



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 327 523**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04721843 .3**
96 Fecha de presentación : **19.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1654286**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.05.2006**

54 Título: **Anticuerpo anti-CD4 humanizado con propiedades inmunosupresoras.**

30 Prioridad: **21.03.2003 EP 03290725**
16.04.2003 EP 03290942

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.10.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.10.2009

73 Titular/es: **Biotest AG.**
Landsteinerstrasse 5
D-63303 Dreieich, DE

72 Inventor/es: **Wijdenes, John y**
Jonuleit, Helmut

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti-CD4 humanizado con propiedades inmunosupresoras.

La invención se refiere a un anticuerpo anti-CD4 humanizado y a su uso para inmunomodulación.

Las enfermedades autoinmunes así como el rechazo de injertos se producen por una respuesta inmune inapropiada a antígenos tisulares: auto-antígenos en el primer caso y antígenos contra aloinjerto en el segundo.

Las enfermedades autoinmunes incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, dermatitis atópica, etc.

Los tratamientos convencionales para estos trastornos inmunológicos implican fármacos inmunosupresores. Sin embargo, estos fármacos inducen una inmunosupresión general; dando como resultado la inhibición no solamente de las funciones lesivas del sistema inmune, sino también de las útiles. Como consecuencia, inducen efectos secundarios, tales como infecciones oportunistas.

Como una estrategia alternativa, se ha propuesto usar anticuerpos monoclonales (mAb) inmunosupresores contra moléculas de superficie celular, para eliminar subconjuntos específicos de linfocitos (anticuerpos destructores) o para inhibir la función de una molécula de superficie diana sin activar la célula que lleva la misma (anticuerpos no destructores).

Generalmente se reconoce que las células T CD4⁺ desempeñan una parte principal en el inicio y mantenimiento de autoinmunidad. En consecuencia, se ha propuesto usar mAb contra moléculas de superficie de células T CD4⁺ y, en particular, mAb anti-CD4 como agentes inmunosupresores. Aunque numerosos estudios clínicos han confirmado el potencial interés de esta estrategia, también han provocado varios aspectos a abordar para hacer que los mAb anti-CD4 sean más adecuados para el uso en la práctica clínica rutinaria.

A modo de ejemplo, el anticuerpo B-F5 (IgG1 murina anti-CD4 humano) se ensayó en diferentes enfermedades autoinmunes:

- en pacientes con artritis reumatoide, varios estudios abiertos sugirieron un efecto clínico positivo de B-F5 a una dosis diaria de al menos 20 mg (Racadot *et al.* Clin Exp Rheumatol 10(4): 365-74; 1992; Wendling *et al.*, Clin Rheumatol, 11(4): 542-7, 1992). Sin embargo, los resultados observados en un experimento controlado con placebo con una dosis diaria de 20 mg durante 10 días no mostraron ninguna mejora significativa (Wendling *et al.* J. Rheumatol; 25(8): 1457-61, 1998).
- en psoriasis, se observó una mejora en lesiones psoriáticas después de un tratamiento a una dosis de 0,2 mg/kg/día a 0,8 mg/kg/día durante 7 u 8 días (Morel *et al.*, J Autoimmun., 5(4): 465-77, 1992);
- en pacientes con esclerosis múltiple (MS) se observaron algunos efectos positivos después de un tratamiento de 10 días en pacientes con formas recidivantes-remitentes, algunas de los cuales estaban libres de recidivas al 6º mes post-terapia (Racadot *et al.*, J Autoimmun 6(6): 771-86, 1993); se observaron efectos similares por Rumbach *et al.* (Mult Soler; 1(4): 207-12, 1996);
- en enfermedad de Crohn grave, no se observó mejora significativa en pacientes que recibieron B-F5 a una dosis de 0,5 mg/día/kg durante 7 días consecutivos o de 0,5 mg/día/kg el primer día (día 0) y de 1 mg/día/kg los días 1-6 (Canva-Delcambre *et al.*, Aliment Pharmacol Ther 10(5): 721-7, 1996);
- en la prevención de rechazo de aloinjerto se describió una modificación de los parámetros biológicos, que indicaban una acción de B-F5 *in vivo* a una dosis de 30 mg/día. Sin embargo, se describió que la biodisponibilidad de B-F5 no era suficiente para permitir su uso para profilaxis de rechazo de aloinjerto (Dantal *et al.*, Transplantation, 27; 62(10); 1502-6, 1996).

Parece a partir de lo anterior que un primer aspecto a resolver es la necesidad de usar altas dosis de mAb para obtener una mejora clínica. Esto se puede producir, entre otras cosas, por la mala accesibilidad al mAb por los linfocitos en los tejidos diana. El uso de mayores dosis puede dar como resultado una acción excesiva sobre linfocitos sanguíneos, que inducen efectos secundarios indeseados.

Otra desventaja de la terapia con anticuerpos monoclonales en seres humanos es que estos anticuerpos generalmente se obtienen de células de ratón y provocan respuestas anti-ratón en los destinatarios humanos. Esto no solamente da como resultado una menor eficacia del tratamiento e incluso más de cualquier tratamiento futuro con anticuerpos monoclonales de ratón, sino también un riesgo aumentado de anafilaxia.

En principio, esta desventaja se puede evitar mediante el uso de anticuerpos humanizados, obtenidos injertando las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo monoclonal de ratón, que determina la especificidad de unión a antígeno, en las regiones flanqueantes (FR) de una molécula de inmunoglobulina humana.

El objetivo de la humanización es obtener un anticuerpo recombinante que tenga las mismas propiedades de unión a antígeno que el anticuerpo monoclonal de ratón del que se han obtenido las secuencias de CDR y menos inmunógeno en seres humanos.

En algunos casos, la sustitución de las CDR humanas por las CDR del anticuerpo de ratón en regiones flanqueantes humanas es suficiente para transferir las propiedades de unión a antígeno (que incluyen no solamente la especificidad, sino también la afinidad por el antígeno). Sin embargo, en muchos anticuerpos, algunos restos de FR son importantes para la unión a antígeno, debido a que se ponen en contacto directamente con el antígeno en el complejo de anticuerpo-antígeno o debido a que influyen en la conformación de las CDR y, por tanto, en su rendimiento de unión a antígeno.

Por tanto, en la mayoría de los casos también es necesario sustituir los restos de FR correspondientes humanos por uno o varios restos flanqueantes del anticuerpo de ratón. Ya que el número de restos sustituidos tiene que ser tan pequeño como sea posible para evitar reacciones anti-ratón, el problema es determinar qué resto o restos aminoacídicos son críticos para conservar las propiedades de unión a antígeno. Se han propuesto diversos métodos para predecir los sitios más apropiados para la sustitución. Aunque proporcionan principios generales que pueden ser de cierta ayuda en las primeras etapas de humanización, el resultado final varía de un anticuerpo a otro. Por tanto, para un anticuerpo dado, es muy difícil predecir qué sustituciones proporcionarán el resultado deseado.

Sin embargo, los inventores han intentado la humanización de B-F5 de ratón y han tenido éxito produciendo B-F5 humanizado (denominado en lo sucesivo en este documento hB-F5) que tiene las mismas propiedades de unión a CD4 que el B-F5 de ratón parental.

Además, han observado, sorprendentemente, que hB-F5 tiene un efecto inmunosupresor óptimo *in vivo* a dosis bastante menores que las usadas previamente con B-F5 parental y que las usadas actualmente con otros anticuerpos monoclonales anti-CD4.

En realidad, los inventores han observado que hB-F5 proporcionaba una inmunosupresión eficaz, reflejada por un efecto clínico positivo en pacientes con artritis reumatoide, cuando se usó en un tratamiento de 10 días a una dosis de tan solo 1 mg/día y preferiblemente a una dosis de 5 mg cada dos días.

La presente invención proporciona un anticuerpo humanizado (hB-F5) obtenido de mAb B-F5 de ratón, donde dicho anticuerpo hB-F5 tiene dominios V definidos por las siguientes secuencias polipeptídicas:

- dominio V de cadena H:

EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQA
PGKGLEWIGVISVKSENYGANYAESVRGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCSAS YYRYDVGAWFAY-
WGQGTLLTVSS (SEC ID N°: 1)

- Dominio V de cadena L:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSIYWYQQ KPGQPPKLLIYLASILESGVPORFSGSGSGTOF-
TLTISSLQAEQVAVXYCQHSRELPTWTFG QGTKVEIK (SEC ID N°: 2),

que es capaz de activar un subconjunto particular de células CD4⁺ T, concretamente, células CD4⁺CD25⁺.

Generalmente, un anticuerpo hB-F5 de la invención comprende adicionalmente una región constante humana (Fc). Esta región constante se puede seleccionar entre dominios constantes de cualquier clase de inmunoglobulinas, que incluyen IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, que incluyen IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las regiones constantes preferidas se seleccionan entre dominios constantes de IgG, en particular, IgG1.

La presente invención también incluye cualquier fragmento de un anticuerpo hB-F5 que comprende las regiones V del mismo. Esto comprende en particular fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y scFv.

La invención también incluye un polinucleótido seleccionado entre:

- un polinucleótido que codifica un polipéptido de la SEC ID N°: 1;
- un polinucleótido que codifica un polipéptido de la SEC ID N°: 2.

Preferiblemente, dicho polinucleótido se selecciona entre:

- un polinucleótido de la SEC ID N°: 3;
- un polinucleótido de la SEC ID N°: 4.

Los polinucleótidos de la invención se pueden obtener de forma sencilla por los métodos bien conocidos de tecnología de ADN recombinante y/o síntesis química de ADN.

Un polinucleótido que codifica el dominio V de la cadena H o de la cadena L de un anticuerpo hB-F5 se puede fusionar con un polinucleótido que codifica la región constante de una cadena H o L humana, con el propósito de expresar las cadenas H y L completas obtenidas de este modo; también se puede añadir una secuencia que codifica un péptido señal que permite la secreción de la proteína. Estos polinucleótidos recombinantes también son parte de la invención.

La invención también proporciona casetes de expresión en los que un polinucleótido de la invención se une a secuencias de control apropiadas que permiten la regulación de su transcripción y traducción en una célula hospedadora seleccionada, y vectores recombinantes que comprenden un polinucleótido o un casete de expresión de la invención.

Estas construcciones de ADN recombinante se pueden obtener e introducir en células hospedadoras por las técnicas bien conocidas de ADN recombinante e ingeniería genética.

La invención también comprende una célula hospedadora, transformada por un polinucleótido de la invención.

Las células hospedadoras útiles dentro del marco de la presente invención pueden ser células procariotas o eucariotas. Entre las células eucariotas adecuadas se mencionarán, a modo de ejemplo, células vegetales, células de levaduras tales como *Saccharomyces*, células de insecto tales como *Drosophila* o *Spodoptera* y células de mamífero tales como HeLa, CHO, 3T3, C127, BHK, COS, etc.

La construcción de vectores de expresión de la invención y la transformación de células hospedadoras se puede realizar por las técnicas convencionales de biología molecular.

Se puede obtener un anticuerpo hB-F5 de la invención cultivando una célula hospedadora que contiene un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo, en condiciones adecuadas para la expresión de la misma, y recuperando dicho anticuerpo del cultivo de célula hospedadora.

La presente invención también comprende una composición terapéutica que comprende un anticuerpo hB-F5 de la invención o un fragmento del mismo, como se ha definido anteriormente.

Preferiblemente, dicha composición es una composición para administración parenteral, formulada para permitir la administración de una dosis de 0,1 a 10 mg, ventajosamente de 1 a 5 mg de hB-F5.

Más específicamente, la invención incluye el uso de un anticuerpo hB-F5 de la invención o un fragmento del mismo, para preparar una composición inmunosupresora. Dicha composición inmunosupresora es útil en particular para el tratamiento o la prevención de enfermedades tales como rechazo de injerto, reacción de injerto contra hospedador o reacción de hospedador contra injerto o enfermedades autoinmunes que incluyen, por ejemplo, miocarditis, diabetes melitus, psoriasis, lupus eritematoso, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, etc.

Además, los inventores han observado que hB-F5 era capaz de activar un subconjunto particular de células T CD4⁺, concretamente, células CD4⁺CD25⁺.

Las células T reguladoras CD25⁺CD4⁺ (células Treg) constituyen el 5-10% de las células T CD4⁺ periféricas. Se describieron por primera vez en 1995 por Sakaguchi *et al.* (J. Immunol., 155: 1151-1164) como células reguladoras en ratones. Cuando están activadas, estas células son capaces de suprimir la activación y proliferación de células T tanto CD4⁺ como CD8⁺. Más adelante, también se han encontrado células T supresoras CD25⁺CD4⁺ en seres humanos (Jonuleit *et al.*, J. Exp. Med. 193, 1285-1294, 2001; Levings *et al.*, J. Exp. Med. 193, 1295-1302, 2001; Dieckmann *et al.*, J. Exp. Med. 193, 1303-1310 2001). Se han publicado numerosos artículos que describen el papel inmunosupresor de estas células en diferentes modelos de enfermedad autoinmune y en sistemas *in vitro* (para una revisión, véase, por ejemplo, Shevach, J. Exp. Med., 193, 11, 41-46, 2001). También se ha demostrado que las células Treg CD4⁺CD25⁺ activadas *ex vivo* son eficaces en la prevención de la enfermedad de injerto contra hospedador (Taylor *et al.*, Blood, 99, 3493-3499, 2002; Cohen *et al.*, J. Exp. Med. 196, 401-406, 2002; Hoffmann *et al.*, J. Exp. Med. 196, 389-399, 2002). Por tanto, la proporción de medios para la activación de células Treg CD4⁺CD25⁺ es de gran interés.

La invención también se refiere al uso del anticuerpo hB-F5 de la invención o del anticuerpo parental B-F5, para activar células T reguladoras CD25⁺CD4⁺ *in vitro*.

Preferiblemente, el anticuerpo hB-F5 de la invención se añade a las células T reguladoras CD25⁺CD4⁺ a una concentración de 1 µg/ml de 10 µg/ml.

La presente invención se ilustrará adicionalmente por la siguiente descripción adicional, que se refiere a ejemplos que ilustran las propiedades de anticuerpos hB-F5 de la invención. Sin embargo, se debe entender que estos ejemplos solamente se proporcionan a modo de ilustración de la invención y no constituyen de ningún modo una limitación de la misma.

Ejemplo 1

*Construcción de B-F5 humanizado*5 *Diseño de Regiones V_H y V_K de B-F5 Humanizado*

Las secuencias de ADN que codifican regiones V_H y V_K de B-F5 de ratón se muestran respectivamente en la Figura 1 y la Figura 2 y bajo los identificadores de secuencia SEC ID N°: 5 y SEC ID N°: 6. La V_H y V_K humana sobre las que se injertaron las CDR de ratón se seleccionaron buscando en bases de datos V_H humanas más parecidas a las V_H y V_K de B-F5 original de ratón. La región V_H de un anticuerpo humano (M26; Número de Acceso A36006) tenía la mayor homología con V_H de B-F5. La región V_K de otro anticuerpo humano (FK-001; NAKATANI *et al.*, Biotechnology, 7 (1989), 805-810)) tenía la mayor homología con V_K de B-F5.

Se construyeron dos tipos de V_K que diferían entre los mismos por que el 4° resto era Leucina o Metionina y se denominaron L4L y L4M. Se construyeron dos tipos de V_H que diferían entre los mismos por que el 37° resto aminoacídico era Leucina o Valina y se denominaron H37L y H37V. El alineamiento de las secuencias polipeptídicas de B-F5, FK-001, L4L y L4M se muestra en la Figura 3. El alineamiento de las secuencias polipeptídicas de B-F5, M26, H37L y H37V se muestra en la Figura 4. Los restos de FR de los que se ha descrito previamente que son importantes para el empaquetamiento de las CDR (Chothia *et al.*, Nature, 342(1989), 8777; Foote *et al.*, J. Mol. Biol., 224(1992), 487) están encuadrados.

Combinando estas V_H y V_K se diseñaron 4 versiones de regiones V.

25 *Expresión de B-F5 humanizado*

Las etapas posteriores para la producción de B-F5 humanizado fueron las mismas que las descritas en la Patente de Estados Unidos N° 5.886.152 para B-B10 humanizado.

En resumen, se construyeron por separado plásmidos de expresión para la cadena H (región humanizada de V_H fusionada con la región constante de una cadena γ -1 humana (TAKAHASHI *et al.*, Cell, 29 (1982), 671-679)) y la cadena L (región humanizada de V_K fusionada con la región constante de la cadena κ de FK-001) de B-F5 humanizado. En estos plásmidos, la expresión de B-F5 humanizado se dirige por el promotor/potenciador del gen de IgM monoclonal humana, FK-001. Las Figuras 5 y 6 muestran respectivamente los fragmentos de los plásmidos que codifican las regiones V_H y V_K de BF-5 humanizado. Las secuencias que codifican la región V están subrayadas y las secuencias polipeptídicas correspondientes se indican sobre la secuencia de nucleótidos. Ambos plásmidos y pSV2neo se introdujeron simultáneamente en Sp2/0 de mieloma de ratón (ATCC CRL-1581) usando Lipofectin™. Los transfectomas que producían IgG humana se seleccionaron por ELISA, usando un anticuerpo anti-IgG humana (cadena γ) y un anticuerpo anti-cadena κ de Ig humana.

Ejemplo 2

*Caracterización de las diferentes versiones de B-F5 humanizado*45 *Estimación de la actividad de unión a CD4*

Se recogieron y concentraron los sobrenadantes de cultivo de transfectomas que producían las cuatro versiones de hB-F5. Los diferentes anticuerpos se purificaron de los sobrenadantes del cultivo por cromatografía de afinidad usando proteína A Sepharose y se evaluaron para su actividad de unión a CD4 por medición, mediante ELISA competitivo, de sus actividades inhibitoras frente a la unión de mB-F5 biotinilado a CD4 soluble aplicado como recubrimiento sobre placas de microtitulación. El tiempo de incubación es de 2 horas a 37°C y durante una noche a 4°C.

Las actividades relativas de unión de los hB-F5 (la actividad de unión de mB-F5 se tomó como el 100%) se muestran en la siguiente Tabla I.

60

65

TABLA I

Anticuerpo	Temp (°C)	Actividad relativa de unión (% de mB-F5)
H37L/L4L	4	80
	37	30
H37L/L4M	4	80
	37	30
H37V/L4L	4	10-20
	37	10
H37V/L4M	4	10-20
	37	10

A partir de los resultados mostrados en la Tabla I, parece que el 37° resto de V_H, Leucina, es crítico para mantener la actividad de unión a CD4 de hB-F5 debido a que la actividad de unión a CD4 se reduce varias veces por conversión de ³⁷Leu a ³⁷Val. Por el contrario, se observa que el 4° resto de V_K no es tan importante para la actividad de unión a CD4. Ya que la diferencia estructural entre ³⁷Leu y ³⁷Val de V_H no está demostrada claramente por modelado molecular, la superioridad de H37L con respecto a H37V en la actividad de unión a CD4 fue inesperada.

Se seleccionaron H37L/L4L y H37L/L4M para evaluar las actividades biológicas *in vitro*.

Investigación de las actividades biológicas in vitro de B-F5 humanizado

Se evaluaron las actividades biológicas *in vitro* de B-F5 de ratón y B-F5 humanizados (H37L/L4M IgG1 y H37L/L4L IgG1). También se ensayaron los B-F5 humanizados de tipo IgG2 (H37L/L4M IgG2 y H37L/L4L IgG2).

Se evaluaron las actividades biológicas *in vitro* de mB-F5 y los cuatro tipos de hB-F5 usando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos. Las PBMC se activaron por ConA (2,5 µg/ml, 3 días) o PPD (10 µg/ml, 4 días) en presencia de B-F5 murinos o hB-F5 y se controlaron para sus respuestas proliferativas por incorporación de ³H-timidina.

Los resultados se muestran en las Figuras 7 y 8. Los B-F5 murinos y hB-F5 podrían inhibir de forma moderada la proliferación inducida por ConA, pero las actividades variaron de anticuerpo a anticuerpo y/o de donante a donante (Figura 7). Además, los B-F5 murinos y hB-F5 eran capaces de inhibir la proliferación de PBMC específica de Ag inducida por PPD (Figura 8).

El tipo IgG1 de hB-F5 inhibió la proliferación inducida por PPD de forma más eficaz (hasta el 70% de inhibición, Figura 7 y 8) que el mB-F5. El tipo de IgG1 parecía ser más eficaz que el tipo de IgG2, del cual la actividad inhibidora era prácticamente la misma que mB-F5. Para el tipo IgG1, H37L/L4M fue más eficaz que H37L/L4L. El tipo de IgG2 de H37L/L4M y H37L/L4L tenía prácticamente las mismas actividades inhibidoras. Brevemente, las actividades inhibidoras de B-F5 frente a la proliferación de PBMC inducida por PPD fueron las siguientes: H37L/L4M IgG1 > H37L/L4L IgG1 > H37L/L4M IgG2 = H37L/L4L IgG2 = mB-F5.

Considerando la eficacia de la actividad biológica *in vitro* y el menor número de aminoácidos de ratón, se seleccionó IgG1 de H37L/L4M para evaluación posterior.

Ejemplo 3

Reevaluación preliminar del efecto de hB-F5 sobre pacientes con artritis reumatoide (RA)

El efecto de hB-F5 (H37L/L4M IgG1) se ensayó en pacientes con RA.

ES 2 327 523 T3

Las condiciones del ensayo fueron las siguientes:

Cada paciente recibió un tratamiento de 10 días que consistía en 5 inyecciones de 5 mg de hB-F5 (una inyección cada 2º día).

Los resultados para 3 pacientes diferentes se muestran en las siguientes Tablas II-IV:

Paciente 1 (Tabla II):

Diagnóstico: Artritis Reumatoide; Actividad 2

Factor Reumatoide: 2; Estadio: 2

Sexo: F; Edad: 65; Aparición de la enfermedad: 1965

Terapia adicional: Diclofenac 150 mg/día

TABLA II

Investigaciones clínicas		Antes del tratamiento	Durante el tratamiento (días)					Después del tratamiento (semanas) 4
			2	4	6	8	10	4
Estimación de dolor en articulaciones (0-10)		4,5	2	2	1,5	3	2,2	3,5
Rigidez matutina en minutos		360	0	0	90	90	120	20
Gravedad de la afección (1-5)	Médico Paciente	3	3	3	2,5	3	3	3
		3	3	3	3	3	3	3
Número de articulaciones hinchadas		6	6	4	3	2	2	7
Número de articulaciones doloridas		25	12	6	7	13	13	23

Investigaciones clínicas		Antes del tratamiento	Durante el tratamiento (días)					Después del tratamiento (semanas) 4
			2	4	6	8	10	
Índice de hinchamiento (0-30)		8	6	4		2	3	9
Potencia en mano	Derecha	17	15	20	22	12	20	15
	Izquierda	10	10	10	15	12	19	12
Estimación de cansancio (0-10)		7,7	4	2,3	2	2,3	3,1	3
Estimación de efectos de tratamiento	Paciente médico		3	3	4	3	5	2
			3	3	4	3	5	2
Velocidad de sedimentación de eritrocitos		35					34	25
Proteína C reactiva		4,0					2	2,5

Paciente 2 (Tabla III):

Diagnóstico: Artritis Reumatoide; Actividad 3

Factor reumatoide: 2; Estadio: 2

Sexo: F; Edad: 48; Aparición de la enfermedad: 2000

Terapia adicional: Diclofenac 150 mg/día

TABLA III

Investigaciones clínicas		Antes del tratamiento	Durante el tratamiento (días)					Después del tratamiento (semanas)
			2	4	6	8	10	
Estimación de dolor en articulaciones (0-10)		8,2		8,2	5	2,9	2,2	0,6
Rigidez matutina en minutos		240		120	120	60	20	10

ES 2 327 523 T3

Investigaciones clínicas		Antes del tratamiento	Durante el tratamiento (días)					Después del tratamiento (semanas)
			2	4	6	8	10	4
Gravedad de la afección (1-5)	Médico Paciente	4		3	3	3	3	2
		4		4	3	3	3	2
Número de articulaciones hinchadas		13		12	11	11	5	5
Número de articulaciones doloridas		22		22	16	15	13	7
Índice de hinchamiento (0-30)		15		14	12	11	5	5
Potencia en mano	Derecha	30		30	28	34	36	40
	Izquierda	22		20	18	18	22	28
Estimación de cansancio (0-10)		8,7		5,1	2,2	2,2	1,1	0,7
Estimación de efectos de tratamiento	Paciente médico			2	4	4	4/5	5
				2	2	3	4/5	5
Velocidad de sedimentación de eritrocitos		35					38	35
Proteína C reactiva		1,2					0,2	0,8

Paciente 3 (Tabla IV):

Diagnóstico: Artritis Reumatoide; Actividad 3

Factor reumatoide: 3; Estadio: 2

Sexo: F; Edad: 49; Aparición de la enfermedad: 1989

Terapia adicional: Diclofenac 150 mg/día

ES 2 327 523 T3

TABLA IV

Investigaciones clínicas	Antes del tratamiento	Durante el tratamiento (días)						Después del tratamiento (semanas)
		2	4	6	8	10	1	2
Estimación de dolor en articulaciones (0-10)	7,9	7,6	7,6	7,2	5,0	3,0	1,5	1,3
Rigidez matutina en minutos	360	0	0	0	0	0	0	
Gravedad de la afección (1-5)	Médico	4	3	3	3	3	2	2
	Paciente	5	4	4	3	3	2	2
Número de articulaciones hinchadas	10	7	7	6	5	5	5	5
Número de articulaciones doloridas	30	24	24	15	11	11	10	9
Índice de hinchamiento (0-30)	15	12	12	9	7	7	6	
Potencia en mano	Derecha	24	30	30	36	48	48	50
	Izquierda	24	30	30	38	40	34	40
Estimación de cansancio (0-10)		8,5	7,2	5,2	0	0	0	0
Estimación de efectos de tratamiento	Médico		3	3	3		5	5
	del paciente		3	4/3	4	4	5	5
Velocidad de sedimentación de eritrocitos		61		53	42	45		41
Proteína C reactiva		8				3,7		3,3

Ejemplo 4

Activación de células Treg CD4+CD25+ por hB-F5

Aislamiento de células T

1) Células reguladoras T (Treg)

- Se aíslan células CD25+ usando microperlas de CD25;
- Reducción de contaminaciones: se preparan células positivas para CD14, CD8, CD19 con DYNALbeads CD14/CD8/CD19;
- Reducción de células CD45RA+ se realiza con mAb de CD45RA + DYNALbeads anti-ratón: pureza: > 95% Treg CD4+CD25+

2) *Células Efectoras*

- Se aíslan células T CD4+ usando microperlas de CD4
- La reducción de células CD45RO+ se realiza con CD45RO + mAb + DYNALbeads anti-ratón; pureza: > 98% CD4/CD45RA+, células T CD25-efectoras.

3) *Sistema de ensayo*

Se cocultivan Treg CD25+ del donante A durante 2 días con PBMC con reducción de CD2 singénicas sin adiciones (control negativo = sin activación = sin actividad supresora) o en presencia de 0,5 µg/ml de anti-CD3 (OKT-3 = control positivo = activación completa de Treg) o en presencia de 5 µg/ml o 30 µg/ml de hB-F5.

Después de lavar de forma exhaustiva las células pre-cultivadas, se aíslan y tratan las células Treg CD25+ por radiación γ (3000 rad).

4) *Ensayo de actividad supresora*

Se cocultivan células Treg CD25+ pre-cultivadas durante 4 días con células T efectoras CD4+ aisladas recientemente (1:1) del donante B en presencia de APC (PBMC con reducción de CD2) del donante A (células T singénicas para células T pre-cultivadas (sin activación adicional) alogénicas para células T efectoras (= reacción mixta de linfocitos alogénicos). Después, las células se incuban durante 16 h con ³H-Timidina y se detecta la proliferación de células T efectoras.

Los resultados se muestran en la Figura 9.

Leyenda de la Figura 9:

- control negativo (sin activación) = preCD25;
- 0,5 µg/ml de OKT-3 (control positivo, activación completa) = preCD25-CD3;
- 5 µg/ml de hB-F5 (Ensayo 1) = preCD25-CD4
- 30 µg/ml de hB-F5 (Ensayo 2) = preCD25-CD4.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado (hB-F5) obtenido de anticuerpo B-F5 monoclonal de ratón anti-CD4, en el que dicho anticuerpo hB-F5 tiene dominios V definidos por las siguientes secuencias polipeptídicas:

- Dominio V de cadena H:

**EEQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSDCRMYWLRQAPGKGLEWIGVISVKSENYGAN
YAESVRGRFTISRDDSKNTVYLQMNSLKTEDTAVYYCSASYRYDVGAWFAWYGQGLVTV
SS (SEC ID N°: 1)**

- Dominio v de cadena L:

**DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSYIYNYQQKPGQPPKLLIYLASILESG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRELPTFTGQGTKVEIK (SEC ID
N°: 2),**

que son capaces de activar un subconjunto particular de células T CD4⁺, concretamente, células CD4⁺CD25⁺.

2. Un fragmento de un anticuerpo hB-F5 de la reivindicación 1, en el que dicho fragmento comprende los dominios V de la SEC ID N°: 1 y de la SEC ID N°: 2.

3. Un polinucleótido seleccionado entre:

- un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el dominio V de cadena H de la SEC ID N°: 1;
- un polinucleótido que comprende una secuencia que codifica el dominio V de cadena L de la SEC ID N°: 2.

4. Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 3, que se selecciona entre:

- un polinucleótido que comprende la secuencia SEC ID N°: 3;
- un polinucleótido que comprende la secuencia SEC ID N°: 4.

5. Una composición terapéutica que comprende un anticuerpo humanizado de la reivindicación 1 o un fragmento de la reivindicación 2.

6. El uso de un anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, o un fragmento de la reivindicación 2, para preparar una composición inmunosupresora.

7. El uso de un anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, para activar células T reguladoras CD25⁺CD4⁺ *in vitro*.

8. Un anticuerpo hB-F5 de acuerdo con la reivindicación 1 o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso como un medicamento.

9. Un anticuerpo hB-F5 o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 8 para el tratamiento o la prevención de rechazo de injerto, reacción de injerto contra hospedador o reacción de hospedador contra injerto.

10. Un anticuerpo hB-F5 o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 8 para tratar o prevenir enfermedad autoinmune.

11. Un anticuerpo hB-F5 o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la enfermedad autoinmune es miocarditis, diabetes melitus, psoriasis, lupus eritematoso, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple o artritis reumatoide.

ES 2 327 523 T3

12. Uso de un anticuerpo hB-F5 de acuerdo con la reivindicación 1 o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 2 para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el rechazo de injerto, la reacción de injerto contra hospedador o la reacción de hospedador contra injerto.

- 5 13. Uso de un anticuerpo hB-F5 de acuerdo con la reivindicación 1 o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 2 para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir enfermedad autoinmune.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

V_H de mB-F5:

CAG GAA TAC CTT GTG GAG ACC GGG GGA GGC TTG GTG AGG CCT GGA AAT TCT CTG AAA
CTC TCC TGT GTC ACC TCG GGT TTC AGT TTC AGT GAC TGC CGG ATG TAC TGG CTT CGC
CAG CCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGT GTG ATT TCA GTC AAA TCT GAG AAT
TAT GGA GCA AAT TAT GCA GAG TCT GTG AGG GGC AGA TTC ACT ATT TCA AGA GAT GAT
TCA AAA AGC AGT GTC TAT CTG CAG ATG AGC AGA TTG AGA GAG GAA GAC ACT GCC ACT
TAT TAT TGT AGT GCC TCC TAT TAT AGG TAC GAC GTG GGG GCC TGG TTT GCT TAC TGG
GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC TCT GCA

Figura 1

V_k de mB-F5:

GAC ATT GTG CTG ACA CAG TCT CCT TCT TCC TTA GTT GTA TCT CTG GGG CAG AGG GCC
ACC ATC TCA TGC AGG GCC AGC AAA AGT GTC AGT ACA TCT GGC TAC AGT TAT ATA TAT
TGG TAC CAA CAG ATC CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC TAT CTT GCA TCC ATC
CTA GAA TCT GGG GTC CCT GGC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC
CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAC AGT
AGG GAA CTT CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAG ATC AAA CGG GCT GAT
GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA TCC AGT GAG CA

Figura 2

	FR1				CDR1				FR2			
	1				2				3			
	12345678901234567890123				456777778901234				567890123456789			
					ABCD							
mB-F5	DQVLTQSPSSLVVSIGQRATISC				RASKSVSTSGYSYIY				WYQQIPGQPPELLIY			
hB-F5L4M	DQVLTQSPDSLAVSLGERATINC				RASKSVSTSGYSYIY				WYQQIPGQPPELLIY			
hB-F5L4L	-----				-----				-----			
FK-001	DQVLTQSPDSLAVSLGERATINC								WYQQKPGQPPKLLIY			

	CDR2				FR3			
	5				6			
	0123456				7890123456789012345678			
mB-F5	LASILES				GVPDRFSSESSTGDTLNIIPVEEEDAATYYC			
hB-F5L4M	LASILES				GVPDRFSSESSTGDTLTISSLQAEDVAVYYC			
hB-F5L4L	-----				-----			
FK-001					GVPDRFSSESSTGDTLTISSLQAEDVAVYYC			

	CDR3				FR4			
	9				10			
	901234567				8901234567			
mB-F5	QHSRELPWT				FSGGTKLEIK			
hB-F5L4M	QHSRELPWT				FSQGTKVEIK			
hB-F5L4L	-----				-----			
FK-001					FSQGTKVEIK			

Figura 3

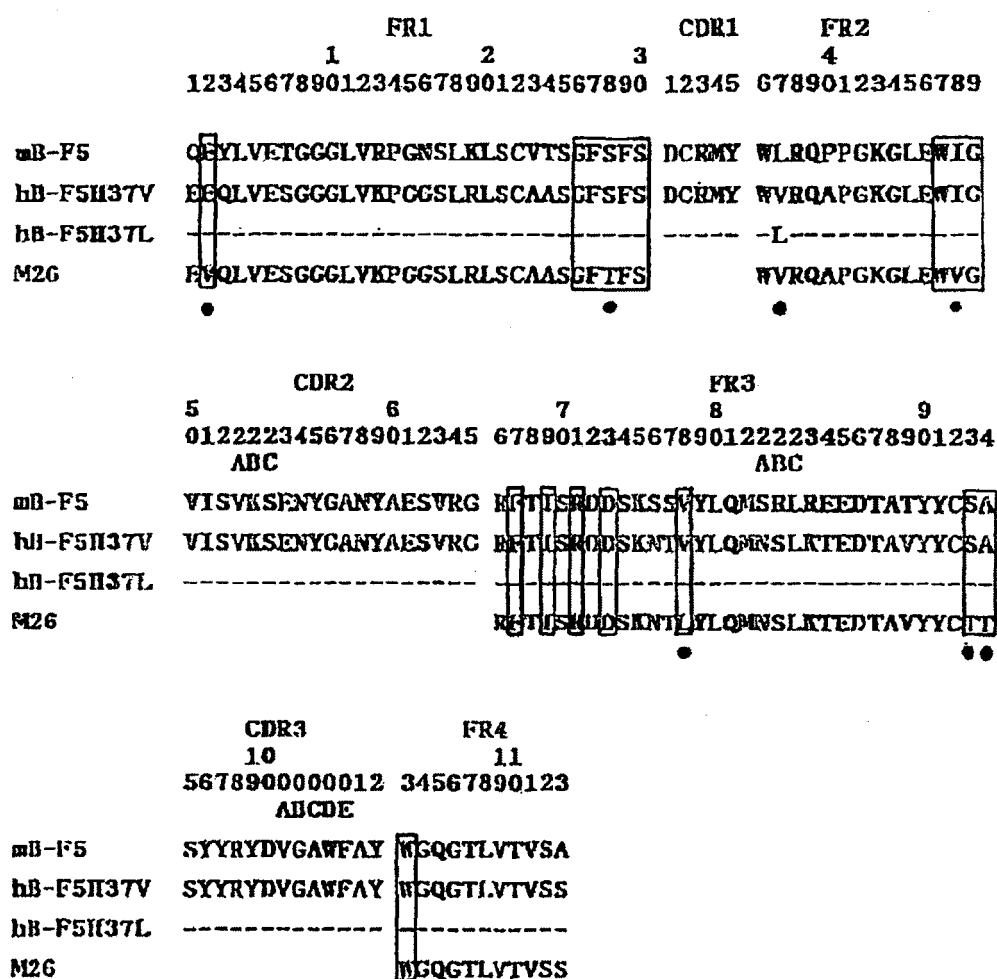


Figura 4

ES 2 327 523 T3

GA GGA GCT CCA GAC AAT GTC TGT CTC CTT CCT CAT CTT CCT GCC CGT GCT GGG CCT

CCC ATG GGG TCA GTG TCA GGG AGA TGC CGT ATT CAC AGC AGC ATT CAC AGA CTG AGG

GGT GTT TCA CTT TGC TGT TTC CTT TTG TCT CCA GGT GTC CTG TCA GAG GAA CAG CTT
E E Q L

GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTG AAA CCC GGA GGT TCT CTG AGG CTC TCC TGT GCA
V E S G G G L V K P G G S L R L S C A

CCC TCG GGT TTC AGT TTC AGT GAC TGC CGG ATG TAC TGG GTT CGC CAG GCT CCA GGG
A S G F S F S D C R M Y W V R Q A P G

AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGT GTG ATT TCA GTC AAA TCT GAG AAT TAT GGA GCA AAT
K G L E W I G V I S V K S E N Y G A N

TAT GCA GAG TCT GTG AGG GGC AGA TTC ACT ATT TCA AGA GAT GAT TCA AAA AAC ACG
Y A E S V R G R F T I S R D D S K N T

GTC TAT CTG CAG ATG AAC AGC TTG AAG ACC GAA GAC ACT GCC GTT TAT TAT TGT AGT
V Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C S

GCC TCC TAT TAT AGG TAC GAC GTG GGG GCC TGG TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT
A S Y Y R Y D V G A W F A Y W G Q G T

CTG GTC ACT GTC TCT TCA GGT AAG AAT GGC CAA GCT TG
L V T V S S

Figura 5

GGA GGA TCC AAT TAT CTG CTG ACT TAT AAT ACT ACT AGA AAG CAA ATT TAA ATG ACA

TAT TTC AAT TAT ATC TGA GAC AGC GTG TAT AAG TTT ATG TAT AAT CAT TGT CCA TTC

CTG ACT ACA GGT GCC TAC GGG GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CCA GAC TCC CTG GCT
D I V M T Q S P D S L A

GTG TCT CTG GGC GAG AGG GCC ACC ATC AAC TGC AGG GCC AGC AAA AGT GTC AGT ACA
V S L G E R A T I N C R A S K S V S T

TCT GGC TAC AGT TAT ATA TAT TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG
S G Y S Y I Y W Y Q Q K P G Q P P K L

CTC ATT TAC CTT GCA TCC ATC CTA GAA TCT GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC
L I Y L A S I L E S G V P D R F S G S

GGG TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG GCT GAA GAT GTG GCA
G S G T D F T L T I S S L Q A E D V A

GTT TAT TAC TGT CAG CAC AGT AGG GAA CTT CCG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG
V Y Y C Q H S R E L P W T F G Q G T K

GTG GAA ATC AAA CGT GAG TAG AAT TTA AAT TTT AAG CTT CTT
V E I K

Figura 6

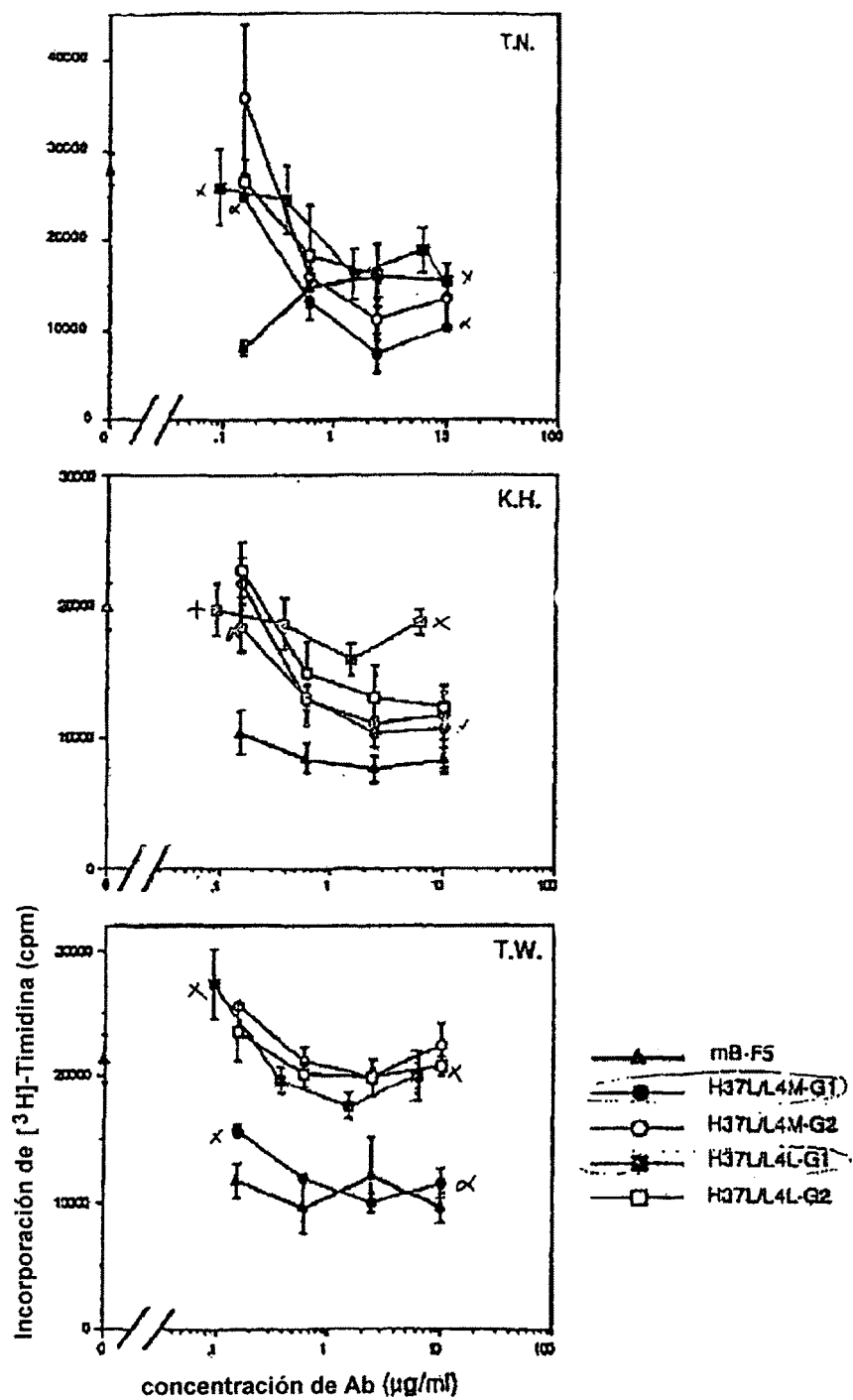


Figura 7

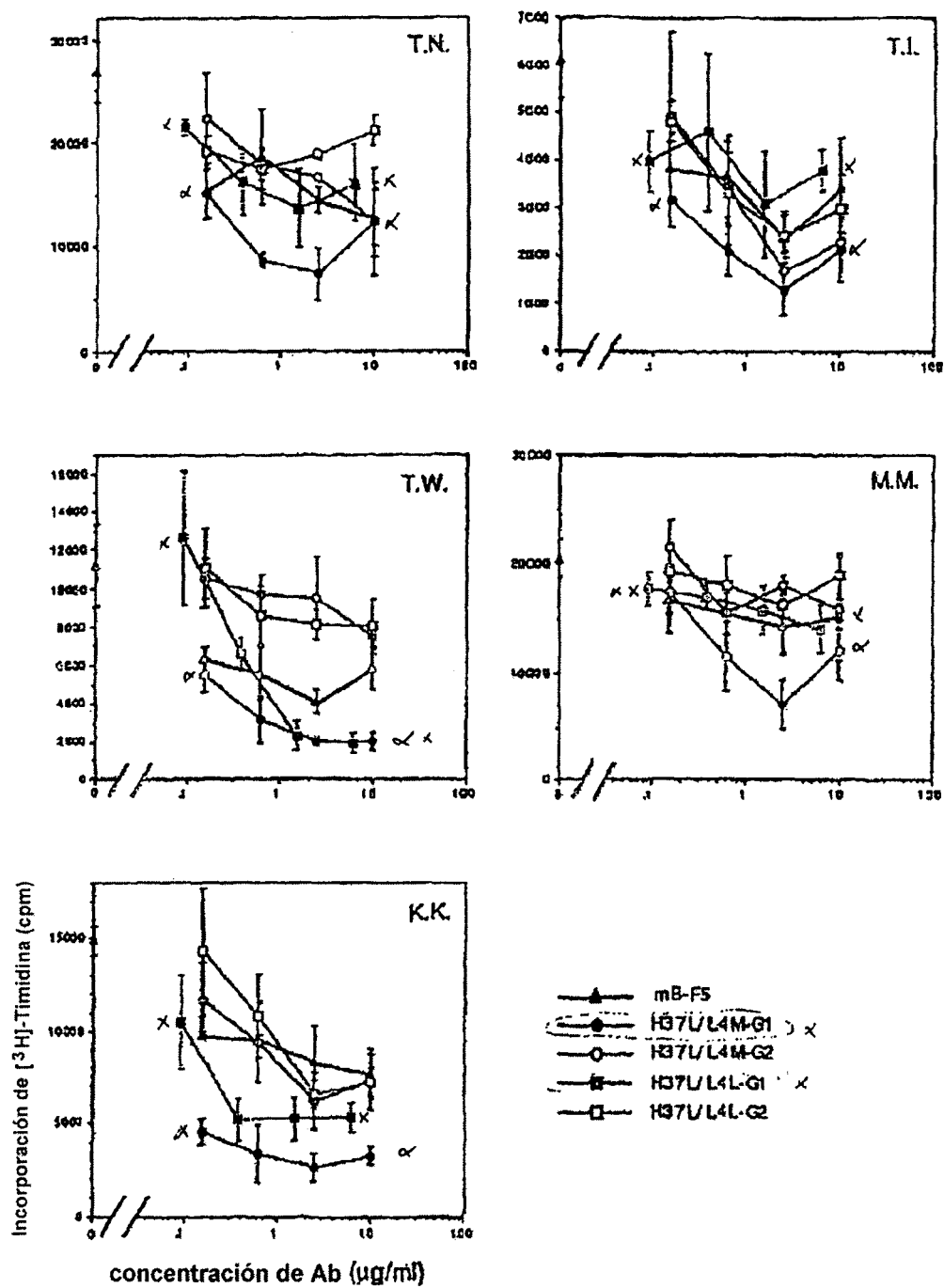


Figura 8

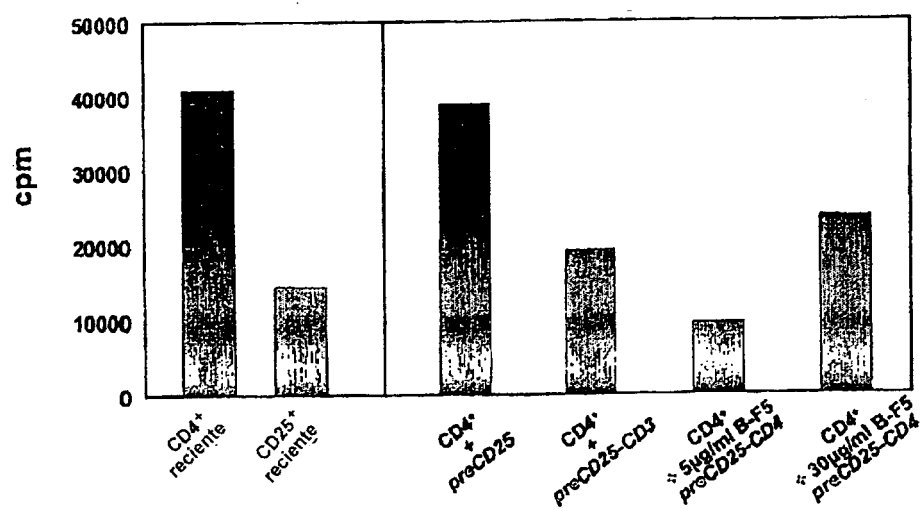


Figura 9

ES 2 327 523 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> DIACLONE
WIJDENES, John

<120> ANTICUERPO ANTI-CD4 HUMANIZADO CON PROPIEDADES INMUNOSUPRESORAS

<130> MJP/ah-884/5EP

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio v de cadena H de anticuerpo humanizado hBF-5

<400> 1

Glu Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Cys
20 25 30

Arg Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile Ser Val Lys Ser Glu Asn Tyr Gly Ala Asn Tyr Ala Glu
50 55 60

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ser Ala Ser Tyr Tyr Arg Tyr Asp Val Gly Ala Trp Phe Ala
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> dominio V de cadena K de anticuerpo humanizado hBF-5

ES 2 327 523 T3

 $\langle 400 \rangle$ 2

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

10 Gly Tyr Ser Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

15 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Ile Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

20 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

25 Glu Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

 $\langle 210 \rangle$ 3

30 <211> 372

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 $\langle 220 \rangle$

<223> dominio v de cadena H de anticuerpo humanizado hBF-5

 $\langle 400 \rangle$ 3

40 gaggaacagc ttgtggagtc tgggggaggc ttggtgaaac ccggaggttc tctgaggctc 60
 tcctgtgcag cctcggtttt cagtttcagt gactgccgga tgtactgggt tcgccaggct 120

45
ccaggggaagg ggctggagtg gattggtgtg atttcagtca aatctgagaa ttatggagca 180
aattatgcag agtctgtgag gggcagattc actatttcaa gagatgattc aaaaaacacg 240
50 gtctatctgc agatgaacag cttgaagacc gaagacactg ccgtttatta ttgtagtgcc 300
tcctattata ggtacgacgt gggggcctgg tttgcttact ggggccaagg gactctggtc 360
actgtctctt ca 372
55

<210> 4

<211> 336

60 $\langle 212 \rangle$ ADN

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

⁶⁵ <223> dominio V de cadena K de anticuerpo humanizado hBF-5

ES 2 327 523 T3

<400> 4

	gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc	60
5	atcaactgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct acagttatat atattggtac	120
	cagcagaaac caggacagcc tcctaagctg ctcatctacc ttgcatccat cctagaatct	180
	ggggtccctg accgattcag tggcagcggg tctgggacag atttcactct caccatcagc	240
10	agcctgcagg ctgaagatgt ggcagtttat tactgtcagc acagtaggga acttccgtgg	300
	acgttcggcc aagggaccaa ggtggaaatc aaacgt	336

15 <210> 5

<211> 372

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

20

<400> 5

	caggaatacc ttgtggagac cgggggagggc ttggtgagggc ctggaaattc tctgaaactc	60
25	tcctgtgtca cctcgggttt cagtttcagt gactgccgga tgtactggct tcgccagcct	120
	ccagggaagg ggctggagtg gattggtgtg atttcagtca aatctgagaa ttatggagca	180
	aattatgcag agtctgtgag gggcagattc actatttcaa gagatgattc aaaaagcagt	240
30	gtctatctgc agatgagcag attgagagag gaagacactg ccacttatta ttgtagtgcc	300
	tcctattata ggtacgacgt gggggcctgg tttgcttact ggggccaagg gactctggtc	360
35	actgtctctg ca	372

<210> 6

<211> 383

40 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 6

45

	gacattgtgc tgacacagtc tccttcttcc ttagttgtat ctctggggca gagggccacc	60
	atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct acagttatat atattggtac	120
50	caacagatcc caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ttgcatccat cctagaatct	180
	ggggtccctg gcagggtcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat	240
	cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga acttccgtgg	300
55	acgttcggtg gaggcaccaa gctggagatc aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc	360
	atcttccac catccagtga gca	383

60

65