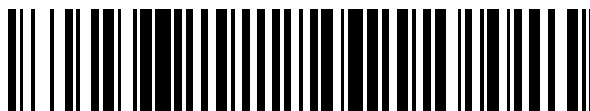


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 136**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2003** **E 03786661 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012** **EP 1578397**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales humanos contra CD25**

30 Prioridad:

15.11.2002 US 426690 P

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

17.04.2013

73 Titular/es:

**GENMAB A/S (100.0%)
BREDGADE 34 P.O. BOX 9068
1260 COPENHAGEN K, DK**

72 Inventor/es:

**SCHUURMAN, JANINE;
HAVENITH, CATHARINA EMANUELE GERARDA;
PARREN, PAUL;
VAN DE WINKEL, JAN G. J.;
WILLIAMS, DENISE LEAH;
PETERSEN, JØRGEN y
BAADSGAARD, OLE D. M. SC.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 401 136 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales humanos contra CD25

5 Antecedentes de la invención

El receptor de la interleucina-2 (IL-2R) de alta afinidad es un receptor heterotrimérico de superficie celular que se compone de cadenas polipeptídicas α , β y γ_c ($K_D = 10^{-11}$ M). La cadena α de 55 kDa, también conocida como antígeno IL-2R α , CD25, p55 y Tac (activación de linfocitos T), es exclusiva del IL-2R. Las cadenas β (CD122; P75) y γ_c (CD132) forman parte de una superfamilia de receptores de citocinas (receptores de hematopoyetina) y son componentes funcionales de otros receptores de citocinas tales como IL-15R (Waldmann (1993) *Immunol. Today* 14(6):264-70; Ellery *et al.*, (2002), "Cytokine Growth Factor Rev". 13(1): 27-40). El receptor de afinidad intermedia es un dímero compuesto de una cadena β y una cadena γ_c ($K_D = 10^{-9}$ M), mientras que el receptor de baja afinidad consiste en una subunidad α monomérica que no tiene ninguna capacidad de transducción de señales ($K_D = 10^{-8}$ M) (Waldmann (1993) *Immunol. Today* 14(6):264-70).

Los linfocitos T, los linfocitos B y los monocitos en reposo expresan pocas moléculas CD25. Sin embargo, el receptor se transcribe y se expresa rápidamente tras la activación (Ellery *et al.*, (2002) *Cytokine Growth Factor Rev.* 13(1): 27-40; Morris *et al.*, (2000) *Ann. Rheum. Dis.* 59 (Supl. 1): 109-14). Las células que expresan el IL-2R de alta afinidad expresan CD25 (la subunidad de CD25) en exceso, lo que conduce a perfiles de unión a IL-2 tanto de alta como de baja afinidad (Waldmann *et al.* (1993) *Blood* 82(6):1701-12; de Jong *et al.* (1996) *J. Immunol.*, 156(4):1339-48). CD25 es altamente expresado por los linfocitos T en algunas enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide, esclerodermia y uveítis, así como trastornos cutáneos como, por ejemplo, soriasis y dermatitis atópica, y una variedad de neoplasmas linfoides como, por ejemplo, leucemia de linfocitos T y enfermedad de Hodgkin (Waldmann (1993) *Immunol. Today* 14(6):264-70; Kuttler *et al.* (1999), *J. Mol. Med.* 77(1):226-9). Además, la expresión de CD25 está asociada con el rechazo a aloinjertos y las respuestas de huésped contra injerto (Jones *et al.*, (2002) *J. Immunol.* 168(3):1123-1130; Anasetti *et al.*, (1994) "Blood" 84(4):1320-7).

Basiliximab es un anticuerpo monoclonal quimérico (murino/humano) con regiones de cadena pesada constante de IgG1 humana y una cadena ligera kappa. Se une específicamente y bloquea el antígeno CD25, la cadena α de IL-2r, en la superficie de los linfocitos T activados (Pascual *et al.* (2001) *Nephrol Dial. Transplant* 16:1756-1760). La administración de basiliximab inhibe la activación de los linfocitos medida por IL-2, una ruta fundamental en el rechazo de aloinjertos (Henry y Rajab (2002) *Expert Opin. Pharmacother.* 3: 1657-1663). Daclizumab es un anticuerpo humanizado contra IL-2r creado mediante la síntesis de genes totales usando oligonucleótidos. Daclizumab es un 90% humano, conservando un 10% de los compartimentos murinos en los segmentos hipervariables críticos para la especificidad de unión (Pascual *et al.* (2001) *supra*).

Por consiguiente, CD25 es una diana importante para la terapia mediada por anticuerpos, por ejemplo, para reducir la inflamación en las enfermedades autoinmunes, para tratar tumores y para prevenir el rechazo de trasplantes. Sin embargo, aunque los resultados obtenidos y la experiencia clínica adquirida hasta la fecha establecen claramente a CD25 como una diana útil para la inmunoterapia, también muestran que los anticuerpos quiméricos y murinos disponibles actualmente no constituyen agentes terapéuticos ideales. Por lo tanto, existe la necesidad de más anticuerpos terapéuticos contra CD25 que sean eficaces en la prevención y/o el tratamiento de una amplia selección de enfermedades en las que participan las células que expresan CD25.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona nuevos anticuerpos terapéuticos para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades asociadas con las células que expresan CD25, incluyendo el rechazo de órganos, tejidos y células, incluyendo el rechazo de aloinjertos y xenoinjertos, la enfermedad del huésped frente al injerto, enfermedades autoinmunes, trastornos cutáneos inflamatorios e hiperproliferativos, y neoplasias linfoides, entre otros. Los anticuerpos abarcados por la invención están mejorados en tanto en cuanto son completamente humanos y, por lo tanto, son potencialmente menos inmunógenos en los pacientes. Los anticuerpos también son ventajosos en base a sus superiores propiedades funcionales (por ejemplo, propiedades terapéuticas).

Como se muestra en la presente memoria, los anticuerpos humanos de la invención se unen a CD25 cuando se analizan mediante ELISA o citometría de flujo.

Los anticuerpos humanos de la invención se unen típicamente a CD25 con una constante de equilibrio de disociación (K_D) de aproximadamente 10^{-8} M o menor, tal como de 10^{-9} M o menor, 10^{-10} M o menor, o 10^{-11} o incluso menor, determinada mediante tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un instrumento BIAcore 3000 con el uso de IL-2R α recombinante humano como ligando y el anticuerpo como analito. Dichos anticuerpos normalmente no reaccionan de forma cruzada con los antígenos de superficie celular relacionados y, por tanto, no inhiben su función.

Además, los anticuerpos humanos de la presente invención inhiben (por ejemplo, bloquean) la interacción de CD25 con su ligando, IL-2. La unión se puede inhibir, por ejemplo, en al menos aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%. Los ejemplos de células que expresan CD25 y, por tanto, cuya función celular se puede inhibir mediante los anticuerpos humanos de la presente invención incluyen, entre otros, linfocitos T, linfocitos B y monocitos. Por ejemplo, como se muestra en la presente memoria, los anticuerpos humanos de la invención pueden inhibir la unión de IL-2 a CD25. Dicha inhibición de unión de IL-2 a CD25 inhibe de forma concomitante diversos mecanismos celulares inducidos por la unión de IL-2. Como también se muestra en la presente memoria, los anticuerpos humanos de la invención pueden inhibir la proliferación de linfocitos T inducida por anticuerpos contra CD3 de una manera dependiente de la dosis. Como también se muestra en la presente memoria, los anticuerpos humanos de la invención pueden inhibir la reacción linfocitaria mixta (MLR) de una manera dependiente de la dosis. La inhibición de la proliferación en dichos experimentos se puede controlar mediante una disminución de la acumulación de la masa celular, medida en ELISA o mediante una disminución de la incorporación de BrdU en el ADN celular.

Así pues, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une a CD25 humano e inhibe la unión de IL-2 a CD25, en la que el anticuerpo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de V_L que tienen las secuencias de aminoácidos de:

- (i) SEC ID N°: 23, 24, 25, 26, 27 y 28;
- (ii) SEC ID N°: 29, 30, 31, 32, 33 y 34;
- (iii) SEC ID N°: 35, 36, 37, 38, 39 y 40; o
- (iv) SEC ID N°: 17, 18, 19, 20, 21 y 22.

El anticuerpo comprende preferentemente regiones variables de cadena pesada humana y cadena ligera kappa humana que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID N°: 6 y 8, SEC ID N°: 14 y 16, SEC ID N°: 2 y 4 o SEC ID N°: 10 y 12, respectivamente.

Los anticuerpos humanos particulares de la presente invención incluyen aquellos denominados AB1, AB7, AB11 y AB12, codificados por ácidos nucleicos de cadena pesada humana y cadena ligera kappa humana que comprenden secuencias de nucleótidos en sus regiones variables según lo expuesto en SEC ID N°: 1, 5, 9 o 13 y SEC ID N°: 3, 7, 11 o 15, respectivamente.

Un anticuerpo que se une a CD25 puede comprender:

- un dominio CDR3 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos:
X₁-Asp-Trp-X₂-Asp-X₃
en la que X₁ es Arg, His o Lys, preferentemente Arg o Lys; X₂ es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Tyr, Trp o Phe, preferentemente Gly o Phe; y X₃ es Pro, Tyr, Phe o Trp, preferentemente Pro o Tyr;
- un dominio CDR1 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos:
X₁-Tyr-X₂-Ile-X₃
en la que X₁, X₂ y X₃ son aminoácidos naturales; y
en la que X₁ es diferente de Ser o X₂ es diferente de Ala; o X₃ es diferente de Ser, por ejemplo, en la que X₁ es Arg, Lys o His, preferentemente Arg; X₂ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile o Pro, preferentemente Ala, Ile o Pro; y X₃ es Asn o Gln, preferentemente Asn;
- un dominio CDR2 de V_H que tiene la secuencia de aminoácidos:
Arg-Ile-Ile-Pro-Ile-Leu-Gly-X₁-X₂-X₃-Tyr-Ala-Gln-X₄-Phe-Gln-X₅
en la que X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅ son aminoácidos naturales; y en la que X₁ es diferente de Ile; o X₂ es diferente de Ala; o X₃ es diferente de Asn; o X₄ es diferente de Lys; o X₅ es diferente de Gly, por ejemplo, en la que X₁ es Ile, Val, Gly, Ala o Leu, preferentemente Ile o Val; X₂ es Ala, Ile, Val, Gly, Leu, Glu o Asp, preferentemente Ala o Glu; X₃ es Asp, Glu, Asn o Gln, preferentemente Asp o Asn; X₄ es Lys, Arg o His, preferentemente Lys o Arg; y X₅ es Gly, Ile, Val, Ala, Leu, Asp o Glu, preferentemente Gly o Asp;
- un dominio CDR1 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos:
Arg-Ala-Ser-Gln-Ser-X₁-Ser-Ser-X₂-Leu-Ala
en la que X₁ y X₂ son aminoácidos naturales; y en la que X₁ es diferente de Val; o X₂ es diferente de Tyr, por ejemplo, en la que X₁ es Val, Ala, Leu, Ile o Gly, preferentemente Val o Gly; y X₂ es Phe, Trp o Tyr, preferentemente Phe o Tyr; y/o
- un dominio CDR3 de V_L que tiene la secuencia de aminoácidos:
Gln-Gln-Tyr-X₁-Ser-Ser-Pro-X₂-X₃
en la que X₁ es Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser o Thr, preferentemente Gly o Ser; X₂ es Leu, Gly, Ala, Val o Ile, preferentemente Leu o Ile; y X₃ es Thr o Ser, preferentemente Thr.

El anticuerpo de la invención puede comprender:

- (i) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada derivada de una secuencia de línea germinal V_H1-69/JH4b o V_H1-69/JH5b humana y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera derivada de una secuencia de línea germinal A27/J_K4 o A27/J_K5 humana; o

(i) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada derivada de una secuencia de línea germinal V_H1-69/D7-27/JH4b o V_H1-69/ D7-27/JH5b humana y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera derivada de una secuencia de línea germinal A27/J_k4 o A27/J_k5 humana.

- 5 Los anticuerpos humanos de la invención incluyen anticuerpos IgG1 (por ejemplo, IgG1,_κ e IgG1,_λ) e IgG4 (por ejemplo, IgG4,_κ e IgG4,_λ). Sin embargo, la invención también engloba otros isotipos de anticuerpos que incluyen IgG2, IgG3, IgM, IgA1, IgA2, IgA secretora, IgD e IgE. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos completos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, incluyendo, por ejemplo, fragmentos Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, Fv, Fv de cadena sencilla (scFv) o anticuerpos biespecíficos. Además, los fragmentos de unión al antígeno incluyen
- 10 proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión (tal como una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera) que está fusionado a un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región bisagra y (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región constante CH2. Dichas proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de
- 15 unión se divulgan más detalladamente en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939.

Los anticuerpos contra CD25 humano de la presente invención se pueden caracterizar por una o más de las siguientes propiedades:

- 20 a) especificidad por CD25 humano;
- b) afinidad de unión con CD25 correspondiente una K_D de aproximadamente 10⁻⁸ M o menor, tal como 10⁻⁹ M o menor, 10⁻¹⁰ M o menor, o 10⁻¹¹ o incluso menor, determinada mediante tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un instrumento BIAcore 3000 con el uso de IL-2R_α recombinante como ligando y el anticuerpo como analito;
- 25 c) capacidad de inducir la tolerancia en los linfocitos T;
- d) capacidad de bloquear la interacción de CD25 con su ligando, IL-2;
- e) capacidad de eliminar los linfocitos T que expresan CD25;
- f) capacidad de inhibir la proliferación de los linfocitos T que expresan CD25;
- 30 g) capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos T inducida por anticuerpos contra CD3 de células mononucleares de sangre periférica (PBMC);
- h) capacidad de bloquear la reacción linfocitaria mixta (MLR); y/o
- l) la interiorización de CD25 expresado en linfocitos T.

35 La expresión "inducir la tolerancia", como se usa en la presente memoria, significa que los linfocitos T no son capaces de reaccionar contra un antígeno tras una nueva prueba de provocación con este antígeno.

Los anticuerpos humanos contra CD25 de la presente invención pueden ser derivatizados, ligados a o coexpresados con otras especificidades de unión: En una realización particular, los anticuerpos están ligados a una o más especificidades de unión para un antígeno diana diferente tal como un antígeno situado sobre una célula efectora.

40 Por consiguiente, la presente invención también incluye moléculas biespecíficas y multiespecíficas que se unen tanto a CD25 humano como a uno o más antígenos diana diferentes tales como CD3, CD4, IL-15R, TNF- α unido a la membrana o unido al receptor, IL-15 unida a la membrana o unido al receptor.

45 En otra realización, los anticuerpos humanos contra CD25 de la invención son derivatizados, ligados a o coexpresados con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento Fab). Por ejemplo, el anticuerpo puede ser ligado funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares distintas tales como otro anticuerpo (por ejemplo, para producir un anticuerpo biespecífico o multiespecífico), una citotoxina, un ligando celular o un antígeno (por ejemplo, para producir un inmunconjugado tal como una inmunotoxina). El anticuerpo también puede estar ligado a otros restos terapéuticos, por ejemplo, un radioisótopo, un fármaco contra el cáncer de bajo peso molecular, un agente antiinflamatorio o un agente inmunosupresor. Por consiguiente, la presente invención engloba una amplia variedad de conjugados de anticuerpos, moléculas biespecíficas y multiespecíficas, y proteínas de fusión, la totalidad de los cuales se une a células que expresan CD25 y que se pueden usar para dirigir

50 otras moléculas a dichas células.

Los anticuerpos humanos, los inmunconjugados, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas, y las composiciones de la presente invención se pueden usar en una variedad de métodos para inhibir, matar y/o modular la actividad y/o el crecimiento (por ejemplo, la proliferación) de células que expresan CD25. En una realización, el método incluye la inhibición de la proliferación de los linfocitos T que expresan CD25. En otra realización, el método incluye la inhibición de las respuestas del huésped frente al injerto, por ejemplo, las MLR. En otra realización más, el método incluye la destrucción de células que expresan CD25 (por ejemplo, mediante lisis mediada por el complemento o la unión del anticuerpo a una citotoxina). Las células son preferentemente destruidas o inhibidas sin destruir ni inhibir la actividad de las células que no expresan CD25, pero que pueden expresar, por ejemplo, un

60 antígeno estructuralmente relacionado de superficie celular (es decir, sin reactividad cruzada con antígenos de superficie celular relacionados, pero funcionalmente distintos). Las células que expresan CD25 que se pueden inhibir

65

o destruir con los anticuerpos humanos de la invención incluyen, por ejemplo, linfocitos T activados, linfocitos B, monocitos, macrófagos, células de Kupffer del hígado y células de Langerhans de la piel que expresan CD25.

- Por consiguiente, los anticuerpos humanos de la presente invención se pueden usar para tratar y/o prevenir una variedad de enfermedades y afecciones en las que las células activadas que expresan CD25 desempeñan un papel activo en la patogénesis mediante la administración de los anticuerpos a los pacientes que sufren dichas enfermedades y afecciones. Las enfermedades ejemplares que se pueden tratar (por ejemplo, mejorar) o prevenir incluyen, pero sin limitación, rechazo de trasplantes, incluyendo rechazo de aloinjertos y xenoinjertos, en pacientes que están siendo sometidos o que han sido sometidos a un trasplante de órgano o de tejido tal como un trasplante de corazón, pulmón, combinado de corazón y pulmón, tráquea, riñón, hígado, páncreas, esófago, intestino, piel, extremidad, cordón umbilical, células madre, células de islotes, etc. Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar, por tanto, como profilácticos en el rechazo de aloinjertos y xenoinjertos, o se pueden usar para invertir, tratar o mejorar de otro modo los episodios agudos de rechazo de aloinjertos o xenoinjertos.
- Otras enfermedades que se pueden tratar incluyen la enfermedad del huésped frente al injerto, por ejemplo, la enfermedad del huésped frente al injerto de transfusión de sangre y la enfermedad del huésped frente al injerto de médula ósea; enfermedades inflamatorias, inmunes o autoinmunes tales como artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis soriasica, diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 insulino dependiente, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, dermatopolimiositis, síndrome de Sjögren, arteritides, incluyendo arteritis de células gigantes, anemia aplásica, asma, esclerodermia y uveítis; trastornos cutáneos inflamatorios o hiperproliferativos, por ejemplo, soriasis, incluyendo soriasis en placa, pustulosis palmoplantar (PPP), liquen plano erosivo, pénfigo ampollar, epidermolisis bullosa, dermatitis de contacto y dermatitis atópica; y una variedad de neoplasmas linfoides, por ejemplo, leucemia de linfocitos T, enfermedad de Hodgkin, leucemia de células pilosas o linfoma cutáneo de linfocitos T, incluyendo micosis fungoide y síndrome de Sezary.

Otras enfermedades que se pueden tratar son:

- tumores malignos* en los que es beneficiosa una inhibición de los linfocitos T reguladores infiltrantes CD25+, tales como cáncer gástrico, cáncer de esófago, melanoma maligno, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer cervical, cáncer de ovario y carcinoma de células renales;
- trastornos hematológicos* tales como leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, linfoma anaplásico de células grandes, leucemia linfocítica crónica (CLL)/linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma periférico de linfocitos T y amiloidosis secundaria;
- trastornos cutáneos* tales como piodermia gangraenosa, granuloma anular, dermatitis alérgica de contacto, penfigoide cicatricial y herpes gestacional;
- trastornos hepato-gastrointestinales* tales como colitis colágena, colangitis esclerosante, hepatitis activa crónica, hepatitis lupoide, hepatitis autoinmune, hepatitis alcohólica, pancreatitis crónica y pancreatitis aguda;
- trastornos cardíacos* tales como miocarditis y pericarditis;
- trastornos vasculares* tales como arteriosclerosis, arteritis de células gigantes/polimialgia reumática, arteritis de Takayasu, poliarteritis nodosa, síndrome de Kawasaki, granulomatosis de Wegener, poliangeítis microscópica, síndrome de Churg-Strauss, angéitis leucocitoclástica y vasculitis secundaria leucocitoclástica;
- trastornos renales* tales como glomerulonefritis aguda, glomerulonefritis crónica, nefritis de cambio mínimo y síndrome de Goodpasture;
- trastornos pulmonares* tales como alveolitis, bronquiolitis obliterante, silicosis y beriliosis;
- trastornos neurológicos* tales como esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, miastenia grave, polineuropatía desmielinizante crónica y polirradiculitis incluyendo el síndrome de Guillain-Barré;
- trastornos del tejidos conjuntivos* tales como policondritis recidivante, sarcoidosis, lupus eritematoso sistémico, lupus del SNC, lupus discoide, nefritis de lupus, síndrome de fatiga crónica y fibromialgia;
- trastornos endocrinos* tales como enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis subaguda; e *infecciones virales* tales como paraparesia espástica tropical.

- En una realización particular de la invención, el sujeto que está recibiendo el anticuerpo se trata además con uno o más agentes terapéuticos adicionales tales como agentes inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, agentes quimioterapéuticos, agentes citotóxicos u otros agentes que sirven para mejorar el efecto terapéutico del anticuerpo.

- En otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para detectar *in vitro* o *in vivo* la presencia de CD25 en una muestra o un individuo, por ejemplo, para el diagnóstico de una enfermedad relacionada con CD25, preferentemente en una etapa temprana. Esto también puede ser útil para controlar la enfermedad y el efecto del tratamiento con un anticuerpo contra CD25, y para determinar y ajustar la dosis del anticuerpo que se vaya a administrar. En una realización, la detección de la presencia de CD25 en una muestra se consigue poniendo en contacto una muestra que se vaya a analizar, opcionalmente junto con una muestra de control, con un anticuerpo monoclonal humano de la invención en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y CD25. A continuación, se detecta la formación del complejo (por ejemplo, mediante ELISA, citometría de flujo o transferencia Western). Cuando se usa una muestra de control junto con la muestra de ensayo, el complejo se detecta en ambas muestras, y cualquier diferencia estadísticamente significativa en la formación de los complejos

entre las muestras indica la presencia de CD25 en la muestra de ensayo. El método *in vivo* se puede realizar mediante una técnica de formación de imágenes tal como PET (tomografía de emisión de positrones) o SPECT (tomografía computarizada de emisión de un solo fotón).

En un aspecto adicional, la invención se refiere a anticuerpos antiidiotípicos que se unen a los anticuerpos monoclonales humanos de la invención. Estos anticuerpos antiidiotípicos se pueden usar como una herramienta de inmunodiagnóstico para detectar y cuantificar los niveles de anticuerpos monoclonales humanos contra CD25 en laboratorio o muestras de pacientes. Esto puede ser útil para examinar la farmacocinética del anticuerpo contra CD25 o para determinar y ajustar la dosis del anticuerpo contra CD25, y para controlar la enfermedad y el efecto del tratamiento en un paciente.

Se pueden crear anticuerpos antiidiotípicos murinos, por ejemplo, mediante la inmunización de ratones Balb/C con los anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con la invención y la generación de hibridomas a partir de los bazo de estos ratones mediante la fusión con células de mieloma tales como NS1 mediante técnicas estándar.

En otro aspecto más, la invención proporciona un animal no humano transgénico, tal como un ratón transgénico, que expresa anticuerpos monoclonales humanos que se unen a CD25. En una realización particular, el animal no humano transgénico es un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén o transcromosoma de cadena pesada humana y un transgén o transcromosoma de cadena ligera humana que codifican todo o una parte de un anticuerpo de la invención. El animal no humano transgénico puede ser inmunizado con una preparación purificada o enriquecida de antígeno CD25 y/o células que expresan CD25. Preferentemente, el animal no humano transgénico, por ejemplo, el ratón transgénico, es capaz de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos contra CD25 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgM), siendo sometido a una recombinación de V-D-J y conmutación isotípica. La conmutación isotípica puede producirse por, por ejemplo, mediante conmutación isotípica clásica o no clásica.

Por consiguiente, en otro aspecto más, la invención proporciona linfocitos B aislados de un animal no humano transgénico según lo descrito anteriormente, por ejemplo, un ratón transgénico, que expresa anticuerpos humanos contra CD25. A continuación, se pueden immortalizar los linfocitos B aislados mediante la fusión a una célula inmortalizada para proporcionar una fuente (por ejemplo, un hibridoma) de anticuerpos humanos contra CD25. Dichos hibridomas (es decir, que producen anticuerpos humanos contra CD25) también se incluyen dentro del alcance de la invención.

Como se ejemplifica en la presente memoria, los anticuerpos humanos de la invención se pueden obtener directamente de hibridomas que expresan el anticuerpo o se pueden clonar (por ejemplo, a partir de hibridomas o fagos que muestran porciones de unión al antígeno de los anticuerpos) y expresarlos de forma recombinante en una célula huésped (por ejemplo, una célula CHO (ovario de hámster chino) o una célula NS/O). Otros ejemplos de células huésped son microorganismos, tales como *E. coli*, y hongos, tales como levadura. Alternativamente, se pueden producir de forma recombinante en una planta o un animal no humano transgénico. Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para producir anticuerpos monoclonales humanos que se unen a CD25 humano. En una realización, el método incluye la inmunización de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, según lo descrito previamente (por ejemplo, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana que codifican toda o una parte de un anticuerpo contra CD25), con una preparación purificada o enriquecida de antígeno CD25 humano y/o células que expresan CD25 humano. A continuación, se obtienen los linfocitos B (por ejemplo, linfocitos B esplénicos) del animal y se fusionan con células de mieloma para formar células de hibridoma inmortales que secretan anticuerpos monoclonales humanos contra CD25.

En otro aspecto más, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos humanos contra CD25 (por ejemplo, regiones variables de los mismos), así como vectores de expresión recombinantes que incluyen los ácidos nucleicos de la invención, y células huésped transfectadas con dichos vectores. Los métodos para producir los anticuerpos mediante el cultivo de estas células huésped también están englobados por la invención. Los ácidos nucleicos particulares proporcionados por la invención comprenden las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEC ID N°: 1, 5, 9 o 13 y SEC ID N°: 3, 7, 11 o 15 que codifican las cadenas pesada y ligera, respectivamente, de los anticuerpos humanos contra CD25 AB1, AB7, AB11 y AB12.

Hay otras características y ventajas de la presente invención que resultarán evidentes a partir de la descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

La *Figura 1* muestra las secuencias de aminoácido de las regiones VJ de cadena ligera (kappa) de los anticuerpos monoclonales humanos AB1, AB7, AB11 y AB12 (SEC ID N°: 4, 8, 12 y 16, respectivamente) con las CDR designadas.

La *Figura 2* muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones VDJ de cadena pesada de los anticuerpos

monoclonales humanos AB1, AB7 y AB11 (SEC ID N°: 2, 6, 10 y 14, respectivamente) con las CDR designadas.

La *Figura 3* muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 2) y la secuencia de nucleótidos correspondiente (SEC ID N°: 1) de la región VDJ de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano AB1 con las CDR designadas.

La *Figura 4* muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 4) y la secuencia de nucleótidos correspondiente (SEC ID N°: 3) de la región VJ de cadena ligera (kappa) del anticuerpo monoclonal humano AB1 con las CDR designadas.

La *Figura 5* muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 6) y la secuencia de nucleótidos correspondiente (SEC ID N°: 5) de la región VDJ de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano AB7 con las CDR designadas.

La *Figura 6* muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 8) y la secuencia de nucleótidos correspondiente (SEC ID N°: 7) de la región VJ de cadena ligera (kappa) del anticuerpo monoclonal humano AB7 con las CDR designadas.

La *Figura 7* muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 10) y la secuencia de nucleótidos correspondiente (SEC ID N°: 9) de la región VDJ de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano AB11 con las CDR designadas.

La *Figura 8* muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 12) y la secuencia de nucleótidos correspondiente (SEC ID N°: 11) de la región VJ de cadena ligera (kappa) del anticuerpo monoclonal humano AB11 con las CDR designadas.

La *Figura 9* muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 14) y la secuencia de nucleótidos correspondiente (SEC ID N°: 13) de la región VDJ de cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano AB12 con las CDR designadas.

La *Figura 10* muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 16) y la secuencia de nucleótidos correspondiente (SEC ID N°: 15) de la región VJ de cadena ligera (kappa) del anticuerpo monoclonal humano AB12 con las CDR designadas.

La *Figura 11* es un gráfico que muestra la inhibición de la unión de la IL-2 a su receptor, CD25, mediante sobrenadantes de anticuerpos monoclonales humanos AB1, AB7, AB11 y AB12 y, en comparación con la inhibición de la unión de IL-2 mediante Zenapax® (daclizumab, anticuerpo IgG1 recombinante humanizado contra CD25, Roche).

La *Figura 12* es un gráfico que muestra la inhibición de la unión de Zenapax® a CD25 mediante anticuerpos monoclonales humanos AB1, AB7, AB11 y AB12.

La *Figura 13* es un gráfico que muestra la inhibición de la proliferación de linfocitos T inducida por anticuerpos contra CD3 (usando PBMC) mediante anticuerpos monoclonales humanos AB1, AB7, AB12, en comparación con la inhibición producida por un anticuerpo de control (hlgG1/κ) y Zenapax®.

La *Figura 14* es un gráfico que muestra la inhibición de la MLR producida por anticuerpos monoclonales humanos AB1, AB7, AB12 en comparación con la inhibición producida por un anticuerpo de control (hlgG1/κ) y Zenapax®.

La *Figura 15* muestra fotografías en las que se usa un filtro de FITC para visualizar la interiorización de CD25 por parte de AB12 marcado con FITC. La *Figura 15A* muestra el resultado para los blastos T preincubados con AB12 marcado con FITC tras 18 horas de incubación a 37 °C, y la *Figura 15B* muestra el resultado para los blastos T cultivados durante 18 horas a 3 °C en presencia de AB12 marcado con FITC. A modo de comparación, la *Figura 15C* muestra el resultado para los blastos T cultivados durante 18 horas a 37 °C en presencia de anticuerpo de control de isotipo marcado con FITC (contra KHL).

La *Figura 16* muestra la interiorización de CD25 por parte de AB12 marcado con FITC medida mediante citometría de flujo, en la que una proporción de la intensidad de fluorescencia media (MFI) superior a 1 indica que la interiorización ha tenido lugar. La *Figura 16A* muestra el resultado para los blastos T preincubados con AB12 marcado con FITC a 4 °C y 37 °C, respectivamente, y la *Figura 16B* muestra el resultado para los blastos T cultivados en presencia de AB12 marcado con FITC a 4 °C y 37 °C, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona terapias basadas en anticuerpos para el tratamiento y el diagnóstico de una

variedad de trastornos en los que participan células que expresan CD25. Las terapias de la invención emplean anticuerpos monoclonales humanos aislados que se unen específicamente a un epítipo presente en CD25. Dichos anticuerpos incluyen todos los isotipos conocidos, por ejemplo, anticuerpos IgA, IgG1-4, IgE, IgM e IgD.

- 5 En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, más particularmente un isotipo IgG1, κ o IgG1, λ . En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG3, más particularmente un isotipo IgG3, κ o IgG3, λ . En otra realización más, el anticuerpo es un anticuerpo IgG4, más particularmente, un isotipo IgG4, κ o IgG4, λ . En otra realización más, el anticuerpo es un anticuerpo IgA1 o IgA2. En otra realización más, el anticuerpo es un anticuerpo IgM.
- 10 En una realización, los anticuerpos humanos se producen en un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, capaz de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos contra CD25 mediante recombinación V-D-J y conmutación isotópica. Dicho animal transgénico también puede ser un conejo transgénico para producir anticuerpos policlonales tales como los divulgados en el documento US 2003/0017534. Por consiguiente, la invención también engloba anticuerpos policlonales humanos que se unen específicamente a
- 15 CD25. Por consiguiente, los aspectos de la invención incluyen no sólo los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y composiciones farmacéuticas de los mismos, sino también animales transgénicos no humanos, linfocitos B, transfectomas de células huésped e hibridomas que producen anticuerpos monoclonales. También se proporcionan métodos de uso de los anticuerpos de la invención para bloquear o inhibir las células que expresan CD25 y son útiles en el tratamiento de trastornos asociados con CD25. Los métodos de uso de los anticuerpos de la invención
- 20 para detectar una célula que expresa CD25 están englobados por la invención.

Para facilitar la comprensión de la presente invención, primero se definen ciertos términos y expresiones. A lo largo de la descripción detallada, se exponen otras definiciones adicionales.

- 25 El término "CD25" la expresión y "antígeno CD25" se usan indistintamente en la presente memoria, e incluyen cualquier variante, isoforma y homólogo de especie de CD25 humano que son expresados de manera natural por las células o se expresan en células transfectadas con el gen CD25. Los sinónimos de CD25, como se reconoce en la técnica, incluyen antígeno CD25, p55 y Tac (activación de linfocitos T). La unión de un anticuerpo de la invención con el antígeno CD25 inhibe y/o bloquea la unión de CD25 a su ligando, a IL-2 y, concomitantemente, la función
- 30 celular resultante de la misma. Por ejemplo, en una realización, los anticuerpos humanos de la invención inhiben la proliferación de linfocitos T inducida por anticuerpos contra CD3. En otra realización, los anticuerpos monoclonales humanos inhiben la MLR.

- 35 Como se usa en la presente memoria, la expresión "inhibe el crecimiento" (por ejemplo, refiriéndose a células) pretende incluir cualquier disminución medible del crecimiento de las células cuando entra en contacto con un anticuerpo contra CD25 en comparación con el crecimiento de las mismas células que no están en contacto con un anticuerpo contra CD25, por ejemplo, la inhibición del crecimiento de un cultivo celular en al menos aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% o 100%.

- 40 Como se usan en la presente memoria, las expresiones "inhibe la unión" y "bloquea la unión" (por ejemplo, en referencia a la inhibición/el bloqueo de la unión de IL-2 a CD25) se usan indistintamente y engloban la inhibición/el bloqueo tanto parcial como total. La inhibición/el bloqueo de la unión de IL-2 a CD25 preferentemente reduce o altera el nivel normal o el tipo de señalización celular que se produce cuando IL-2 se une a CD25 sin inhibición o
- 45 bloqueo. La inhibición y el bloqueo también pretenden incluir cualquier disminución medible en la afinidad de unión de IL-2 a CD25 cuando está en contacto con un anticuerpo contra CD25 en comparación con el ligando que no está en contacto con un anticuerpo contra CD25, por ejemplo, el bloqueo de la unión de IL-2 a CD25 en al menos aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99% o 100%.

- 50 El término "anticuerpo", como se usa en la presente memoria, incluye anticuerpos intactos y cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, "parte de unión al antígeno") o cadena sencilla del mismo. Un "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de tipo disulfuro, o una parte de unión al antígeno de la misma. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente memoria como V_H) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera está compuesta de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente
- 55 memoria como V_L) y una región constante de cadena ligera. Las regiones V_H y V_L se pueden dividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino-terminal hasta el carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio
- 60 de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

- 65 La expresión "parte de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "parte de anticuerpo"), como se usa en la presente memoria, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, CD25). Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un

anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo intacto o de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos en la expresión "parte de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región bisagra, (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv que consiste de un dominio V_L y V_H ; (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341: 544-546), que consiste en un dominio V_H ; (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada y (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas que opcionalmente pueden estar unidas por un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes separados, se pueden unir, a través de métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permita que se compongan como una cadena proteica sencilla en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo Bird *et al.* (1988) *Science* 242: 423-426; y Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EE.UU., 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena sencilla también pretenden estar comprendidos en la expresión "parte de unión al antígeno" de un anticuerpo. Un ejemplo adicional es el de las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión que está fusionado con un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región bisagra y (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región constante CH2. El polipéptido de dominio de unión puede ser una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se divulgan más detalladamente en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, y los fragmentos se rastrean para su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

El término "epítipo" significa un determinante proteico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Habitualmente, los epítipos consisten en agrupamientos químicamente tensioactivos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares, y normalmente tienen características tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos configuracionales y no configuracionales se distinguen en que se pierde la unión a los primeros pero no a los segundos mediante el tratamiento con disolventes desnaturizantes.

La expresión "molécula biespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, un péptido, o un complejo proteico o peptídico, que tiene dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula se puede unir o interactuar con (a) un antígeno de superficie celular y (b) un receptor Fc en la superficie de una célula efectora.

La expresión "molécula multiespecífica" o "molécula heteroespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, un péptido, o un complejo proteico o peptídico, que tiene más de dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula se puede unir o interactuar con (a) un antígeno de superficie celular y (b) un receptor Fc sobre la superficie de una célula efectora y (c) al menos otro componente. Por consiguiente, la invención incluye, pero sin limitación, moléculas biespecíficas, trispecíficas, tetraspecíficas y otras moléculas multiespecíficas que están dirigidas a CD25 y a otras dianas tales como receptores de Fc en las células efectoras.

La expresión "anticuerpos biespecíficos" también incluye diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios V_H y V_L se expresan en una cadena polipeptídica sencilla, pero usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, obligando así a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU., 90: 6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2: 1121-1123).

La expresión "derivados de anticuerpos humanos" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

La expresión "anticuerpo humano", como se usa en la presente memoria, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención también pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en la presente memoria, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se hayan injertado en secuencias flanqueantes humanas.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usan en la presente memoria, se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular sencilla. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una sola especificidad de unión y afinidad por un determinado epítipo. Por consiguiente, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una sola especificidad de unión que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un

hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal no humano transgénico o transcromosómico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.

5 La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en la presente memoria, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos (descrito más detalladamente en el Apartado I que figura a continuación), (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el
10 anticuerpo, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de un banco combinatorio de anticuerpos humanos recombinantes y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos
15 humanos recombinantes se pueden someter a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de y están relacionadas con secuencias de V_H y V_L de línea germinal humana, pueden no existir de manera natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

20 El término "transfectoma", como se usa en la presente memoria, incluye células huésped eucariotas recombinantes que expresan el anticuerpo, tales como células CHO, células NS/O, células HEK293, células vegetales u hongos, incluyendo células de levadura.

25 Como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo heterólogo" se define en relación con el organismo no humano transgénico que produce dicho anticuerpo. Esta expresión se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico codificante correspondiente a la encontrada en un organismo que no consiste en el animal no humano transgénico y, generalmente, de una especie distinta de la del animal no humano transgénico.

30 Un "anticuerpo aislado", como se usa en la presente memoria, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a CD25 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de CD25). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, una isoforma o una variante de CD25 humano puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos
35 relacionados, por ejemplo, de otras especies (por ejemplo, homólogos de especie de CD25). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o compuestos químicos. En una realización de la invención, una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" que tienen diferentes especificidades se combinan en una composición bien definida.

40 Como se usa en la presente memoria, "unión específica" se refiere a la unión de un anticuerpo con un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad correspondiente a una K_D de aproximadamente 10^{-8} M o menor, tal como 10^{-9} M o menor, de aproximadamente 10^{-10} M o menor, o aproximadamente 10^{-11} M o menor determinada mediante tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un instrumento BIAcore 3000 con el uso de IL-2R α recombinante como ligando y el anticuerpo como analito, y se une con el antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una K_D que es al menos diez órdenes de magnitud inferior, preferentemente 100 órdenes de magnitud inferior a su afinidad de unión con un antígeno inespecífico (por ejemplo, ASB, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan
45 indistintamente en la presente memoria junto con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente con un antígeno".

50 El término " k_d " (s^{-1}), como se usa en la presente memoria, pretende referirse a la constante de velocidad de equilibrio de disociación de una determinada interacción entre un anticuerpo y un antígeno. Dicho valor también se denomina valor k_{off} .

55 El término " k_a " ($M^{-1} \times s^{-1}$), como se usa en la presente memoria, pretende referirse a la constante de velocidad de equilibrio de asociación de una determinada interacción entre un anticuerpo y un antígeno.

60 El término " K_D " (M), como se usa en la presente memoria, pretende referirse a la constante de equilibrio de disociación de una determinada interacción entre un anticuerpo y un antígeno.

El término " K_A " (M^{-1}), como se usa en la presente memoria, pretende referirse a la constante de equilibrio de asociación de una determinada interacción entre un anticuerpo y un antígeno, y se obtiene dividiendo k_a entre k_d .

65

Como se usa en la presente memoria, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificado por genes de región constante de cadena pesada.

Como se usa en la presente memoria, "conmutación isotípica" se refiere al fenómeno mediante el que la clase, o el isotipo, de un anticuerpo cambia de una clase de Ig a una de las otras clases de Ig.

Como se usa en la presente memoria, "isotipo no conmutado" se refiere a la clase isotípica de cadena pesada que se produce cuando no ha tenido lugar una conmutación isotípica; el gen CH que codifica el isotipo no conmutado es típicamente el primer gen CH inmediatamente secuenciado abajo del gen VDJ funcionalmente reordenado. La conmutación isotípica se ha clasificado como conmutación isotípica clásica o no clásica. La conmutación isotípica clásica se produce mediante recombinaciones que implican al menos una región de secuencia de cambio en el transgén. Se puede producir una conmutación isotípica no clásica, por ejemplo, mediante recombinación homóloga entre σ_{μ} humana y Σ_{μ} humana (deleción asociada con δ). Pueden aparecer mecanismos de conmutación no clásica alternativos, tales como recombinación intertransgénica y/o intercromosómica, entre otros, y efectuarse una conmutación isotípica.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "secuencia de conmutación" se refiere a las secuencias de ADN responsables de una recombinación de conmutación. Una secuencia "donante de la conmutación", típicamente una región de conmutación μ , estará 5' (es decir, secuencia arriba) de la región de construcción que se vaya a eliminar durante la recombinación de conmutación. La región "acceptora de la conmutación" estará entre la región de construcción que se vaya a eliminar y la región constante de reemplazo (por ejemplo, γ , ϵ , etc.).

Como se usa en la presente memoria, "patrón de glucosilación" se define como el patrón de unidades de carbohidratos que se unen covalentemente con una proteína, más específicamente con una proteína de inmunoglobulina (anticuerpo). Un patrón de glucosilación de un anticuerpo heterólogo puede caracterizarse como sustancialmente similar a patrones de glucosilación que se producen de forma natural en anticuerpos producidos por la especie del animal transgénico no humano, cuando un experto habitual en la técnica reconocería el patrón de glucosilación del anticuerpo heterólogo como más similar a dicho patrón de glucosilación en la especie del animal transgénico no humano que en la especie de la que se obtuvieron los genes CH del transgén.

La expresión "de origen natural", como se usa en la presente memoria aplicado a un objeto, se refiere al hecho de que el objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo (incluyendo virus) que se puede aislar de la naturaleza y que no se ha modificado intencionadamente por el hombre en el laboratorio es de origen natural.

El término "reordenado", como se usa en la presente memoria, se refiere a una configuración de un locus de inmunoglobulina de cadena pesada o cadena ligera en el que un segmento V está situado inmediatamente adyacente a un segmento D-J o J en una configuración que codifica esencialmente un dominio V_H o V_L completo, respectivamente. Un locus de gen de inmunoglobulina reordenado (anticuerpo) se puede identificar comparándolo con ADN de línea germinal; un locus reordenado tendrá al menos un elemento de homología de heptámero/nonámero recombinado.

La expresión "no reordenado" o "configuración de línea germinal", como se usa en la presente memoria en referencia a un segmento V, se refiere a la configuración en la que el segmento V no está recombinado de modo que sea inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

La expresión "molécula de ácido nucleico", como se usa en la presente memoria, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser bicatenaria o monocatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario.

La expresión "molécula de ácido nucleico aislada", como se usa en la presente memoria en referencia a ácidos nucleicos que codifican anticuerpos completos o partes de anticuerpos (por ejemplo, V_H , V_L , CDR3) que se unen a CD25, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo intacto o parte de anticuerpo están libres de otras secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos completos o partes de anticuerpo que se unen a antígenos distintos de CD25, pudiendo flanquear de forma natural dichas otras secuencias el ácido nucleico en ADN genómico humano. En una realización, el anticuerpo contra CD25 humano incluye las regiones de aminoácidos variables de cadena pesada (V_H) y cadena ligera (V_L) de AB1, AB7, AB11 o AB12 codificados por las secuencias de nucleótidos mostradas en SEC ID N°: 1, 5, 9 o 13 y SEC ID N°: 3, 7, 11 o 15, respectivamente.

Como se divulga y reivindica en la presente memoria, las secuencias expuestas en SEC ID N°: 1-40 incluyen "modificaciones de secuencia conservadoras", es decir, modificaciones de secuencias de nucleótidos y aminoácidos que no afectan ni alteran significativamente las características de unión del anticuerpo codificado por la secuencia de nucleótidos o que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones de secuencia conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y eliminaciones de nucleótidos y aminoácidos. Se pueden introducir modificaciones en las SEC ID N°: 1-40 mediante técnicas convencionales conocidas en la materia, tales como mutagénesis dirigida

y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras incluyen aquéllas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un residuo de aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo contra CD25 humano se reemplaza preferentemente por otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral.

La presente invención también engloba "derivados" de las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 17-40, y las modificaciones de secuencia conservadoras de las mismas, en las que uno o más de los residuos de aminoácido han sido derivatizados, por ejemplo, mediante acilación o glucosilación, sin afectar ni alterar significativamente las características de unión del anticuerpo con CD25.

Además, la presente invención comprende anticuerpos en los que se han realizado una o más alteraciones en la región Fc para cambiar las propiedades funcionales o farmacocinéticas de los anticuerpos. Dichas alteraciones pueden producir una reducción o un aumento de la unión de C1q y CDC o de la unión de FcγR y la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Se pueden hacer sustituciones, por ejemplo, en uno o más de los residuos de aminoácido situados en las posiciones 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 de la región constante de cadena pesada, provocando de este modo una alteración en una función efectora mientras que se conserva la capacidad para unirse con el antígeno en comparación con el anticuerpo no modificado, cf. documentos US 5.624.821 y US 5.648.260. Además, se puede consultar el documento WO 00/42072, que divulga anticuerpos con regiones Fc modificadas que aumentan la ADCC y el documento WO 94/29351, que divulga anticuerpos que tienen mutaciones en la región N-terminal del dominio CH2 que modifican la capacidad de los anticuerpos para unirse a FcRI, disminuyendo así la capacidad de los anticuerpos para unirse a C1q lo que, a su vez, disminuye la capacidad de los anticuerpos para fijar complementos. Además Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* (2001), 276: 6591-6604 enseñan variantes de combinación, por ejemplo, T256A/S298A, S298A/E333A y S298A/E333A/K334A para mejorar la unión de FcγRIII.

La semivida *in vivo* de los anticuerpos también se puede mejorar modificando el epítipo del receptor natural del dominio constante de Ig o un dominio constante de tipo Ig de modo que la molécula no comprenda un dominio CH2 intacto o una región Fc de Ig intacta, cf. documentos US 6.121.022 y US 6.194.551. La semivida *in vivo* se puede aumentar además realizando mutaciones en la región Fc, por ejemplo, sustituyendo treonina por leucina en la posición 252, sustituyendo treonina por serina en la posición 254 o sustituyendo treonina por fenilalanina en la posición 256, cf. documento US 6.277.375.

Además, se puede modificar el patrón de glucosilación de los anticuerpos para cambiar la función efectora de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden expresar en un transfectoma que no añada la unidad de fucosa normalmente unida por carbohidrato a Asn en la posición 297 de Fc para potenciar la afinidad de Fc por FcγRIII que, a su vez, daría como resultado un aumento de la ADCC de los anticuerpos en presencia de linfocitos NK, cf. Shield *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.*, 277: 26733. Además, se puede realizar una modificación de galactosilación para modificar la CDC. También se puede consultar el documento WO 99/54342 y Umana *et al.*, *Nat. Biotechnol.* (1999) 17: 176 que divulga una línea celular CHO diseñada genéticamente para expresar GntIII que produce la expresión de anticuerpos monoclonales con glucoformas modificadas y una mejor actividad ADCC.

Además, los fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, los fragmentos Fab, de la invención se pueden pegar para aumentar la semivida. Esto se puede llevar a cabo mediante reacciones de pegilación conocidas en la técnica, según lo descrito, por ejemplo, en "Focus on Growth Factors", (1992) 3:4-10; EP 154 316 y EP 401 384.

Como alternativa, en otra realización, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante de anticuerpo contra CD25, tal como por mutagénesis de saturación, y los anticuerpos contra CD25 modificados resultantes se pueden rastrear con respecto a la actividad de unión.

Por consiguiente, los anticuerpos codificados por las secuencias de nucleótidos (de región variable de cadena pesada y ligera) divulgadas en la presente memoria y/o que contienen las secuencias de aminoácidos (de región variable de cadena pesada y ligera) reveladas en la presente memoria (es decir, SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 17-40) incluyen anticuerpos sustancialmente similares codificados por o que contienen secuencias similares que se han modificado de forma conservadora. Más adelante, se proporciona un análisis adicional sobre cómo se pueden generar dichos anticuerpos sustancialmente similares basándose en las secuencias parciales (es decir, de regiones variables de cadena pesada y ligera) divulgadas en la presente memoria como SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 17-40.

Para secuencias de nucleótidos y aminoácidos, el término "homología" indica el grado de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos cuando se alinean óptimamente y se comparan con inserciones o

eliminaciones apropiadas. Como alternativa, existe homología sustancial cuando los segmentos de ADN se hibridan en condiciones de hibridación selectivas con el complemento de la cadena. El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, porcentaje de homología = N° de posiciones idénticas/ N° total de posiciones $\times 100$), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para conseguir el alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden realizar usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no restrictivos que figuran más adelante.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar usando el programa GAP del paquete informático GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 o 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos también se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4: 11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48: 444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP del paquete informático GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Las secuencias de ácido nucleico y proteínas se pueden usar además como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda en bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Dichas búsquedas se pueden realizar con los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-10. Las búsquedas de nucleótidos de BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de cadena = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas proteicas de la invención. Para obtener alineamientos con huecos a efectos comparativos, se puede utilizar BLAST con huecos como se describe en Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25 (17): 3389-3402. Cuando se utilizan los programas de BLAST y BLAST con huecos, se pueden usar los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en una forma sustancialmente pura o parcialmente purificada. Un ácido nucleico está "aislado" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se separa mediante purificación de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas convencionales, incluyendo tratamiento con SDS/alcalino, gradiente de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras técnicas bien conocidas en la materia. Véase, F. Ausubel, *et al.*, ed. "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York (1987).

Las composiciones de ácido nucleico de la presente invención, aunque con frecuencia están en una secuencia nativa (excepto para los sitios de restricción modificados y similares), bien de ADNc, genómicos o de mezclas de los mismos, se pueden mutar de acuerdo con técnicas convencionales para proporcionar secuencias génicas. Para secuencias codificantes, estas mutaciones pueden afectar a la secuencia de aminoácidos según se desee. En particular, se contemplan secuencias de ADN sustancialmente homólogas a o derivadas de conmutaciones, constantes, V, D, J, nativas y otras secuencias tales como las descritas en la presente memoria (en las que "derivada" indica que una secuencia es idéntica a o modificada de otra secuencia).

Un ácido nucleico está "ligado operativamente" cuando se sitúa en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o un potenciador está ligado operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia. Con respecto a la transcripción de secuencias reguladoras, ligado operativamente significa que las secuencias de ADN que ligadas están contiguas y, cuando sea necesario para unir dos regiones codificantes proteicas, están contiguas y en marco de lectura. Para las secuencias de conmutación, ligadas operativamente indica que las secuencias son capaces de efectuar recombinación de conmutación.

El término "vector", como se usa en la presente memoria, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha ligado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de realizar una replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped tras su introducción en la célula huésped y, de este modo, se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que se ligan de forma operativa. Dichos vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión útiles en técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en

forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, los términos "plásmido" y "vector" se pueden usar indistintamente, puesto que el plásmido es la forma de vector más habitualmente usada. Sin embargo, la invención pretende incluir dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados defectuosos en replicación), que cumplen funciones equivalentes.

5 La expresión "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), como se usa en la presente memoria, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debería entenderse que dichas expresiones pretenden referirse no solamente a la célula en cuestión, sino a los descendientes de dicha célula. Debido a que se pueden producir ciertas modificaciones en generaciones sucesivas
10 debido a mutación o influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, no ser idéntica a la célula precursora, pero aún así se incluye dentro del alcance de la expresión "célula huésped" como se usa en la presente memoria. Las células huésped recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas tales como células CHO y células NS/O.

15 Como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. La expresión "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos tales como primates no humanos, ovejas, perro, vaca, pollos, anfibios, reptiles, etc.

20 La expresión "animal no humano transgénico" se refiere a un animal no humano que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes o transcromosomas de cadena pesada y/o ligera humana (bien integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es capaz de expresar anticuerpos completamente humanos. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén de cadena ligera humana y bien un transgén de cadena pesada humana o un transcromosoma de cadena pesada humana, de modo que el ratón produzca anticuerpos humanos contra CD25 cuando sea inmunizado con antígeno CD25 y/o células que expresan CD25. El
25 transgén y/o el transcromosoma de cadena pesada y cadena ligera humana se pueden integrar en el ADN cromosómico del ratón o mantenerse extracromosómicamente. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos (denominados en conjunto en la presente memoria "ratones transgénicos") son capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos contra CD25 (por ejemplo, IgG, IgA, IgM, IgD y/o IgE) experimentando recombinación V-D-J y conmutación isotípica. El animal no humano transgénico también se puede
30 usar para la producción de un anticuerpo específico contra CD25 mediante la introducción de genes que codifican dicho anticuerpo específico contra CD25, por ejemplo, ligando operativamente los genes a un gen que se exprese en la leche del animal. En los siguientes apartados, se describen diversos aspectos de la invención más detalladamente.

35 I. Producción de anticuerpos humanos contra CD25

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención se pueden producir mediante una diversidad de técnicas, incluyendo la metodología de anticuerpos monoclonales convencional, por ejemplo, la técnica convencional de
40 hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Aunque se prefieren procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpo monoclonal, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B o técnicas de presentación de fagos usando bancos de genes de anticuerpos humanos.

45 El sistema animal preferido para preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos es el sistema murino. La producción de hibridoma en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Se conocen en la técnica protocolos de inmunización y técnicas para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión. También se conocen parejas de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión.

50 En una realización preferida, se pueden generar anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra CD25 usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmune humano en vez del sistema murino. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones que se denominan en la presente memoria ratones HuMAb, por ejemplo, ratones Hco7 y Hco12, y ratones KM, respectivamente, siendo denominados colectivamente en la presente memoria "ratones transgénicos".

55 El ratón HuMAb contiene un minilocus de gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y ligera κ humanas no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que desactivan los loci endógenos de cadena μ y κ (Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368 (6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones muestran una reducción de la expresión de IgM de ratón o de la cadena ligera κ y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos, experimentan
60 conmutación de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG, κ humanos de alta afinidad (Lonberg, N. *et al.* (1994), *supra*; revisado en Lonberg, N. (1994) "Handbook of Experimental Pharmacology", 113: 49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci* 764: 536-546). La preparación de ratones HuMAb se describe detalladamente en Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20: 6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647-656;
65 Tuailon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152: 2912-2920; Lonberg *et al.*, (1994) *Nature* 368 (6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) "Handbook of Experimental Pharmacology", 113:49-101; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6:

579-591; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93; Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci* 764: 536-546; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851. Véanse además los documentos US 5.545.806; US 5.569.825; US 5.625.126; US 5.633.425; US 5.789.650; US 5.877.397; US 5.661.016; US 5.814.318; US 5.874.299; y US 5.770.429; todos de Lonberg y Kay, así como el documento US 5.545.807 de Surani *et al.*; documentos WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 y WO 01/09187.

Los ratones HCo7 tienen una interrupción JKD en sus genes endógenos de cadena ligera (kappa) (según lo descrito en Chen *et al.*, (1993) *EMBO J.* 12: 821-830), una interrupción CMD en sus genes endógenos de cadena pesada (según lo descrito en el Ejemplo 1 del documento WO 01/14424), un transgén de cadena ligera kappa humana KCo5 (según lo descrito en Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851) y un transgén de cadena pesada humana HCo7 (según lo descrito en el documento US 5.770.429).

Los ratones HCo 12 tienen una interrupción JKD en sus genes endógenos de cadena ligera (kappa) (según lo descrito en Chen *et al.*, (1993) *EMBO J.* 12: 821-830), una interrupción CMD en sus genes endógenos de cadena pesada (según lo descrito en el Ejemplo 1 del documento WO 01/14424 de Korman *et al.*), un transgén de cadena ligera kappa humana KCo5 (según lo descrito en Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851) y un transgén de cadena pesada humana HCo12 (según lo descrito en Ejemplo 2 del documento WO 01/14424 de Korman *et al.*). En la cepa murina KM, se ha interrumpido homocigóticamente el gen endógeno de cadena ligera kappa murina según lo descrito en Chem *et al.*, (1993) *EMBO J.* 12: 811-820 y el gen endógeno de cadena pesada murina según lo descrito en el Ejemplo 1 del documento WO 01/09187. Esta cepa murina porta un transgén de cadena ligera kappa humana, KCo5, según lo descrito en Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology*, 14: 845-851. Esta cepa murina también porta un transcromosoma de cadena pesada humana compuesto del fragmento del cromosoma 14 hCF (SC20) según lo descrito en el documento WO 02/43478.

Inmunizaciones

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos contra CD25, se pueden inmunizar ratones transgénicos o transcromosómicos que contengan genes de inmunoglobulina humana (por ejemplo, ratones HCo12, HCo7 o KM) con una preparación enriquecida de antígeno CD25, CD25 recombinante y/o células que expresan CD25, según lo descrito, por ejemplo, en Lonberg *et al.* (1994), *supra*; Fishwild *et al.* (1996), *supra* y documento WO 98/24884. Alternativamente, los ratones se pueden inmunizar con ADN que codifica CD25 humano. Preferentemente, los ratones tendrán de 6-16 semanas de vida tras la primera infusión. Por ejemplo, se puede usar una preparación enriquecida del antígeno CD25 o antígeno CD25 recombinante para inmunizar los ratones HuMAb por vía intraperitoneal. En el caso de que las inmunizaciones que usan una preparación purificada o enriquecida del antígeno CD25 no produzcan anticuerpos, también es posible inmunizar los ratones con células que expresan CD25, por ejemplo, una línea celular, para promover respuestas inmunes.

La experiencia acumulada con diversos antígenos ha demostrado que los ratones transgénicos HuMAb responden mejor cuando se inmunizan inicialmente por vía intraperitoneal (IP) o por vía subcutánea (SC) con células que expresan CD25 en adyuvante completo o incompleto de Freund, seguido de inmunizaciones IP (hasta un total de 10) con células que expresan CD25, por ejemplo, en solución salina tamponada con fosfato (PBS). La respuesta inmune se puede controlar a lo largo del protocolo de inmunización obteniéndose muestras de suero por extracción de sangre retroorbital. Se puede rastrear el suero mediante análisis de FACS (como se describe más adelante) y se pueden usar ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana contra CD25 para fusiones. Los ratones se pueden estimular por vía intravenosa con células que expresan CD25 3 y 2 días antes, sacrificarlos y extirpar el bazo y los ganglios linfáticos.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos contra CD25

Para generar hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos contra el CD25 humano, se pueden aislar esplenocitos y células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarlos con una línea celular inmortalizada apropiada tal como una línea celular de mieloma de ratón. A continuación, se pueden rastrear los hibridomas resultantes con respecto a la producción de anticuerpos específicos del antígeno. Por ejemplo, se pueden fusionar suspensiones de células sencillas de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con células de mieloma SP2/0-Ag14 (ATCC, CRL 1581) con PEG al 50% (p/v). Las células se pueden sembrar a aproximadamente 1×10^5 por pocillo en placa de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene, además de los reactivos habituales, suero clonal fetal al 10%, factor de clonación de hibridomas Origen 5 (IGEN) y 1 x HAT (Sigma). Después de aproximadamente dos semanas, se pueden cultivar las células en medio en el que se reemplaza HAT por HT (Sigma). Luego se puede rastrear cada pocillo mediante ELISA con respecto a los anticuerpos que contienen la cadena ligera kappa humana y mediante análisis de FACS usando células que expresan CD25 con respecto a la especificidad de CD25. Una vez que se produce el crecimiento extensivo del hibridoma, se pueden rastrear los clones en cuanto a la producción de IgG, habitualmente tras 7-10 días. Se pueden volver a sembrar los hibridomas que secretan anticuerpos en placas, rastrearlos de nuevo y si aún son positivos en IgG humana, se pueden subclonar los anticuerpos monoclonales contra CD25 al menos dos veces por dilución limitante. A continuación, se pueden cultivar los subclones estables *in vitro* para generar anticuerpo en

medio de cultivo tisular para su caracterización.

Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales humanos contra CD25

- 5 Los anticuerpos humanos de la invención también se pueden producir en un transfectoma de células huésped usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como se conoce bien en la técnica (Morrison, S. (1985) *Science* 229: 1202).

10 Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o los fragmentos de anticuerpos de los mismos, se pueden obtener ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas parciales o de longitud completa mediante técnicas estándar de biología molecular (por ejemplo, amplificación por PCR, mutagénesis dirigida) y se pueden insertar en vectores de expresión de modo que los genes se ligan operativamente a secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, la expresión "ligado operativamente" pretende significar que un gen de anticuerpo se liga en un vector de modo que las secuencias de control de la transcripción y la traducción del vector realizan su función pretendida de regulación de la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan para que sean compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo se pueden insertar en vectores separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante métodos estándar (por ejemplo, unión de los sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen de anticuerpo y vector, o unión de extremos romos si no hay sitios de restricción presentes). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden usar para crear genes de anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolas en vectores de expresión que ya codifican las regiones constantes de cadena pesada y las regiones constantes de cadena ligera del isotipo deseado, de modo que el segmento V_H se ligue operativamente al/los segmento/s C_H en el vector, y el segmento V_L se ligue operativamente al segmento C_L en el vector. Además o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilite la secreción de la cadena de anticuerpo desde una célula huésped. El gen de la cadena de anticuerpo se puede clonar en el vector de modo que el péptido señal esté ligado en marco al terminal amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; "Gene Expression Technology". *Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se vaya a transformar, el nivel de expresión deseado de proteína, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de células de mamífero huésped incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus de simio 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y polio. Alternativamente, se pueden usar secuencias reguladoras no virales tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de β -globina.

Además de los genes de cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden portar secuencias adicionales tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, patentes de Estados Unidos N° 4.399.216; 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped dhfr con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para la selección con G418).

Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, el/los vector/es de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras se transfectan en una célula huésped mediante técnicas estándar. Las diversas formas del término "transfección" pretenden englobar una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped bien procarióticas o eucarióticas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y más preferentemente, en células huésped de mamífero, es la más preferida, porque dichas células eucarióticas y, en particular, las células de mamífero, son más propensas que las células procariotas a ensamblarse y secretar un anticuerpo plegado apropiadamente e inmunológicamente activo.

Las células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células CHO (incluyendo células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 77: 4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, según lo descrito en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159: 601-621), células de mieloma NS/0, células COS, células HEK293 y células SP2. En particular, para su uso con células de mieloma NS/0, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión génica de GS (glutamina sintetasa) divulgado en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338 841. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos se introducen en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo mediante métodos estándar de purificación de proteínas.

Medios recombinantes adicionales para producir anticuerpos monoclonales humanos contra CD25

Como alternativa, los genes de anticuerpo clonados se pueden expresar en otros sistemas de expresión, incluyendo células procariotas tales como microorganismos, por ejemplo, *E. coli* para la producción de anticuerpos Fv de cadena sencilla, algas, así como células de insecto. Además, los anticuerpos se pueden producir en animales no humanos transgénicos tales como en leche de ovejas y conejos o en huevos de gallinas, o en plantas transgénicas. Véase, por ejemplo, Verma, R., *et al.* (1998). "Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems". *J. Immunol. Meth.* 216: 165-181; Pollock, *et al.* (1999). "Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies". *J. Immunol. Meth.* 231: 147-157; y Fischer, R., *et al.* (1999). "Molecular farming of recombinant antibodies in plants". *Biol. Chem.* 380: 825-839.

Uso de secuencias de anticuerpos parciales para expresar anticuerpos intactos

Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácidos que se ubican en las seis regiones CDR de cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos de dentro de las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias de fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imiten las propiedades de anticuerpos de origen natural específicos construyendo vectores de expresión que incluyan secuencias de CDR del anticuerpo de origen natural específico injertado en secuencias flanqueantes de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véase, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321: 522-525; y Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU.*, 86: 10029-10033). Dichas secuencias flanqueantes se pueden obtener de bases de datos de ADN públicas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de línea germinal. Estas secuencias de línea germinal diferirán de las secuencias de genes de anticuerpos maduros, porque no incluirán genes variables completamente ensamblados, que se forman por unión de V(D)J durante la maduración de los linfocitos B. Las secuencias génicas de línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad que contenga mutaciones en todo el gen variable, pero típicamente agrupadas en las CDR. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente infrecuentes en la parte amino-terminal de la región flanqueante 1 y en la parte carboxi-terminal de la región flanqueante 4. Además, muchas mutaciones somáticas no alteran significativamente las propiedades de unión del anticuerpo. Por esta razón, no es necesario obtener la secuencia de ADN completa de un determinado anticuerpo para recrear un anticuerpo recombinante intacto que tenga propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (véase documento WO 99/45962). La secuencia de cadena pesada y ligera parcial que abarca las regiones CDR es típicamente suficiente para este propósito. La secuencia parcial se usa para determinar qué segmentos génicos variables y de unión de línea germinal contribuyeron a los genes variables de anticuerpo recombinados. La secuencia de línea germinal se usa después para rellenar las partes que faltan de las regiones variables. Las secuencias líder de cadena pesada y ligera se escinden durante la maduración de la proteína y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para añadir secuencias que faltan, se pueden combinar secuencias de ADNc clonadas con oligonucleótidos sintéticos mediante unión o amplificación por PCR. Alternativamente, es posible sintetizar la región variable completa como un conjunto de oligonucleótidos cortos solapantes y combinarse mediante amplificación por PCR para crear un clon de región variable completamente sintético. Este proceso tiene ciertas ventajas tales como la eliminación o la inclusión de sitios de restricción particulares, o la optimización de determinados codones.

Las secuencias de nucleótidos de transcritos de cadena pesada y ligera de hibridomas se usan para diseñar un conjunto solapante de oligonucleótidos sintéticos para crear secuencias V sintéticas con capacidades codificantes de aminoácidos idénticos como las secuencias naturales. Las secuencias de cadena pesada y kappa sintéticas pueden diferir de las secuencias naturales de tres maneras: se interrumpen hileras de bases nucleotídicas repetidas para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y la amplificación por PCR; se incorporan sitios de inicio de la traducción óptimos de acuerdo con las reglas de Kozak (Kozak, 1991, *J. Biol. Chem.* 266: 19867-19870); y se introducen mediante ingeniería genética sitios HindIII secuencia arriba de los sitios de inicio de la traducción.

Para regiones variables de cadena tanto pesada como ligera, las secuencias de cadena codificante optimizada y de cadena no codificante correspondiente se rompen en 30-50 nucleótidos aproximadamente en el punto medio del correspondiente oligonucleótido no codificante. Así pues, para cada cadena, los oligonucleótidos pueden

ensamblarse en conjuntos bicatenarios solapantes que abarcan segmentos de 150-400 nucleótidos. Los grupos se usan después como moldes para producir productos de amplificación de PCR de 150-400 nucleótidos. Típicamente, un conjunto de oligonucleótidos de región variable sencilla se romperá en dos grupos que se amplifican por separado para generar dos productos de PCR solapantes. Estos productos solapantes se combinan después

- 5 mediante amplificación por PCR para formar la región variable completa. También puede ser deseable incluir un fragmento solapante de la región constante de cadena pesada o ligera (incluyendo el sitio BbsI de la cadena ligera kappa, o el sitio AgeI de la cadena pesada gamma) en la amplificación por PCR para generar fragmentos que puedan clonarse fácilmente en las construcciones de vectores de expresión.
- 10 Las regiones variables de cadena pesada y ligera reconstruidas se combinan después con promotor clonado, secuencia líder, secuencias de inicio de la traducción, de región constante, 3' no traducidas, de poliadenilación y de terminación de la transcripción para formar construcciones de vectores de expresión. Las construcciones de expresión de cadena pesada y ligera se pueden combinar en un vector sencillo, cotransfectarse, transfectarse en serie o transfectarse por separado en células huésped que después se fusionan para formar una célula huésped que
- 15 expresa ambas cadenas.

A continuación, se puede realizar un procedimiento similar para injertar una nueva especificidad de antígeno en un anticuerpo maduro existente. Preferentemente, se selecciona un anticuerpo aceptor que proceda del mismo gen de línea germinal variable que el anticuerpo donante de CDR. Entonces se transfieren una o más CDR del anticuerpo

- 20 donante mediante las técnicas descritas anteriormente

Más adelante, se describen plásmidos ejemplares para su uso en la construcción de vectores de expresión para IgGk humana. Los plásmidos se construyeron de modo que se pudieran usar secuencias de ADNc de cadena ligera kappa V y pesada V amplificadas por PCR para reconstruir minigenes de cadena ligera y pesada completos. Estos

- 25 plásmidos se pueden usar para expresar anticuerpos IgG1,k o IgG4,k completamente humanos. Se pueden construir plásmidos similares para la expresión de otros isotipos de cadena pesada o para la expresión de anticuerpos que comprendan cadenas ligeras lambda.

Por consiguiente, en otra realización, la invención proporciona diversos procedimientos para preparar anticuerpos humanos contra CD25. En una realización, el procedimiento implica:

- 30

preparar un anticuerpo que comprende (1) regiones flanqueantes de cadena pesada humana y CDR de cadena pesada humana, en las que al menos una de las CDR de cadena pesada humana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de las CDR mostradas en las Figuras 1-10 (o

- 35 residuos de aminoácido correspondientes de las SEC ID N°: 17-19, 23-25, 29-31 o 35-37); y (2) regiones flanqueantes de cadena ligera humana y CDR de cadena ligera humana, en las que al menos una de las CDR de cadena ligera humana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de las CDR mostradas en las Figuras 1-10 (o residuos de aminoácido correspondientes de las SEC ID N°: 20-22, 26-28, 32-34 o 38-40); en las que el anticuerpo conserva la capacidad para unirse a CD25.

- 40 La capacidad del anticuerpo para unirse a CD25 se puede determinar mediante ensayos de unión convencionales tales como los expuestos en los ejemplos (por ejemplo, un análisis de FACS).

Puesto que se conoce bien en la técnica que los dominios CDR3 de cadena ligera y pesada de anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno, los anticuerpos recombinantes preparados según lo expuesto anteriormente comprenden preferentemente las CDR3 de cadena pesada y ligera de AB1, AB7, AB11 o AB12. Los anticuerpos pueden comprender además las CDR2 de AB1, AB7, AB11 o AB12. Los anticuerpos pueden comprender además las CDR1 de AB1, AB7, AB11 o AB12. Por consiguiente, la invención proporciona además anticuerpos contra CD25 que comprenden: (1) regiones

- 45 flanqueantes de cadena pesada humana, una región CDR1 de cadena pesada humana, una región CDR2 de cadena pesada humana y una región CDR3 de cadena pesada humana, siendo la región CDR3 de cadena pesada humana la CDR3 de AB1, AB7, AB11 o AB12 como se muestra en las Figuras 1-10 (o residuos de aminoácido correspondientes mostrados en las SEC ID N°: 19, 25, 31 o 37); y (2) regiones flanqueantes de cadena ligera humana, una región CDR1 de cadena ligera humana, una región CDR2 de cadena ligera humana y una región
- 50 CDR3 de cadena ligera humana, siendo la región CDR3 de cadena ligera humana la CDR3 de AB1, AB7, AB11 o AB12 como se muestra en las Figuras 1-10 (o residuos de aminoácido correspondientes mostrados en las SEC ID N°: 22, 28, 34 o 40), uniéndose el anticuerpo a CD25. El anticuerpo puede comprender además la CDR2 de cadena pesada y/o CDR2 de cadena ligera de AB1, AB7, AB11 o AB12. El anticuerpo puede comprender además la CDR1 de cadena pesada y/o la CDR1 de cadena ligera de AB1, AB7, AB11 o AB12.

- 60 Preferentemente, la CDR1, 2 y/o 3 de los anticuerpos obtenidos mediante ingeniería genética descritos anteriormente comprenden la/s secuencia/s de aminoácidos exactas de AB1, AB7, AB11 o AB12 divulgadas en la presente memoria. Sin embargo, el experto habitual en la técnica apreciará que es posible una cierta desviación de las secuencias de CDR exactas de AB1, AB7, AB11 o AB12 manteniendo aún la capacidad del anticuerpo para unirse a CD25 de forma eficaz (por ejemplo, sustituciones conservadoras). Por consiguiente, en otra realización, el anticuerpo obtenido mediante ingeniería genética puede estar compuesto de una o más CDR que son, por ejemplo,
- 65

un 90%, 95%, 98% o 99,5% homólogas a una o más CDR de AB1, AB7, AB11 o AB12.

Además de o alternativamente a unirse simplemente a CD25, los anticuerpos obtenidos mediante ingeniería genética tales como los descritos anteriormente se pueden seleccionar con respecto a su conservación de otras propiedades funcionales de anticuerpos de la invención, tales como:

- (1) alta afinidad de unión a CD25;
- (2) inhibición o bloqueo de la unión de CD25 a IL-2;
- (3) eliminación de linfocitos T que expresan CD25;
- (4) inducción de la tolerancia en linfocitos T;
- (5) inhibición de la proliferación de los linfocitos T que expresan CD25;
- (6) inhibición de la proliferación de los linfocitos T inducida por anticuerpos contra CD3 de PBMC;
- (7) inhibición de la MLR; y/o
- (8) interiorización de CD25 expresado en los linfocitos T.

Caracterización de la unión de anticuerpos monoclonales humanos con CD25

Los anticuerpos humanos contra CD25 de la invención se pueden aislar y caracterizar de una serie de maneras diferentes. Por ejemplo, se pueden dejar crecer hibridomas en matraces adecuados para la purificación de anticuerpos monoclonales. A continuación, se pueden filtrar y concentrar los sobrenadantes antes de realizar una cromatografía de afinidad con proteína A-sefarosa (para anticuerpos de isotipo IgG1) (Pharmacia, Piscataway, NJ) o sefarosa revestida con IgG antihumana o proteína G-sefarosa en caso de anticuerpos de isotipo IgG3. Se puede comprobar la IgG eluida mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para asegurar su pureza. Se puede intercambiar la solución tamponadora en PBS y se puede determinar la concentración mediante DO₂₈₀ usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales se pueden separar en alícuotas y almacenarse a -80 °C.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales contra CD25 humanos seleccionados se unen a epítopos únicos, se puede usar la mutagénesis dirigida o multidirigida.

Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, se pueden realizar análisis ELISA de isotipos. Se pueden revestir los pocillos de placas de microtitulación con 10 µg/ml de Ig antihumana durante una noche a 4 °C. Tras bloquear con ASB al 5%, se hacen reaccionar las placas con 10 µg/ml de anticuerpos monoclonales o controles de isotipos purificados, a temperatura ambiente durante dos horas. A continuación, se pueden hacer reaccionar los pocillos con IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgE, IgA1, IgA2 humanas o sondas conjugadas con fosfatasa alcalina específicas de IgM humana. Tras lavar, se revelan las placas con sustrato pNPP (1 mg/ml) y se analizan a DO de 405 nm.

Para demostrar la presencia de anticuerpos contra CD25 en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales con células vivas que expresan CD25, se puede usar la citometría de flujo. Brevemente, se mezclan líneas de células que expresan CD25 (cultivadas en condiciones de crecimiento convencionales) con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en PBS que contiene ASB al 0,1% y azida sódica al 0,02%, y se incuban a 4 °C durante 30 minutos. Tras lavar, se hacen reaccionar las células con anticuerpo IgG anti-humano marcado con fluoresceína en las mismas condiciones que la tinción de anticuerpos primarios. Las muestras se pueden analizar mediante citometría de flujo con un citómetro de flujo (por ejemplo, instrumento FACS de Becton Dickinson) usando propiedades de dispersión de la luz y lateral para seleccionar células vivas sencillas. Se puede usar un ensayo alternativo que usa microscopía de fluorescencia además del o en lugar del ensayo de citometría de flujo. Las células se pueden teñir exactamente como se ha descrito anteriormente y examinarse por microscopía de fluorescencia. Este método permite la visualización de células individuales, pero puede tener una sensibilidad reducida dependiendo de la densidad del antígeno.

Se puede analizar además la reactividad de las IgG humanas contra CD25 con el antígeno CD25 mediante transferencia Western. Brevemente, se pueden preparar extractos celulares a partir de células que expresan CD25 y someterlos a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS). Tras la electroforesis, se transferirán los antígenos separados a membranas de nitrocelulosa, se bloquearán con leche desnatada al 20% y se sondarán con los anticuerpos monoclonales que se vayan a analizar. Es posible detectar la unión de IgG humana usando fosfatasa alcalina contra IgG humana y revelarla con comprimidos de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Inhibición de la actividad de células que expresan CD25

Además de unirse específicamente a CD25, es posible analizar la capacidad de los anticuerpos monoclonales humanos contra CD25 para inhibir diversas actividades de células tales como linfocitos T y de otros linfocitos que expresan CD25. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo ensayos de proliferación de linfocitos T mediante técnicas conocidas. En una técnica, se diluyen PBMC humanas en un medio adecuado y luego se estimulan, por ejemplo, con un anticuerpo contra CD3, antes de añadir concentraciones variables de anticuerpos experimentales para

determinar el efecto que tienen sobre la proliferación de linfocitos T. También se puede evaluar la proliferación de linfocitos T purificados en presencia de anticuerpos monoclonales contra CD3 y contra CD28.

- 5 También se pueden realizar ensayos para la MLR mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, se pueden irradiar las PBMC de un primer donante y mezclarlas con PBMC de un segundo donante. Se pueden añadir concentraciones variables de anticuerpo a las células, seguidas de la medición de la respuesta MLR.

II. Producción de animales no humanos transgénicos que generan anticuerpos monoclonales humanos contra CD25

- 10 En otra realización más, la invención proporciona animales no humanos transgénicos y transcromosómicos, tales como ratones transgénicos o transcromosómicos, que son capaces de expresar anticuerpos humanos que se unen específicamente a CD25. En una realización particular, la invención proporciona un ratón transgénico o transcromosómico que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humano, de modo que el ratón produce anticuerpos humanos contra CD25 cuando se inmuniza con células que expresan CD25. El transgén de cadena pesada humana se puede integrar en el ADN cromosómico del ratón, como sucede con los ratones transgénicos, por ejemplo, ratones HuMAb, según lo descrito detalladamente y ejemplificado en la presente memoria. Como alternativa, el transgén de cadena pesada humano se puede mantener extracromosómicamente, como es el caso de los ratones transcromosómicos (por ejemplo, KM) según lo descrito en el documento WO 02/43478. Dichos animales transgénicos y transcromosómicos son capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos contra CD25 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) experimentando una recombinación V-D-J/V-J y una conmutación isotípica. El diseño de un animal no humano transgénico o transcromosómico que responda a la estimulación con antígeno foráneo con un repertorio de anticuerpos heterólogos requiere que los transgenes de inmunoglobulina heterólogos contenidos en el animal transgénico actúen correctamente a lo largo de la ruta de desarrollo de los linfocitos B. Esto incluye, por ejemplo, la conmutación isotípica del transgén de cadena pesada heterólogo. Por consiguiente, los transgenes se construyen de modo que se pueda inducir la conmutación isotípica y una o más de las siguientes características de genes de anticuerpos: (1) expresión específica del tipo celular y de alto nivel; (2) reordenación de genes funcionales; (3) activación de y respuesta a la exclusión alélica; (4) expresión de un repertorio primario suficiente; (5) transducción de señales; (6) hipermutación somática; y (7) dominación del locus de anticuerpo transgénico durante la respuesta inmune.

- 30 No es necesario que se cumplan todos los criterios anteriores. Por ejemplo, en las realizaciones en las que los loci endógenos de inmunoglobulina del animal transgénico se interrumpen funcionalmente, el transgén no necesita activar la exclusión alélica. Además, en las realizaciones en las que el transgén comprende un gen de inmunoglobulina de cadena pesada y/o ligera funcionalmente reordenado, el segundo criterio de reordenación de genes funcionales es innecesario, al menos para ese transgén que ya está reordenado. Para consultar los antecedentes de inmunología molecular, véase, "Fundamental Immunology", II edición (1989), Paul William E., ed. Raven Press, N. Y.

- 40 En ciertas realizaciones, los animales no humanos transgénicos o transcromosómicos usados para generar los anticuerpos monoclonales humanos de la invención contienen transgenes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina heterólogos reordenados, no reordenados o una combinación de reordenados y no reordenados en la línea germinal del animal transgénico. Cada uno de los transgenes de cadena pesada comprende al menos un gen C_H . Además, el transgén de cadena pesada puede contener secuencias de conmutación isotípica funcionales, que son capaces de soportar la conmutación isotípica de un transgén heterólogo que codifica múltiples genes C_H en los linfocitos B del animal transgénico. Dichas secuencias de conmutación pueden ser las que aparecen de forma natural en el locus de inmunoglobulina de línea germinal de la especie que actúa como la fuente de los genes C_H transgénicos, o dichas secuencias de conmutación pueden derivar de las que aparecen en la especie que va a recibir la construcción de transgén (el animal transgénico). Por ejemplo, una construcción de transgén humano que se use para producir un ratón transgénico puede producir una frecuencia mayor de conmutaciones isotípicas si incorpora secuencias de conmutación similares a las que aparecen de forma natural en el locus de cadena pesada murina, ya que supuestamente las secuencias de conmutación murinas están optimizadas para actuar con el sistema de enzima recombinasa de conmutación de ratón, mientras que las secuencias de conmutación humanas no lo están. Las secuencias de conmutación se pueden aislar y clonar mediante métodos de clonación convencionales o se pueden sintetizar *de novo* a partir de oligonucleótidos sintéticos solapantes diseñados basándose en la información de secuencias publicada en relación con las secuencias de regiones de conmutación de inmunoglobulina (Mills *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 15: 7305-7316 (1991); Sideras *et al.*, *Intl. Immunol.* 1: 631-642 (1989)). Para cada uno de los animales transgénicos anteriores, se encuentran transgenes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera heterólogos funcionalmente reordenados en una fracción significativa de los linfocitos B del animal transgénico (al menos del 10%).

- 60 Los transgenes usados para generar los animales no humanos transgénicos de la invención incluyen un transgén de cadena pesada que comprende ADN que codifica al menos un segmento génico variable, un segmento génico de diversidad, un segmento génico de unión y al menos un segmento génico de región constante. El transgén de cadena ligera de inmunoglobulina comprende ADN que codifica al menos un segmento génico variable, un segmento génico de unión y al menos un segmento génico de región constante. Los segmentos génicos que codifican los segmentos génicos de cadena ligera y pesada son heterólogos para el animal transgénico, porque

derivan de, o corresponden a, ADN que codifica segmentos génicos de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de una especie que no consiste en el animal transgénico no humano. En un aspecto de la invención, el transgén se construye de modo que los segmentos génicos individuales no están reordenados, es decir, no están reordenados para codificar una cadena ligera o pesada de inmunoglobulina funcional. Dichos transgenes no reordenados soportan la recombinación de los segmentos génicos V, D y J (reordenamiento funcional) y preferentemente soportan la incorporación de todo o una parte de un segmento génico de región D en la cadena pesada de inmunoglobulina reordenada resultante dentro del animal transgénico cuando se expone a antígeno CD25.

En una realización alternativa, los transgenes comprenden un "mini-locus" no reordenado. Dichos transgenes comprenden típicamente una parte sustancial de los segmentos C, D y J, así como un subconjunto de los segmentos génicos V. En dichas construcciones de transgenes, las diversas secuencias reguladoras, por ejemplo, promotores, potenciadores, regiones de conmutación de clase, secuencias donantes de cortes y empalmes y aceptores de cortes y empalmes para procesamiento de ARN, señales de recombinación y similares, comprenden secuencias correspondientes derivadas del ADN heterólogo. Dichas secuencias reguladoras se pueden incorporar en el transgén de la misma especie o de una especie relacionada del animal no humano usado en la invención. Por ejemplo, se pueden combinar segmentos génicos de inmunoglobulina humana en un transgén con una secuencia potenciadora de inmunoglobulina de roedor para su uso en un ratón transgénico. Alternativamente, se pueden incorporar secuencias reguladoras sintéticas en el transgén, en el que dichas secuencias reguladoras sintéticas no son homólogas a una secuencia de ADN funcional conocida por aparecer de forma natural en los genomas de mamíferos. Las secuencias reguladoras sintéticas se diseñan de acuerdo con reglas de consenso tales como, por ejemplo, las que especifican las secuencias permisibles de un sitio aceptor de cortes y empalmes o un motivo promotor/potenciador. Por ejemplo, un mini-locus comprende una parte del locus genómico de inmunoglobulina que tiene al menos una eliminación interna (es decir, no en un extremo de la parte) de una parte de ADN no esencial (por ejemplo, secuencia intermedia; intrón o parte de la misma) en comparación con el locus de Ig de línea germinal de origen natural.

Los animales no humanos transgénicos y transcromosómicos preferidos, por ejemplo, ratones, mostrarán una producción de inmunoglobulina con un repertorio significativo, idealmente, sustancialmente similar al de un ser humano tras ajustar con respecto al volumen.

Lo ideal es que el repertorio se aproxime al mostrado en un ser humano cuando se ajusta con respecto al volumen, habitualmente con una diversidad del al menos aproximadamente 10% como máximo, preferentemente del 25 al 50% o mayor. Generalmente, se producirán al menos aproximadamente mil inmunoglobulinas diferentes (idealmente IgG), preferentemente de 10^4 a 10^6 o más, dependiendo del número de regiones V, J y D diferentes introducidas en el genoma murino y conducidas por la diversidad adicional generada por los reordenamientos de segmentos génicos V(-D)-J y adiciones de nucleótidos aleatorios en las regiones de unión. Típicamente, las inmunoglobulinas mostrarán una afinidad (K_D) con antígenos preseleccionados inferior a 10^{-8} M, tal como inferior a 10^{-9} M, 10^{-10} M o 10^{-11} M o incluso inferior. Los animales no humanos transgénicos y transcromosómicos, por ejemplo, ratones, según lo descrito anteriormente se pueden inmunizar, por ejemplo, con células que expresan CD25. Como alternativa, los animales transgénicos se pueden inmunizar con ADN que codifica CD25 humano. Entonces, los animales producirán linfocitos B que experimentan conmutación de clase mediante recombinación de conmutación (conmutación *cis*) y expresan inmunoglobulinas sensibles a CD25. Las inmunoglobulinas pueden ser anticuerpos humanos (también denominados "anticuerpos de secuencia humana"), en los que los polipéptidos de cadena pesada y ligera están codificados por secuencias transgénicas humanas, que pueden incluir secuencias derivadas por mutación somática y uniones recombinatorias de región V, así como secuencias codificadas en línea germinal; se puede hacer referencia a estos anticuerpos humanos como sustancialmente idénticos a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico V_L y J_L o V_H , D_H y J_H humano, incluso aunque puedan estar presentes otras secuencias de línea no germinal como resultado de mutación somática y uniones de recombinación V-J y V-D-J diferenciales. Las regiones variables de cada cadena de anticuerpo son típicamente al menos un 80 por ciento similares a los segmentos génicos V y J de línea germinal humana y, en el caso de cadenas pesadas, a los segmentos génicos V, J y D de línea germinal humana; frecuentemente, al menos un 85 por ciento similares a las secuencias de línea germinal humana presentes en el transgén; con frecuencia, un 90 o un 95 por ciento o más similares a secuencias de línea germinal humana presentes en el transgén. Sin embargo, puesto que se introducen secuencias que no son de línea germinal por mutación somática y unión de VJ y VDJ, los anticuerpos de secuencia humana frecuentemente tendrán algunas secuencias de región variable que no están codificadas por segmentos génicos V, D o J humanos como se encuentran en el transgén o los transgenes humanos en la línea germinal de los ratones. Típicamente, dichas secuencias que no son de línea germinal (o posiciones de nucleótidos individuales) se agruparán en o cerca de las CDR, o en regiones en las que se sabe que se agrupan mutaciones somáticas.

Otro aspecto de la invención incluye linfocitos B derivados de animales transgénicos o transcromosómicos no humanos como se describe en la presente memoria. Los linfocitos B se pueden usar para generar hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales humanos que se unen con alta afinidad (por ejemplo, una constante de equilibrio de disociación (K_D) inferior a 10^{-8} M) con CD25 humano. Así pues, en otra realización, la invención proporciona un hibridoma que produce un anticuerpo humano que tiene una afinidad (K_D) inferior a 10^{-8} M, tal como inferior a 10^{-9} M, 10^{-10} M o 10^{-11} M, o incluso inferior, determinada mediante análisis de scatchard de células que expresan CD25 usando un anticuerpo monoclonal marcado radiativamente o mediante la determinación de la concentración de unión semimáxima usando análisis de FACS, o mediante análisis usando resonancia de

plasmones superficiales medida en un instrumento BIAcore.

En la presente memoria, el anticuerpo monoclonal comprende una cadena ligera de secuencia humana compuesta de (1) una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia polipeptídica que es sustancialmente idéntica a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico V_L humano y un segmento J_L humano y (2) una región constante de cadena ligera codificada por un segmento génico C_L humano; y una cadena pesada de secuencia humana compuesta por (1) una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia polipeptídica que es sustancialmente idéntica a una secuencia polipeptídica codificada por un segmento génico V_H humano, una región D y un segmento J_H humano y (2) una región constante codificada por un segmento génico C_H humano. Se ha de observar que es posible modificar sustancialmente los genes D humanos mediante recombinación y mutaciones somáticas, de modo que no se pueda reconocer fácilmente la secuencia de línea germinal humana original.

El desarrollo de anticuerpos monoclonales humanos de alta afinidad contra CD25 se puede facilitar por un método para expandir el repertorio de segmentos génicos de región variable humana en un animal no humano transgénico que tenga un genoma que comprenda un transgén de inmunoglobulina humano integrado, comprendiendo dicho método introducir en el genoma un transgén de gen V que comprende segmentos génicos de región V que no están presentes en dicho transgén de inmunoglobulina humana integrado. Con frecuencia, el transgén de región V es un cromosoma artificial de levadura (YAC) que comprende una parte de una matriz de segmento génico V_H o V_L (V_K) humano, como pueden aparecer de forma natural en un genoma humano o como se pueden cortar y empalmar entre sí de forma separada por métodos recombinantes, que pueden incluir segmentos génicos V no funcionales u omitidos. Con frecuencia, al menos cinco o más segmentos génicos V funcionales están contenidos en el YAC. En esta variación, es posible crear un animal transgénico producido mediante el método de expansión de repertorio de V, en el que el animal expresa una cadena de inmunoglobulina que comprende una secuencia de región variable codificada por un segmento génico de región V presente en el transgén de región V y una región C codificada en el transgén de Ig humana. Por medio del método de expansión de repertorio de V, se pueden generar animales transgénicos que tienen al menos 5 genes V distintos; así como animales que contienen al menos aproximadamente 24 genes V o más. Algunos segmentos génicos V pueden ser no funcionales (por ejemplo, pseudogenes y similares); si se desea, estos segmentos pueden conservarse o pueden suprimirse de forma selectiva mediante métodos recombinantes disponibles para los expertos en la materia.

Una vez modificada la línea germinal de ratón mediante ingeniería genética para que contenga un YAC funcional que tenga un repertorio de segmento V expandido, sustancialmente no presente en el transgén de Ig humano que contiene los fragmentos génicos J y C, el rasgo se puede propagar y reproducir en otros contextos genéticos, incluyendo contextos en los que el YAC funcional que tiene un repertorio de segmento V expandido se reproduce en una línea germinal de animal no humano que tenga un transgén de Ig humano diferente. Se pueden reproducir múltiples YAC funcionales que tengan un repertorio de segmento V expandido en una línea germinal para actuar con un transgén de Ig humano (o múltiples transgenes de Ig humanos). Aunque, en la presente memoria, se denominan transgenes YAC, dichos transgenes, cuando se integran en el genoma, pueden carecer sustancialmente de secuencias de levadura tales como las secuencias necesarias para la replicación autónoma en levadura; dichas secuencias se pueden retirar opcionalmente mediante ingeniería genética (por ejemplo, digestión de restricción y electroforesis en gel de campo pulsado u otro método adecuado) cuando ya no sea necesaria la replicación en levadura (es decir, antes de la introducción en una célula ES murina o procigoto murino). Los métodos para propagar el rasgo de expresión de inmunoglobulina de secuencia humana incluyen criar un animal transgénico que tenga el transgén o los transgenes de Ig humanos y, opcionalmente, que también tenga un YAC funcional que tenga un repertorio de segmento V expandido. Los segmentos génicos tanto V_H como V_L pueden estar presentes en el YAC. El animal transgénico se puede criar en cualquier contexto deseado por el facultativo, incluyendo contextos que albergan otros transgenes humanos, incluyendo transgenes de Ig humanos y/o transgenes que codifican otras proteínas de linfocitos humanos. La invención también proporciona una inmunoglobulina de secuencia humana de alta afinidad producida por un ratón transgénico que tenga un transgén de YAC de repertorio de región V expandido. Aunque la información anterior describe una realización preferida del animal transgénico de la invención, se contemplan otras realizaciones que se han clasificado en tres categorías:

- I. Animales transgénicos que contienen un transgén de inmunoglobulina de cadena ligera reordenada y cadena pesada no reordenada;
- II. Animales transgénicos que contienen un transgén de inmunoglobulina de cadena ligera no reordenada y cadena pesada no reordenada; y
- III. Animal transgénico que contiene un transgén de inmunoglobulina de cadena ligera no reordenada y cadena pesada reordenada.

De estas categorías de animal transgénico, el orden preferido de preferencia es el siguiente: II > I > III cuando se han desactivado los genes endógenos de cadena ligera (o al menos el gen κ) mediante recombinación homóloga (u otro método), y I > II > III cuando no se han desactivado los genes endógenos de cadena ligera y deben dominarse mediante exclusión alélica.

III. Moléculas biespecíficas/multiespecíficas que se unen a CD25

En otra realización más de la invención, se pueden derivatizar anticuerpos monoclonales humanos contra CD25 o se pueden ligar a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento Fab') para generar una molécula biespecífica o multispecífica que se una a múltiples sitios de unión o epítopos diana. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención se puede ligar funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) con una o más moléculas de unión adicionales tales como otro anticuerpo, péptido o mimético de unión.

Por consiguiente, la presente invención incluye moléculas biespecíficas y multispecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión por CD25 y una segunda especificidad de unión por un segundo epítipo diana. En una realización particular de la invención, el segundo epítipo diana es CD3, CD4, IL-15R, TNF- α unido a la membrana o unido al receptor, o IL-15 unido a la membrana o unido al receptor. En otra realización, el segundo epítipo diana es un receptor Fc, por ejemplo, Fc γ RI humano (CD64) o Fc α RI humano (CD89), o un receptor de linfocitos T. Por lo tanto, la invención incluye moléculas biespecíficas y multispecíficas capaces de unirse tanto a Fc γ RI, Fc α RI o Fc ϵ R que expresan células efectoras (por ejemplo, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMN)), y a células diana que expresan CD25. Estas moléculas biespecíficas y multispecíficas dirigen células que expresan CD25 diana a células efectora y, como los anticuerpos monoclonales humanos de la invención, desencadenan actividades de célula efectora mediadas por el receptor de Fc, tales como fagocitosis de una célula que expresa CD25, ADCC, liberación de citocinas o generación de anión superóxido.

Las moléculas biespecíficas y multispecíficas de la invención pueden incluir además una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión contra Fc y una especificidad de unión contra CD25. En una realización, la tercera especificidad de unión es una parte contra el factor de potenciación (EF), por ejemplo, una molécula que se une a una proteína de superficie implicada en la actividad citotóxica y, por lo tanto, aumenta la respuesta inmune contra la célula diana. La "parte contra el factor de potenciación" puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se une a una molécula dada, por ejemplo, un antígeno o un receptor, y por tanto da como resultado una potenciación del efecto de los determinantes de unión para el receptor de Fc o antígeno de célula diana. La "parte contra el factor de potenciación" se puede unir a un receptor de Fc o un antígeno de célula diana. Como alternativa, la parte contra el factor de potenciación se puede unir a una entidad que es diferente de la entidad a la que se unen la primera y la segunda especificidad de unión. Por ejemplo, la parte contra el factor de potenciación se puede unir a un linfocito T citotóxico (por ejemplo, a través de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmune que genere una respuesta inmune aumentada contra la célula diana).

En una realización, las moléculas biespecíficas y multispecíficas comprenden como una especificidad de unión al menos un anticuerpo, incluyendo, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o un Fv de cadena sencilla. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o una construcción de cadena sencilla según lo descrito en Ladner *et al.*, documento US 4.946.778. El anticuerpo también puede ser una proteína de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión según lo descrito en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939.

En una realización, la especificidad de unión por un receptor de Fc es proporcionada por un anticuerpo monoclonal humano, cuya unión no está bloqueada por inmunoglobulina G (IgG) humana. Como se usa en la presente memoria, la expresión "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena γ y ubicados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas de receptor transmembrana o soluble que se agrupan en tres clases de receptor de Fc: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16). En una realización preferida, el receptor de Fc γ es un Fc γ RI de alta afinidad humano.

La producción y caracterización de estos anticuerpos monoclonales preferidos se describe en Fanger *et al.*, en el documento WO 88/00052 y en el documento US 4.954.617. Estos anticuerpos se unen a un epítipo de Fc γ RI, Fc γ RII o Fc γ RIII en un sitio que es distinto del sitio de unión a Fc γ del receptor y, por lo tanto, su unión no está bloqueada sustancialmente por niveles fisiológicos de IgG. Los anticuerpos contra Fc γ RI específicos útiles en la presente invención son mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. En otras realizaciones, el anticuerpo contra Fc γ RI es una forma humanizada de mAb 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano, R. F. *et al.* (1995) *J. Immunol.*, 155 (10): 4996-5002 y el documento WO 94/10332. La línea celular productora de anticuerpo H22 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo el 4 de noviembre de 1992 con la designación HA022CL1 y tiene el N° de acceso CRL 11177.

En otras realizaciones preferidas más, la especificidad de unión por un receptor Fc es proporcionada por un anticuerpo que se une a un receptor de IgA humano, por ejemplo, Fc α RI (CD89), cuya unión preferentemente no está bloqueada por inmunoglobulina A (IgA) humana. La expresión "receptor de IgA" pretende incluir el producto génico de un gen α (Fc α RI) ubicado en el cromosoma 19. Este gen es conocido por codificar varias isoformas de transmembrana con corte y empalme alternativo de 55 a 110 kDa. Fc α RI (CD89) se expresa de forma constitutiva en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinófilos y neutrófilos, pero no en poblaciones de células no efectoras. Fc α RI tiene afinidad media tanto por IgA1 como por IgA2, que aumenta tras la exposición a citocinas tales como G-CSF o

GM-CSF (Morton, H. C. *et al.* (1996), "Critical Reviews in Immunology", 16: 423-440). Se han descrito cuatro anticuerpos monoclonales específicos de Fc α RI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que se unen a Fc α RI fuera del dominio de unión al ligando de IgA (Monteiro, R. C. *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148: 1764).

Fc α RI y Fc γ RI son los receptores desencadenantes preferidos para su uso en la invención debido a que (1) se expresan principalmente en células efectoras inmunes, por ejemplo, monocitos, PMN, macrófagos y células dendríticas; (2) se expresan a altos niveles (por ejemplo, 5.000-100.000 por célula); (3) son mediadores de actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis); y (4) median la presentación antigénica potenciada de los antígenos, incluyendo autoantígenos, dirigidos a ellos.

Un "anticuerpo específico de célula efectora", como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo funcional que se une al receptor de Fc de células efectoras. Los anticuerpos preferidos para su uso en la presente invención se unen al receptor de Fc de células efectoras en un sitio que no está unido por inmunoglobulina endógena.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "célula efectora" se refiere a una célula inmune que está implicada en la fase efectora de una respuesta inmune, a diferencia de las fases cognitivas y de activación de una respuesta inmune. Las células inmunes ejemplares incluyen una célula de origen mieloide o linfóide, por ejemplo, linfocitos (por ejemplo, linfocitos B y linfocitos T, incluyendo linfocitos T citolíticos (CTL)), linfocitos citolíticos, linfocitos citolíticos naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleares, granulocitos, mastocitos y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores de Fc específicos y llevan a cabo funciones inmunes específicas. En realizaciones preferidas, una célula efectora es capaz de inducir ADCC, por ejemplo, un neutrófilo capaz de inducir ADCC. Por ejemplo, los monocitos, macrófagos, que expresan FcR están implicados en la destrucción específica de células diana y la presentación de antígenos a otros componentes del sistema inmune, o la unión a células que presentan antígenos. En otras realizaciones, una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana, una célula diana o un microorganismo. La expresión de un FcR particular en una célula efectora puede ser regulada por factores humorales tales como citocinas. Por ejemplo, se ha descubierto que la expresión de Fc γ RI se suprarregula mediante interferón gamma (IFN- γ). Esta expresión potenciada aumenta la actividad citotóxica de las células que portan Fc γ RI contra dianas. Una célula efectora puede fagocitar o lisar un antígeno diana o una célula diana.

"Célula diana" significará cualquier célula de un sujeto (por ejemplo, una ser humano o un animal) a la que se pueda dirigir una composición (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humano, una molécula biespecífica o una molécula multiespecífica) de la invención. En realizaciones preferidas, la célula diana es una célula que expresa o sobreexpresa CD25. Las células que expresan CD25 típicamente incluyen linfocitos B activados, monocitos y linfocitos B.

Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas se pueden preparar mediante técnicas químicas (véase, por ejemplo, D. M. Kranz *et al.* (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 78:5807), técnicas de "polidoma" (Véase el documento US 4.474.893, concedido a Reading) o técnicas de ADN recombinante.

En particular, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la presente invención se pueden preparar conjugando las especificidades de unión constituyentes, por ejemplo, las especificidades de unión contra FcR y contra CD25, usando métodos conocidos en la técnica y descritos en los ejemplos proporcionados en la presente memoria. Por ejemplo, se puede generar cada especificidad de unión de la molécula biespecífica y multiespecífica de forma separada y después conjugadas entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, se puede usar una diversidad de agentes de acoplamiento o entrecruzamiento para la conjugación covalente. Los ejemplos de agentes de entrecruzamiento incluyen proteína A, carbodiimida, *N*-succinimidil-*S*-acetiltioacetato (SATA), ácido 5, 5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) *o*-fenilendimaleimida (oPDM), *N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) y sulfosuccinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (véase por ejemplo, Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.*, 160:1686; Liu, M. A. *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82: 8648). Otros métodos incluyen los descritos por Paulus, *Behring Ins. Mitt.* (1985) N° 78.118-132; Brennan *et al.*, *Science* (1985) 229: 81-83 y Glennie *et al.*, *J. Immunol.* (1987) 139:2367-2375). Los agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles en Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, estos se pueden conjugar mediante enlace de sulfhidrilo de las regiones bisagra del terminal C de las dos cadenas pesadas. En una realización particularmente preferida, se modifica la región bisagra para que contenga un número impar de restos sulfhidrilo, preferentemente uno, antes de la conjugación.

Como alternativa, ambas especificidades de unión se pueden codificar en el mismo vector, y expresarse y ensamblarse en la misma célula huésped. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica y multiespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o ligando x Fab. Una molécula biespecífica y multiespecífica de la invención, por ejemplo, una molécula biespecífica puede ser una molécula de cadena sencilla tal como un anticuerpo biespecífico de cadena sencilla, una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y un determinante de unión, o una molécula biespecífica

de cadena sencilla que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas también pueden ser moléculas de cadena sencilla o pueden comprender al menos dos moléculas de cadena sencilla. Por ejemplo, en los documentos US 5.260.203; US 5.455.030; US 4.881.175; US 5.132.405; US 5.091.513; US 5.476.786; US 5.013.653; US 5.258.498; y US 5.482.858, se describen métodos para preparar moléculas biespecíficas y multiespecíficas.

La unión de las moléculas biespecíficas y multiespecíficas con sus dianas específicas se puede confirmar mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a una enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), análisis de FACS, un bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento), un análisis BIAcore o un ensayo de transferencia Western. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos proteína-anticuerpo de interés particular empleando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos de anticuerpo-FcR se pueden detectar usando, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo ligado a una enzima que reconoce y se une específicamente a los complejos de anticuerpo-FcR. Alternativamente, los complejos se pueden detectar usando cualquiera de una diversidad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, se puede marcar radiativamente el anticuerpo y usarlo en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., "Principles of Radioimmunoassays", Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, marzo, 1986). El isótopo radiactivo se puede detectar mediante medios tales como el uso de un contador y o un contador de centelleo o mediante autorradiografía.

IV. Inmunoconjugados

En otro aspecto de la invención, los anticuerpos monoclonales humanos contra CD25 están conjugados con un resto terapéutico tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o un radioisótopo. Dichos conjugados se denominan en la presente memoria "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o un agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial (por ejemplo, que destruya) las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi-antracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos.

Los agentes terapéuticos adecuados para formar los inmunoconjugados de la invención incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracil, dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cisplatino (cis-diclorodiamin-platino (II) (DDP)), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Otros ejemplos de citotoxinas terapéuticas que se pueden conjugar con un anticuerpo de la invención incluyen calicheamicinas y duocarmicinas.

Los anticuerpos de la presente invención también se pueden conjugar con un radioisótopo, por ejemplo, yodo-131, itrio-90 o indio-111, para generar agentes radiofarmacéuticos citotóxicos para tratar un trastorno relacionado con CD25 tal como un cáncer. Los conjugados de anticuerpos de la invención se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada, y el resto farmacológico no debe interpretarse como limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o un polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa o un fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina A de *Pseudomonas* o toxina diftérica; o un agente activo en la superficie celular tal como enzimas fosfolipasas, por ejemplo, fosfolipasa C.

Las técnicas para conjugar dichos restos terapéuticos con anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* y (II Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

En una realización adicional, los anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con la invención se unen a un enlazador-quelante (por ejemplo, tiuxetán), que permite al anticuerpo conjugarse con un radioisótopo.

V. Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones que incluyen composiciones farmacéuticas que contienen uno o una combinación de anticuerpos monoclonales humanos de la presente invención. Las composiciones se pueden formular con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como con

cualquier otro adyuvante y excipiente conocido de acuerdo con técnicas convencionales tales como las descritas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, XIX Edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995.

- 5 Las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes relevantes para la enfermedad o afección que se vaya a tratar. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente invención con al menos un agente inmunosupresor, al menos un agente antiinflamatorio, al menos un agente para la soriasis o al menos un agente quimioterapéutico.

10 En una realización, dichos agentes terapéuticos incluyen uno o más agentes inmunosupresores tales como ciclosporina, azatioprina, ácido micofenólico, micofenolato de mofetilo, corticosteroides tales como prednisona, metotrexato, sales de oro, sulfasalazina, antimaláricos, brequinar, leflunomida, mizoribina, 15-desoxiespergualina, 6-mercaptopurina, ciclofosfamida, rapamicina, tacrolimus (FK-506), OKT3, globulina anti-timocítica, etc.

15 En una realización adicional, las composiciones de la invención se administran en combinación con dos o más agentes inmunosupresores tales como prednisona y ciclosporina; prednisona, ciclosporina y azatioprina; o prednisona, ciclosporina y micofenolato de mofetilo.

20 En una realización adicional, dichos agentes terapéuticos incluyen uno o más agentes antiinflamatorios tales como un fármaco esteroideo o un AINE (fármaco antiinflamatorio no esteroideo). Los agentes preferidos incluyen, por ejemplo, aspirina y otros salicilatos, inhibidores de la COX-2 tales como rofecoxib y celecoxib, AINE tales como ibuprofeno, fenoprofeno, naproxeno, sulindac, diclofenac, piroxicam, ketoprofeno, diflunisal, nabumetona, etodolac, oxaprozina e indometacina.

25 En otra realización, dichos agentes terapéuticos incluyen uno o más DMARD tales como metotrexato, hidroxycloroquina, sulfasalazina, inhibidores de la síntesis de pirimidina, por ejemplo, leflunomida, agentes bloqueadores del receptor IL-1, por ejemplo, anakinra y agentes bloqueadores de TNF- α , por ejemplo, etanercept, infliximab y adalimumab. Otros DMARD adecuados son anticuerpos contra IL-6R, CTLA4Ig y anticuerpos contra IL-15.

30 En otra realización, dichos agentes terapéuticos incluyen uno o más agentes para tratar trastornos cutáneos inflamatorios o hiperproliferativos tales como medicamentos tópicos, incluyendo alquitrán de hulla, vitamina A, antralina, calcipotrien, tarazotene y corticosteroides, medicamentos orales o inyectables tales como corticosteroides, metotrexato, retinoides, por ejemplo acicretin, ciclosporina, etanercept, alefacept, efalizumab, 6-tioguanina, micofenolato de mofetilo, tacrolimus (FK-506) e hidroxiurea. Otros ejemplos son CTLA4Ig e infliximab. Otros tratamientos pueden incluir la exposición a la luz solar o la fototerapia, incluyendo UVB (ultravioleta B de banda ancha y de banda estrecha), UVA (ultravioleta A) y PUVA (psoralen metoxalen y más ultravioleta A).

40 En una realización adicional, las composiciones de la invención se administran en combinación con dos o más de los tratamientos anteriores tales como metotrexato + fototerapia (PUVA o UVA); metotrexato + acitretina; acitretina + fototerapia (PUVA o UVA); metotrexato + acitretina + fototerapia (PUVA o UVB), hidroxiurea + fototerapia (PUVA o UVB); hidroxiurea + acitretina; ciclosporina + metotrexato; o calcipotrien + fototerapia (UVB).

45 En otra realización más, dichos agentes terapéuticos incluyen uno o más agentes quimioterapéuticos tales como doxorubicina, cisplatino, bleomicina, carmustina, ciclofosfamida, vindesina, vincristina y clorambucil.

En otra realización más, los presentes anticuerpos se pueden administrar en combinación con radioterapia y/o trasplante de médula ósea.

50 En otra realización más, los presentes anticuerpos se pueden administrar en combinación con otros anticuerpos, por ejemplo, otros anticuerpos monoclonales humanos inmunosupresores, tales como anticuerpos que se unen a p75 del receptor IL-2, o anticuerpos que se unen, por ejemplo, a MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6P, IL-7, IL-8, IL-10, CD11a, CD20 o CD58, o anticuerpos que se unen a sus ligandos; o en combinación con otros compuestos inmunomoduladores, por ejemplo, IL-15R soluble o IL-10.

60 Como se usa en la presente memoria, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para una administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión).

65 Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto precursor y no confiere ningún efecto toxicológico no deseado (véase, por ejemplo, Berge, S. M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos tales como ácido

clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos fenil-sustituídos, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos y aromáticos sulfónicos y similares. Las sales de adición de base incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas tales como *N,N'*-dibenciletilendiamina, *N*-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina y similares.

Las composiciones de la presente invención, incluyendo las composiciones farmacéuticas (terapéuticas), se pueden administrar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Los compuestos activos se pueden preparar con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles tales como acetato etilvinílico, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones son conocidos en general por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Para administrar las composiciones de la invención por ciertas vías de administración, puede ser necesario revestir el compuesto, o coadministrar el compuesto, con un material para evitar su desactivación. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina y soluciones tampón acuosas. Los liposomas incluyen emulsiones CGF de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales (Strejan *et al.* (1984) *J. Neuroimmunol.* 7:27).

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Se conoce en la técnica el uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención. También se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos complementarios.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Las composiciones se pueden formular en forma de una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como glicerol, manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Se puede provocar la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención se administran en forma cristalina por inyección subcutánea, cf. Yang *et al.*, (2003) PNAS, 100(12): 6934-6939.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida a un disolvente apropiado con un ingrediente o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguida de la esterilización mediante microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la criodesecación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Las pautas de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria como se usa en la presente memoria se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas de dosificación unitarias de la invención están dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se vaya a conseguir y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de la formación de compuestos tales como un compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes hidrosolubles tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propilgalato, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes metálicos tales como ácido cítrico, ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Las composiciones terapéuticas de la presente invención se pueden formular para vías de administración particulares tales como la vía oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material transportador para producir una sola forma de dosificación variará en función del sujeto que se esté tratando y del modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material transportador para producir una sola forma de dosificación generalmente será la cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. En general, del cien por cien, esta cantidad variará del aproximadamente 0,01% al aproximadamente 99% de ingrediente activo, preferentemente del aproximadamente 0,1% al aproximadamente 70%, más preferentemente del aproximadamente 1% al aproximadamente 30%.

Las formulaciones de la presente invención que son adecuadas para una administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen dichos vehículos conocidos en la técnica como apropiados. Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de las composiciones de la presente invención incluyen polvos, pulverizados, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo se puede mezclar en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, tampón o propulsor que pueda ser necesario.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" como se usan en la presente memoria significan modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, habitualmente por inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Es posible mantener una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de dispersión. Puede asegurarse la prevención de la presencia de microorganismos tanto mediante procedimientos de esterilización, *supra*, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, se puede producir la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retarden la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Cuando los compuestos de la presente invención se administran como agentes farmacéuticos a seres humanos y animales, se pueden proporcionar solos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, del 0,01 al 99,5% (más preferentemente, del 0,1 al 90%) del ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que se pueden usar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos de las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar para obtener una cantidad de ingrediente activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, la sal o la amida de las mismas, las vías de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto que se esté empleando en particular, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, el estado de salud general y el historial médico previo del paciente que se esté tratando y factores similares ampliamente conocidos en la técnica médica.

Un médico o veterinario que tenga experiencia habitual en la técnica puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o el veterinario podrían iniciar dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los necesarios para conseguir el efecto terapéutico deseado e ir aumentando gradualmente la dosis hasta conseguir el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de la composición de la invención será la cantidad del compuesto que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. Es preferible que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, preferentemente administrada cerca del sitio diana. Aunque es posible administrar un compuesto de la presente invención solo, es preferible administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición). La dosis se puede determinar o ajustar midiendo la cantidad de anticuerpos monoclonales contra CD25 en circulación en diferentes puntos temporales tras la administración en una muestra biológica, haciendo uso de anticuerpos antiidiopáticos dirigidos a los anticuerpos contra CD25.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención se pueden administrar para la prevención del rechazo de trasplantes mediante el tratamiento de inducción, es decir, como una terapia profiláctica a corto plazo para la administración única o múltiple antes del trasplante y en la fase muy temprana posterior al trasplante, por ejemplo, poco antes del trasplante y hasta 3 meses después del trasplante.

En una realización, los anticuerpos monoclonales de la invención, por ejemplo, se pueden administrar para la prevención del rechazo de trasplantes en dosis totales de aproximadamente 20 a 100 mg, por ejemplo, administrados como infusiones intravenosas de 15 o 20 mg con la primera dosis administrada antes de la cirugía y las dosis posteriores administradas en el transcurso de los diez primeros días posteriores a la operación. Alternativamente, las dosis se pueden administrar mediante inyecciones en bolo. En otra realización, los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden administrar para la prevención del rechazo de trasplantes en una dosis de 0,5-1,5 mg/kg por vía intravenosa, cada dos semanas durante un máximo de cinco dosis, administrándose la primera dosis antes de la cirugía. Dicha administración se puede combinar con una terapia inmunosupresora, por ejemplo, esteroides tales como prednisona o metilprednisolona y ciclosporina; esteroides tales como prednisona o metilprednisolona, ciclosporina y azatioprina; o esteroides tales como prednisona o metilprednisolona, ciclosporina y micofenolato de mofetilo. La administración de los anticuerpos humanos puede ser ventajosamente un ahorro de esteroides o resultar en la rápida retirada de los esteroides.

En otra realización, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención se pueden administrar para tratar o prevenir el rechazo de trasplantes mediante una pauta de infusión intravenosa de dos dosis (aproximadamente 20 mg por dosis el día del trasplante y aproximadamente 20 mg al cuarto día del trasplante). Dicha administración se puede combinar con una terapia inmunosupresora, por ejemplo, según lo divulgado anteriormente. Por ejemplo, se puede administrar 1 g de micofenolato de mofetilo por vía oral antes de la cirugía, y 500 mg de metilprednisolona en el momento de la inducción de la anestesia. La ciclosporina se puede introducir el segundo día después del trasplante, pudiéndose continuar con 1 g de micofenolato de mofetilo tras el trasplante. Los esteroides se pueden reducir hasta 20 mg de prednisona por vía oral al cuarto día de la cirugía.

En otra realización más, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención se pueden administrar para tratar o prevenir el rechazo de trasplantes mediante una terapia de inducción de dos dosis, siendo la primera dosis de 1 mg/kg administrada 1 hora antes de la cirugía y la segunda dosis, 4 días después del trasplante. Dicha administración se puede combinar con una terapia inmunosupresora, por ejemplo, según lo divulgado anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención se pueden administrar para la prevención del rechazo de trasplantes mediante terapia a largo plazo, por ejemplo, mediante la administración de una dosis en el intervalo de 10 a 150 mg, tal como de 20 a 40 mg, semanal o mensualmente, por ejemplo, de 3 a 8 administraciones semanales, seguida opcionalmente por una o más administraciones mensuales. Con un tratamiento a largo plazo, es posible reducir o evitar la terapia de mantenimiento con ciclosporina.

Las composiciones de anticuerpo terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, se puede administrar una composición terapéutica de la invención con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos divulgados en los documentos US 5.399.163; US 5.383.851; US 5.312.335; US 5.064.413; US 4.941.880; US 4.790.824; o US 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: documento US 4.487.603, que divulga una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicamentos a una velocidad controlada; documento US 4.486.194, que divulga un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; documento US 4.447.233, que divulga una bomba de infusión de medicamentos para administrar medicamentos a una velocidad de infusión exacta; documento US 4.447.224, que divulga un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármacos; documento US 4.439.196, que divulga un sistema osmótico de administración de fármacos que tiene compartimentos de múltiples cámaras; y documento US 4.475.196, que divulga un sistema osmótico de administración de fármacos. Los expertos en la técnica conocen muchos otros de dichos implantes, sistemas de administración y módulos.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención se pueden formular para asegurar una distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención crucen la BBB (si se desea), estos se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para consultar métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, los documentos US 4.522.811; US 5.374.548; y US 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan de forma selectiva a células u órganos específicos, potenciando de este modo la administración dirigida de fármacos (véase, por ejemplo, V. V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29: 685). Los restos dirigidos ejemplares incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, el documento US 5.416.016 de Low *et al.*); manósidos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038); anticuerpos (P. G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357: 140; M. Owais *et al.*, (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); receptor de proteína A tensoactivo (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134), diferentes especies de las cuales pueden comprender las formulaciones de la invención, así como componentes de las moléculas inventadas; p. 120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 9090); véase también K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994), *FEBS Lett.* 346:123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273. En una realización de la invención, los compuestos terapéuticos de la invención se formulan en liposomas; en una realización más preferida, los liposomas incluyen un resto dirigido. En una realización más preferida, los compuestos terapéuticos de los liposomas se administran mediante inyección en bolo a un sitio próximo a la zona deseada, por ejemplo, el sitio de la inflamación o la infección, o el sitio de un tumor. La composición debe estar en estado líquido en la medida en que sea fácil de inyectar. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

Las dosis eficaces y las pautas de dosificación para los anticuerpos monoclonales humanos de la invención dependen de la enfermedad o de la afección que se vaya a tratar, y pueden ser determinadas por los expertos en la técnica.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" para prevenir el rechazo de un transplante, preferentemente, reducirá el número y la gravedad de episodios tempranos de rechazo del transplante.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" para la artritis reumatoide preferentemente dará como resultado una definición preliminar de mejoría ACR20 en los pacientes, más preferentemente una definición preliminar de mejoría ACR50 y, aún más preferentemente una definición preliminar de mejoría ARC70.

La definición preliminar de mejoría ACR20 se define como: $\geq 20\%$ de mejoría en: recuento de articulaciones doloridas (TCJ) y recuento de articulaciones hinchadas (SWJ) y $\geq 20\%$ de mejoría en 3 de las 5 siguientes evaluaciones: evaluación del dolor del paciente (VAS), evaluación global del paciente (VAS), evaluación global por el médico (VAS), discapacidad autoevaluada por el paciente (HAQ) y reactivo de fase aguda (CRP o ESR).

ACR50 y ACR70 se definen de la misma manera con mejorías de $\geq 50\%$ y $\geq 70\%$, respectivamente. Para más información, véase Felson *et al.* en "American College of Rheumatology Preliminary Definition of Improvement in Rheumatoid Arthritis"; *Arthritis Rheumatism* (1995) 38:727-735.

Alternativamente, una dosis terapéuticamente eficaz para la artritis reumatoide se puede medir mediante el DAS (puntuación de la actividad patológica), incluyendo DAS28 y, más preferentemente, DAS56, según lo definido por EULAR.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" para la soriasis resultará preferentemente en un PASI50, más preferentemente un PASI75, y aún más preferentemente un PASI90 en los pacientes o una reducción de la evaluación global de la soriasis en comparación con la impresión de mejoría después del tratamiento farmacológico con respecto a las condiciones de pretratamiento. El PASI (índice de extensión y gravedad de la soriasis) es un sistema de puntuación usado para la evaluación de la extensión y la gravedad de la enfermedad. El PASI50 se define como una mejoría de $\geq 50\%$ de la puntuación. De la misma manera, el PASI75 y PASI90 se definen como mejorías de $\geq 75\%$ y $\geq 90\%$ de la puntuación, respectivamente.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" para la terapia tumoral se puede medir mediante las respuestas tumorales objetivas que pueden ser bien totales o parciales. Una respuesta total (CR) se define como una evidencia no clínica, radiológica u otra evidencia de la enfermedad. Una respuesta parcial (PR) se produce como consecuencia de una reducción de más del 50% del tamaño del tumor total. El tiempo medio hasta la progresión es una medida que caracteriza la duración de la respuesta tumoral objetiva.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" para la terapia tumoral también se puede medir mediante su capacidad para estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer se puede evaluar en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición se puede evaluar examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular o para inducir la apoptosis mediante ensayos *in vitro* conocidos por el experto en la técnica. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño tumoral o mejorar de otra manera los síntomas en un sujeto. Un experto normal en la técnica sería capaz de determinar dichas cantidades basándose en factores tales

como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición o la vía de administración seleccionadas en particular.

VI. Usos y métodos de la invención

5 Los anticuerpos humanos de la presente invención, así como los derivados/conjugados y composiciones de los mismos, tienen numerosas utilidades que implican el tratamiento de trastornos mediados por CD25 o trastornos en los que participan células que expresan CD25.

10 En una realización, los anticuerpos humanos de la presente invención se pueden administrar *in vivo* a un sujeto para bloquear o inhibir la unión de CD25 con su ligando (IL-2). Esto, a su vez, se puede usar para prevenir o inhibir una variedad de enfermedades asociadas con las células portadoras de CD25.

15 Las enfermedades ejemplares que se pueden tratar (por ejemplo, mejorar) o prevenir incluyen, pero sin limitación, rechazo de trasplantes, incluyendo rechazo de aloinjertos y xenoinjertos, en pacientes que están siendo sometidos o que han sido sometidos a un trasplante de órganos o de tejidos tales como corazón, pulmón, combinado de corazón y pulmón, tráquea, riñón, hígado, páncreas, esófago, intestino, piel, trasplante de una extremidad, trasplante del cordón umbilical, trasplante de células madre, trasplante de células de islotes, etc. Dichos pacientes incluyen adultos, pero también pueden ser pacientes pediátricos.

20 Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar, por tanto, como profilácticos en el rechazo de aloinjertos y xenoinjertos, o se pueden usar para invertir, tratar o mejorar de otro modo los episodios agudos de rechazo de aloinjertos o xenoinjertos.

25 Otras enfermedades que se pueden tratar incluyen la enfermedad del huésped frente al injerto, por ejemplo, la enfermedad del huésped frente al injerto de transfusión de sangre y la enfermedad del huésped frente al injerto de médula ósea; enfermedades inflamatorias, inmunes o autoinmunes tales como artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis soriásica, diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 insulín dependiente, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, dermatitis polimorfe, síndrome de Sjögren, arteritis, incluyendo arteritis de células gigantes, anemia aplásica, asma, esclerodermia y uveítis; trastornos cutáneos inflamatorios o hiperproliferativos, por ejemplo, soriasis, incluyendo soriasis en placa, pustulosis palmoplantar (PPP), liquen plano erosivo, pénfigo ampollar, epidermolisis bullosa, dermatitis de contacto y dermatitis atópica; y una variedad de neoplasmas linfoides, por ejemplo, leucemia de linfocitos T, enfermedad de Hodgkin, leucemia de células pilosas o linfoma cutáneo de linfocitos T, incluyendo micosis fungoide y síndrome de Sezary.

Otras enfermedades que se pueden tratar son:

40 *tumores malignos* en los que es beneficiosa una inhibición de los linfocitos T reguladores infiltrantes CD25+, tales como cáncer gástrico, cáncer de esófago, melanoma maligno, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer cervical, cáncer de ovario y carcinoma de células renales;

trastornos hematológicos tales como leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, linfoma anaplásico de células grandes, leucemia linfocítica crónica (CLL)/linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma periférico de linfocitos T y amiloidosis secundaria;

45 *trastornos cutáneos* tales como piodermia gangraenosa, granuloma anular, dermatitis alérgica de contacto, pénfigo cicatricial y herpes gestacional;

trastornos hepato-gastrointestinales tales como colitis colagénica, colangitis esclerosante, hepatitis activa crónica, hepatitis lúpica, hepatitis autoinmune, hepatitis alcohólica, pancreatitis crónica y pancreatitis aguda;

trastornos cardíacos tales como miocarditis y pericarditis;

50 *trastornos vasculares* tales como arteriosclerosis, arteritis de células gigantes/polimialgia reumática, arteritis de Takayasu, poliarteritis nodosa, síndrome de Kawasaki, granulomatosis de Wegener, poliangeítis microscópica, síndrome de Churg-Strauss, síndrome de angioedema hereditario, síndrome de angioedema crónico y vasculitis secundaria leucocitoclástica;

trastornos renales tales como glomerulonefritis aguda, glomerulonefritis crónica, nefritis de cambio mínimo y síndrome de Goodpasture;

55 *trastornos pulmonares* tales como alveolitis, bronquiolitis obliterante, silicosis y beriliosis;

trastornos neurológicos tales como esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, miastenia grave, polineuropatía desmielinizante crónica y polirradiculitis incluyendo síndrome de Guillain-Barré;

trastornos del tejido conjuntivo tales como la policondritis recidivante, sarcoidosis, lupus eritematoso sistémico, lupus del SNC, lupus discoide, nefritis de lupus, síndrome de fatiga crónica y fibromialgia;

60 *trastornos endocrinos* tales como enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis subaguda; e

infecciones virales tales como paraparesia espástica tropical.

Las vías adecuadas de administración de las composiciones de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos humanos e inmunoconjugados) de la invención *in vivo* e *in vitro* son bien conocidas en la técnica y pueden ser seleccionadas por los expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos se pueden administrar mediante inyección (por ejemplo, intravenosa o subcutánea). Las dosis adecuadas de las moléculas usadas dependerán de la edad y del peso del sujeto, y de la concentración y/o la formulación de la composición de

anticuerpos.

El anticuerpo se puede administrar solo o junto con otro agente terapéutico, tal como un agente inmunosupresor, un agente antiinflamatorio, un agente para tratar trastornos cutáneos inflamatorios o hiperproliferativos, un agente quimioterapéutico o una citotoxina que actúe en combinación o sinérgicamente con la composición de anticuerpos para tratar o prevenir enfermedades asociadas con las células que expresan CD25, especialmente los linfocitos T activados.

Según lo descrito anteriormente, los anticuerpos humanos contra CD25 de la invención se pueden administrar conjuntamente con uno o más otros agentes terapéuticos, por ejemplo, un agente inmunosupresor o un agente antiinflamatorio para aumentar el efecto antiinflamatorio global. Se puede ligar el anticuerpo al agente (como un inmunocomplejo) o se puede administrar por separado del agente. En el último caso (la administración separada), el anticuerpo se puede administrar antes, después o simultáneamente con el agente.

También se encuentran dentro del alcance de la presente invención los kits que comprenden las composiciones de anticuerpos de la invención (por ejemplo, anticuerpos humanos e immunoconjugados) y las instrucciones de uso. El kit puede contener uno o mas agentes adicionales tales como un agente inmunosupresor, o uno o más anticuerpos humanos adicionales de la invención.

Por consiguiente, los pacientes tratados con las composiciones de anticuerpos de la invención se pueden administrar además (antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo humano de la invención) con otro agente terapéutico tal como un agente inmunosupresor, un agente antiinflamatorio, un agente para el tratamiento de trastornos cutáneos inflamatorios o hiperproliferativos, o un agente quimioterapéutico, que mejore o aumente el efecto terapéutico de los anticuerpos humanos.

En otra realización más, los immunoconjugados de la invención se pueden usar para dirigir compuestos (por ejemplo, agentes terapéuticos, marcadores, citotoxinas, inmunosupresores, etc.) hacia células que tienen CD25 unido a su superficie mediante la unión de dichos compuestos con el anticuerpo. Así pues, la invención también proporciona métodos para localizar *ex vivo* o *in vitro* en células que expresan CD25 (por ejemplo, con un marcador detectable tal como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático). En otra realización, la invención proporciona métodos para matar células que tienen CD25 unido a su superficie mediante la administración de las inmunotoxinas de la presente invención.

En una realización adicional, los anticuerpos de la invención se pueden usar *in vivo* o *in vitro* para el diagnóstico de enfermedades en las que las células activadas que expresan CD25 desempeñan un papel activo en la patogénesis mediante la detección de los niveles de CD25, o los niveles de las células que contienen CD25 en la superficie de su membrana. Esto se puede realizar, por ejemplo, poniendo en contacto una muestra que se vaya a analizar, opcionalmente junto con una muestra de control, con el anticuerpo humano en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y CD25. A continuación, se detecta la formación del complejo (por ejemplo, mediante un ELISA). Cuando se usa una muestra de control junto con la muestra de ensayo, se detecta el complejo en ambas muestras, y cualquier diferencia estadísticamente significativa en la formación de los complejos entre las muestras indica la presencia de CD25 en la muestra de ensayo.

La presente invención se ilustra más detalladamente mediante los siguientes ejemplos, que no deberían ser considerados como restrictivos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de anticuerpos humanos contra CD25

Antígeno: se desarrolló una línea celular transfectante que expresa CD25 de superficie celular para su uso como un reactivo para la inmunización de ratones HuMAb y la caracterización de anticuerpos contra CD25. Esta línea celular es una línea celular CHO diseñada mediante ingeniería genética para expresar los dominios extracelulares de CD25 acoplados al dominio transmembrana del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas. Se amplificaron las secuencias de CD25 a partir de cDNA preparado a partir de células HUT102 y se obtuvieron las secuencias del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas a partir del vector pDISPLAY (Invitrogen Corporation). Se creó mediante ingeniería genética en un vector de expresión una construcción de expresión que codificaba la proteína de fusión. Se sometió la línea celular CHO transfectante a 2 series de amplificación en metotrexato 5 nM y metotrexato 50 nM para aumentar los niveles de expresión de CD25.

Cultivo de transfectoma de CHO-CD25: se cultivaron células de transfectoma de CHO-CD25 (Medarex Inc., NJ, EE.UU.) en medio CHO-S-SFM II (Gibco BRL), sin hipoxantina, sin timidina, con penicilina (5.000 U/ml), estreptamicina (5.000 mg/ml; BioWhittaker, Bélgica) y metotrexato (concentración final 50 nM, Sigma). Las células se renovaron cada dos a tres días.

Ratones transgénicos: se alojaron ratones HCo7 y Hco12 en jaulas de filtro y se evaluaron para que estuvieran en

buenas condiciones físicas en las fechas de la vacunación, las extracciones de sangre y el día de la fusión. Los ratones que produjeron los hibridomas seleccionados fueron todos machos. Los ratones con ID 23185, 23196, 23197 y 23198 tienen el genotipo (CMD)++; (HCo7) 11952+; (JKD)++; (KCo5) 9272+. Los ratones con ID 23175 fueron de genotipo (CMD)++; (HCo12) 15087+; (JKD)++; (KCo5) 9272+. Las designaciones de cada transgén están entre paréntesis, seguidas de los números de línea de los transgenes integrados aleatoriamente. Los símbolos ++ y + indican homocigoto o hemicigoto; sin embargo, como los ratones se rastrean rutinariamente usando un ensayo basado en PCR, no fue posible distinguir entre la heterocigosidad y la homocigosidad para los transgenes de Ig humanos integrados aleatoriamente. La designación + se puede dar a los ratones que son en realidad homocigotos para estos elementos.

Calendario y procedimiento de inmunizaciones: los ratones se inmunizaron con el antígeno de dos formas: células vivas (las células CHO transfectadas con CD25 descritas anteriormente) y proteína purificada (CD25 humano recombinante (rhCD25), una proteína recombinante expresada en NS/0 de R & D Systems, (Nº de catálogo 223-2A/CF), Mineápolis, MN). Se mezcló rhCD25 soluble con adyuvante completo de Freund (CFA) o adyuvante incompleto de Freund (IFA). El adyuvante de Freund se obtuvo en Gibco-BRL, Rockville, MD. Se inyectaron a los ratones 0,2 ml de antígeno preparado en la cavidad intraperitoneal. Se realizaron inmunizaciones finales en la vena de la cola con CD25 soluble en PBS estéril o solución salina (NaCl al 0,9%). Las inmunizaciones con células transfectadas se administraron en la cavidad intraperitoneal (i.p.) en 0,2 ml de solución salina estéril a $1,0-2,0 \times 10^7$ células por ratón. Todas las inmunizaciones se inyectaron en la cavidad intraperitoneal. Tres y dos días antes de la fusión, se inyectaron vacunas de recuerdo por vía intravenosa (i.v.). El calendario de inmunizaciones se describe en la Tabla 1. Todos los ratones fueron incluidos en una cohorte de doce (12) ratones de genotipos HCo7 y HCo12.

Tabla 1

Fecha de la actividad	Inmunización: adyuvantes, antígeno	Sangría y títulos*/fusiones
Día 1	$1,5 \times 10^7$ células transfectadas con CD25 vivas, i.p. en solución salina	
Día 12	CFA, rhCD25 (20 µg)	
Día 21	$1,5 \times 10^7$ células transfectadas con CD25 vivas, i.p. en solución salina	
Día 28	CFA, rhCD25 (20 µg)	
Día 35		Título
Día 42		Fusión 23175/23197
Día 42	$1,5 \times 10^7$ células transfectadas con CD25 vivas, i.p. en solución salina	
Día 56	CFA, rhCD25 (20 µg)	
Día 63		Título
Día 68	$1,5 \times 10^7$ células transfectadas con CD25 vivas, i.p. en solución salina	
Día 71		Fusión 23196/23198
Día 81		Título
Día 85		Fusión 23185
*Para los títulos, véase la Tabla 2.		

Títulos murinos: los títulos para el ratón Nº 23175, 23185, 23196, 23197 y 23198 se muestran a continuación en la Tabla 2. Los títulos mostrados en la Tabla 2 indican las diluciones de suero que mostraron positivo en las pruebas específicas de CD25. La respuesta al antígeno tras inmunizaciones repetidas muestra un nivel de respuesta potente y que el ratón estaba preparado para la fusión.

Tabla 2

Ratón Nº	Título día 35	Título día 63	Título día 81
23175	12800		
23185	6400	12800	12800
Ratón Nº	Título día 35	Título día 63	Título día 81
23196	6400	25600	

Ratón N°	Título día 35	Título día 63	Título día 81
23197	50000		
23198	3200	25600	

Procedimiento de fusión: para las fusiones, se usó la línea celular de mieloma SP2/0-agl4 (ATCC CRL 1581, lote F-15087). Se descongeló el vial ATCC inicial y se expandió en cultivo. Se preparó un cultivo patrón de viales congelados a partir de esta expansión. Se mantuvieron las células en cultivo durante 6-8 semanas, se pasaron dos veces a la semana.

DMEM rico en glucosa: se usó (Mediatech Cellgro, N° 1001233) que contenía SBF al 10% (Hyclone N° de catálogo SH30071), antibiótico-antimicótico (x 100) (Gibco, N° 15240062) y L-glutamina al 0,1% para cultivar células de mieloma. Se añadieron otros complementos de medio adicionales a los medio de crecimiento de hibridomas, incluyendo factor de clonación de hibridomas Origen al 5% (Igen), piruvato de sodio $4,5 \times 10^{-4}$ M, HAT (hipoxantina $1,0 \times 10^{-4}$ M, aminopterina $4,0 \times 10^{-4}$ M, timidina $1,6 \times 10^{-5}$ M; Sigma) y suero bovino fetal (Hyclone, Logan, Utah).

El bazo del ratón N° 23197 era de un tamaño normal y se obtuvieron $4,0 \times 10^8$ células viables. El bazo del ratón N° 23175 era de un tamaño normal y se obtuvieron $2,6 \times 10^8$ células viables. Los bazos de los ratones N° 23196 y N° 23198 eran de un tamaño normal y produjeron $2,4 \times 10^8$ y $2,0 \times 10^8$ células viables, respectivamente. El último bazo del ratón N° 23185 era de un tamaño normal y produjo $1,9 \times 10^8$ células viables. Los esplenocitos se fusionaron de acuerdo con el procedimiento estándar.

Medios usados para la generación de hibridomas (fusión): se usaron DMEM rico en glucosa (Mediatech, N° de lote 10013264) que contenía suero bovino fetal al 10% (SBF); (Hyclone, Logan, Utah, SH30071 N° de lote AJE10321) antibiótico-antimicótico (GibcoBRL, N° de lote 15240062) y L-glutamina al 0,1% (Gibco, N° de lote 1.013.845) para cultivar las células de mieloma. Se añadieron complementos de medios adicionales al medio de crecimiento de hibridomas que incluían: factor de clonación de hibridomas Origen al 5% (Igen, N° de lote 36600 y 36782 y 36684), piruvato de sodio $4,5 \times 10^{-4}$ M, HAT (Sigma, H 0262): hipoxantina $1,0 \times 10^{-4}$ M, aminopterina $4,0 \times 10^{-7}$ M, timidina $1,6 \times 10^{-5}$ M o HT (Sigma, H0137): hipoxantina $1,0 \times 10^{-4}$ M, timidina $1,6 \times 10^{-5}$ M.

Se extirparon el bazo y los ganglios linfáticos de los ratones inmunizados y se colocaron estos órganos en un tubo que contenía DMEM + SBF al 10%. Se transfirió el tubo a una sala de cultivo de tejidos y se preparó una sola suspensión de células de bazo y de ganglios linfáticos, y se realizó el recuento de las células. Se transfirió un volumen apropiado de células SP2/0 (ATCC CRL 1581, lote F-15087; 6 células de bazo o de ganglios linfáticos por cada célula de SP2/0) y se mezclaron y se volvieron a suspender las células. Se añadieron aproximadamente 1,2 ml de PEG (1 minuto mientras se agita suavemente el tubo en un vaso de precipitados que contenía agua a 37 °C). Se dejó el tubo durante 90 segundos, se añadieron 15 ml de DMEM y se realizó un lavado con medio. Tras someter las células a una centrifugación descendente, se eliminó el sobrenadante y se volvieron a suspender las células. Se añadieron diez (10) ml de medio que contenía HAT al tubo. Tras incubar durante 30-60 minutos en un incubador de CO₂, se sembraron las células en placas de cultivo de 96 pocillos, 200 µl/pocillo (aproximadamente 1×10^7 células por placa de 96 pocillos). El día 7, se alimentaron las células con medio que contenía HT, 250 µl/pocillo (el medio con HT es el medio con HAT sin aminopterina).

Se realizó el rastreo inicial de ELISA para los anticuerpos humanos IgGk 7-10 días después de la fusión. A continuación, se rastrearon los pocillos positivos en IgGk humana en placas de ELISA revestidas con CD25 soluble. Se transfirieron los hibridomas positivos en antígeno a placas de 24 pocillos y finalmente a los matraces de cultivo de tejidos. Los hibridomas positivos en antígeno se conservaron en varias etapas en el proceso de desarrollo mediante la congelación de las células en medio de congelación de DMSO Origen (Fisher N° de cat. IG-50-0715).

Protocolo de ELISA para la detección de IgGk (usado para el rastreo de las fusiones):

se revistieron placas de ELISA durante la noche con K antihumano, 1 µg/ml (Immunotech, N° de lote 0173) o y anti-humano, 1 µg/ml (Jackson, N° de lote 109-006-098), 50 µg/pocillo. Se vaciaron las placas y se bloquearon los sitios de unión residuales con PBS complementado con Tween-20 (0,05%) y suero de pollo al 5% (PBSTC) durante 1 hora a temperatura ambiente (T.A.). Se lavaron las placas 3 veces con PBS complementado con Tween-20 al 0,05% (PBST). Se analizaron los sobrenadantes derivados de las fusiones y los subclones diluidos 1:2 en general en PBSTC. Como control positivo, se usó IgG humana (Calbiochem). Tras incubar las muestras durante aproximadamente 2 horas, se lavaron las placas con PBST y se añadió un anticuerpo secundario, IgG anti-humano-Fc-HRP conjugado (Jackson, N° de lote 109-036-098), diluido 1:5000 en PBSTC a los pocillos (100 µl). Tras una incubación de 1 hora a T.A., se realizó el ELISA usando ABTS (Sigma) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Determinación de isotipo mediante ELISA: se revistieron placas de ELISA de 96 pocillos (Greiner, Alemania) durante la noche (100 µl/pocillo, temperatura ambiente (T.A.)) con IgG1 humana antimurina (CLB, Países Bajos, diluida 1:5.000 del patrón) o con IgG3 humana antimurina (CLB, diluida 1: 10.000 del patrón). Tras lavar las placas 3 veces

con PBST (150 µl/pocillo), se incubaron las placas con PBSTC durante 1 hora a T.A. A continuación, se añadieron los sobrenadantes de clones de anticuerpos monoclonales humanos contra CD25 (100 µl/pocillo; 2 horas a T.A.). Los sobrenadantes de IgG1 contra KLH (1 µg/ml) y IgG3 contra KLH (1 µg/ml) sirvieron como controles positivos. El medio de cultivo y las PBSTC sirvieron como controles negativos. Después de lavar con PBST (3 veces), se añadió hlgG anti-cabra-HRP (Fc específico; Jackson Labs, Maine, EE.UU.) (1 hora a T.A.). Para la detección de IgG1, el conjugado se diluyó 1:500, mientras que para la detección de IgG3, el conjugado se diluyó 1:2000. Tras lavar con PBST (x 3), se prepararon 10 mg de ABTS (Roche) por cada 10 ml de tampón ABTS (Roche) y se añadieron 100 µl a cada pocillo. Transcurridos 20 minutos, se leyó la absorción a 405 nm con un lector de ELISA (EL 808, Bio-Tek Instruments, Vermont, EE.UU.).

En base al procedimiento de inmunización, se seleccionaron 4 hibridomas específicos del antígeno, todos ellos derivados de ratones HCo: AB1, AB7, AB11 y AB12. Los isotipos de estos cuatro clones resultaron ser IgG1,k.

Los anticuerpos de la invención se pueden expresar de forma recombinante como otros isotipos, por ejemplo IgG2, IgG3, IgG4, IgM e IgA.

Medios usados para mantener los hibridomas después de la selección: Todas las líneas celulares de hibridoma de anticuerpos monoclonales humanos contra CD25 se cultivaron en Dulbecco modificado de Eagle (Biowhittaker, N° de lote BE12-709F) complementado con FCS al 10% (Wisent Multicell optimum C241), L-glutamina 2 mM (Glutamax-II), 50 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina (pen/estrep), β-ME 2 µM (todos derivados de Gibco BRL, Life Technologies, Escocia), HCF al 24% (Origen, Igen International Inc., Gaithersburg, EE.UU.).

Purificación de anticuerpos: antes de la purificación o la concentración de los anticuerpos humanos específicos de CD25 del sobrenadante de cultivo, se debe filtrar el sobrenadante del cultivo celular a través de un filtro desechable de vacío de cuello de botella para eliminar el material bruto tal como los restos celulares u otras impurezas. La muestra se puede concentrar si el volumen de la muestra es mayor de 500 ml hasta un volumen por debajo de 500 ml con un TFF Prep/ scale™, cartucho de 929,03 cm² (Millipore, EE.UU.).

Se realizó la purificación con proteína A de los anticuerpos específicos de CD25 mediante cromatografía de afinidad.

Tras equilibrar la columna de proteína A de 5 ml (*ProtA 5ml SP*, versión 041201, Amersham Pharmacia Biotech AB, Suecia) con PBS, pH 7,4, y cebar la bomba de muestra A con PBS, pH 7,4, se cargó el sobrenadante que contenía anticuerpos específicos de CD25 en la columna, se retiró mediante lavado la muestra no unida, y se aclaró la bomba de sistema B con ácido cítrico 0,1 M, pH 5, (tampón de elución 1). Tras ello, se eluyó la IgG bovina (presente en el sobrenadante del cultivo) con tampón de elución 1 a través de la bomba del sistema B. Después de enjuagar la bomba del sistema A con ácido cítrico 0,1 M, pH 3, (tampón de elución 2), se eluyeron los anticuerpos humanos específicos de CD25 a través de la bomba del sistema A con tampón de elución 2. Entonces se aclaró la bomba del sistema B con ácido cítrico 0,1 M, pH 2, (tampón de elución 3) y se eluyó toda la IgG restante unida a la columna a través de la bomba de sistema B con tampón de elución 3. Se neutralizaron los anticuerpos específicos de CD25 eluidos con Tris-HCl 2 M al 10% (v/v) (Sigma), pH 9, y a continuación se mezclaron las fracciones pico.

Se sometieron a diálisis las fracciones pico mezcladas de la etapa de elución 2 con PBS (30 ml de material purificado a 51PBS), durante 18 horas a 4 °C. Para conservar y almacenar el material purificado, se concentraron las muestras. La concentración de IgG humana se determinó usando un ensayo nefelométrico (Dade-Behring, BNII) con anticuerpos policlonales contra IgG (CLB, Amsterdam, Países Bajos, N° de lote M1090). Se tomaron alícuotas de los anticuerpos, se congelaron rápidamente y se almacenaron a -80 °C.

Ejemplo 2: Secuenciación de anticuerpos humanos contra CD25

Secuenciación de las regiones V_L y V_H de los anticuerpos

Secuenciación: Se secuenciaron las regiones VDJ después de la clonación en el sistema vectorial II de pGEMT. La secuenciación se realizó en BaseClear (Leiden, Países Bajos). Se alinearon las secuencias con respecto a las secuencias de genes V de línea germinal en Vbase (www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/intro.htm).

Preparación del ARN: el ARN total se preparó a partir de 5 x 10⁶ células de cuatro (4) líneas celulares de hibridoma de CD25 humano diferentes (AB1, AB7, AB11, AB12) con el kit RNeasy (Qiagen, Westburg, Leusden, Países Bajos) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Preparación del ADNc: se preparó ADN complementario (ADNc) del ARN a partir de células de hibridoma de CD25 humano a partir de 3 µg de ARN total con transcriptasa inversa AMV con tampón (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), oligo d(T)₁₅ (Promega, Madison, WI, EE.UU.), dNTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y RNasin (Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante (2000, versión 3).

Las regiones V_H y V_L se amplificaron usando los siguientes cebadores de PCR:

V_H: cebadores 5' de FR1

5 AB62 CAg gTK CAg CTg gTg CAg TC (SEC ID N°: 41)
AB63 SAg gTg CAg CTg KTg gAg TC (SEC ID N°: 42)
AB65 gAg gTg CAg CTg gTg CAg TC (SEC ID N°: 43)

Cebadores 5' líder de V_H

10 AB85 ATg gAC Tgg ACC Tgg AgC ATC (SEC ID N°: 44)
AB86 ATg gAA TTg ggg CTg AgC Tg (SEC ID N°: 45)
AB87 ATg gAg TTT ggR CTg AgC Tg (SEC ID N°: 46)
AB88 ATg AAA CAC CTg Tgg TTC TTC (SEC ID N°: 47)
AB89 ATg ggg TCA ACC gCC ATC CT (SEC ID N°: 48)

15 Cebador 3' de V_H

AB90 TgC CAg ggg gAA gAC CgA Tgg (SEC ID N°: 49)

V_K: cebadores 5' de FR1

20 AB8 RAC ATC CAg ATg AYC CAg TC (SEQ ID N°: 50)
AB9 gYC ATC YRg ATg ACC CAg TC (SEC ID N°: 51)
AB10 gAT ATT gTg ATg ACC CAg AC (SEC ID N°: 52)
25 AB11 gAA ATT gTg TTg ACR CAg TC (SEC ID N°: 53)
AB12 gAA ATW gTR ATg ACA CAg TC (SEC ID N°: 54)
AB13 gAT gTT gTg ATg ACA CAG TC (SEC ID N°: 55)
AB 14 gAA ATT gTg CTg ACT CAg TC (SEC ID N°: 56)

Cebadores 5' líder de V_K:

30 AB123 CCC gCT Cag CTC CTg ggg CTC CTg (SEC ID N°: 57)
AB124 CCC TgC TCA gCT CCT ggg gCT gC (SEC ID N°: 58)
AB 125 CCC AgC gCA gCT TCT CTT CCT CCT gC (SEC ID N°: 59)
35 AB 126 ATg gAACCA Tgg AAg CCC CAg CAC AgC (SEQ ID N°: 60)

Cebador 3' de V_K

AB16 Cgg gAA gAT gAA gAC AgA Tg (SEC ID N°: 61)

40 En las secuencias de cebador anteriores, K, S, R, Y y W tienen los siguientes significados:

K = G o T
S = C o G
R = A o G
45 Y = C o T
W = A o T.

50 *Condiciones de la PCR usadas para amplificar las regiones V_H y V_L para la clonación:* las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron con la polimerasa AmpliTaq (Perkin Elmer) en un termociclador T1 96 (Biometra, Westburg, Leusden, Países Bajos).

Protocolo de ciclos de PCR:

55 11 ciclos 94 °C, 2 min
94 °C 30 s
65 °C 30 s, 1º menos por ciclo
72 °C 30 s
30 ciclos 94 °C 30 s
55 °C 30 s
72 °C 30 s
60 72 °C 10 min
enfriar hasta 4 °C.

65 *Clonación de V_H y V_L en un sistema de vector pGEMT II:* tras analizar los productos de PCR sobre un gel de agarosa, se purificaron los productos con el kit de extracción en gel QIAEX II (Qiagen, Westburg, Leusden, Países Bajos). Se clonaron siempre dos productos de PCR amplificados independientemente, usando cebadores de FR1 o líder, de cada región V_H y V_L en el sistema de vector pGEMT II (Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante

(1999, versión 6).

Tras la transformación a JM109 de *E. coli*, se rastrearon las colonias individuales mediante PCR de colonias usando cebadores T7 y SP6, 30 ciclos de apareamiento a 55 °C. El DNA plasmídico de las colonias se purificó usando el kit Qiaprep Spin miniprep (Qiagen). Para seguir analizando las regiones V_H y V_L, se realizó una digestión con Nco1/Not1 (NE Biolabs, Westburg, Leusden, Países Bajos) y se analizó sobre gel de agarosa.

Las cuatro líneas celulares de hibridoma seleccionadas expresaron las siguientes secuencias de anticuerpo:

- 10 AB1: un anticuerpo IgG1,κ monoclonal humano con las secuencias de aminoácidos: SEC ID N°:2 y 4;
AB7: un anticuerpo IgG1,κ monoclonal humano con las secuencias de aminoácidos: SEC ID N°:6 y 8;
AB11: un anticuerpo IgG1,κ monoclonal humano con las secuencias de aminoácidos: SEC ID N°:10 y 12; y
AB12: un anticuerpo IgG1,κ monoclonal humano con las secuencias de aminoácidos: SEC ID N°:14 y 16.

- 15 Las secuencias obtenidas se muestran en las Figuras 1-10.

Ejemplo 3: Características de unión de los anticuerpos humanos contra CD25

- 20 *Unión de los sobrenadantes de los anticuerpos monoclonales humanos contra CD25 a CD25 expresado constitutivamente en células CHO:* AB1, AB7, AB11 y AB12 todas unidas a CD25 expresado en células CHO transfectadas determinadas mediante citometría de flujo (véase la Tabla 3).

- 25 *Unión de sobrenadantes de anticuerpos monoclonales humanos contra CD25 a hrCD25 en ensayo de ELISA:* AB1, AB7, AB11 y AB12 todas se unieron a CD25 según lo analizado en un ELISA usando hrCD25 como antígeno de revestimiento. Se revistieron placas de 96 pocillos (Greiner) durante la noche a T.A. con rhCD25 (100 ng/ml, R & D), tras lo que se bloqueó la unión inespecífica mediante el revestimiento de las placas con PBSTC durante 1 hora a T.A. Tras lavar (x 3) las placas con PBST, se añadieron 100 µl de anticuerpo de la muestra. Tras lavar las placas tres veces (PBST), se incubaron con estreptavidina-poli-HRP (1:10.000) en PBS y se añadieron 100 µl a cada pocillo (1 hora, temperatura ambiente). Tras lavar las placas (3 veces en PBST), se prepararon 10 mg de ABTS (Roche) por cada 10 ml de tampón de ABTS (Roche) y se añadieron 100 µl a cada pocillo. Transcurridos 20 minutos, se leyó la absorción a 405 nm con un lector de ELISA (EL 808, Bio-Tek Instruments).
- 30

Tabla 3

Nombres, isotipos y unión de los clones a CD25			
Clon	Subclase	Unión a CD25 ¹	CD25-CHO ²
AB1	IgG1	+	+
AB7	IgG1	+	+
AB11	IgG1	+	+
AB12	IgG1	+	+
¹ Unión de los sobrenadantes del cultivo de clones determinada mediante ELISA de rhCD25 ² Unión a CD25 expresada sobre células CHO transfectadas y determinada mediante citometría de flujo			

- 35 *Inhibición de la unión de IL-2 biotinilada a su receptor mediante sobrenadantes de anticuerpos monoclonales humanos contra CD25:* Para examinar el grado de bloqueo o inhibición de la unión de IL-2 a CD25 por parte de los anticuerpos monoclonales humanos, se revistieron placas de 96 pocillos (Greiner) durante la noche a T.A. con rhCD25 (100 ng/ml, R & D Systems, MN, EE.UU.), tras lo que se bloqueó la unión inespecífica mediante el revestimiento de las placas con PBSTC durante 1 hora a T.A. Tras lavar (x 3) las placas con PBST, se añadieron 100 µl de anticuerpo de la muestra (intervalo de concentraciones: 10, 33 y 100 ng/ml). A efectos comparativos, también se añadió Zenapax®. Transcurridos 10 minutos, se añadió rIL-2-biotina (50 ng/ml) (1,5 horas, T.A.). Tras lavar las placas 3 veces (en PBST), se incubaron con estreptavidina-poli-HRP (dilución 1:10.000 del patrón) en PBS, y se añadieron 100 µl a cada pocillo (1 hora, temperatura ambiente). Tras lavar las placas (3 veces en PBST), se prepararon 10 mg de ABTS (Roche) por cada 10 ml de tampón ABTS (Roche) y se añadieron 100 µl a cada pocillo.
- 40
- 45 Transcurridos 20 minutos, se leyó la absorción a 405 nm con un lector de ELISA (EL 808, Bio-Tek Instruments). Los datos muestran uno de los dos experimentos representativos. Como se muestra en la Figura 11, los sobrenadantes de anticuerpos monoclonales humanos contra CD25 AB1, AB7, AB11 y AB12 fueron capaces de inhibir la unión de IL-2 biotinilado a CD25 más eficazmente que Zenapax®.

50

Inhibición de la unión de Zenapax® a CD25 mediante sobrenadantes de anticuerpos monoclonales humanos contra CD25: Para examinar el grado de bloqueo o inhibición de la unión de Zenapax® a CD25 por parte de los anticuerpos monoclonales humanos, se revistieron placas de 96 pocillos (Greiner) durante la noche a T.A. con rhCD25 (100 ng/ml, R & D Systems, MN, EE.UU.), tras lo que se bloqueó la unión inespecífica mediante el revestimiento de las placas con PBSTC durante 1 hora a T.A. Tras lavar (x 3) las placas con PBST, se añadieron 100 µl de muestra (intervalo de concentraciones: 10, 33 y 100 ng/ml). Transcurridos 10 minutos, se añadió Zenapax® biotinilado (5 ng/ml) (1,5 horas, T.A.). Tras lavar las placas 3 veces (en PBST), se incubaron con estreptavidina-poli-HRP (dilución 1:10.000 del patrón) en PBS, y se añadieron 100 µl a cada pocillo (1 hora, temperatura ambiente). Tras lavar las placas (3 veces en PBST), se prepararon 10 mg de ABTS (Roche) por cada 10 ml de tampón ABTS (Roche) y se añadieron 100 µl a cada pocillo. Transcurridos 20 minutos, se leyó la absorción a 405 nm con un lector de ELISA (EL 808, Bio-Tek Instruments). Los datos muestran uno de los dos experimentos representativos. Como se muestra en la Figura 12, los sobrenadantes de anticuerpos monoclonales humanos contra AB1, AB7, AB11 y AB12 bloquean la unión de Zenapax® a CD25.

Ejemplo 4: Los anticuerpos monoclonales humanos contra CD25 inhiben la proliferación de linfocitos T inducida por anticuerpos contra CD3

Se analizó la capacidad de los anticuerpos humanos para inhibir la proliferación de linfocitos T mediante el ensayo de proliferación de linfocitos T. A efectos comparativos, también se añadió Zenapax®, así como un anticuerpo de control del isotipo (hlgG1/k).

Aislamiento de PBMC: se colocaron células de sangre humana (obtenidas en capas leucocitarias del banco de sangre de la Cruz Roja holandesa, Utrecht, Países Bajos) en un gradiente de Ficoll (Pharmacia, 2.500 rpm, 25 minutos). Con una pipeta, se recogieron las PBMC en RPMI 1640 (complementado con FCS al 10% (Wisent Multicell optimum C241), L-glutamina 2 mM, 50 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin, HEPES 25 mM (todos derivados de Bio Whittaker, Europa)).

Ensayo de proliferación de linfocitos T: se diluyeron PBMC humanas en medio RPMI 1640 (complementado con FCS al 10% (Wisent Multicell optimum C241), L-glutamina 2 mM, 50 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin, HEPES 25 mM (todo obtenido en Bio Whittaker, Europa)) a $1,5 \times 10^5$ células/pocillo (en triplicado) en placas de fondo plano de 96 pocillos (Greiner). Se estimularon las células con anticuerpo contra CD3 (CLB-T3/4.E, N° de cat. M1654, 10 ng/ml). A continuación se añadieron 50 µl de anticuerpos experimentales diluidos de manera creciente a las células (variando de 500 ng/ml a 7,8 ng/ml, en diluciones de dos etapas). Transcurridos cinco días (37 °C, CO₂ al 5%) se cuantificó la proliferación mediante el uso de BrdU (concentración final: 10 µM, Roche) de acuerdo con el método descrito a continuación.

Ensayo de marcaje con BrdU (kit de tinción con BrdU de Roch, N° de cat. 1 647 229): se añadió solución de marcaje con BrdU (100 µM) a los pocillos y se incubaron las células durante la noche (37 °C, CO₂ al 5%). Se volvieron a suspender las células en pozos y se centrifugaron (10 minutos, 300 g). Se desechó el sobrenadante y se secó el sedimento celular (1 hora, 60 °C). A continuación, se incubó el sedimento con FixDenat (200 µl/pocillo, 30 minutos, T.A.). Tras la incubación, se desechó el FixDenat y se añadieron 100 µl/pocillo de POD contra BrdU (se añaden 100 µl/l de solución patrón contra BrdU a 10 ml de solución de la dilución de Ac) al sedimento (1 hora, temperatura ambiente). Tras desechar el sobrenadante, se lavaron las placas (x 3) con solución de lavado (200 µl/pocillo). Por último, se añadieron 100 µl/pocillo de solución de sustrato al sedimento (5 minutos, T.A.). Se detuvo la reacción de coloración con H₂SO₄ (25 µl/pocillo, 1 M) y se leyó la densidad óptica con un lector de ELISA a 450 nm (Bio-Tek Instruments).

Como se muestra en la Figura 13, los anticuerpos monoclonales humanos AB1, AB7 y AB12 inhibieron la proliferación de linfocitos T inducida por el anticuerpo contra CD3 de una manera dependiente de la dosis. La inhibición producida por los anticuerpos humanos fue más eficaz que la producida por Zenapax®. Los datos muestran uno de los tres experimentos representativos.

Ejemplo 5: Los anticuerpos monoclonales humanos contra CD25 inhiben la MLR

Se analizó la capacidad de los anticuerpos humanos para inhibir la MLR usando el ensayo de MLR. A efectos comparativos, se analizó Zenapax®, así como un anticuerpo de control de isotipo (hlgG1/k). Se diluyeron las PBMC humanas (obtenidas en capas leucocitarias del banco de sangre de la Cruz Roja holandesa, Utrecht, Países Bajos) de dos donantes de MHC no coincidentes en medio RPMI 1640 (complementado con FCS al 10% (Wisent Multicell optimum C241), L-glutamina 2 mM, 50 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin (todo obtenido Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Escocia)) hasta $2,0 \times 10^6$ células/ml. Se irradiaron las PBMC del primer donante (2000 radiaciones) y se mezclaron ($1,0 \times 10^5$ células/pocillo) con PBMC del segundo donante ($1,0 \times 10^5$ células/pocillo) en placas de 96 pocillos de fondo plano (Greiner) por triplicado. Entonces, se añadieron 50 µl de anticuerpos experimentales diluidos de forma creciente a las células (variando de 50 ng/ml a 0,8 ng/ml, en diluciones de dos etapas). Tras seis días de cultivo (37 °C, CO₂ al 5%), se cuantificó la proliferación usando BrdU (concentración final: 10 Mm, Roche) de acuerdo con el método descrito anteriormente.

Como se muestra en la Figura 14, los anticuerpos monoclonales humanos AB1, AB7 y AB12 inhibieron la MLR de una manera dependiente de la dosis. La inhibición de la MLR producida por AB1, AB7 y AB12 (a dosis entre aproximadamente 1 y 3 ng/ml) fue más eficaz que la inhibición producida por Zenapax®. Los datos muestran uno de los tres experimentos representativos.

Ejemplo 6: Análisis cinético de AB12 en un instrumento BIAcore 3000

Los análisis de afinidad se realizaron mediante el control de los cambios en una resonancia de plasmones superficiales con un instrumento BIAcore 3000. Se usó un BIAcore 3000 y un control con el programa informático BIAcore 3000 (BIAcore, Uppsala, Suecia, N° de lote BR-1100-43). Se inmovilizó CD25 humano (R&D Systems, N° de lote 223-2A/CFO) en un chip sensor CM-5 a baja densidad (BIAcore, N° de lote BR-1000-14) usando química de acoplamiento con amina según las recomendaciones del fabricante. Tras bloquear los sitios de unión residuales del chip sensor activado con el uso de etanol-amina-HCl, se realizó un análisis cinético a 25° C (de acuerdo con las recomendaciones del fabricante) usando anticuerpo monoclonal humano AB12 y a efectos comparativos, Zenapax®. Se hicieron fluir las muestras que contenían AB12 y Zenapax®, respectivamente, sobre la superficie del chip sensor revestido, permitiendo la asociación de AB12 y Zenapax® con rhCD25. Se controlaron la asociación y la disociación de AB12 y Zenapax®, respectivamente, mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR) en el chip sensor. Los resultados se visualizaron usando un BIAcore 3000 (Bio-Tek Instruments) y se analizaron usando el programa informático BIAevaluation 3.1 (BIAcore, Uppsala, Suecia), usándose la unión a Languir 1:1 como modelo preestablecido.

La K_D de AB12 para la unión a rhCD25 determinada mediante análisis con BIAcore:

$$4,74 \times 10^{-11} \pm 0,43 \times 10^{-11}.$$

La K_D de Zenapax para la unión a rhCD25 determinada mediante análisis con BIAcore: $1,52 \times 10^{-10} \pm 0,27 \times 10^{-10}$.

Ejemplo 7: El tratamiento de blastos T con AB12 produce la interiorización de CD25

Se analizó la capacidad de AB12 para inducir la interiorización de CD25. Se incluyó anti-KLH (anticuerpo de isotipo IgG1/k humano, específico de hemocianina de lapa californiana) como anticuerpo de control de isotipo.

Inducción de blastos T: tras el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de muestras de sangre con heparina usando un gradiente de medio de separación de linfocitos, se estimularon las células PBMC durante tres a cuatro días con 5 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA; Difco, N° de cat. 211796) en medio de cultivo (37 °C, CO₂ al 5%).

Estimulación de blastos T para examinar la interiorización: tras cosechar las células y lavar en PBS, se contaron las células con azul de tripano. Se preincubó una parte de los blastos T (1×10^6 células/ml) (4 °C, durante 15 min) con AB12 marcado con FITC (2 µg/ml de AB12-FITC) o anti-KLH marcado con FITC (2 µg/ml) como control del isotipo, o con la adición de anticuerpos. Tras la preincubación, se lavaron las células en PBS, y se añadieron 1×10^6 células (en 1 ml de medio de cultivo) a placas de 24 pocillos, y se incubaron durante 18 horas (37 °C, CO₂ al 5%). Se incubó el resto de los blastos T en ausencia o en presencia de AB12 marcado con FITC (2 µg/ml) o anti-KLH marcado con FITC (2 µg/ml) durante 18 horas (37 °C, CO₂ al 5%).

Tras la incubación, se cosecharon las células y se marcaron con aglutinina de germen de trigo marcada con rodamina (1 µg/ml, marcaje de membranas; Molecular Probes, N° de cat. W-849) a 4 °C durante 15 min. Tras ello, se lavaron las células con PBS y se volvieron a suspender en 25 µl de Vectashield DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). A continuación, se pipetearon 10 µl de suspensión celular sobre las placas de tejidos, se revistieron y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia (Carl Zeiss) y se tomaron fotografías con filtro de TRITC para la tinción con rodamina (filtro 15, Zeiss) o con el filtro de FITC para la tinción con FITC (filtro 09, Zeiss). No se muestra la tinción de la membrana, obtenida con la aglutinina de germen de trigo marcada con rodamina.

Como se muestra en las Figuras 15A y 15B, tras 18 horas de cultivo, se puede encontrar la señal de AB12-FITC en el interior de las células. La Figura 15A muestra el resultado tras cultivar las células durante 18 horas después de una preincubación (15 min) con AB12-FITC y un lavado, y la Figura 15B muestra el resultado tras el cultivo de las células durante 18 horas en presencia de AB12-FITC. Un experimento de control con anticuerpo contra KLH conjugado con FITC irrelevante (Figura 15C) muestra que no hay interiorización del anticuerpo marcado con FITC.

Ejemplo 8: El tratamiento de blastos T con AB12 produce la interiorización de CD25 medida mediante citometría de flujo

En otro experimento, se usó una citometría de flujo para determinar la interiorización de AB12 marcado con FITC en blastos T a diferentes intervalos temporales.

Tras el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de muestras de sangre con heparina usando un gradiente de medio de separación de linfocitos (Ficoll), se estimularon las células PBMC durante tres a cuatro días con 5 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA; Difco, N° de cat. 211796) en medio de cultivo (37 °C, CO₂ al 5%).

Tras tres días de cultivo, se cosecharon los blastos T, se lavaron en PBS, se contaron con azul de tripano. Se añadieron a los blastos T (2,5 x 10⁶ células en 2 ml de medio de cultivo), 2 µg/ml de AB12 marcado con FITC o anti-KLH marcado con FITC (anticuerpo de control de isotipo). Tras preincubar las células (4 °C, 1 hora), se dividieron en dos partes. Una parte se lavó en medio de cultivo, mientras que la otra parte no se lavó. Tras lavar, se volvieron a suspender las muestras de la preincubación en medio de cultivo. Se incubaron ambas partes a 4 °C o a 37 °C.

Tras 0, 0,5, 1 o 4,5 horas de incubación (bien a 4 °C o a 37 °C), se añadieron 3 ml de tampón de FACS (PBS complementado con ASB al 0,05% y 0,01 µg de azida de sodio) a las células, y se sometieron a una centrifugación descendente las células a 300 g (4 °C). En una parte, se volvieron a suspender las células en 200 µl de tampón de FACS, mientras que en la otra parte, las células se volvieron a suspender en 200 µl de tampón de FACS y 1 mg/ml de bromuro de etidio (Sigma, N° de cat. E8751). El bromuro de etidio se añadió inmediatamente antes de la adquisición de las células mediante citometría de flujo.

El bromuro de etidio se usó para apagar la señal de fluorescencia en la superficie celular. Como se muestra en la Figura 16, la proporción de fluorescencia de las muestras incubadas a 4 °C medida con o sin bromuro de etidio fue de aproximadamente uno. Esto indica que no ha tenido lugar interiorización. Las células cultivadas a 37 °C mostraron un aumento de esta proporción de fluorescencia frente al tiempo. Esto indica que la interiorización de AB12-FITC ha tenido lugar. Como se esperaba, la incubación de las células en presencia continuada de AB12 marcado con FITC produce niveles más altos de interiorización (Figura 16B) en comparación con células sólo preincubadas con AB12 marcado con FITC (Figura 16A). La figura 16A muestra la proporción de la intensidad de fluorescencia media (MFI) para las células preincubadas durante 1 hora y con el exceso de AB12 marcado con FITC retirado mediante lavado. La Figura 16B muestra el resultado después de cultivar las células en presencia de AB12 marcado con FITC. La proporción de MFI se determina dividiendo la MFI de las muestras de ensayo entre IMF de la muestra a las 0 horas. No se observó tinción con el anticuerpo de control de isotipo (anti-KLH-FITC, datos no mostrados).

Esta característica de interiorización de los anticuerpos de la invención les hará adecuados para conjugarlos con una toxina para el tratamiento de, por ejemplo, la leucemia de linfocitos T/linfoma en adultos, el linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de linfocitos T cutáneo (incluyendo micosis fungoide y síndrome de Sezary), linfomas de linfocitos T periféricos, linfoma de Hodgkin, leucemia de células vellosas y leucemia linfocítica crónica (CLL)/linfoma linfocítico pequeño (SLL).

En otro contexto, los anticuerpos de la invención se someten a radiomarcado con un radioisótopo adecuado para el tratamiento de, por ejemplo, la leucemia de linfocitos T/linfoma en adultos, el linfoma anaplásico de células grandes, linfoma de linfocitos T cutáneo (incluyendo micosis fungoide y síndrome de Sezary), linfomas de linfocitos T periféricos, linfoma de Hodgkin, leucemia de células vellosas y leucemia linfocítica crónica (CLL)/linfoma linfocítico pequeño (SLL).

Además, los anticuerpos se pueden marcar con ¹¹¹In para determinar la carga tumoral y ajustar, por tanto, la dosis de anticuerpo radiomarcado que se vaya a administrar.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genmab A/S

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANOS CONTRA CD25

<130> GMI-059PC

<150> 60/426690

<151> 15-11-2002

<160> 61

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 381

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1


```

cagggttcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaagtc 60
tcttgcaagg cttctggagg cacttcagc cgttatccta tcaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaagg atcatcccta tccttggtat agcagactac 180
gcacagaggt tccagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgaa cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attattgtgc gaggagggac 300
tggggagact actggggcca gggaaacctg gtcaccgtct cctcagcctc caccaagggc 360
ccatcggtct tccccctggc a 381

```

<210> 2
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Arg Tyr
      20          25          30
Pro Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35          40          45
Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asp Tyr Ala Gln Arg Phe
      50          55          60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
      65          70          75          80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85          90          95
Ala Arg Arg Asp Trp Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
      100          105          110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
      115          120          125

```

<210> 3
 <211> 420
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 3

```

atggaagccc cagcacagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaatttgtt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtcg gagggttagc agcagcttct tagcctggta ccagcagaaa 180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatagta gtcaccgct cactttcggc 360
ggaggggacca aggtggagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttccc 420

```

<210> 4
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

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

<210> 5
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 5

caggttcagc	tggtgcagtc	tggggctgag	gtgaagaagc	ctgggtcctc	gggtgaaggtc	60
tcctgcaagg	cttctggagg	caccttcagc	agatatgcta	tcaactgggt	gcgacaggcc	120
cctggacaag	gacttgagtg	gatgggaagg	atcatcccta	tccttgatat	agcagactac	180
gcacagaagt	tccaggacag	agtcacgatt	accgcggaca	agtccacgaa	cacagcctac	240
atggagctga	gcagcctgag	atctgaggac	acggccgtgt	attactgtgc	gagaaaggac	300
tggttcgacc	cctggggcca	gggaaccctg	gtcacctct	cctcagcctc	caccaagggc	360
ccatcggtct	tccccctggc	a				381

<210> 6
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Arg	Tyr
		20					25					30			
Ala	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Arg	Ile	Ile	Pro	Ile	Leu	Asp	Ile	Ala	Asp	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55					60				
Gln	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Arg	Lys	Asp	Trp	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
			100					105					110		
Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
			115				120					125			

<210> 7
 <211> 421
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 7

```

atggaagccc cagcacagct tctcttcttc ctgctactct ggctcccaga tatcacccga 60
gaaaatgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctctgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtcg gagtggtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gtagggccac tggcatccca 240
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gttcaccgat caccttcggc 360
caagggacac gactggagat taaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccc 420
g

```

5 <210> 8
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 8

```

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

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
          100          105          110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
          115          120

```

15 <210> 9
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 9

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaagtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc cgttatccta tcaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaagg atcatcccta tccttggtat agcagactac 180

gcacagaggt tccagggcag agtcacgatt accgcggaca aattcacgaa cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcctgtg attattgtgc gaggagggac 300
tgaggagact actggggcca gggaaccctg gtcacccgtc cctcagcctc caccaagggc 360
ccatcggtct tccccctggc a

```

25 <210> 10
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Arg	Tyr
		20						25					30		
Pro	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Arg	Ile	Ile	Pro	Ile	Leu	Gly	Ile	Ala	Asp	Tyr	Ala	Gln	Arg	Phe
	50					55				60					
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Phe	Thr	Asn	Thr	Ala	Tyr
65					70					75				80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Arg	Arg	Asp	Trp	Gly	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
		100						105					110		
Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	
		115					120					125			

<210> 11
 <211> 421
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 11

atggaagccc	cagcacagct	tctcttcctc	ctgctactct	ggctcccaga	taccaccgga	60
gaaattgtgt	tgacgcagtc	tccaggcacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	120
ctctcctgca	gggccagtca	gagtggttagc	agcagcttct	tagcctggta	ccagcagaaa	180
cctggccagg	ctcccagget	cctcatctat	ggtgcatcca	gcagggccac	tggcatccca	240
gacaggttca	gtggcagtgg	gtctgggaca	gacttcaetc	tcaccatcag	cagactggag	300
cctgaagatt	ttgcagtgtg	ttactgtcag	cagtatagta	gctcaccgct	cactttcggc	360
ggagggacca	aggtggagat	caaacgaact	gtggctgcac	catctgtctt	catcttcccc	420
g						421

<210> 12
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12

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

<210> 13
 <211> 381
 <212> ADN

ES 2 401 136 T3

<213> Homo sapiens

<400> 13

```
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc aggtatatta tcaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggaagg atcatcccta tccttggtgt agaaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaaaggac 300
tggtttgatt actggggcca ggggaacctg gtcacogtct cctcagcctc caccaagggc 360
ccatcggtct tccccctggc a 381
```

5

<210> 14

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1      5      10      15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Arg Tyr
20     25     30
Ile Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35     40     45
Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Glu Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50     55     60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65     70     75     80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85     90     95
Ala Arg Lys Asp Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100    105    110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115    120    125
```

15

<210> 15

<211> 418

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 15

```
atggaagccc cagcacagct tctcttctct ctgtactctt ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcttgca gggccagtca gactgttagc agctacttag cctgggtacca gcagaaacct 180
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcattccagca gggccactgg catcccagac 240
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag actggagcct 300
gaagattttg cagtgtatta ctgtcagcag tatggttagt caccgctcac ttctggcgga 360
gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttccccg 418
```

25

<210> 16

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

30

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

<210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

Arg Tyr Pro Ile Asn
 1 5

<210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18

Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asp Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly

<210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19

Arg Asp Trp Gly Asp Tyr
 1 5

<210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala
 1 5 10

<210> 21
 <211> 7
 <212> PRT

ES 2 401 136 T3

<213> Homo sapiens

<400> 21

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

10

<213> Homo sapiens

<400> 22

Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Pro Leu Thr
1 5

15

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 23

Arg Tyr Ala Ile Asn
1 5

25

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 24

Arg Ile Ile Pro Ile Leu Asp Ile Ala Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Asp

35

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

40

Lys Asp Trp Phe Asp Pro
1 5

45

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Arg Ala Ser Gln Ser Gly Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

50

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

ES 2 401 136 T3

<213> Homo sapiens

<400> 27

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 28

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Ile Thr
1 5

15

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 29

Arg Tyr Pro Ile Asn
1 5

25

<210> 30

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 30

Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asp Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
1 5 10 15
Gly

35

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

40

Arg Asp Trp Gly Asp Tyr
1 5

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

45 <213> Homo sapiens

<400> 32

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Phe Leu Ala
1 5 10

50

<210> 33

<211> 7

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

5

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 34

Gln Gln Tyr Ser Ser Ser Pro Leu Thr
1 5

15

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 35

Arg Tyr Ile Ile Asn
1 5

25

<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 36

Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Glu Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

35

<210> 37
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

<400> 37

Lys Asp Trp Phe Asp Tyr
1 5

45

<210> 38
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

50

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 39

ES 2 401 136 T3

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 39
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 40
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 41
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 41
 Cys Ala Gly Gly Thr Lys Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Cys
 1 5 10 15
 Ala Gly Thr Cys
 20
 25 <210> 42
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 42
 Ser Ala Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly Lys Thr Gly Gly
 1 5 10 15
 Ala Gly Thr Cys
 20
 35 <210> 43
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 43
 Gly Ala Gly Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Cys
 1 5 10 15
 Ala Gly Thr Cys
 20
 45 <210> 44
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50 <400> 44

ES 2 401 136 T3

Ala Thr Gly Gly Ala Cys Thr Gly Gly Ala Cys Cys Thr Gly Gly Ala
 1 5 10 15
 Gly Cys Ala Thr Cys
 20

<210> 45
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Thr Gly Gly Ala Ala Thr Thr Gly Gly Gly Gly Cys Thr Gly Ala
 1 5 10 15
 Gly Cys Thr Gly
 20

<210> 46
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46

Ala Thr Gly Gly Ala Gly Thr Thr Thr Gly Gly Arg Cys Thr Gly Ala
 1 5 10 15
 Gly Cys Thr Gly
 20

<210> 47
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47

Ala Thr Gly Ala Ala Ala Cys Ala Cys Cys Thr Gly Thr Gly Gly Thr
 1 5 10 15
 Thr Cys Thr Thr Cys
 20

<210> 48
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48

Ala Thr Gly Gly Gly Gly Thr Cys Ala Ala Cys Cys Gly Cys Cys Ala
 1 5 10 15
 Thr Cys Cys Thr
 20

<210> 49
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49

Thr Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala Gly Ala Cys Cys
 1 5 10 15
 Gly Ala Thr Gly Gly
 20

<210> 50
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50

Arg Ala Cys Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Thr Gly Ala Tyr Cys Cys
 1 5 10 15
 Ala Gly Thr Cys
 20

<210> 51
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51

Gly Tyr Cys Ala Thr Cys Tyr Arg Gly Ala Thr Gly Ala Cys Cys Cys
 1 5 10 15
 Ala Gly Thr Cys
 20

<210> 52
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52

Gly Ala Thr Ala Thr Thr Gly Thr Gly Ala Thr Gly Ala Cys Cys Cys
 1 5 10 15
 Ala Gly Ala Cys
 20

<210> 53
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 53

Gly Ala Ala Ala Thr Thr Gly Thr Gly Thr Thr Gly Ala Cys Arg Cys
 1 5 10 15
 Ala Gly Thr Cys
 20

<210> 54
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 54

ES 2 401 136 T3

Gly Ala Ala Ala Thr Trp Gly Thr Arg Ala Thr Gly Ala Cys Ala Cys
 1 5 10 15
 Ala Gly Thr Cys
 20

<210> 55
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 55

Gly Ala Thr Gly Thr Thr Gly Thr Gly Ala Thr Gly Ala Cys Ala Cys
 1 5 10 15
 Ala Gly Thr Cys
 20

<210> 56
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 56

Gly Ala Ala Ala Thr Thr Gly Thr Gly Cys Thr Gly Ala Cys Thr Cys
 1 5 10 15
 Ala Gly Thr Cys
 20

<210> 57
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 57

Cys Cys Cys Gly Cys Thr Cys Ala Gly Cys Thr Cys Cys Thr Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Cys Thr Cys Cys Thr Gly
 20

<210> 58
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 58

Cys Cys Cys Thr Gly Cys Thr Cys Ala Gly Cys Thr Cys Cys Thr Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Cys Thr Gly Cys
 20

<210> 59
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 59

ES 2 401 136 T3

Cys Cys Cys Ala Gly Cys Gly Cys Ala Gly Cys Thr Thr Cys Thr Cys
 1 5 10 15
 Thr Thr Cys Cys Thr Cys Cys Thr Gly Cys
 20 25

<210> 60
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 60

Ala Thr Gly Gly Ala Ala Cys Cys Ala Thr Gly Gly Ala Ala Gly Cys
 1 5 10 15
 Cys Cys Cys Ala Gly Cys Ala Cys Ala Gly Cys
 20 25

<210> 61
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 61

Cys Gly Gly Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly Ala Ala Gly Ala Cys Ala
 1 5 10 15
 Gly Ala Thr Gly
 20

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a CD25 humano e inhibe la unión de IL-2 a CD25, en el que el anticuerpo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de V_L que tienen las secuencias de aminoácidos de:
 - (i) SEC ID N°: 23, 24, 25, 26, 27 y 28;
 - (ii) SEC ID N°: 29, 30, 31, 32, 33 y 34;
 - (iii) SEC ID N°: 35, 36, 37, 38, 39 y 40; o
 - (iv) SEC ID N°: 17, 18, 19, 20, 21 y 22.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1 que se une a CD25 humano e inhibe la unión de IL-2 a CD25, en el que el anticuerpo comprende regiones variables de cadena pesada humana y cadena ligera kappa humana que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID N°:6 y 8, SEC ID N°:14 y 16, SEC ID N°:2 y 4 o SEC ID N°:10 y 12, respectivamente.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2 codificado por los aminoácidos de cadena pesada humana y cadena ligera kappa humana que comprenden las secuencias de nucleótidos de sus regiones variables como las expuestas en SEC ID N°:5 y 7, SEC ID N°:13 y 15, SEC ID N°:1 y 3 o SEC ID N°:9 y 11, respectivamente.
4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende:
 - (i) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada derivada de una secuencia de la línea germinal $V_H1-69/JH4b$ o $V_H1-69/JH5b$ humana y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera derivada de una secuencia de la línea germinal $A27/J_k4$ o $A27/J_k5$ humana; o
 - (i) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada derivada de una secuencia de la línea germinal $V_H1-69/D7-27/JH4b$ o $V_H1-69/D7-27/JH5b$ humana y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera derivada de una secuencia de la línea germinal $A27/J_k4$ o $A27/J_k5$ humana
5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo IgG1, un anticuerpo IgG2, un anticuerpo IgG3, un anticuerpo IgG4, un anticuerpo IgM, un anticuerpo IgA1, un anticuerpo IgA2, un anticuerpo IgA secretor, un anticuerpo IgD y un anticuerpo IgE.
6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo se disocia de CD25 humano con una constante de equilibrio de disociación (K_D) de aproximadamente 10^{-8} M o menor, preferentemente de aproximadamente 10^{-9} M o menor, y más preferentemente, de aproximadamente 10^{-10} M o menor, o 10^{-11} o incluso menor, determinada mediante tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un instrumento BIAcore 3000 con el uso de CD25 recombinante humano como ligando y el anticuerpo como analito.
7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo tiene una o más de las siguientes características:
 - (a) elimina los linfocitos T que expresan CD25;
 - (b) induce la tolerancia en los linfocitos T;
 - (c) inhibe la proliferación de los linfocitos T que expresan CD25;
 - (d) inhibe la proliferación de linfocitos T inducida por el anticuerpo contra CD3 de células mononucleares de sangre periférica (PBMC);
 - (e) inhibe la reacción linfocitaria mixta (MLR);
 - (f) interiorización del CD25 expresado en linfocitos T.
8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es un anticuerpo intacto seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo IgG1 intacto, preferentemente, un anticuerpo IgG1, κ intacto o un anticuerpo IgG1, λ intacto, un anticuerpo IgG2 intacto, un anticuerpo IgG3 intacto, un anticuerpo IgG4 intacto, preferentemente, un anticuerpo IgG4, κ intacto, un anticuerpo IgG4, λ intacto, un anticuerpo IgM intacto, un anticuerpo IgA1 intacto, un anticuerpo IgA2 intacto, un anticuerpo IgA secretor intacto, un anticuerpo IgD intacto y un anticuerpo IgE intacto, en el que el anticuerpo está glucosilado en una célula eucariota.
9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que es un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo de cadena sencilla.
10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es una proteína de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprende (i) una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera según lo definido en la reivindicación 1, que está fusionada a un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina; (ii) una región constante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región bisagra; y (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región constante CH2.

11. Un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal humano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 5 12. El hibridoma de la reivindicación 11 que comprende un linfocito B obtenido de un animal no humano transgénico en el que las reordenaciones del segmento génico V-(D)-J han producido la formación de un transgén de cadena pesada humano funcional y un transgén de cadena ligera funcional fusionados a una célula inmortalizada.
- 10 13. Un transfectoma que comprende los ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada humana y una cadena ligera humana, en el que el transfectoma produce una cantidad detectable del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 15 14. Una célula huésped eucariota o procariota *ex vivo* que comprende los ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada humana y una cadena ligera humana, en la que la célula huésped produce una cantidad detectable del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 20 15. Un animal no humano transgénico o una planta transgénica que comprende los ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada humana y una cadena ligera humana, en el que el animal o la planta produce una cantidad detectable del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 25 16. Un vector de expresión que codifica un anticuerpo monoclonal humano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
17. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el vector de expresión de la reivindicación 16 y un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, que comprende además un agente terapéutico.
- 30 18. Un producto que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el vector de expresión de la reivindicación 16 y otro agente terapéutico para su uso en el tratamiento del cuerpo de un ser humano o un animal, en el que el anticuerpo y el agente terapéutico o el vector de expresión y el agente terapéutico son para una administración por separado.
- 35 19. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende además un enlazador quelante para unir un radioisótopo.
20. Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 ligado a un agente citotóxico, un radioisótopo o un fármaco.
- 40 21. Una molécula biespecífica o multiespecífica que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y una especificidad de unión por CD3, CD4, IL-15R, FNT- α unido a la membrana o unido al receptor, o IL-15 unido a la membrana o unido al receptor.
- 45 22. Un método *in vitro* de inhibición del crecimiento y/o proliferación de una célula que expresa CD25 o de eliminación de una célula que expresa CD25, que comprende administrar un anticuerpo, una composición, un inmunoconjugado, una molécula biespecífica o una molécula multiespecífica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 17 a 21, de modo que se inhibe el crecimiento y/o la proliferación de la célula o de modo que se produce la muerte de la célula que expresa CD25, y en el que la célula que expresa CD25 es opcionalmente un linfocito T activado.
- 50 23. Un anticuerpo, una composición, un inmunoconjugado, una molécula biespecífica o multiespecífica, o vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 16 a 21 para su uso en un método para tratar el cuerpo humano o animal mediante terapia.
- 55 24. Un anticuerpo, una composición, un inmunoconjugado, una molécula biespecífica o multiespecífica, o vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 16 a 21 para su uso en un método para tratar o prevenir el rechazo de trasplantes, la enfermedad del huésped frente al injerto, una enfermedad inmune, autoinmune o inflamatoria, un trastorno cutáneo inflamatorio o hiperproliferativo o un neoplasma linfóide, en el que
 - (i) el rechazo de trasplantes es un rechazo de aloinjerto y xenoinjerto en pacientes que están siendo sometidos a un trasplante de órganos o de tejidos tal como un trasplante de corazón, pulmón, combinado de corazón y pulmón, tráquea, riñón, hígado, páncreas, esófago, intestino, piel, extremidad, cordón umbilical, células madre o células de islotes;
 - (ii) la enfermedad del huésped frente al injerto está seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de huésped frente a injerto de transfusión de sangre y enfermedad de huésped frente a injerto de médula ósea;
 - (iii) la enfermedad inmune, autoinmune o inflamatoria está seleccionada de entre artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis sorliásica, diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 insulín dependiente, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis
- 60
- 65

ulcerosa, dermato-polimiositis, síndrome de Sjögren, arteritides, incluyendo arteritis de células gigantes, anemia aplásica, asma, esclerodermia y uveítis;

(iv) el trastorno cutáneo inflamatorio o hiperproliferativo está seleccionado del grupo que consiste en soriasis, incluyendo soriasis en placa, pustulosis palmoplantar (PPP), liquen plano erosivo, pénfigo ampollar, epidermolisis bullosa, dermatitis de contacto y dermatitis atópica; o

(v) el neoplasma linfoide está seleccionado del grupo que consiste en leucemia de linfocitos T, enfermedad de Hodgkin, leucemia de células pilosas o linfoma cutáneo de linfocitos T, incluyendo micosis fungoide y síndrome de Sezary.

25. Un anticuerpo, una composición, un inmunoconjugado, una molécula biespecífica o una molécula multiespecífica o vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 16 a 21 para su uso en un método para tratar o prevenir un tumor maligno en la que es beneficiosa una inhibición de linfocitos T reguladores infiltrantes CD25+, y que está seleccionado entre cáncer gástrico, cánceres de esófago, melanoma maligno, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer cervical, cáncer de ovario y carcinoma de células renales.

26. Un anticuerpo, una composición, un inmunoconjugado, una molécula biespecífica o multiespecífica, o vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 16 a 21 para su uso en un método para tratar o prevenir un trastorno hematológico seleccionado entre leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, linfoma anaplásico de células grandes, leucemia linfocítica crónica (CLL)/linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma periférico de linfocitos T y amiloidosis secundaria.

27. El anticuerpo, la composición, el inmunoconjugado, la molécula biespecífica o multiespecífica, o el vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, en los que el método comprende administrar por separado otro agente terapéutico u otra terapia.

28. La composición de la reivindicación 17, el producto de la reivindicación 18, o el anticuerpo, la composición, el inmunoconjugado, la molécula biespecífica o multiespecífica, o el vector de expresión de la reivindicación 27, en los que el agente terapéutico es

(i) un inmunosupresor seleccionado entre ciclosporina, azatioprina, ácido micofenólico, micofenolato de mofetilo, corticosteroides tales como prednisona, metotrexato, sales de oro, sulfasalazina, antimaláricos, brequinar, leflunomida, mizoribina, 15-desoxiespergualina, 6-mercaptopurina, ciclofosfamida, rapamicina, tacrolimus (FK-506), OKT3, globulina anti-timocítica;

(ii) un agente antiinflamatorio seleccionado de entre un fármaco esteroideo, un AINE (fármaco antiinflamatorio no esteroideo) y un DMARD tal como metotrexato, hidroxicloquina, sulfasalazina, leflunomida, agentes bloqueadores del receptor IL-1, por ejemplo, anakinara, agentes bloqueadores de TNF- α , por ejemplo, etanercept, infliximab y adalimumab, y anticuerpos contra IL-6R, CTLA4lg y anticuerpos contra IL-15;

(iii) un agente o una terapia para tratar un trastorno cutáneo inflamatorio o hiperproliferativo seleccionado entre alquitrán de hulla, vitamina A, antralina, calcipotrien, tarazotene, corticosteroides, metotrexato, retinoides, por ejemplo, acicretin, ciclosporina, etanercept, alefacept, efalizumab, 6-tioguanina, micofenolato de mofetilo, tacrolimus (FK-506), hidroxiurea, y fototerapia tal como UVB (ultravioleta B de banda ancha y de banda estrecha), UVA (ultravioleta A) y PUVA (psoralen metoxalen más ultravioleta A); o

(iv) está seleccionado entre doxorubicina, cisplatino, bleomicina, carmustina clorambucil y ciclofosfamida.

29. Uso de un anticuerpo, una composición, un inmunoconjugado, una molécula biespecífica o multiespecífica, o un vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 16 a 21 en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir:

(a) rechazo de trasplantes, enfermedad del huésped frente al injerto, una enfermedad inmune, autoinmune o inflamatoria, un trastorno cutáneo inflamatorio o hiperproliferativo o un neoplasma linfoide, en los que:

(i) el rechazo de trasplantes es un rechazo de aloinjerto y xenoinjerto en pacientes que están siendo sometidos a un trasplante de órganos o de tejidos tal como un trasplante de corazón, pulmón, combinado de corazón y pulmón, tráquea, riñón, hígado, páncreas, esófago, intestino, piel, extremidad, cordón umbilical, células madre o de células de islotes;

(ii) la enfermedad del huésped frente al injerto está seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de huésped frente al injerto de transfusión de sangre y enfermedad de huésped frente al injerto de médula ósea;

(iii) la enfermedad inmune, autoinmune o inflamatoria está seleccionada de entre artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis soriásica, diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 insulino dependiente, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, dermato-polimiositis, síndrome de Sjögren, arteritides, incluyendo arteritis de células gigantes, anemia aplásica, asma, esclerodermia y uveítis;

(iv) el trastorno cutáneo inflamatorio o hiperproliferativo está seleccionado del grupo que consiste en

soriasis, incluyendo soriasis en placa, pustulosis palmoplantar (PPP), liquen plano erosivo, pénfigo ampollar, epidermolisis bullosa, dermatitis de contacto y dermatitis atópica; o

(v) el neoplasma linfoide está seleccionado del grupo que consiste en leucemia de linfocitos T, enfermedad de Hodgkin, leucemia de células pilosas o linfoma cutáneo de linfocitos T, incluyendo micosis fungoide y síndrome de Sezary.

5

(b) un tumor maligno en el que es beneficiosa una inhibición de linfocitos T reguladores infiltrantes CD25+, y que está seleccionado entre cáncer gástrico, cánceres de esófago, melanoma maligno, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células

10

no pequeñas, cáncer cervical, cáncer de ovario y carcinoma de células renales; o
(c) un trastorno hematológico seleccionado entre leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos, linfoma anaplásico de células grandes, leucemia linfocítica crónica (CLL)/linfoma linfocítico pequeño (SLL), linfoma periférico de linfocitos T y amiloidosis secundaria.

15 30. Un método *in vitro* para detectar la presencia de antígeno CD25 o una célula que exprese CD25 en una muestra que comprende:

poner en contacto la muestra con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y CD25; y

20

detectar la formación de un complejo.

31. Un kit de diagnóstico para detectar la presencia de antígeno CD25 o una célula que exprese CD25 en una muestra que comprenda el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el anticuerpo opcionalmente está ligado a un marcador detectable.

25

32. La unión de un anticuerpo antiidiotípico a un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

33. Un anticuerpo antiidiotípico de la reivindicación 32 que se une a un anticuerpo que tiene regiones variables de cadena pesada humana y cadena ligera kappa humana que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEC ID N°:2 y 4, SEC ID N°:6 y 8, SEC ID N°:10 y 12 o SEC ID N°:14 y 16, respectivamente.

30

34. Uso de un anticuerpo antiidiotípico de la reivindicación 32 o 33 para detectar el nivel de un anticuerpo monoclonal humano contra CD25 en una muestra.

35

Figura 1

Secuencias de cadena ligera

1	10	20	30	40	
EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRASQSVSSSYLAWYQOK			<u>Línea germinal</u>
EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRASQSVSSSFLAWYQOK			(1) AB1
ENVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRASQSGSSSYLAWYQOK			(1) AB7
EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRASQSVSSSFLAWYQOK			(1) AB11
EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRASQSVSS-YLAWYQOK			(1) AB12
41	50	60	70	80	
PGQAPRLLIY	GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE				<u>Línea germinal</u>
PGQAPRLLIY	GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE				(41) AB1
PGQAPRLLIY	GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE				(41) AB7
PGQAPRLLIY	GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE				(41) AB11
PGQAPRLLIY	GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE				(41) AB12
81	90	100	110	120	
PEDFAVYYCQQYGSSP	-----				<u>Línea germinal</u>
PEDFAVYYCQQYSSSPLTFGGG	TKVEIKRTVAAPSVFIFP				(81) AB1
PEDFAVYYCQQYSSSPLTFGGG	TKVEIKRTVAAPSVFIFP				(81) AB7
PEDFAVYYCQQYSSSPLTFGGG	TKVEIKRTVAAPSVFIFP				(81) AB11
PEDFAVYYCQQYSSSPLTFGGG	TKVEIKRTVAAPSVFIFP				(81) AB12

Se han subrayado CDR1, CDR2 y CDR3.

Figura 2

Secuencias de cadena pesada

1	10	20	30	40	
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV	SCKASGGTFSSYAISWVRQA				Línea germinal
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV	SCKASGGTFSRYPINWVRQA				(1) AB1
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV	SCKASGGTFSRYAINWVRQA				(1) AB7
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV	SCKASGGTFSRYPINWVRQA				(1) AB11
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV	SCKASGGTFSRYYINWVRQA				(1) AB12
41	50	60	70	80	
PGQGLEWMGRIIPILGIANYA	QKFQGRVTITADKSTSTAY				Línea germinal
PGQGLEWMGRIIPILGIADYA	QRFQGRVTITADKSTNTAY				(43) AB1
PGQGLEWMGRIIPILDIADYA	QKFQDRVTITADKSTNTAY				(43) AB7
PGQGLEWMGRIIPILGIADYA	QRFQGRVTITADKFTNTAY				(43) AB11
PGQGLEWMGRIIPILGVENYA	QKFQGRVTITADKSTSTAY				(43) AB12
81	90	100	110	120	
MELSSLRSED	TAVYYCAR-----				Línea germinal
MELSSLRSED	TAVYYCARRDWGDYWGQGL	TLTVSSASTKG			(85) AB1
MELSSLRSED	TAVYYCARKDWFDPWGQGL	TLTVSSASTKG			(85) AB7
MELSSLRSED	TAVYYCARRDWGDYWGQGL	TLTVSSASTKG			(85) AB11
MELSSLRSED	TAVYYCARKDWFDPWGQGL	TLTVSSASTKG			(85) AB12
121					
-----					Línea germinal
PSVFPLA					(121) AB1
PSVFPLA					(121) AB7
PSVFPLA					(121) AB11
PSVFPLA					(121) AB12

Se han subrayado CDR1, CDR2 y CDR3.

Figura 3

AB1 de VH sin líder

	AB62	
	FR1	
+1	Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V	
1	CAGGTTGAGC TGGTGACGTC TGGGCTGAG GTGAAGAAGC CTGGGTCTCTC GGTGAAGTC	
	FR1	FR2
	FR1	CDR1
+1	S C K A S G G T F S R Y P I N W V R Q A	
61	TCCTGCAAGG CTTCTGGAGG CACCTTCAGC CGTTATCCTA TCAACTGGGT GCGACAGGCC	
	FR2	CDR2
+1	P G Q G L E W M G R I I P I L G I A D Y	
121	CCTGGACAAG GGCTTGAGTG GATGGGAAGG ATCATCCCTA TCCTTGGTAT AGCAGACTAC	
	CDR2	FR3
+1	A Q R F Q G R V T I T A D K S T N T A Y	
181	GCACAGAGGT TCCAGGGCAG AGTCACGATT ACCGGGACA AATCCACGAA CACAGCCTAC	
	CDR3	JH4b
+1	M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R R D	
241	ATGGAGCTGA GCAGCCTGAG ATCTGAGGAC ACGGCCGTGT ATTATTGTGC GAGGAGGGAC	
	CDR3	constante gamma 1
	FR4	
	JH4b	
+1	W G D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G	
301	TGGGGAGACT ACTGGGGCCA GGGAAACCTG GTCACCGTCT CCTCAGCCTC CACCAAGGCG	
	AB90	
	constante gamma 1	
+1	P S V F P L A	
361	CCATCGGTCT TCCCCCTGGC A	

Figura 4

AB1 de VL con líder

AB125	
líder	
+1	M E A P A Q L L F L L L L L W L P D T T G
1	ATGGAAGCCC CAGCACAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCGA TACCACCGGA
AB11	
FR1	
+1	E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T
61	GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCACGGGGA AAGAGCCACC
FR2	
CDR1	
+1	L S C R A S Q S V S S S F L A W Y Q Q K
121	CTCTCTGCA GGGCCAGTCA GAGTTTAGC AGCAGCTTCT TAGCTGGTA CCAGCAGAAA
FR3	
CDR2	
+1	P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P
181	CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA
FR3	
+1	D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E
241	GACAGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG
JK4	
FR3	
FR4	
+1	P E D F A V Y Y C Q Q Y S S S P L T F G
301	CCTGAAGATT TTGCAGTGA TTAGTGTGTCAG CAGTATAGTA GCTCACCCT CACTTCGGC
AB16	
FR4	
JK4	
constante kappa	
+1	G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P
361	GGAGGGACCA AGGTGGAGAT CAAACGAAT GTGGCTGCAC CATCTGTCTT CATCTTCCCG

Figura 5

AB7 de VH sin líder

	AB62	FR1	FR2
+1	Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V		
1	CAGGTCAGC TGGTGAGTC TGGGCTGAG GTGAAGAAGC CTGGGTCCTC GGTGAAGGTC		
	FR1	CDR1	FR2
+1	S C K A S G G T F S R Y A I N W V R Q A		
61	TCCTGCAAGG CTTCTGGAGG CACCTTCAGC AGATATGCTA TCAACTGGGT GCGACAGGCC		
	FR2	CDR2	
+1	P G Q G L E W M G R I I P I L D I A D Y		
121	CCTGGACAAG GACTTGAGTG GATGGGAAGG ATCATCCCTA TCCTTGATAT AGCAGACTAC	FR3	
	CDR2		
+1	A Q K F Q D R V T I T A D K S T N T A Y		
181	GCACAGAAGT TCCAGGACAG AGTCACGATT ACCGGGGACA AGTCCAGGAA CACAGCCTAC	CDR3	
	FR3	JH5b	
+1	M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R K D		
241	ATGGAGCTGA GCAGCCTGAG ATCTGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAGAAAGGAC	FR4	
	CDR3	constante gamma 1	
	JH5b		
+1	W F D P W G Q G T L V T V S S A S T K G		
301	TGGTTCGACC CTTGGGGCCA GGAACCTTG GTCACCGTCT CCTACGCCTC CACCAAGGGC	constante gamma 1	
	AB80		
+1	P S V F P L A		
361	CCATCGGTCT TCCCCCTGGC A		

Figura 6

AB7 de VL con lider

lider	
	AB125
+1	M E A P A Q L L F L L L L W L P D I T G
1	ATGGAAGGCC CAGCACAGCT TCCTCTTCCCT CTGTACTCTT GGTCCCCAGA TATCACCCGA
	FR1
+1	E N V L T Q S P G T L S L S P G E R A T
51	GAAATGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCCACC CTGTCTCTCT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC
	FR1
	FR2
	CDR1
+1	L S C R A S Q S G S S Y L A W Y Q Q K
121	CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGGTAGC AGCAGCTACT TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA
	FR2
	FR3
	CDR2
+1	P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P
181	CTGGCCAGG CTCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATCCA GTAGGCCAC TGGCATCCCA
	FR3
+1	D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E
241	GACAGGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCAC TCACCATCAG CAGACTGGAG
	FR3
	JK5
	FR4
	CDR3
+1	P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P I T F G
301	CCTGAAGATT TTGCAGTGTA TTACTGTGTCAG CAGTATGGTA GTTACCCGAT CACCTTCGGC
	FR4
	JK5
	AB16
	constante kappa
+1	Q G T R L E I K R T V A A P S V F I F P
361	CAAGGGAC GACTGGAGAT TAAAGAACT GTGGTGCAC CATCTGTCIT CATCTTCCCC

Figura 8

AB11 de VL con líder

líder	
	AB125
+1	M E A P A Q L L F L L L L W L P D T T G
1	ATGGAGCCC CAGCACAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCGAGA TACCACCGGA
	FR1
+1	E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T
61	GAATTGTGT TGAGGCAGTC TCCAGGCACC CTGCTTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC
	FR1
	CDR1
+1	L S C R A S Q S V S S S F L A W Y Q Q K
121	CTCTCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTAGC AGCAGCTTCT TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA
	FR2
	CDR2
+1	P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P
181	CCTGGCCAGG CTCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA
	FR3
+1	D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E
241	GACAGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG
	FR3
	JK4
	FR4
+1	P E D F A V Y Y C Q Q Y S S S P L T F G
301	CCTGAGATT TTGCAGTGA TTACTGTCAG CAGTATAGTA GCTCACCCT CACTTTCGGC
	FR4
	JK4
	constante kappa
+1	G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P
361	GGAGGGACCA AGGTGGAGAT CAAACGAAC GTGGCTGCAC CATCTGTCTT CATCTTCCCC
421	G

Figura 9

AB12 de VH sin líder

	AB63	
	FR1	
+1	Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V	
1	CAGGTGCAC TGGTGCAGTC TGGGGCTGAG GTGAAGAAGC CTGGGTCCCTC GGTAAGGTC	FR2
	FR1	
	CDR1	
+1	S C K A S G G T F S R Y I I N W V R Q A	
61	TCCTGCAAGG CTTCTGGAGG CACCTTCAGC AGGTATATTA TCAACTGGGT GCGACAGGCC	
	FR2	
	CDR2	
+1	P G Q G L E W M G R I I P I L G V E N Y	
121	CCTGGACAAG GGCTTGAGTG GATGGGAAGG ATCATCCCTA TCCTTGGTGT AGAAACTAC	FR3
	CDR2	
+1	A Q K F Q G R V T I T A D K S T S T A Y	
181	GCACAGAAGT TCCAGGGCAG AGTCACGATT ACCGGGACA AATCCACGAG CACAGCCTAC	CDR3
	FR3	JH4b
+1	M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R K D	
241	ATGGAGCTGA GCAGCCTGAG ATCTGAGGAC ACGCCGTGT ATTACTGTGC GAGAAAGGAC	
	CDR3	constante gamma 1
	FR4	
	JH4b	
+1	W F D Y W G Q G T L V T V S A S T K G	
301	TGGTTTGATT ACTGGGGCCA GGAACCCCTG GTCACCGTCT CCTCAGCCTC CACCAAGGCG	
	AB90	
	constante gamma 1	
+1	P S V F P L A	
361	CCATCGGTCT TCCCCCTGGC A	

Figura 10

AB12 de VL sin líder

	AB125	líder
+1	M E A P A Q L L L F L L L L W L P D T T G	
1	ATGGAAGCCC CAGCACAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA	
	FR1	
+1	E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T	
61	GAATTTGTG TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC	
	FR1	FR2
	CDR1	
+1	L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P	
121	CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTAGC AGCTACTTAG CTTGGTACCA GCAGAAACCT	
	FR2	FR3
	CDR2	
+1	G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D	
181	GGCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGGT GCATCCAGCA GGGCCACTGG CATCCCGAC	
	FR3	
+1	R F S G S G T D F T L T I S R L E P	
241	AGGTCAGTG GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG ACTGGAGCCT	
	CDR3	
	FR3	FR4
	JK4	JK4
+1	E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P L T F G G	
301	GAAGATTITG CAGTGTAATTA CTGTCAGCAG TATGGTAGCT CACCGCTCAC TTTCGGCGGA	
	FR4	AB16
	JK4	constante kappa
+1	G T K V E I K R T V A A P S V F I F P	
361	GGGACCAAGG TGGAGATCAA AGGAATCTG GCTGCACCAT CTGTCTTCAT CTTCCCCG	

Figura 11

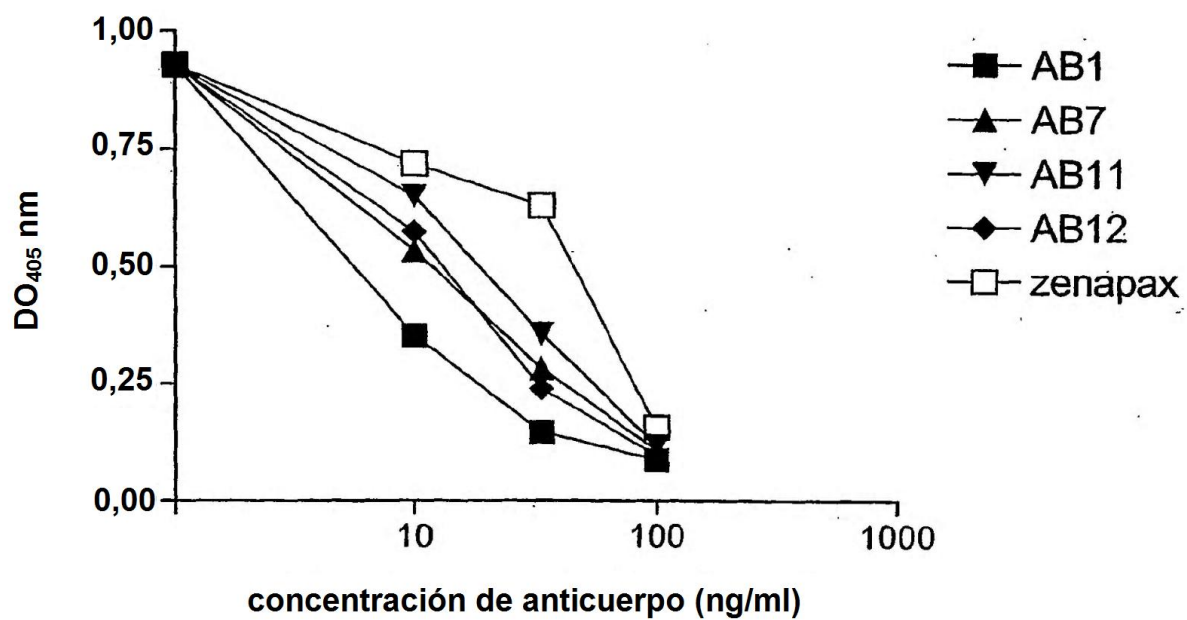


Figura 12

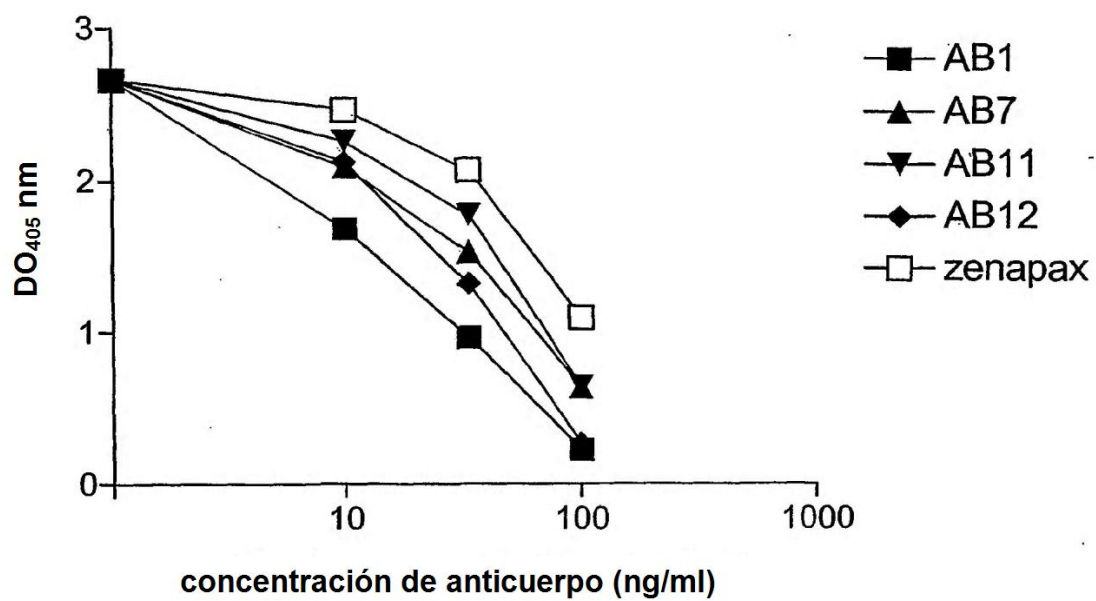


Figura 13

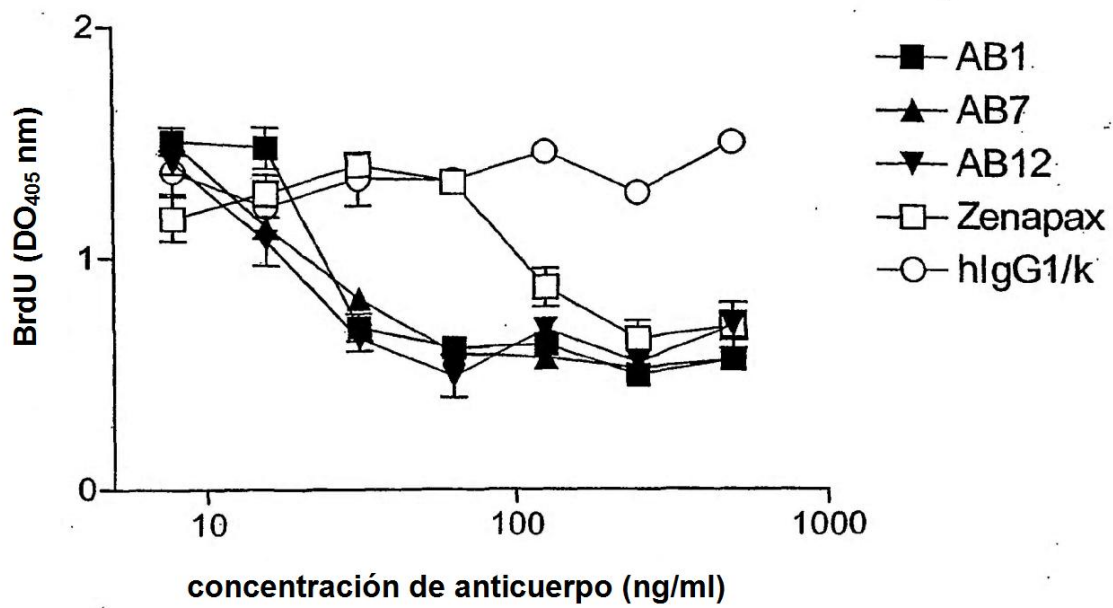


Figura 14

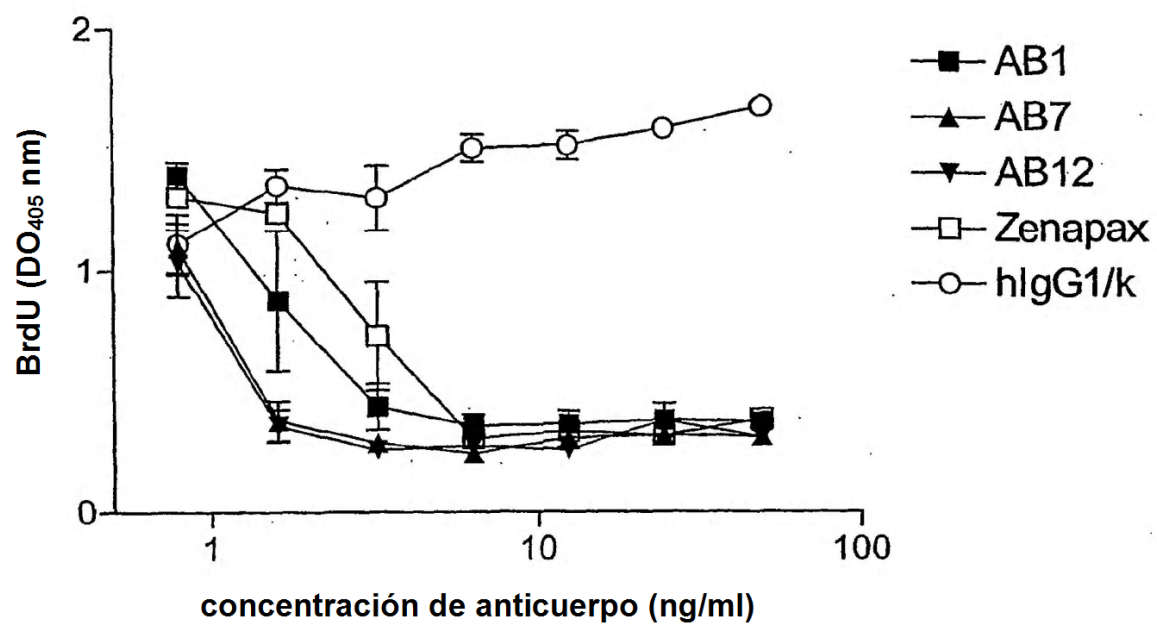


Figura 15

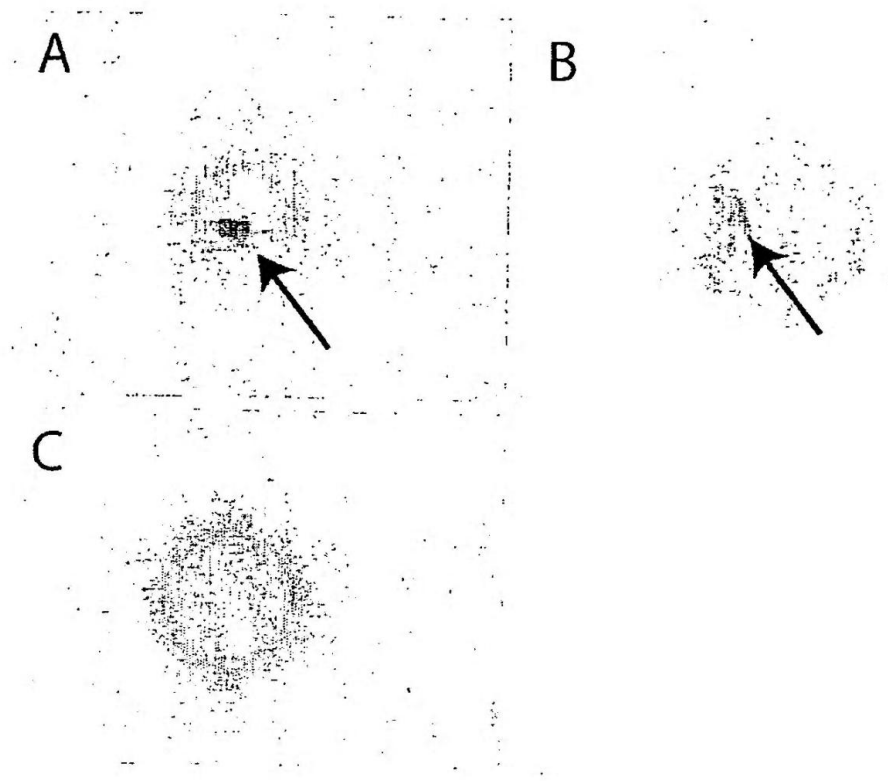
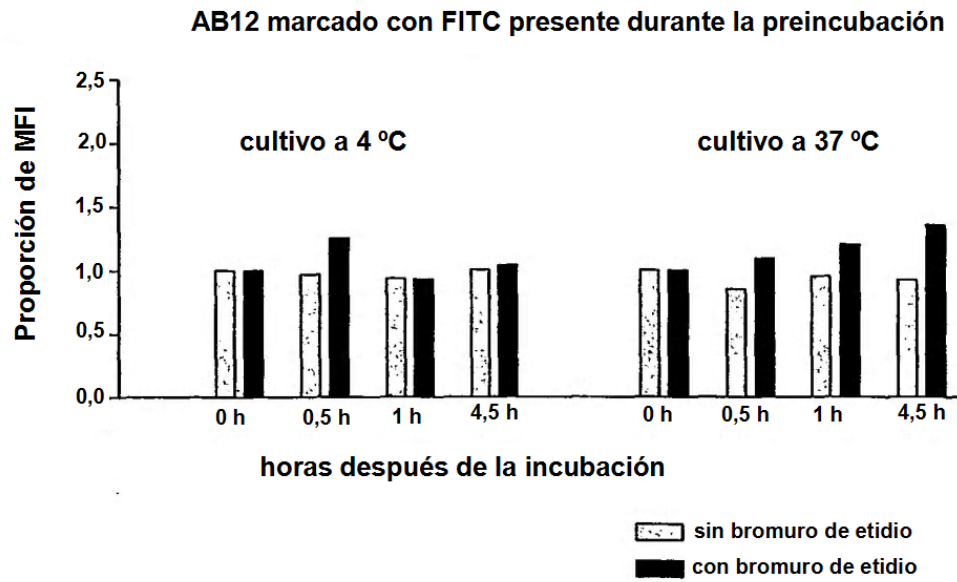


Figura 16

A



B

