

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 954 183**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C12N 5/0783** (2010.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.05.2016 PCT/EP2016/060148**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2016 WO16180721**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.05.2016 E 16720842 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2023 EP 3294766**

54 Título: **Anticuerpo humanizado o fragmento de este específico para CD3**

30 Prioridad:

**08.05.2015 EP 15166966**

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

**20.11.2023**

73 Titular/es:

**MILTENYI BIOTEC B.V. & CO. KG (100.0%)  
Friedrich-Ebert-Strasse 68  
51429 Bergisch Gladbach, DE**

72 Inventor/es:

**NÖLLE, VOLKER;  
THIE, HOLGER y  
KAISER, ANDREW**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

### Observaciones:

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

ES 2 954 183 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

Anticuerpo humanizado o fragmento de este específico para CD3

## Campo de invención

La presente invención se refiere al campo de los anticuerpos humanizados o fragmentos de estos, en particular a los anticuerpos o fragmentos de estos específicos para el antígeno CD3 y usos de estos.

## Antecedentes de la invención

El clon OKT3 es un anticuerpo monoclonal de ratón IgG2a específico para el marcador de superficie celular humano CD3 (glucoproteína de superficie de células T CD3, un correceptor transductor de señales del receptor de células T, que comprende las subunidades gamma, delta, épsilon y zeta), que reconoce un área atípicamente pequeña de CD3 épsilon. OKT3 se describió originalmente en el documento US4658019 y en Kung y cols. (1979) Science 206, 347-349. OKT3 es bien conocido para la estimulación de células T humanas usando anticuerpos anti-CD3 de longitud completa por ser un potente estimulador de la activación y proliferación de células T (documentos US6406696; US6143297; US6113901; Yannelly y cols. (1990) J. Immunol. Meth. 130, 91-100). La activación de células T por anticuerpos anti-CD3 implica una interacción molecular compleja. Los anticuerpos anti-CD3 solubles no eran capaces de inducir la activación de las células T *in vitro* en ausencia de células portadoras de receptores Fc; y se ha demostrado que dicha activación depende del entrecruzamiento del complejo receptor de células T (TCR)/CD3 en la superficie de las células T, que estaba mediado por el anticuerpo anti-CD3 OKT3 que une tanto las células T (a través de sus regiones variables) como células portadoras del receptor Fc (a través de su porción Fc) (Ceuppens y cols. (1985) J Immunol. 135, 3882-3886; Bohua y cols. (2005) Immunology 116, 487-498). El fragmento monovalente Fab de OKT3 es unas 100 veces menos potente que la IgG parental (Van Waave y cols. (1980) J Immunol. 124, 2708-2713).

Geppert y Lipsky (J. Immunol. (1987) 138, 1660-1666) informaron del uso de anticuerpos monoclonales anti-CD3 inmovilizados para inducir la proliferación de una población purificada de células T. Los autores encontraron que OKT3 inmovilizado no era muy eficaz en estimular la proliferación de células T. Los anticuerpos anti-CD3 también se han descrito como agentes usados en combinación con anticuerpos anti-CD28 para inducir la proliferación de células T (documento US6352694). Los clones 15E8, CD28.3 y Leu-28 son ejemplos de anticuerpos monoclonales de ratón específicos para el antígeno CD28 humano. Los anticuerpos anti-CD28 con distintas propiedades de unión difieren en su capacidad para inducir la activación de células T (Nunès y cols. (1993) Int Immunol. 5, 311-315). En el documento WO9429436A1 se describe un método *in vitro* para inducir la proliferación de una población de células T, que comprende poner en contacto una población de células T con una superficie de fase sólida que tiene directamente inmovilizado sobre ella: (a) un primer agente que proporciona una señal primaria de activación a las células T (normalmente anticuerpo anti-CD3), activando así las células T; y (b) un segundo agente que estimula una molécula accesoria en la superficie de las células T (normalmente anticuerpo anti-CD28), estimulando así las células T activadas, induciendo el primer y segundo agente de esta forma la proliferación de las células T. Los agentes como los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 que permiten la estimulación policlonal de las células T también se pueden unir a una matriz de cadenas poliméricas móviles como se describe en el documento WO2014048920 o en el documento EP2711418A1.

Las células T se pueden estimular para aumentar la eficacia de transducción (por ejemplo, transducción lentiviral). La eficacia de transducción de las células T inactivas suele ser muy baja, ya que la célula no expresa los receptores (como el receptor de LDL en el caso de los vectores lentivirales pseudotipados de proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV)) necesarios para la transducción. La estimulación de las células T por el anticuerpo anti-CD3 solo o en combinación con el anticuerpo anti-CD28 da como resultado la expresión de estos receptores y, por lo tanto, da lugar a una mayor eficacia de transducción (Amirache y cols. (2014) Blood 123, 1422-1424).

Desafortunadamente, el anticuerpo OKT3 murino muestra una baja estabilidad. El documento WO1998052975 describe una variante de scFv mutado del anticuerpo anti-CD3 murino OKT3 que contiene una posición de cambio H100A de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat. El scFv mutado de OKT3 se produce usando un sistema de expresión recombinante y el documento WO1998052975 propone que el scFv anti-CD3 mutado es más estable que el anticuerpo original OKT3 durante períodos prolongados de almacenamiento.

Los anticuerpos humanizados o fragmentos de estos son útiles para fines clínicos y de terapia celular ya que son menos inmunogénicos cuando se administran a pacientes humanos en comparación con anticuerpos no humanizados o fragmentos de estos como los anticuerpos murinos o fragmentos de estos. Se conocen en la técnica las técnicas para la humanización de anticuerpos no humanos y comprenden el injerto de regiones determinantes de complementariedad (CDR) en un marco humano o humanizado, en donde las CDR injertadas se derivan típicamente de un anticuerpo de roedor. Las CDRs forman parte de las regiones variables de los anticuerpos o fragmentos de estos, donde estas moléculas se unen a su antígeno específico. Están integradas en regiones marco que son mucho menos variables que las CDRs. Los documentos US6750325, US5885573, US7381803, US20040052783 y US20040202657 describen la transferencia de la especificidad de unión de OKT3 en marcos humanos. El documento WO2002051871 describe anticuerpos humanizados obtenidos a partir de regiones variables de CD28.3, producidos

por el hibridoma CNCM 1-2582. CD28.3 es casi incapaz de inducir la liberación de IL-2/activación de células T (Nunès y cols. (1993) *Int Immunol.* 5, 311-315).

El documento WO2013188693A1 describe un constructo que tiene un scFv que comprende las secuencias de las presentes SEQ ID N.º: 16 y 17.

- 5 El documento WO2012143524A2 describe anticuerpos biespecíficos que se unen a HER2 y CD3. Uno de los brazos Fab de CD3 comprende las secuencias de las presentes SEQ ID N.º: 16 y 17.

El documento WO2013186613A1 describe anticuerpos anti-CD3 humanizados recombinantes que comprenden las CDRs de la presente invención. Estos anticuerpos humanizados se basan en OKT3 y la mutación de cisteína a serina en la posición 114 de acuerdo con la nomenclatura IMGT en la CDR3 de la cadena pesada de OKT3 da lugar a una mejora significativa en la actividad biológica y la estabilidad de los anticuerpos.

Existe la necesidad en la técnica de un anticuerpo anti-CD3 humanizado o un fragmento de este que sea más estable que el anticuerpo OKT3 parental murino y que, por ejemplo, se pueda usar para la estimulación policlonal de células T solo o en combinación con un anticuerpo humanizado anti-CD28 o fragmento de este.

### Compendio de la invención

15 Sorprendentemente, hemos descubierto que el nivel de expresión de las variantes de Fab mutadas de CDR del clon OKT3 del anticuerpo anti-CD3 era de 40 a 70 veces mayor que el nivel de la variante de Fab no mutada de CDR y que el nivel de expresión de las variantes de Fab humanizadas del anticuerpo anti-CD28 clon 15E8 era 10 veces mayor que el nivel de la variante de Fab no humanizada, cuando se expresaron en *E. coli*. En el caso de OKT3, una variante humanizada y mutada de CDR mostró el nivel de expresión más alto, en donde la mutación del CDR comprendía la sustitución del aminoácido cisteína por serina en la posición 114 de acuerdo con la nomenclatura IMGT en la CDR3 del dominio variable de la cadena pesada.

En segundo lugar, las moléculas de Fabs resultantes de variantes de OKT3 mutadas en CDR (tanto humanizadas como no humanizadas) mostraron sorprendentemente una mayor estabilidad en comparación con la variante de Fab no mutada en CDR y con el anticuerpo OKT3 de longitud completa parental murino. El aumento de estabilidad se detectó para la molécula de Fab libre así como para las moléculas de Fab marcadas.

En tercer lugar, se descubrió inesperadamente que las variantes de OKT3 mutadas en CDR (tanto humanizadas como no humanizadas) en formato Fab son capaces de estimular a las células T cuando se unen a una matriz de cadenas poliméricas móviles y, lo que es aún más sorprendente, que estas son más potentes como anticuerpo OKT3 de longitud completa. Esto iba completamente en contra de lo esperado porque se pensaba que el entrecruzamiento en la superficie de las células T estaba mediado no solo por las regiones variables, sino también por la porción Fc de OKT3.

En cuarto lugar, se descubrió inesperadamente que las variantes 15E8 humanizadas en formato Fab que son específicas para el antígeno CD28 son capaces de estimular a las células T en combinación con el anticuerpo OKT3 murino o con las variantes de Fab de OKT3 mutadas en CDR (tanto humanizadas como no humanizadas) al menos tan potente como el anticuerpo 15E8 murino cuando se une a una matriz de cadenas poliméricas móviles. De nuevo, esto era contrario a lo esperado debido a la ausencia de la porción Fc del Fab. La combinación de una variante de Fab anti-CD3 humanizada y mutada en CDR de OKT3 con una variante de Fab anti-CD28 humanizada de 15E8, cada una unida a una matriz de cadenas poliméricas móviles, dio el mejor resultado en términos de alta frecuencia de células T activadas además de una alta tasa de proliferación de células T.

Las CDRs (de acuerdo con la nomenclatura IMGT) del anticuerpo anti-CD3 clon OKT3 se describen en las SEQ ID N.º: 1, SEQ ID N.º: 2 y SEQ ID N.º: 3 para el dominio variable de cadena pesada y en las SEQ ID N.º: 4, SEQ ID N.º: 5 y SEQ ID N.º: 6 para el dominio variable de cadena ligera (véase la FIG. 2A y la FIG. 2B para la nomenclatura IMGT). El marco para la humanización de OKT3 se basa en secuencias publicadas en Adair y cols. (1994) *Hum Antibodies Hybridoma* 5, 41-47. Las CDRs (de acuerdo con la nomenclatura IMGT) del anticuerpo anti-CD28 clon 15E8 se describen en las SEQ ID N.º: 7, SEQ ID N.º: 8 y SEQ ID N.º: 9 para el dominio variable de cadena pesada y en las SEQ ID N.º: 10, SEQ ID N.º: 11 y SEQ ID N.º: 12 para el dominio variable de cadena ligera. El marco para la humanización de 15E8 se basa en secuencias marco de línea germinal humana.

Además de los anticuerpos o fragmentos de estos descritos en la presente memoria, la presente descripción también comprende polinucleótidos aislados que codifican dichos anticuerpos o fragmentos de estos, vectores de expresión que comprenden dichos polinucleótidos, un sistema de expresión que comprende dichos polinucleótidos y células huésped que expresan dichos anticuerpos o fragmentos de estos, células huésped que comprenden dichos polinucleótidos, el uso de dichos anticuerpos o fragmentos de estos para la estimulación de células T, y el uso de dichos anticuerpos o fragmentos de estos para el marcaje reversible de células.

### Breve descripción de las Figuras

FIG.1: Predicción *in silico* de la agregación de los dominios variables de la cadena pesada (VH, FIG. 1A) y de la cadena ligera (VL, FIG. 1B) del anticuerpo anti-CD3 murino parental clon OKT3 y los dominios variables de la cadena pesada

(VH, FIG. 1C) y de la cadena ligera (VL, FIG. 1D) del anticuerpo anti-CD28 clon 15E8. Se calculó para cada residuo de aminoácido, dado aquí por un número de posición, una puntuación numérica usando software estándar conocido en la técnica que predice la tendencia de agregación de proteínas. Las puntuaciones más altas representan una mayor tendencia a la agregación. La puntuación mínima es 0 (no propenso a la agregación) y la puntuación máxima es 100 (altamente propenso a la agregación).

FIG. 2: Definición de regiones marco FR1, FR2, FR3, FR4 y regiones CDR CDR1, CDR2 y CDR3 usando los dominios variables de cadena pesada (FIG. 2A) y ligera (FIG. 2B) del anticuerpo 15E8 murino parental específico para el antígeno CD28 como un ejemplo. La numeración está de acuerdo con IMGT.

FIG. 3: Mapa plasmídico del vector procariota para la expresión de fragmentos de Fabs específicos para el antígeno CD3 y específicos para el antígeno CD28 en *E. coli*. LC, cadena ligera; HC, cadena pesada; VL, dominio variable de cadena ligera; VH, dominio variable de cadena pesada; CL dominio constante de cadena ligera; CH1 (hlgG1), dominio CH1 de IgG1 humana; RBS, sitio de unión al ribosoma; poli-HIS, secuencia de poli-histidina; kan, gen de resistencia a la kanamicina; lacIq, gen represor lac; ori, origen de la replicación; PhoA, péptido señal PhoA; PelB, péptido señal PelB; kBps, kilo pares de bases.

FIG. 4: Gel SDS teñido con Coomassie con muestras de diferentes etapas de la purificación de la variante de Fab "huCD3\_mut" mediante cromatografía de intercambio iónico y de afinidad con quelatos metálicos. M, marcador de peso molecular con tamaños de 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 y 10 kDa de arriba a abajo. Calle 1: extracto periplásmico; calle 2: fracción de paso por la columna de quelato metálico; calles 3-4: fracciones de lavado; calles 5-8: fracciones de eluato; calle 9: fracción de paso por la columna de intercambio iónico; calle 10: fracción de lavado; calles 11-12: fracciones de eluato.

FIG. 5: Análisis de citometría de flujo de PBMCs teñidas usando directamente anticuerpos conjugados o indirectamente usando Fabs en combinación con un anticuerpo anti-poli-histidina. 5A-5D: diagramas de puntos de tinciones anti-CD3; 5A: control positivo, conjugado OKT3-PE; 5B: control negativo, conjugado anti-poli-histidina-PE; 5C: Fab chCD3\_mut; 5D: Fab huCD3\_mut. 5E-5J: diagramas de puntos de tinciones anti-CD28; 5E: control positivo, conjugado 15E8-PE; 5F: control negativo, conjugado anti-poli-histidina-PE; 5G: Fab huCD28\_v1; 5H: Fab huCD28\_v2; 5I: Fab huCD28\_v3; 5J: Fab huCD28\_v4. FSC: dispersión frontal. PE: ficoeritrina. FITC: isotiocianato de fluoresceína. anti-HIS-PE: anti-poli-histidina-ficoeritrina. El intervalo del eje x es de 0 a 1.000, y el del eje y de 1E-01 a 1E+03.

FIG. 6: Estimulación de células T por diferentes combinaciones de nanomatrices que comprenden anticuerpos o fragmentos de estos específicos para CD3 y CD28. 6A: frecuencia (%) de células T que expresan ambos marcadores de activación temprana CD25 y CD69 después de 48 horas de estimulación. 6B: tasa de proliferación (%) de células T después de una semana de estimulación. Cada punto representa la muestra de un donante. Las líneas horizontales representan el valor de la mediana correspondiente. "mAb" indica el anticuerpo parental murino de longitud completa (OKT3 para CD3 y 15E8 para CD28).

FIG. 7: Resultados de SEC-HPLC de clones de anticuerpos murinos parentales purificados OKT3 (anti-CD3) y 15E8 (anti-CD28) después del almacenamiento a 25 °C durante 26 semanas. 7A: cantidad (%) de anticuerpo agregado, triángulos: OKT3, rombos: 15E8; 7B: cantidad (%) de anticuerpo dimérico, triángulos cerrados: OKT3, cuadrados abiertos: 15E8.

FIG. 8: Tinción de PBMCs usando Fabs anti-CD3 térmicamente estresados. 8A: Intensidad de fluorescencia mediana (%) de células teñidas; columnas abiertas: usando Fabs no incubados, cada uno ajustado al 100% (referencia); columnas rellenas: usando Fabs después de la incubación a 37 °C durante una semana. 8B-E: análisis de citometría de flujo; diagramas de puntos de 8B: Fab chCD3 no incubado, 8C: Fab chCD3 incubado (estresado), 8D: Fab huCD3\_mut no incubado, 8E: Fab huCD3\_mut incubado (estresado). FSC: dispersión frontal. anti-HIS-PE: anti-poli-histidina-ficoeritrina. El intervalo del eje x es de 0 a 1.000, y el del eje y de 1E-01 a 1E+03.

FIG. 9: Estimulación de células T usando nanomatrices estresadas térmicamente que comprenden anticuerpos o fragmentos de estos. Columnas abiertas: usando nanomatrices no incubadas (referencia); columnas rellenas: usando nanomatrices después de la incubación a 37 °C durante una semana. 9A: frecuencia (%) de células T que expresan ambos marcadores de activación temprana CD25 y CD69 después de 48 horas de estimulación. 9B: tasa de proliferación (%) de células T después de una semana de estimulación. "mAb" indica el anticuerpo parental murino de longitud completa OKT3 (para CD3).

FIG. 10: Marcaje reversible de PBMCs usando Fabs específicos para CD3 y CD28 en combinación con un conjugado anti-poli-histidina-fluorocromo, analizado mediante citometría de flujo. A, B: diagramas de puntos para CD3; D-F: diagramas de puntos para CD28. A, C, E: células marcadas antes del lavado; B, D, F: marcaje eliminado después del lavado de las células. anti-HIS-APC: anti-poli-histidina-aloficocianina. FSC: dispersión frontal. El intervalo del eje x es de 0 a 1.000, y el del eje y de 1E-01 a 1E+03.

## Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo humanizado o un fragmento de este específico para el antígeno CD3, en donde dicho anticuerpo o fragmento de este comprende un dominio variable de cadena pesada

que comprende una región CDR1 de SEQ ID N.º: 1, una región CDR2 de SEQ ID N.º: 2, y una región CDR3 de SEQ ID N.º: 3, y un dominio variable de cadena ligera que comprende una región CDR1 de SEQ ID N.º: 4, una región CDR2 de SEQ ID N.º: 5 y una región CDR3 de SEQ ID N.º: 6. En la presente memoria se describen diferentes realizaciones de dicho anticuerpo humanizado o fragmento de este.

5 Dichas CDRs se pueden incorporar en una secuencia marco que comprende las regiones FR1, FR2, FR3 y FR4. El orden de secuencia puede ser FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. El dominio variable de cadena pesada de dicho anticuerpo humanizado o fragmento de este puede comprender las regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4, en donde dichas regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4 son secuencias de aminoácidos que tienen una identidad de al menos el 70%, más preferiblemente al menos del 80%, lo más preferiblemente al menos del 90% con las regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4 de SEQ ID N.º: 16. El dominio variable de cadena ligera de dicho anticuerpo humanizado o fragmento de este puede comprender las regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4, en donde dichas regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4 son secuencias de aminoácidos que tienen una identidad de al menos el 70%, más preferiblemente al menos del 80%, lo más preferiblemente al menos del 90% con las regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4 de SEQ ID N.º: 17.

15 Las regiones marco de dicho dominio variable de cadena pesada y de dicho dominio variable de cadena ligera pueden comprender sustituciones de aminoácidos (retro-mutaciones) para aumentar la afinidad del anticuerpo o fragmento de este en comparación con la variante humanizada sin retro-mutación. Además, las retro-mutaciones pueden afectar a la cantidad de anticuerpo que se puede fabricar estabilizando o desestabilizando la estructura de la proteína. Preferiblemente, dicho dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 16 y dicho dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 17. Preferiblemente, los anticuerpos o fragmentos de estos se unen específicamente al antígeno CD3 con una afinidad de al menos el 20%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100% o más del 100% por el antígeno CD3 en comparación con el clon de anticuerpo anti-CD3 murino parental OKT3 o fragmentos de este.

25 En un aspecto, la invención proporciona un método *in vitro* para la estimulación policlonal de células T que comprende poner en contacto una población de células T con un fragmento de anticuerpo anti-CD3 humanizado, en donde dicho fragmento de anticuerpo anti-CD3 humanizado comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de la SEQ ID N.º: 16, y una secuencia dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de la SEQ ID N.º: 17, y en donde dicho anticuerpo o fragmento de este está unido a partículas.

30 Dichas partículas pueden ser perlas con una superficie de fase sólida que varía en tamaño entre 500 nm y 10 µm. Alternativamente, dichas partículas pueden ser una nanomatriz, comprendiendo la nanomatriz a) una matriz de cadenas poliméricas móviles, y b) unido a dicha matriz de cadenas poliméricas móviles dicho anticuerpo o fragmento de este, en donde la nanomatriz tiene un tamaño de 1 a 500 nm.

35 Dicho fragmento de anticuerpo anti-CD3 se puede usar en combinación con un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de este. Dicho anticuerpo anti-CD28 o fragmento de este se puede humanizar. Dicho anticuerpo anti-CD28 o fragmento de este puede ser el clon 15E8 humanizado como se describe en la presente memoria. Dicho anticuerpo anti-CD28 o fragmento de este puede comprender un dominio variable de cadena pesada humanizado que comprende una región CDR1 de la SEQ ID N.º: 7, una región CDR2 de la SEQ ID N.º: 8 y una región CDR3 de la SEQ ID N.º: 9, y un dominio variable de cadena ligera humanizado que comprende una región CDR1 de la SEQ ID N.º: 10, una región CDR2 de la SEQ ID N.º: 11 y una región CDR3 de la SEQ ID N.º: 12. Dicho anticuerpo anti-CD28 o fragmento de este puede estar unido a partículas.

45 Las CDRs de dicho anticuerpo anti-CD28 o fragmento de este se pueden incorporar en una secuencia marco que comprende las regiones FR1, FR2, FR3 y FR4. El orden de secuencia puede ser FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4. El dominio variable de cadena pesada humanizado de dicho anticuerpo humanizado o fragmento de este puede comprender las regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4, en donde dichas regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4 son secuencias de aminoácidos que tienen una identidad de al menos el 70%, más preferiblemente al menos del 80%, más preferiblemente al menos del 90% con las regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4 de la SEQ ID N.º: 26 o la SEQ ID N.º: 24.

50 El dominio variable de cadena ligera humanizado de dicho anticuerpo anti-CD28 humanizado o fragmento de este puede comprender las regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4, en donde dichas regiones marco FR1, FR2, FR3 y FR4 son secuencias de aminoácidos que tienen una identidad de al menos el 70%, más preferiblemente al menos del 80%, lo más preferiblemente al menos del 90% con las regiones estructurales FR1, FR2, FR3 y FR4 de la SEQ ID N.º: 25.

55 Las regiones marco de dicho dominio variable de cadena pesada anti-CD28 humanizado y de dicho dominio variable de cadena ligera anti-CD28 humanizado pueden comprender sustituciones de aminoácidos (retro-mutaciones) para aumentar la afinidad del anticuerpo o fragmento de este en comparación con la variante humanizada sin retro-mutación. Además, las retro-mutaciones pueden afectar a la cantidad de anticuerpo que se puede fabricar estabilizando o desestabilizando la estructura de la proteína. Preferiblemente, el dominio variable de cadena ligera comprende las sustituciones de aminoácidos D74A (aspartato-74 por alanina) y S93P (serina-93 por prolina, de acuerdo con la nomenclatura IMGT) como retro-mutaciones. Preferiblemente, dicho dominio variable de cadena pesada humanizado comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 26 o de la SEQ ID N.º: 24, y dicho

dominio variable de cadena ligera humanizado comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 25. Preferiblemente, los anticuerpos o fragmentos de estos se unen específicamente a CD28 con una afinidad de al menos el 20%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100% o más del 100% por el antígeno CD28 en comparación con el anticuerpo anti-CD28 murino parental clon 15E8 o fragmentos de este.

5 Como un componente de una nanomatriz, los fragmentos de anticuerpo específicos para CD3 y CD28, respectivamente, pueden estar unidos a la misma matriz o a una matriz diferente de cadenas poliméricas móviles: pueden estar localizados en la misma matriz (por ejemplo, una matriz que contiene ambos anticuerpos o fragmentos de estos específicos para CD3 y CD28) o en matrices separadas (por ejemplo, una matriz que lleva un anticuerpo o fragmento de este específico para CD3 y otra matriz que lleva un anticuerpo o fragmento de este específico para CD28). Cuando se localizan en la misma matriz, puede variar la relación molar de los anticuerpos o fragmentos de estos específicos para CD3 y CD28, por ejemplo 100:1, 10:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:10, y pueden ser útiles las relaciones 1:100 (anti-CD3:anti-CD28). Dicho método de estimulación policlonal de células T se puede realizar en un sistema de cultivo celular cerrado y estéril (sistema cerrado de procesamiento de muestras celulares).

15 En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición celular obtenida mediante el método de la presente invención para aplicaciones terapéuticas.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona el uso de un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de este para el marcaje reversible de células, en donde dicho anticuerpo anti-CD3 o fragmento de este comprende un dominio variable de cadena pesada humanizado que comprende una región CDR1 de la SEQ ID N.º: 1, una región CDR2 de la SEQ ID N.º: 2 y una región CDR3 de la SEQ ID N.º: 3, y un dominio variable de cadena ligera humanizado que comprende una región CDR1 de la SEQ ID N.º: 4, una región CDR2 de la SEQ ID N.º: 5, y una región CDR3 de la SEQ ID N.º: 6, y en donde dicho anticuerpo o fragmento de este está unido a una etiqueta.

La presente descripción también proporciona el uso de dicho anticuerpo anti-CD3 o fragmento de este en combinación con un anticuerpo anti-CD28 o fragmento de este para el marcaje reversible de células, en donde dicho anticuerpo anti-CD28 o fragmento de este comprende un dominio variable de cadena pesada humanizado que comprende una región CDR1 de la SEQ ID N.º: 7, una región CDR2 de la SEQ ID N.º: 8 y una región CDR3 de la SEQ ID N.º: 9, y un dominio variable de cadena ligera humanizado que comprende una región CDR1 de la SEQ ID N.º: 10, una región CDR2 de la SEQ ID N.º: 11, y una región CDR3 de la SEQ ID N.º: 12, y en donde dicho anticuerpo o fragmento de este está unido a una etiqueta.

30 Dicha etiqueta pueden ser partículas (p. ej., una perla), marcadores (p. ej., un tinte fluorescente, un marcador isotópico o una entidad magnética), moléculas (p. ej., un ácido nucleico, una proteína o un péptido) o superficies (p. ej., una placa de cultivo o una placa de microtitulación). El marcaje se puede disolver permitiendo una unión monovalente de dichos anticuerpos o fragmentos de estos a sus antígenos, lo que da como resultado una disociación del complejo antígeno-anticuerpo debido a las propiedades cinéticas de los anticuerpos o fragmentos de estos.

35 Los anticuerpos o fragmentos de estos específicos para CD3 o CD28, respectivamente, pueden ser proteínas de fusión. Los ejemplos de fusiones comprenden secuencias de poli-histidina, secuencias de biotilación, péptidos que imitan a la biotina, proteínas fluorescentes, secuencias conectoras como poli-glicina-serina y receptores de antígenos quiméricos.

40 Los anticuerpos o fragmentos de estos específicos para CD3 o CD28, respectivamente, pueden contener sustituciones, inserciones y supresiones de aminoácidos. Los anticuerpos o fragmentos de estos específicos para CD3 o CD28, respectivamente, se pueden modificar químicamente. Los ejemplos comprenden la conjugación con colorantes fluorescentes, con proteínas y con partículas magnéticas, y modificaciones químicas conocidas en la técnica, como la biotilación.

En un aspecto, la presente descripción proporciona polinucleótidos aislados que codifican anticuerpos humanizados o fragmentos de estos específicos para el antígeno CD3 como se describe en la presente memoria.

45 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un sistema de expresión que comprende los polinucleótidos que codifican un anticuerpo o fragmento de este específico para el antígeno CD3 como se describe en la presente memoria, y una célula huésped que expresa dicho anticuerpo o fragmento de este.

En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona una célula huésped que comprende los polinucleótidos que codifican los anticuerpos o fragmentos de estos como se describe en la presente memoria.

50 Definiciones

A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entienden comúnmente los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención.

55 El término "anticuerpo", como se usa en la presente memoria, se usa en el sentido más amplio para abarcar las diversas formas de estructuras de anticuerpos, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales y policlonales (incluidos los anticuerpos de longitud completa), anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos

biespecíficos), fragmentos de anticuerpos, inmunoadhesinas y quimeras de anticuerpo-inmunoadhesina, que reconocen específicamente (es decir, se unen) un antígeno diana. El anticuerpo de acuerdo con la invención es preferiblemente un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico u otro anticuerpo modificado genéticamente siempre que se conserven las propiedades características de acuerdo con la invención. Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, preferiblemente el dominio variable de este, o al menos el sitio de unión al antígeno de este. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab (fragmento de unión a antígeno), scFv (fragmento variable de cadena única), anticuerpos de dominio único, diacuerpos, dsFv, Fab', diacuerpos, moléculas de anticuerpos de cadena única y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos scFv se describen, p. ej., en Ahmed *y cols.* (2012) Clin Dev Immunol. 2012, 980250. El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que la estructura y/o las CDRs se han modificado para comprender la CDR de una inmunoglobulina de diferentes especies en comparación con la de la inmunoglobulina parental. En una realización preferida, se injerta una CDR de roedor (p. ej., ratón) en la región marco de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado" (se proporciona un ejemplo en Riechmann *y cols.* (1988) Nature 332, 323-327). Un anticuerpo humanizado se une al mismo antígeno o uno similar al del anticuerpo donante que proporciona las CDRs. El marco aceptor de una inmunoglobulina humanizada puede tener un número limitado de sustituciones por aminoácidos tomados del marco donante. Las moléculas humanizadas pueden tener sustituciones de aminoácidos conservativas adicionales que sustancialmente no tienen efecto sobre la unión al antígeno u otras funciones de la inmunoglobulina. Las sustituciones conservativas generalmente mantienen (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una lámina o conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, y/o (c) la mayor parte de la cadena lateral.

Como se usa en la presente memoria, los términos "progenitor/a" y "parental" con respecto a una secuencia de anticuerpo se refieren a la secuencia de anticuerpo que se va a humanizar. Por lo tanto, un anticuerpo parental es el clon de anticuerpo no humano que se va a humanizar, normalmente de origen roedor. El clon de anticuerpo murino OKT3 específico para el antígeno CD3 de la presente invención es un ejemplo de un anticuerpo parental. Como se usa en la presente memoria, el término "antígeno" pretende incluir sustancias que provocan la producción de uno o más anticuerpos. Cada anticuerpo se une a un antígeno específico por medio de una interacción similar al ajuste entre una cerradura y una llave. La sustancia puede provenir del ambiente externo o formarse dentro del cuerpo. El término "antígeno" comprende, pero no se limita a, proteínas, péptidos, polipéptidos, oligopéptidos, lípidos, carbohidratos y combinaciones de estos, por ejemplo, una proteína glicosilada o un glicolípido. Un antígeno puede estar en la superficie celular o dentro de la célula. Preferiblemente, un antígeno está en la superficie celular de una célula. Preferiblemente, el antígeno CD3 es un antígeno CD3 de mamífero. Lo más preferido, el antígeno CD3 es un antígeno CD3 humano. Preferiblemente, el antígeno CD28 es un antígeno CD28 de mamífero. Lo más preferido, el antígeno CD28 es un antígeno CD28 humano.

Los términos "se une específicamente a" o "específico para" con respecto a un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo o fragmento de este se refieren a un dominio de unión a antígeno que reconoce y se une a un antígeno específico, es decir, CD3 en el caso de un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de este, pero no reconoce ni se une sustancialmente a otros antígenos en una muestra. Un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno de una especie también se puede unir a ese antígeno de otra especie. Esta reactividad entre especies no es contraria a la definición de ese dominio de unión a antígeno como específico. Un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno también se puede unir a diferentes formas alélicas del antígeno (variantes alélicas, variantes de corte y empalme, isoformas, etc.). Esta reactividad cruzada no es contraria a la definición de ese dominio de unión a antígeno como específico.

El término "dominio" se refiere a una estructura de proteína que retiene su estructura terciaria independientemente del resto de la proteína. En algunos casos, los dominios tienen propiedades funcionales discretas y se pueden añadir, eliminar o transferir a otra proteína sin pérdida de función.

El término "afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (p. ej., el brazo de unión de un anticuerpo) y su pareja de unión (p. ej., un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en la presente memoria, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de una pareja de unión (p. ej., proteína de unión a antígeno y su antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y se puede representar generalmente por la constante de equilibrio de disociación ( $K_D$ ). La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica (p. ej., medición con Biacore™).

El "dominio variable" o "región variable" (dominio variable de una cadena ligera (VL), dominio variable de una cadena pesada (VH)) como se usa en la presente memoria indica cada par de dominios de cadena ligera y pesada que están implicados directamente en unión del anticuerpo con el antígeno. El término "dominio variable" se refiere tanto a dominios variables de cadenas ligeras de inmunoglobulina de tipo kappa como a dominios variables de cadenas ligeras de inmunoglobulina de tipo lambda.

El "dominio constante" o "región constante" (dominio constante de una cadena ligera (CL), dominio constante de una cadena pesada (CH)) tal como se usa en la presente memoria indica los dominios que comprenden el dominio CL (en el caso de la cadena ligera) y los dominios CH1, Bisagra, CH2, CH3 y/o CH4 (en el caso de la cadena pesada) de un

anticuerpo. La región constante de la cadena pesada difiere en anticuerpos de diferentes isotipos. En anticuerpos recombinantes o fragmentos de estos, se pueden combinar los dominios CH1, Bisagra, CH2, CH3 y CH4 y fragmentos de estos de diferentes isotipos. Los dominios CH1, Bisagra, CH2, CH3 y CH4 también se pueden elegir de diferentes especies. En un fragmento Fab humanizado, el dominio constante es preferiblemente un dominio constante humano, más preferiblemente CL humano e CH1 IgG1 humano.

Los dominios variables de cadena ligera y pesada tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDRs). Los dominios variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo comprenden, desde el extremo N hasta el extremo C terminal, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las CDRs de cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional por las regiones marco y forman junto con las CDRs de la otra cadena el sitio de unión al antígeno. La asignación de las regiones CDR y FR a la secuencia del anticuerpo como se usa en la presente memoria se determina de acuerdo con la definición de IMGT (<http://www.imgt.org>), también denominada FR-IMGT y CDR-IMGT. Hay otras definiciones de regiones FR y CDR de acuerdo con, por ejemplo, Kabat y Chothia, que pueden dar lugar a asignaciones ligeramente diferentes de posiciones de aminoácidos en las uniones de las regiones FR y CDR y, por lo tanto, en longitudes de CDRs ligeramente diferentes. El anticuerpo de acuerdo con la invención puede comprender una parte Fc de origen humano que se selecciona de las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Preferiblemente, la parte Fc de origen humano es de la subclase IgG1 o IgG4. La parte Fc puede contener sustituciones, inserciones y supresiones de aminoácidos. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos implicados en la unión del receptor Fc gamma se pueden sustituir con otros residuos de aminoácidos para aumentar, minimizar o suprimir esta interacción.

El anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser un fragmento de este. El fragmento de anticuerpo puede contener sustituciones, inserciones y supresiones de aminoácidos. Por ejemplo, se puede insertar o añadir una secuencia de poli-histidina a cualquier cadena de fragmento Fab que permita la purificación usando cromatografía de afinidad y/o detección inmunológica usando anticuerpos anti-histidina. El anticuerpo de acuerdo con la invención se caracteriza preferiblemente porque los dominios constantes son de origen humano. Dichos dominios constantes son bien conocidos en la técnica y se describen, p. ej., por Kabat.

Como se usa en la presente memoria, el término "antígeno CD3" se refiere a la proteína CD3, también conocida como glicoproteína de superficie de células T CD3, y el término "antígeno CD28" se refiere a la proteína CD28, también conocida como glicoproteína de superficie específica de células T CD28.

Como se usa en la presente memoria, el término "nomenclatura IMGT" describe el esquema de numeración de las secuencias de anticuerpos de acuerdo con IMGT (ImMunoGeneTics Information system®, [www.imgt.org](http://www.imgt.org); Giudicelli y cols. (2005) *Nucleic Acids Res.* 33, D256 - D261). Las FIG. 2A y 2B muestran a modo de ejemplo la nomenclatura IMGT para los dominios variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo anti-CD28.

Como se usa en la presente memoria, el término "IGKV" se usa como abreviatura para los genes de la región variable kappa de inmunoglobulina. El término "IGHV" se usa como abreviatura para los genes de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina.

Como se usa en la presente memoria, el término "injerto de CDR" se refiere a un método para tomar regiones CDR de un anticuerpo o fragmento de este y transferirlas al marco de un segundo anticuerpo o fragmento de este en donde el marco receptor (marco aceptor) no es idéntico al marco del primer anticuerpo (marco donante).

Como se usa en la presente memoria, los términos "marco" y "regiones marco" se refieren a la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo o fragmento de este que comprende los dominios FR1, FR2, FR3 y FR4 de las regiones variables de cadena pesada y ligera, es decir, los dominios variables sin las regiones CDR. Por consiguiente, los términos "marco de línea germinal" y "regiones marco de línea germinal" se refieren a los dominios variables de anticuerpos sin las regiones CDR codificadas por genes de anticuerpos de la línea germinal humana.

Como se usa en la presente memoria, se usa el término "identidad" (de proteínas y polipéptidos) con respecto a las secuencias de aminoácidos para una comparación de cadenas de proteínas. Los cálculos de "identidad de secuencia" entre dos secuencias se realizan como sigue. Las secuencias se alinean con fines de comparación óptimos (p. ej., se pueden introducir huecos en una o ambas secuencias de aminoácidos primera y segunda para un alineamiento óptimo y las secuencias no homólogas se pueden descartar con fines de comparación). El alineamiento óptimo se determina como la mejor puntuación usando el programa "ssearch36" en el paquete de software FASTA36 (<http://faculty.virginia.edu/wrpearson/fasta/>) con una matriz de puntuación Blossum 50 con una penalización de hueco abierto de -10, y una penalización de extensión de hueco de -2. A continuación, se comparan los residuos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido en la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias.

Como se usa en la presente memoria, el término "retro-mutación" se refiere a una sustitución de aminoácidos en la región marco de una secuencia de anticuerpo humanizado. Esto generalmente se hace para aumentar la afinidad del



anticuerpo hacia su antígeno después de la humanización. Los residuos candidatos para la retro-mutación comprenden, por ejemplo, posiciones con diferentes aminoácidos en el anticuerpo humanizado después del injerto de CDR y el anticuerpo original no humanizado, y posiciones con diferentes aminoácidos en el anticuerpo humanizado después del injerto de CDR y una secuencia consenso de anticuerpo. Por lo general, los residuos candidatos se encuentran en sitios de las regiones marco que son importantes para las propiedades de unión del anticuerpo y/o que determinan las conformaciones de la cadena principal de los bucles de unión al antígeno.

A diferencia de las CDRs, se pueden realizar cambios más sustanciales en las regiones marco estructurales (FRs) sin afectar negativamente a las propiedades de unión de un anticuerpo. Los cambios en las FRs incluyen, pero no se limitan a, la humanización de un marco no derivado de humanos o la ingeniería de ciertos residuos marco que son importantes para el contacto con el antígeno o para estabilizar el sitio de unión, p. ej., cambiar la clase o subclase de la región constante, cambiar residuos de aminoácidos específicos que podrían alterar una función efectora como la unión al receptor Fc (Lund y cols. (1991) J. Immunol. 147, 2657-2662; Morgan y cols. (1995) Immunology 86, 319-324), o cambiar la especie de la que se deriva la región constante.

Los anticuerpos de la invención son típicamente polipéptidos expresados de forma recombinante. Los anticuerpos pueden ser polipéptidos quiméricos, en donde el término "polipéptido quimérico" se refiere a un polipéptido artificial (que no se produce de forma natural) que se crea por yuxtaposición de dos o más fragmentos peptídicos que de otro modo no aparecerían de forma contigua. En el caso de una molécula Fab, el término "Fab quimérico" se refiere a la combinación de regiones variables y constantes de diferente origen, por ejemplo, la combinación de regiones variables de origen murino y regiones constantes de origen humano. La variante de Fab "Fab chCD3\_mut" es un ejemplo de un Fab quimérico.

Como se usa en la presente memoria, los términos "selección positiva de células" y "enriquecimiento de células" como se usa en la presente memoria tienen un significado intercambiable y se refieren al aislamiento de una subpoblación de células de una población de células que incluye tejido. Los métodos adecuados para la selección positiva de células comprenden centrifugación, filtración, clasificación de células magnéticas y clasificación de células fluorescentes.

Como se usa en la presente memoria, el término "depleción de células" como se usa en la presente memoria se refiere a un proceso de selección negativa que separa las células deseadas de las células no deseadas. Las muestras de células como se usan en la presente memoria pueden comprender células de origen sanguíneo tales como PBMCs, de origen de cultivo celular o de origen tisular como cerebro o hueso que se pueden disociar antes de su uso. Los métodos adecuados para la depleción de células comprenden centrifugación, filtración, clasificación de células magnéticas y la clasificación de células fluorescentes.

Los términos células "que expresan CD3" y "CD3-positivas" (CD3+) como se usan en la presente memoria tienen un significado intercambiable y describen células que expresan el antígeno CD3. Por consiguiente, los términos células "que no expresan CD3" y "CD3-negativas" (CD3-) como se usan en la presente memoria tienen un significado intercambiable y describen células que no expresan el antígeno CD3 de manera detectable.

Las secuencias de aminoácidos de una región CDR1, una región CDR2 y una región CDR3 de un dominio variable de cadena pesada humanizado, y las secuencias de aminoácidos de una región CDR1, una región CDR2 y una CDR3 de un dominio variable de cadena ligera humanizado se dan en las SEQ ID N.º: 1, SEQ ID N.º: 2, SEQ ID N.º: 3, SEQ ID N.º: 4, SEQ ID N.º: 5 y SEQ ID N.º: 6, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable de cadena ligera se proporcionan en las SEQ ID N.º: 13 y SEQ ID N.º: 14, respectivamente.

Los anticuerpos o fragmentos de estos de acuerdo con la invención se producen preferiblemente por medios recombinantes. Dichos métodos son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células procariotas y eucariotas, preferiblemente en células de no mamífero, con el aislamiento posterior del polipéptido del anticuerpo (anticuerpo completo o fragmento de este). La purificación del polipéptido de anticuerpo se puede realizar hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de proteínas, los ácidos nucleicos que codifican cadenas ligeras y pesadas o fragmentos de estos se pueden insertar en vectores de expresión o vectores de transducción viral mediante métodos estándar. La expresión se realiza en células huésped procariotas o eucariotas apropiadas, como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, células de levadura, *Bacillus* o *E. coli*, y el anticuerpo se recupera de las células (del sobrenadante o después de la lisis total o parcial de las células). La producción recombinante de anticuerpos es bien conocida en el estado de la técnica.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico.

El término "aislado" significa alterado o extraído del estado natural. Por ejemplo, una población aislada de células significa un enriquecimiento de dichas células y la separación de otras células que normalmente están asociadas en su estado natural con dichas células aisladas. Una población aislada de células significa una población de células sustancialmente purificadas que son una población homogénea de células.

Los términos "estimulación de células T" y "activación de células T" como se usan en la presente memoria tienen un significado intercambiable y se refieren a una respuesta celular que se caracteriza por la proliferación de células T y la expresión de marcadores tempranos de activación de células T, especialmente CD25 y CD69.

El término "variante con CDR mutada", como se usa en la presente memoria, se refiere a una variante de un anticuerpo o fragmentos de este que comprende al menos una sustitución, inserción o supresión de un aminoácido dentro de una de las seis regiones de CDRs. La sustitución del aminoácido cisteína por serina en la posición 114 (nomenclatura IMGT) en la CDR3 del dominio variable de cadena pesada del clon OKT3 anti-CD3 es un ejemplo de una variante con CDR mutada. Por consiguiente, el término "variante con CDR no mutada", como se usa en la presente memoria, se refiere a la variante de un anticuerpo o fragmentos de este que no comprende sustitución, inserción o supresión de aminoácidos dentro de una de las seis regiones CDR (es decir, se usan las regiones CDR originales).

El término "etiqueta", como se usa en la presente memoria, se refiere al acoplamiento de la molécula de unión al antígeno, p. ej., un anticuerpo o fragmento de este, a otras moléculas, p. ej., partículas, fluoróforos, haptenos como la biotina o superficies más grandes como placas de cultivo y placas de microtitulación. En algunos casos, el acoplamiento da como resultado la inmovilización directa de la molécula de unión al antígeno, p. ej., si la molécula de unión al antígeno se acopla a una superficie más grande de una placa de cultivo. En otros casos, este acoplamiento da como resultado una inmovilización indirecta, p. ej., se inmoviliza una molécula de unión al antígeno acoplada directa o indirectamente (a través de, p. ej., biotina) a una perla magnética si dicha perla se retiene en un campo magnético. En otros casos, el acoplamiento de la molécula de unión al antígeno con otras moléculas no da como resultado una inmovilización directa o indirecta, sino que permite el enriquecimiento, la separación, el aislamiento y la detección de células de acuerdo con la presente invención, p. ej., si la molécula de unión al antígeno se acopla a un fluoróforo que luego permite la discriminación de células marcadas más fuertes, células marcadas más débiles y células no marcadas, p. ej., a través de métodos de citometría de flujo, como FACSoring, o microscopía de fluorescencia.

El término "partícula", como se usa en la presente memoria, se refiere a una fase sólida como partículas coloidales, microesferas, nanopartículas o perlas. Los métodos para generar dichas partículas son bien conocidos en el campo de la técnica. Las partículas pueden ser partículas magnéticas. Las partículas pueden estar en una solución o suspensión o pueden estar en un estado liofilizado antes de su uso en la presente invención. A continuación, la partícula liofilizada se reconstituye en un tampón conveniente antes de ponerse en contacto con la muestra que se va a procesar con respecto a la presente invención.

Los términos "matriz de cadenas poliméricas móviles" y "matriz móvil", tal como se usan en la presente memoria, tienen un significado intercambiable. Estos polímeros consisten en cadenas móviles (móviles), preferiblemente altamente móviles (móviles), por lo que la matriz se caracteriza por la ausencia de una superficie sólida como punto de unión de los agentes estimuladores como anticuerpos o fragmentos de estos, y lo que contrasta fuertemente con las perlas o microesferas actualmente usadas que regularmente tienen una superficie rígida, inmóvil e inflexible. Como resultado, la nanomatriz que comprende una matriz de cadenas poliméricas móviles es flexible y ajustable a la forma de la superficie de las células. Además, como resultado, la nanomatriz es una nanomatriz en donde la mayoría (es decir, más del 50%), preferiblemente más del 80%, y más preferiblemente más del 90%, y lo más preferiblemente más del 99% del volumen total de la nanomatriz en solución acuosa consiste en cadenas poliméricas móviles.

La matriz consiste en un material inerte polimérico, preferiblemente biodegradable o biocompatible, que no es tóxico para las células. Preferiblemente, la matriz está compuesta por cadenas poliméricas hidrófilas, que obtienen la máxima movilidad en solución acuosa debido a la hidratación de las cadenas. La matriz móvil es el único o al menos el principal componente de la nanomatriz independientemente de los agentes que se le adjuntan.

La matriz móvil puede ser de colágeno, proteínas purificadas, péptidos purificados, polisacáridos, glicosaminoglicanos o composiciones de matriz extracelular. Un polisacárido puede incluir, por ejemplo, éteres de celulosa, almidón, goma arábiga, agarosa, sefariosa, dextrano, quitosano, ácido hialurónico, pectinas, xantano, goma guar, almidón o alginato. Otros polímeros pueden incluir poliésteres, poliéteres, poliácridatos, poliácridamidas, poliaminas, polietileniminas, polímeros de policuaternio, polifosfacenos, polivinilalcoholes, polivinilacetatos, polivinilpirrolidonas, copolímeros de bloque o poliuretanos. Preferiblemente, la matriz móvil es un polímero de dextrano.

Se puede unir o acoplar un agente a la matriz móvil mediante una variedad de métodos conocidos y disponibles en la técnica. La unión puede ser covalente o no covalente, electrostática o hidrófoba y se puede lograr mediante una variedad de medios de unión, que incluyen, por ejemplo, medios químicos, mecánicos, enzimáticos u otros mediante los cuales un agente es capaz de estimular a las células. Por ejemplo, el anticuerpo frente a una estructura de la superficie celular se puede unir primero a la matriz, o se puede unir avidina o estreptavidina a la matriz para unirse a un agente biotinilado. El anticuerpo frente a la estructura de la superficie celular se puede unir a la matriz directa o indirectamente, p. ej., a través de un anticuerpo anti-isotipo. Otro ejemplo incluye el uso de proteína A o proteína G, u otras moléculas de unión a anticuerpos no específicas, unidas a matrices para unir un anticuerpo. Otro ejemplo de un enlace indirecto comprende una proteína de fusión de un anticuerpo o fragmento que comprende una etiqueta de polihistidina en combinación con una partícula que lleva un anticuerpo anti-histidina o un fragmento de este o un grupo quelato metálico capaz de unirse a la etiqueta de polihistidina. Alternativamente, el agente se puede unir a la matriz por medios químicos, como el entrecruzamiento con la matriz.

El término "magnético" en "partícula magnética" como se usa en la presente memoria se refiere a todos los subtipos de partículas magnéticas que se podrían preparar con métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, especialmente partículas ferromagnéticas, partículas superparamagnéticas y partículas paramagnéticas. Los materiales "ferromagnéticos" son fuertemente susceptibles a los campos magnéticos y son capaces de retener las

propiedades magnéticas cuando se elimina el campo. Los materiales "paramagnéticos" tienen solo una susceptibilidad magnética débil y cuando se elimina el campo pierden rápidamente su magnetismo débil. Los materiales "superparamagnéticos" son altamente susceptibles magnéticamente, es decir, se vuelven fuertemente magnéticos cuando se colocan en un campo magnético, pero, al igual que los materiales paramagnéticos, pierden rápidamente su magnetismo.

El término "marcador", como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula detectable unida directa o indirectamente a una diana, y que se puede usar, por ejemplo, para detectar, rastrear, separar, aislar, deplecionar o cuantificar la diana. Las dianas pueden ser células individuales o poblaciones celulares, estructuras de la superficie celular, carbohidratos, proteínas y péptidos. Los ejemplos de marcadores comprenden marcadores fluorescentes, magnéticos e isotópicos. En algunos casos, el marcador puede ser parte de la diana misma.

El término "marcaje reversible de células", como se usa en la presente memoria, se refiere a un método en el que las células se marcan en primer lugar usando una etiqueta como un marcador o una partícula. En algunos casos, se puede usar una combinación de etiquetas. A continuación, las células se pueden procesar, por ejemplo, cultivar, activar, expandir, clasificar, aislar o analizar. Posteriormente, la etiqueta se elimina de las células. En el caso de anticuerpos y fragmentos de estos, la etiqueta se puede eliminar o disolver permitiendo una unión monovalente de dichos anticuerpos o fragmentos de estos a su antígeno en esa etapa, lo que da como resultado una pérdida de unión multivalente y una disociación del antígeno y el anticuerpo etiquetado debido a las propiedades cinéticas de los anticuerpos o fragmentos de estos.

Los términos "sistema cerrado de procesamiento de muestras celulares" y "sistema (de cultivo celular) cerrado y estéril" se pueden usar indistintamente. El término "sistema cerrado de procesamiento de muestras celulares" como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier sistema cerrado que reduce el riesgo de contaminación mientras se realizan procesos de cultivo como la introducción de nuevo material, p. ej., transformación y transducción, y se realizan etapas de cultivo celular como proliferación, diferenciación, activación y/o separación de células. Este sistema permite operar bajo condiciones GMP o similar a GMP ("estériles") que dan como resultado composiciones celulares que son clínicamente aplicables. En la presente memoria se usa como un sistema cerrado de procesamiento de muestras celulares el CliniMACS Prodigy® (Miltenyi Biotec GmbH, Alemania). Este sistema se describe en el documento WO2009/072003. No se pretende restringir el uso del método de la presente invención al CliniMACS® Prodigy.

#### Realizaciones

El fragmento de anticuerpo de la invención se puede presentar en diversas realizaciones como se describe en la presente memoria y se describe en detalle en las secciones anteriores. Común a todas estas realizaciones del fragmento de anticuerpo humanizado específico para el antígeno CD3 es la existencia de la secuencia SEQ ID N.º: 16 y la SEQ ID N.º: 17, en los dominios variables de cadena ligera y pesada humanizados, respectivamente.

En una presente descripción, un anticuerpo o fragmento de este tiene secuencias de CDRs (p. ej., una CDR IMGT, Chothia o Kabat) que difieren de las del clon OKT3 del anticuerpo parental. Las secuencias de CDRs que difieren de las del clon de anticuerpo parental murino incluyen cambios de aminoácidos, como sustituciones de 1 o 2 aminoácidos si una CDR tiene una longitud de 3-4 aminoácidos, o sustituciones de 1, 2, 3 o 4 aminoácidos si una CDR tiene una longitud de 5-7 aminoácidos, o sustituciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de aminoácidos en la secuencia de una CDR si una CDR tiene una longitud de 10 aminoácidos o más. El aminoácido que se sustituye puede tener una carga, hidrofobicidad o características estereoquímicas similares. En algunas descripciones, la(s) sustitución(es) de aminoácidos es una sustitución conservativa. En otras descripciones, la(s) sustitución(es) de aminoácidos es una sustitución no conservativa. Tales sustituciones están dentro de la experiencia habitual de un técnico. Se pueden examinar el anticuerpo o fragmentos de anticuerpo de este que contienen las CDRs sustituidas para identificar anticuerpos que se unen al antígeno CD3.

En una descripción, un anticuerpo humanizado o un fragmento de este como se describe en la presente memoria se puede usar para el enriquecimiento (selección positiva) de células que expresan CD3 (CD3+) a partir de una muestra que comprende células que expresan CD3. En una realización preferida, la muestra comprende células que expresan CD3 y células que no expresan CD3 (otras células). Los métodos adecuados para el enriquecimiento son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, citometría de flujo como FACS® o separación de células magnéticas como MACS®. Las células que expresan CD3 enriquecidas se pueden usar en varios análisis adicionales como la expresión de citoquinas o la señalización de receptores o se pueden usar en una composición farmacéutica que comprende estas células que expresan CD3. Las células que expresan CD3 enriquecidas se pueden expandir *in vitro* a una cantidad terapéuticamente eficaz antes de la aplicación a un paciente que lo necesite.

En una descripción, un anticuerpo humanizado o un fragmento de este como se describe en la presente memoria se puede usar para la depleción de las células que expresan CD3 de una muestra que comprende células que expresan CD3. En una realización preferida, la muestra comprende células que expresan CD3 y células que no expresan CD3 (otras células). Los métodos adecuados para la depleción son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, citometría de flujo como FACS® o separación de células magnéticas como MACS®.

A modo de ejemplo, se describe aquí el principio de separación MACS® (Miltenyi Biotec GmbH, Alemania): Los anticuerpos o fragmentos de estos específicos para el antígeno CD3 se pueden usar para el marcaje magnético directo o indirecto de subgrupos de linfocitos. El antígeno CD3 se expresa en células T y timocitos. En primer lugar, las células que expresan CD3 se marcan magnéticamente con CD3 MicroBeads, es decir, anticuerpos frente a CD3 o fragmentos de estos conjugados con partículas magnéticas. Luego, la suspensión celular se carga en una columna MACS® que se coloca en el campo magnético de un separador MACS®. Las células que expresan CD3 marcadas magnéticamente se retienen en la columna. Las células sin marcar pasan a través, esta fracción de células está deplecionada de células CD3+. Después de retirar la columna del campo magnético, las células CD3+ retenidas magnéticamente se pueden eluir como la fracción celular seleccionada positivamente.

Algunos ejemplos de aplicaciones en el contexto del enriquecimiento (selección positiva) y la depleción de células usando los anticuerpos o fragmentos de estos como se describe en la presente memoria podrían ser: (a) Depleción de células CD3+ humanas de sangre periférica o de tejido linfóide para alotrasplante de células madre, o para la preparación de injertos deplecionados de células T, o para el posterior enriquecimiento de células que no expresan CD3 (p. ej., células NK sin células NKT); (b) selección positiva de células CD3+ humanas de sangre periférica, tejido linfóide u homogeneizado de tejido (como tejido tumoral) con fines analíticos, para el enriquecimiento posterior o para la terapia de transferencia celular adoptiva (p. ej., infusión de leucocitos de donante o células T modificadas genéticamente, transferencias alogénicas o autólogas respectivamente).

Para la selección positiva de subgrupos de células T CD3+, el anticuerpo o fragmento de este específico para CD3 se puede combinar, por ejemplo, con anticuerpos o fragmentos de estos específicos para antígenos como CD4, CD8, CD25, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO, CD56, CD62L, CD95, CCR7, CD127, CD137, CD279, Tim-3 y/o LAG-3. En una realización, el anticuerpo o fragmento de este específico para CD3 se puede combinar, por ejemplo, con la proteína Anexina V y/o con anticuerpos o fragmentos de estos específicos para el antígeno de superficie CD19, y/o CD14, y/o CD56, con el fin de garantizar que sólo se hayan aislado células T CD3+ vivas.

En una descripción, un anticuerpo humanizado o fragmento de este específico para CD3 como se describe en la presente memoria se puede usar para la selección positiva de células T reguladoras vírgenes para aplicaciones clínicas. Usando sangre periférica o tejido linfóide, el anticuerpo CD3 humanizado o fragmento de este se combina con anticuerpos o fragmentos de estos específicos para CD4, CD25, CD45RA y CD127 con el fin de aislar células T reguladoras vírgenes (caracterizadas por CD3+, CD4+, CD25 hi, CD45RA+, CD127dim).

Para una depleción combinada de células T CD3+ y otras células, el anticuerpo o fragmento de este específico para CD3 se puede combinar, por ejemplo, con anticuerpos o fragmentos de estos específicos para antígenos como CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD14, CD15, CD16, CD19, CD34, CD38, CD43, CD44, CD56, CD133 y/o CD271.

En una descripción, también las células distintas de las células T, pero que también tienen un receptor de célula T o un receptor de antígeno, se pueden estimular mediante un anticuerpo o fragmento de este específico para CD3 solo o en combinación con un anticuerpo o fragmento de este específico para CD28. En una realización preferida, estas células expresan receptores de antígenos quiméricos (CARs) o receptores de células T exógenos (TCRs). Los ejemplos de células que expresan CARs y/o TCRs comprenden células T, células dendríticas, células madre mesenquimales, células NKT y células NK. Los ejemplos de moléculas diana de CARs y/o TCRs comprenden los marcadores de superficie celular CD19, CD20 y CD22.

En una realización de la invención, las células T son estimuladas por un fragmento de anticuerpo anti-CD3 como se describe en la presente memoria solo o en combinación con un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de este como se describe en la presente memoria, por ejemplo, para aumentar la eficacia de transducción (por ejemplo, transducción lentiviral). Los fragmentos de anticuerpos específicos para CD3 y específicos para CD28, respectivamente, pueden ambos estar unidos a partículas.

En una descripción, se usa un sistema cerrado de procesamiento de muestras celulares como el CliniMACS Prodigy® (Miltenyi Biotec) para deplecionar las células T CD3+. Por ejemplo, se conecta una leucoféresis de 8E+09 células totales a través de soldadura estéril a un conjunto de tubos instalado en el CliniMACS Prodigy®. Las células se lavan y se marcan con anticuerpos o fragmentos de estos específicos para CD3 acoplados a partículas magnéticas. Las células T marcadas se aíslan específica y automáticamente del resto de las células mediante enriquecimiento magnético usando una columna (que forma parte del conjunto de tubos) colocada en un campo magnético controlable. Las células T aisladas se pueden enriquecer (fracción positiva) o descartar (fracción negativa) y usar posteriormente para aplicaciones clínicas.

En una descripción, un anticuerpo humanizado o fragmento de este específico para el antígeno CD3 como se describe en la presente memoria se puede acoplar a una etiqueta. Dicha etiqueta puede ser una partícula magnética o un fluoróforo. En una descripción, un anticuerpo humanizado o fragmento de este específico para CD3 como se describe en la presente memoria se puede usar para el marcaje fluorescente de células que expresan CD3. Esto se puede lograr *in vitro* (p. ej., en cultivo celular) o *in vivo* (p. ej., en el cuerpo). El marcador fluorescente se puede unir al anticuerpo o fragmento de este directamente (p. ej., mediante conjugación química) o indirectamente (p. ej., mediante biotinylation del anticuerpo humanizado o fragmento de este y unión del anticuerpo biotinilado a un conjugado fluorocromo de estreptavidina). En algunas variantes, dicho anticuerpo humanizado o fragmento de este específico

para CD3 se puede usar en combinación con un anticuerpo humanizado o fragmento de este específico para CD28 como se describe en la presente memoria.

En una descripción, un anticuerpo humanizado o fragmento de este, como se describe en la presente memoria, se puede usar para la identificación y la monitorización de las células T CD3+ *in vitro* o *in vivo*. En algunas variantes, dicho anticuerpo humanizado o fragmento de este específico para CD3 se puede usar en combinación con un anticuerpo humanizado o fragmento de este específico para CD28 como se describe en la presente memoria.

En una descripción, un anticuerpo humanizado o un fragmento de este como se describe en la presente memoria se puede usar para el marcaje reversible de células. Dicho anticuerpo o fragmentos de este se pueden conjugar con un marcador, por ejemplo, un colorante fluorescente o una partícula. Las células se etiquetan mediante la unión multivalente de dicho anticuerpo o fragmentos de este que se acopla a la etiqueta. La etiqueta se elimina de las células cambiando de unión multivalente a monovalente de dicho anticuerpo o fragmentos de este. La disociación de dicho anticuerpo o fragmentos de este unidos al antígeno depende de propiedades cinéticas adecuadas como  $K_D$  (constante de equilibrio de disociación) y/o  $K_{off}$  ("constante de tasa de inactividad (off)"), lo que permite que los anticuerpos o fragmentos unidos monovalentemente se liberen de las células. Los métodos para cambiar de unión multivalente a monovalente de dicho anticuerpo o fragmentos de este comprenden la eliminación de un anticuerpo o fragmento de este de una etiqueta como una partícula o un marcador, por ejemplo, mediante escisión enzimática usando un sitio o estructura de escisión específica, o mediante desplazamiento competitivo de la etiqueta del anticuerpo o fragmento de este mediante la adición de un exceso de una sustancia capaz de desplazar la etiqueta o el anticuerpo o fragmento de este (p. ej., biotina que desplaza un anticuerpo anti-biotina conjugado con fluorocromo unido a un anticuerpo biotinilado o fragmento de este dirigido frente a un antígeno diana como CD3, en donde el anticuerpo o fragmento biotinilado está entrecruzado con el anticuerpo anti-biotina conjugado con fluorocromo).

Las composiciones celulares enriquecidas y/o separadas mediante el uso de anticuerpos o fragmentos de estos como se describe en la presente memoria se pueden administrar solas o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes como citoquinas. Brevemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender una composición celular enriquecida y/o separada mediante el uso de un anticuerpo o fragmento de este como se describe en la presente memoria, en combinación con uno o más transportadores, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Tales composiciones pueden comprender tampones como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato (PBS) y similares; carbohidratos como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos como glicina; antioxidantes; agentes quelantes como EDTA o glutatión; adyuvantes (p. ej., hidróxido de aluminio); y conservantes.

Preferiblemente, las composiciones de la presente descripción se formulan para administración intravenosa. La administración de composiciones celulares al sujeto se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente conocida en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se pueden administrar de una manera apropiada para la enfermedad a tratar. Las dosis apropiadas se pueden determinar mediante ensayos clínicos. Pero la cantidad y frecuencia de administración también estarán determinadas e influenciadas por tales factores como la condición del paciente y el tipo y gravedad de la enfermedad del paciente.

## Ejemplos

Ejemplo 1: Análisis de agregación de anticuerpos murinos parentales OKT3 y 15E8 *in silico*.

Se analizaron las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada y ligera del clon OKT3 del anticuerpo anti-CD3 y del clon 15E8 del anticuerpo anti-CD28 usando algoritmos conocidos en la técnica para predecir regiones de secuencia que son propensas a la agregación. Se sabe que dichas regiones pueden interferir con la expresión recombinante de una proteína, lo que da como resultado niveles bajos de expresión de proteína. Los algoritmos útiles comprenden, por ejemplo, PASTA (Walsh *y cols.* (2014) *Nucleic Acids Res.* 42, W301-307), WALTZ (Maurer-Stroh *y cols.* (2010) *Nature Methods* 7, 237-242), y AGGRESACN (Conchillo-Solé *y cols.* (2007) *BMC Bioinformatics* 8, 65-81). Los algoritmos normalmente asignan una puntuación numérica a cada aminoácido, en donde la puntuación es un indicador del potencial de agregación. La FIG. 1 muestra la asignación de dicha puntuación a los dominios variables de la cadena pesada (de la SEQ ID N.º: 13, FIG. 1A) y de la cadena ligera (de la SEQ ID N.º: 14, FIG. 1B) del clon OKT3 del anticuerpo CD3 parental murino y de los dominios variables de la cadena pesada (de la SEQ ID N.º: 18, FIG. 1C) y de la cadena ligera (de la SEQ ID N.º: 19, FIG. 1D) del clon 15E8 del anticuerpo anti-CD28 parental murino. Una puntuación de 0 indica que no, una puntuación de aproximadamente > 20 indica una tendencia moderada y una puntuación de aproximadamente > 50 indica una alta tendencia a formar agregados. En el caso de OKT3 anti-CD3, no se detectaron regiones propensas a la agregación. Por lo tanto, se esperaba que la expresión recombinante del clon OKT3 del anticuerpo anti-CD3 no se viera obstaculizada por la agregación de proteínas y, por lo tanto, se esperaban niveles de expresión y títulos de producto normales. En el caso de 15E8 anti-CD28, se predice que la cadena ligera tiene un mayor riesgo de agregación, lo que puede derivar en niveles de expresión y títulos de producto más bajos. También se predice que las variantes humanizadas de anti-CD28, como se presenta en la tabla 2, tienen un mayor riesgo de agregación, al menos tan fuerte como la secuencia original de anti-CD28.

Ejemplo 2: Humanización del clon 15E8 del anticuerpo anti-CD28 mediante injerto de CDR en una secuencia marco de línea germinal humana.

Se determinaron las CDRs y la numeración de los residuos de aminoácidos de acuerdo con la nomenclatura de IMGT presentando las secuencias de cadena pesada y ligera del clon 15E8 del anticuerpo murino anti-CD28 parental a la herramienta IMGT "DomainGapAlign". Los esquemas de numeración resultantes y las definiciones de CDR se representan en la FIG. 2A y la FIG. 2B, y las CDRs también se describen en las SEQ ID N.º: 7 a SEQ ID N.º: 12. En una etapa siguiente, las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada del clon 15E8 del anticuerpo anti-CD28 murino parental se compararon con bases de datos de referencia de regiones V de la línea germinal humana (secuencias polipeptídicas). Se usaron las versiones actuales (agosto de 2014) de los conjuntos de directorios de referencia de IG humana IMGT como bases de datos de referencia. Estas secuencias incluyen FR1, CDR1, FR2, CDR2 y FR3, pero no CDR3 y FR4. La CDR3 de la cadena pesada se ensambla principalmente a partir de una pequeña parte de un segmento V, todo el segmento D y una pequeña parte de un segmento J. La CDR3 de la cadena ligera se ensambla principalmente a partir de una pequeña parte de un segmento V y una pequeña parte de un segmento J. FR4 se deriva del segmento J. Antes del procesamiento adicional, se eliminaron los pseudogenes y las secuencias duplicadas de los conjuntos de referencia de IMGT. Para la identificación de secuencias de línea germinal humana con alta identidad con las regiones marco de los dominios variables de cadena ligera y pesada no humanos originales, se comparó la identidad de las regiones marco FR1, FR2 y FR3, y de CDR1 y CDR2 a nivel de aminoácidos frente a los conjuntos de referencia IMGT procesados mediante el uso del algoritmo Smith-Waterman implementado en el programa ssearch36 que forma parte del paquete FASTA36 (<http://faculty.virginia.edu/wrpearson/fasta/>). Para la cadena pesada, se seleccionó el alelo IGHV4-4\*08 del segmento V (SEQ ID N.º: 27) como molde adecuado para el injerto de CDR. Para el dominio variable de la cadena ligera, se seleccionó el alelo IGKV4-1\*01 del segmento V (SEQ ID N.º: 28) como molde adecuado para el injerto de CDR. Para FR-4, se usaron como moldes los alelos IGHJ4\*01 (SEQ ID N.º: 33) para la cadena pesada e IGKJ4\*01 (SEQ ID N.º: 34) para el dominio variable de la cadena ligera. Además, las secuencias de anticuerpos anti-CD28 se compararon con una base de datos de secuencias combinadas que comprende el conjunto de referencia IMGT, las secuencias de línea germinal NCBI y V-BASE que usa el servidor web abYsis (<http://www.bioinf.org.uk/abysis/index.html>). La selección de las secuencias molde descritas anteriormente se confirmó de esa manera. Finalmente, las CDRs (de acuerdo con la definición de IMGT) de las secuencias molde de la línea germinal humana seleccionadas IGHV4-4\*08 e IGKV4-1\*01 se reemplazaron por las CDRs del anticuerpo murino anti-CD28 parental clon 15E8 (SEQ ID N.º: 7-12), lo que dio como resultado "anti-CD28graft VH\_final\_IMGT" (SEQ ID N.º: 29) y "anti-CD28graft VL\_final\_IMGT" (SEQ ID N.º: 30).

Ejemplo 3: Modelado estructural de variantes de anticuerpos humanizados específicos para CD28 e identificación de residuos de aminoácidos para retro-mutación.

Con el fin de identificar residuos de aminoácidos en las regiones marco FR1, FR2 y FR3 de las secuencias de línea germinal humana injertadas con CDR (SEQ ID N.º: 29 y SEQ ID N.º: 30) que difieren del anticuerpo murino anti-CD28 parental del clon 15E8 (SEQ ID N.º: 18 y SEQ ID N.º: 19), se generaron alineamientos por pares entre estas secuencias usando el programa LALIGN. Los residuos de aminoácidos dentro de las regiones marco que interactúan físicamente (mediante enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, hidrofóbicas u otras) con residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR ("residuos de Vernier") y que son diferentes entre el anticuerpo anti-CD28 murino parental clon 15E8 y la secuencia de la línea germinal humana molde pueden ser críticos para la unión al antígeno y la integridad estructural del anticuerpo humanizado. Esos residuos se tienen que retro-mutar, es decir, el residuo de aminoácido respectivo dentro de la secuencia injertada con CDR tiene que ser reemplazado por el aminoácido correspondiente en la misma posición dentro del anticuerpo anti-CD28 murino parental del clon 15E8. La identificación de residuos de aminoácidos adecuados para la retro-mutación requiere conocimientos sobre la estructura tridimensional del anticuerpo que se va a modificar. Como no había datos estructurales disponibles para el anticuerpo anti-CD28 murino parental clon 15E8, se usó un anticuerpo alternativo con una alta identidad de secuencia con el anticuerpo anti-CD28 murino parental clon 15E8. Para ello, se realizaron búsquedas BLAST de secuencias de cadenas ligeras y pesadas de 15E8 frente a la base de datos de proteínas PDB (<http://www.pdb.org>), y se seleccionaron por separado estructuras con secuencias peptídicas correspondientes que muestran la puntuación de bits más alta y los valores E más bajos para la cadena ligera y pesada. Para la cadena pesada se seleccionó la estructura 1GIG (cadena A) y para la cadena ligera la estructura 4BKL (cadena C), respectivamente. Para el análisis en función de la estructura, se usó el software disponible públicamente "Discovery Studio 4.0" (Accelrys). En primer lugar, se definieron las CDRs de acuerdo con la nomenclatura IMGT dentro de la estructura y se identificaron todos los átomos marco dentro de un radio de 5 Å de las CDRs. Posteriormente, se comprobó la conservación de cada aminoácido marco identificado por este procedimiento entre el molde humano y el anticuerpo anti-CD28 murino parental clon 15E8. Usando este procedimiento, se identificaron los aminoácidos que interaccionan específicamente con las CDRs y probablemente estabilizan su estructura y se retro-mutaron en la secuencia de línea germinal injertada con CDR humana correspondiente. Se diseñaron cuatro variantes humanizadas diferentes: "huCD28\_v1" que comprende las SEQ ID N.º: 20 y 21, "huCD28\_v2" que comprende las SEQ ID N.º: 22 y 23, "huCD28\_v3" que comprende las SEQ ID N.º: 24 y 25, y "huCD28\_v4" que comprende las SEQ ID N.º: 26 y 25. La principal diferencia entre huCD28\_v3 y huCD28\_v4 frente a huCD28\_v1 y huCD28\_v2 son dos retro-mutaciones en los dominios variables de cadena ligera, concretamente, las sustituciones de aminoácidos D74A y S93P (nomenclatura IMGT).

Ejemplo 4: Clonación de vectores de ADN y transformación de *E. coli*.

Para la expresión en *E. coli* de fragmentos de Fabs no humanizados y humanizados específicos para CD3 y CD28, respectivamente, se diseñaron genes sintéticos que codificaban dominios variables de cadena ligera y cadena pesada no humanizados y humanizados (designados como VH y VL) de cualquiera de los clones OKT3 anti-CD3 (SEQ ID N.º: 13 en combinación con SEQ ID N.º: 14; SEQ ID N.º: 15 en combinación con SEQ ID N.º: 14; SEQ ID N.º: 16 en combinación con SEQ ID N.º: 17) o del clon 15E8 anti-CD28 (SEQ ID N.º: 18 en combinación con SEQ ID N.º: 19; SEQ ID N.º: 20 en combinación con SEQ ID N.º: 21; SEQ ID N.º: 22 en combinación con SEQ ID N.º: 23; SEQ ID N.º: 24 en combinación con SEQ ID N.º: 25; SEQ ID N.º: 26 en combinación con SEQ ID N.º: 25), respectivamente, para la región constante de cadena ligera kappa humana (designada como CL, SEQ ID N.º: 32) y para la región constante de cadena pesada de IgG1 humana CH1 (SEQ ID N.º: 31) usando una herramienta de software estándar. Se añadieron sitios de restricción flanqueantes compatibles a las secuencias de genes sintéticos para facilitar la clonación directa en un vector de expresión de *E. coli*. La síntesis de genes se realizó externamente por un proveedor de servicios. La secuencia génica que codifica el dominio variable (VL y CL) de la cadena ligera (LC) del fragmento de Fab comprende una secuencia señal phoA para la translocación periplasmática de la cadena ligera. La secuencia génica que codifica el dominio variable (VH y CH1, seguido opcionalmente por una etiqueta de poli-histidina) de la cadena pesada (HC) del fragmento de Fab comprende una secuencia señal pelB para la translocación periplasmática de la cadena pesada. La clonación se realizó usando técnicas estándar conocidas en la técnica. El vector de expresión de *E. coli* resultante se muestra en la FIG. 3. Todas las regiones del vector afectadas por el procedimiento de clonación se validaron mediante secuenciación de ADN.

Ejemplo 5: Expresión de fragmentos de Fabs en *E. coli*.

Para la producción de Fabs específicos para CD3 y específicos para CD28, se transformaron células W3110 de *E. coli* con un vector de expresión apropiado como, por ejemplo, "pOPE313 huCD3\_mut" que codifica la variante de Fab humanizada "huCD3\_mut" con dominios variables de cadena pesada (VH) y ligera (VL) como se describe en las SEQ ID N.º: 16 y SEQ ID N.º: 17. Se cultivaron pre-cultivos de *E. coli* transformadas en medios complejos (que contenían peptona de soja, extracto de levadura y NaCl, suplementado con glucosa) en matraces de agitación durante toda la noche a 37 °C. A la mañana siguiente, se inoculó un biorreactor agitable a escala de laboratorio (3 l) que contenía medios complejos (que contenían peptona de soja, extracto de levadura y NaCl, suplementado con glucosa como fuente de carbono) hasta una densidad óptica final a 600 nm de 0,05 usando el pre-cultivo. Las células se crecieron a 28°C y pH 7,0 con una pO<sub>2</sub> de al menos el 30%. Antes de la inducción, el biorreactor se enfrió a 25 °C y posteriormente se indujo la expresión de la proteína diana mediante la adición de IPTG 0,2 mM. El cultivo se continuó durante al menos 20 horas a 25°C. Se añadió constantemente glucosa como fuente de carbono y el pH se mantuvo a 7,0. La recogida de células se realizó mediante centrifugación a 6.000xg durante 1 hora. Los sedimentos de células recogidos se almacenaron a -20°C para su posterior procesamiento.

## Ejemplo 6: Purificación de fragmentos de Fabs.

Los Fabs recombinantes específicos para CD3 y CD28 se purificaron a partir de células de *E. coli* fermentadas del ejemplo 5 mediante una etapa de extracción periplásmica seguida de etapas de purificación cromatográfica. Para la extracción celular, se resuspendieron sedimentos congelados de *E. coli* en 10 ml de tampón de extracción periplásmica (Tris 100 mM, EDTA 10 mM) por 1 g de sedimento celular (peso húmedo) y se incubaron a 37 °C con agitación constante durante al menos 16 horas. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 6.000xg durante 1 hora. El sobrenadante contenía la fracción periplásmica de *E. coli*, albergando los Fabs. Se desecharon los sedimentos celulares. El sobrenadante se filtró y se aplicó a una columna de cromatografía adecuada empaquetada con una resina IMAC (por ejemplo, Resina ProCatchHis, Miltenyi Biotec) para cromatografía de afinidad de quelatos metálicos en un sistema FPLC (ÅKTA) para una primera etapa de purificación por captura de afinidad. Las impurezas se eliminaron mediante lavado usando tampón que contenía imidazol (5 mM). La proteína diana se eluyó usando un tampón que contenía una concentración de imidazol aumentada de al menos 50 mM. Las fracciones eluidas se agruparon y se aplicaron a una matriz de intercambio catiónico (por ejemplo, SP sefarosa). La elución se realizó usando un tampón a base de fosfato (25 mM) en el intervalo de pH de 6,0 a 7,4 que contenía NaCl en el intervalo de 0,3 a 0,5 M. Los eluatos que contenían Fabs se agruparon y se cuantificó el contenido de proteína mediante ensayo BCA y absorción UV (A<sub>280</sub> nm). Se almacenaron alícuotas de Fabs específicos para CD3 purificados y de Fabs específicos para CD28 purificados a -70°C antes de su uso. En algunos casos, los Fabs se volvieron a tamponar, por ejemplo, en PBS/EDTA. La FIG. 4 muestra un gel SDS teñido con Coomassie con muestras de diferentes etapas del proceso de purificación de la variante de Fab "huCD3\_mut" como ejemplo. Las tablas 1 y 2 enumeran la cantidad de Fabs purificados a partir de 100 g de sedimento celular de *E. coli*. Dado que el proceso de expresión y purificación fue casi idéntico para todas las variantes, la cantidad de Fabs purificados es un buen indicador del nivel de expresión individual de una variante de Fab. Para CD3, la cantidad más alta de proteína después de la purificación se encontró para la variante de Fab humanizada "huCD3\_mut", lo que muestra que el nivel de expresión de la variante "huCD3\_mut" también fue el más alto de todas las variantes probadas. Para CD28, la cantidad más alta de proteína después de la purificación se encontró para la variante de Fab humanizada "huCD28\_v3", lo que muestra que el nivel de expresión de la variante "huCD28\_v3" también fue el más alto de todas las variantes probadas.

Tabla 1

| Variante                   | SEQ ID N.º | rendimiento (mg) | rendimiento (%) |
|----------------------------|------------|------------------|-----------------|
| Fab chCD3 (quimérico)      | 13 + 14    | 0,5              | 100             |
| Fab chCD3_mut (quimérico)  | 15 + 14    | 20               | 4.000           |
| Fab huCD3_mut (humanizado) | 16 + 17    | 36               | 7.200           |

La Tabla 1 muestra el rendimiento de variantes de Fabs purificadas específicas para el antígeno CD3 (a partir de 100 g de sedimento celular de *E. coli*). El rendimiento de la variante de Fab "chCD3" se ajustó al 100%. La SEQ ID N.º se refiere a las secuencias de los dominios variables de cadena pesada y ligera, respectivamente.

Tabla 2

| Variante                   | SEQ ID N.º | rendimiento (mg) | rendimiento (%) |
|----------------------------|------------|------------------|-----------------|
| Fab chCD28 (quimérico)     | 18 + 19    | 1                | 100             |
| Fab huCD28_v1 (humanizado) | 20 + 21    | 0,05             | 5               |
| Fab huCD28_v2 (humanizado) | 22 + 23    | 0,02             | 2               |
| Fab huCD28_v3 (humanizado) | 24 + 25    | 11               | 1.100           |
| Fab huCD28_v4 (humanizado) | 26 + 25    | 9                | 900             |

La Tabla 2 muestra el rendimiento de variantes de Fabs purificadas específicas para el antígeno CD28 (a partir de 100 g de sedimento celular de *E. coli*). El rendimiento de la variante de Fab "chCD28" se ajustó al 100%. La SEQ ID N.º se refiere a las secuencias de los dominios variables de cadena pesada y ligera, respectivamente.

Ejemplo 7: Determinación de constantes cinéticas de variantes de Fabs usando antígeno CD28 recombinante.

Las variantes de Fabs del ejemplo 6 específicas para el antígeno CD28 se analizaron mediante espectroscopía de resonancia de plasmón superficial (Biacore). Por lo tanto, el antígeno CD28 recombinante (dominio extracelular, expresado en células de mamífero) se inmovilizó en un chip CM5 mediante acoplamiento de amina estándar. Las variantes de Fabs se usaron como analitos en tampón HBS-EP (HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Surfactante P20 al 0,005% v/v) en una concentración de 50 µg/ml. La evaluación se realizó con el software BIAeval usando un modelo de transferencia de masa de unión 1:1. La Tabla 3 muestra las constantes cinéticas determinadas: las constantes de velocidad " $k_{(on)}$ " y " $k_{(off)}$ " y la constante de equilibrio de disociación " $K_D$ " para las cinco variantes de Fabs.

Tabla 3

| Variante      | $k_{(on)}$ [1/Ms] | $k_{(off)}$ [1/s] | $K_D$ [M] | afinidad [%] |
|---------------|-------------------|-------------------|-----------|--------------|
| Fab chCD28    | 1,0E+06           | 3,2E-02           | 3,2E-08   | 100          |
| Fab huCD28_v1 | 1,9E+06           | 8,0E-02           | 4,2E-08   | 76           |
| Fab huCD28_v2 | 0,6E+06           | 5,5E-02           | 9,2E-08   | 35           |
| Fab huCD28_v3 | 0,5E+06           | 2,6E-02           | 5,2E-08   | 62           |
| Fab huCD28_v4 | 0,4E+06           | 2,1E-02           | 5,3E-08   | 60           |



La Tabla 3 muestra las constantes cinéticas de las variantes de Fabs purificadas. La afinidad, determinada por el valor de  $K_D$  en [M], de la variante de Fab "chCD28" hacia el antígeno CD28 se estableció en 100%. M, molar; s, segundo.

Ejemplo 8: Tinción de células que expresan antígeno CD3 o CD28.

Se analizaron la unión a y la tinción de las células CD3+ de las variantes de Fabs anti-CD3 del ejemplo 6. Se incubaron PBMCs (células mononucleares de sangre periférica) con 2,5 µg/ml tanto de la variante de Fab chCD3\_mut como de la humCD3\_mut. Un conjugado de OKT3-PE (1,5 µg/ml) sirvió como control positivo. Se detectó el Fab unido a las células después de la incubación con un conjugado anti-poli-histidina-PE. Las células teñidas únicamente con un conjugado anti-poli-histidina-PE sin incubación adicional con un Fab sirvieron como control negativo. Las FIG. 5A-D muestran los diagramas de puntos del análisis de citometría de flujo para las variantes de CD3. Se realizó un análisis similar para las variantes de Fabs anti-CD28 del ejemplo 6 para unir/teñir células CD28+. Se incubaron PBMCs (células mononucleares de sangre periférica) con 5 µg/ml de cualquiera de las variantes de Fabs huCD28\_v1, huCD28\_v2, huCD28\_v3 o huCD28\_v4. Un conjugado de 15E8-PE (3,0 µg/ml) sirvió como control positivo. Además, las células se incubaron con un conjugado anti-CD3-FITC. Se detectó el Fab unido a las células después de la incubación con un conjugado anti-poli-histidina-PE. Las células teñidas únicamente con un conjugado anti-poli-histidina-PE sin incubación adicional con un Fab sirvieron como control negativo. Las FIG. 5E-J muestran los diagramas de puntos del análisis de citometría de flujo para las variantes de CD28. Todas las variantes de Fabs son funcionales y muestran un patrón de tinción similar al de sus anticuerpos parentales murinos.

Ejemplo 9: Generación de nanomatrices que comprenden Fabs anti-CD3, anticuerpo OKT3 parental, Fabs anti-CD28 y anticuerpo 15E8 parental.

Se usaron las variantes de Fabs del ejemplo 6 y anticuerpos murinos parentales purificados específicos para CD3 y específicos para CD28, respectivamente, para la generación de nanomatrices. Se usó dextrano como una cadena polimérica móvil. En este ejemplo, se produjeron nanomatrices magnéticas y, por lo tanto, se usó un procedimiento modificado de Molday y MacKenzie. Se disuelven diez gramos de Dextrano T40 (GE Healthcare), 1,5 g de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  y 0,64 g de  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  en 20 ml  $H_2O$ , y se calienta a 40°C. Mientras se agita, se añaden lentamente 10 ml de NaOH 4 N y la solución se calienta a 70°C durante 5 min. La suspensión de partículas se neutraliza con ácido acético. Para eliminar los agregados, la suspensión se centrifuga durante 10 min a 2.000xg y se filtra a través de un filtro de tamaño de poro de 0,22 µm (Millex G V, Millipore). El dextrano no unido se elimina lavando en un campo magnético de alto gradiente (HGMF). El lavado HGMF de nanomatrices magnéticas se realiza en columnas de lana de acero fabricadas como se describe a continuación y colocadas en un campo magnético de aprox. 0,6 Tesla (imán permanente MACS, Miltenyi Biotec). Se aplican diez mililitros de suspensión de nanomatrix a una columna de 15 x 40 mm de 2 g de lana de acero. La columna cargada se lava con 30 ml de acetato de sodio 0,05 M. Después de retirar la columna del campo magnético externo, las nanomatrices magnéticas se eluyen con acetato de sodio 0,05 M. Las nanomatrices forman una suspensión marrón. Se da como concentración relativa de partículas la densidad óptica a 450 nm. El tamaño de las nanomatrices se determinó mediante microscopía electrónica y dispersión de luz dinámica en  $30 \pm 20$  nm (e.m.) y  $65 \pm 20$  nm (DLS). Las nanomatrices muestran un comportamiento superparamagnético, según lo determinado por las medidas de susceptibilidad. El tamaño de los microcristales de ferrita atrapados se determinó a partir de mediciones magnéticas en aproximadamente 10 nm. Los anticuerpos y los Fabs se conjugaron para separar nanomatrices mediante química de bioconjugación estándar (Bioconjugate Techniques, 2.ª edición, por Greg T. Hermanson, publicado por Academic Press, Inc., 2008). Después de la filtración estéril, las nanomatrices resultantes se almacenaron en tampón PBS/Poloxámero 188 al 0,3% a -70 °C. Como resultado, se generaron las siguientes nanomatrices: Una nanomatrix que comprende el anticuerpo parental OKT3 anti-CD3, una nanomatrix que comprende el anticuerpo parental 15E8 anti-CD28, una nanomatrix que comprende la variante de Fab anti-CD3 chCD3\_mut, una nanomatrix que comprende la variante de Fab anti-CD3 huCD3\_mut, una nanomatrix que comprende la variante de Fab anti-CD28 huCD\_v3, y una nanomatrix que comprende la variante de Fab anti-CD28 huCD3\_v4.

Ejemplo 10: Estimulación de células T por nanomatrices que comprenden una proteína anti-CD3 sola o en combinación con nanomatrices que comprenden una proteína anti-CD28.

Se usaron nanomatrices que comprendían anticuerpos y variantes de Fabs del ejemplo 9 para la estimulación de células T. Por lo tanto, se aislaron las células Pan T de PBMCs usando el kit de aislamiento de células Pan T, humano (Miltenyi Biotec). Posteriormente, las células se marcaron con éster de succinimidil carboxifluoresceína (CFSE) y se cultivaron a una densidad de  $1E+06$  células por  $cm^2$  en medio TexMACS GMP (Miltenyi Biotec) suplementado con 200 UI/ml de MACS GMP IL-2 (Miltenyi Biotec). Se usó una nanomatrix que comprendía ya sea una variante de Fab anti-CD3 o el anticuerpo de longitud completa (OKT3) solo o en diferentes combinaciones con una nanomatrix que comprendía una variante de Fab anti-CD28 o el anticuerpo de longitud completa (15E8), respectivamente. La concentración final durante la estimulación de células T fue de 500 ng de proteína/ml para cada anticuerpo de longitud completa anti-CD3 y anti-CD28 y de 333 ng de proteína/ml para cada variante de Fab anti-CD3 y anti-CD28, respectivamente. La capacidad de estimulación de las nanomatrices se determinó después de 48 horas de cultivo celular mediante citometría de flujo para la detección de los marcadores de activación temprana CD25 y CD69 (entre células T viables). Posteriormente, las células se cultivaron durante 5 días más, y se determinó la tasa de proliferación (entre las células viables) mediante adquisición de citometría de flujo. La FIG. 6A muestra la frecuencia de las células T que expresan tanto CD25 como CD69 después de la estimulación, y la FIG. 6B muestra la tasa de proliferación de las células T estimuladas. Cada punto representa la muestra de un donante, en donde la línea horizontal representa

los valores medianos. Para anti-CD3 solo, una nanomatriz que comprendía Fab huCD3\_mut humanizado dio lugar a un mayor número de células que expresaban marcadores de activación temprana y también a una mayor tasa de proliferación que una nanomatriz que comprendía el anticuerpo OKT3 parental. Como se esperaba, las nanomatrices que comprendían una proteína anti-CD28 usadas sin una nanomatriz que comprendía una proteína anti-CD3 no dieron como resultado una expresión detectable de CD25 y CD69 o una mayor proliferación celular. En combinación con una nanomatriz que comprendía el anticuerpo 15E8 anti-CD28, una nanomatriz que comprendía Fab huCD3\_mut dio como resultado una mayor activación y una tasa de proliferación similar en comparación con una nanomatriz que comprendía el anticuerpo OKT3. En combinación con una nanomatriz que comprendía el anticuerpo OKT3 anti-CD3, ambas nanomatrices que comprendían Fab huCD28\_v3 o huCD28\_v4 mostraron una mayor activación y una mayor tasa de proliferación que una nanomatriz que comprendía el anticuerpo 15E8, y estos resultados fueron muy sólidos y reproducibles. La combinación de una nanomatriz que comprendía la variante de Fab huCD3\_mut con una nanomatriz que comprendía la variante de Fab huCD28\_v3 o huCD28\_v4 dio el mejor resultado en términos de inducción robusta de alta frecuencia de células activadas más alta tasa de proliferación.

Ejemplo 11: Agregación y formación de dímeros de anticuerpos OKT3 y 15E8 parentales murinos.

Los anticuerpos OKT3 (anti-CD3) y 15E8 (anti-CD28) purificados a concentraciones de 1,0 mg/ml y 0,2 mg/ml, respectivamente, se almacenaron en viales de vidrio cerrados durante un período de 26 semanas a 25 °C y 40% de humedad relativa en una cámara climática. En varios momentos, las muestras de los anticuerpos almacenados se analizaron mediante SEC-HPLC analítica para diferenciar entre anticuerpos monoméricos, dimericos y agregados. Como se muestra en la FIG. 7A, en el caso de 15E8 solo hay una formación de agregados menor al comienzo del almacenamiento. Para OKT3, se detectó una formación de agregados lineal a exponencial, alcanzando un contenido de agregados del 1% después de 26 semanas. Se puede observar una tendencia similar en la formación de dímeros de anticuerpos (es decir, un dímero de dos anticuerpos): mientras que para 15E8 (FIG. 7B) el contenido de dímero permanece estable en el intervalo del 3-5% durante el almacenamiento, el contenido de dímero OKT3 aumentó sucesivamente hasta un 9% después de 26 semanas. En ese momento, el contenido de monómero OKT3 disminuyó a menos del 90%.

Ejemplo 12: Estabilidad de Fabs anti-CD3 purificados.

Las variantes de Fabs del ejemplo 6 a una concentración de 0,2 mg/ml en tampón PBS/ETDA se incubaron a 37 °C durante una semana. Las PBMCs se tiñeron con estos Fabs así como con Fabs no incubados (referencia) usando un título de 1 µg/ml. El Fab unido a las células se detectó después de la incubación con un conjugado anti-poli-histidina-PE. Se muestran diagramas de puntos ejemplares para Fab chCD3 (FIG. 8B+C) y Fab huCD3\_mut (FIG. 8D+E). Las FIG. 8B+D representan Fabs no incubados (no estresados), y las FIG. 8C+E representan Fabs incubados (estresados). La intensidad de fluorescencia mediana (MFI, en%) de las células teñidas se ilustra en la FIG. 8A. Para los Fabs no incubados, se ajustó cada MFI al 100%. Se puede ver que el MFI de la variante con CDR no mutada se reduce en un 35% después del estrés térmico del Fab, mientras que la disminución de los valores de MFI de ambas variantes con CDR mutada (tanto humanizadas como no humanizadas) es mucho menor (11-12%). Las moléculas de Fabs, incubadas y no incubadas, también se analizaron mediante SDS-PAGE no reductora. No se pudieron detectar diferencias, todas las muestras mostraron la misma banda de proteína sin ningún cambio visible después del estrés térmico. No había agregados proteicos visibles ni productos de degradación.

Ejemplo 13: Estabilidad de unas nanomatrices que comprenden proteínas anti-CD3.

Para probar la estabilidad de las nanomatrices que comprenden proteínas anti-CD3, las nanomatrices del ejemplo 9 se incubaron a 37 °C durante una semana. Posteriormente, estas muestras incubadas, así como las muestras de referencia no incubadas, se usaron para la estimulación de células T como se describe en el ejemplo 10. Nuevamente, se analizaron la expresión de ambos marcadores de activación temprana CD25 y CD69 después de 48 horas de estimulación y la tasa de proliferación de células T después de una semana de estimulación. La FIG. 9 ilustra la aumentada estabilidad de las nanomatrices que comprenden la variante de Fab chCD3\_mut o huCD3\_mut en comparación con una nanomatriz que comprende el anticuerpo OKT3 parental murino: tanto la expresión de los marcadores de activación temprana como la tasa de proliferación de las células T disminuyen en el caso de una nanomatriz que comprende OKT3 después del estrés térmico, mientras que ambas nanomatrices que comprenden una de las variantes de Fab se ven mucho menos afectadas después del estrés térmico. La nanomatriz que comprende la variante de Fab huCD3\_mut muestra los mejores resultados, con una pérdida mínima o nula de la capacidad para estimular eficazmente a las células T.

Ejemplo 14: Marcaje reversible de células con Fabs anti-CD3 y anti-CD28.

Se usaron las variantes de Fabs del ejemplo 6 para el marcaje reversible de células. Por lo tanto, se incubó 1 µg/ml de la variante de Fab huCD3\_mut, huCD28\_v3 o huCD28\_v4, respectivamente, con PBMCs en tampón fosfato/EDTA durante 10 min a 4 °C. Posteriormente, se dividió la muestra. Una parte se incubó durante 10 min a 4 °C con un conjugado anti-poli-histidina-APC (Miltenyi Biotec, en un título de acuerdo con las instrucciones del fabricante) que es capaz de unirse a las variantes de Fabs. Se añadió tampón fosfato/EDTA y las células marcadas se centrifugaron a 300xg durante 5 min y luego se analizaron mediante citometría de flujo. La otra parte se lavó primero con tampón fosfato/EDTA y luego se incubó con un conjugado anti-poli-histidina-APC y se analizó mediante citometría de flujo.

5 como se describe anteriormente. Las Figuras 10A y 10B muestran los diagramas de puntos del análisis de citometría de flujo para las variantes de anti-CD3 y las Figuras 10C-10F los diagramas de puntos para las variantes de anti-CD28. Todas las variantes de Fabs son capaces de marcar células (FIG. 10A, 10C y 10E), en donde la etiqueta comprende el conjugado de fluorocromo anti-poli-histidina. El marcaje es reversible y se puede eliminar lavando las células (FIG. 10B, 10D y 10F). Los resultados también muestran que las propiedades cinéticas de los Fabs están en un intervalo útil para el marcaje específico y reversible de células.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* para la estimulación policlonal de células T que comprende poner en contacto una población de células T con un fragmento de anticuerpo anti-CD3 humanizado, en donde dicho fragmento de anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de la SEQ ID N.º: 16, y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de la SEQ ID N.º: 17, y en donde dicho fragmento de anticuerpo anti-CD3 está unido a partículas.  
5
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha población de células T se pone en contacto adicionalmente con un fragmento de anticuerpo anti-CD28 humanizado, en donde dicho fragmento de anticuerpo anti-CD28 comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de la SEQ ID N.º: 26 o la SEQ ID N.º: 24, y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de la SEQ ID N.º: 25, y en donde dicho fragmento de anticuerpo anti-CD28 está unido a las mismas partículas o a partículas separadas con respecto a las partículas a las que está unido el fragmento de anticuerpo anti-CD3.  
10
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dichas partículas son perlas con una superficie de fase sólida cuyo tamaño varía entre 500 nm y 10 µm.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho método se realiza en un sistema de cultivo celular cerrado y estéril.  
15

FIG 1 A

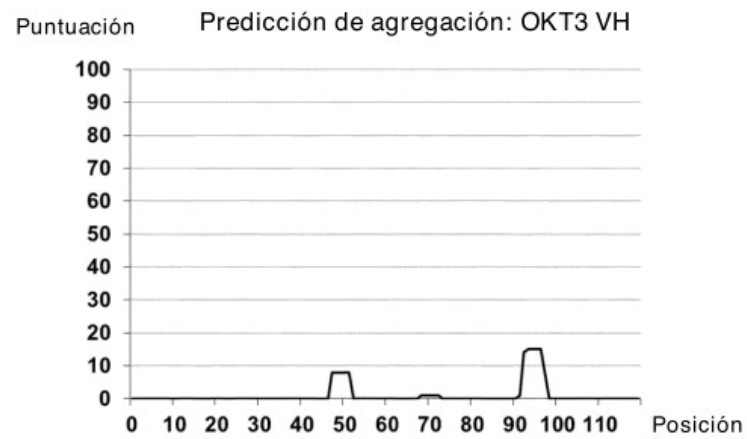


FIG 1 B

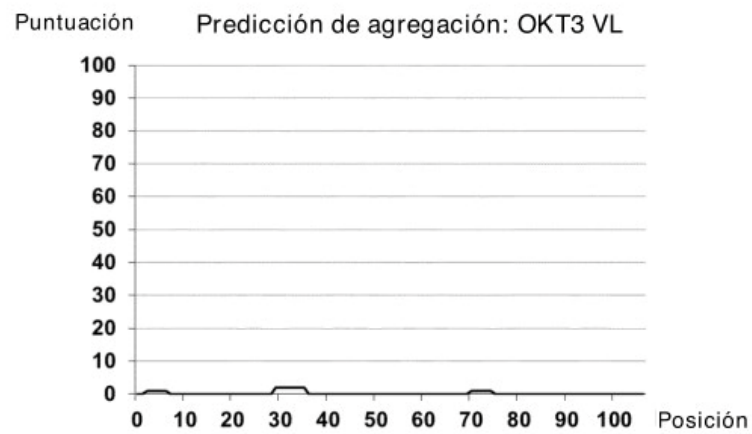


FIG 1 C

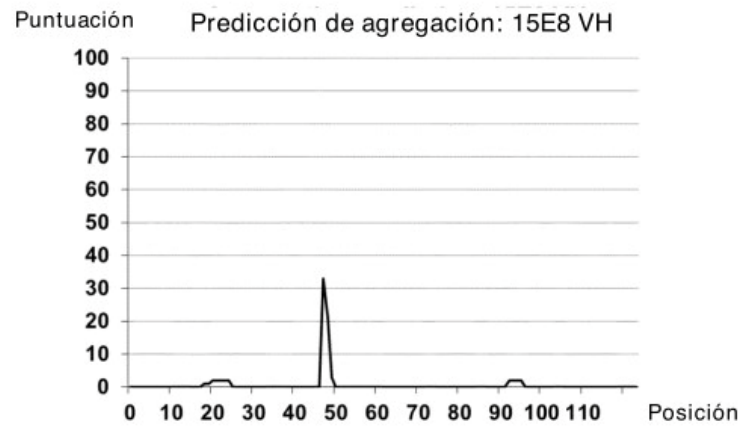
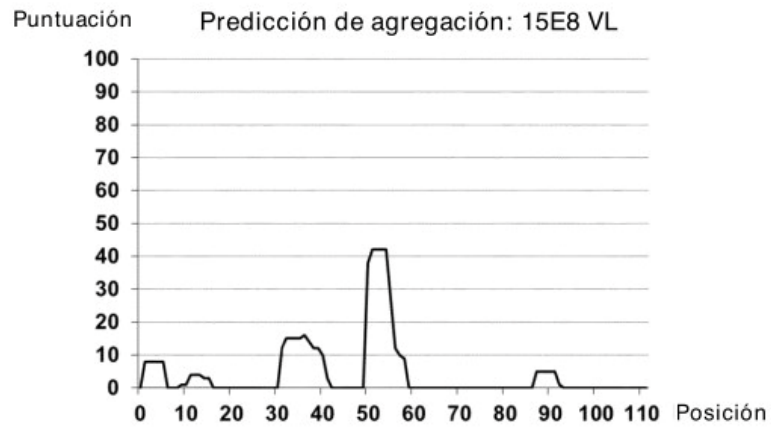


FIG 1 D

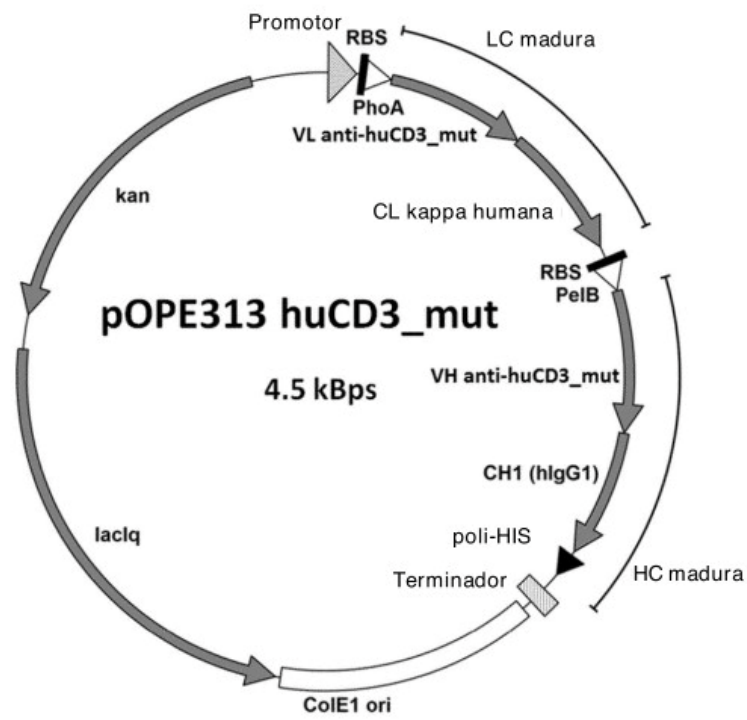


[illegible]

**FIG 2B**

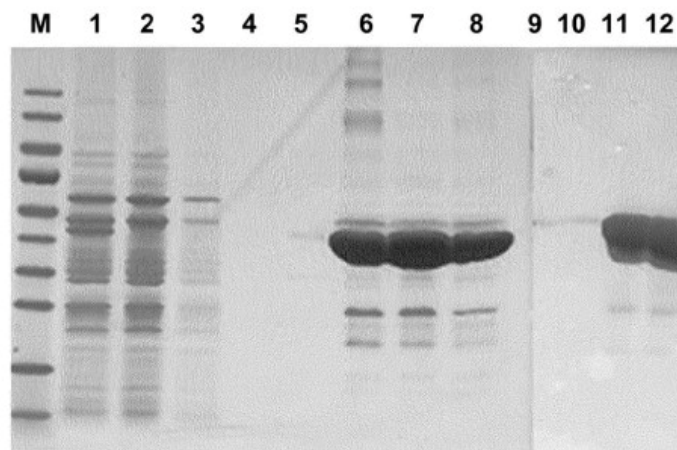
|   | FR1   |       |       |       | CDR1  |       |       |       | FR2   |       |       |       | CDR2  |       |       |       |       |
|---|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|   | 10  | 15    | 16    |       | 23    | 26    | 27    |       | 38    | 39    | 41    | 46    | 47    |       | 55    | 56    | 65    |
| 1   |   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|   | .....   | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
|   | DIVLTQSPASIAVSL GQATISCRAS ESVEY..YVTSI MQWYQQK QGPPLLIY AA.....S |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|   | FR3   |       |       |       |       |       |       |       | CDR3  |       |       |       | FR4   |       |       |       |       |
| 66  | 74  | 75    | 84    | 85    | 89    | 96    | 97    | 104   | 105   | 111   | 112   | 117   | 118   |       |       |       | 128   |
|   | .....   | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| NVESGVP.A RFGSGG..SG TDFSINHPVEE DDIAMYFC QQTRK...VPST FGGGTTKLEIK. |   |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |

FIG 3

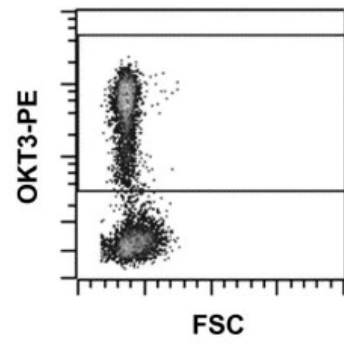




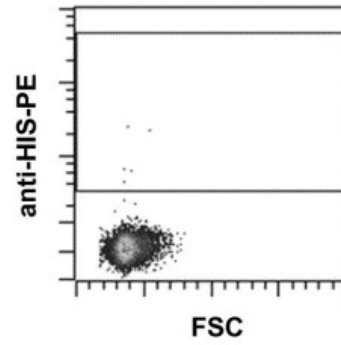
**FIG 4**



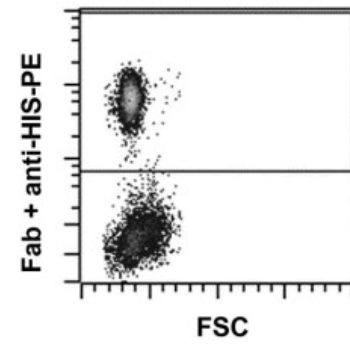
**FIG 5A**



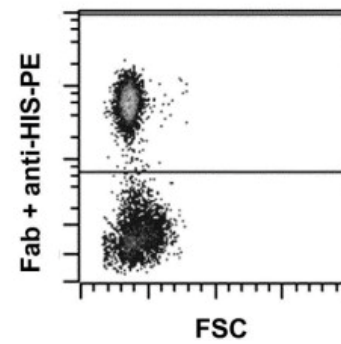
**FIG 5B**



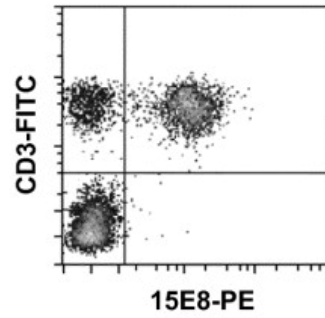
**FIG 5C**



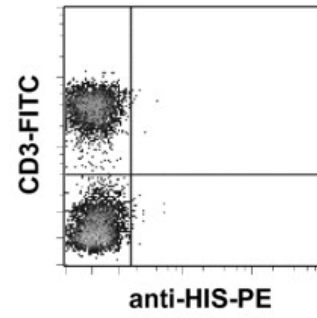
**FIG 5D**



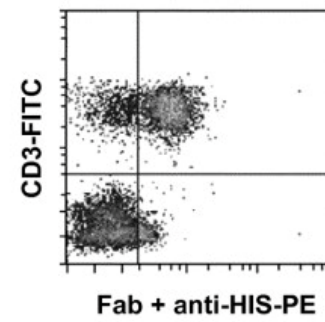
**FIG 5E**



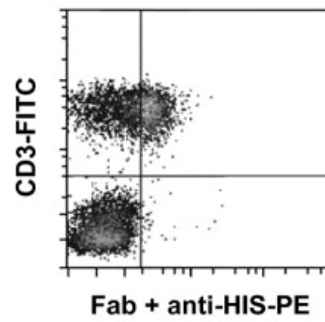
**FIG 5F**



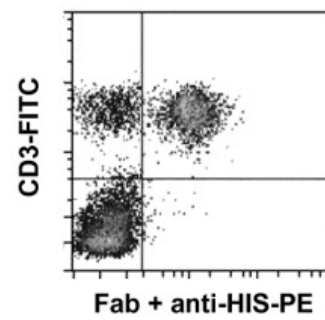
**FIG 5G**



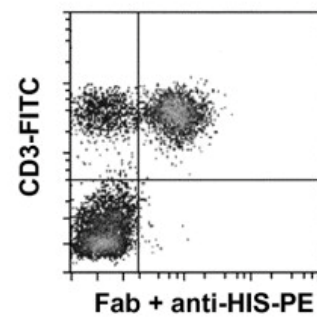
**FIG 5H**

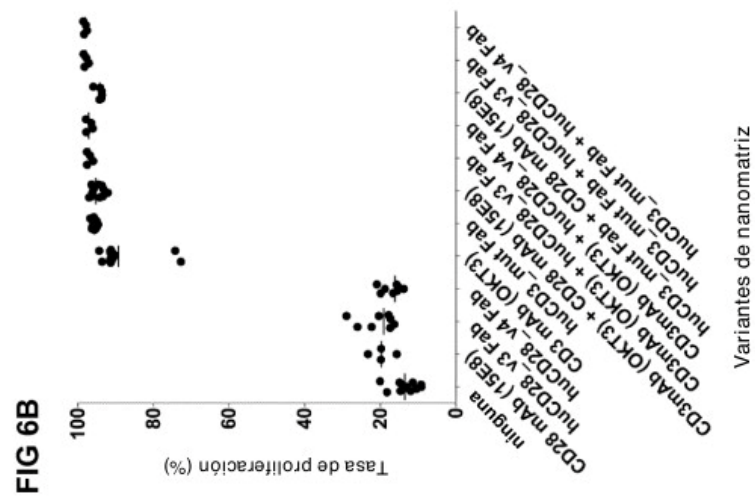
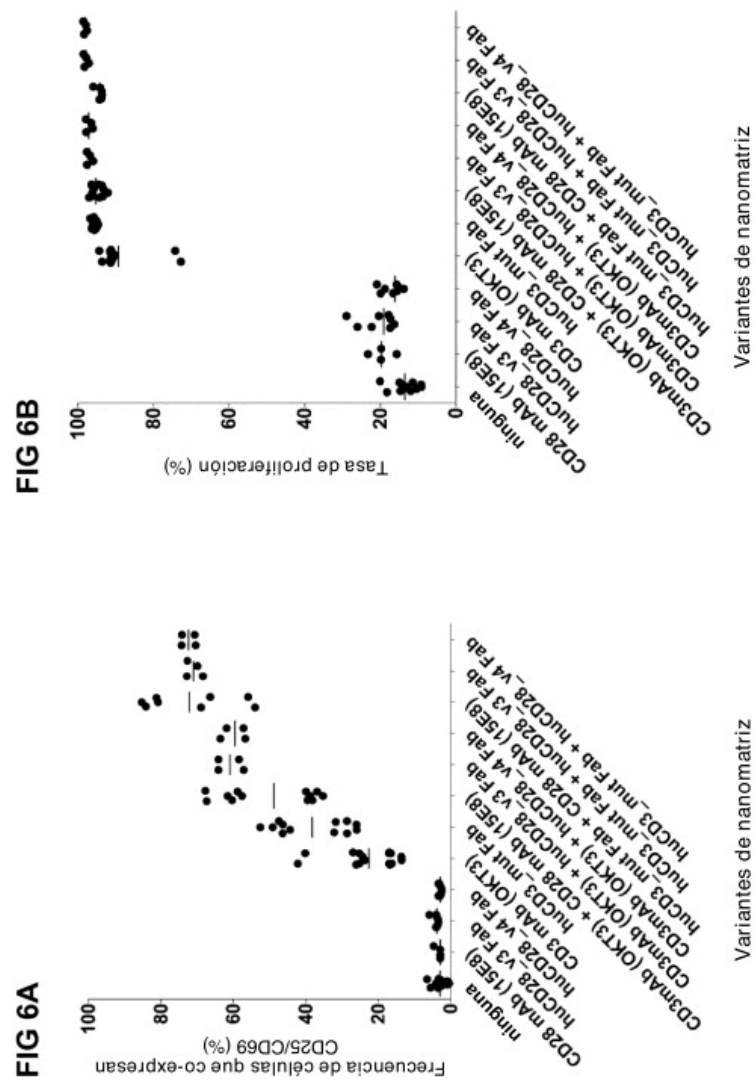


**FIG 5I**

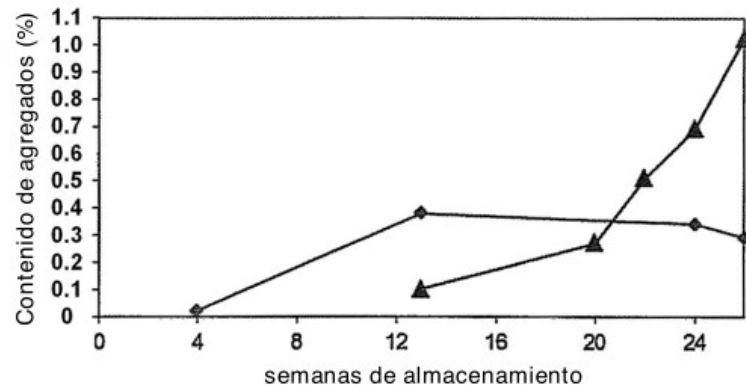


**FIG 5J**

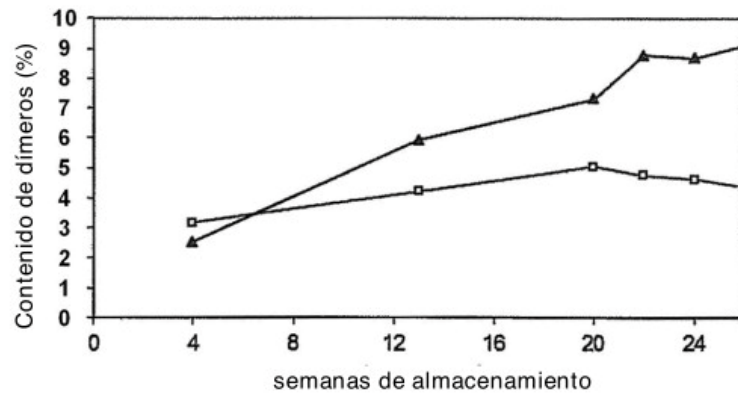




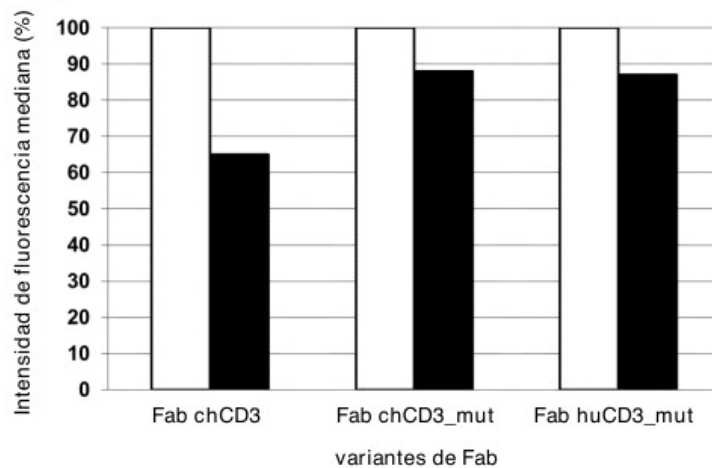
**FIG 7A**



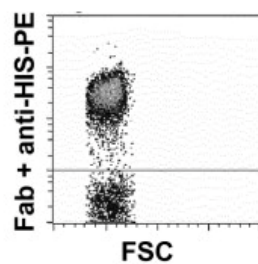
**FIG 7B**



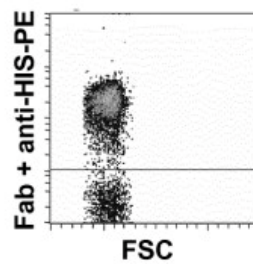
**FIG 8A**



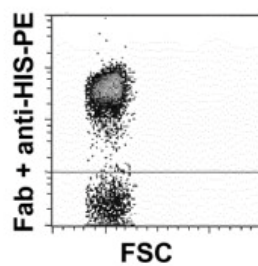
**FIG 8B**



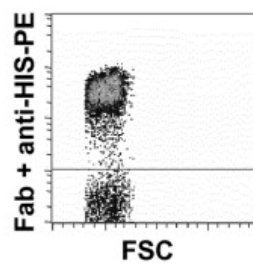
**FIG 8C**



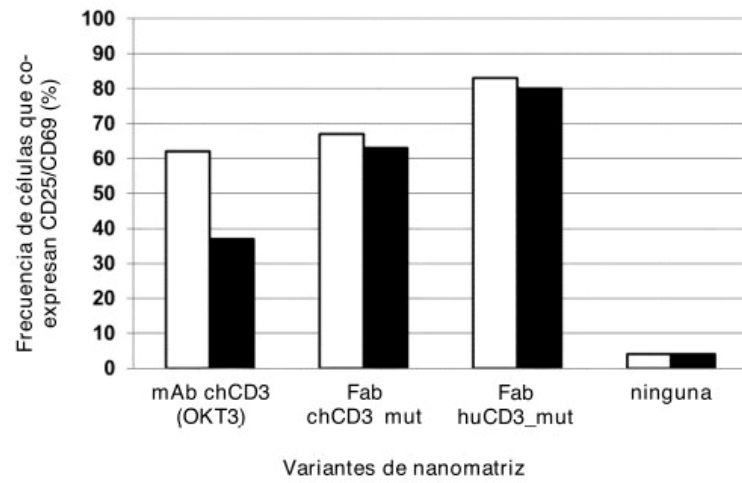
**FIG 8D**



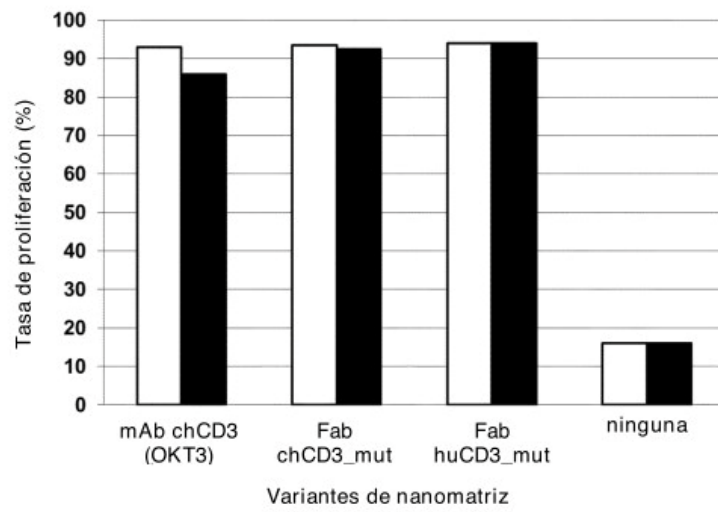
**FIG 8E**



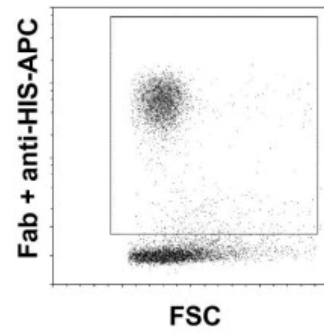
**FIG 9A**



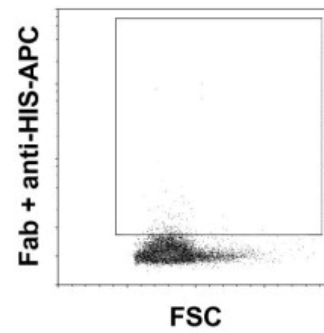
**FIG 9B**



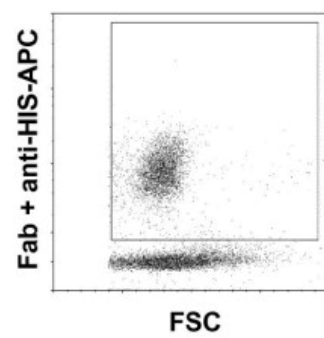
**FIG 10A**



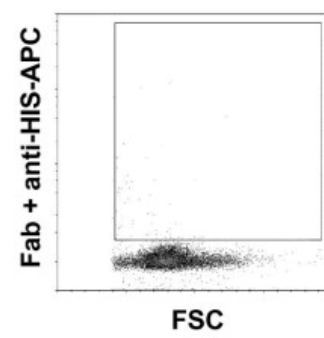
**FIG 10B**



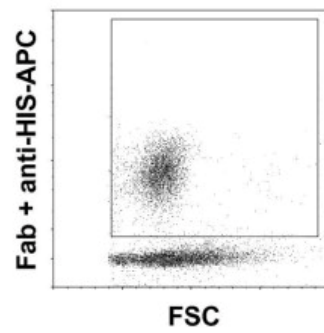
**FIG 10C**



**FIG 10D**



**FIG 10E**



**FIG 10F**

