



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 327 611**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01986609 .4**
96 Fecha de presentación : **28.09.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1331944**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.08.2003**

54 Título: **Empleo de anticuerpos monoclonales específicos de CD28 para estimular células sanguíneas sin CD28.**

30 Prioridad: **11.10.2000 DE 100 50 935**

73 Titular/es: **TheraMAB GmbH
Friedrich-Bergius-Ring 15
97076 Würzburg, DE**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2009

72 Inventor/es: **Hünig, Thomas;
Rodríguez-Palmero, Marta y
Kerkau, Thomas**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2009

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

Empleo de anticuerpos monoclonales específicos de CD28 para estimular células sanguíneas sin CD28.

5 Ámbito de la invención

La invención es relativa a un empleo de anticuerpos monoclonales específicos de CD28 que activan los linfocitos T sin ocupación de un receptor de antígeno de linfocitos T y, por ende, de modo antígeno-inespecífico.

10 Fundamento de la invención

Existen diversas enfermedades propias de las especies tanto humana como animales de sangre caliente en las cuales la cantidad de la diversas células sanguíneas es inferior a la que se tiene en estado de salud.

15 Uno de estos grupos de enfermedades se llama granulocitopenia (neutropenia y monocitopenia) y afecta a los granulocitos. En tanto causas de esta enfermedad se consideran: i) una granulocitopoyesis reducida (perturbación aplásica) causada por un daño de la médula ósea debido, por ejemplo, a 25 agentes químicos como el benzol, medicamentos como los citostáticos, inmunosupresores, AZT y/o cloramfenicol (toxicidad relativa a las dosis) o como la fenilbutazona, compuestos de oro, raras veces cloramfenicol (independientemente de la dosis por causa de reacciones farmacogenéticas), rayos o autoanticuerpos nocivos a las células madre (en algunos casos de inmunoneutropenia), debido a infiltración en la médula ósea (leucemias, carcinomas, linfomas malignos) y/o debido a osteomielosclerosis, 20 ii) perturbaciones en la maduración de la granulocitopoyesis, por ejemplo debido a perturbaciones congénitas de la maduración o mielopoyesis, síndrome de Kostmann (detención de la maduración de la mielopoyesis en el estadio de los promielocitos), neutropenia cíclica, síndrome de mielodisplasia, carencia de vitamina B12 o de ácido fólico con granulopoyesis, eritropoyesis y/o trombopoyesis inefectiva. Las terapias convencionales abarcan el suministro de factores del crecimiento de la granulocitopoyesis (por ejemplo G-CSF y GM-CSF).

Un segundo grupo se denomina trombocitopenia. En tanto causas cabe considerar: i) reducida trombocitopoyesis en la médula ósea (perturbación aplásica o bien una cantidad reducida de megacariocitos en la médula ósea) por causa 30 de un daño en la médula ósea debido, por ejemplo, a agentes químicos como el benzol, medicamentos como es el caso de los citostáticos y/o los inmunosupresores, rayos, infecciones como por ejemplo VIH o autoanticuerpos nocivos a los megacariocitos (en algunos casos de inmunotrombocitopenia) por causa de infiltración en la médula ósea (leucemias, carcinomas; linfomas malignos) y/o por causa de osteomielosclerosis, ii) perturbaciones de la maduración de los megacariocitos (megacariocitos en la médula ósea normal en aumento) con trombopoyesis, eritropoyesis y/o granulopoyesis inefectiva con megaloblastos, metamielocitos gigantes y demás debido a carencia de vitamina B12 o ácido fólico. Las 35 terapias convencionales abarcan la supresión de los medicamentos inseguros, substitución de trombocitos (en casos de perturbaciones de la producción en la médula ósea: trombocitopoyetina) así como MGDF (Megakaryocyte Growth and Development Factor, estimulación de la proliferación y maduración de los megacariocitos).

40 Un tercer grupo está conformado por las anemias aplásicas o bien la deficiencia de la médula ósea con aplasia/hipoplasia de médula ósea y pancitopenia (enfermedad de las células madre). Una anemia aplásica congénita es, por ejemplo, la anemia Fanconi. Más frecuentes son las anemias aplásicas adquiridas como es el caso de la anemia idiopática aplásica (cuya causa es desconocida) y anemias aplásicas secundarias debidas al efecto de los medicamentos, sustancias tóxicas, radiaciones con ionización e infecciones víricas (véase arriba). Los enfoques terapéuticos 45 de apoyo abarcan la substitución de eritrocitos/trombocitos. Los enfoques terapéuticos causales abarcan el transplante de médula ósea o el transplante de células madre, terapias inmunosupresivas (por ejemplo ATG) y otras medidas terapéuticas como, por ejemplo, el suministro de citocinas (GM-CSF, G-CSF, MGDF, y/o trombocitopoyetina).

Finalmente cabe mencionar la leucemia aguda, que frecuentemente se presenta en tanto anemia, trombocitopenia 50 y/o granulocitopenia. Las terapias abarcan la substitución de los eritrocitos y los trombocitos en la medida necesaria o bien la estimulación de la granulopoyesis a través de G-CSF y/o GM-CSF, la quimioterapia y los trasplantes de médula óseas y/o células madre.

Las enfermedades anteriormente mencionadas comparten un aspecto común, a saber, el que las células sanguíneas 55 afectadas son precisamente aquellas que no llevan ningún CD28 en su superficie.

Estado de la técnica

60 CD28 se denomina una molécula expresada de la membrana celular de linfocitos T de procedencia humana o animal con una secuencia conocida de aminoácidos a la cual, en el marco del "Human Leukocyte Typing Workshops" internacional, se le ha asignado la abreviatura de CD28. Con la activación de los linfocitos T la proliferación de la actividad metabólica, el aumento del volumen de las células, la síntesis de moléculas inmunológicamente importantes y el que tenga lugar la división celular (proliferación) de los linfocitos T se indica un estímulo exterior. Estos procesos, por ejemplo, se inducen por medio de la ocupación de la molécula CD28 en células T por medio de anticuerpos 65 monoclonales especiales específicos de CD28. La activación de los linfocitos T con los epifenómenos descritos es un aspecto de la inmunoreacción fisiológica que, en todo caso, puede derivar en casos patológicos en descontrol (enfermedades linfoproliferativas) o ser insuficientes (inmunodeficiencia).

Para comprender la invención es primeramente importante considerar el trasfondo tecnológico que a continuación se ilustra. La activación de las células T en reposo con vistas a la proliferación y la diferenciación funcional requiere, en primer lugar, la ocupación de estructuras superficiales dobles, los llamados receptores: 1. primero, del receptor del antígeno, que posee una especificidad diferente de célula a célula y que es necesaria para el reconocimiento de antígenos como, por ejemplo, productos de disociación virales; así como la molécula CD28 expresada del mismo modo en todas las células T en reposo, la cual se une de un modo natural a ligandos sobre la superficie de otras células del sistema inmunológico. Cabe mencionar a este respecto la expresión de “coestimulación” relativa a la inmunoreacción específica de antígeno por causa de CD28. En el cultivo celular pueden reproducirse estos procesos por ocupación del receptor de antígeno así como de la molécula CD28 con anticuerpos monoclonales apropiados. En el sistema clásico de la coestimulación ni la ocupación del receptor de antígenos ni de la molécula CD28 sólo tienen por consecuencia la proliferación celular T, no obstante la ocupación de ambos receptores es efectiva. Esto mismo se ha observado en células T tanto humanas como de ratones y ratas.

Una activación “directa”, es decir, una activación independiente de la ocupación del receptor de antígeno de linfocitos T en reposo a través de anticuerpos monoclonales específicos de CD28, se ha observado en los siguientes sistemas: en la nota bibliográfica de Brinkmann *et al.*, J. Immunology, 1996, 156: 4100-4106 se mostró que una muy reducida porción (del 5%) de los linfocitos T humanos portadores de los marcadores superficiales CD45 RO típicos de los linfocitos T en reposo se activa por medio de los anticuerpos monoclonales “clásicos” específicos de CD28 9.3 en caso de adición del factor de crecimiento interleucina 2 (IL-2) sin ocupación del receptor de antígeno. En el trabajo de Siefken *et al.*, Cellular Immunology, 1997, 176: 59-65, se mostró que por vías convencionales, es decir, por medio de inmunizar a ratones con células T humanas, los anticuerpos monoclonales específicos de CD28 producidos pueden activar en cultivos celulares un subgrupo de células T humanas sin ocupación de receptor de antígeno con vistas a la proliferación siempre que el CD28 sea ocupado por estos anticuerpos monoclonales y las moléculas monoclonales ligadas celularmente se enlacen además conformando una red entre sí por la acción de otros anticuerpos. En ambos casos los anticuerpos descritos primera y fundamentalmente no son apropiados para el empleo en la medicina humana, ya que se trata de anticuerpos de ratón. Por lo demás ambos anticuerpos comparten la característica de que tan sólo una porción muy reducida de las células T puede activarse “directamente”.

En el trabajo de Tacke *et al.*, Eur. J. Immunol., 1997, 27:239-247 se describen dos tipos de anticuerpos monoclonales específicos de CD28 de diferentes propiedades funcionales: “anticuerpos clásicos” que coestimulan la activación de las células T en reposo solamente con la ocupación del receptor de antígeno simultánea; y “directos”, los cuales pueden activar la proliferación sin del receptor de antígeno de linfocitos T de todas las clases in vitro y en animales de laboratorio. Ambos anticuerpos monoclonales conocidos hasta este punto se relacionan a la inmunización con células en las que se expresa el CD28 de ratos y pueden obtenerse en diferentes selecciones de acuerdo a sendas propiedades descritas.

De la nota bibliográfica WO 98/54225, a la cual se hace referencia expresa y en toda su extensión de modo que se eviten las repeticiones, se conocen los anticuerpos monoclonales “directos” específicos de CD-28 así como su empleo destinado al tratamiento de enfermedades en las que tenga lugar una disminución patológica de la cantidad de células T CD4 o a la modulación de inmunoreacciones en las vacunas. En los casos de estas aplicaciones se consideran regularmente células que portan el CD28 en su superficie (células T) y que, consecuentemente, se estimulan inmediatamente por la acción de los anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales anti-CD28 que activan los linfocitos T inespecíficamente son conocidos en la bibliografía del European Journal of Immunology, 27(1):239-247 (1997), European Journal of Immunology, 30(3):424-428 (2000) y Cellular Immunology 176(1):59-65 (1997). De la nota bibliográfica Clinical and Experimental Immunology 85(3):424-428 (1991) es conocido el hecho de que un paciente con trombocitopenia mostraba un déficit de CD-28.

Problema técnico de la invención

La invención se relaciona al problema técnico de haber de indicarse una composición farmacológica por medio de la cual se estimule la formación y/o activación de células sanguíneas que no sean portadoras de CD 28.

Elementos básicos de la invención

Respecto de la solución de este problema técnico la invención indica el empleo de acuerdo a la única reivindicación de patente.

En tanto estimulación se denomina el incremento de la actividad metabólica, el aumento del tamaño de las células, la síntesis de los factores y/o el hecho de que la proliferación tenga lugar.

Análogas son sustancias que no sean anticuerpos monoclonales y que, no obstante, desempeñen las funciones ilustradas en el marco de la invención. Ejemplos a este respecto son las proteínas altamente específicas “cortadas” o RNA, DNA o PNA (por ejemplo, aptámeros, especialmente aptámeros estabilizados frente a enzimas disociadoras de ácido nucleico o bien RNA, DNA o PNA). El criterio común es, en todo caso, la especificidad CD28 de efecto “directamente” estimulante sobre las células sanguíneas portadoras de CD28.

La invención se base en el sorprendente descubrimiento de que los anticuerpos monoclonales específicos de CD28 también surten el efecto de la proliferación, la formación o activación de células sanguíneas que no porten ningún CD28; se trata de células sanguíneas, pues, en las que el acoplamiento de los anticuerpos no parece posible. Sin el deseo de establecer un compromiso con una teoría concreta se sospecha que el sorprendente efecto se relaciona con el hecho de que por medio de la estimulación “directa” (es decir, sin coestimulante) de las células portadoras de CD28, especialmente las células T, estas células producen y emiten por su cuenta factores que a su vez estimulan las células sanguíneas no portadoras de CD28. Por lo tanto se sospecha la existencia de un proceso indirecto.

La composición farmacológica para el suministro a personas muestran los anticuerpos monoclonales aplicados según la invención, preferentemente componentes constantes humanos. Los componentes constantes de un anticuerpo son sectores sin importancia respecto del reconocimiento del antígeno al contrario que en el caso de los sectores variables que definen la especificidad antigénica de un anticuerpo. Los componentes constantes se diferencian, no obstante, en los anticuerpos de diversos tipos y, por ende, también de animales y personas. Los sectores constantes de un anticuerpo pueden corresponderse, por ejemplo, a los de anticuerpos de un organismo que haya de ser tratado con anticuerpos por motivos de compatibilidad. Los anticuerpos monoclonales aplicados a personas según la invención son, por tanto, por una parte humanamente compatibles y ello, a saber, sea tanto per se o por humanización, mientras que por otra parte pueden servir para el tratamiento, puesto que los anticuerpos puede encontrarse específicamente configurados frente al humano CD28 y puesto que la activación de los linfocitos T es amplia. Con la adaptación correspondiente o con la producción de un derivado los anticuerpos monoclonales aplicados según la invención pueden aplicarse también a mamíferos no humanos. A este respecto cabe mencionar que los anticuerpos monoclonales no humanizados bien pueden ser humano-compatibles. Humano-compatibles son los anticuerpos monoclonales cuando no producen ninguna inmunoreacción indeseada durante un espacio determinado de tiempo, como, por ejemplo, es ello demostrable por la determinación de anticuerpos de anti-inmunoglobulina cuando estos impidan su empleo.

Los derivados de anticuerpos monoclonales se entienden como modificaciones de anticuerpos monoclonales que se hayan producido por una manipulación convencional bioquímica o técnico-genética. Este caso se da, por ejemplo, en la humanización de un anticuerpo monoclonal de ratón por substitución parcial de componentes estructurales (constantes) del anticuerpo de ratón por otros humanos.

En detalle los anticuerpos monoclonales aplicados según la invención pueden obtenerse por medio de: A) creación de células de hibridomas aptas para la producción de CD28 humano monoclonal específicos de anticuerpos de animales en vías de una inmunización con líneas de células tumorales no T en las cuales se encuentre expresado el CD28 humano o con CD28 recombinantemente expresado; B) en su caso, humanización de los anticuerpos de animales obtenibles según el nivel A de las células hibridomas por medio de substitución bioquímica o técnico-genética de componentes constantes de anticuerpos de animales por componentes constantes análogos de un anticuerpo humano o bien por substitución de los componentes de los genes correspondientes de células hibridomas; C) secreción de los anticuerpos en cultivos de células hibridomas y aislamiento de los anticuerpos resultantes o producción de anticuerpos por medio de inyección de las células hibridomas en animales, por ejemplo, en ratones, y aislamiento de los anticuerpos de los líquidos corporales de los animales. -Un aspecto importante de los anticuerpos monoclonales aplicados según la invención consiste, en comparación con las siguientes notas bibliográficas de Brinkmann *et al.*, J. Immunology, 1996, 156: 4100-4106, y Siefken *et al.*, Cellular Immunology, 1997, 176: 59-65, en el descubrimiento de que los anticuerpos monoclonales se dan por inmunización con células tumorales no T en las cuales se encuentra expresado el CD28 humano en lugar de inmunización con líneas celulares T. Pues de este modo pueden obtenerse anticuerpos monoclonales que no solamente son específicos frente al CD28 (humano) sino que también tienen el efecto de una activación “directa” en una amplitud considerable. En particular los anticuerpos monoclonales aplicados según la invención pueden presentar la especificidad relativa a determinantes, por ejemplo, de la molécula humana CD28, que son difícilmente accesibles a la molécula CD28 naturalmente expresada y cuya ocupación por los novedosos anticuerpos monoclonales coopera a la activación de las células T y, finalmente, a la activación de células sanguíneas no portadoras de CD28. Por determinante ha de entenderse el sector de una molécula que queda definido por la especificidad enlazante de uno o varios anticuerpos.

El modo básico de proceder en la producción de células hibridomas, la humanización así como en la producción de anticuerpos monoclonales a partir de células hibridomas (humanizadas), es bien conocido por el personal especializado y no requiere ser ilustrado aquí. En principio pueden emplearse todas las líneas celulares conocidas y libremente disponibles especiales para la producción de células hibridomas. Para la producción de los anticuerpos monoclonales se tienen en cuenta por principio general, además del método en adelante descrito, la expresión recombinada con la que el especialista está familiarizado en detalle.

Concretamente es preferible que los anticuerpos de animales específicos para la producción de monoclonales humanos CD28 contengan células hibridomas por medio de a) creación de un plásmido por medio de inserción de ADN complementario de CD28 humano en el vector pH β APr-1-neo tras escisión del fragmento SalI-HindIII y creación de protoplastos de *escherichia coli* (MC1061) que porten el plásmido; b) fusión de los protoplastos con células tumorales de ratón A2OJ y/o L929 por medio de polietilenglicol; c) cultivo de las líneas transferidas contenidas en el nivel b; d) screenen de las células de ratón transferidas A2OJ y/o L929 a la expresión del CD28 humano y selección de células de ratón A2OJ y/o L929 que expresen el CD28 humano; e) inmunización de ratones BALB/c con las células de ratón A2OJ y/o L929 que expresen el CD28 humano (por ejemplo por medio de seis inyecciones intraperitoneales y seguidamente una intravenosa); f) toma de células del bazo de los ratones así inmunizados y fusión de las células del bazo con células (“nonproducer”, es decir, que no produzcan anticuerpos) de la línea de meta X63-Ag 8.653 por

medio de polietilenglicol, g) selección de células hibridomas así obtenidas con el cometido de que en el excedente de las células hibridomas seleccionadas se encuentren anticuerpos que se enlacen a las células de ratón que expresen el CD28 humano y h) cultivo/subclonación de las células hibridomas seleccionadas obtenidas en el nivel g. En el lugar de los niveles de a) a d) pueden emplearse naturalmente otros sistemas de expresión con los que el especialista se encuentre familiarizado. El ADN complementario de CD28 humano puede adquirirse libremente por medio del Dr. A. Aruffo y el Dr. B. Seed, que han publicado la secuencia y también la siguiente nota bibliográfica: Aruffo, A., and Seed, B, 1987, "Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high efficiency COS cell expression system", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:8573. De esta nota bibliográfica puede tomarse en detalle, pues, el ADN complementario de CD28 humano. Por lo demás todos los especialistas, sin problema alguno y por medio de la secuencia depuesta en el banco de genes y de la reacción de polimerización en cadena, pueden producir de un modo muy sencillo y rápido un clon de ADN complementario de CD28 humano. El vector pH β APr-I-neo puede adquirirse libremente por medio de los autores de la posición bibliográfica Gunning, P, *et al.*, 1987, "A human β -actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:4831. "neo" no significa sino resistencia a la neomicina. El nivel c) se lleva a cabo pues en ausencia de la neomicina. Las líneas celulares y/o los microorganismos anteriormente mencionados se encuentran libremente disponibles y pueden adquirirse comercialmente en la American Type Culture Collection (ATCC). En relación a la *escherichia coli* (MC1061) hacemos referencia complementariamente a la posición bibliográfica de Meissner, P.S., *et al.*, 1987, "Bacteriophage gamma cloning system for the construction of directional cDNA libraries", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:4171.

La presentación galénica de los anticuerpos monoclonales de la invención para las diversas formas de suministro es bien conocida por los especialistas y no necesita ser ilustrada aquí con más detalle. Especialmente, además de los componentes activos relativos a la invención, pueden contenerse otras sustancias activas y/o otras sustancias prácticas o necesarias con vista a la presentación galénica. Ha de comprenderse que una composición farmacológica según la invención ha de contener los anticuerpos en una dosis terapéuticamente efectiva. Una dosis terapéutica activa puede determinarse respecto de los diversos organismos determinando la dosis misma que tenga por consecuencia un aumento estadísticamente significativo de la cantidad de células sanguíneas no portadoras de CD28 en comparación con el estado anterior al del suministro de la composición.

El invento incluye un método para la producción de un medicamento destinado a la curación de las enfermedades inicialmente mencionadas empleándose los anticuerpos monoclonales relativos a la invención.

En adelante se ilustra la invención con más detalle partiendo de unos ejemplos de ejecución.

Los experimentos representados o bien los ejemplos relativos a los efectos de los anticuerpos monoclonales "directos" específicos de CD28 se llevaron a cabo en el modelo de la rata, respecto de lo cual en tanto ejemplo de un anticuerpo específico de CD28 "clásico" se aplicó el anticuerpo monoclonal JJ319 y en tanto ejemplo de uno "directamente" activante se aplicó el anticuerpo monoclonal JJ316. Ambos anticuerpos se encuentran libremente disponibles y pueden adquirirse comercialmente en la empresa Pharmingen, San Diego, USA. Los anticuerpos JJ319 y JJ316 puede adquirirse por lo demás según la indicación bibliográfica de M. Tacke *et al.*, Immunology, 1995, 154: 5121-5127, a la cual se hace aquí expresa referencia también en relación a ciertos detalles de la producción de células hibridomas y anticuerpos monoclonales.

Ejemplo 1

Producción de anticuerpo monoclonal específico de CD28 "directo"

En este ejemplo se ilustra con más detalle la producción del anticuerpo monoclonal empleado según la invención, es decir, el humano específico de CD28. Estos se denominarán en adelante también CMY-2. El CD28 humano procedente de una biblioteca de ADN complementario fue expresado en líneas de células A20J y/o L929 recombinantemente. Primeramente se creó a este respecto un plásmido por medio de inserción de ADN complementario de CD28 humano en el vector pH β APr-I-neo tras escisión del fragmento SalI-HindIII. Partiendo de la *escherichia coli* (MC1061) se produjeron protoplastos portadores del plásmido. Tuvo después lugar la fusión de los protoplastos con células tumorales A20J y/o L929 por medio de polietilenglicol. Las células transferidas así obtenidas se cultivaron del modo habitual. Seguidamente tuvo lugar una detección sistemática por screen de las células transferidas de ratón A20J y/o L929 a la expresión del CD28 humano y la selección de las células de ratón A20J y/o L929 con expresión del CD28 humano.

La comprobación de que la expresión tuvo éxito se llevó a cabo por medio de un anticuerpo convencional, comercialmente adquirible, con marca fluorescente y especificidad relativa al CD28 humano (9.3-ficoeritrina). En tanto control negativo se colorearon células no transferidas A20J o bien L929 con el mismo anticuerpo. Los transferidos (A20J-CD28 y L929-CD28) mostraron una intensidad fluorescente superior. Puesto que no todas las células eran CD28-positivas, se subclonaron las células CD28-positivas y se emplearon para la inmunización. Como se reconoce en la figura 1, en el desplazamiento de los cúmulos de puntos hacia arriba en ambos diagramas de la derecha, reaccionan estas células con los anticuerpos que pueden comprarse, o sea que expresan el CD28 humano en su superficie.

La línea celular A20J de CD28 humano se empleó para la inmunización de ratones BALB/c. La fusión celular y la detección sistemática (por screen) se llevaron a cabo de la siguiente manera: i) inmunización de ratones BALB/c

ES 2 327 611 T3

con las células de ratón A2OJ expresantes de CD28 humano (seis inyecciones intraperitoneales y seguidamente una vez intravenosa). ii) Toma de células del bazo de los ratones así inmunizados y fusión de las células del bazo con las células de la línea celular X63-Ag 8.653 por medio de polietilenglicol. iii) Selección de las células hibridomas así adquiridas con el cometido de que en el excedente de las células hibridomas seleccionadas se contengan anticuerpos que se enlacen a las células de ratón A2OJ y/o L929 que expresen el CD28 humano.

En tanto *read-out* se contaba con pigmentación de una mezcla de células tumorales de ratón L929 con transferencia y sin transferencia de CD28. En la figura 2 se muestra que los anticuerpos monoclonales así aislados diferenciaban células transferidas y no transferidas CMY-2 de diferente intensidad fluorescente. La detección sistemática por screen diferencial relativa a anticuerpos frente al CD28 humano tuvo lugar de la siguiente manera. Se tomó en cada caso 50 μ l de excedente de hibridomas celulares cultivados y se incubaron durante 15 minutos con una mixtura de células L929 y transfectantes L929-CD28. Tras el lavado se colorearon las células con DaMIg-PE. La parte A muestra el control negativo. Las células fueron incubadas sólo con DaMIg-PE. La parte B muestra la pigmentación con un excedente que era levemente positivo pero que no mostraba diferencia alguna en ambas células. La parte C muestra las células coloreadas con un excedente de CMY-2.

En los experimentos no representados se colorearon células sanguíneas periféricas humanas con el nuevamente aislado CMY-2 y el anticuerpo "clásico" específico de CD28 9.3. Se encontró un modelo de expresión idéntico en las subpoblaciones de células sanguíneas humanas.

En resumen mostraron los experimentos que el CMY-2 es un anticuerpo humano específico de CD28.

El CMY-2 se sometió entonces a la comprobación relativa a la actividad clásica coestimulante y "directamente" estimulante con linfocitos T humanos procedentes de sangre periférica enriquecidos a un 80%. La proliferación de células T fue medida por medio de la integración de timidina 3 H entre los días segundo y tercero del cultivo. Se obtuvieron los siguientes resultados.

Coestimulación:

células no estimuladas	276 cpm
anticuerpos específicos de CD3	3111 cpm
anticuerpos específicos de CD3 + CMY-2	51676 cpm

Estimulación directa:

fase sólida <i>anti-mouse</i> Ig	379 cpm
fase sólida <i>anti-mouse</i> Ig-+ control mAk	258 cpm
fase sólida <i>anti-mouse</i> Ig más CMY-2	19115 cpm

Explicación: el anti CD3 se ocupa de la estimulación del receptor celular T (CD3 es una parte del complejo TCR). El CMY-2 se empleó en forma de un excedente de cultivo no purificado (50% del volumen final). Según la experiencia la concentración efectiva de mAk que cabe esperar se encuentra por debajo de óptimo con vistas a una activación directa, no obstante es suficiente para la coestimulación. El experimento muestra que el CMY-2 posee propiedades directamente activantes.

Las células hibridomas relativas a la invención y que producen CMY-2 se han depuesto en la DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, empresa sita en Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, con el número DSM ACC2353 (20.05.1998).

Ejemplo 3

Reconstitución de la cantidad de células T en ratas con linfopenia T con mitógeno anti-CD28-mAk

El tratamiento con mitógeno y no con el anti-CD28 MAK convencional tiene por consecuencia una rápida reconstitución de la cantidad de células T en ratas con linfopenia T, lo cual se expone en adelante.

El plan experimental se representa en la figura 3. Las ratas obtenidas por consanguineidad PVG fueron sometidas a la radiación gamma procedente de una fuente de cesio de tal manera que el sistema reproductor de sangre, leucocitos

incluidos, quedó destruido. En tanto fuente de células madre generadoras de sangre se les suministró a los animales células de la médula ósea consanguínea intravenosamente. En el experimento 1 se les suministró adicionalmente 5×10^6 de células T CD4 y en el experimento 2 5×10^6 de células T (CD4 y CDB) del mismo tronco consanguíneo PVG.RT7^b. Estos animales son idénticos con el tronco consanguíneo receptor PVG salvo por la molécula de superficie de leucocitos RT7, de la que expresan el alelo b en lugar del a. Por medio del MAK marcado por fluorescencia específico de RT7^b pueden identificarse en los animales células T que proceden del 5×10^6 de células T maduras inyectadas. Estos linfocitos T, que maduran nuevamente en tanto linfocitos T procedentes de las células precursoras inmaduras de la médula ósea inyectada en el timo de los animales receptores, no reaccionan por el contrario con el MAK marcado por fluorescencia específico de RT7^b. La cantidad de 5×10^6 linfocitos T se corresponde aproximadamente a una milésima de la cantidad de linfocitos T maduros de una rata adulta, de modo que nos encontramos ante un modelo de de linfopenia T grave. Para el aumento en el animal receptor de las células T inyectadas se aplicó, de acuerdo al esquema de tratamiento mostrado, 1 mg del mitógeno anti-CD28 MAK JJ316 intravenosamente durante dos días (día 0 y día 10 en el experimento 1, día 0 y día 13 en el experimento 2). En los momentos indicados se tomo sangre de los animales a y se determinó la cantidad de los linfocitos T mediante medición de la cantidad total de leucocitos así como de la porción de linfocitos T. Por lo demás se diferencia entre los linfocitos T procedentes de las células T maduras inyectadas (RT7^b positivo) y aquellos otros que se generaron nuevamente en el timo (RT7^b negativo). Estos análisis fueron llevados a cabo por medio de anticuerpos monoclonales con especificidad relativa a los marcadores de superficie de células T. La técnica empleada es la inmunofluorescencia de varios colores junto con la citofotometría de flujo (análisis "FACS®").

En la figura 4 se representa el experimento 1, es decir, la reconstitución con células CD4 T maduras. Los diferentes tratamientos de los animales se han anotado en la abscisa; cada uno de los animales se simboliza por medio de un punto. Ya tan sólo nueve días tras el comienzo del experimento se mostró un avance considerable de la cantidad de linfocitos T en la sangre periférica del grupo tratado con el mitógeno anti-CD28 MAK frente a los animales de control, a los que se suministró el anti-CD28 MAK convencional o solamente una solución salina tamponada con fosfato (PBS), que se empleó en tanto solución para el MAK. Este avance se mantuvo hasta el último punto de medición (día 36). Si se consideran solamente los linfocitos T procedentes de las células T maduras RT7^b positivas CD4, el efecto terapéutico del mitógeno anti-CD28 MAK resulta más dramático en comparación con el grupo de control. La causa de esto viene a ser que con el avance del tiempo se generan en el timo nuevas células T RT7^b negativas. El origen de estas células T es independiente de la estimulación de anticuerpos y, en todo caso no fue afectado por estos.

La figura 5 muestra el experimento 2, es decir, la reconstitución con células T CD4 y CD8 maduras. De acuerdo al esquema de la figura 3 se transfirieron 5×10^6 RT7^b linfocitos T positivos que consisten aproximadamente en 3/4 de células T CD4 y 1/4 de células T CD8. La cantidad de células T en sangre fue determinada como se describe en la figura 5. Cada una de las líneas representa un animal experimental. Los símbolos abiertos muestran el tratamiento con PBS, los cerrados el realizado con el mitógeno anti-CD28 MAK JJ316. Ambos gráficos muestran el desarrollo de la cantidad de células RT7^b positivas derivadas del inóculo celular T maduro, las dos inferiores el RT7^b negativo originado nuevamente en el timo. Los resultados muestran un rápido aumento de los linfocitos T maduros CD4 y CD8 por medio del tratamiento con mitógeno anti CD28 MAK (arriba). La nueva formación de células T (abajo) que posteriormente tuvo lugar no fue afectada por el tratamiento.

Ejemplo 4

Calidad de los linfocitos T reproducidos

En este ejemplo se muestro que los linfocitos T que se reprodujeron por medio de la terapia con anti-CD28 son longevos y funcionan bien.

La figura 6 muestra el plano de ensayos y la demostración de la proliferación de células T en los nódulos linfáticos por medio de anti-CD28. El tratamiento de los animales de ensayo se corresponde primeramente al esquema ilustrado en la figura 4 del experimento 2. Tras 55 días se sacrificó a los animales. El análisis de los linfocitos en los nódulos linfáticos dio por resultado que tras el tratamiento PBS tan sólo el 6% (3.33 del 47.9%) se derivó del inóculo inyectado al principio del ensayo de células maduras RT7^b positivas; el resto de las células T CD4 eran nuevas y se formaron en el timo (RT7^b negativo). Por el contrario las células T CD4 RT7^b positivas supusieron en el grupo sometido a terapia el 40% aproximadamente (22.26 de 56.42%). Los "dot plots" representados muestran por su parte los resultados del análisis de citofotometría de flujo descrito en el ejemplo 3. Se emplearon anticuerpos marcados fluorescentemente frente a CD4 (abscisa) y RT7^b (ordenada). Este resultado muestra que la terapia llevada a cabo al principio del ensayo (día 0 y día 13) tiene por consecuencia una repoblación duradera con los linfocitos T reproducidos por medio de la terapia con anti-CD28. Los linfocitos T RT7^b positivos y RT7^b negativos se separaron entre sí. Siguió después un enriquecimiento de las células T por medio de una pasada a través de fibra lanosa de nylon. Así pues las células T RT7^b positivas se cargaron con MAK específico de RT7^b en que se enlazaron unas bolitas paramagnéticas de hierro. Por medio de un imán tuvo lugar entonces la separación de las células T RT7^b positivas y RT7^b negativas. El sistema aquí empleado (y muy extendido en el mundo de la investigación) de la empresa Miltenyi Biotech (sita en Bergisch-Gladbach) se llama MACS (Magnetism Activated Cell Sorting). Las células T RT7^b positivas y RT7^b negativas así separadas se sometieron a un análisis funcional (figuras de 7 a 9).

La Figura 7 muestra la proliferación *in vitro* de las células T expandidas terapéuticamente *in vivo*. Las células ilustradas en la figura 6, RT7^b positivas aisladas, es decir las células T derivadas del inóculo originalmente maduro así

como las células T RT7^b negativas ("RT7³" producidas nuevamente en el timo) se comprobaron en un ensayo estándar de proliferación en cuanto a su reactividad frente a la coestimulación convencional. A este respecto se cultivaron células T 1x10⁵ en 0,2 ml de medio de cultura en placa de microtiter de cuenco 96 durante dos días a 37°C, seguido de un pulso de 16 horas con timidina marcada 1 μ Ci³H. La incorporación de ésta en el ADN se representa en tanto cpm x 10⁻³ y es una dimensión admisible para la actividad de la división (proliferación) de las células. Las cuatro barras superiores muestran enfoques en los que las células T fueron estimuladas por medio de un MAK específico (R73) de receptor de antígeno celular T (TCR) así como adicionalmente por medio de 15 MAKJJ319 específico de CD28 (coestimulación clásica). A este respecto se reprodujeron las señales fisiológicas en la activación de las células T. Las cuatro barras muestran la reacción de las cuatro poblaciones diferentes de células T que fueron comprobadas, es decir sendas RT7^b procedentes del inóculo originario de células T maduras así como las células RT7^a nuevamente generadas en el timo de ambos grupos de animales, a saber, el sometido a la terapia con CD28 y el grupo de animales de control tratados con PBS. El grupo inferior ("medio") muestra las mismas células sin estimulación. Aquí no se observó proliferación alguna. El ensayo muestra que incluso tras la expansión extensa *en vivo* por medio de la terapia con CD28 se mantenía la capacidad de reaccionar de los linfocitos.

La figura 8 muestra que las células T generadas *en vivo* por medio de la terapia anti-CD28 reaccionan frente a antígenos extraños transplantados. El enfoque del ensayo se corresponde en principio al ilustrado en la figura 7 excepto en que aquí la estimulación de las células T no se lleva a cabo con ayuda de anticuerpos monoclonales, sino añadiendo células estimuladoras del tronco LEW. Se trata de 10⁵ de células irradiadas de nódulos linfáticos por cuenco. La irradiación se lleva a cabo para que las células estimulantes mismas no cooperen a la proliferación medida. El tronco LEW fue seleccionado por diferenciarse por sus más potentes antígenos de trasplatación (de acuerdo al antígeno HLA del ser humano) respecto del tronco PVG: LEW expresa RT1^l, mientras que PVG, por el contrario, RT1^c. Para determinar un valor básico se aplicó también al grupo inferior células de nódulos linfáticos irradiadas PVG en tanto estimuladores. El resultado muestra que de nuevo los cuatro grupos comprobados de linfocitos T reaccionan a los antígenos de trasplatación extraños con proliferación; por lo demás se muestra un aumento de la reacción de fondo en las células T tanto del grupo sometido a terapia como del grupo de control, que procede del inóculo originario de células T (RT7^b positivas) maduras aplicado.

La figura 9 muestra que las células T proliferadas *en vivo* por medio de la terapia con anti-CD28 se encuentran en disposición de producir citocina. Como se ilustra en la figura 7, las células T maduras expandidas (RT7^{b+}) y las maduras nuevamente en el timo (RT7^{b-}, es decir las RT7^a) de las sometidas a terapia anti-CD28 y las controladas *in vitro* se activan por medio de coestimulación. Tras 5 días se colectaron las células y se sometieron a comprobación (según un protocolo que puede consultarse en el catálogo de la empresa Pharmingen/Becton Dickinson) en cuanto a la aptitud reproductiva de la citocina gamma-interferón e interleucina-4. Estas dos citocinas se seleccionaron por ser características de ambos tipos funcionales diversos de células T de Effektor CD4 que pueden originarse tras la activación: las células estimulantes de la inflamación TH1 producen interferón-gamma, las células TH2 supresoras de la inflamación y estimuladoras de la producción de anticuerpos TH2 producen IL-4. En cuanto al método demostrativo se trata de una pigmentación intracelular de citocina que se evalúa por medio de la citofotometría de flujo. Cada punto que se encuentre por encima de la línea de separación horizontal muestra una célula que sintetiza la citocina indicada en la ordenada. Es notorio que los cuatro grupos de linfocitos T contienen una fracción de células de semejante tamaño que pueden producir interferón-gamma. Por contrario las células que producen IL-4 se encuentran solamente en aquellos linfocitos T que fueron reproducidos *en vivo* por medio de la terapia con mitógeno anti-CD28 (dot plot abajo a la derecha). El experimento muestra que por medio de la expansión *en vivo* con mitógeno MAK específico de CD28 no se pierde la capacidad de sintetizar citocina del tipo TH1. El que se den células fenotipo TH2 (productoras W-4) no es sorprendente.

Ejemplo 5

50 Proliferación de células T por medio de la terapia con CD28 en ratas con extirpación de timo

El enfoque de ensayo se corresponde al ilustrado en la figura 3 con dos variantes: 1. Los animales recibieron solamente una inyección de 1 mg de MAK el día 0; 2. A los animales se les extirpó el timo antes de ser sometidos a irradiación y reconstitución a fin de evitar la remaduración de las células T en el timo. De este modo se reproduce la situación de la linfopenia en personas adultas, por ejemplo tras una quimioterapia o radioterapia. Las personas maduras a penas pueden producir nuevas células T en el timo, ya que tras la pubertad el funcionamiento del timo concluye prácticamente.

La figura 10 muestra el aumento de la cantidad de células T en la sangre. No es necesario diferenciar entre células RT7^b positivas y negativas, ya que todas las células T son RT7^{b+} (falta de nueva producción de células T RT7^{b-} en el timo). Los tres gráficos muestran las células T así como sus subpoblaciones de CD4 y CD8 de tres animales terapeutizados con anti-CD28 (símbolos rellenos) y tres animales tratados con un anticuerpo de control del mismo tipo (símbolos abiertos) cada uno. Como puede reconocerse fácilmente el tratamiento de una dosis de 1 mg del mitógeno anti-CD28 mAk JJ316 tuvo como consecuencia una recuperación rápida de la cantidad de células T.

En la figura 11 puede reconocerse que las células reproducidas *en vivo* por medio de la terapia con anti-CD28 pueden inmunizarse. Los animales referidos en la figura 10 fueron inmunizados durante cuatro semanas tras el tratamiento con el antígeno modelo Keyhole Limpet hemocianina (KLH) a fin de someter a prueba la capacidad de

funcionamiento de los linfocitos. Tras cuatro semanas más se sacrificaron los animales y las células de los nódulos linfáticos fueron sometidas a la comprobación de su aptitud de reaccionar ante la estimulación de KLH proliferando. Una prueba de este tipo se denomina de antígeno de “Recall”; semejantes pruebas se emplean, por ejemplo, con las personas a fin de comprobar el éxito de la inducción de la inmunidad T relativa a antígeno de vacuna como el toxoide tetánico. El sistema de comprobaciones se corresponde por principio general con el de las figuras 7 y 8, en todo caso para la estimulación se empleó el antígeno de vacuna KLH. Es algo claro que los animales de ambos grupos contaban con la inmunidad celular T contra KLH como consecuencia de la vacuna. Esto es igual de intenso en ambos grupos, ya que para la prueba *in vitro* la cantidad de células por cuenco de cultivo se iguala de modo que las diferencias en la expansión celular T terapéutica previa se suprimen por medio del mitógeno anti-CD28 mAk.

La figura 12 muestra la producción de anticuerpos contra el antígeno modelo KLH. La producción de anticuerpos a través de los nódulos linfáticos B depende de la función de los linfocitos T CD4. De los animales inmunizados con KLH referidos en la figura 11 se tomó por este motivo sangre en los momentos ilustrados en la abscisa y fueron sometidos a comprobación relativa a la presencia de anticuerpos específicos de KLH en un Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Como muestra el gráfico superior todos los animales sometidos a terapia con anti-CD28 reaccionaron con la misma rápida cinética a la inmunización (símbolos rellenos) mientras que dos de los tres animales de control no mostraron reacción alguna; el tercero reaccionó de modo semejante al del grupo sometido a terapia si bien con cinética retardada (véase los gráficos de los resultados de ELISA de los días 7, 14 y 21; estos valores fueron medidos en una segunda prueba; la densidad óptica medida no es directamente comparable por este motivo con los gráficos superiores).

En un experimento que no se ilustra con ninguna figura se mostró que los animales T-linfopénicos sometidos a terapia con anti-CD28 rechazaban los trasplantes de piel ajena. El combate de las células infectadas con virus, de tumores y de bacterias intracelulares depende del funcionamiento de las células proinflamatorias TH1. Por causa de la presencia de las células TH2 productoras de IL-4 antiinflamatorio en los animales T-linfopénicos sometidos a terapia con CD28 hubo de tenerse en cuenta la posibilidad de que se suprimiera la inmunidad proinflamatoria, “de mediación celular”. Esto puede comprobarse partiendo de la capacidad de los animales de rechazar un trasplante de piel extraña. También esta reacción depende de TH1. A los animales sometidos a terapia con CD28 se les aplicó por ello un trasplante de piel del tronco LEW que expresa los alelos de RT1^l de los antígenos de trasplantación fuertes, mientras que los animales PVG sometidos a terapia portan RT1^c. A modo de control se transfirió un trasplante singénico PVG. Los ocho animales sometidos a terapia rechazaron la piel extraña, mientras que aquellos de tronco genéticamente idéntico la incorporaron. Ejemplar a este respecto fue, por una parte, el LEW necrótico y, por otra parte, el trasplante PVG bien vascularizado en un animal. Por término medio el rechazo en los animales sometidos a terapia sucedió más rápidamente que en los animales de control. Este resultado confirma que por medio de la terapia con anti-CD28 no se pierde la inmunidad mediada por línea.

Ejemplo 6

Aumento de la cantidad de granulocitos en la sangre de ratas tratadas con mAk anti-CD28

La figura 13 muestra una cinética de la cantidad de granulocitos tras el tratamiento con mAk anti-CD28 convencional (símbolos abiertos) y mitógeno (símbolos rellenos). Cada una de las líneas representa un animal. Las ratas LEW adultas recibieron 1 mg del mAk anti-CD28 mitógeno JJ316 o del mAk anti-CD28 JJ319 convencional aplicado intravenosamente. La cantidad de los granulocitos en la sangre periférica se constató en los momentos concretos por determinación de la cantidad total de leucocitos así como de la porción de granulocitos. Esta medición tuvo lugar con la citofotometría de flujo y partiendo de las propiedades de dispersión lumínica especial de los granulocitos. Como se muestra en la figura 13, en todos los animales que recibieron el mitógeno mAk anti-CD28 se observó un dramático aumento de la cantidad de granulocitos, al contrario que en el caso de los animales de control, a los que se suministró el mAk anti-CD28 convencional.

La figura 14 muestra un ejemplo del aumento de la cantidad de granulocitos en la sangre de los animales estimulados con CD28. Los leucocitos se sometieron a comprobación en cuanto a sus propiedades de dispersión lumínica por medio de una citofotometría. FSC significa *forward scatter* o dispersión de la luz hacia delante, SSC *sideward scatter* o bien la luz desviada 90°, que es una dimensión relativa a la granularidad de las células. Cada una de las líneas se representa por medio de un punto. La nube rotulada muestra los granulocitos, cuyo porcentaje es resultado directo de la medición; la cantidad de células añadidas por microlitro de sangre se calcula por medio de la cantidad anteriormente determinada de leucocitos por microlitro de sangre. Se reconoce un aumento (que sobrepasa el límite de significancia) de la cantidad de granulocitos tras el tratamiento con mAk “directo” específico de CD28.

Ejemplo 7

Aumento de la cantidad de monocitos tras el tratamiento con mAk anti-CD28 convencional y mitógeno

Las ratas LEW adultas recibieron 1 mg del mitógeno anti-CD28 mAk JJ316 (símbolos rellenos) o del convencional anti-CD28 mAk JJ319 (símbolos abiertos) intravenosamente. La cantidad de los monocitos en la sangre periférica fue constatada en los momentos previstos por determinación de la cantidad total de leucocitos así como su porción de

monocitos. Esta medición se realizó con la citofotometría de flujo partiendo de las propiedades de dispersión lumínica especiales de los monocitos así como de la expresión del antígeno Mac-1, que fue constatada por medio del MAX 0X42 fluorescentemente marcado. Como se muestra en la figura 15, en todos los animales que recibieron el mitógeno anti-CD28 mAk se observó un dramático aumento de la cantidad de monocitos, al contrario que en los animales de control, los cuales recibieron el anti-CD28 mAk convencional.

Ejemplo 8

10 *Aumento de los granulocitos y monocitos en la sangre de ratas irradiadas, con médula ósea reconstituida, por medio de la terapia con anti-CD28*

Tras afectación del sistema hematopoyético, por ejemplo por causa de quimioterapia o radioterapia, han de regenerarse también los granulocitos y monocitos del sistema inmunológico congénito o natural. Puesto que los linfocitos T 15 activados pueden estimular esto mismo, por ejemplo por medio de producción de citocina (G-CSF, GM-CSF) y puesto que en los animales sanos se ha observado un aumento de la cantidad de los granulocitos y monocitos en la sangre tras el tratamiento con anti-CD28, se sometió a comprobación la capacidad del mitógeno MAK anti-CD28 de acelerar la recuperación de esta población de leucocitos.

20 La figura 16 muestra el proceso cronológico de la cantidad de granulocitos y monocitos en la sangre de ratas irradiadas con médula ósea reconstituida tras la terapia con anti-CD28.

A las ratas obtenidas por consanguineidad PVG se les extirpó primeramente el timo a fin de evitar que remaduraran las células T (de este modo se reproduce la situación de la linfopenia en personas, por ejemplo tras una quimioterapia o radioterapia; en las personas adultas el funcionamiento del timo ha concluido prácticamente). Fueron sometidas a 25 los efectos de los rayos gamma procedentes de una fuente de cesio de tal modo que el sistema generador de sangre, incluidos los glóbulos blancos, quedó destruido. En tanto fuente de producción de células madre recibieron los animales células de médula ósea del mismo tronco genético consanguíneo intravenoso. Adicionalmente recibieron 5×10^6 células T CD4 o 5×10^5 células T (CD4 y CD8) del tronco genético consanguíneo PVG.RT7^b. Los animales de este tronco son idénticos al tronco receptor PVG excepto en la molécula de la superficie de los leucocitos RT7, de la 30 cual expresan el alelo b en lugar del a. Por medio del MAK específico de RT7b marcado fluorescentemente pueden identificarse las células T de los animales que procedan de las células T maduras inyectadas. La cantidad de células T inyectadas se corresponde aproximadamente a una milésima de la cantidad de células T maduras de una rata adulta, de modo que nos encontramos ante el modelo de una drástica linfopenia T. A los animales se les suministró el día 0 1 mg de JJ316 o de JJ319.

En el momento indicado se les tomó sangre y se determinó la cantidad de células de acuerdo al ejemplo 7. De la figura 16 se desprende una recuperación más rápida de la cantidad de monocitos y granulocitos con el mAk aplicado según la invención, a lo cual, en el caso de los granulocitos, se encontró una reacción excedente los primeros días tras 40 el tratamiento, la cual se normalizó de nuevo.

La figura 17 muestra datos relativos a la proporción de granulocitos en la sangre de ratas irradiadas con médula ósea reconstituida tras la terapia con anti-CD28. En tanto ejemplo se muestra una medición de la proporción de granulocitos siete días tras el comienzo de la terapia. El método se corresponde al descrito en el ejemplo 3.

45

Ejemplo 9

50 *Estimulación en monos rhesus con un mitógeno de anticuerpo específico de CD28*

La figura 18 muestra el plano del ensayo. A dos monos adultos rhesus se les suministró intravenosamente una dosis de 5 mg por kg de peso corporal de un mitógeno de mAk específico de CD28. A fin de poder reconocer a tiempo el efecto tóxico que posiblemente pudiera darse la dosis se repartió en tres subdosis de 0,25, 1,0 y 3,75 mg/kg de peso corporal que fueron aplicadas en el espacio temporal de un día. El animal 1 no fue tratado, el animal 2 fue 55 infectado 22 meses antes con un virus apatógeno (SIV_{Δ^{nef}}). Esta infección no desempeñó ninguna función respecto de los resultados aquí obtenidos y solamente se menciona por de la exhaustividad. El animal 2, además, fue inmunizado dos semanas antes del tratamiento con anticuerpos con un antígeno modelo KLH. Ninguno de los animales mostró reacción tóxica perceptible a la infusión de anticuerpos. En los momentos mostrados se les tomó a los animales sangre destinada a los exámenes que describimos seguidamente.

60

La figura 19 muestra la expresión Ki-67 en células T de un mono rhesus estimulado con CD28 (animal 2). La molécula Ki-67 se expresa en núcleos de células que se encuentran en ciclo celular, es decir, que se están dividiendo. Como muestra la figura, antes del tratamiento se encontraba aproximadamente el 5% de las células T CD4 y el 5% de las CD8 en fase de ciclo celular. Tras el tratamiento con CD28 (día 0) aumentó la frecuencia primeramente al 20, luego 65 al 45% en ambas poblaciones y, después, se precipitó regresando al 10%. Este resultado muestra que la estimulación *en vivo* con CD28 es efectiva en cuanto a la proliferación de las células T CD4 y CD8.

ES 2 327 611 T3

Las figuras de 20 a 22, que son esenciales en cuanto a la invención, muestran finalmente el aumento que puede obtenerse de la cantidad de granulocitos, monocitos y trombocitos en la sangre periférica de monos rhesus sometidos a terapia con anti-CD28. Los esquemas sanguíneos se obtuvieron en un laboratorio hematológico con un aparato CellDyn 4000 y se representan aquí en tanto células/microlitros de sangre en proceso cronológico. La figura 20 manifiesta el aumento de la cantidad granulocitos neutrófilos en la sangre periférica de monos rhesus sometidos a terapia con anti-CD28.

Ambos animales mostraron un dramático aumento en comparación al valor inicial. Esto mismo se obtuvo de nuevo con el animal 1 tras un mes, con el animal 2 un poco después. Gracias a la terapia puede ser innecesario el tratamiento habitual con G-CSF en la trasplatación de médula ósea. La figura 21 demuestra el aumento de la cantidad de monocitos en la sangre periférica de monos rhesus sometidos a terapia con anti-CD28. En ambos animales se observó un aumento considerable respecto del valor inicial con igualación lenta al valor normal durante los dos meses siguientes. La figura 22 demuestra el aumento de la cantidad de monocitos en la sangre periférica de monos rhesus sometidos a terapia con anti-CD28. Ambos animales mostraron un dramático aumento en comparación al valor inicial. Esto mismo se obtuvo de nuevo con el animal 1 tras un mes, con el animal 2 algo antes.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Empleo de anticuerpos monoclonales específicos de CD28 y linfocitos T de varios subgrupos a todos los sub-
grupos sin ocupación de un receptor de antígeno de linfocitos T y, por ende, activación antigénica específica para la
producción de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de enfermedades en que se dé una reducción de
la cantidad de células sanguíneas, que no porten CD28, a lo cual la enfermedad ha de adscribirse al grupo conformado
por “granulocitopenia, especialmente neutropenia y monocitopenia, trombocitopenia, anemias aplásticas, deficien-
10 cia de la médula ósea con aplasia/hipoplasia de la médula ósea misma, pancitopenia, anemia de Fanconi, anemias
aplasticas adquiridas, especialmente anemia aplástica idiopática y anemias aplásticas secundarias así como anemia,
trombocitopenia y/o granulocitopenia en casos de leucemia aguda”.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

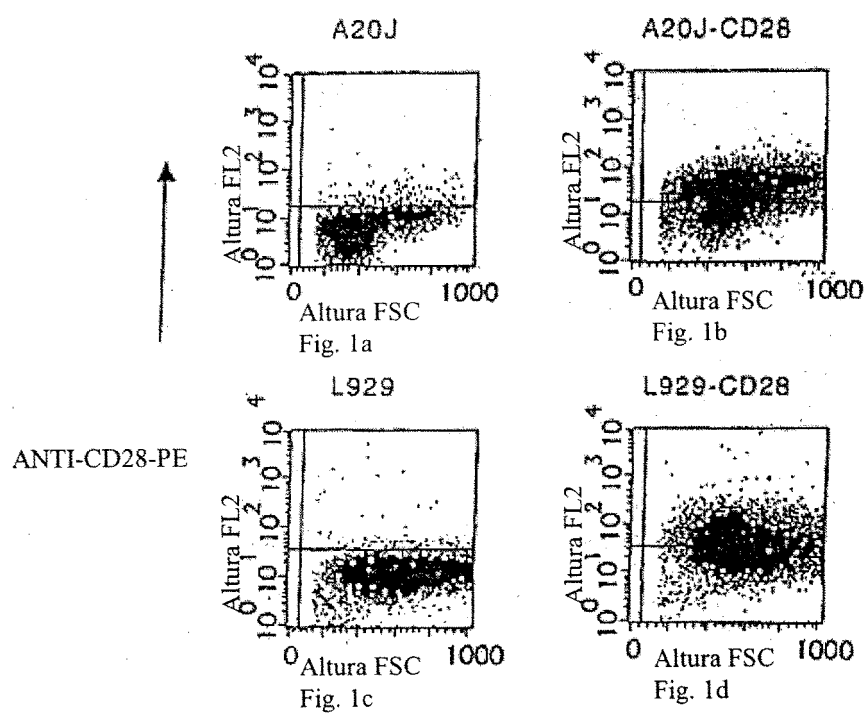


FIG. 2a

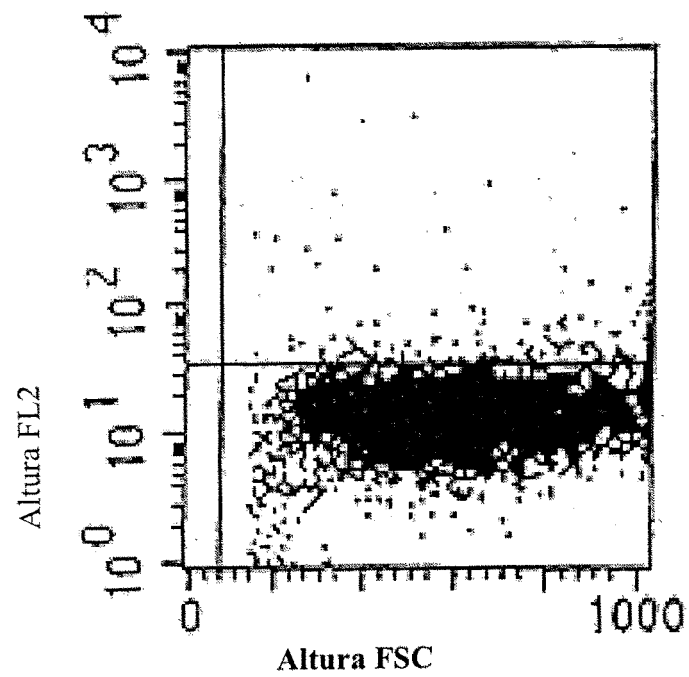


FIG. 2b

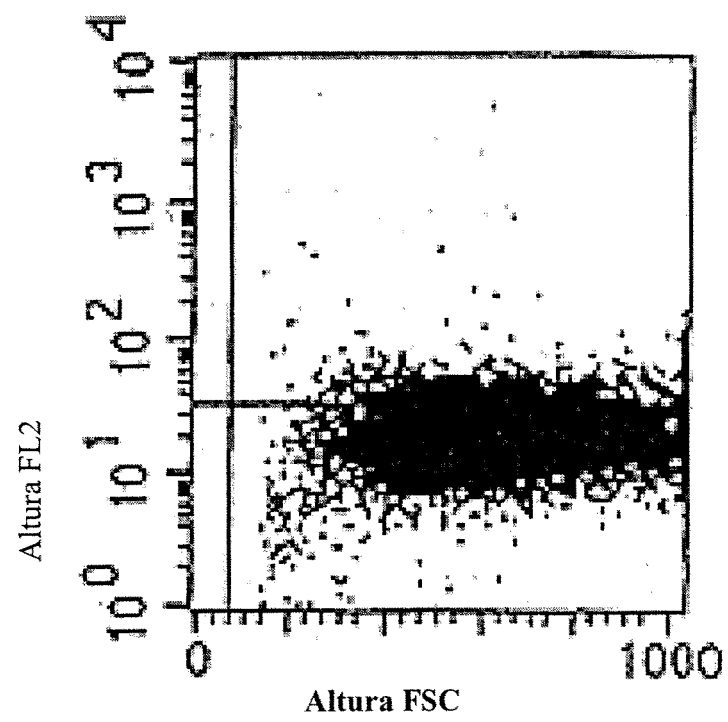


FIG. 2c

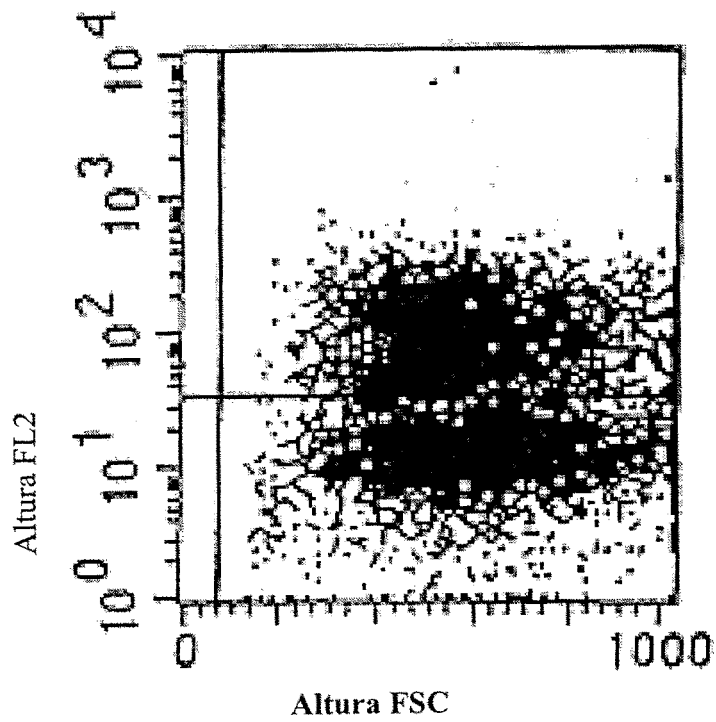


FIG. 3

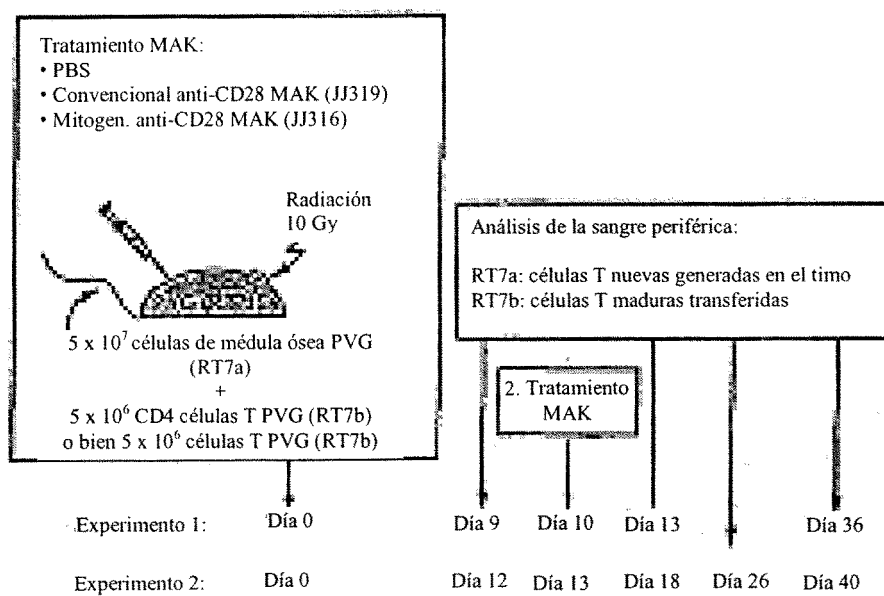


FIG. 4

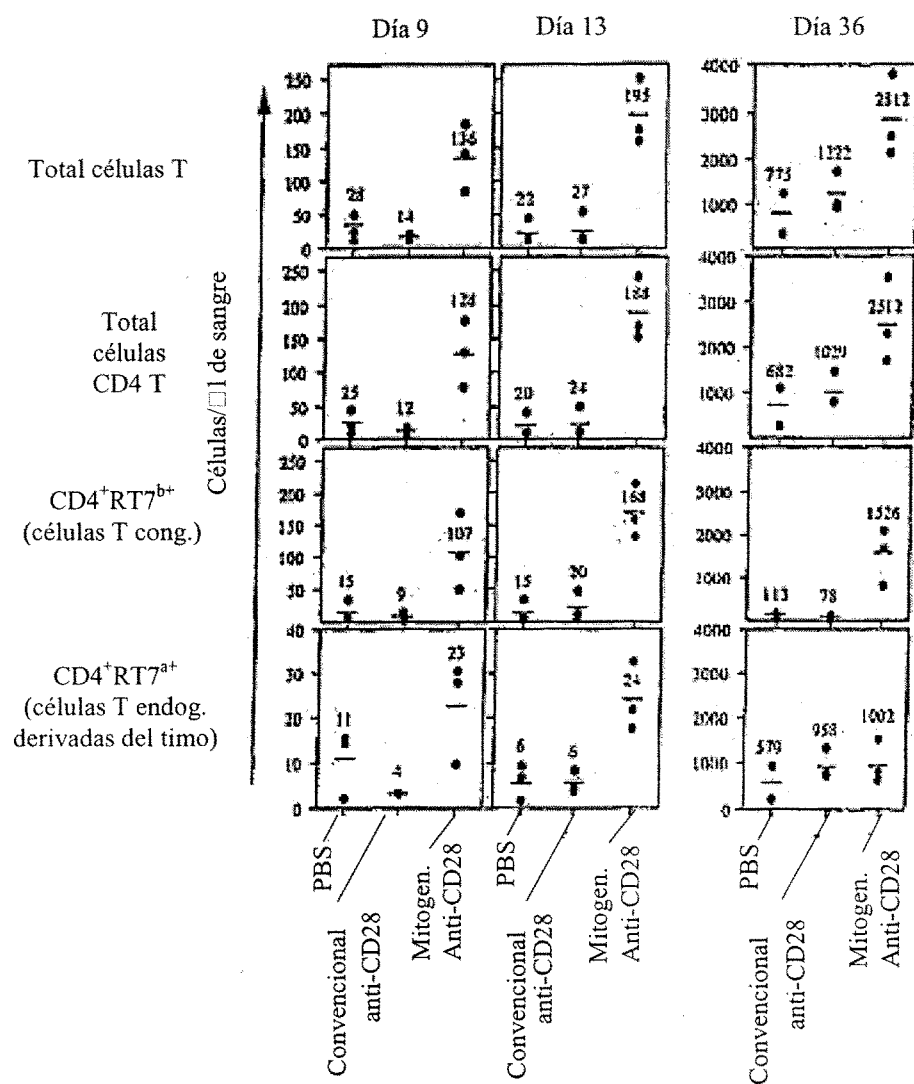


FIG. 5

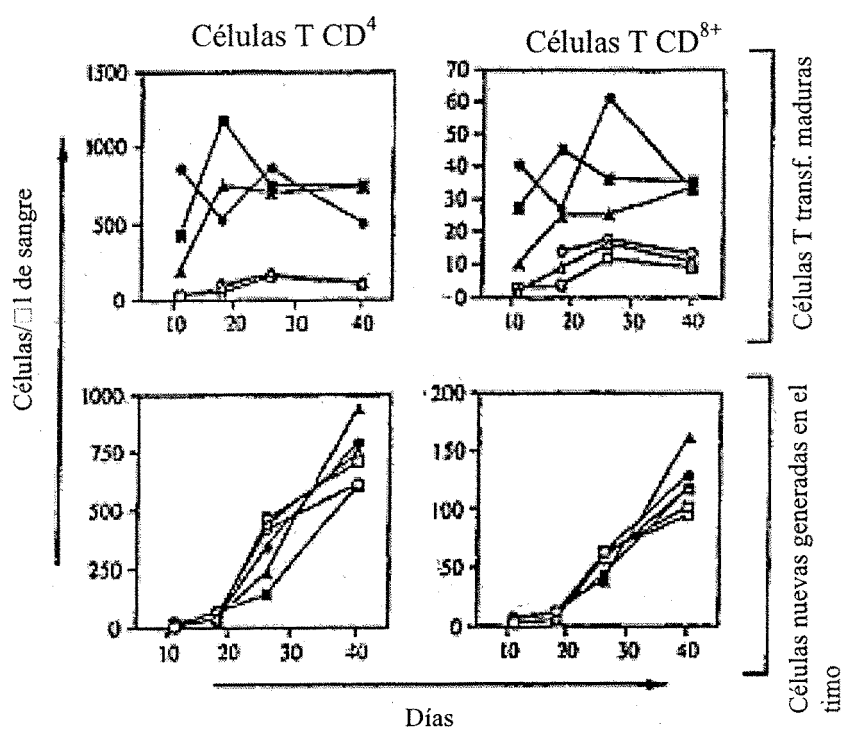


FIG. 6

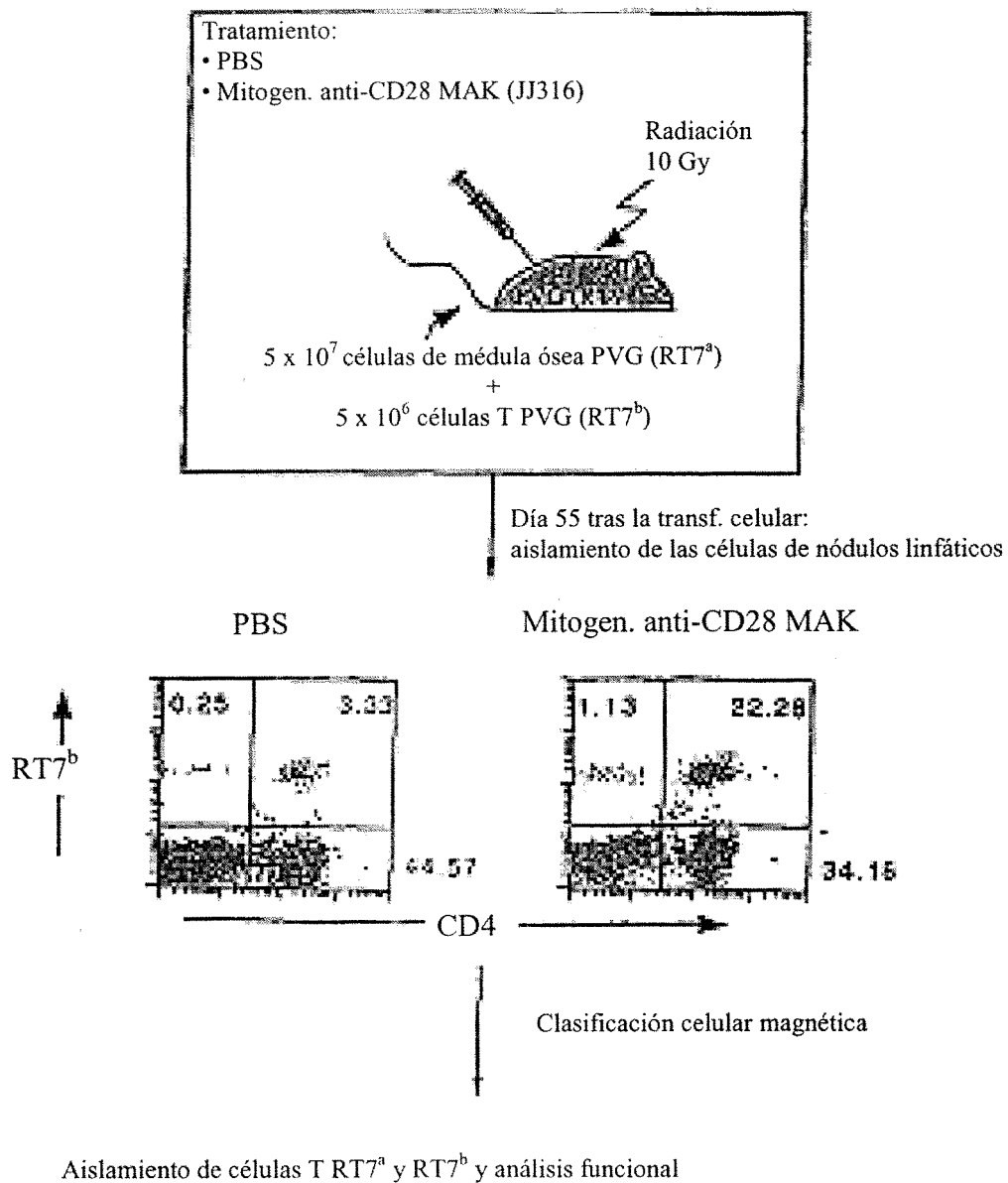


FIG. 7

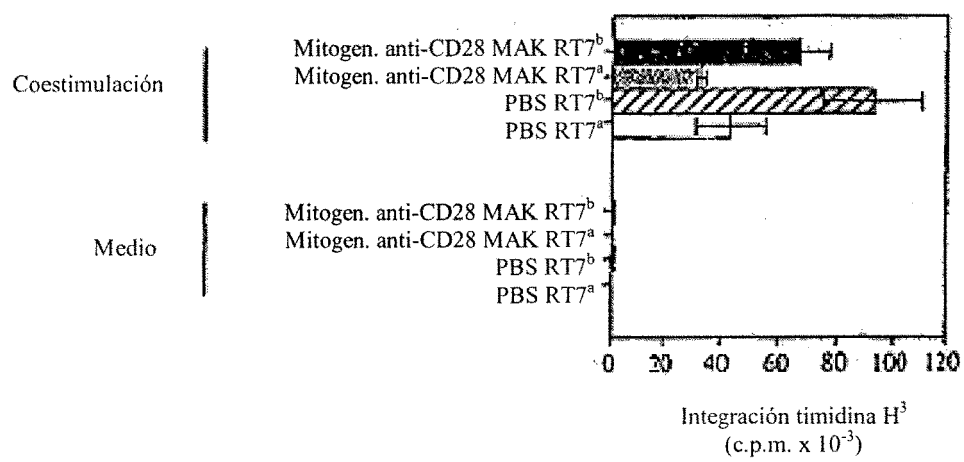


FIG. 8

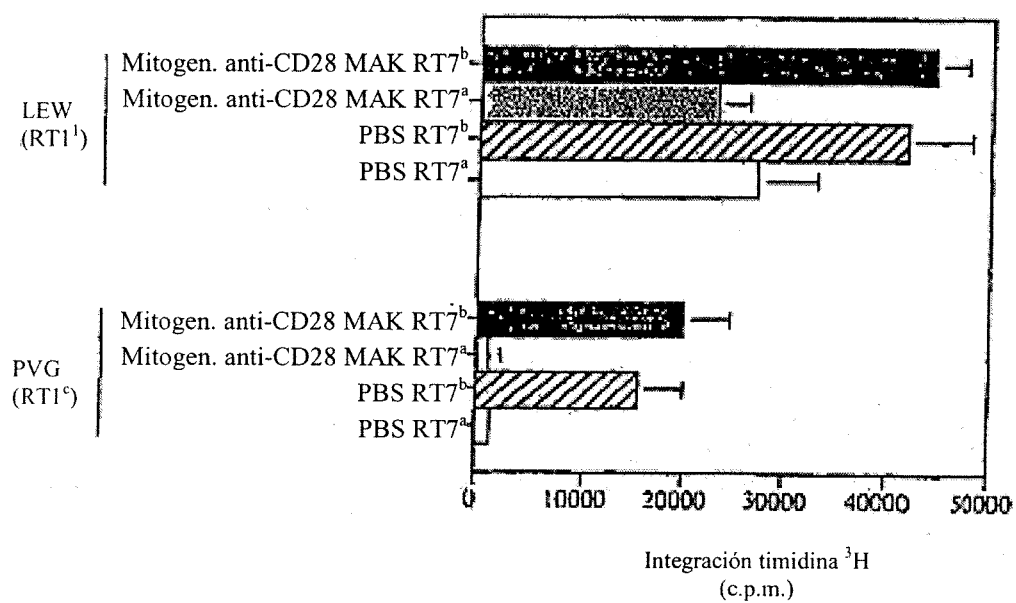


FIG. 9

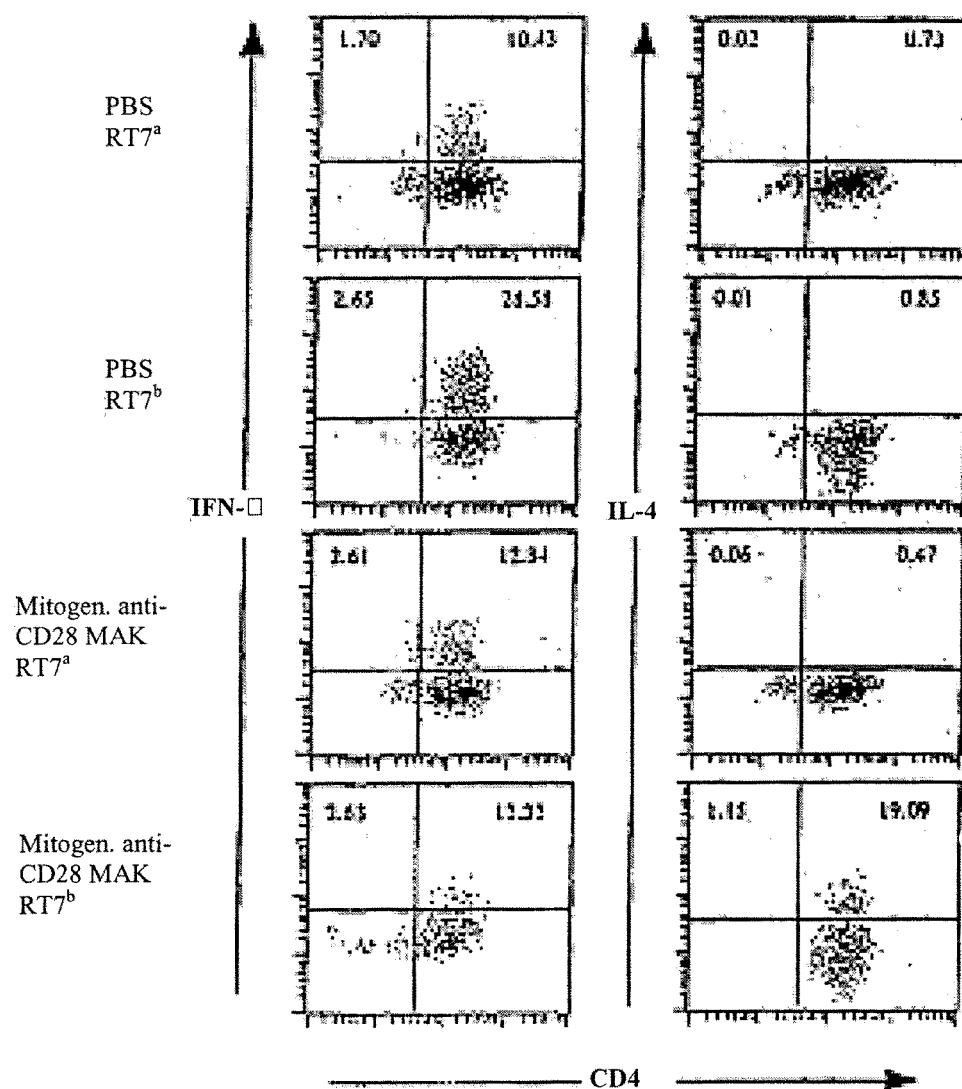


FIG. 10

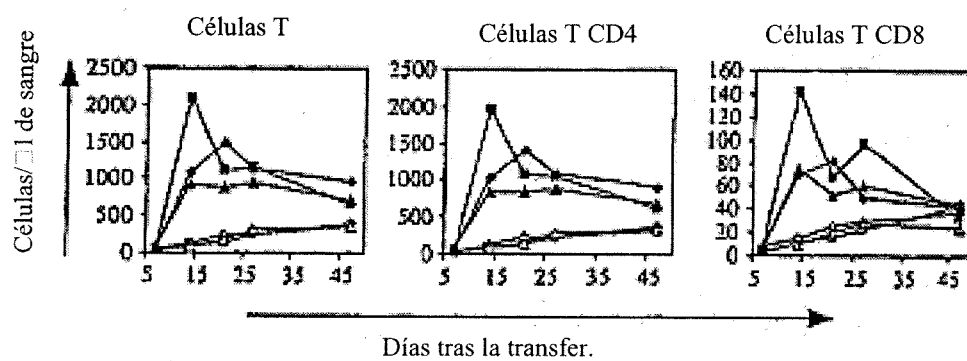


FIG. 11

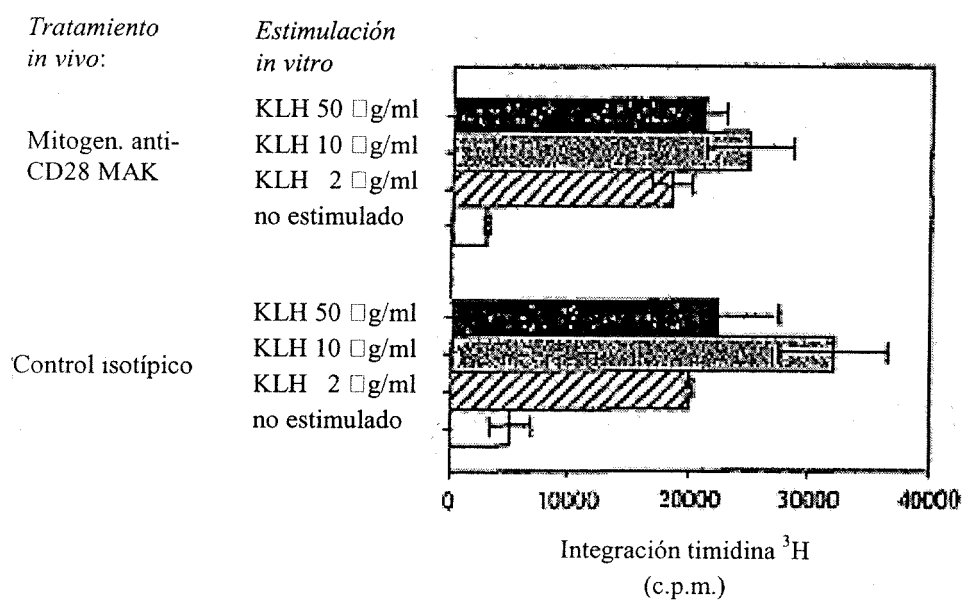


FIG. 12

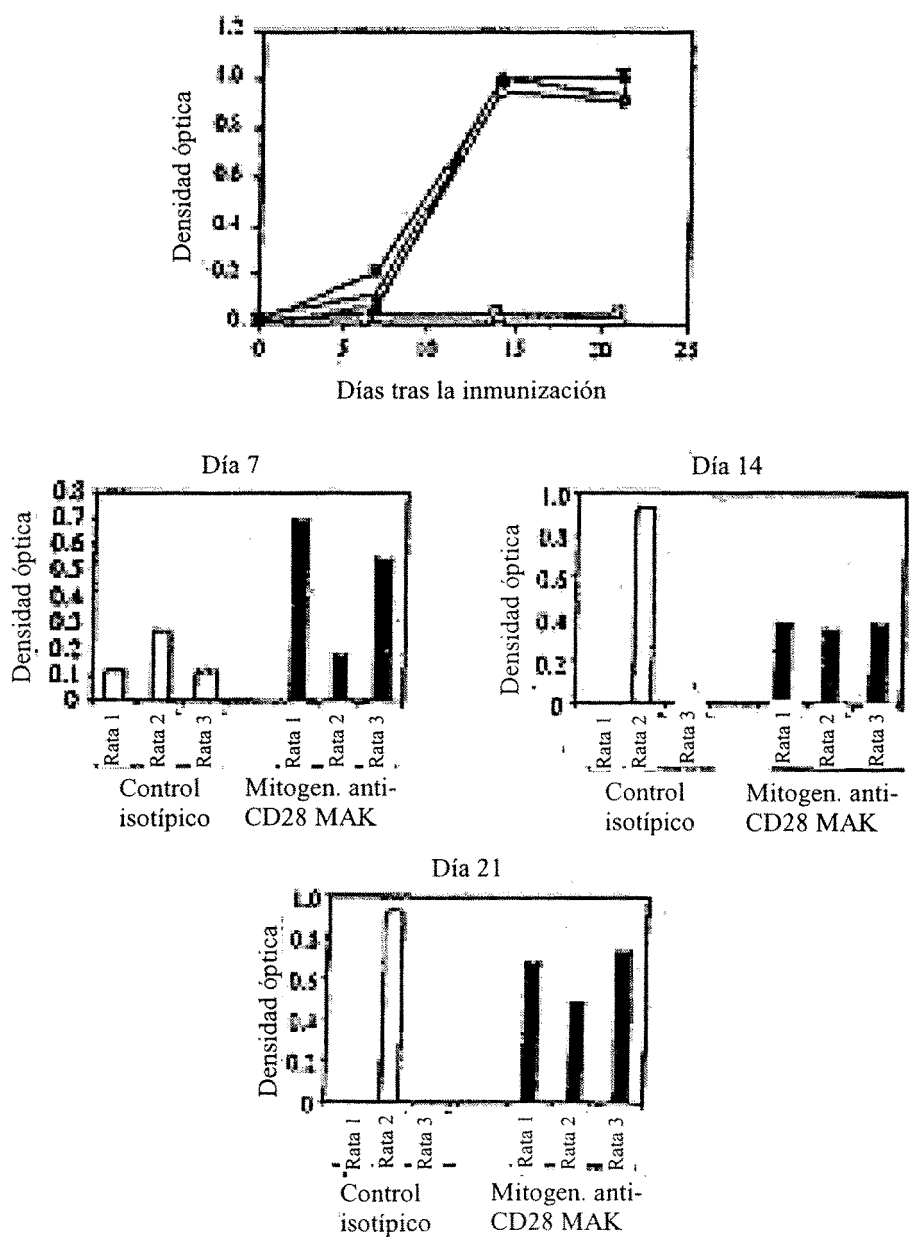


FIG. 13

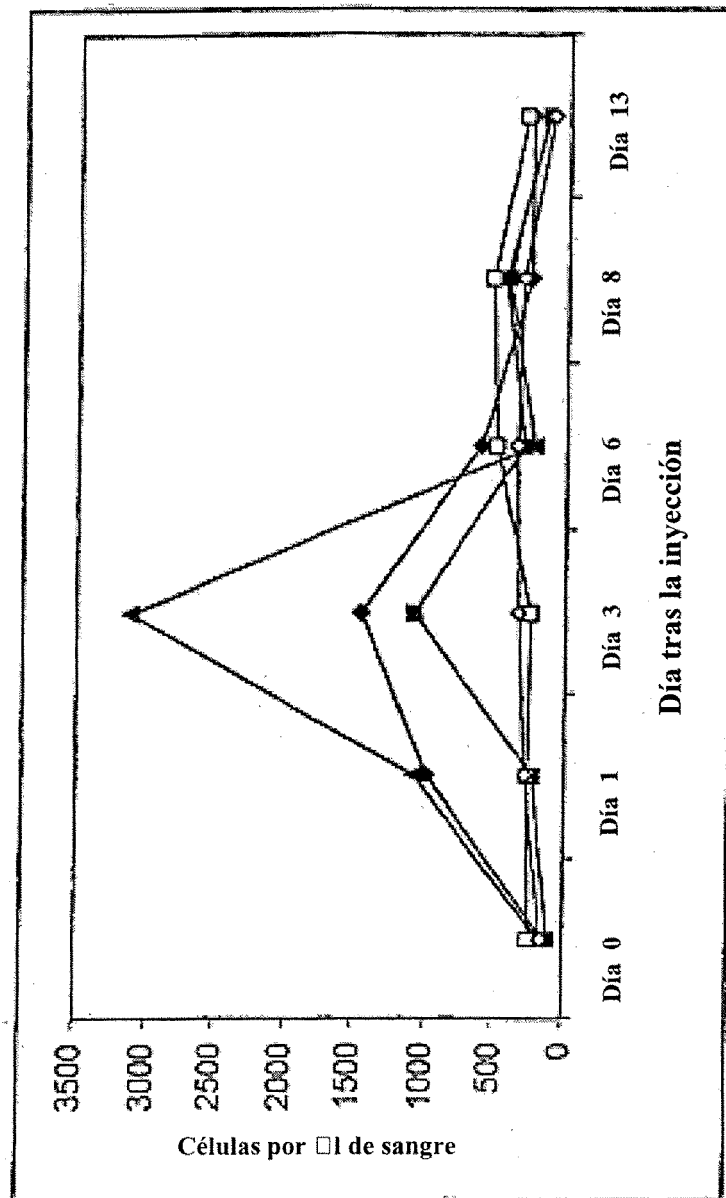


FIG. 14

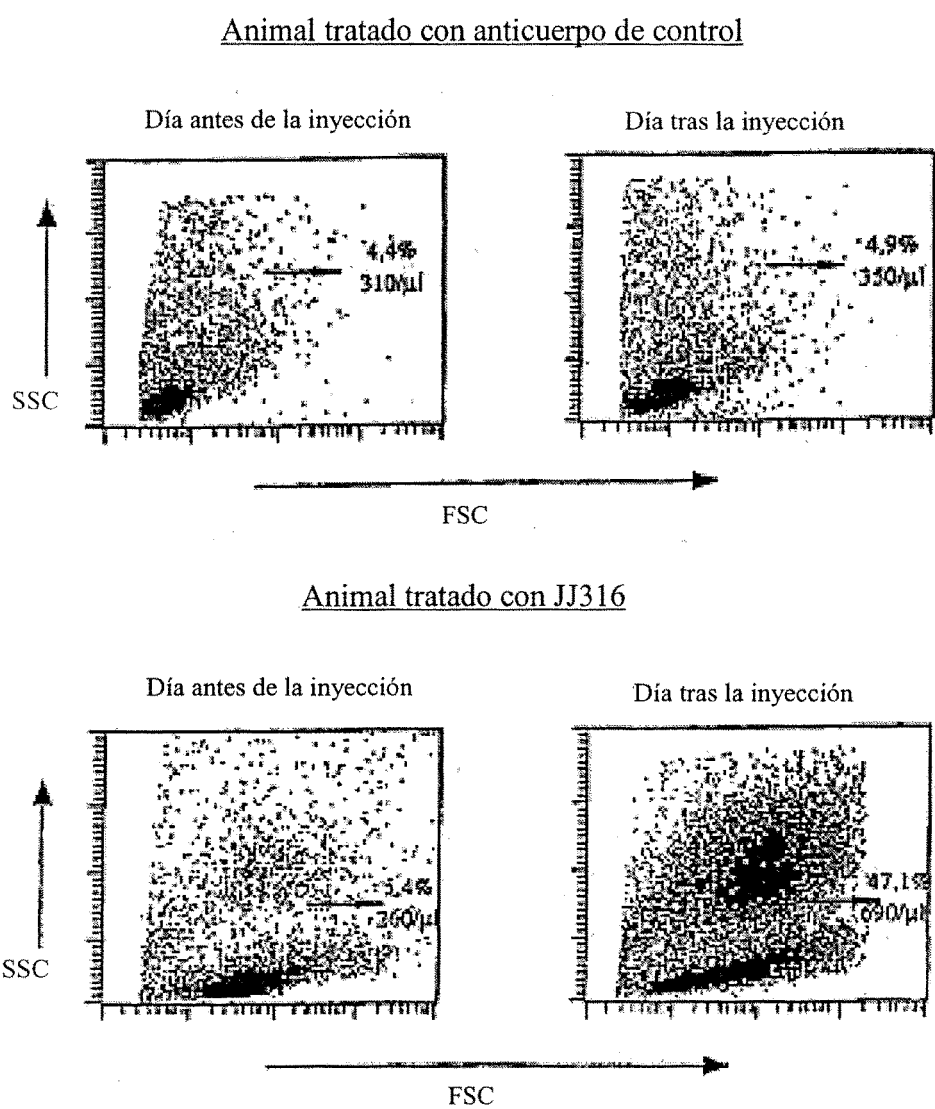


FIG. 15

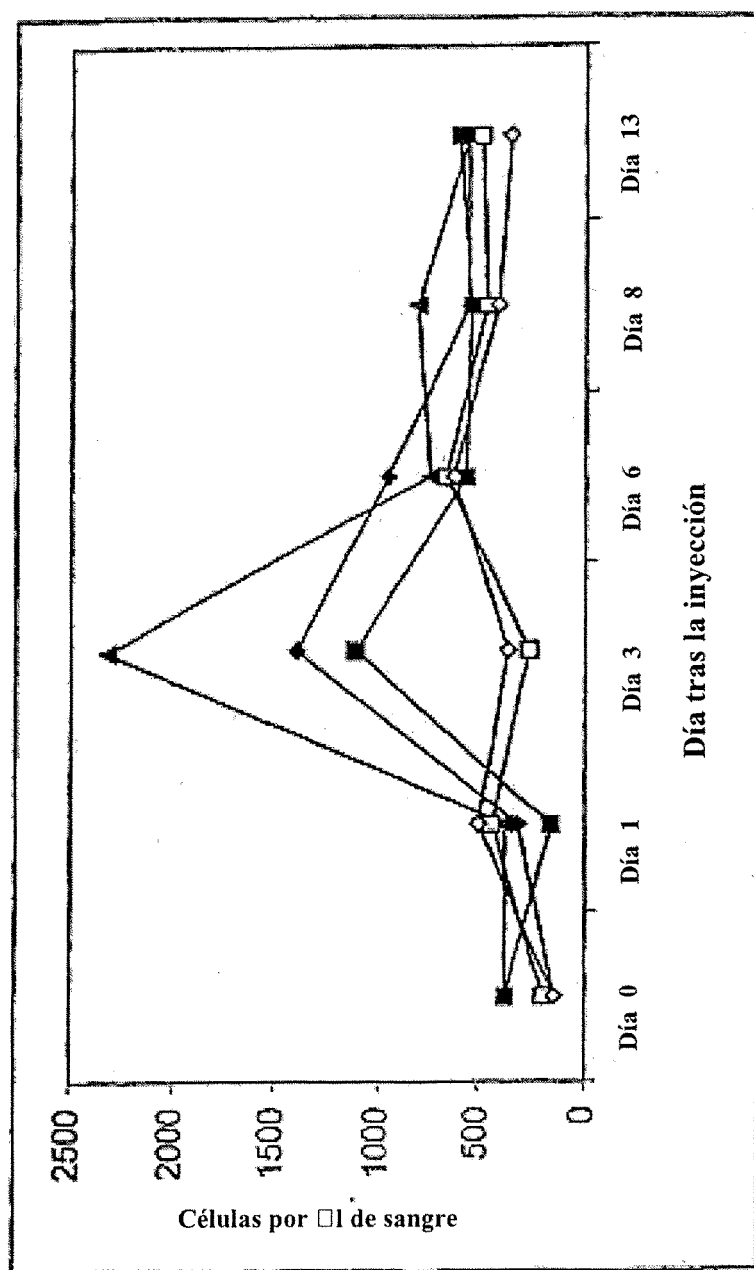


FIG. 16

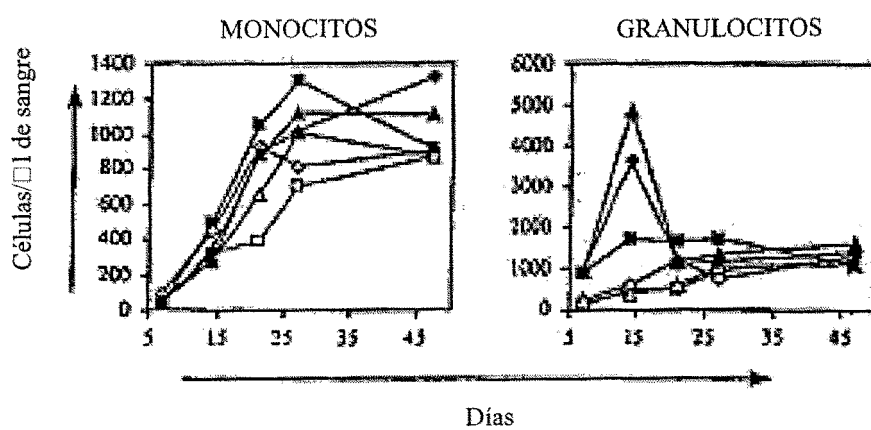


FIG. 17

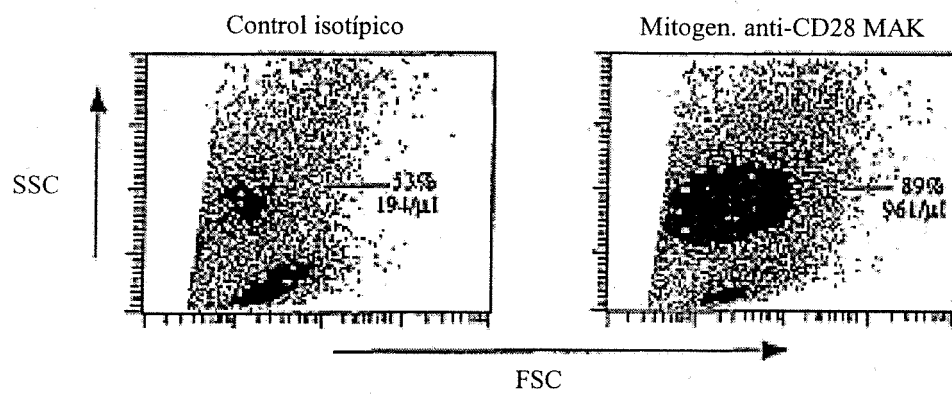


FIG. 18

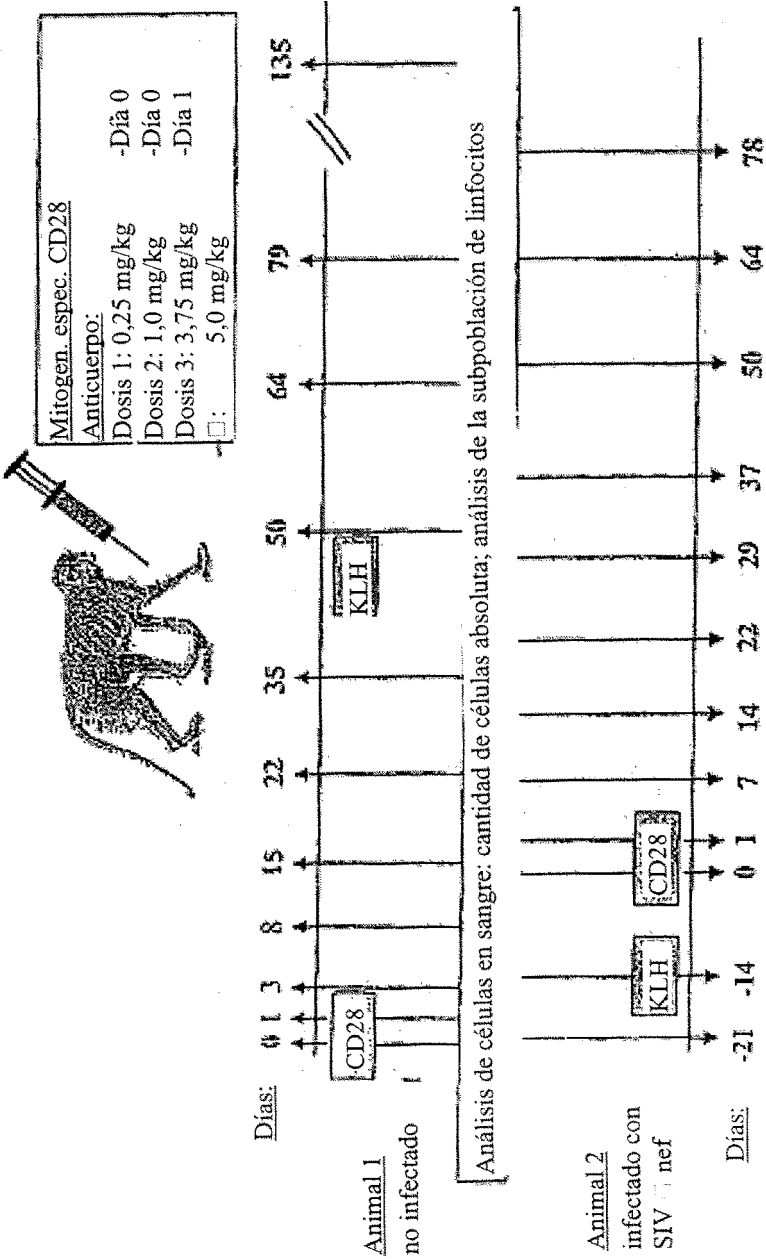


FIG. 19

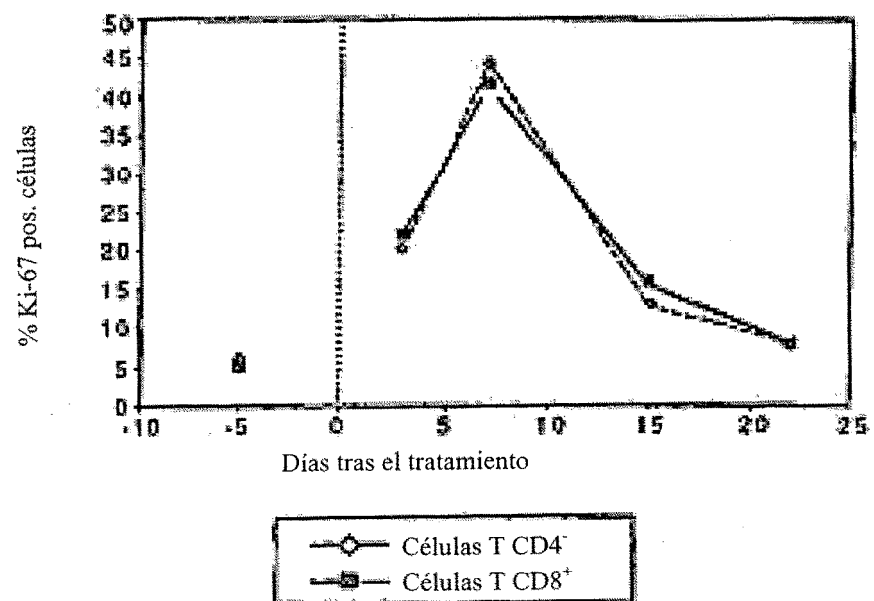


FIG. 20

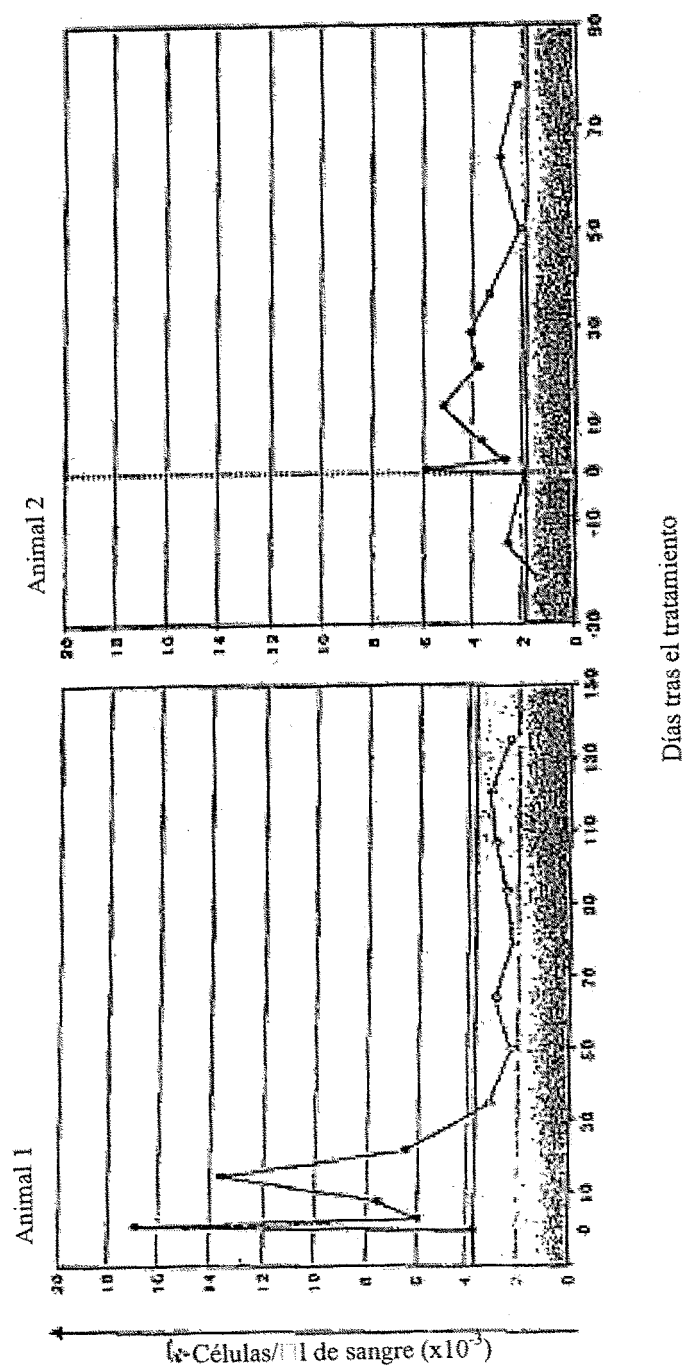


FIG. 21

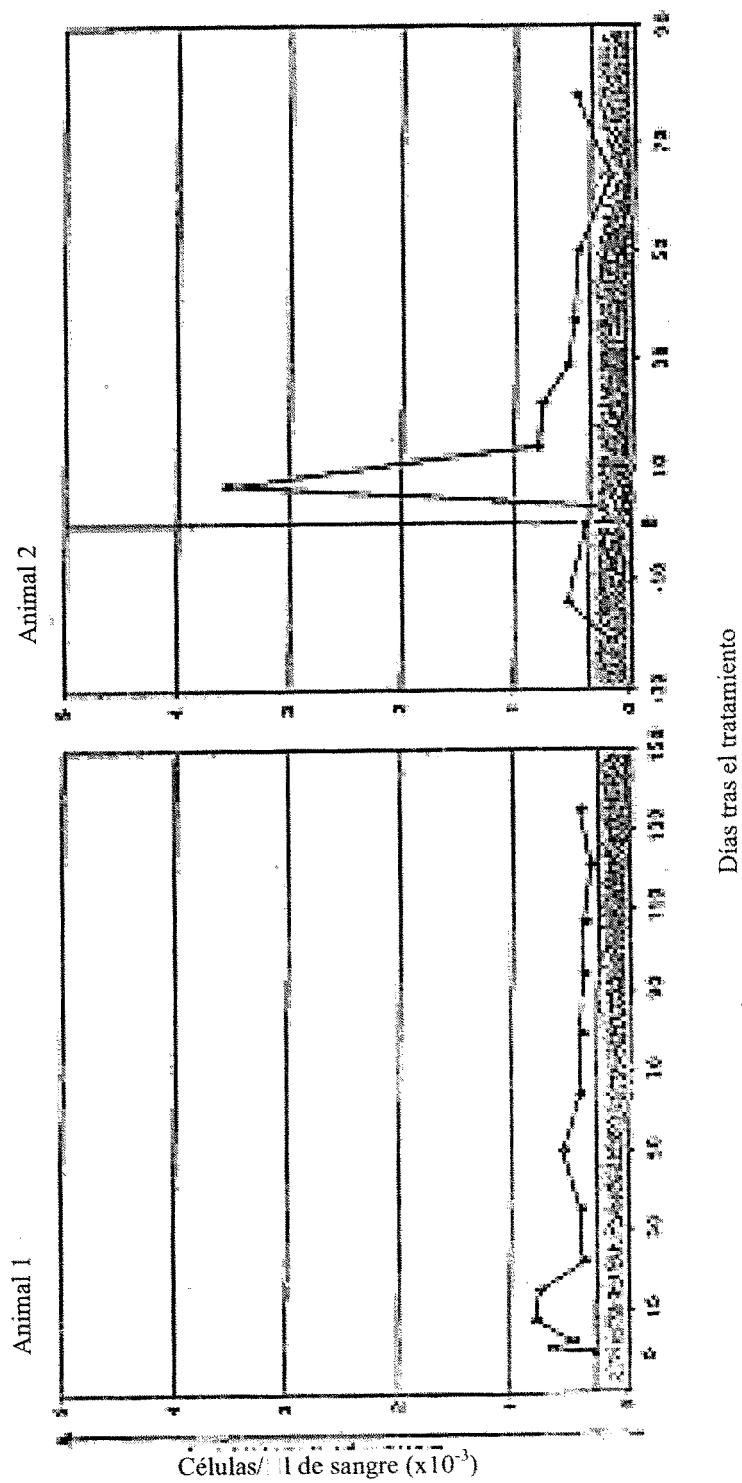


FIG. 22

