

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 936 075**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.04.2017 PCT/JP2017/015767**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2017 WO17183665**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2017 E 17786002 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2022 EP 3447138**

54 Título: **Activador de células T reguladoras, y uso del mismo**

30 Prioridad:

20.04.2016 JP 2016084170

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.03.2023

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF TSUKUBA (100.0%)
1-1, Tennodai 1-chome Tsukuba-shi
Ibaraki 305-8577, JP**

72 Inventor/es:

**SHIBUYA, AKIRA;
SHIBUYA, KAZUKO;
ABE, FUMIE;
HIROCHIKA, REI y
OKUMURA, GENKI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 936 075 T3

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

DESCRIPCIÓN

Activador de células T reguladoras, y uso del mismo

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un activador de células T reguladoras y al uso del activador de células T reguladoras. Específicamente, se refiere a un activador de células T reguladoras, una composición farmacéutica para la activación de células T reguladoras, un ácido nucleico, un vector y un transformante, en el que el activador de células T reguladoras es un anticuerpo monoclonal de molécula 1 accesoria anti DNAX humana (DNAM-1) o un fragmento del mismo como se define en el presente documento. La presente solicitud se basa y reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente japonesa anterior No. 2016-084170, presentada el 20 de abril de 2016.

Antecedentes del estado de la técnica

La enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) puede ocurrir después de una transfusión de sangre o un trasplante de células madre. La enfermedad de injerto contra huésped es causada por células T activas originadas en el donante que están presentes en las células trasplantadas dañando las células del receptor. El rechazo puede ocurrir cuando un órgano de un donante se trasplanta a un receptor. Por ejemplo, en un trasplante de corazón, un trasplante vascular, un trasplante de riñón y similares, un corazón, vaso o riñón trasplantado se injerta temporalmente, pero puede desprenderse gradualmente. En consecuencia, ha habido una demanda de una tecnología para prevenir la enfermedad de injerto contra huésped y el rechazo de trasplantes.

Por ejemplo, en PTL 1, se describe que un anticuerpo neutralizante de la proteína DNAM-1 de ratón puede usarse como un fármaco para mantener el injerto de un corazón, vaso o riñón trasplantado en ratones.

La proteína DNAM-1, también conocida como CD226, es una molécula de adhesión que tiene un peso molecular de 65 kDa que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. La proteína DNAM-1 se expresa en varios linocitos humanos y de ratón, tales como células T CD4⁺, células T CD8⁺, células NK, macrófagos y células dendríticas. La ID de RefSeq de DNAM-1 humana es NP_001290547. La ID de RefSeq de DNAM-1 de ratón es NP_001034238. Los inventores encontraron que la proteína DNAM-1 se une a CD155, que se conoce como receptor de poliovirus. CD155 es una glicoproteína transmembrana de tipo I que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

Listado de citas

Literatura de patentes

PTL 1: JPA 2013-245162 (JP6048949)

T. Naebekura et al., (2010) Proceedings of the National Academy of Sciences 107(43): 18593-18598 investiga el papel de la molécula 1 accesoria DNAX (DNAM-1) en el desarrollo de enfermedad aguda de injerto contra huésped en ratones.

El documento WO 2015/009856 se refiere a métodos para tratar el cáncer usando antagonistas de unión al eje PD-1 e inhibidores de TIGIT.

El documento EP2012123 se refiere a un marcador para predecir la enfermedad de injerto contra huésped y la utilización del mismo.

Lozano Ester et al., (2013) Journal of Immunology 191(7): 1550-6606 afirma que la interacción CD226/CD155 regula el equilibrio proinflamatorio/antiinflamatorio en humanos.

Gilfillan et al., (2008) The Journal of Experimental Medicine 205(13): 2965-2973 afirma que DNAM-1 promueve la activación de linfocitos citotóxicos por células y tumores no profesionales presentadoras de antígeno.

Dardalhon et al., (2005) The Journal of Immunology, The American Association of Immunologists, Inc, US 175(3): 1558-1565 afirma que CD226 se expresa específicamente en la superficie de las células Th1 y regula su expansión y funciones efectoras.

Yumi Yamashita et al., (2013) Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy 32(1): 60-64 divulga el establecimiento y la caracterización de un nuevo anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1.

Resumen de la invención

Problema técnico

A la luz del contexto anterior, se desean tecnologías para reducir las respuestas inmunitarias humanas.

5 Solución al problema

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo, un ácido nucleico, un vector, un transformante, una composición farmacéutica y un anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo para uso en la prevención o el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped, el rechazo de trasplantes, una enfermedad autoinmune, fibrosis, enteritis inflamatoria o una alergia como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención incluye los siguientes aspectos y realizaciones.

15 En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo, que tiene una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 a CDR3 que tiene secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 a 3 respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 a CDR3 que tiene secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4 a 6 respectivamente.

20 En realizaciones del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de la presente invención, el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

25 En realizaciones del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de la presente invención, el anticuerpo o un fragmento del mismo es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.

En realizaciones del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de la presente invención, el anticuerpo o un fragmento del mismo es un anticuerpo de ratón o un fragmento tipo anticuerpo de ratón.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de la presente invención.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende el ácido nucleico de la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un transformante que comprende el vector de la presente invención. En otro aspecto, la presente invención proporciona el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de la presente invención para su uso en la prevención o el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped, el rechazo de trasplantes, una enfermedad autoinmune, fibrosis, enteritis inflamatoria, o una alergia.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para la activación de células T reguladoras, comprendiendo la composición farmacéutica el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 (1) Un anticuerpo monoclonal de molécula 1 accesoria anti-DNAX humana (DNAM-1) o un fragmento del mismo (fragmento de anticuerpo), que tiene una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 a CDR3 que tiene secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 a 3, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 a CDR3 que tiene secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 4 a 6 respectivamente.

50 (2) El anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de acuerdo con (1), que tiene una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 a CDR3 que tiene secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 a 3 respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 a CDR3 que tiene secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 4 a 6 respectivamente.

55 (3) El anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de acuerdo con (1) o (2), que tiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 modificada por eliminación, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 modificada por eliminación, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos.

60 (4) El anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de (1) a (3), que tiene una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

(5) Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de (1) a (4).

65 (6) Un vector recombinante que tiene el ácido nucleico de acuerdo con (5).

(7) Un transformante que tiene el vector recombinante de acuerdo con (6).

(8) Un inmunosupresor que incluye el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de (1) a (4) como ingrediente activo.

(9) El inmunosupresor de acuerdo con (8) para uso en la prevención o el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped.

5 (10) El inmunosupresor de acuerdo con (8) para uso en la prevención o el tratamiento del rechazo de trasplantes.

Efectos ventajosos de la invención

Breve descripción de los dibujos

10 [Fig. 1] La Fig. 1 es un diagrama que ilustra la alineación de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano Nos. 1 a 6.
 [Fig. 2] La Fig. 2 es un diagrama que ilustra la alineación de las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano Nos. 1 a 6.
 15 [Fig. 3] Las Figs. 3(a) a 3(d) son gráficos que ilustran los resultados obtenidos en el Ejemplo de prueba 2.
 [Fig. 4] Las Figs. 4(a) a 4(1) son gráficos que ilustran los resultados obtenidos en el Ejemplo de prueba 3.
 [Fig. 5] Las Figs. 5(a) a 5(e) son gráficos que ilustran las reactividades del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano Nos. 1 a 6 determinadas en el Ejemplo de prueba 4.
 [Fig. 6] Las Figs. 6(a) a 6(e) son gráficos que ilustran las reactividades del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano Nos. 1 a 6 determinadas en el Ejemplo de prueba 5.
 20 [Fig. 7] Las Figs. 7(a) a 7(e) son gráficos que ilustran las reactividades del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano Nos. 1 a 6 determinadas en el Ejemplo de prueba 6.
 [Fig. 8] Las Figs. 8(a) a 8(e) son gráficos que ilustran las reactividades del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano Nos. 1 a 6 determinadas en el Ejemplo de prueba 7.
 25 [Fig. 9] La Fig. 9 es un gráfico que ilustra los resultados de un ensayo de reacción de linfocitos mixtos realizado en el Ejemplo de prueba 8.
 [Fig. 10] La Fig. 10 es un diagrama que ilustra el protocolo del experimento en el ejemplo de prueba 9.
 [Fig. 11] La Fig. 11 es un gráfico que ilustra las tasas de supervivencia de los ratones determinadas en el Ejemplo de prueba 9.
 30 [Fig. 12] Las Figs. 12(a) y 12(b) son gráficos que ilustran las funciones hepáticas de ratones determinadas en el Ejemplo de prueba 9.
 [Fig. 13] La Fig. 13 es un diagrama que ilustra el protocolo del experimento en el ejemplo de prueba 10.
 [Fig. 14] La Fig. 14 es un gráfico que ilustra las tasas de supervivencia de los ratones determinadas en el Ejemplo de prueba 10.
 35 [Fig. 15] La Fig. 15 es un gráfico que ilustra las actividades citotóxicas de las células T CD8⁺ que reaccionaron con anticuerpos monoclonales anti-DNAM-1 humano determinados en el Ejemplo de prueba 11.
 [Fig. 16] La Fig. 16(a) es un gráfico que ilustra las proporciones de células T reguladoras con respecto a células T CD4⁺ en los bazo de ratones determinadas 14 días después de la administración del anticuerpo monoclonal No. 1 en el Ejemplo de prueba 12; y la Fig. 16(b) es un gráfico que ilustra las proporciones de células T reguladoras con respecto
 40 a células T CD4⁺ en la sangre periférica de ratones determinadas 14 días después de la administración del anticuerpo monoclonal No. 1 en el Ejemplo de prueba 12.
 [Fig. 17] La Fig. 17(a) es un gráfico que ilustra la tasa de incidencia de encefalomielitis determinada en el Ejemplo de prueba 13; y la Fig. 17(b) es un gráfico que ilustra la puntuación clínica promedio calculada en el ejemplo de prueba 13.
 45 [Fig. 18] La Fig. 18(a) es un gráfico que ilustra la cantidad de fosfatasa alcalina presente en el suero determinada en el Ejemplo de prueba 14; y la Fig. 18(b) es un gráfico que ilustra la cantidad de bilirrubina total presente en el suero determinada en el Ejemplo de prueba 14.
 [Fig. 19] La Fig. 19(a) es una micrografía del tejido hepático de un ratón de control usado en el Ejemplo de prueba 14; y la Fig. 19(b) es una micrografía del tejido hepático de un ratón con eliminación de DNAM-1 utilizado en el Ejemplo
 50 de prueba 14.
 [Fig. 20] La Fig. 20(a) incluye fotografías de secciones de riñones teñidas con tricromo de Masson tomadas en el Ejemplo de prueba 15; y la Fig. 20(b) es un gráfico que ilustra las áreas de las cortezas renales determinadas con base en los resultados ilustrados en la Fig. 20(a).
 [Fig. 21] La Fig. 21(a) es una micrografía de un corte de tejido típico del riñón de un ratón de control inmunoteñido con un anticuerpo anti- α -SMA en el Ejemplo de prueba 15; la Fig. 21(b) es una micrografía de un corte de tejido típico del
 55 riñón de un ratón inactivado para DNAM-1 inmunoteñido con un anticuerpo anti- α -SMA en el Ejemplo de prueba 15; y la Fig. 21(c) es un gráfico que ilustra las áreas de la región positiva para α -SMA en el tejido renal de ratones pertenecientes a cada uno de los grupos calculados en el Ejemplo de prueba 15.
 [Fig. 22] La Fig. 22 es un gráfico que ilustra los pesos de los ratones de control y los ratones con eliminación de DNAM-1 utilizados en el Ejemplo de prueba 16.
 60 [Fig. 23] La Fig. 23(a) es una fotografía del intestino grueso de un ratón con eliminación de DNAM-1 que se extrajo del ratón el noveno día desde el inicio de la prueba en el Ejemplo de prueba 16; la Fig. 23(b) es una fotografía del intestino grueso de un ratón de control que se extrajo del ratón el noveno día desde el inicio de la prueba en el Ejemplo de prueba 16; y la Fig. 23(c) es un gráfico que representa numéricamente los resultados mostrados en las Figs. 23(a) y
 65 23(b).

Descripción de las realizaciones

[Activador de células T reguladoras]

5 Una realización de la presente invención proporciona un activador de células T reguladoras que comprende una sustancia que inhibe la unión entre DNAM-1 y CD155, en el que dicho activador de células T reguladoras es el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de la presente invención.

10 Como se describe en los Ejemplos a continuación, los inventores encontraron que las células T reguladoras pueden activarse al inhibir la unión entre DNAM-1 y CD155. Por lo tanto, se puede usar una sustancia que inhiba la unión entre DNAM-1 y CD155 para activar las células T reguladoras.

15 Los ejemplos de la sustancia que inhibe la unión entre DNAM-1 y CD155 incluyen una sustancia que se une específicamente a DNAM-1, un agente que inhibe la expresión de DNAM-1, una sustancia que se une específicamente a CD155 y un agente que inhibe la expresión de CD155.

20 La sustancia que se une específicamente a DNAM-1 y la sustancia que se une específicamente a CD155 puede ser cualquier sustancia capaz de inhibir la unión entre DNAM-1 y CD155. Los ejemplos de dicha sustancia incluyen un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo y un aptámero. El anticuerpo se puede producir inmunizando a un animal, tal como un ratón, o seleccionando una biblioteca de anticuerpos, tal como una biblioteca de fagos. Los ejemplos de un fragmento de anticuerpo incluyen F(ab')₂, Fab', Fab, Fv y scFv. Los ejemplos de un aptámero incluyen un aptámero de ácido nucleico y un aptámero de péptido.

25 La sustancia que se une específicamente a DNAM-1 puede ser CD155 solubilizado. Los ejemplos de un CD155 solubilizado incluyen una proteína de fusión formada por la fusión de CD155 con una región constante de anticuerpo y similares. La sustancia que se une específicamente a CD155 puede ser un DNAM-1 solubilizada. Los ejemplos de DNAM-1 solubilizada incluyen una proteína de fusión formada por la fusión de DNAM-1 con una región constante de anticuerpo y similares.

30 El agente que inhibe la expresión de DNAM-1 y el agente que inhibe la expresión de CD155 puede ser cualquier sustancia capaz de reducir la expresión de DNAM-1 o CD155 y, en consecuencia, inhibir la unión entre DNAM-1 y CD155. Los ejemplos de dicha sustancia incluyen ARNpi, ARNph, miARN, ribozima, ácido nucleico antisentido y un compuesto de bajo peso molecular. El ARNpi, el ARNph, el miARN, la ribozima y el ácido nucleico antisentido pueden incluir varias modificaciones químicas para mejorar la estabilidad y la actividad. Por ejemplo, un residuo de fosfato puede reemplazarse con un residuo de fosfato modificado químicamente, tal como fosforotioato, metilfosfonato o fosforoditioato, para evitar la descomposición por una hidrolasa, como una nucleasa. Al menos una parte del mismo puede estar compuesta por un análogo de ácido nucleico, tal como un ácido nucleico peptídico (PNA).

40 Una célula T reguladora es un tipo de células T y también se conoce como Treg. Se está aclarando que las células T reguladoras son responsables del control inhibitorio de las respuestas inmunitarias. Los ejemplos de células T reguladoras incluyen una célula T CD4⁺ CD25⁺, una célula T Foxp3⁺ CD25⁺ y una célula CD4⁺ Foxp3⁺.

45 El término "activación de células T reguladoras" que se usa en el presente documento se refiere, por ejemplo, a un aumento en el número de células T reguladoras, un aumento en la cantidad de citoquinas inhibitorias, tal como TGF- β o IL-10 expresadas por células T reguladoras, inhibición de respuestas inmunitarias por parte de las células T, o inhibición de respuestas inmunitarias generales.

50 El activador de células T reguladoras, es decir, el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo, de la presente invención puede usarse para prevenir o tratar la enfermedad de injerto contra huésped, el rechazo de trasplantes, una enfermedad autoinmune, fibrosis, enteritis inflamatoria y una alergia.

55 Los ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen reumatismo, diabetes mellitus tipo I y encefalomiелitis autoinmune. La fibrosis es una enfermedad en la que el tejido de un órgano, tal como un pulmón, un corazón, un hígado o un riñón, se reemplaza con colágeno tipo I o similar. Los ejemplos de fibrosis incluyen cirrosis, nefropatía diabética y fibrosis pulmonar. Los ejemplos de una alergia incluyen la rinitis alérgica y la dermatitis atópica.

60 El anticuerpo anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo tiene preferiblemente una reactividad con la que se puede saturar la DNAM-1 humana expresada de manera forzada en superficies de 1×10^5 linfocitos cuando el anticuerpo o un fragmento del mismo se hace reaccionar con DNAM-1 humana con 100 ng o menos, preferiblemente 80 ng o menos, más preferiblemente 50 ng o menos, más preferiblemente 40 ng o menos, y particularmente preferiblemente 30 ng o menos del anticuerpo anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo en términos de la longitud total del anticuerpo IgG. Como se describe en los Ejemplos a continuación, un anticuerpo anti-DNAM-1 humano que tiene tal reactividad tiene una alta capacidad para activar las células T reguladoras.

65 En el caso de que el anticuerpo diana sea, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo, la reactividad del fragmento de anticuerpo se calcula convirtiendo la longitud total del anticuerpo IgG. En este caso, la conversión de masa se puede

realizar, por ejemplo, sobre la base de los pesos moleculares del fragmento de anticuerpo y la longitud total del anticuerpo IgG.

5 Cuando DNAM-1 humana expresada de manera forzada en superficies de 1×10^5 linfocitos se satura con 1000 ng de la proteína de fusión se forma CD155 humana con una región constante de anticuerpo IgG y luego el anticuerpo anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo se hace reaccionar con los linfocitos, el anticuerpo anti-DNAM-1 humano o el fragmento del mismo usado preferiblemente como activador de células T reguladoras de acuerdo con esta
10 realización puede tener una reactividad que inhibe la unión entre la proteína de fusión y la molécula de DNAM-1 humana en la superficie de los linfocitos con 500 ng o menos, preferiblemente 400 ng o menos, más preferiblemente 300 ng o menos, aún más preferiblemente 200 ng o menos, y particularmente preferiblemente 100 ng o menos del anticuerpo anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo en términos de la masa de longitud total del anticuerpo IgG.

15 En otras palabras, un anticuerpo anti-DNAM-1 humano que tiene tal reactividad es capaz de romper la unión entre DNAM-1 y CD155 incluso cuando DNAM-1 se ha unido a CD155. Como se describe en los Ejemplos a continuación, un anticuerpo anti-DNAM-1 humano que tiene tal reactividad tiene una alta capacidad para activar las células T reguladoras.

20 La expresión "completamente inhibida" utilizada en el presente documento significa que puede estar sustancialmente completa inhibida. Por ejemplo, en el caso en el que la molécula DNAM-1 humana presente en la superficie de 1×10^5 linfocitos en los que DNAM-1 humana se expresa de manera forzada, se saturan con 1000 ng de una proteína de fusión formada por la fusión de CD155 humana con una región constante de anticuerpo IgG y luego los linfocitos reaccionan con 80 % o más, preferiblemente 90 % o más, más preferiblemente 95 % o más, y más preferiblemente 99 % o más de la proteína de fusión unida a las superficies de los linfocitos se disocia y se une a DNAM-1 humana
25 presente en las superficies de los linfocitos.

Cuando el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, la aparición de efectos secundarios, tales como el choque anafiláctico, puede reducirse incluso cuando se administra a un ser humano debido a baja inmunogenicidad.

30 El término "anticuerpo quimérico" utilizado en el presente documento se refiere a un anticuerpo que incluye una región variable derivada de un animal no humano y una región constante de la que al menos una parte se deriva de un ser humano. El término "anticuerpo humanizado" utilizado en este documento se refiere a un anticuerpo en el que solo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las cadenas pesada y ligera se derivan de un animal no humano y la región constante y la región marco se derivan de un ser humano. El término "anticuerpo de tipo
35 completamente humano" utilizado en el presente documento se refiere a un anticuerpo cuya totalidad, incluidas las regiones determinantes de complementariedad, se derivan de un ser humano.

40 En el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de la presente invención, el anticuerpo anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo incluye una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 a CDR3 que tiene secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 1 a 3, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 a CDR3 que tiene secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 4 a 6 respectivamente.

45 El término "varias" utilizado en este documento se refiere a 4, 3 o 2 cuando se refiere a CDR1 o CDR2 de la región variable de cadena pesada. El término "varias" utilizado en este documento se refiere a 2 cuando se refiere a CDR3 de la región variable de cadena pesada. El término "varias" utilizado en este documento se refiere a 4, 3 o 2 cuando se refiere a CDR1 o CDR3 de la región variable de cadena ligera. El término "varias" utilizado en este documento se refiere a 2 cuando se refiere a CDR2 de la región variable de cadena ligera.

50 Ejemplos de un anticuerpo que incluye una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 a CDR3 que tiene secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 1 a 3, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 a CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 4 a 6, respectivamente, incluyen el anticuerpo monoclonal No. 1 descrito en los Ejemplos a continuación y un anticuerpo producido mediante la humanización del anticuerpo monoclonal No. 1.

60 El anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano no se limita al anticuerpo monoclonal No. 1; cualquier anticuerpo anti-DNAM-1 humano que tenga una reactividad comparable o superior a la del anticuerpo monoclonal No. 1 puede usarse como activador de células T reguladoras de acuerdo con esta realización, siempre que el anticuerpo anti-DNAM-1 humano sea un anticuerpo que incluye una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 a CDR3 que tiene las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 1 a 3 respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 a CDR3 que tienen secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 4 a 6 respectivamente.

65 La expresión "un anticuerpo diana compite" significa que, por ejemplo, cuando la molécula de DNAM-1 humana presente en las superficies de 1×10^5 linfocitos en los que se expresa de manera forzada el DNAM-1 humano

reaccionan con el anticuerpo monoclonal No. 1 descrito en los ejemplos a continuación y luego se hace reaccionar una molécula diana con los linfocitos, al menos una parte de la unión entre el anticuerpo monoclonal No. 1 y el DNAM-1 humano puede disociarse y el DNAM-1 humano puede unirse.

- 5 La expresión "al menos una parte" utilizada en el presente documento puede referirse al 10 % o más, al 30 % o más, al 50 % o más, al 70 % o más y al 90 % o más de la cantidad total de DNAM-1 humano presente en las superficies de 1×10^5 linfocitos.

[Composición farmacéutica para la activación de células T reguladoras]

- 10 Otra realización de la presente invención proporciona una composición farmacéutica para la activación de células T reguladoras que incluye el activador de células T reguladoras descrito anteriormente, es decir, el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 15 Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen vehículos comúnmente utilizados para producir fármacos, tales como un vehículo, un estabilizador y un disolvente para inyección. Los ejemplos del disolvente para inyección incluyen una solución isotónica que contiene un adyuvante tal como una solución salina fisiológica, glucosa, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol o cloruro de sodio.

- 20 La composición farmacéutica de acuerdo con esta realización puede incluir además un aditivo distinto del activador de células T reguladoras descrito anteriormente, es decir, el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de la presente invención, o el vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos del otro aditivo incluyen un regulador de pH, un mejorador de la viscosidad, un colorante y un esteroide y un inmunosupresor que se han usado para tratar la enfermedad de injerto contra huésped o el rechazo de trasplantes.

- 25 Los ejemplos de la forma de dosificación de la composición farmacéutica de acuerdo con esta realización incluyen, entre otros, un fármaco liofilizado, un fármaco en polvo, un fármaco en solución que contiene una solución tampón de pH controlado y un fármaco microencapsulado para inyección.

- 30 La composición farmacéutica se puede administrar a un paciente, por ejemplo, en forma de inyección o de fármaco por instilación, o por administración intravenosa o similar. La dosis de la composición farmacéutica, la vía de administración y la receta de la composición farmacéutica pueden determinarse apropiadamente de acuerdo con los síntomas, peso, edad, sexo y similares del paciente.

- 35 La dosis de la composición farmacéutica puede variar con los síntomas, el peso, la edad, el sexo y similares del paciente y no puede determinarse incondicionalmente. La composición farmacéutica se puede administrar a un paciente humano que necesite tratamiento de una a varias veces al día en ciertas cantidades de tal manera que la cantidad de ingrediente activo (la sustancia que inhibe la unión entre DNAM-1 y CD155) de la composición farmacéutica por kilogramo de peso corporal es, por ejemplo, de $1 \mu\text{g}$ a 100 mg o de $50 \mu\text{g}$ a 50 mg por dosis.

[Anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o fragmento del mismo]

- 45 Otra realización más de la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo que es capaz de saturar la molécula de ADN-1 humana expresada de manera forzada en superficies de 1×10^5 linfocitos cuando reacciona con el DNAM-1 humano, con 100 ng o menos, preferiblemente 80 ng o menos, más preferiblemente 50 ng o menos, más preferiblemente 40 ng o menos, y particularmente preferiblemente 30 ng o menos del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo en términos de la longitud total del anticuerpo IgG.

- 50 Como se describe en los ejemplos a continuación, un anticuerpo anti-DNAM-1 humano que tiene tal reactividad es útil, por ejemplo, para la activación de células T reguladoras y la mitigación de los síntomas de la enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplantes, enfermedad autoinmune, fibrosis, enteritis inflamatoria, o similares.

- 55 En el caso de que el anticuerpo cuya reactividad se va a determinar sea, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo, la reactividad del anticuerpo puede determinarse en términos de la longitud total del anticuerpo IgG. En este caso, la masa del fragmento de anticuerpo se puede convertir en la longitud total del anticuerpo IgG sobre la base de los pesos moleculares del fragmento de anticuerpo y la longitud total del anticuerpo IgG. El anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de la presente invención como se define en otra parte del presente documento puede ser distinto de los anticuerpos conocidos o fragmentos de los mismos.

- 60 Cuando el DNAM-1 humano expresado de manera forzada en superficies de 1×10^5 linfocitos se satura con 1000 ng de la proteína de fusión se forma CD155 humana con una región constante de anticuerpo IgG y luego el anticuerpo anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo se hace reaccionar con los linfocitos, el anticuerpo anti-DNAM-1 humano o el fragmento del mismo de acuerdo con esta realización puede tener una reactividad que inhiba la unión entre la proteína de fusión y la molécula de DNAM-1 humana en la superficie de los linfocitos con 500 ng o menos,

preferiblemente 400 ng o menos, más preferiblemente 300 ng o menos, más preferiblemente 200 ng o menos, y particularmente preferiblemente 100 ng o menos del anticuerpo anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo en términos de la longitud total del anticuerpo IgG.

5 En otras palabras, un anticuerpo anti-DNAM-1 humano que tiene tal reactividad es capaz de romper la unión entre DNAM-1 y CD155 incluso cuando DNAM-1 se ha unido a CD155. El significado de la expresión "inhibir completamente" utilizada en el presente documento es el mismo que se ha descrito anteriormente.

10 El anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de acuerdo con esta realización puede ser un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo. El anticuerpo humanizado es el mismo que se ha descrito anteriormente.

15 El anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de acuerdo con esta realización, incluye una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 a CDR3 que tiene secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 a 3 respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 a CDR3 que tiene secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 4 a 6 respectivamente.

20 La expresión "varias" utilizada cuando se hace referencia a CDR1 o CDR2 de la región variable de cadena pesada significa 4, 3 o 2. La expresión "varias" utilizada cuando se hace referencia a CDR3 de la región variable de cadena pesada significa 2. La expresión "varias" utilizada cuando se hace referencia a CDR1 o CDR3 de la región variable de cadena ligera significa 4, 3 o 2. La expresión "varias" utilizada cuando se hace referencia a CDR2 de la región variable de cadena ligera significa 2.

25 El término "fragmento de anticuerpo" utilizado en el presente documento se refiere, por ejemplo, a Fab, F(ab')₂ y Fv de cadena sencilla (scFv) producidos al unir una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera con un enlazador adecuado. Los ejemplos de un enlazador de scFv incluyen péptidos tales como (GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 21).

30 Como se describe en los ejemplos siguientes, el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o el fragmento del mismo de acuerdo con esta realización se une adecuadamente a la proteína DNAM-1 humana y, por lo tanto, reduce las respuestas inmunitarias de humanos *in vivo* e *in vitro*. Por consiguiente, el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o el fragmento del mismo de acuerdo con esta realización puede usarse como inmunosupresor.

35 El anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de la presente invención incluye una región variable de cadena pesada que incluye CDR1 a CDR3 que tiene las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 a 3, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que incluye CDR1 a CDR3 que tiene las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 4 a 6, respectivamente. Los ejemplos del anticuerpo anterior incluyen el anticuerpo monoclonal No. 1 descrito en los Ejemplos a continuación y un anticuerpo producido mediante la humanización del anticuerpo monoclonal No. 1.

40 El anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de la presente invención puede incluir una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8. Los ejemplos de tal anticuerpo incluyen el anticuerpo monoclonal No. 1 descrito en los Ejemplos a continuación y un anticuerpo producido mediante la humanización del anticuerpo monoclonal No. 1.

45 El anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo puede incluir una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

50 La expresión "varias" utilizada cuando se hace referencia a la región variable de cadena pesada o la región variable ligera significa 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, o 2. Los ejemplos de tal anticuerpo incluyen los anticuerpos monoclonales Nos. 3 a 6 y los anticuerpos producidos humanizando los anticuerpos monoclonales Nos. 3 a 6 descritos en los Ejemplos a continuación.

55 [Codificación de ácido nucleico para anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o fragmento del mismo]

Otra realización más de la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano descrito anteriormente o un fragmento del mismo de la presente invención.

60 Los ejemplos de dicho ácido nucleico incluyen un gen que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano descrito anteriormente, un gen que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano, un gen que codifica la región variable de cadena pesada y una parte de la región constante del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano, un gen que codifica la región variable de cadena ligera y una parte de la región constante del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano, un gen que codifica la longitud total de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano, un gen que codifica la longitud

total de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano y un gen que codifica scFv formado al fusionar las regiones variables de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano con un enlazador adecuado.

- 5 El gen que codifica la región variable de cadena pesada puede ser un gen que tiene la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 19. El gen que codifica la región variable de cadena ligera puede ser un gen que tiene la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 20.

- 10 El gen que codifica la región variable de cadena pesada puede ser un gen que codifica una región variable de cadena pesada que incluye CDR1 a CDR3 que tiene las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 a 3, respectivamente, y una región marco distinta de las CDR puede ser un gen que se deriva de un anticuerpo que no es de ratón. El gen que codifica para la región variable de cadena ligera puede ser un gen que codifica para una región variable de cadena ligera que incluye CDR1 a CDR3 que tiene las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 4 a 6, respectivamente, y una región marco distinta de las CDR puede ser un gen que se deriva de un anticuerpo que no es de ratón. Los ejemplos del anticuerpo que no es de ratón incluyen un anticuerpo de tipo humano.

- 15 El ácido nucleico de acuerdo con esta realización es preferiblemente una combinación del gen que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano de la presente invención o un gen derivado del mismo y el gen que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano de la presente invención o un gen derivado del mismo.

- 20 Los ejemplos del gen derivado del gen que codifica la región variable de cadena pesada incluyen un gen que codifica una región variable de cadena pesada que incluye CDR1 a CDR3 que tiene las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 a 3, respectivamente, y una región marco distinta de las CDR que se deriva de un anticuerpo que no es de ratón. De manera similar, los ejemplos del gen derivado del gen que codifica la región variable de cadena ligera incluyen un gen que codifica una región variable de cadena ligera que incluye CDR1 a CDR3 que tiene las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 4 a 6, respectivamente y una región marco distinta de las CDR que se deriva de un anticuerpo que no es de ratón.

- 30 [Vector]

- Aún otra realización de la presente invención proporciona un vector recombinante que incluye el ácido nucleico descrito anteriormente. El vector recombinante de acuerdo con esta realización puede ser un vector de expresión. Cuando el vector de acuerdo con esta realización es un vector de expresión, es posible producir el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de la presente invención introduciendo el vector en el huésped y haciendo que el gen se exprese.

- 35 En el vector recombinante de acuerdo con esta realización, un ADN que codifica una secuencia de etiqueta tal como una etiqueta de histidina, una etiqueta FLAG o una etiqueta GST puede unirse al extremo 5' o al extremo 3' del ácido nucleico descrito anteriormente. Los ejemplos del vector de expresión incluyen un vector celular que expresa el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de la presente invención en células huésped y un vector libre de células que expresa el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo en un sistema de traducción de proteínas que incluye un componente que tiene capacidad de síntesis de proteínas que se extrae de células adecuadas.

- 40 El vector celular puede ser cualquier vector de expresión conocido adecuado para las células huésped. En el caso de que se utilice *Escherichia coli* como huésped, los ejemplos del vector incluyen plásmidos ColE, tal como un derivado de pBR322; plásmidos pACYC con origen en p15A; plásmidos pSC; plásmidos mini-F derivados del factor F, tales como plásmidos Bac; y vectores de expresión que incluyen un promotor de triptófano (p. ej., trc o tac), un promotor lac, un promotor T7, un promotor T5, un promotor T3, un promotor SP6, un promotor inducible por arabinosa, un promotor de choque frío o un promotor inducible por tetraciclina. En el caso de que el huésped no sea *Escherichia coli*, los ejemplos del vector incluyen plásmidos pAUR utilizados para la expresión en levadura, plásmidos pLEx utilizados para la expresión de células de insectos y plásmidos pBApo-CMV utilizados para la expresión de células animales.

- 45 Los ejemplos del vector sin células incluyen un vector de expresión que tiene el promotor T7 y un vector de expresión que tiene el promotor T3 que se describieron anteriormente como ejemplos del vector celular; y vector de síntesis de proteína libre de células de trigo, tal como un plásmido pEU que tiene un promotor SP6 o un promotor T7.

- 60 Cuando se sintetiza una proteína utilizando un vector libre de células, en primer lugar, el ARNm se sintetiza mediante un sistema de transcripción responsable de la transcripción del gen SesA. Los ejemplos del sistema de transcripción incluyen sistemas de transcripción conocidos capaces de realizar la transcripción usando ARN polimerasa. Los ejemplos de la ARN polimerasa incluyen la ARN polimerasa T7 y la polimerasa SP6.

- 65 Posteriormente, el ARNm se traduce utilizando un sistema de síntesis de proteínas sin células, es decir, un sistema de traducción, para sintetizar una proteína. Este sistema incluye varios elementos necesarios para la traducción, tales

como el ribosoma, un factor de iniciación de la traducción, un factor de elongación de la traducción, un factor de liberación y aminoacil-tARN sintetasa. Los ejemplos del sistema de traducción de proteínas anterior incluyen un extracto de *E. coli*, un extracto de reticulocito de conejo, un extracto de germen de trigo y un sistema de síntesis de proteínas reconstituidas libre de células que incluye solo los factores requeridos por la traducción que se han purificado individualmente.

El anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de la presente invención puede usarse mediante purificación a partir de la proteína sintetizada usando el vector celular o el vector libre de células. Los ejemplos del método de purificación incluyen un método en el que se utiliza Proteína A, Proteína G o similares. En el caso de que el vector de expresión esté diseñado para expresar una secuencia de etiqueta, tal como una etiqueta de histidina, en el extremo N o el extremo C de una proteína diana, la purificación puede realizarse utilizando una columna de afinidad con una sustancia, tal como níquel o cobalto, teniendo afinidad por la etiqueta. La pureza del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo puede incrementarse realizando la purificación usando cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de permeación en gel y similares en combinación apropiada.

[Transformante]

Otra realización más de la presente invención proporciona un transformante que incluye el vector recombinante descrito anteriormente. El anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de la presente invención se puede producir utilizando el transformante de acuerdo con esta realización o un medio o similar del transformante.

El transformante de acuerdo con esta realización se puede producir introduciendo el vector recombinante descrito anteriormente en un huésped. Los ejemplos del transformante incluyen células de cultivo, tales como *Escherichia coli*, levadura, células vegetales, células de insectos y células animales, en las que se ha introducido el vector recombinante descrito anteriormente; un insecto vivo, tal como un gusano de seda, en el que se ha introducido el vector recombinante descrito anteriormente; y un cuerpo de una planta, tal como tabaco y similares, en los que se ha introducido el vector recombinante descrito anteriormente.

La introducción del vector recombinante en el huésped (transformación) se puede realizar mediante un método conocido públicamente, tal como un método de células competentes en el que se usan células tratadas con calcio y electroporación. En lugar de usar un vector de plásmido, la transformación se puede realizar alternativamente infectando al huésped con un vector de fago, un vector de virus o similar.

[Inmunosupresor]

Todavía otra realización de la presente invención proporciona un inmunosupresor que incluye el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano descrito anteriormente o un fragmento del mismo de la presente invención, que actúa como ingrediente activo.

Como se describe en los Ejemplos a continuación, el inmunosupresor de acuerdo con esta realización es capaz de inhibir la proliferación de las células T CD8⁺ en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR).

Además, como se describe en los Ejemplos a continuación, se confirmó en un modelo de ratón de enfermedad de injerto contra huésped que el inmunosupresor de acuerdo con esta realización es eficaz para prevenir y tratar la enfermedad de injerto contra huésped.

En consecuencia, el inmunosupresor de acuerdo con esta realización, es decir, que comprende el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de la presente invención, puede ser un fármaco para prevenir o tratar la enfermedad de injerto contra huésped. El inmunosupresor de acuerdo con esta realización puede ser un fármaco para prevenir o tratar el rechazo de trasplantes.

El inmunosupresor de acuerdo con esta realización, es decir, que comprende el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de la presente invención, puede ser una composición farmacéutica que incluye un portador farmacéuticamente aceptable y otros aditivos. Los ejemplos del portador farmacéuticamente aceptable incluyen un vehículo, un estabilizador y un disolvente de inyección. Los ejemplos del disolvente para inyección incluyen una solución isotónica que contiene un adyuvante tal como una solución salina fisiológica, glucosa, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol o cloruro de sodio. Los ejemplos de los otros aditivos incluyen un regulador de pH, un mejorador de la viscosidad, un colorante y un esteroide y un inmunosupresor que se han usado para tratar la enfermedad de injerto contra huésped o el rechazo de trasplantes.

Los ejemplos de la forma de dosificación del inmunosupresor de acuerdo con esta realización y la composición farmacéutica descrita anteriormente (cada una de las cuales comprende el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de la presente invención) incluyen, pero no se limitan a, un fármaco liofilizado, un fármaco en polvo, un fármaco en solución de pH controlado que contiene una solución tampón y un fármaco microencapsulado para inyección.

El inmunosupresor de acuerdo con esta realización o la composición farmacéutica descrita anteriormente (cada una de las cuales comprende el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de la presente invención) se administra a un paciente en forma de inyección, un fármaco de instilación, o similar por administración intravenosa o similar. La dosis del inmunosupresor o de la composición farmacéutica, la vía de administración y la receta del inmunosupresor o de la composición farmacéutica se pueden determinar adecuadamente de acuerdo con los síntomas, peso, edad, sexo, etc. del paciente.

La dosis del inmunosupresor de acuerdo con esta realización o la composición farmacéutica descrita anteriormente varía con los síntomas, el peso, la edad, el sexo, etc. del paciente y no puede determinarse incondicionalmente. El inmunosupresor o la composición farmacéutica se puede administrar a un paciente humano que necesite tratamiento de una a varias veces al día en ciertas cantidades de tal manera que la cantidad de ingrediente activo (el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo) por kilogramo de peso corporal es, por ejemplo, de 1 µg a 100 mg o de 50 µg a 50 mg por dosis.

[Otras realizaciones]

Otra realización más de la presente invención proporciona el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano descrito anteriormente o un fragmento del mismo de la presente invención que se usa para tratar o prevenir la enfermedad de injerto contra huésped o el rechazo de trasplantes.

Otra realización más de la presente invención proporciona el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano descrito anteriormente o un fragmento del mismo de la presente invención que se usa para producir un fármaco para tratar o prevenir la enfermedad de injerto contra huésped o rechazo de trasplantes.

Ejemplos

La presente invención se describe más detalladamente con referencia a los ejemplos de prueba que se muestran a continuación. La presente invención no está limitada por los siguientes ejemplos de prueba.

[Ejemplo de prueba 1]

(Preparación de anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano)

Se introdujo el gen DNAM-1 humano en una línea celular BW5147, que se deriva de linfocitos de ratón, para expresar la proteína DNAM-1 humana. Se inmunizó un ratón usando las células como antígeno y se preparó un hibridoma de la manera habitual. A partir de la línea de hibridoma resultante, se obtuvieron clones que producían uno específico de los anticuerpos monoclonales anti-DNAM-1 humanos Nos. 1 a 6 de acuerdo con la reactividad con la proteína DNAM-1 humana.

Se clonaron los genes que codifican las cadenas pesadas de los anticuerpos y los genes que codifican las cadenas ligeras de los anticuerpos obtenidos a partir de la línea de hibridoma establecida de la manera habitual, y se identificaron las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos. La Fig. 1 es un diagrama que ilustra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano Nos. 1 a 6. Las CDR1 a 3 están subrayadas en la Fig. 1. La Fig. 2 es un diagrama que ilustra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano Nos. 1 a 6. Las CDR1 a 3 están subrayadas en la Fig. 2. La Tabla 1 resume la correspondencia entre las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de cada uno de los anticuerpos monoclonales y las SEQ ID NOs que se muestran en el listado de secuencias.

[Tabla 1]

Anticuerpo	Longitud total de la región variable de cadena pesada	Longitud total de la región variable de cadena ligera
No. 1	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
No. 2	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
No. 3	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
No. 4	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 14
No. 5	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 16
No. 6	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 18

[Ejemplo de prueba 2]

(Estudio 1 de reactividad del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano)

Se determinaron las reactividades de los anticuerpos monoclonales Nos. 1 y 2 preparados en el Ejemplo de prueba 1. Específicamente, una línea celular BW5147 (en adelante, denominada "BW"), que se deriva de linfocitos de ratón, y una línea celular BW5147 en la que se expresó la proteína DNAM-1 humana (en adelante, esta línea celular BW5147

puede denominarse como "DNAM-1/BW") se hicieron reaccionar con el anticuerpo monoclonal No. 1 o 2, y se realizó un análisis por citometría de flujo utilizando un anticuerpo IgG1 de control como referencia. Con 1×10^5 células de cada línea celular, se hicieron reaccionar 30 ng del anticuerpo. La reacción del anticuerpo se realizó en hielo durante 30 minutos.

La Fig. 3(a) es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos cuando las células BW se hicieron reaccionar con el anticuerpo monoclonal No. 1. La Fig. 3(b) es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos cuando las células DNAM-1/BW se hicieron reaccionar con el anticuerpo monoclonal No. 1. La Fig. 3(c) es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos cuando las células BW se hicieron reaccionar con el anticuerpo monoclonal No. 2. La Fig. 3(d) es un gráfico que ilustra los resultados obtenidos cuando las células DNAM-1/BW se hicieron reaccionar con el anticuerpo monoclonal No. 2.

Los resultados anteriores mostraron que tanto el anticuerpo monoclonal No. 1 como el No. 2 reconocían específicamente la proteína DNAM-1 expresada por las células BW.

[Ejemplo de prueba 3]

(Estudio 2 de reactividad del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano)

Se determinaron las reactividades de los anticuerpos monoclonales Nos. 1 y 2 preparados en el Ejemplo de prueba 1 con la proteína DNAM-1 presente en las superficies de los linfocitos de sangre periférica humana.

Se determinaron las reactividades de los anticuerpos monoclonales Nos. 1 y 2 con células CD3⁺ CD4⁺ (células T CD4⁺), células CD3⁺ CD8⁺ (células T CD8⁺), células CD3⁺ CD19⁺ (células B), células CD3⁺ CD56⁺ (células NK), células CD3⁺ CD56⁺ (células NKT) y células CD14⁺ (monocitos) presentes en los linfocitos de sangre periférica humana. El anticuerpo IgG1 de control se usó como referencia. Con 1×10^5 linfocitos de sangre periférica, se hicieron reaccionar 100 ng del anticuerpo monoclonal No. 1 o 2. La reacción del anticuerpo se realizó en hielo durante 30 minutos.

La Fig. 4(a) ilustra la reactividad del anticuerpo monoclonal No. 1 con las células T CD4⁺. La Fig. 4(b) ilustra la reactividad del anticuerpo monoclonal No. 1 con las células T CD8⁺. La Fig. 4(c) ilustra la reactividad del anticuerpo monoclonal No. 1 con las células B. La Fig. 4(d) ilustra la reactividad del anticuerpo monoclonal No. 2 con las células T CD4⁺. La Fig. 4(e) ilustra la reactividad del anticuerpo monoclonal No. 2 con las células T CD8⁺. La Fig. 4(f) ilustra la reactividad del anticuerpo monoclonal No. 2 con las células B. La Fig. 4(g) ilustra la reactividad del anticuerpo monoclonal No. 1 con las células NK. La Fig. 4(h) ilustra la reactividad del anticuerpo monoclonal No. 1 con las células NKT. La Fig. 4(i) ilustra la reactividad del anticuerpo monoclonal No. 1 con los monocitos. La Fig. 4(j) ilustra la reactividad del anticuerpo monoclonal No. 2 con las células NK. La Fig. 4(k) ilustra la reactividad del anticuerpo monoclonal No. 2 con las células NKT. La Fig. 4(l) ilustra la reactividad del anticuerpo monoclonal No. 2 con los monocitos.

Los resultados anteriores mostraron que tanto el anticuerpo monoclonal No. 1 como el No. 2 tenían reactividad con la proteína DNAM-1 presente en las superficies de las células T CD4⁺, las células T CD8⁺, las células B, las células NK, las células NKT y los monocitos.

[Ejemplo de prueba 4]

(Estudio 3 de reactividad del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano)

Se realizó un ensayo competitivo usando el anticuerpo monoclonal No. 1 a No. 6 preparado en el Ejemplo de prueba 1. Específicamente, las células DNAM-1/BW (1×10^5 células) se hicieron reaccionar con 100 ng del anticuerpo monoclonal No. 2 (pretratamiento). Posteriormente, las células DNAM-1/BW se hicieron reaccionar con uno específico de los anticuerpos monoclonales Nos. 1 y 3 a 6 diluidos en serie. La reacción del anticuerpo se realizó en hielo durante 30 minutos. También se determinaron las reactividades de los anticuerpos con las células DNAM-1/BW que no habían sido sometidas al pretratamiento.

La Fig. 5(a) es un gráfico que ilustra la reactividad del anticuerpo monoclonal No. 1. La Fig. 5(b) es un gráfico que ilustra la reactividad del anticuerpo monoclonal No. 3. La Fig. 5(c) es un gráfico que ilustra la reactividad del anticuerpo monoclonal No. 4. La Fig. 5(d) es un gráfico que ilustra la reactividad del anticuerpo monoclonal No. 5. La Fig. 5(e) es un gráfico que ilustra la reactividad del anticuerpo monoclonal No. 6.

El resultado ilustrado en la Fig. 5(a) confirmó que el anticuerpo monoclonal No. 1 incluso tenía una buena reactividad con las células DNAM-1/BW que habían reaccionado con el anticuerpo monoclonal No. 2. Esto prueba que el anticuerpo monoclonal No. 1 tenía una mayor reactividad con la proteína DNAM-1 que el anticuerpo monoclonal No. 2.

El resultado ilustrado en la Fig. 5(b) confirmó que el anticuerpo monoclonal No. 3 tenía poca reactividad con las células DNAM-1/BW que habían reaccionado con el anticuerpo monoclonal No. 2. Esto prueba que el anticuerpo monoclonal No. 2 tenía mayor reactividad con la proteína DNAM-1 que el anticuerpo monoclonal No. 3.

5 Los resultados ilustrados en la Fig. 5(c) confirmaron que el anticuerpo monoclonal No. 4 tenía poca reactividad con las células DNAM-1/BW que habían reaccionado con el anticuerpo monoclonal No. 2. Esto prueba que el anticuerpo monoclonal No. 2 tenía mayor reactividad con la proteína DNAM-1 que el anticuerpo monoclonal No. 4.

10 El resultado ilustrado en la Fig. 5(d) confirmó que el anticuerpo monoclonal No. 5 tenía reactividad con las células DNAM-1/BW que habían reaccionado con el anticuerpo monoclonal No. 2. Teniendo en cuenta también los resultados obtenidos en el Ejemplo de prueba 5 a continuación, se considera que los epítomos del anticuerpo monoclonal No. 5 y No. 2 no compitieron entre sí.

15 El resultado ilustrado en la Fig. 5(e) es similar al de la Fig. 5(d). Teniendo en cuenta también los resultados obtenidos en el Ejemplo de prueba 5 a continuación, se considera que los epítomos del anticuerpo monoclonal No. 6 y No. 2 no compitieron entre sí.

[Ejemplo de prueba 5]

20 (Estudio 4 de reactividad del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano)

Se realizó una prueba como en el Ejemplo de prueba 4, excepto que se cambió el tipo de anticuerpo que había reaccionado con las células DNAM-1/BW. Específicamente, las células DNAM-1/BW (1×10^5 células) se hicieron reaccionar con una cantidad de saturación de uno específico de los anticuerpos monoclonales Nos. 1 y 3 a 6 (pretratamiento). Las cantidades de anticuerpo monoclonal Nos. 1 y 3 a 6 usadas fueron 30, 300, 300, 500 y 1000 ng, respectivamente.

30 Téngase en cuenta que, las cantidades mínimas de anticuerpo monoclonal Nos. 1 a 6 requeridas para saturar el anticuerpo DNAM-1 humano expresado en las superficies de 1×10^5 células DNAM-1/BW fueron 30, 50, 100, 100, 300 y 300 ng, respectivamente. Posteriormente, las células DNAM-1/BW se hicieron reaccionar con cada uno de los anticuerpos monoclonales No. 2 diluidos en serie. La reacción del anticuerpo se realizó en hielo durante 30 minutos. También se determinaron las reactividades de los anticuerpos con las células DNAM-1/BW que no habían sido sometidas al pretratamiento.

35 La Fig. 6(a) es un gráfico que ilustra los resultados de la prueba en la que se usó el anticuerpo monoclonal No. 1. La Fig. 6(b) es un gráfico que ilustra los resultados de la prueba en la que se utilizó el anticuerpo monoclonal No. 3. La Fig. 6(c) es un gráfico que ilustra los resultados de la prueba en la que se utilizó el anticuerpo monoclonal No. 4. La Fig. 6(d) es un gráfico que ilustra los resultados de la prueba en la que se utilizó el anticuerpo monoclonal No. 5. La Fig. 6(e) es un gráfico que ilustra los resultados de la prueba en la que se utilizó el anticuerpo monoclonal No. 6.

40 El resultado ilustrado en la Fig. 6(a) confirmó que el anticuerpo monoclonal No. 2 tenía poca reactividad con las células DNAM-1/BW que habían reaccionado con el anticuerpo monoclonal No. 1. Teniendo en cuenta también los resultados obtenidos en el Ejemplo de prueba 4 anterior, esto respalda el hecho de que el anticuerpo monoclonal No. 1 tenía mayor reactividad con la proteína DNAM-1 que el anticuerpo monoclonal No. 2.

45 El resultado ilustrado en la Fig. 6(b) confirmó que el anticuerpo monoclonal No. 2 incluso tenía una reactividad relativamente buena con las células DNAM-1/BW que habían reaccionado con el anticuerpo monoclonal No. 3. Teniendo en cuenta también los resultados obtenidos en el Ejemplo de prueba 4 anterior, esto respalda el hecho de que el anticuerpo monoclonal No. 2 tenía mayor reactividad con la proteína DNAM-1 que el anticuerpo monoclonal No. 3.

50 El resultado ilustrado en la Fig. 6(c) confirmó que el anticuerpo monoclonal No. 2 incluso tenía una reactividad relativamente buena con las células DNAM-1/BW que habían reaccionado con el anticuerpo monoclonal No. 4. Teniendo en cuenta también los resultados obtenidos en el Ejemplo de prueba 4 anterior, esto respalda el hecho de que el anticuerpo monoclonal No. 2 tenía mayor reactividad con la proteína DNAM-1 que el anticuerpo monoclonal No. 4.

60 El resultado ilustrado en la Fig. 6(d) confirmó que el anticuerpo monoclonal No. 2 tenía reactividad con las células DNAM-1/BW que habían reaccionado con el anticuerpo monoclonal No. 5. Teniendo en cuenta también los resultados obtenidos en el Ejemplo de prueba 4 anterior, se considera que los epítomos del anticuerpo monoclonal No. 2 y No. 5 no compitieron entre sí.

65 El resultado ilustrado en la Fig. 6(e) fue similar al de la Fig. 6(d). Teniendo en cuenta también los resultados obtenidos en el Ejemplo de prueba 4 anterior, se considera que los epítomos del anticuerpo monoclonal No. 2 y No. 6 no compitieron entre sí.

[Ejemplo de prueba 6]

(Estudio 5 de reactividad del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano)

5 Se sabe que la proteína DNAM-1 y la proteína CD155 interactúan entre sí. En consecuencia, se determinó si los anticuerpos monoclonales No. 1 a No. 6 preparados en el ejemplo de prueba 1 son capaces o no de inhibir la interacción entre la proteína DNAM-1 y la proteína CD155.

10 En primer lugar, se preparó una proteína CD155 humana solubilizada. Específicamente, se preparó una proteína de fusión formada por la fusión de proteína CD155 humana con una región constante de anticuerpo IgG humano (en lo sucesivo, esta proteína de fusión puede denominarse "hCD155-Fc") de la manera convencional. La ID de RefSeq de la proteína CD155 humana es NP_001129240.

15 Luego, las células DNAM-1/BW (1×10^5 células) se hicieron reaccionar con una cantidad de saturación (1000 ng) de la proteína hCD155-Fc por adelantado. Posteriormente, las células DNAM-1/BW se hicieron reaccionar con uno específico del anticuerpo monoclonal No. 1 a No. 6 diluido en serie. La reacción se realizó en hielo durante 30 minutos.

20 Las Figs. 7(a) a 7(e) son gráficos que ilustran los resultados de las pruebas en las que se usaron los anticuerpos monoclonales Nos. 1 y 3 a 6, respectivamente. Los resultados de la prueba en la que se usó el anticuerpo monoclonal No. 2 también se muestran en las Figs. 7(a) a 7(e) para comparación.

25 El resultado ilustrado en la Fig. 7(a) confirmó que el anticuerpo monoclonal No. 1 era capaz de reaccionar adecuadamente con las células DNAM-1/BW que habían reaccionado con la proteína hCD155-Fc y la reactividad era mayor que la del anticuerpo monoclonal No. 2.

El resultado ilustrado en la Fig. 7(b) confirmó que el anticuerpo monoclonal No. 3 era capaz de reaccionar adecuadamente con las células DNAM-1/BW que habían reaccionado con la proteína hCD155-Fc y la reactividad era comparable a la del anticuerpo monoclonal No. 2.

30 El resultado ilustrado en la Fig. 7(c) confirmó que el anticuerpo monoclonal No. 4 era capaz de reaccionar adecuadamente con las células DNAM-1/BW que habían reaccionado con la proteína hCD155-Fc y la reactividad era comparable a la del anticuerpo monoclonal No. 2.

35 El resultado ilustrado en la Fig. 7(d) confirmó que el anticuerpo monoclonal No. 5 era capaz de reaccionar con las células DNAM-1/BW que habían reaccionado con la proteína hCD155-Fc, pero la reactividad fue menor que la del anticuerpo monoclonal No. 2.

40 Los resultados ilustrados en la Fig. 7(e) confirmaron que el anticuerpo monoclonal No. 6 era capaz de reaccionar con las células DNAM-1/BW que habían reaccionado con la proteína hCD155-Fc, pero la reactividad fue menor que la del anticuerpo monoclonal No. 2.

[Ejemplo de prueba 7]

(Estudio 6 de reactividad del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano)

45 Después de que las células DNAM-1/BW reaccionaron con la proteína hCD155-Fc por adelantado con un anticuerpo monoclonal específico No. 1 a No. 6 diluido en serie en el Ejemplo de prueba 6, la proteína hCD155-Fc se unió a la proteína DNAM-1 presente en las superficies de las células DNAM-1/BW. La detección de la proteína hCD155-Fc se realizó utilizando un anticuerpo anti-IgG humano. La reacción se realizó en hielo durante 30 minutos.

50 Las Figs. 8(a) a 8(e) son gráficos que ilustran los resultados de las pruebas en las que se usaron los anticuerpos monoclonales Nos. 1 y 3 a 6, respectivamente. Los resultados de la prueba en la que se usó el anticuerpo monoclonal No. 2 también se muestran en las Figs. 8(a) a 8(e) para comparación.

55 El resultado ilustrado en la Fig. 8 (a) confirmó que los residuos de proteína hCD155-Fc que después de que las células DNAM-1/BW habían reaccionado con el anticuerpo monoclonal No. 1 disminuyeron de una manera dependiente de la concentración del anticuerpo monoclonal No. 1.

60 También se confirmó que la cantidad de proteína hCD155-Fc era sustancialmente cero en el intervalo en el que la concentración del anticuerpo monoclonal que reaccionaba era alta. Esto prueba que tanto el anticuerpo monoclonal No. 1 como el No. 2 fueron capaces de inhibir completamente la interacción entre la proteína DNAM-1 y la proteína CD155. La cantidad de anticuerpo monoclonal No. 1 requerida para inhibir completamente la interacción entre la proteína DNAM-1 y la proteína CD155 fue menor que la cantidad de anticuerpo monoclonal No. 2 requerida para inhibir completamente la interacción entre la proteína DNAM-1 y la proteína CD155. Específicamente, las cantidades de anticuerpo monoclonal No. 1 y No. 2 requeridas para inhibir completamente la interacción entre la proteína DNAM-1 y la proteína CD155 fueron 100 y 300 ng, respectivamente.

El resultado ilustrado en la Fig. 8(b) confirmó que los residuos de la proteína hCD155-Fc después de que las células DNAM-1/BW reaccionaron con el anticuerpo monoclonal No. 3 disminuyeron de una manera dependiente de la concentración del anticuerpo monoclonal No. 3.

También se confirmó que, en el intervalo donde la concentración del anticuerpo monoclonal reaccionó con las células DNAM-1/BW fue baja, los residuos de la proteína hCD155-Fc después de que las células DNAM-1/BW reaccionaron con el anticuerpo monoclonal No. 3 fue más pequeña que la de la proteína hCD155-Fc después de que las células DNAM-1/BW reaccionaron con el anticuerpo monoclonal No. 2. Esto prueba que, en el intervalo donde la concentración del anticuerpo monoclonal reaccionó con las células DNAM-1/BW fue bajo, el anticuerpo monoclonal No. 3 tenía mayor actividad de inhibición de la interacción entre la proteína DNAM-1 y la proteína CD155 que el anticuerpo monoclonal No. 2. En el intervalo donde la concentración del anticuerpo monoclonal reaccionó con las células DNAM-1/BW fue alto, la diferencia en la reactividad anterior entre los anticuerpos monoclonales Nos. 2 y 3 fue pequeña. La cantidad de anticuerpo monoclonal No. 3 necesaria para inhibir completamente la interacción entre la proteína DNAM-1 y la proteína CD155 fue de 300 ng.

El resultado ilustrado en la Fig. 8(c) confirmó que los residuos de la proteína hCD155-Fc después de que las células DNAM-1/BW habían reaccionado con el anticuerpo monoclonal No. 4 disminuyeron de una manera dependiente de la concentración del anticuerpo monoclonal No. 4.

También se confirmó que los residuos de proteína hCD155-Fc después de que las células DNAM-1/BW habían reaccionado con el anticuerpo monoclonal No. 4 eran más grandes que los de la proteína hCD155-Fc después de que las células DNAM-1/BW había reaccionado con el anticuerpo monoclonal No. 2. Esto prueba que el anticuerpo monoclonal No. 2 tenía una mayor actividad de inhibición de la interacción entre la proteína DNAM-1 y la proteína CD155 que el anticuerpo monoclonal No. 4. La cantidad de anticuerpo monoclonal número 4 requerida para inhibir completamente la interacción entre la proteína DNAM-1 y la proteína CD155 fue de 1000 ng.

El resultado ilustrado en la Fig. 8(d) confirmó que la cantidad de proteína hCD155-Fc no disminuyó lo suficiente incluso después de que las células DNAM-1/BW reaccionaron con el anticuerpo monoclonal No. 5. Esto prueba que el anticuerpo monoclonal No. 5 tenía baja actividad de inhibición de la interacción entre la proteína DNAM-1 y la proteína CD155. No fue posible inhibir completamente la interacción entre la proteína DNAM-1 y la proteína CD155 incluso cuando se usaron 3000 ng del anticuerpo monoclonal No. 5.

El resultado ilustrado en la Fig. 8(e) confirmó que la cantidad de proteína hCD155-Fc no disminuyó lo suficiente incluso después de que las células DNAM-1/BW reaccionaron con el anticuerpo monoclonal No. 6. Esto prueba que el anticuerpo monoclonal No. 6 tenía baja actividad de inhibición de la interacción entre la proteína DNAM-1 y la proteína CD155. No fue posible inhibir completamente la interacción entre la proteína DNAM-1 y la proteína CD155 incluso cuando se usaron 3000 ng del anticuerpo monoclonal No. 6.

[Ejemplo de prueba 8]

(Análisis de función 1 del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano)

Se realizó un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR) en presencia del anticuerpo monoclonal No. 1 o No. 2 preparado en el ejemplo de prueba 1 para determinar los impactos del anticuerpo monoclonal en la proliferación de células T.

Un ensayo MLR mide la proliferación de células T que se produce cuando se mezclan células estimulantes alogénicas con células T. Específicamente, en primer lugar, se tomaron muestras de células CD14⁺ (5×10^5 células) de linfocitos de sangre periférica humana y se cultivaron durante 1 semana en presencia de interleucina (IL)-4 (40 ng/pocillo) y GM-CSF (50 ng/pocillo) para inducir células dendríticas. El cultivo de las células CD14⁺ se realizó utilizando una placa de 24 pocillos. Se tomaron muestras de células T CD8⁺ de linfocitos de sangre periférica humana derivados de otro donante.

Las células T CD8⁺ se hicieron reaccionar con una cierta cantidad (1 µg/mL) del anticuerpo monoclonal F(ab')₂ No. 1, el anticuerpo monoclonal F(ab')₂ No. 2, o la IgG de control F(ab')₂ (referencia) que era igual o mayor que la cantidad de saturación. Posteriormente, las células T CD8⁺ se cultivaron conjuntamente, con las células dendríticas. El número de células T CD8⁺ fue de 5×10^4 . El número de células dendríticas fue de 5×10^3 .

A las 48 horas de iniciado el cultivo conjunto, se añadió de nuevo el anticuerpo anterior en una cantidad de 1 µg/mL. A las 72 horas de iniciado el cultivo conjunto se añadió bromodesoxiuridina (BrdU). A las 96 horas de iniciado el cultivo conjunto, se realizó la tinción con un anticuerpo anti-BrdU para medir la proliferación de las células T CD8⁺.

La Fig. 9 es un gráfico que ilustra los resultados del ensayo MLR. En la Fig. 9, el símbolo "*" indica que hubo una diferencia significativa entre ellos con un nivel de significancia de menos del 5 %. Se confirmó que la proliferación de las células T CD8⁺ estaba significativamente limitada incluso cuando se añadía cualquiera de los anticuerpos

monoclonales No. 1 y No. 2. Los resultados anteriores muestran que los anticuerpos monoclonales No. 1 y No. 2 pueden afectar las funciones de las células T humanas.

[Ejemplo de prueba 9]

(Análisis de funciones 2 del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano)

Las funciones del anticuerpo monoclonal No. 1 preparado en el Ejemplo de prueba 1 se analizaron usando un modelo de ratón de enfermedad de injerto contra huésped.

El modelo de ratón de enfermedad de injerto contra huésped utilizado en el Ejemplo de prueba 9 fue un modelo en el que los ratones hCD155Tg/NOG generados cruzando un ratón NOG (ratón NOD/Shi-scid, IL-2 R γ null), que es un ratón inmunodeficiente, con un ratón transgénico CD155 humano, se expusieron a radiación, los linfocitos de sangre periférica humana se trasplantaron posteriormente a los ratones y los síntomas de la enfermedad de injerto contra huésped se determinaron sobre la base del cambio de peso y la tasa de supervivencia.

La Fig. 10 es un diagrama que ilustra el protocolo experimental de la prueba. El día anterior al inicio de la prueba, los ratones hCD155Tg/NOG (hembra, 8 semanas de edad) fueron expuestos a una radiación de 1.2 Gy. El día de inicio de la prueba, se trasplantaron 2.5×10^6 células/ratón de linfocitos de sangre periférica humana a los ratones mediante inyección en la vena de la cola. Posteriormente, se administraron intraperitonealmente a los ratones (n = 6) 300 μ g/0.2 mL del anticuerpo monoclonal F(ab')₂, No. 1. Los ratones a los que se les administró una solución tampón de fosfato (PBS) en lugar del anticuerpo se usaron como referencia (n = 6). Se midieron los cambios en los pesos de los ratones y las tasas de supervivencia de los ratones para determinar los síntomas de la enfermedad de injerto contra huésped. El anticuerpo se administró por vía intraperitoneal a los ratones en la misma cantidad descrita anteriormente en los días 3, 7, 11, 14, 18 y 21 después del inicio de la prueba.

La Fig. 11 es un gráfico que ilustra las tasas de supervivencia de los ratones. La tasa de supervivencia de los ratones a los que se administró el anticuerpo monoclonal No. 1 aumentó significativamente. Esto prueba que la administración del anticuerpo monoclonal No. 1 puede prevenir la enfermedad de injerto contra huésped.

El deterioro de la función hepática en los ratones se determinó midiendo la actividad de la transaminasa glutámico pirúvica (ALT) y la actividad de la transaminasa glutámico oxaloacética (AST) en sangre. Los aumentos en las actividades de ALT y AST en la sangre indican alteraciones de la función hepática.

La Fig. 12(a) es un gráfico que ilustra el resultado de la actividad de ALT medida. La Fig. 12(b) es un gráfico que ilustra el resultado de la actividad de AST medida. Se confirmó que se suprimió el deterioro de la función hepática en los ratones a los que se administró el anticuerpo monoclonal No. 1.

[Ejemplo de prueba 10]

(Análisis de funciones 3 del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano)

Las funciones del anticuerpo monoclonal No. 1 preparado en el Ejemplo de prueba 1 se analizaron utilizando el mismo modelo de ratón de enfermedad de injerto contra huésped que en el Ejemplo de prueba 9, excepto que el protocolo del experimento se cambió del Ejemplo de prueba 9. Se determinó el efecto del anticuerpo monoclonal No. 1 en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped.

La Fig. 13 es un diagrama que ilustra el protocolo experimental de la prueba. El día anterior al inicio de la prueba, los ratones hCD155Tg/NOG (hembra, 8 semanas de edad) fueron expuestos a una radiación de 1.2 Gy. El día de inicio de la prueba, se trasplantaron 2.5×10^6 células/ratón de linfocitos de sangre periférica humana a los ratones mediante inyección en la vena de la cola. Posteriormente, se midieron los cambios en los pesos de los ratones y las tasas de supervivencia de los ratones para determinar los síntomas de la enfermedad de injerto contra huésped. Los días 10, 13, 17 y 20 después del inicio de la prueba, se administraron intraperitonealmente a los ratones 300 μ g/0.2 mL del anticuerpo monoclonal F(ab')₂ No. 1. El anticuerpo monoclonal No. 1 se administró a cada uno de los ratones dos veces por semana de manera continua hasta que el ratón murió. Los ratones a los que se administró PBS en lugar del anticuerpo se usaron como referencia.

La Fig. 14 es un gráfico que ilustra las tasas de supervivencia de los ratones. Como resultado, la tasa de supervivencia de los ratones a los que se administró el anticuerpo monoclonal No. 1 aumentó significativamente. Esto prueba que la administración del anticuerpo monoclonal No. 1 puede tratar la enfermedad de injerto contra huésped.

[Ejemplo de prueba 11]

(Análisis 4 de funciones del anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano)

Se hizo una comparación entre las funciones del anticuerpo monoclonal No. 1 y No. 2 preparado en el Ejemplo de prueba 1. Específicamente, las células T CD8⁺ se separaron de los monocitos de sangre periférica humana y se cultivaron en presencia de anticuerpo anti-CD3 (catálogo No. 555336, producido por BD Bioscience, 0.25 µg/mL), el anticuerpo anti-CD28 (catálogo No. 555725, producido por BD Bioscience, 1 µg/mL) e IL-2 (catálogo No. 554603, producido por BD Bioscience, 0.02 µg/mL) durante 7 días para activarse.

Luego, a las células T CD8⁺ activadas se les añadió el anticuerpo IgG1 de control (referencia), el anticuerpo monoclonal No. 1, o el anticuerpo monoclonal No. 2 en una proporción de 10 mg/10⁶ células para unir el anticuerpo a las células T CD8⁺ activadas mediante incubación a 4 °C durante 30 minutos.

Posteriormente, las células T CD8⁺ tratadas con el anticuerpo se mezclaron con células expresadas en hCD155, que sirvieron como células diana, en una proporción de células T CD8⁺:células expresadas en hCD155 = 1:5. Luego, se realizó el cultivo conjunto a 37 °C durante 4 horas. Las células expresadas con hCD155 utilizadas fueron células BW5147 en las que se había expresado de forma forzada hCD155.

Se determinó la actividad citotóxica de cada uno de los conjuntos de células T CD8⁺. La actividad citotóxica de las células T CD8⁺ se determinó sobre la base de la expresión de CD107a en las células T CD8⁺. CD107a es un marcador de desgranulación de células T CD8⁺.

La Fig. 15 es un gráfico que ilustra los resultados del estudio. La Fig. 15 ilustra la proporción de células en las que se expresó CD107a con respecto a las células T CD8⁺ tratadas con uno específico del anticuerpo monoclonal No. 1 o el anticuerpo monoclonal No. 2, siendo 100 % la proporción de células en las que CD107a se expresó con respecto a las células T CD8⁺ tratadas con el anticuerpo IgG1 de control (referencia).

En la Fig. 15, "p = 0.002" significa que hubo una diferencia significativa entre ellos con un nivel de significancia de menos del 0.2 %; "p = 0.004" significa que hubo una diferencia significativa entre ellos con un nivel de significancia inferior al 0.4 %; y "p = 0.02" significa que hubo una diferencia significativa entre ellos con un nivel de significancia de menos del 2 %.

Como resultado, se confirmó que, cuando se inhibió la unión entre el DNAM-1 presente en las células T CD8⁺ y hCD155 presente en las células diana con el anticuerpo anti-DNAM-1, se inhibió la actividad citotóxica de las células T CD8⁺. También se confirmó que el grado de inhibición de la actividad citotóxica logrado usando el anticuerpo monoclonal No. 1 fue significativamente mayor que el logrado usando el anticuerpo monoclonal No. 2.

[Ejemplo de prueba 12]

(Estudio de las células T reguladoras)

Las funciones del anticuerpo monoclonal No. 1 preparado en el Ejemplo de prueba 1 se analizaron utilizando el mismo modelo de ratón de enfermedad de injerto contra huésped que en el Ejemplo de prueba 9.

Específicamente, primero, el día antes del inicio de la prueba, ratones hCD155Tg/NOG (hembra, 8 semanas de edad) generados cruzando un ratón NOG (ratón NOD/Shi-scid, IL-2 R⁰), que es un ratón inmunodeficiente, con un ratón transgénico CD155 humano fueron expuestos a 1.2 Gy de radiación. Luego, el día de inicio de la prueba, se trasplantaron 2.5 x 10⁶ células/ratón de linfocitos de sangre periférica humana a los ratones mediante inyección en la vena de la cola. Posteriormente, se administraron intraperitonealmente a los ratones (n = 6) 300 µg/0.2 mL del anticuerpo monoclonal F(ab')₂ No. 1. Los ratones a los que se les administró una solución tampón de fosfato (PBS) en lugar del anticuerpo se usaron como referencia (n = 6). El anticuerpo se administró por vía intraperitoneal a los ratones en la misma cantidad descrita anteriormente en los días 3, 7 y 11 después del inicio de la prueba.

Posteriormente, el día 14 después del inicio de la prueba, se tomaron muestras de bazo y sangre periférica de cada uno de los ratones y se analizaron por citometría de flujo para determinar la proporción de células T reguladoras en el bazo y sangre periférica. Las células CD4⁺ Foxp3⁺ se detectaron como células T reguladoras.

La Fig. 16(a) es un gráfico que ilustra los resultados de la proporción de células T reguladoras con respecto a células T CD4⁺ en el bazo de cada uno de los ratones determinados 14 días después de la administración del anticuerpo monoclonal No. 1. La Fig. 16(b) es un gráfico que ilustra la proporción de células T reguladoras con respecto a células T CD4⁺ en la sangre periférica de cada uno de los ratones determinada 14 días después de la administración del anticuerpo monoclonal No. 1.

Como resultado, se confirmó que la administración del anticuerpo monoclonal No. 1 aumentó significativamente la proporción de células T reguladoras.

[Ejemplo de prueba 13]

(Estudio de enfermedades autoinmunes)

Las funciones del anticuerpo anti-DNAM-1 se determinaron usando un modelo experimental de encefalomiелitis autoinmune. Concretamente, en primer lugar, el día anterior al inicio de la prueba, se administraron intraperitonealmente 100 µg/0.2 mL de un anticuerpo anti-DNAM-1 de ratón a los ratones C57BL/6J (n = 8). Se utilizaron como referencia ratones C57BL/6J (n = 9) a los que se les administró 100 µg/0.2 mL de un anticuerpo IgG de control por vía intraperitoneal.

Posteriormente, al inicio de la prueba, se administraron subcutáneamente 50 µg/0.2 mL de péptido que es equivalente a la secuencia de aminoácidos entre el 33^{avo} y el 55^{avo} en la glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) en la parte posterior de cada uno de los ratones. Luego, se administraron intraperitonealmente a los ratones 200 ng/0.2 mL de toxina pertussis. Además, los 200 ng/0.2 mL de toxina pertussis se administraron por vía intraperitoneal a cada uno de los ratones también el segundo día después del inicio de la prueba.

Posteriormente, en los días 1, 3, 7, 11 y 13 después del inicio de la prueba, se administraron 100 µg/0.2 mL de un anticuerpo anti-DNAM-1 de ratón o 100 µg/0.2 mL de un anticuerpo IgG de control a los ratones.

La tasa de incidencia de encefalomiелitis y la puntuación clínica se determinaron controlando los ratones después del inicio de la prueba. La puntuación clínica fue el promedio de las puntuaciones determinadas de acuerdo con los siguientes criterios.

(Puntuación clínica)

0: Normales

1: Caída del tono de la cola

2: Cola completamente flácida

3: Anomalía de la marcha

4: Debilidad completa de las patas traseras

5: Debilidad completa de las patas traseras con parálisis de las patas delanteras

6: Muerte

La Fig. 17(a) es un gráfico que ilustra el resultado medido de las tasas de incidencia de encefalomiелitis. La Fig. 17(b) es un gráfico que ilustra el resultado calculado de las puntuaciones clínicas promedio. En las Figs. 17(a) y 17(b), el eje horizontal muestra el tiempo (días) transcurridos desde el inicio de la prueba. Como resultado, se confirmó que la administración del anticuerpo anti-DNAM-1 mejoró la puntuación clínica de la encefalomiелitis autoinmune.

[Ejemplo de prueba 14]

(Estudio de fibrosis hepática)

Se realizó un estudio de fibrosis hepática utilizando ratones con eliminación del gen de DNAM-1 (en lo sucesivo, denominado "DNAM-1KO") en lugar de la administración del anticuerpo anti-DNAM-1. Se usaron ratones de tipo silvestre como referencia. En la prueba se utilizó un modelo de ligadura de conductos biliares (BDL).

Específicamente, en primer lugar, se abrió la cavidad peritoneal de cada uno de los ratones y se ligó el conducto biliar común al inicio de la prueba para preparar un modelo BDL. Luego, en los días 3, 7, 14 y 21 después del inicio de la prueba, se tomaron muestras de sangre del seno orbital de cada uno de los ratones. Posteriormente, se separó el suero de la muestra de sangre obtenida y se determinaron las cantidades de fosfatasa alcalina y bilirrubina total presentes en el suero utilizando un analizador de química clínica (Modelo: "DRI-CHEM", producido por FUJIFILM Holdings Corporation). Téngase en cuenta que la fosfatasa alcalina y la bilirrubina total son índices de daños en el hígado y el tracto biliar.

El día 21 después del inicio de la prueba, se perfundió todo el cuerpo de cada uno de los ratones y se extrajo el hígado del ratón. Cada uno de los hígados recolectados se fijó e incluyó en parafina. Luego, se prepararon los cortes de tejido. Los cortes de tejido se tiñeron con rojo sirio y se observaron con un microscopio. El rojo sirio es un tinte que se une a una triple hélice de colágeno.

La Fig. 18(a) es un gráfico que ilustra el resultado de la cantidad de fosfatasa alcalina presente en el suero cuantificado. En la Fig. 18(a), "WT" indica los resultados de los ratones de tipo silvestre; "DNAM-1 KO" indica los resultados de los ratones con eliminación de DNAM-1; y "sin procesar" indica los resultados de ratones que no habían sido sometidos a la ligadura del conducto biliar. El eje horizontal muestra el tiempo (días) transcurrido desde el inicio de la prueba. Como resultado, se confirmó que las cantidades de fosfatasa alcalina presentes en los sueros de los ratones con eliminación de DNAM-1 eran significativamente menores que las de los ratones de tipo silvestre de control.

La Fig. 18(b) es un gráfico que ilustra el resultado de la cantidad de bilirrubina total presente en el suero cuantificado. En la Fig. 18(b), "WT" indica los resultados de los ratones de tipo silvestre; "DNAM-1 KO" indica los resultados de los ratones con eliminación de DNAM-1; y "sin procesar" indica los resultados de ratones que no habían sido sometidos

a la ligadura del conducto biliar. El eje horizontal muestra el tiempo (días) transcurrido desde el inicio de la prueba. Como resultado, se confirmó que las cantidades de bilirrubina total presentes en los sueros de los ratones con eliminación de DNAM-1 eran significativamente menores que las de los ratones de tipo silvestre.

Las Figs. 19(a) y 19(b) son micrografías de tejido hepático. La Fig. 19(a) es una fotografía del tejido hepático de uno de los ratones de tipo silvestre (WT) de control. La Fig. 19(b) es una fotografía del tejido hepático de uno de los ratones con eliminación de DNAM-1 (DNAM-1 KO). Ambas micrografías se tomaron con un aumento de 20 veces. Como resultado, se confirmó que la fibrosis hepática se redujo significativamente en el ratón con eliminación de DNAM-1 en comparación con el ratón de tipo silvestre.

Los resultados anteriores muestran que la administración del anticuerpo anti-DNAM-1 a un organismo vivo puede reducir la fibrosis hepática.

[Ejemplo de prueba 15]

(Estudio de fibrosis renal)

Se realizó un estudio de fibrosis renal utilizando ratones con eliminación del gen de DNAM-1 en lugar de la administración del anticuerpo anti-DNAM-1. Se usaron ratones de tipo silvestre como referencia. En la prueba se utilizó un modelo de obstrucción ureteral unilateral (UUO).

Específicamente, primero, al inicio de la prueba, se abrió la cavidad peritoneal de cada uno de los ratones y se ligó el uréter derecho para preparar un modelo UUO. El riñón izquierdo no fue tratado. Luego, el séptimo día después del inicio de la prueba, se perfundió todo el cuerpo de cada uno de los ratones y se extrajeron ambos riñones de cada uno de los ratones. Posteriormente, los riñones recolectados se fijaron con formalina y se incluyeron en parafina para preparar los cortes de tejido. Los cortes de tejido se tiñeron con tricromo de Masson y se observaron. Los riñones fijados con paraformaldehído se incluyeron en un compuesto de OCT para preparar los cortes de tejido. Luego, los cortes de tejido fueron inmunoteñidos. Se calculó el área de la región positiva de actina de músculo liso α (α -SMA), que es un índice de fibrosis.

La Fig. 20(a) son fotografías de secciones de riñones teñidas con tricromo de Masson. La Fig. 20(b) es un gráfico que ilustra el resultado de las áreas de las cortezas renales determinadas sobre la base de los resultados ilustrados en la Fig. 20(a). En las Figs. 20(a) y 20(b), "UUO" indica los resultados del riñón derecho con el uréter ligado, mientras que "CON" indica los resultados del riñón izquierdo sin tratar; y "WT" indica los resultados obtenidos por las pruebas en las que se usaron ratones de tipo silvestre, mientras que "DNAM-1 KO" indica los resultados obtenidos por las pruebas en las que se usaron ratones con eliminación de DNAM-1. En la Fig. 20(b), el símbolo "*" significa que había una diferencia significativa entre ellos con un nivel de significancia inferior al 5%; el símbolo "****" significa que hubo una diferencia significativa entre ellos con un nivel de significancia menor al 1%; y "NS" significa que no hubo diferencia significativa entre ellos. Como resultado, se confirmó que la destrucción del tejido renal resultante de la ligadura del uréter se redujo significativamente en los ratones con eliminación de DNAM-1 en comparación con los ratones de tipo silvestre.

Las Figs. 21(a) y 21(b) son micrografías de un corte de tejido renal inmunoteñido con anticuerpo anti- α -SMA. La Fig. 21(a) ilustra un corte de tejido típico del riñón derecho con el uréter ligado en el ratón de tipo silvestre de control, mientras que la Fig. 21(b) ilustra un corte de tejido típico del riñón derecho con el uréter ligado en el ratón con eliminación de DNAM-1. La Fig. 21(c) es un gráfico que ilustra el resultado del área de la región positiva para α -SMA del tejido renal calculado en cada uno de los ratones.

En las Figs. 21(a) a 21(c), "WT" denota los resultados obtenidos por las pruebas en las que se usaron ratones de tipo silvestre, mientras que "DNAM-1 KO" indica los resultados obtenidos por las pruebas en las que se usaron ratones con eliminación de DNAM-1. En la Fig. 21(c), "CON" indica el área de la región positiva para α -SMA en el riñón izquierdo no tratado. Como resultado, se confirmó que la fibrosis del tejido renal que resultaba de la ligadura del uréter se redujo significativamente en los ratones con eliminación de DNAM-1 en comparación con los ratones de tipo silvestre.

Los resultados anteriores muestran que la administración del anticuerpo anti-DNAM-1 a un organismo vivo puede reducir la fibrosis renal.

[Ejemplo de prueba 16]

(Estudio de enteritis inflamatoria)

Se realizó un estudio de enteritis inflamatoria utilizando ratones con eliminación para el gen de DNAM-1 en lugar de la administración del anticuerpo anti-DNAM-1. Se usaron ratones de tipo silvestre como referencia. En la prueba se usó un modelo de ratón de colitis inducida por sulfato de dextrano (DSS).

En primer lugar, se criaron y habituaron ratones con eliminación de DNAM-1 (n = 5) y ratones de tipo silvestre (n = 5) 3 días antes del inicio de la prueba. En esta etapa, se les dio agua corriente a los ratones. Después del inicio de la prueba, los ratones se criaron con una solución acuosa de DSS al 2% en lugar de agua, y se midieron los cambios en los pesos de los ratones. Los ratones se sacrificaron el noveno día después del inicio de la prueba. Se recogieron los intestinos gruesos de los ratones y se midió su longitud.

La Fig. 22 es un gráfico que ilustra el resultado de los pesos medidos de los ratones de tipo silvestre (WT) de control y los ratones con eliminación (KO) de DNAM-1. En la Fig. 22, el símbolo "***" significa que hubo una diferencia significativa entre ellos con un nivel de significancia de menos del 5%. El eje horizontal muestra el tiempo (días) transcurrido desde el inicio de la prueba. Como resultado, se confirmó que la reducción de peso resultante de la enteritis inflamatoria se redujo significativamente en el ratón con eliminación de DNAM-1 en comparación con el ratón de tipo silvestre.

La Fig. 23(a) es una fotografía de los intestinos gruesos de los ratones con eliminación de DNAM-1 recolectados el noveno día desde el inicio de la prueba. La Fig. 23(b) es una fotografía de los intestinos gruesos de los ratones de tipo silvestre de control recolectados el noveno día desde el inicio de la prueba. La Fig. 23(c) es un gráfico digitalizado de los resultados mostrados en las Figs. 23(a) y 23(b). En las Figs. 23(a) a 23(c), "WT" denota los resultados obtenidos por la prueba en la que se utilizaron ratones de tipo silvestre, mientras que "DNAM-1 KO" indica los resultados obtenidos por la prueba en la que se usaron ratones con eliminación de DNAM-1; y "sin procesar" indica los resultados obtenidos por la prueba en la que se administró agua a un ratón en lugar de la solución acuosa de DSS al 2%. En la Fig. 23(c), "N.S." significa que no hubo diferencia significativa entre ellos. Como resultado, se confirmó que la reducción en la longitud del intestino resultante de la enteritis inflamatoria se redujo significativamente en los ratones con eliminación de DNAM-1 en comparación con los ratones de tipo silvestre.

Los resultados anteriores muestran que la administración del anticuerpo anti-DNAM-1 a un cuerpo vivo puede reducir los síntomas de la enteritis inflamatoria.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo, que tiene una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 a CDR3 que tiene secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1 a 3 respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 a CDR3 que tiene secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 4 a 6 respectivamente.
- 10 2. El anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.
- 15 3. El anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo o un fragmento del mismo es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo.
- 20 4. El anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, siendo el anticuerpo o un fragmento del mismo un anticuerpo de ratón o un fragmento de anticuerpo tipo de ratón.
5. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 25 6. Un vector que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5.
7. Un transformante que comprende el vector de acuerdo con la reivindicación 6.
- 30 8. El anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en la prevención o el tratamiento de enfermedad de injerto contra huésped, el rechazo de trasplantes, una enfermedad autoinmune, fibrosis, enteritis inflamatoria o una alergia.
9. Una composición farmacéutica para la activación de células T reguladoras, comprendiendo la composición farmacéutica el anticuerpo monoclonal anti-DNAM-1 humano o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

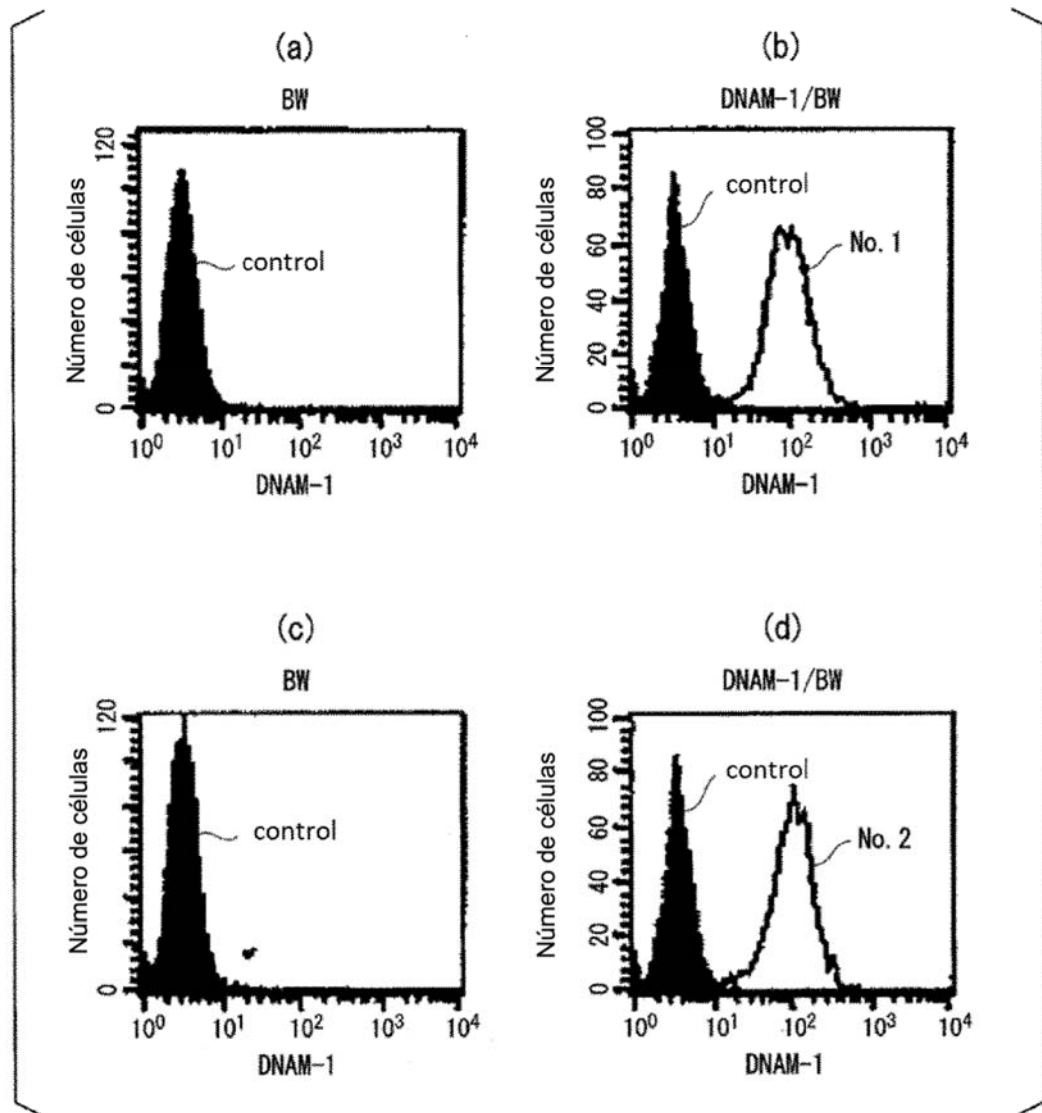
[Fig.1]

No. 1	1	-SQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKLEWMGYISYDGSNNYNPS	50
No. 2	1	-SQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGITTYNPS	50
No. 3	1	-----EISCKASGYTFNYWLGWVKQRPBGHLEWIGDIYPGGGYTNYNE	50
No. 4	1	-KWGLSEISCKASGYTFDYNMHWKQSHGKSLEWIGYIYPYNGGTGYNQ	50
No. 5	1	-----SVTGYSITSG-YYWNWIRQFPGNKLEWMGYISYDGSNNYNPS	50
No. 6	1	SQSLSLTCSVTGYSITSG-YYWNWIRQFPGNKLEWMGYISYDGSNNYNPS	50
		CDR1 CDR2	
No. 1	51	LKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCARAYYGNVVGFDVWGA	100
No. 2	51	LKSRIITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCAELSMQDYWGQTSVTVS	100
No. 3	51	KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCANAYYRYKGFAYWGQG	100
No. 4	51	KFKSKATLTVDNSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCAGYWFYFDVWGAGTTVT	100
No. 5	51	LKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCARERVMITASFDYWGQG	100
No. 6	51	LKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCARERVMITASFDYWGQG	100
No. 1	101	GTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGK-----	122
No. 2	101	SAKTTTPSVYPLAPGNLNSSTSFSSLG-----	126
No. 3	101	TLVTVSAAKTTPPSVYPLAPL-----	115
No. 4	101	VSSAKTTPPSVYPLAPWK-----	117
No. 5	101	TTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGK-----	113
No. 6	101	TTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGK-----	121

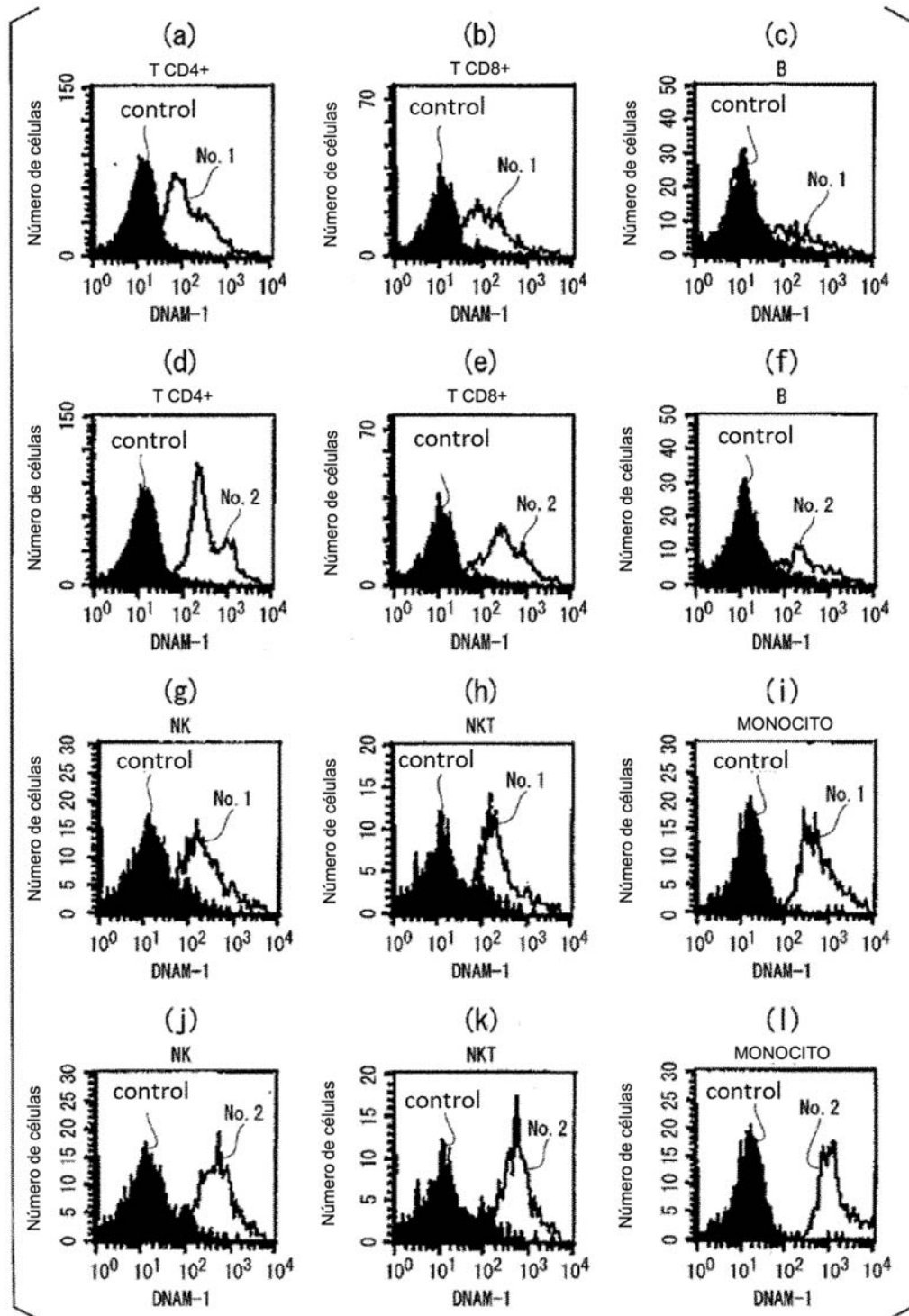
[Fig.2]

No. 1	1	-----RVTITCKASQSVSNDAVWYQKPGQSPKLLIY_	50
No. 2	1	DIVLSQLPATLSVSPGERVSFSCRASQSIGTSIHVYQRTNGSPRLLIK_	50
No. 3	1	-----VTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQKPGQAPKLLIYW_	50
No. 4	1	-----EKVSITCKASQDVGTAVAWYQKPGQSPKLLIYW_	50
No. 5	1	-----SALWERVSLTCRASQEISGYLSWLQKQPDGTIKRLIYA_	50
No. 6	1		
CDR1			
No. 1	51	ASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFITSTVQAEDLAVYFCQQDYSSPLTFGA	100
No. 2	51	ASEISGIPSRFSGSGSGTDFTLSTNSVESEDIADYYCQQRSWPLTFGA	100
No. 3	51	ASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVKAEDLAVYYCQQYSSYPWTFGG	100
No. 4	51	ASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPWTFGG	100
No. 5	51	ASTLDSGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSELEDFADYYCLQYASYPWTFGG	100
No. 6	51		
CDR2		CDR3	
No. 1	101	GTKLELKRADAAPTIVSIFPPSSEQT-----	108
No. 2	101	GTKLELKRADAAPTIVSIFPPSSEQNHEFWIRYVTRLQHAWYRAFPVDE	150
No. 3	101	GTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQ-----	112
No. 4	101	GTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQR-----	109
No. 5	101	GTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQ-----	112

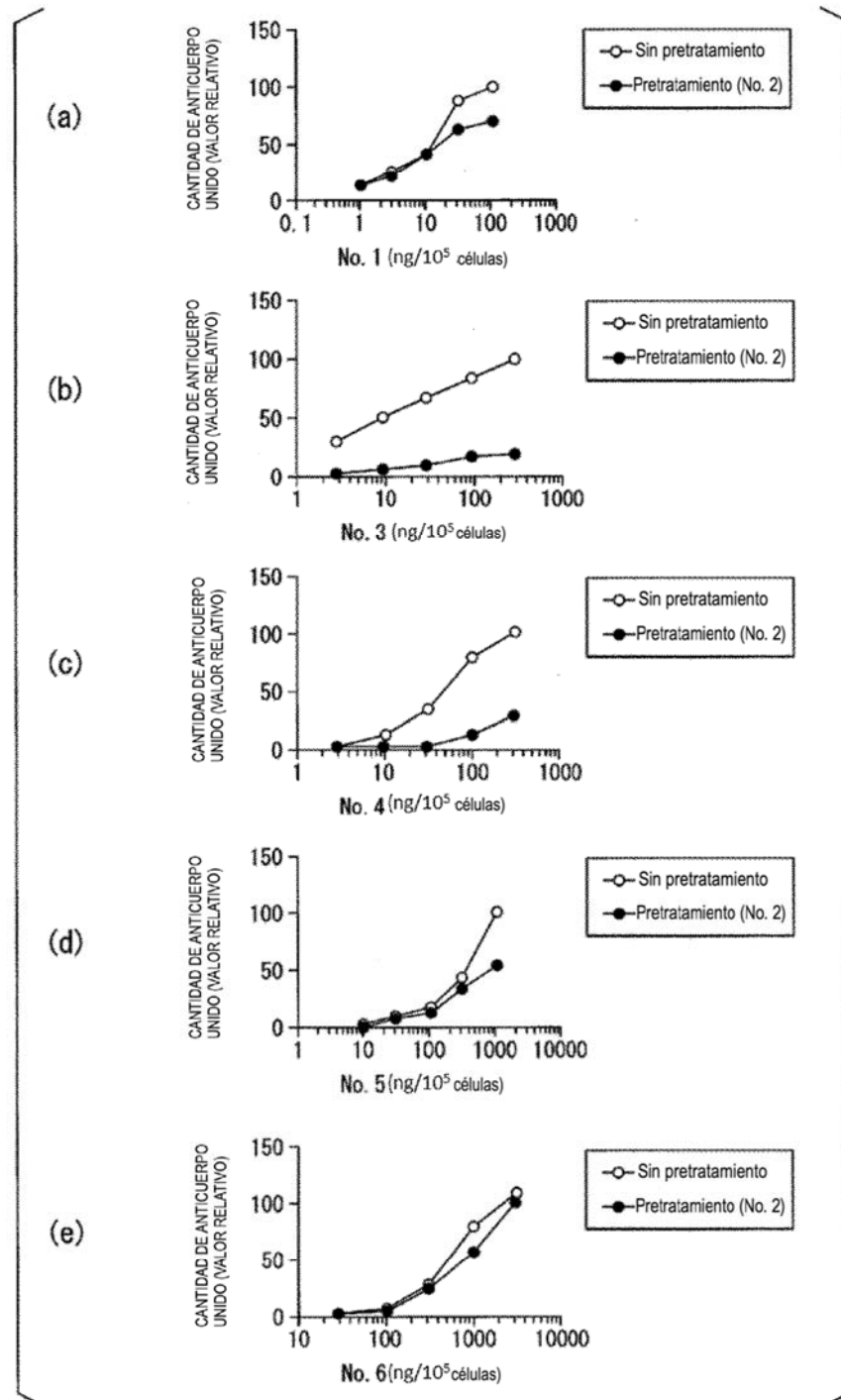
[Fig.3]



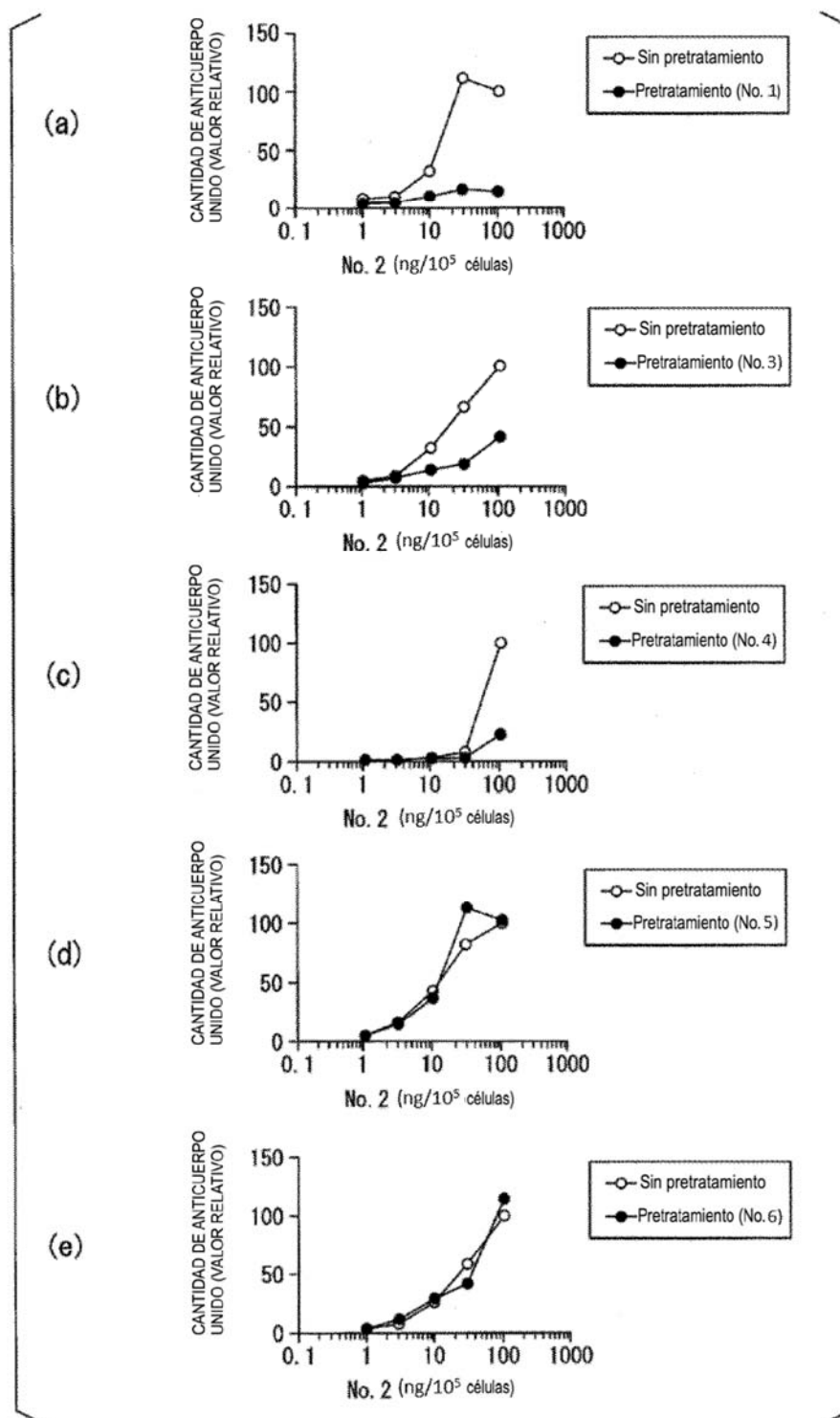
[Fig.4]



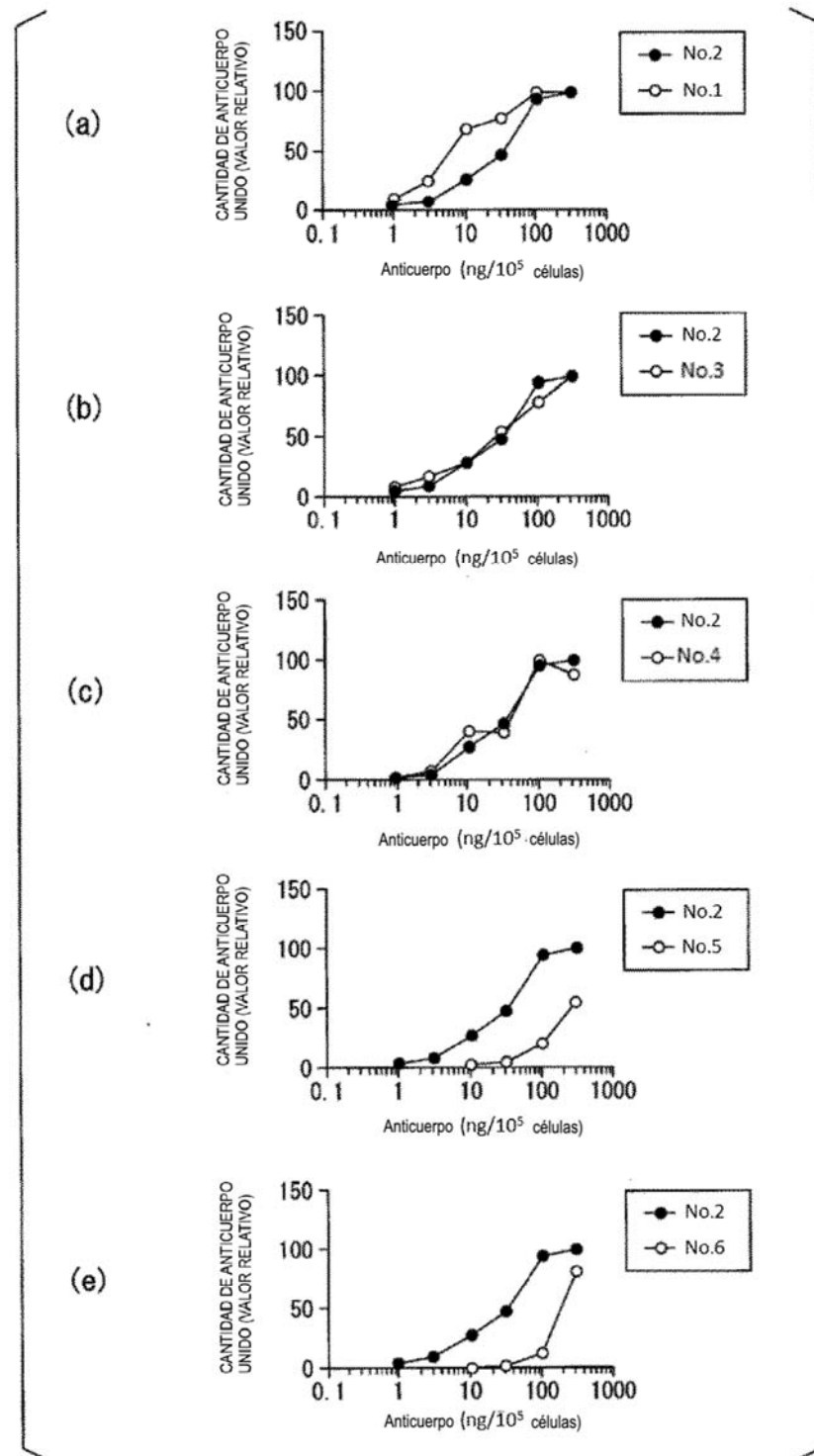
[Fig.5]



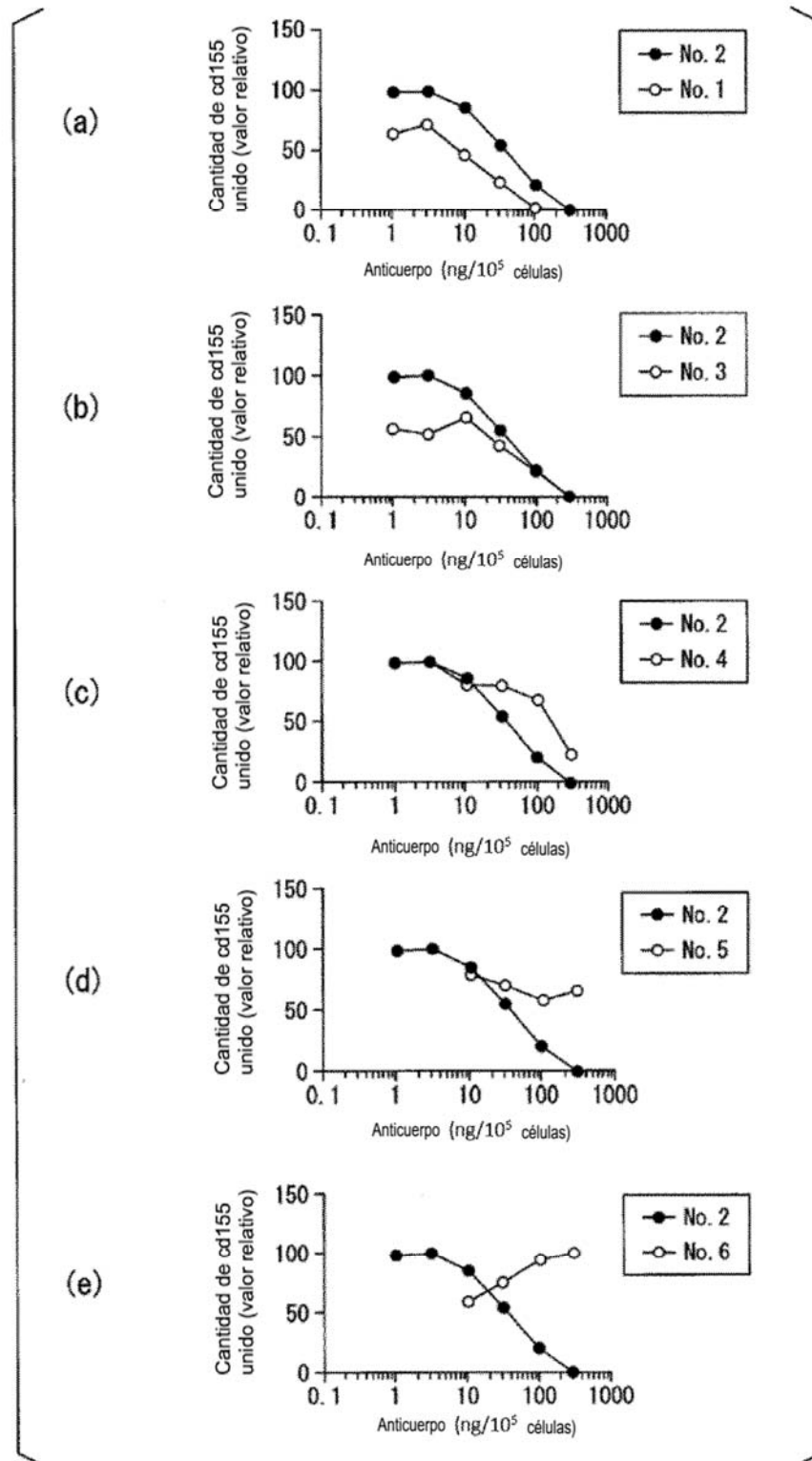
[Fig.6]



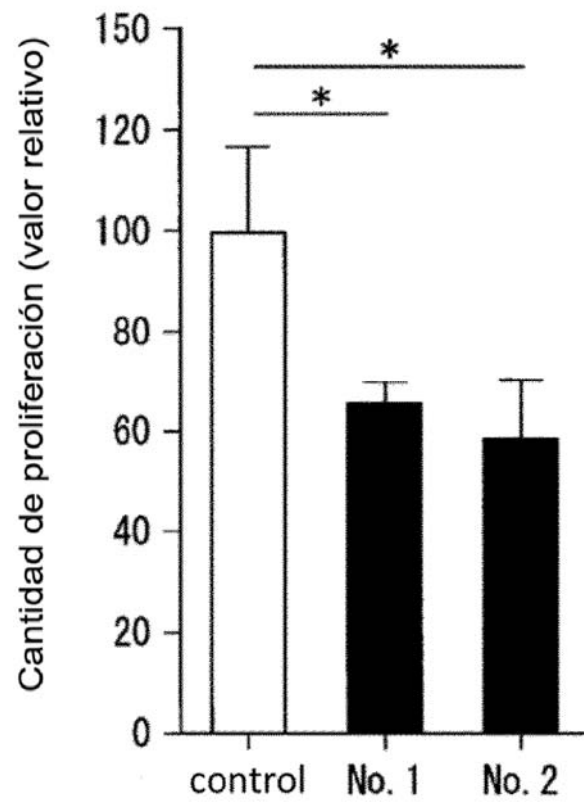
[Fig.7]



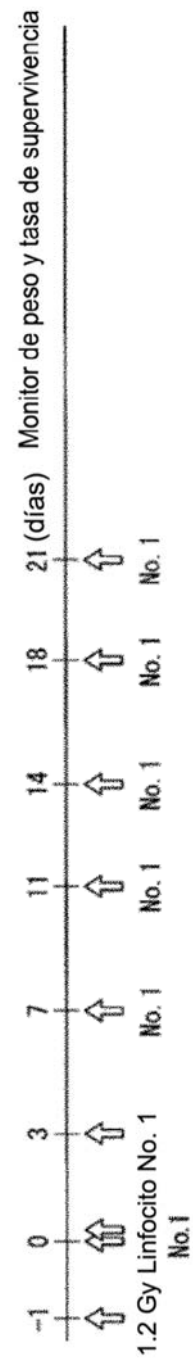
[Fig.8]



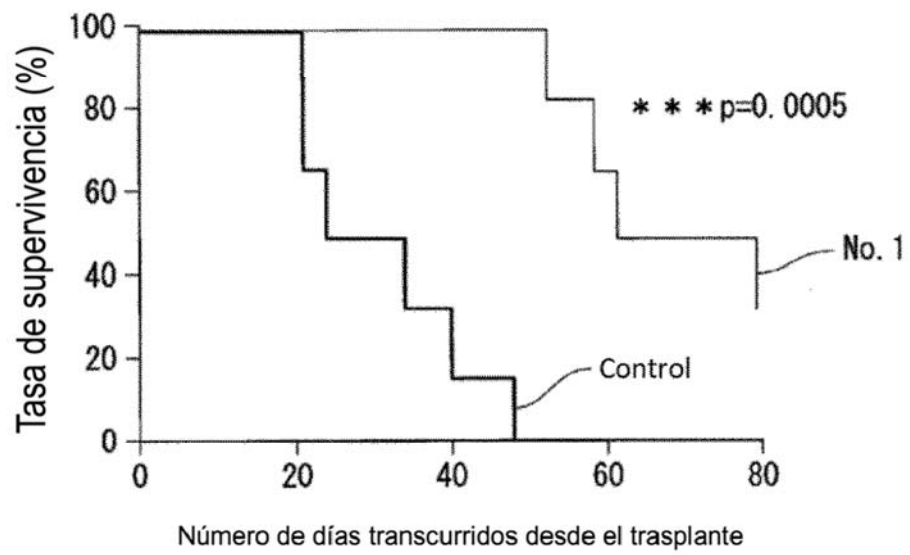
[Fig.9]



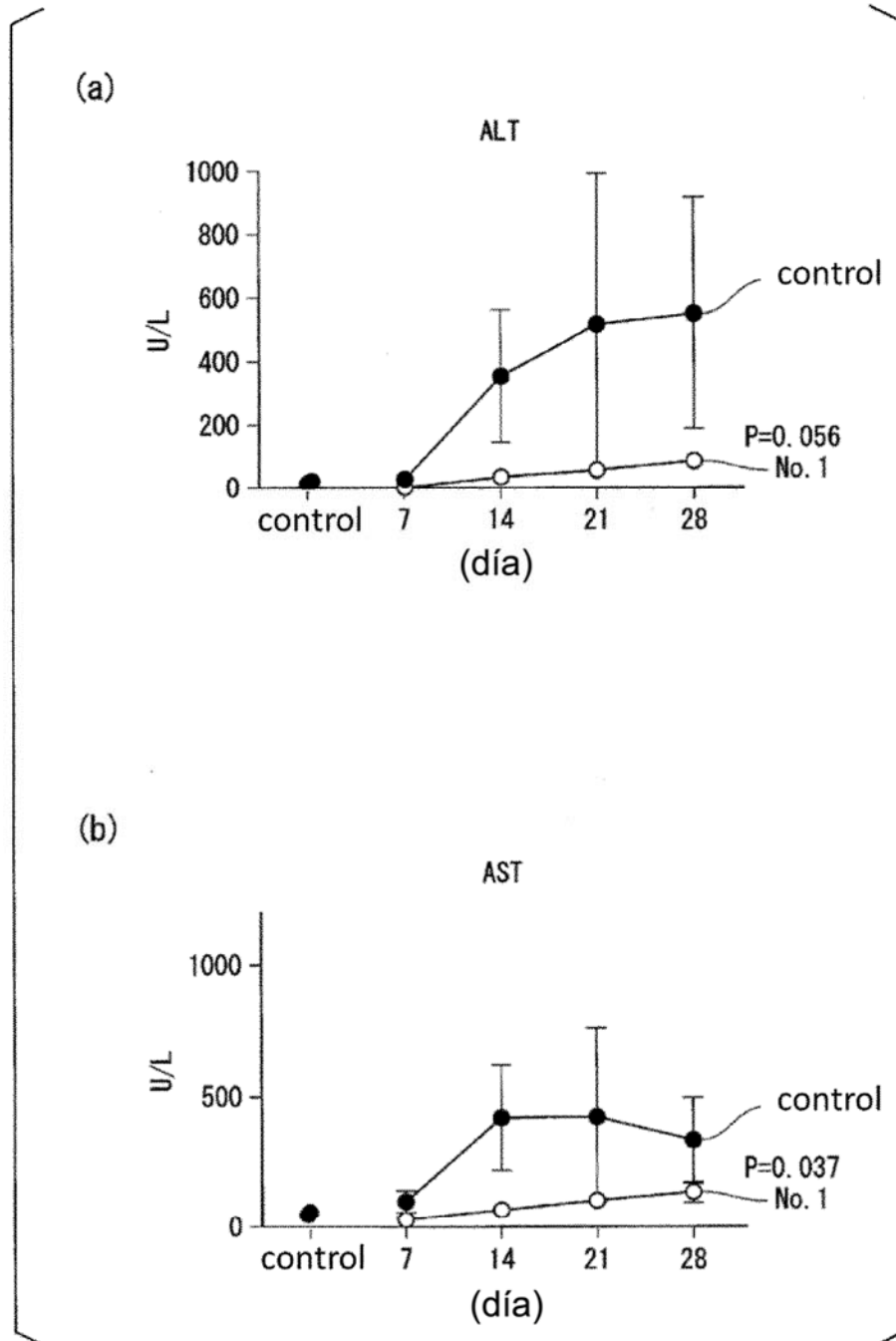
[Fig.10]



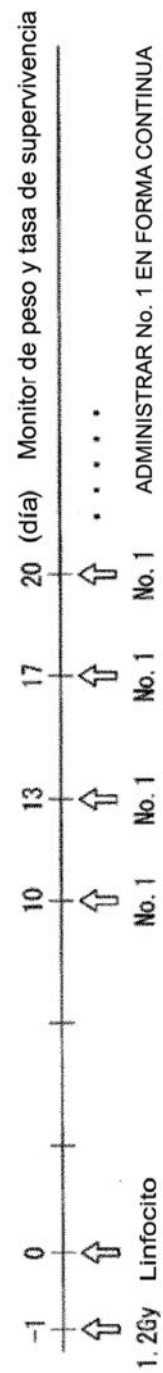
[Fig.11]



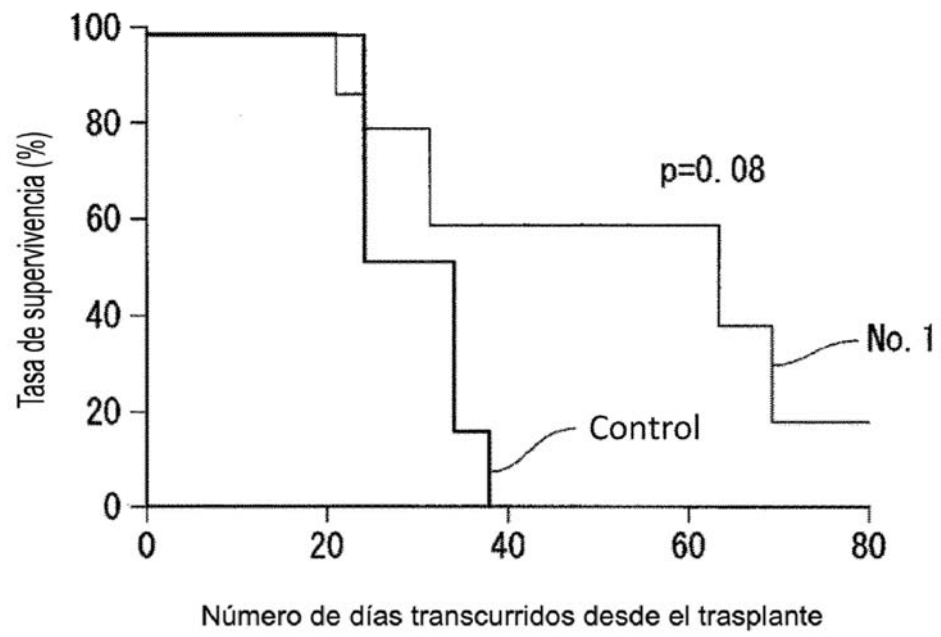
[Fig. 12]



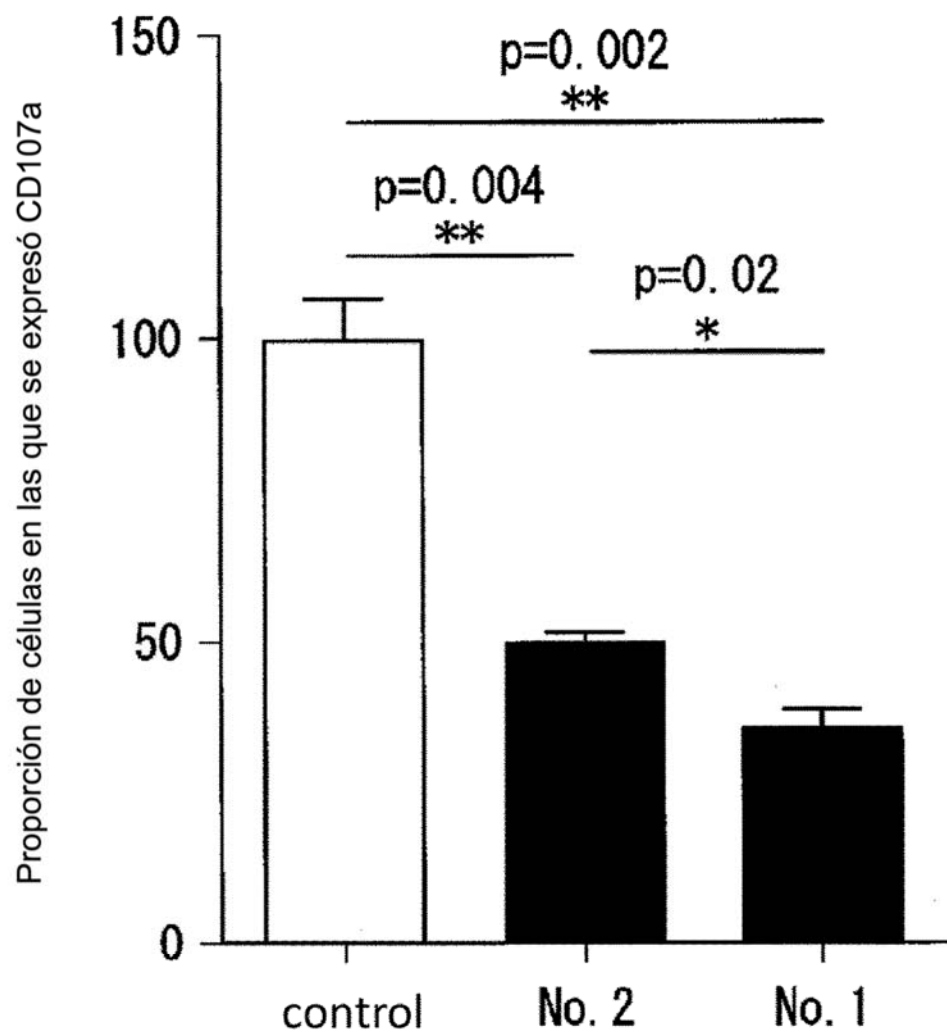
[Fig.13]



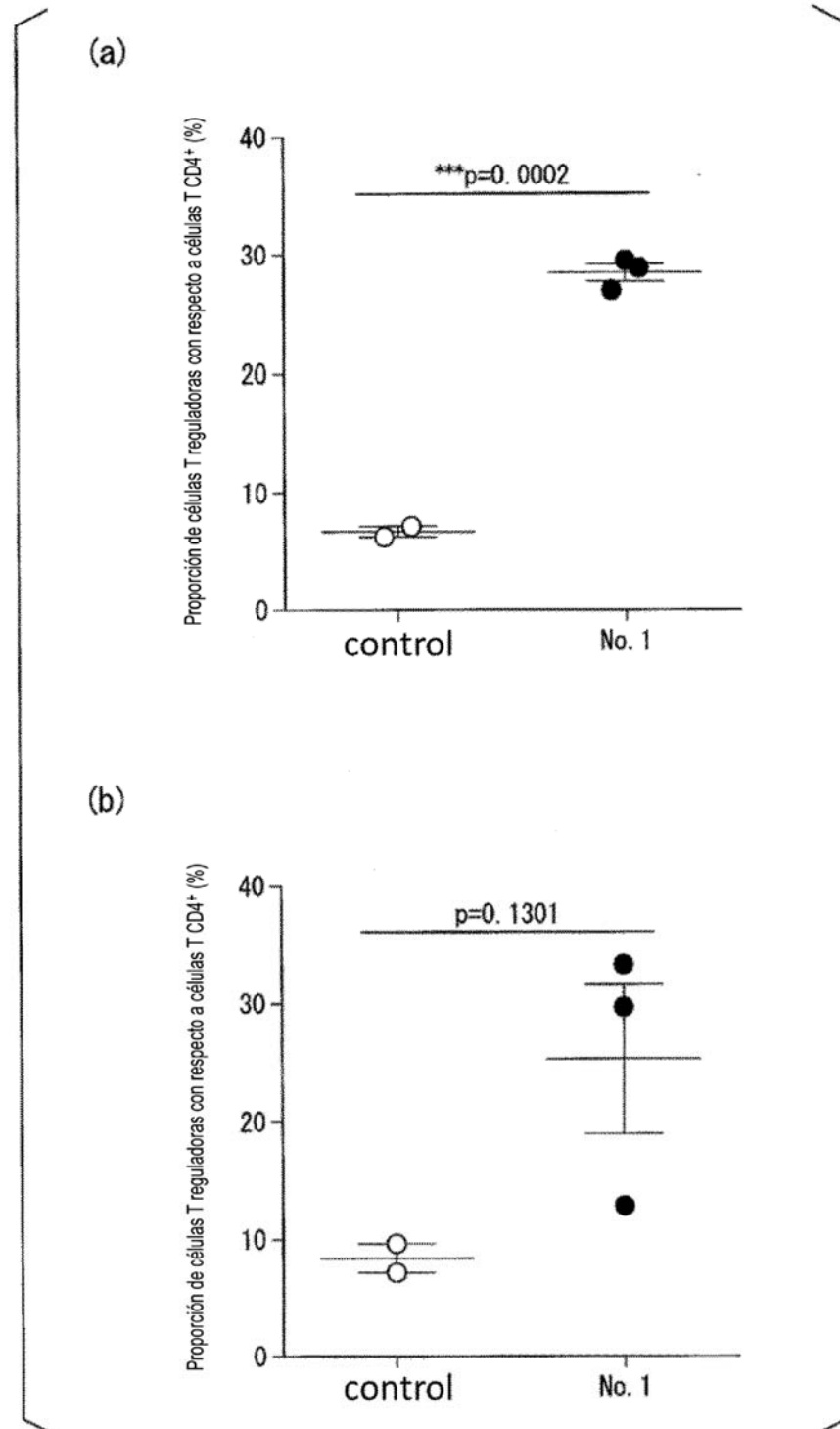
[Fig.14]



[Fig.15]

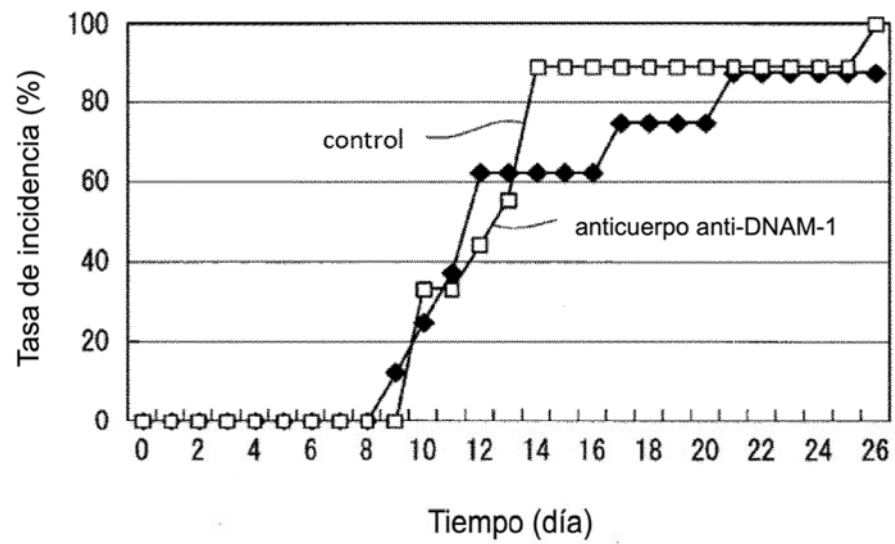


[Fig.16]

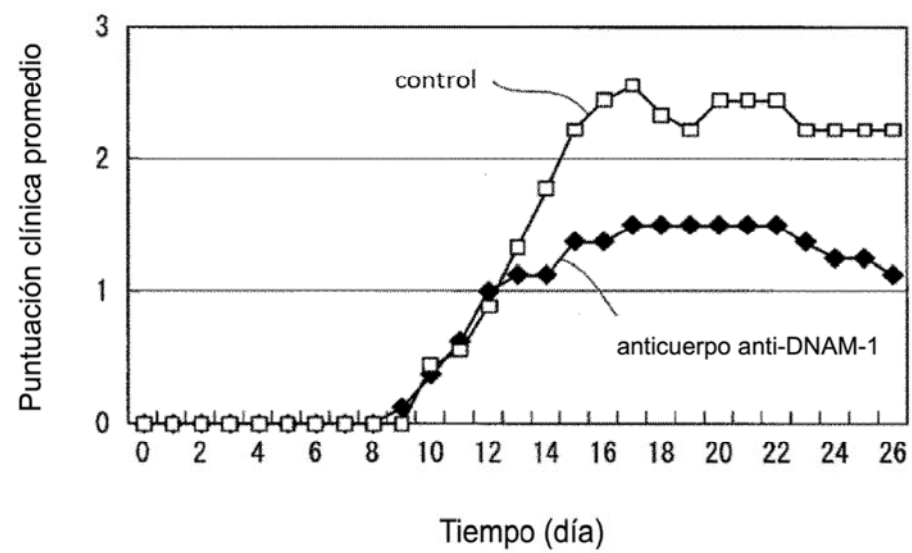


[Fig.17]

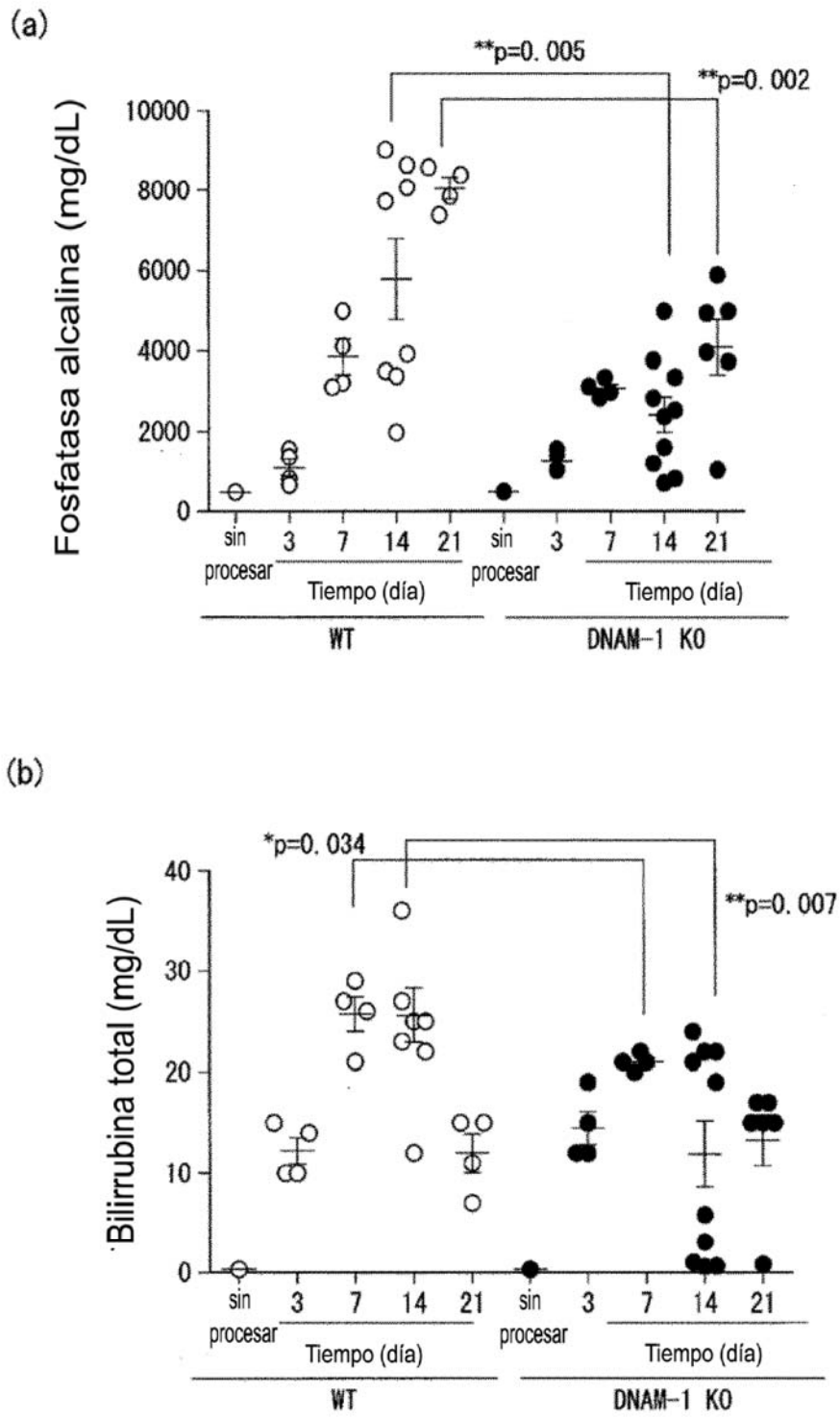
(a)



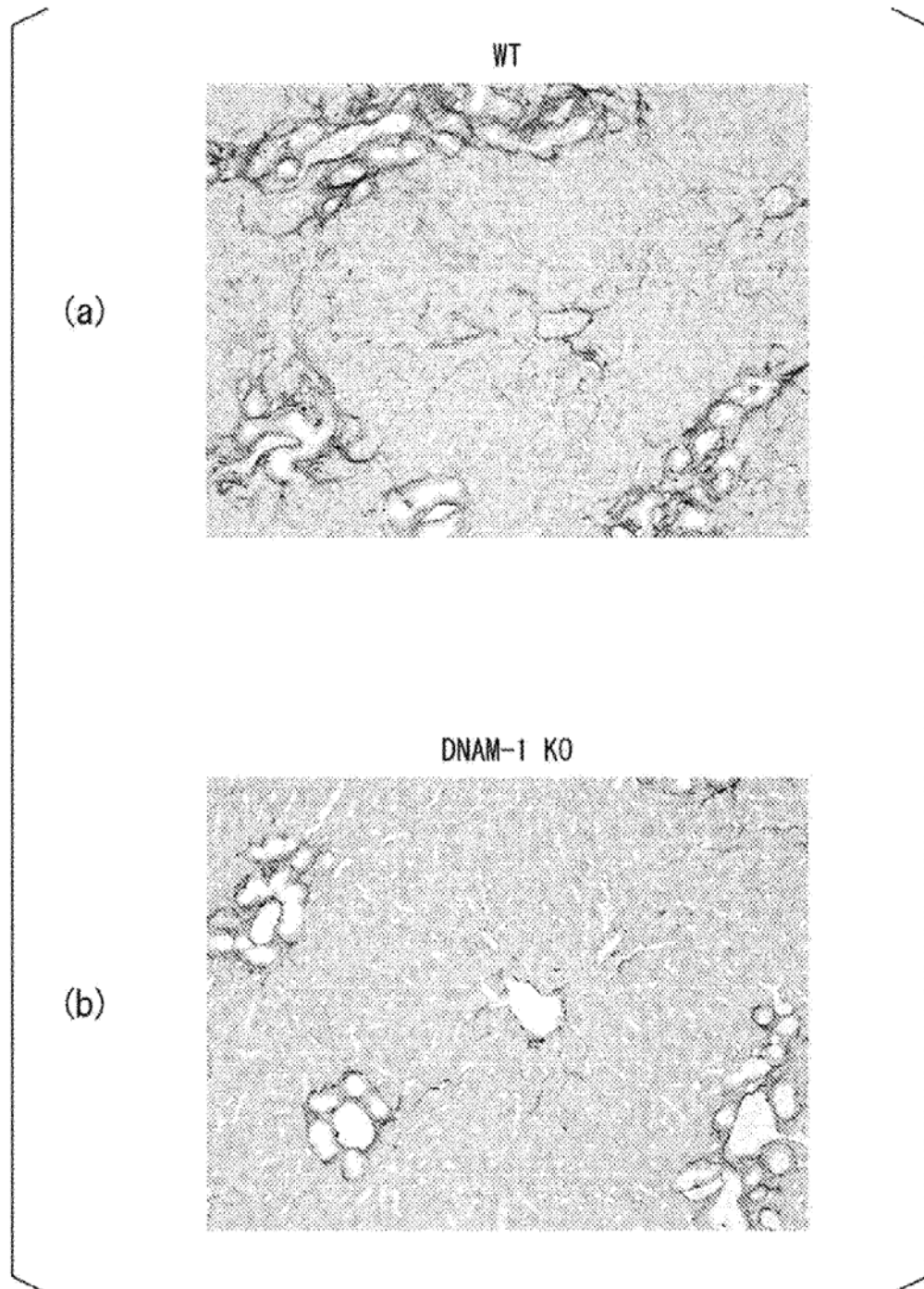
(b)



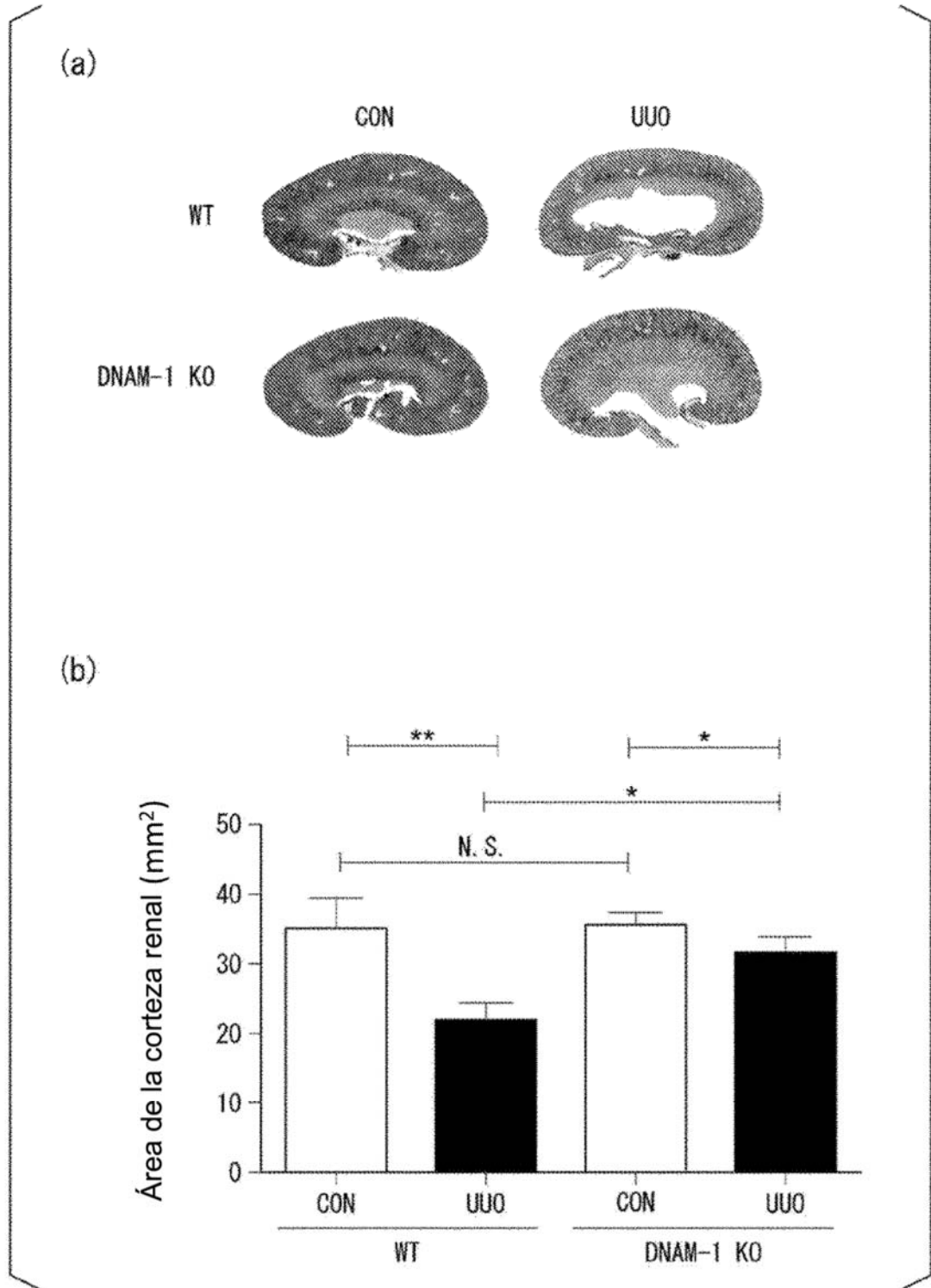
[Fig.18]



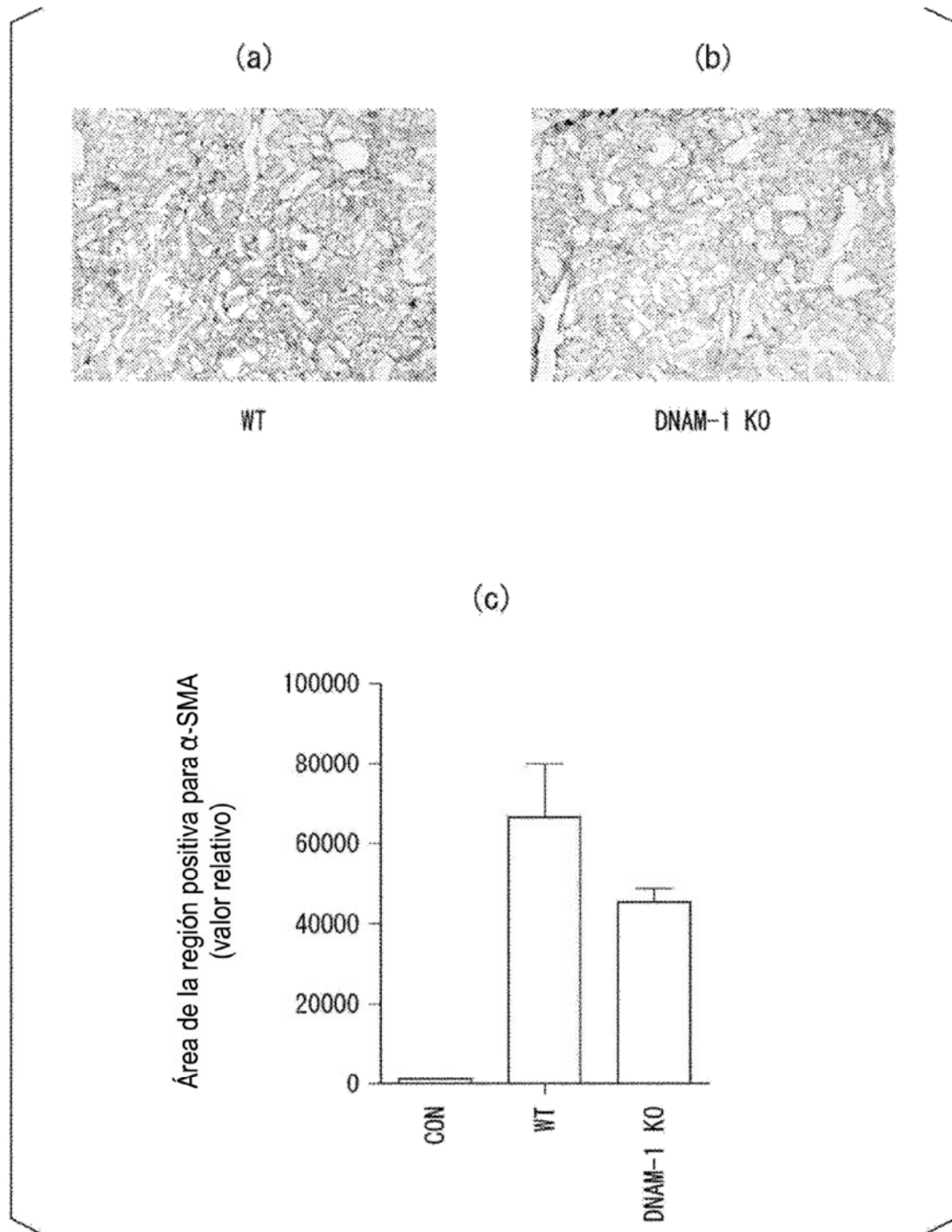
[Fig.19]



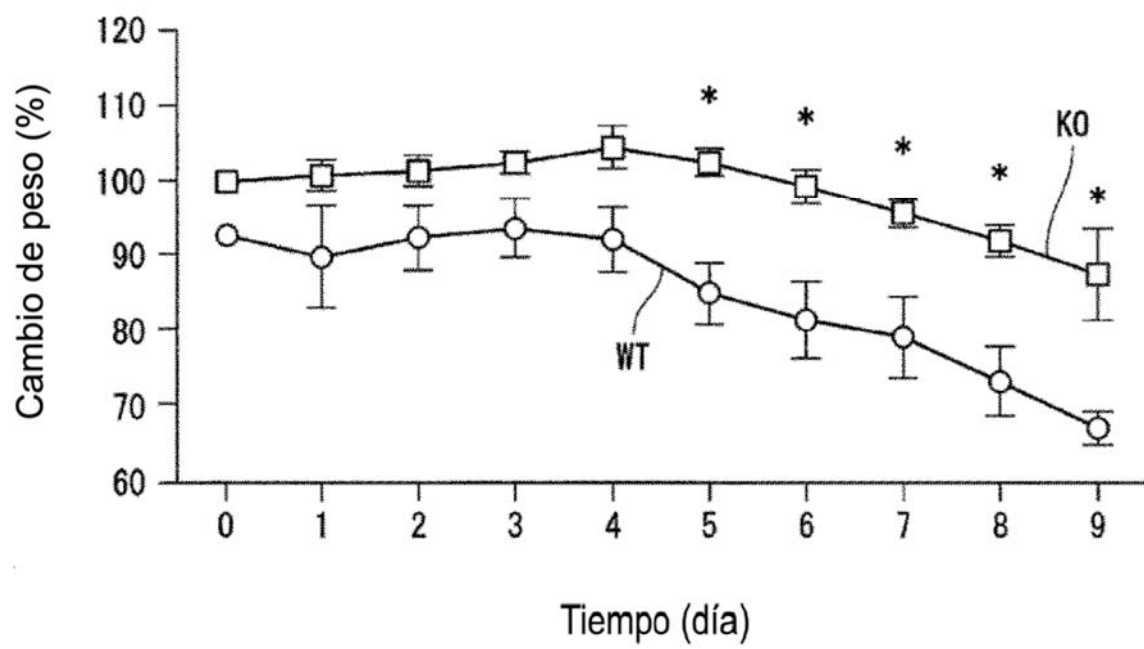
[Fig.20]



[Fig.21]



[Fig.22]



[Fig.23]

