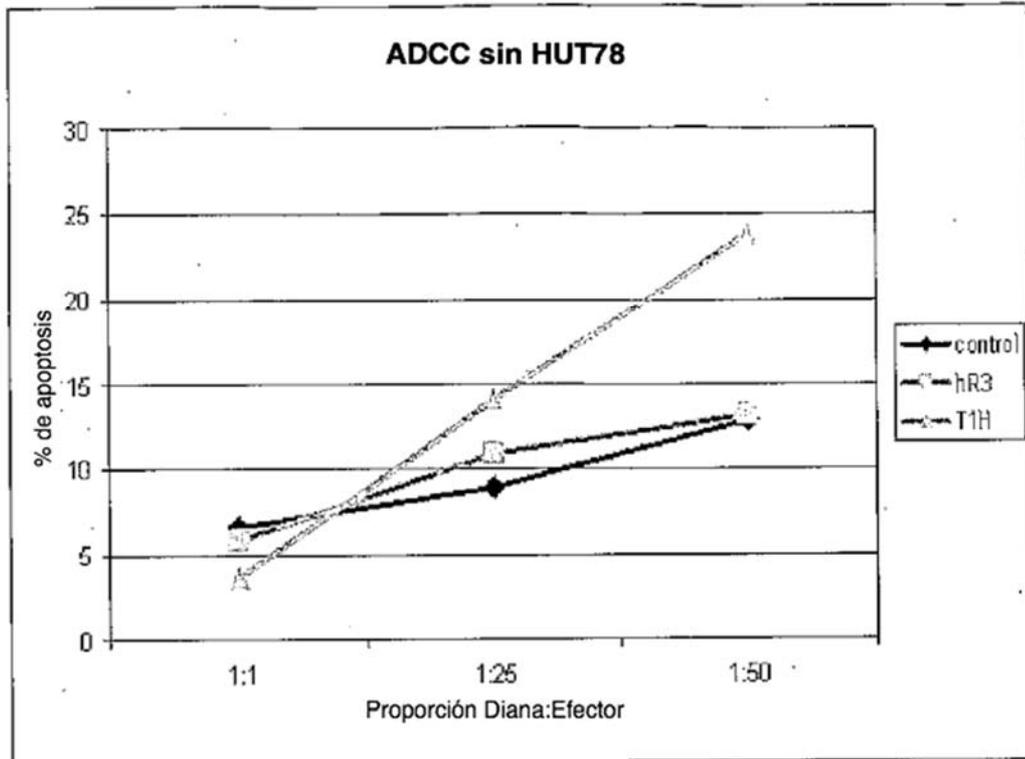


Figura 10

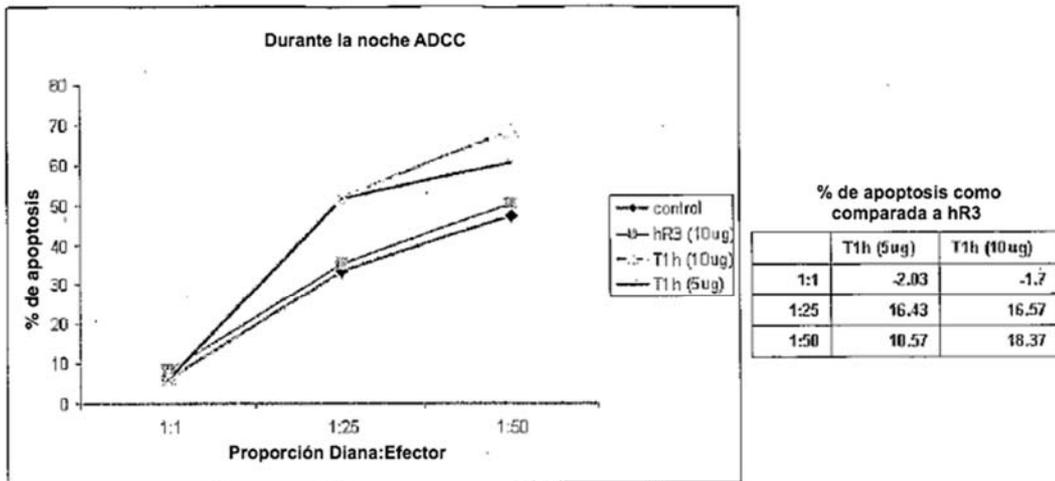


Figura 11

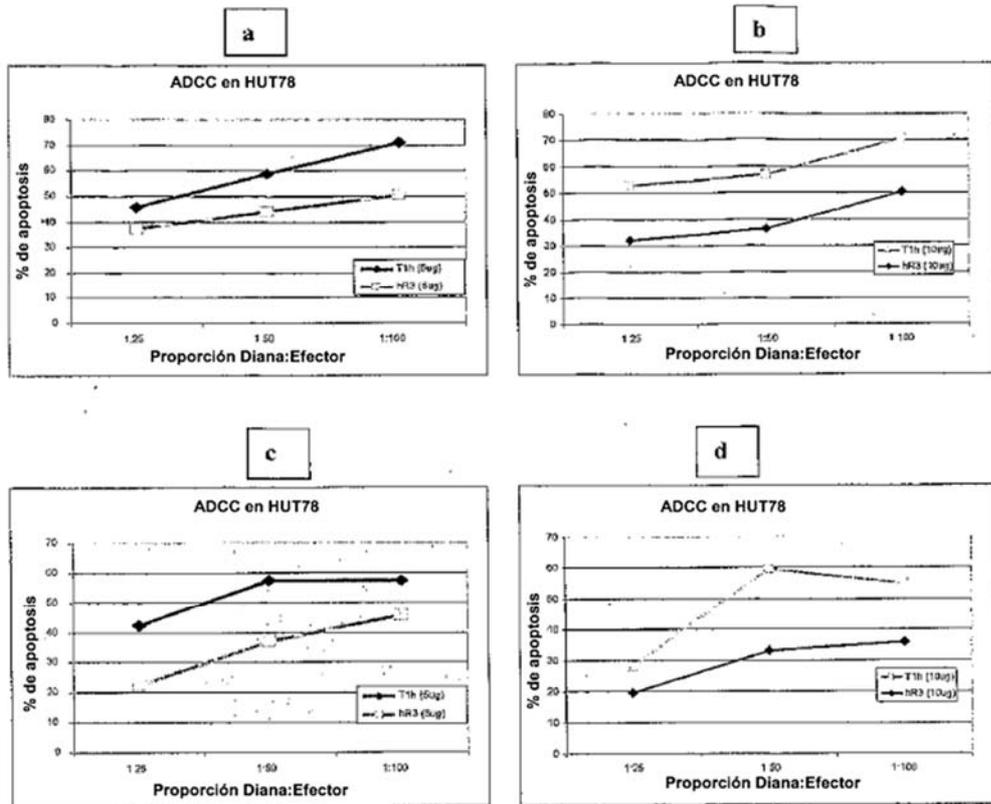


Figura 12

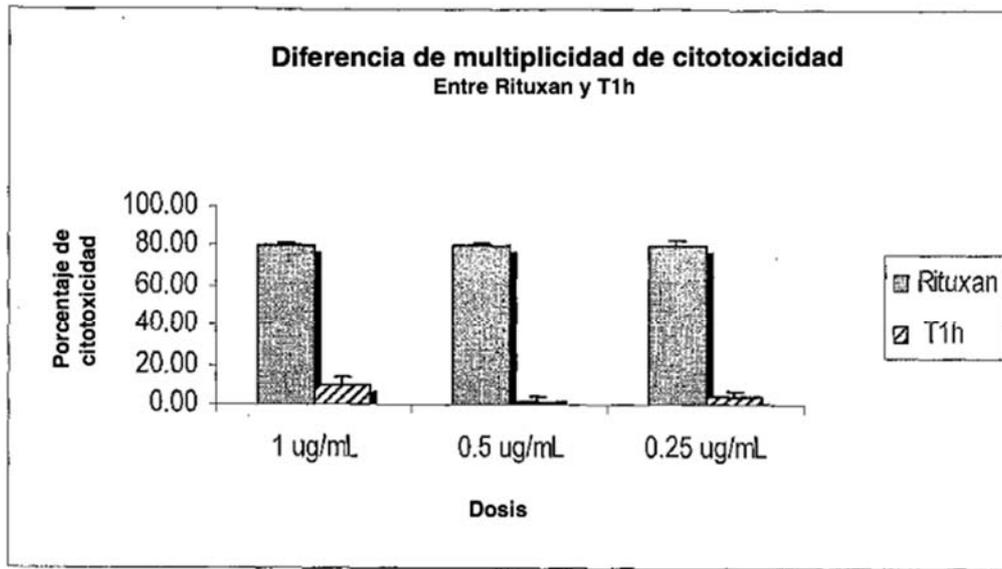


Figura 13

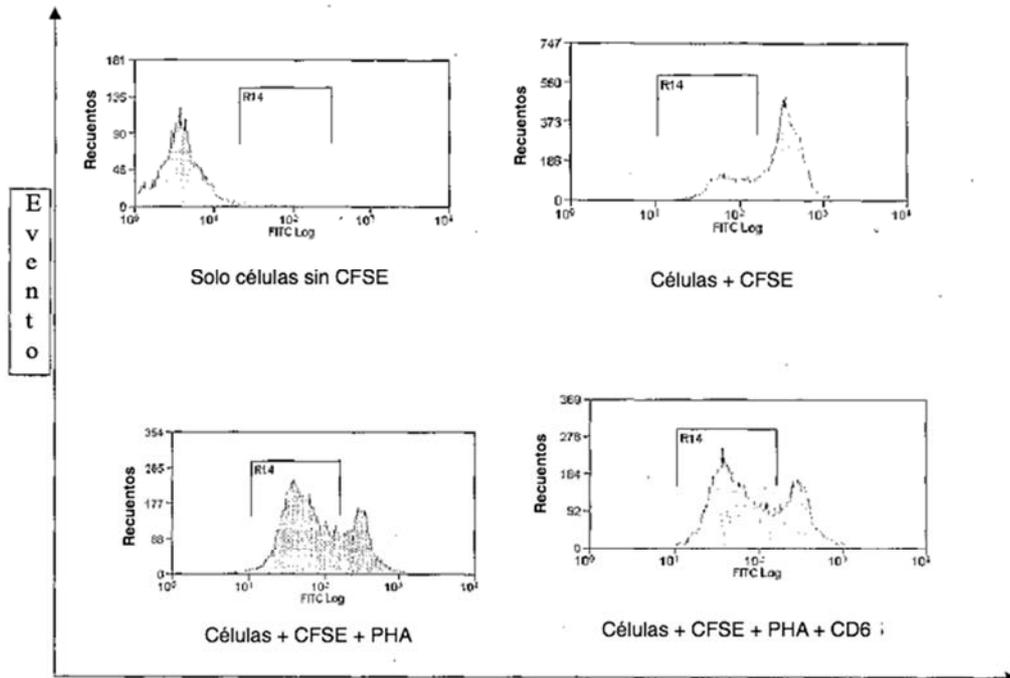


Figura 14

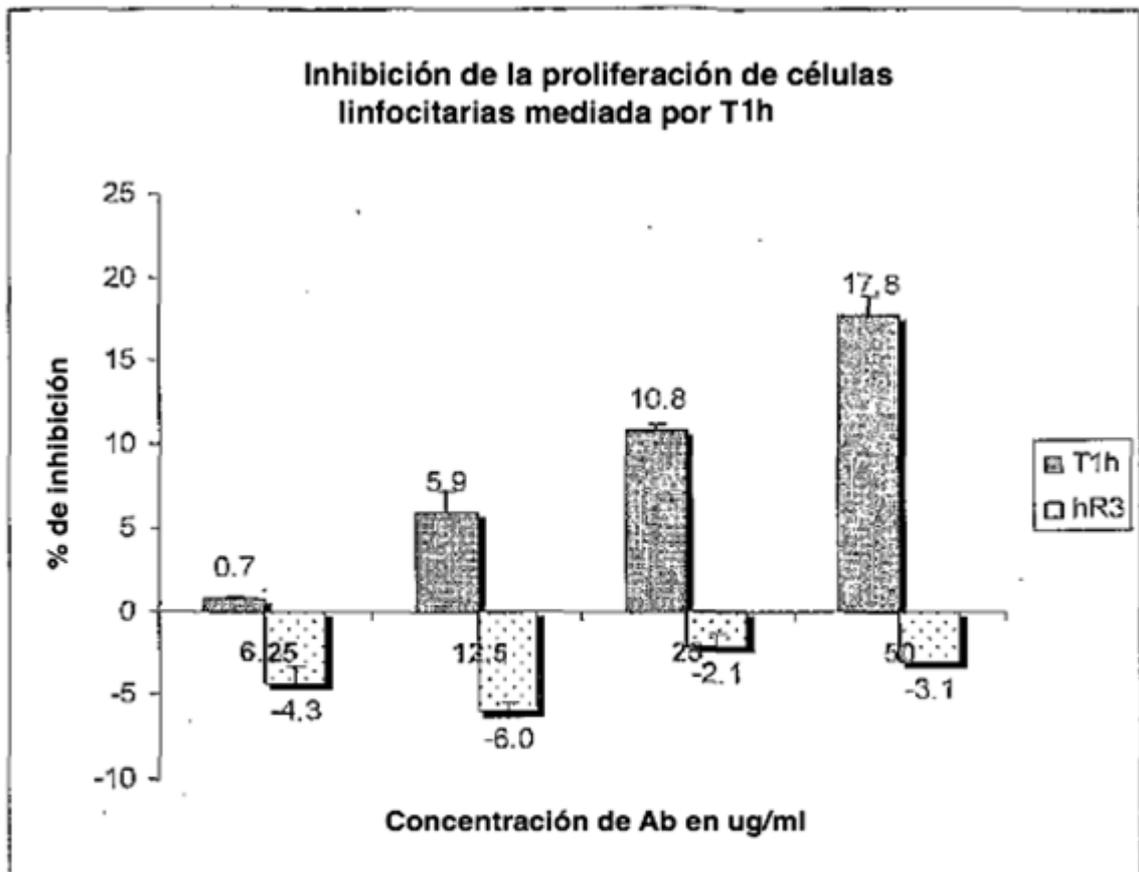


Figura 15

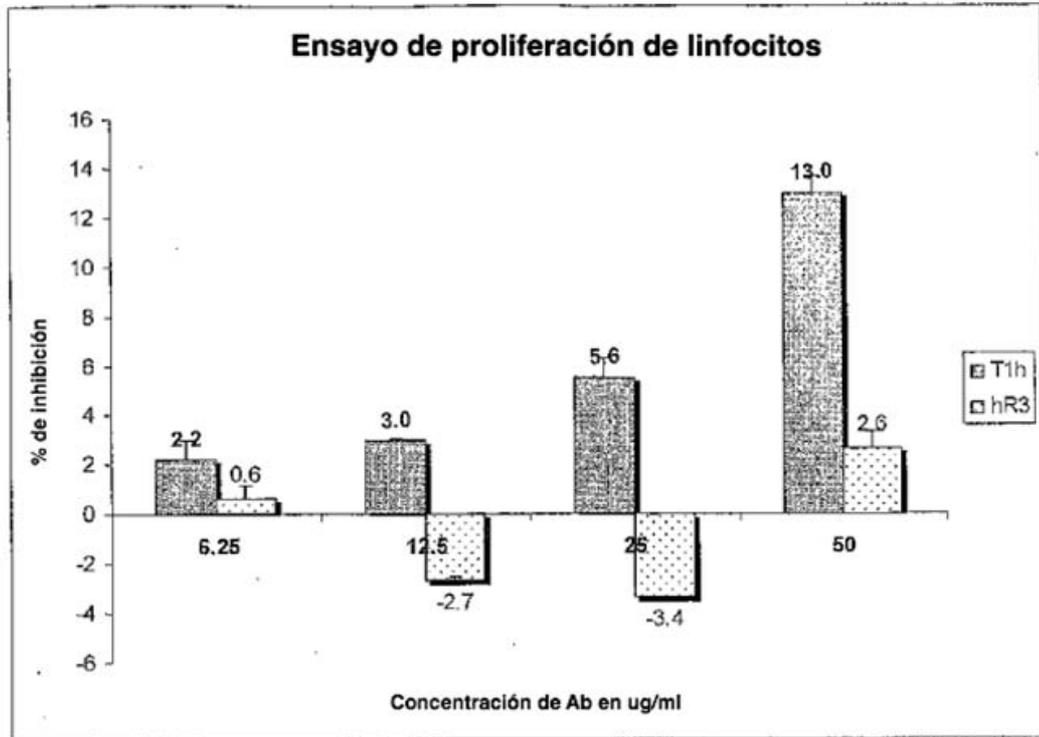
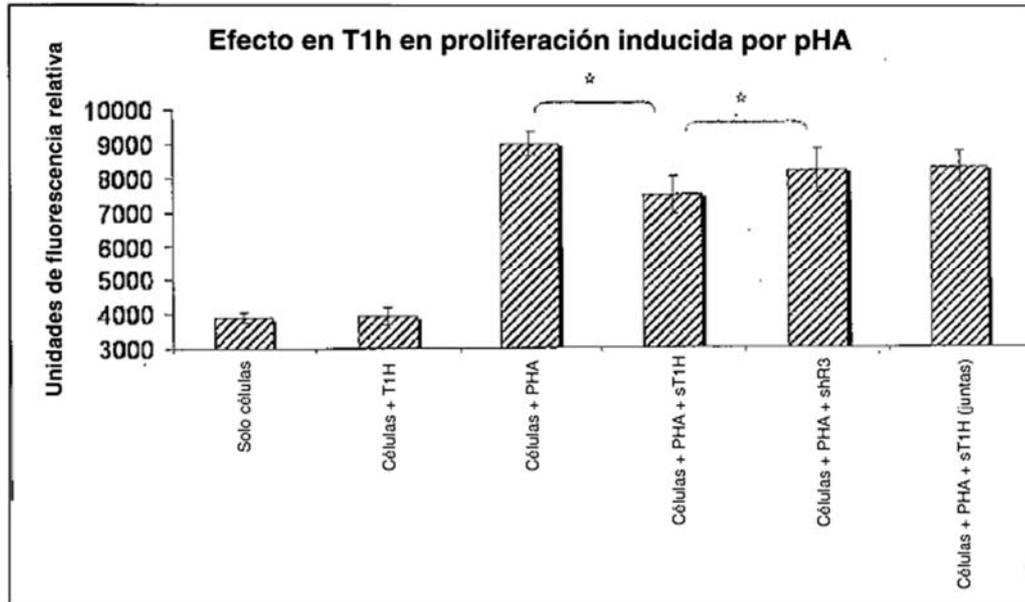


Figura 16



	medio/sT1h	sT1h/shR3
Tprueba	0.0023	0.0225

Figura 17

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CD 3 1ug/ml	CD 3 1ug/ml	CD 3 1ug/ml	CD 3 1ug/ml	CD 3 1ug/ml + T1h	CD 3 1ug/ml + T1h	CD 3 1ug/ml + T1h	CD 3 1ug/ml + T1h	CD 3 1ug/ml + Alcam	CD 3 1ug/ml + Alcam	CD 3 1ug/ml + Alcam	CD 3 1ug/ml + Alcam
B	CD 3 0.5ug/ml	CD 3 0.5ug/ml	CD 3 0.5ug/ml	CD 3 0.5ug/ml	CD 3 0.5ug/ml + T1h	CD 3 0.5ug/ml + T1h	CD 3 0.5ug/ml + T1h	CD 3 0.5ug/ml + T1h	CD 3 0.5ug/ml + alcam	CD 3 0.5ug/ml + alcam	CD 3 0.5ug/ml + alcam	CD 3 0.5ug/ml + alcam
C	CD 3 0.25ug/ml	CD 3 0.25ug/ml	CD 3 0.25ug/ml	CD 3 0.25ug/ml	CD 3 0.25ug/ml + T1h	CD 3 0.25ug/ml + T1h	CD 3 0.25ug/ml + T1h	CD 3 0.25ug/ml + T1h	CD 3 0.25ug/ml + Alcam	CD 3 0.25ug/ml + Alcam	CD 3 0.25ug/ml + Alcam	CD 3 0.25ug/ml + Alcam
D	CD 3 0.125ug/ml	CD 3 0.125ug/ml	CD 3 0.125ug/ml	CD 3 0.125ug/ml	CD 3 0.125ug/ml	CD 3 0.125ug/ml	CD 3 0.125ug/ml	CD 3 0.125ug/ml				
E	CD 3 0.625ug/ml + T1h	CD 3 0.625ug/ml + T1h	CD 3 0.625ug/ml + T1h	CD 3 0.625ug/ml + T1h	CD 3 0.625ug/ml + Alcam	CD 3 0.625ug/ml + Alcam	CD 3 0.625ug/ml + Alcam	CD 3 0.625ug/ml + Alcam				
F	Sin anticuerpo	Sin anticuerpo	Sin anticuerpo	T1h 1 ug/ml	T1h 1 ug/ml	T1h 1 ug/ml	hR3 1 ug/ml	hR3 1 ug/ml	hR3 1 ug/ml	hR3 1 ug/ml	hR3 1 ug/ml	hR3 1 ug/ml
G	Sin anticuerpo	Sin anticuerpo	Sin anticuerpo	T1h 1 ug/ml	T1h 1 ug/ml	T1h 1 ug/ml	hR3 1 ug/ml	hR3 1 ug/ml	hR3 1 ug/ml	hR3 1 ug/ml	hR3 1 ug/ml	hR3 1 ug/ml
H												

Figura 18

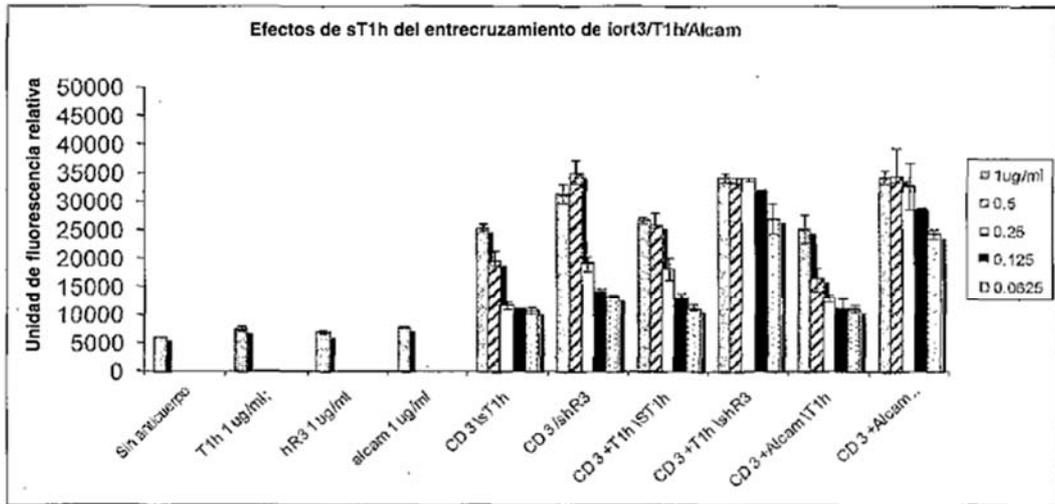
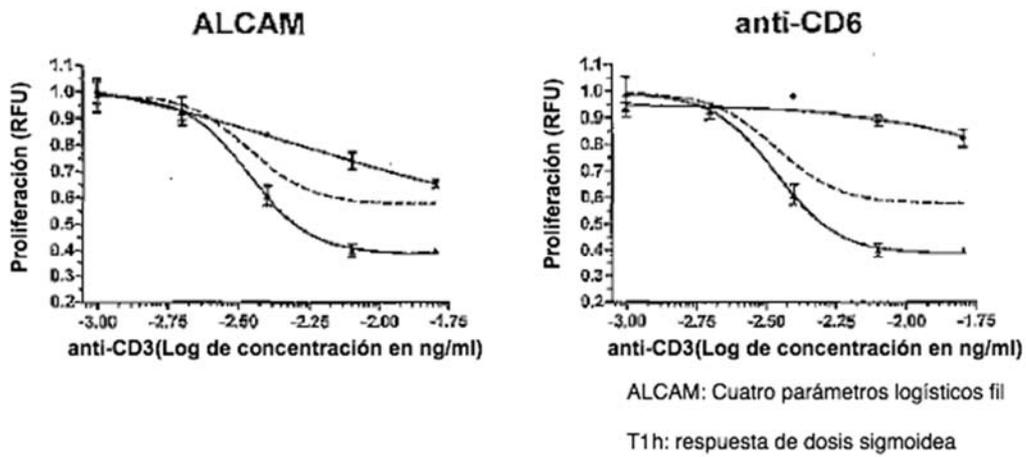


Figura 19



Control: hR3 (EGFR mAb anti-humano)

anti-CD6: T1h (CD6 mAb anti-humano)

Concentración: 10 µg/mL soluble y 1 µg/mL enlazado

RFU: Unidad de fluorescencia relativa (Azul Alamar)

Incubación: 5 días

Número de células: 30000 células/pozo

Modelo de adicción Bliss

-predice que la respuesta combinada C para dos compuestos individuales con efectos A y B es:

$$C = A + B - A \cdot B$$

donde cada efecto es expresado como una inhibición fraccionaria entre 0 y 1. Estos modelos de sinergia basados en efectos no hacen suposiciones sobre la forma funcional de las curvas de dosis-respuesta, y no requieren información de dosis-respuesta que esté fuera del rango muestreado por cada matriz de cribado.

Figura 20

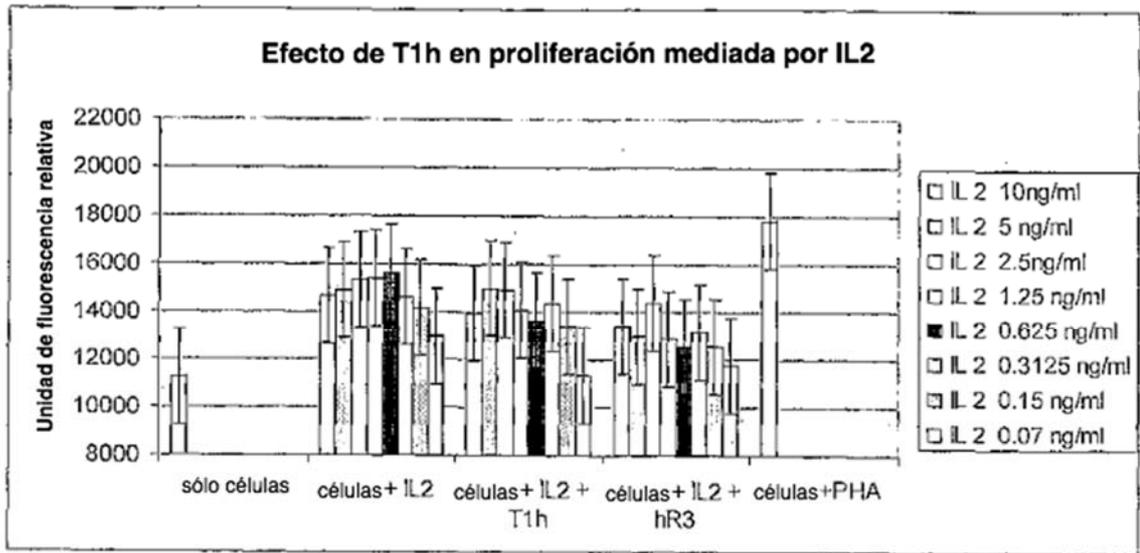


Figura 21

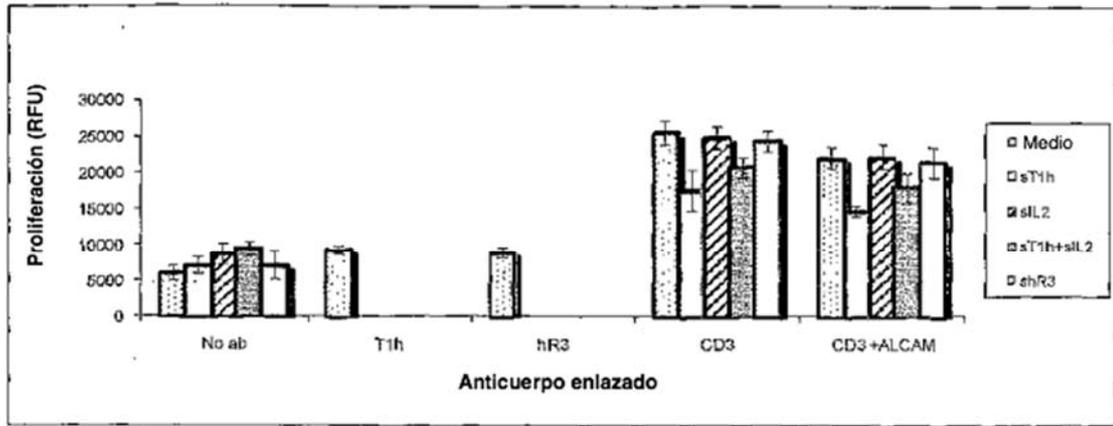


Figura 22

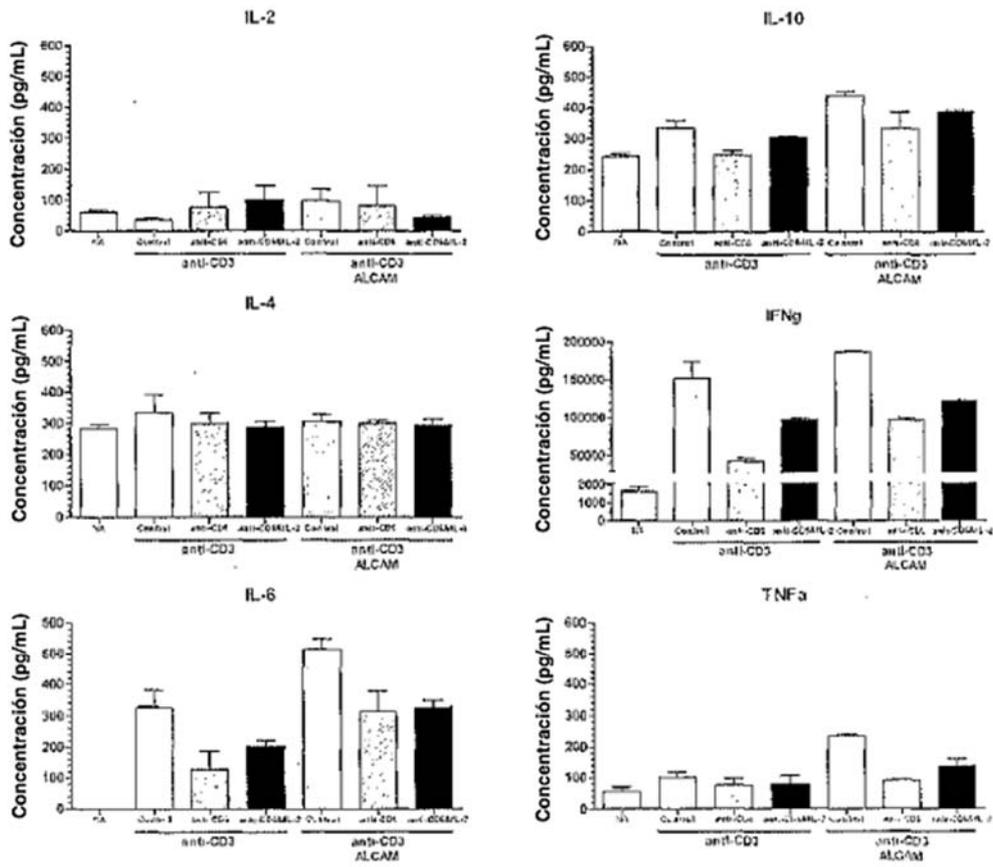


Figura 23

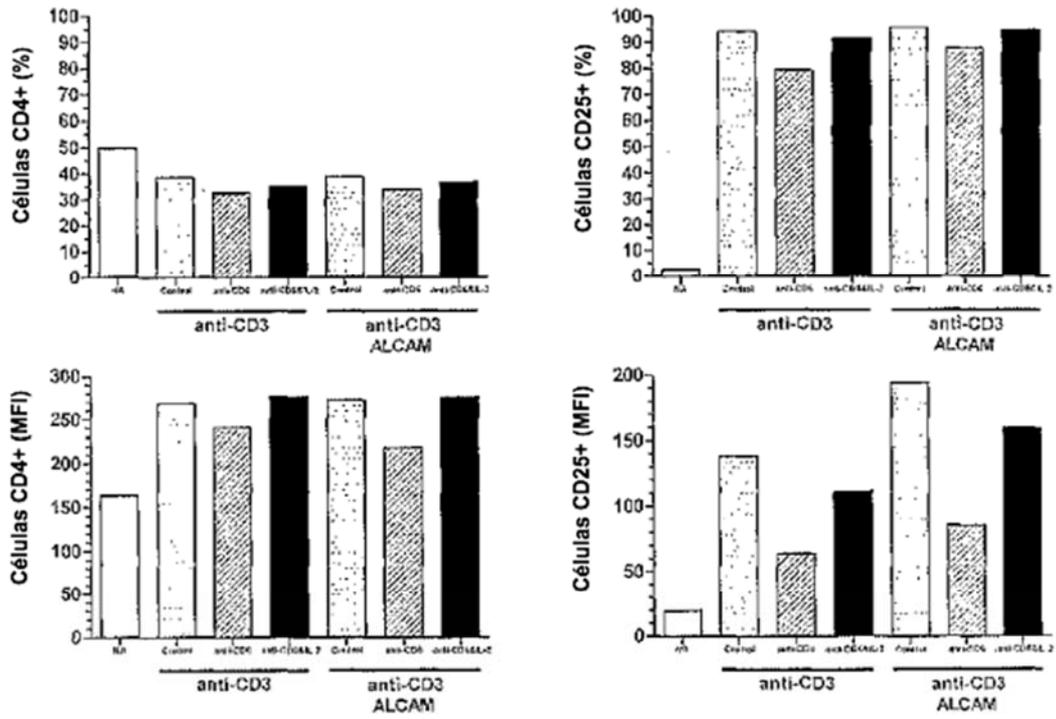


Figura 24

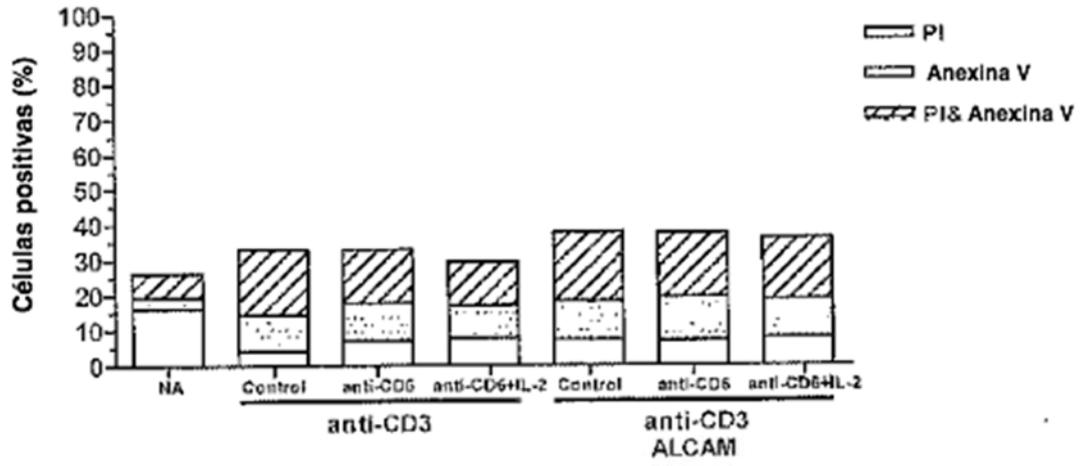


Figura 25

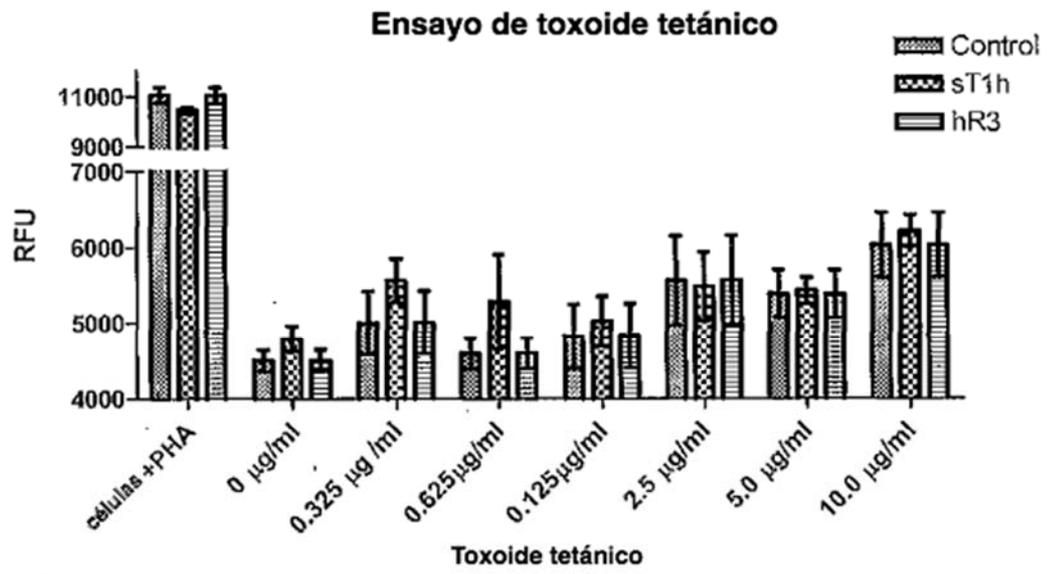


Figura 26

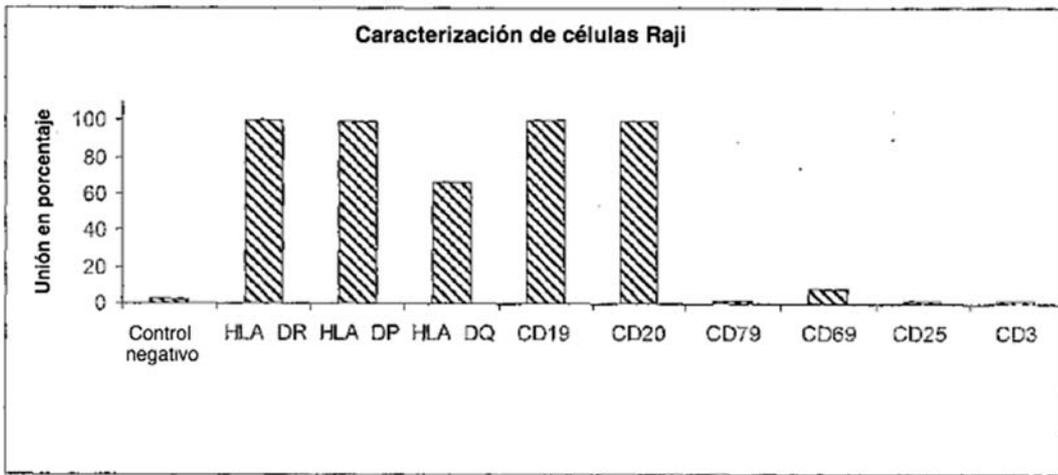


Figura 27

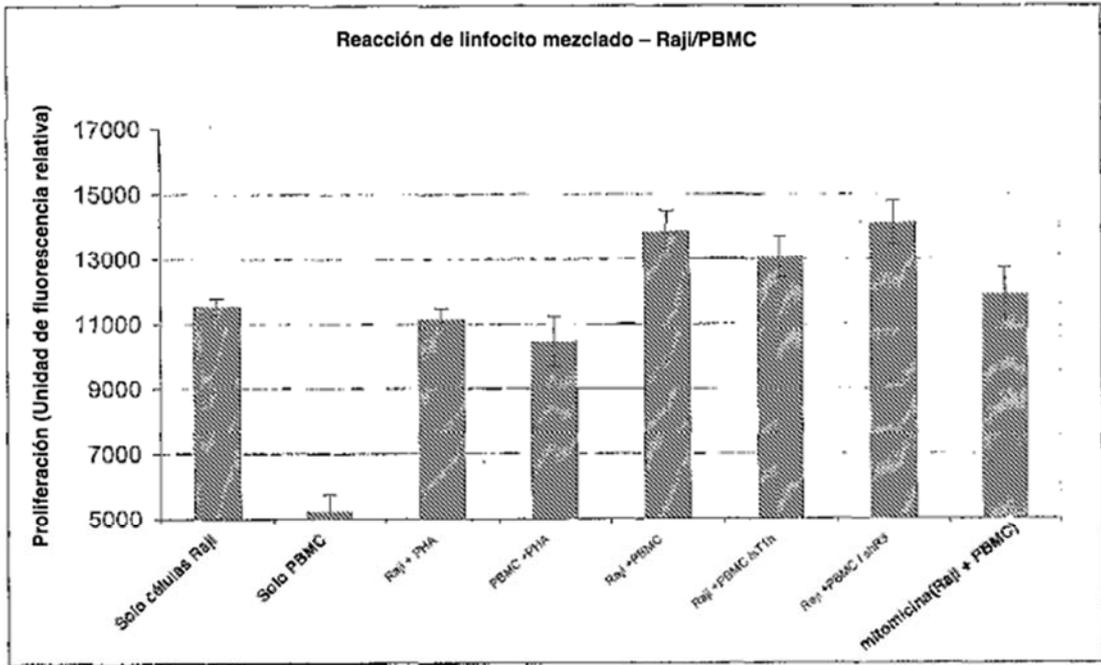


Figura 28

ES 2 759 075 T3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	PBL	PBL	PBL	PBL	PBL	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	
C	DC	DC	DC	DC	DC	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	
D	PBL(M)+ DC	PBL(M)+ DC	PBL(M)+ DC	PBL(M)+ DC	PBL(M)+ DC	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	
E	PBL+DC	PBL+DC	PBL+DC	PBL+DC	PBL+DC	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	
F	PBL+DC+ hR3 40	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+					
G	PBL+DC+ hR3 20	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+	PBL+DC+					
H												

Figura 29

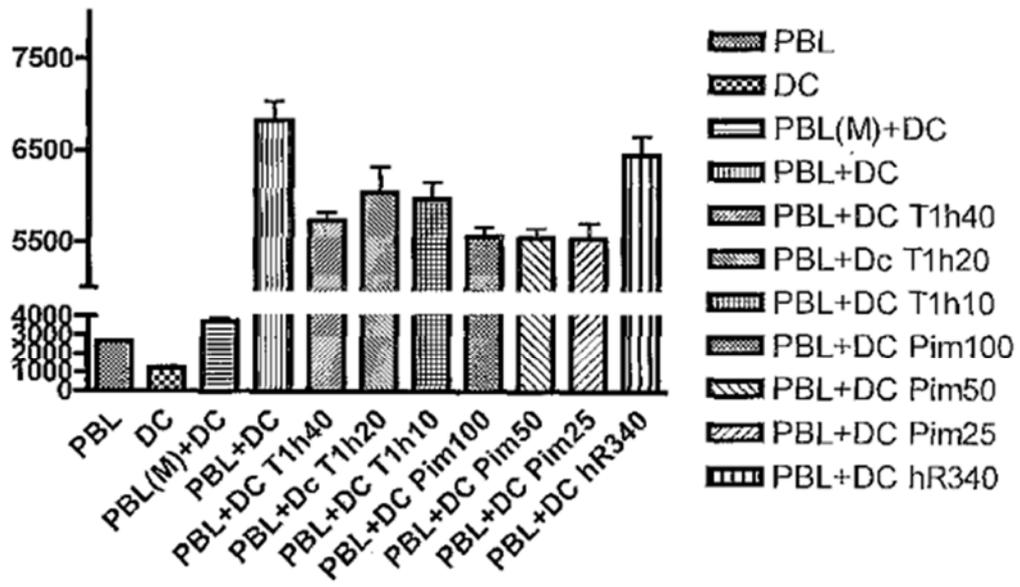


Figura 30

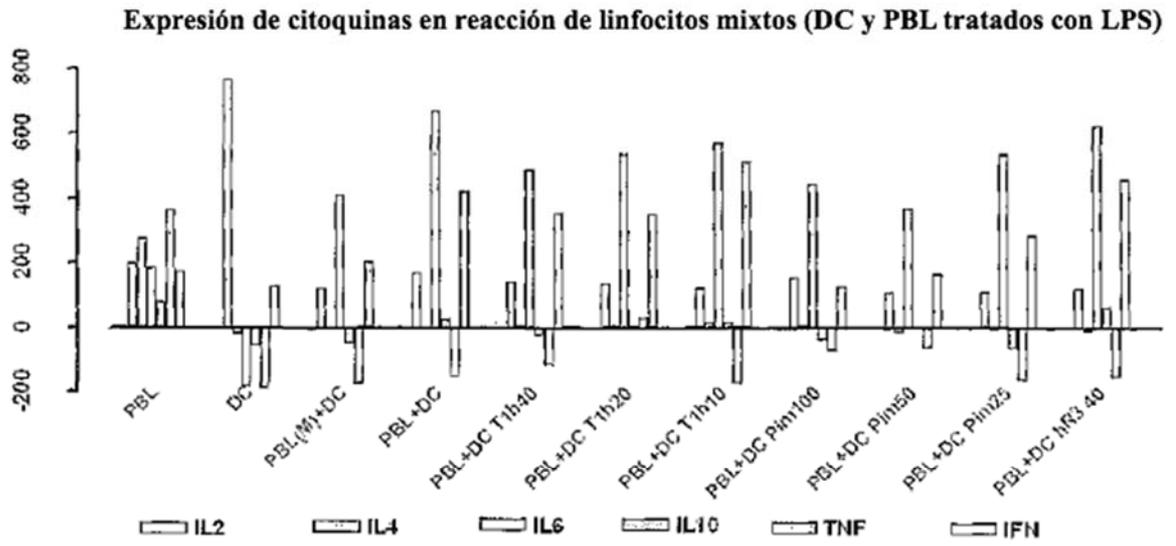


Figura 31