

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 992 392**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 14/55 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2019** **PCT/EP2019/056248**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2019** **WO19175216**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2019** **E 19709955 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2024** **EP 3765503**

54 Título: **Anti-CD25 para el agotamiento de células específicas de tumor**

30 Prioridad:

13.03.2018 US 201862642230 P
13.03.2018 WO PCT/EP2018/056312
13.03.2018 US 201862642248 P
13.03.2018 US 201862642218 P
13.03.2018 US 201862642232 P
13.03.2018 US 201862642243 P
13.03.2018 GB 201804028
13.03.2018 GB 201804029
13.03.2018 GB 201804027

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.12.2024

73 Titular/es:

TUSK THERAPEUTICS LTD (50.0%)
6 Falcon WayShire ParkWelwyn Garden City
Hertfordshire AL7 1TW, GB y
CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED
(50.0%)

72 Inventor/es:

GOUBIER, ANNE;
GOYENCHEA CORZO, BEATRIZ;
SALIMU, JOSEPHINE;
MOULDER, KEVIN;
MERCHERS, PASCAL y
QUEZADA, SERGIO

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 992 392 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

Anti-CD25 para el agotamiento de células específicas de tumor

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-CD25, a composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-CD25 y a usos terapéuticos de dichos anticuerpos.

10 ANTECEDENTES

La inmunoterapia contra el cáncer implica el uso del propio sistema inmunitario del sujeto para tratar o prevenir el cáncer. Las inmunoterapias aprovechan el hecho de que las células cancerosas a menudo tienen moléculas sutilmente diferentes en su superficie que pueden ser detectadas por el sistema inmunitario. Estas moléculas, o antígenos del cáncer, son más comúnmente proteínas, pero también incluyen moléculas como hidratos de carbono. La inmunoterapia implica, por tanto, la provocación del sistema inmunitario para atacar los linfocitos Tumorales a través de estos antígenos diana. Sin embargo, los tumores malignos, en particular los tumores sólidos, pueden escapar de la vigilancia inmunitaria mediante diversos mecanismos tanto intrínsecos a la célula tumoral como mediados por componentes del microentorno tumoral. Entre estos últimos, se han propuesto como factores críticos la infiltración tumoral por linfocitos T reguladores (linfocitos Treg o Treg) y, más específicamente, un balance desfavorable de linfocitos T efectores (Tef) frente a Treg (es decir, una baja proporción de Tef con respecto a Treg) (Smyth M. et al., 2014).

Desde su descubrimiento, se ha descubierto que los Treg son críticos para mediar en la homeostasis inmunitaria y promover el establecimiento y mantenimiento de tolerancia periférica. Sin embargo, en el contexto del cáncer, su papel es más complejo. A medida que las células cancerosas expresan tanto autoantígenos como antígenos asociados al tumor, la presencia de Treg, que buscan amortiguar las respuestas de los linfocitos efectores, puede contribuir a la progresión del tumor. La infiltración de Treg en tumores establecidos, por lo tanto, representa uno de los principales obstáculos para las respuestas antitumorales eficaces y para el tratamiento del cáncer en general. Se piensa que los mecanismos de supresión empleados por Treg contribuyen significativamente a la limitación o incluso al fracaso de las terapias actuales, en particular las inmunoterapias que se basan en la inducción o potenciación de las respuestas antitumorales (Onishi H et al.; 2012).

Se ha demostrado sistemáticamente que los linfocitos Treg contribuyen al establecimiento y la progresión de tumores en modelos murinos y que su ausencia produce un retraso en la progresión del tumor (Elpek et al., 2007; Golgher et al., 2002; Jones et al., 2002; Onizuka et al., 1999; Shimizu et al., 1999). En los seres humanos, la alta infiltración tumoral por los linfocitos Treg y, lo que es más importante, una baja proporción de linfocitos T efectores (Tef) con respecto a linfocitos Treg, se asocia con resultados deficientes en varios cánceres (Shang et al., 2015). A la inversa, una proporción alta de linfocitos Tef/Treg se asocia con respuestas favorables a la inmunoterapia tanto en humanos como en ratones (Hodi et al., 2008; Quezada et al., 2006). Sin embargo, el agotamiento de Treg en los tumores es complejo, y los resultados de los estudios preclínicos y clínicos en esta área han sido inconsistentes, principalmente debido a la dificultad de identificar una diana específico para Treg.

CD25 es una de las posibles dianas moleculares para lograr el agotamiento de Treg. De hecho, CD25, también conocida como la cadena alfa del receptor de alta afinidad de interleucina 2 (IL-2R α), se expresa constitutivamente en niveles altos en linfocitos Treg, y está ausente o se expresa en niveles bajos en linfocitos T efectores y, por lo tanto, es una diana prometedora para el agotamiento de Treg. La interacción IL-2/CD25 ha sido objeto de varios estudios en modelos murinos, la mayoría de los cuales involucran el uso de PC61, un anticuerpo anti-CD25 murino de rata (Setiady Y et al., 2010). La unión a CD25 y las actividades funcionales de este anticuerpo se han comparado con las de un panel de anticuerpos monoclonales generados por diferentes autores (Lowenthal JW et al., 1985; Moreau, J.-L. et al.; Volk HD et al., 1989; Dantal J et al., 1991). Si bien los estudios originales demostraron la actividad profiláctica pero no terapéutica de PC61, un estudio reciente mostró que una versión Fc optimizada de este anticuerpo anti-CD25 condujo a un agotamiento de Treg intratumoral y ofrece un beneficio terapéutico significativo en varios modelos de tumores murinos (Vargas A et al., 2017).

Los anticuerpos anti-CD25 disponibles, tales como PC61, bloquean o inhiben la unión de IL-2 a CD25, al igual que muchos otros anticuerpos anti-CD25 de ratón y la mayoría de los anticuerpos desvelados como anticuerpos anti-CD25 humanos; véanse, por ejemplo, los documentos de patente WO2004/045512, WO 2006/108670, WO1993/011238, WO1990/007861 y WO2017/174331. Por ejemplo, basiliximab y daclizumab son anticuerpos anti-CD25 humanos que inhiben la unión de IL-2 a CD25 y se han desarrollado para reducir la activación de linfocitos T efectores (Queen C et al., 1989, y Bielekova B, 2013). Basiliximab es un anticuerpo quimérico anti-CD25 humano de ratón actualmente aprobado para enfermedades injerto contra huésped, y daclizumab es un anticuerpo humanizado anti-CD25 aprobado para el tratamiento de la esclerosis múltiple. También se ha mostrado que daclizumab reduce Treg circulantes sin alterar la inmunidad humoral estimulada por vacuna en pacientes con glioblastoma tratados con temozolomida (Sampson JH et al., 2012).

Algunos otros anticuerpos anti-CD25 todavía permiten la unión de IL-2 a CD25, tal como el clon 7D4 (anti-CD25 de ratón), el clon 2E4 (anti-CD25 de ratón), el clon MA251 (anti-CD25 de humano) o 7G7B6 (anti-CD25 de humano) (es decir, anticuerpos no bloqueadores). Inolimomab/BT536, aunque se ha dicho que no bloquea la unión de IL-2 a CD25, de hecho

bloquea la señalización de IL-2 a través de CD25. 7D4 es un anticuerpo anti-CD25 de ratón IgM de rata que se ha usado ampliamente para detectar células positivas para CD25 en presencia o después del tratamiento con PC61 o de anticuerpos que tienen propiedades de unión similares (Onizuka S et al., 1999). Muy pocos documentos desvelan alguna propiedad funcional del anticuerpo 7D4-IgM, solo o en comparación con PC61 (Kohm A et al., 2006; Hallett W et al., 2008; Fecci P et al., 2006; McNeill A et al., 2007; Setiady Y et al., 2010; Couper K et al., 2007). De hecho, la técnica anterior no enseña la posibilidad de adaptar o modificar de alguna manera el isotipo u otras características estructurales de 7D4 para obtener un anticuerpo mejorado, en particular aquellos que se pueden usar en la terapia del cáncer. La capacidad de 7D4-IgM (como tal o como un anticuerpo manipulado) o de cualquier anticuerpo anti-CD25 humano diseñado o caracterizado por tener características de unión a CD25 similares a las de 7D4 para CD25 de ratón no se ha evaluado en detalle con respecto al agotamiento optimizado de linfocitos Treg.

Como se trató anteriormente, la infiltración de linfocitos Treg en tumores, y en particular una baja proporción de linfocitos Tef con respecto a linfocitos Treg, puede llevar a un mal desenlace clínico. CD25 se ha identificado como un marcador de Treg y, por lo tanto, podría ser una diana interesante para los anticuerpos terapéuticos que apuntan al agotamiento de Treg. Es importante destacar que CD25 es la subunidad alfa del receptor para IL-2, e IL-2 es una citocina clave para las respuestas de Tef. Los anticuerpos anti-CD25 que se han sometido a pruebas clínicas hasta el momento, aunque agotan los linfocitos Treg, también bloquean la señalización de IL-2 a través de CD25 (específicamente, un complejo CD25/CD122/CD132). Los presentes inventores han descubierto ahora que tal bloqueo de la señalización de IL-2 limita las respuestas de Tef y que un anticuerpo anti-CD25 que no bloquee la señalización de IL-2 puede agotar efectivamente los linfocitos Treg, mientras que aún permite que IL-2 estimule los linfocitos Tef, proporcionando anticuerpos que presentan un fuerte efecto antineoplásico.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de anticuerpos anti-CD25 mejorados, en particular anticuerpos que no bloqueen la unión de CD25 a IL-2 o la señalización de IL-2, y que agoten los Treg, en particular en tumores, y que se puedan usar en métodos para tratar el cáncer.

SUMARIO

La presente invención proporciona nuevos agentes de anticuerpo anti-CD25 como se define en las reivindicaciones. Los agentes de anticuerpo anti-CD25 proporcionados son anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a CD25, particularmente a CD25 humano, sin bloquear la unión de interleucina 2 (IL-2) a CD25, o la señalización de IL-2 a través de CD25, y que agotan eficientemente los Treg, en particular dentro de los tumores. Los agentes de anticuerpo anti-CD25 permiten al menos el 50 % de la señalización de IL-2 en respuesta a la unión de IL-2 a CD25 en comparación con el nivel de señalización en ausencia del agente de anticuerpo anti-CD25. Los agentes de anticuerpo anti-CD25 se denominan, por lo tanto, agentes de anticuerpo anti-CD25 no bloqueadores o no bloqueadores de IL-2.

En algunas realizaciones, los agentes de anticuerpo anti-CD25 o los fragmentos de unión al antígeno se unen a CD25 sin bloquear la unión de IL-2 a CD25 o la señalización de IL-2 a través de CD25. Es decir, en algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD25 inhiben menos del 50 % de la señalización de IL-2 en comparación con la señalización de IL-2 en ausencia de los anticuerpos. Los anticuerpos anti-CD25 se caracterizan por elementos estructurales que permiten tanto la unión de CD25 sin bloquear la unión de IL-2 a CD25, como su señalización.

Se ha descubierto sorprendentemente que los anticuerpos anti-CD25 que no bloquean la unión de IL-2 o la señalización a través de CD25 y agotan los Treg tienen fuertes efectos antitumorales, en particular tienen un efecto antitumoral más fuerte que los anticuerpos anti-CD25 que agotan los Treg pero bloquean la señalización de IL-2. Los anticuerpos aumentaron las proporciones CD4⁺ Tef/Treg y CD8⁺ Tef/Treg. El agotamiento eficaz de linfocitos Treg infiltrantes del tumor al tiempo que se conserva la señalización de IL-2 en los linfocitos Tef conduce a un enfoque terapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer solo o en combinación con otros agentes antineoplásicos.

Los expertos en la técnica, sin embargo, apreciarán que las enseñanzas de la presente divulgación no están limitadas por un mecanismo de acción particular de los anticuerpos proporcionados o fragmentos de unión al antígeno de los mismos. Las características estructurales y/o funcionales relevantes de los anticuerpos proporcionados se describen en el presente documento y hablan por mismas.

También se describen agentes de anticuerpo anti-CD25 caracterizados por una o más características que están asociadas con la unión a un epítipo específico en el dominio extracelular CD25 humano, y/o que los hacen particularmente susceptibles de uso y/o fabricación farmacéutica.

Las tecnologías proporcionadas, incluidos los agentes de anticuerpo anti-CD25 proporcionados (por ejemplo, los anticuerpos proporcionados o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos), las composiciones que los incluyen y/o sus usos, son útiles en medicina. En algunas realizaciones, dichas tecnologías proporcionadas son útiles en la terapia y/o la profilaxis del cáncer.

Los agentes de anticuerpo anti-CD25 proporcionados se ejemplifican por los anticuerpos que tienen la secuencia de aCD25-a-674, y más en general anticuerpos o agentes que son o comprenden uno o más fragmentos de unión al antígeno

o porciones de los mismos, por ejemplo, que comprenden la secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-HCDR3 como región 3 determinante de complementariedad de cadena pesada variable, y comprenden una o ambas de las secuencias HCDR1 y HCDR2 de aCD25-a-674. Las referencias a los agentes de anticuerpo anti-CD25 en el presente documento, tales como aCD25-a-674, incluyen variantes de los mismos, incluidas las variantes maduras por afinidad de las mismas, a menos que el contexto implique lo contrario.

La invención proporciona un agente de anticuerpo anti-CD25 que comprende las secuencias de HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de aCD25-a-674. En una realización, se proporciona un agente de anticuerpo anti-CD25 que comprende la secuencia de aminoácidos pesada variable de aCD25-a-674. En otra realización, se proporciona el agente de anticuerpo anti-CD25 que comprende las secuencias de aminoácidos pesadas variables y ligeras variables de aCD25-a-674, o de una variante del mismo, incluyendo variantes maduras por afinidad.

También se desvela un agente de anticuerpo anti-CD25 que compite con aCD25-a-674 (o un fragmento de unión al antígeno o un derivado o variante del mismo, que incluye variantes maduras por afinidad) para unirse al dominio extracelular de CD25 humano.

En algunas realizaciones, los agentes de anticuerpo anti-CD25 proporcionados (por ejemplo, los anticuerpos proporcionados, incluidas las variantes y derivados de los mismos, tales como las variantes maduras por afinidad) o fragmentos de unión al antígeno de los mismos se unen a CD25 humano con un K_d en el intervalo de 10^{-7} M o inferior (por ejemplo, en el intervalo de 10^{-8} o 10^{-9} o 10^{-10} o 10^{-11} o 10^{-12} o 10^{-13}). En algunas realizaciones, los agentes de anticuerpo anti-CD25 proporcionados (por ejemplo, los anticuerpos proporcionados o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos, incluidas las variantes y derivados de los mismos, tales como las variantes maduras por afinidad) se unen a CD25 humano con un valor K_d de 10^{-7} a 10^{-10} , o de 10^{-7} a 10^{-9} .

También se desvelan agentes de anticuerpo anti-CD25 (por ejemplo, los anticuerpos proporcionados o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos, incluidas las variantes y derivados de los mismos) que se unen a un epítipo en CD25 humano que está unido por aCD25-a-674 (o un fragmento de unión al antígeno o derivado o variante del mismo). Los agentes de anticuerpo anti-CD25 proporcionados pueden unirse al dominio extracelular CD25 humano. En algunas realizaciones, los agentes de anticuerpo anti-CD25 proporcionados pueden unirse a un epítipo de CD25 (por ejemplo, cuando se evalúa usando uno o más ensayos como se describen en el presente documento o de otra manera conocida en la técnica), en particular el identificado como aCD25ep-a y aCD25ep-b. En algunas realizaciones, los anticuerpos proporcionados o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden unirse a CD25 de humano y de primate no humano (por ejemplo, de macaco cangrejero) (por ejemplo, a un epítipo extracelular en CD25 de humano y/o macaco cangrejero) con un valor K_d en el intervalo de 10^{-7} M o inferior, por ejemplo, en el intervalo de 10^{-8} o 10^{-9} o 10^{-10} o 10^{-11} o 10^{-12} o 10^{-13} . En algunas realizaciones, los agentes de anticuerpo anti-CD25 proporcionados (por ejemplo, los anticuerpos proporcionados o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos, incluidas las variantes y derivados de los mismos, tales como las variantes maduras por afinidad) se unen a CD25 humano con un valor K_d de 10^{-7} a 10^{-10} , o de 10^{-7} a 10^{-9} .

Entre otras cosas, la presente divulgación también describe un procedimiento que puede utilizarse para identificar y/o caracterizar agentes de anticuerpo anti-CD25 particularmente útiles (por ejemplo, anticuerpos anti-CD25 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos anti-CD25 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos caracterizados por ciertas características estructurales y/o funcionales, tales como la unión específica a CD25 humano (por ejemplo, a un epítipo extracelular del mismo), la inclusión de uno o más elementos de secuencia de CDR como se describe en el presente documento (y particularmente la inclusión de un elemento de secuencia HCDR3, opcionalmente en combinación con elementos HCDR1 y/o HCDR2), el impacto en la actividad de señalización de IL-2 como se describe en el presente documento, la actividad citotóxica como se describe en el presente documento (por ejemplo, con respecto a células positivas para CD25 tales como las células reguladoras inmunitarias o células cancerosas que expresan CD25), y combinaciones de los mismos. Los anticuerpos anti-CD25 particularmente útiles como se describe en el presente documento se caracterizan por una pluralidad de dichas características.

Por lo tanto, tal como se ejemplifica en el presente documento, ciertos anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno que comprenden secuencias aCD25-a674 (en particular, aCD25-a-674-HCDR3 y/o aCD25-a-674-LCDR3) se caracterizan por tales características estructurales y/o funcionales deseables; tales anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden denominarse en el presente documento como agentes de anticuerpo anti-CD25. Además, según la presente divulgación, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que compiten con aCD25-a-674 pueden ser anticuerpos particularmente útiles.

Los anticuerpos (y/o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos) descritos en el presente documento pueden ser particularmente útiles en medicina (por ejemplo, en terapia y/o en profilaxis, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer), y/o para su uso con respecto a métodos que requieren o involucran apuntar a un epítipo como el identificado como aCD25ep-a y aCD25ep-b dentro del dominio extracelular de CD25 humano. Los anticuerpos proporcionados o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden prepararse presentando el isotipo más apropiado, en particular el isotipo humano del grupo que consiste en anticuerpos de isotipo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, más particularmente IgG1 humano o IgG2 humano, preferiblemente IgG1 humano.

En un aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que comprenden

(a) la secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-HCDR3 (SEQ ID NO: 4) como región 3 determinante de complementariedad de cadena pesada variable;

b) secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-HCDR1 (SEQ ID NO: 2) como región 1 determinante de complementariedad de cadena pesada variable; y/o

c) secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-HCDR2 (SEQ ID NO: 3) como región 2 determinante de complementariedad de cadena pesada variable;

d) la secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-LCDR1 (SEQ ID NO: 6) como región 1 determinante de complementariedad de cadena ligera variable;

e) la secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-LCDR2 (SEQ ID NO: 7) como región 2 determinante de complementariedad de cadena ligera variable; y

f) la secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-LCDR3 (SEQ ID NO: 8) como región 3 determinante de complementariedad de cadena ligera variable.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos proporcionados comprenden regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada variable definidas anteriormente (es decir, elementos de secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674) además en el orden correcto, específicamente separadas por secuencias de marco de anticuerpo (SEQ ID NO: 5), en particular para ejercer correctamente sus propiedades de unión y funcionales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un anticuerpo proporcionado o fragmento de unión al antígeno del mismo puede comprender secuencias de aminoácidos de aCD25-a-674-HCDR123 (SEQ ID NO: 5) y:

(a) la secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-LCDR1 (SEQ ID NO: 6) como región 1 determinante de complementariedad de cadena ligera variable;

b) secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-LCDR2 (SEQ ID NO: 7) como región 2 determinante de complementariedad de cadena ligera variable; y

c) secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-LCDR3 (SEQ ID NO: 8) como región 3 determinante de complementariedad de cadena ligera variable.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-HCDR123 (SEQ ID NO: 5). Preferentemente, dicho anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo comprende además una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-LCDR123 (SEQ ID NO: 9), como se describe en los Ejemplos. Además, también se describen secuencias de anticuerpos que se definen por un número de sustituciones con respecto a los elementos de secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674 definidos anteriormente. Por ejemplo, dicha secuencia puede comprender, como región 3 determinante de complementariedad de cadena pesada variable (HCDR3) una secuencia que contiene 1, 2, 3, 4, o más sustituciones de aminoácidos dentro de aCD25-a-674-HCDR3 (SEQ ID NO: 4). También se describen secuencias de anticuerpos que comprenden, como regiones 1, 2 y 3 determinantes de complementariedad de cadena pesada variables (HCDR1, HCDR2, y HCDR3) una secuencia que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones de aminoácidos dentro de aCD25-a-674-HCDR1 (SEQ ID NO: 2), aCD25-a-674-HCDR2 (SEQ ID NO: 3) y aCD25-a-674-HCDR3 (SEQ ID NO: 4), y más preferiblemente una secuencia que contenga 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones de aminoácidos dentro de aCD25-a-674-HCDR123 (SEQ ID NO: 5). Los anticuerpos que presentan dichos elementos de secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674 y dichas sustituciones pueden seguir presentando las propiedades de unión y/o funcionales de aCD25-a-674, y de los agentes de anticuerpo anti-CD25 en general.

También se describe un agente de anticuerpo anti-CD25 (es decir, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo) que comprende:

a. la secuencia de región de cadena pesada variable de aCD25-a-674 (SEQ ID NO: 5) (o una variante de la misma, tal como una variante madurada por afinidad de la misma) o una secuencia de región de cadena pesada variable que tiene hasta 5 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de región de cadena pesada variable de aCD25-a-674 (o una variante de la misma, tal como una variante madurada por afinidad de la misma); y/o

b. la secuencia de región de cadena ligera variable de aCD25-a-674 (SEQ ID NO: 9) (o una variante de la misma, tal como una variante madurada por afinidad de la misma) o una secuencia de región de cadena ligera variable que tiene hasta 5 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de región de cadena ligera variable de aCD25-a-674 (o una variante de la misma, tal como una variante madurada por afinidad de la misma).

En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos no se producen en una secuencia de CDR.

También se describe un agente de anticuerpo anti-CD25 (es decir, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo) que comprende:

a. la secuencia de región de cadena pesada variable de aCD25-a-674 (SEQ ID NO: 5) (o una variante de la misma, tal como una variante madurada por afinidad de la misma) o una secuencia de región de cadena pesada variable que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de región de cadena pesada variable de aCD25-a-674 (o una variante de la misma, tal como una variante madurada por afinidad de la misma); y/o

b. la secuencia de región de cadena ligera variable de aCD25-a-674 (SEQ ID NO: 9) (o una variante de la misma, tal como una variante madurada por afinidad de la misma) o una secuencia de región de cadena ligera variable que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de región de cadena ligera variable de aCD25-a-674 (o una variante de la misma, tal como una variante madurada por afinidad de la misma).

En algunas realizaciones, el % de identidad de secuencia se calcula sin las secuencias de las 6 CDR de aCD25-a-686 (o una variante de la misma, tal como una variante madurada por afinidad de la misma, como se desvela en el presente documento). Por ejemplo, el agente de anticuerpo anti-CD25 puede comprender una secuencia de región de cadena pesada variable que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de región de cadena pesada variable de aCD25-a-686 (o una variante de la misma, tal como una variante madurada por afinidad de la misma) y/o una secuencia de región de cadena ligera variable que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de región de cadena ligera variable de aCD25-a-686 (o una variante de la misma, tal como una variante madurada por afinidad de la misma), en donde cualquier variación de aminoácidos ocurre solo en las regiones estructurales de las secuencias de regiones de cadena pesada y ligera variables. En dichas realizaciones, los agentes de anticuerpo anti-CD25 que tienen ciertas identidades de secuencia comprenden las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y ligera completas del agente de anticuerpo anti-CD25 del que se derivan.

La divulgación también proporciona anticuerpos variantes, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, de los anticuerpos descritos en el presente documento. La divulgación proporciona anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, en donde puede alterarse cualquier motivo DG en las cadenas ligeras o pesadas de los anticuerpos, por ejemplo, para reducir la isomerización de aspartato y/o en donde puede alterarse cualquier motivo NG en las cadenas ligeras o pesadas de los anticuerpos, por ejemplo, para reducir la desamidación de asparagina y/o en donde puede alterarse cualquier metionina en las cadenas ligeras o pesadas de los anticuerpos, por ejemplo, para reducir la oxidación de metionina. Por ejemplo, un motivo DG puede alterarse para sustituir uno o ambos aminoácidos en el motivo con un aminoácido diferente. Un motivo NG puede alterarse para sustituir uno o ambos de los aminoácidos en el motivo con un aminoácido diferente. Por ejemplo, dichos motivos pueden mutarse a EG, DQ o DA. Un residuo de metionina puede alterarse para reemplazarlo con un aminoácido diferente, por ejemplo, leucina o fenilalanina.

En dichos casos, el anticuerpo anti-CD25 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede ser o puede derivar, por ejemplo, de aCD25-a-674. Los anticuerpos anti-CD25 variantes proporcionan anticuerpos adicionales que tienen cualquiera de las propiedades de unión y funcionales de aCD25-a-674, y posiblemente todas. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD25 variantes son anticuerpos no bloqueadores de IL-2.

Por consiguiente, en algunos casos, los anticuerpos o fragmentos de los mismos proporcionados en el presente documento pueden mutarse para eliminar o modificar motivos DG o motivos NG, en particular motivos DG o NG que aparecen en las regiones CDR, como es habitual en la técnica para reducir la susceptibilidad a la modificación química. Dichos anticuerpos que han sido modificados de este modo pueden necesitar una modificación adicional (por ejemplo, maduración por afinidad) antes de llegar a una secuencia final.

También se desvela un anticuerpo variante que tiene secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo como se desvela en el presente documento (por ejemplo, las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de aCD25-a-674), o la cadena pesada variable y ligera variable de cualquier anticuerpo como se desvela en el presente documento (por ejemplo, la cadena pesada variable y ligera variable de cualquiera de aCD25-a-674), pero que difiere de la secuencia especificada en que al menos uno o al menos dos motivos DG o NG en las CDR (si están presentes) se han cambiado a un motivo diferente. Las variantes desveladas se pueden usar y formular como se describe para aCD25-a-674.

La invención también proporciona anticuerpos madurados por afinidad, por ejemplo, variantes maduradas por afinidad derivadas de cualquiera de los anticuerpos desvelados en el presente documento. En una realización, los anticuerpos madurados por afinidad son anticuerpos madurados por afinidad que tienen un motivo DG y/o un motivo NG alterado, y/o alterados para eliminar o mutar cualquier residuo de metionina. Las variantes maduradas por afinidad desveladas se pueden usar y formular como se describe para aCD25-a-674.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método de preparación de un anticuerpo anti-CD25 que comprende proporcionar un anticuerpo como se describe en el presente documento (por ejemplo, aCD25-a-674 o un fragmento de unión al antígeno), y someter el anticuerpo a maduración por afinidad, en donde el anticuerpo producido se une a CD25 con mayor afinidad que el anticuerpo parental. Preferiblemente, el anticuerpo producido se une a CD25 con al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, más preferiblemente al menos 50 % de afinidad más que la afinidad con la que el anticuerpo parental se une a CD25, por ejemplo, como se mide por la Kd. Los métodos de medición de la afinidad son conocidos en la técnica y se describen en los Ejemplos a continuación. Los anticuerpos madurados por afinidad producidos por dichos métodos pueden formularse y usarse como se describe en el presente documento para los otros agentes de anticuerpo anti-CD25.

La maduración por afinidad se puede llevar según cualquier método adecuado conocido por el experto. Por ejemplo, los sistemas de presentación de anticuerpos *in vitro* se usan ampliamente para la generación de anticuerpos específicos con alta afinidad. En estos sistemas, el fenotipo (es decir, el fragmento de anticuerpo) se acopla al genotipo (es decir, el gen del anticuerpo), lo que permite la determinación directa de la secuencia del anticuerpo. Se han desarrollado varios sistemas para lograr la presentación de repertorios de anticuerpos para permitir la selección subsiguiente de aglutinantes, y el aumentar la rigurosidad de la selección permite la selección de variantes afinidad cada vez mayor. Los fragmentos de anticuerpos pueden expresarse en levaduras, ribosomas, partículas de presentación de fagos o por acoplamiento directo al ADN.

Los métodos actuales de maduración por afinidad de anticuerpos pertenecen a dos categorías de mutagénesis: estocástica y no estocástica. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) propensa a errores, las cepas bacterianas mutadoras y la mutagénesis de saturación son ejemplos típicos de métodos de mutagénesis estocástica. Las técnicas no estocásticas a menudo usan el escaneo de alanina o la mutagénesis dirigida al sitio para generar colecciones limitadas de variantes específicas. Además, los métodos de barajado para obtener variantes barajadas del anticuerpo parental también se pueden usar para mejorar aún más la afinidad de los anticuerpos.

Por consiguiente, en una realización de la invención, el método de maduración por afinidad se selecciona del grupo que consiste en mutagénesis estocástica (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) propensa a errores, cepas bacterianas mutadoras o mutagénesis de saturación), mutagénesis no estocástica (por ejemplo, escaneo de alanina o mutagénesis dirigida al sitio), barajado (por ejemplo, barajado de ADN, barajado de cadenas o barajado de CDR) y el uso del sistema CRISPR-Cas9 para introducir modificaciones.

Los métodos de maduración por afinidad se describen, por ejemplo, en Rajpal et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(24): 8466-71, Steinwand et al., MAbs, 2014, 6(1): 204-18, así como en el Handbook of Therapeutic Antibodies, Wiley, 2014, Capítulo 6, Afinidad de anticuerpos (páginas 115-140).

En algunas realizaciones, se proporciona un método de preparación de una composición farmacéutica que comprende proporcionar un anticuerpo preparado según un método anterior (es decir, para producir un anticuerpo por maduración por afinidad) y formular conjuntamente el anticuerpo con al menos uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El anticuerpo usado en la preparación de la composición farmacéutica puede ser una variante madurada por afinidad de aCD25-a-674. Las composiciones farmacéuticas producidas por dichos métodos pueden usarse en los tratamientos de la presente invención como se describe en el presente documento para los otros agentes de anticuerpo anti-CD25.

Los anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a CD25 como se describe en el presente documento (por ejemplo, un agente de anticuerpo anti-CD25 que puede incluir uno o más elementos de secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674 como aCD25-a-674-HCDR3 (SEQ ID NO: 4) o aCD25-a-674-HCDR123 (SEQ ID NO: 5), y/o que puede competir con aCD25-a-674 para unirse a CD25 humano y CD25 de primate no humano, por ejemplo CD25 de macaco cangrejero, etc.) pueden proporcionarse en cualquiera de una variedad de formatos. Por ejemplo, un formato apropiado puede ser o comprender un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de dominio, un anticuerpo de cadena simple, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento variable de cadena simple (scFv), un fragmento scFv-Fc, un anticuerpo de cadena simple (scAb), un aptámero o un nanocuerpo. En algunas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo (y particularmente un anticuerpo monoclonal) puede ser un anticuerpo de conejo, ratón, quimérico, humanizado o completamente humano, o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En algunas realizaciones, un anticuerpo proporcionado o fragmento de unión al antígeno del mismo puede ser de un isotipo IgG, IgA, IgE o IgM (preferiblemente humanos), ya que puede ser más apropiado para un uso dado. En algunas realizaciones, un anticuerpo proporcionado o fragmento de unión al antígeno del mismo es de un isotipo IgG, más particularmente un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. (En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es de la subclase de IgG1 humana. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo es de la subclase de IgG2 humana.) En algunas realizaciones, un anticuerpo proporcionado o un fragmento de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, proporcionado como parte de un agente de unión multiespecífico tal como, por ejemplo, cuando se desea asociar adicionalmente restos de unión y/o funcionales a agentes de anticuerpo anti-CD25, tal como una secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674, el anticuerpo aislado o el fragmento de unión al antígeno pueden estar comprendidos en un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico u otro formato multiespecífico que pueda estar disponible en la técnica.

En algunas realizaciones, un agente de anticuerpo anti-CD25 proporcionado comprende una entidad de unión a CD25 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25 o un fragmento de unión al antígeno del mismo) y una carga activa conjugada, tal como un agente terapéutico o diagnóstico. En muchas de dichas realizaciones, el agente se considera y/o se refiere como un “inmunconjugado”. Los ejemplos de tecnologías y compuestos que se pueden usar para generar inmunconjugados específicos, tales como anticuerpo-fármaco, se desvelan en la literatura (Beck A et al., 2017) y se describen como aplicables a varios anticuerpos anti-CD25 conocidos (O'Mahony D et al., 2008; Oh et al., 2017; Kreitman RJ et al., 2016; Flynn MJ et al., 2016).

También se describen secuencias de aminoácidos de aCD25-a-674 que identifican anticuerpos proporcionados o fragmentos de unión al antígeno de los mismos (o una variante de los mismos, incluidas las variantes maduras por afinidad). En algunos casos, dichas secuencias identifican anticuerpos proporcionados o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a un epítipo en CD25 humano (tal como aCD25ep-a y aCD25ep-b), y opcionalmente también un epítipo correspondiente de un CD25 de primate no humano, por ejemplo, de macaco cangrejero y/o de un CD25 murino, ya sea como proteínas aisladas o en la superficie de células que expresan CD25 (tales como células inmunitarias o líneas celulares, por ejemplo células SU-DHL1).

También se describen anticuerpos anti-CD25 o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a un epítipo de CD25 humano, en donde el epítipo comprende uno o más residuos de aminoácidos comprendidos en los aminoácidos 150-158 y/o 176-186 de SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, el epítipo comprende al menos 4 aminoácidos, en donde el epítipo comprende uno o más aminoácidos comprendidos en los aminoácidos 150-158 y/o 176-186 de SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, el epítipo comprende al menos 5 aminoácidos, al menos 6 aminoácidos, al menos siete aminoácidos, al menos ocho aminoácidos, al menos nueve aminoácidos, al menos diez aminoácidos, al menos once aminoácidos, al menos doce aminoácidos, al menos trece aminoácidos o al menos catorce o más aminoácidos en donde el epítipo comprende uno o más aminoácidos comprendidos en los aminoácidos 150-158 y/o 176-186 de SEQ ID NO: 1. El epítipo puede ser lineal o conformacional, es decir, discontinuo. Los anticuerpos anti-CD25 o los fragmentos de unión al antígeno se unen específicamente a un epítipo de CD25 humano en donde el epítipo comprende al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once, al menos doce, al menos trece o al menos catorce o más residuos de aminoácidos comprendidos en los aminoácidos 150-158 y/o 176-186 de SEQ ID NO: 1. Los anticuerpos anti-CD25 o los fragmentos de unión al antígeno se unen a un epítipo que comprende los aminoácidos 150-158 y/o 176-186 de SEQ ID NO: 1.

También se describen procedimientos para seleccionar y/o caracterizar anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que comprenden una secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674 y/o que presentan características de unión comparables a los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que comprenden uno o más elementos de secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674 (por ejemplo, que incluyen la secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-HCDR3 (SEQ ID NO: 4) y/o que compiten con aCD25-a-674) que permiten la unión al dominio extracelular CD25 humano como proteína aislada y en la superficie de células que expresan CD25 humano, compitiendo por el mismo epítipo, en particular el identificado en los Ejemplos como aCD25ep-a (secuencia de proteína RWTQPQLICTG (SEQ ID NO: 10); aminoácidos 176-186 en la secuencia Uniprot P01589) y aCD25ep-b (secuencia de proteína YQCVQGYRA (SEQ ID NO: 11); aminoácidos 150-158 en la secuencia de Uniprot P01589).

Además, la presente divulgación también proporciona procedimientos para seleccionar anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que presentan características funcionales comparables con los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que comprenden uno o más elementos de secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674, incluyendo dichas características la falta de inhibición de la interacción entre IL-2 y CD25, la falta de inhibición de la señalización de IL-2, y actividades citotóxicas, y que actúan como agentes de anticuerpo anti-CD25. En estos ámbitos, los anticuerpos candidatos pueden evaluarse en los ensayos que se describen en los Ejemplos u otros ensayos que se conocen en la técnica para establecer la presencia de cualquiera de dichas características, pero posiblemente todas ellas cuando se evalúan en ensayos *in vitro*/ex vivo, ensayos basados en células y/o modelos animales.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende un agente de anticuerpo anti-CD25, tal como una secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674 (o una variante de la misma, incluidas las variantes maduras por afinidad). En algunas realizaciones, dichas moléculas de ácido nucleico proporcionadas pueden contener secuencias de ácido nucleico optimizadas por codones, y/o pueden incluirse en casetes de expresión dentro de vectores de ácido nucleico apropiados para la expresión en células hospedadoras, tales como, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, de insecto, de peces, murinas, de simio o humanas.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona células hospedadoras que comprenden moléculas de ácido nucleico heterólogas (por ejemplo, vectores de ADN) que expresan un agente de anticuerpo anti-CD25 proporcionado (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo) que tiene una o más propiedades, por ejemplo, como se describe en el presente documento, de un agente de anticuerpo anti-CD25 (por ejemplo, que comprende una secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674). En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos de preparación de un agente de anticuerpo anti-CD25 (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo) que tiene una o más propiedades, por ejemplo, como se describe en el presente documento, de un agente de anticuerpo anti-CD25 (por ejemplo, que comprende una secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674). En algunas

realizaciones, dichos métodos pueden comprender cultivar una célula hospedadora que comprende ácidos nucleicos (por ejemplo, ácidos nucleicos heterólogos que pueden comprender y/o administrarse a la célula hospedadora a través de vectores). En algunas realizaciones, dicha célula hospedadora (y/o las secuencias de ácido nucleico heterólogas) está dispuesta y construida de manera tal que el agente de anticuerpo anti-CD25 (por ejemplo, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo) se secreta de la célula hospedadora (por ejemplo, para que se pueda aislar de los sobrenadantes de cultivos celulares) y/o se expone en la superficie celular (por ejemplo, si tales secuencias de aminoácidos de aCD25-a-674 y elementos de secuencia están destinados a ser usados en el contexto de, o junto con, dichas células, como en receptores de linfocitos T artificiales que injertan la especificidad de un anticuerpo monoclonal en linfocitos T).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno puede estar afucosilado. Es bien sabido que la glucosilación de anticuerpos puede tener un impacto en la actividad, la farmacocinética y la farmacodinámica de los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes y/o anticuerpos que se manipulan o aíslan de otra manera) y las proteínas de fusión Fc, y la tecnología específica puede explotarse para obtener un anticuerpo con el perfil de glucosilación deseado (Liu L, 2015). Las funciones efectoras que respaldan la citotoxicidad de un anticuerpo para su uso según la presente invención (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25 como se describe en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, un anticuerpo que puede ser o describirse como un agente de anticuerpo anti-CD25) pueden mejorarse usando métodos para disminuir los niveles de fucosilación del anticuerpo. Los anticuerpos que comprenden elementos de secuencia aCD25-a-674 específicos que presentan dichas propiedades pueden generarse, por ejemplo, expresando una secuencia aCD25-a-674 que usa tecnologías para manipular genéticamente líneas celulares con capacidad de fucosilación ausente o reducida, algunas de las cuales están disponibles comercialmente, como Potelligent (Lonza), GlyMAXX (ProBiogen), ambas proporcionadas por Evitria, o mediante la manipulación del proceso de fabricación, por ejemplo, controlando la osmolaridad y/o usando inhibidores de enzimas; consulte también, por ejemplo, los métodos descritos en el documento de patente EP2480671.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) que comprenden un anticuerpo proporcionado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que tiene propiedades deseables como se describe en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos aCD25-a-674 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, o anticuerpos). En algunas realizaciones, dichas composiciones proporcionadas están destinadas y/o se usan en un uso médico, tal como un uso terapéutico, de diagnóstico o profiláctico. En algunas realizaciones, dicha composición proporcionada puede comprender además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y/o puede usarse en el tratamiento del cáncer. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica puede formularse con uno o más vehículos, excipientes, sales, agentes tamponantes, etc., como se conoce en la técnica. Los expertos en la técnica conocerán y podrán utilizar fácilmente una variedad de tecnologías de formulación, incluyendo aquellas que pueden ser particularmente deseables y/o útiles para un método y/o sitio de administración dado, por ejemplo, para administración parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa), mucosa, intratumoral, peritumoral, oral o tópica. En muchas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas, que comprenden un agente de anticuerpo anti-CD25 como se describe en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25 o una porción de unión al antígeno del mismo), se formulan para administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección y/o infusión). En algunas realizaciones, dicha composición farmacéutica proporcionada puede ser proporcionada, por ejemplo, en formato de jeringa precargada o vial. En algunas realizaciones, dicha composición farmacéutica proporcionada puede proporcionarse y/o utilizarse, por ejemplo, en forma seca (por ejemplo, liofilizada); alternativamente, en algunas realizaciones, dicha composición farmacéutica proporcionada se puede proporcionar y/o utilizar en forma líquida (por ejemplo, como una disolución, suspensión, dispersión, emulsión, etc.), en forma de gel, etc.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona usos de agentes de anticuerpo anti-CD25 (por ejemplo, anticuerpos anti-CD25 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) como se describe en el presente documento (por ejemplo, que comprenden un elemento de secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674), y/o de una composición que los comprende, para su uso en el tratamiento de un cáncer, tal como neoplasia de linfocitos B, un linfoma (linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, mielomas), un trastorno mieloproliferativo, un tumor sólido (tal como un carcinoma de mama, un carcinoma de células escamosas, un cáncer de colon, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de pulmón, un cáncer genitourinario, un cáncer de recto, un cáncer gástrico, sarcoma, melanoma, cáncer de esófago, cáncer de hígado, cáncer de testículo, cáncer cervical, mastocitoma, hemangioma, cáncer de ojo, cáncer de laringe, cáncer de boca, mesotelioma, cáncer de piel, cáncer de recto, cáncer de garganta, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de útero, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer renal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de riñón, cáncer de cerebro y cáncer de ovario). El cáncer también se puede definir basándose en la presencia de marcadores y antígenos específicos relevantes para el tumor, tales como CD20, HER2, PD-1, PD-L1, SLAMF7, CD47, CD137, CD134, TIM3, CD25, GITR, CD25, EGFR, etc. o un cáncer que se ha identificado como portador de un biomarcador conocido como alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H) o deficiencia en la reparación de desajustes (dMMR). Además, dichas afecciones también pueden considerarse al definir estados precancerosos, no invasivos, de los cánceres anteriores, tales como cáncer *in situ*, mieloma latente, gammapatía monoclonal de importancia indeterminada, neoplasia intraepitelial cervical, MALTomas/GALTomas y diversos trastornos linfoproliferativos. Preferiblemente, en algunas realizaciones, el sujeto que se está tratando tiene un tumor sólido.

También se describen métodos de tratamiento del cáncer en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende un agente de anticuerpo anti-CD25 proporcionado (por ejemplo, anticuerpos anti-CD25 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) como se describe en el presente documento (por ejemplo, que comprenden las secuencias de aminoácidos de aCD25-a-674) o un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que compite con un anticuerpo que comprende secuencias de aminoácidos de aCD25-a-674 para la unión de CD25. Preferiblemente, en algunas realizaciones, el sujeto tiene un tumor sólido.

También se describe un método de agotamiento de linfocitos T reguladores en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende un agente de anticuerpo anti-CD25 proporcionado (por ejemplo, anticuerpos anti-CD25 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) como se describe en el presente documento (por ejemplo, que comprenden secuencias de aminoácidos de aCD25-a-674) o un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que compite con un anticuerpo que comprende secuencias de aminoácidos de aCD25-a-674 para la unión a CD25. En un caso, el sujeto tiene un tumor sólido. En un caso, el sujeto tiene un cáncer hematológico.

En algunas realizaciones, la composición o anticuerpo para su uso puede comprender además administrar, simultánea o secuencialmente en cualquier orden, al menos un agente o terapia adicional al sujeto (es decir, de modo que el sujeto reciba una terapia de combinación). En algunas realizaciones, dicho al menos un agente o terapia adicional puede ser o comprender un fármaco antineoplásico (por ejemplo, un agente quimioterapéutico), radioterapia (aplicando irradiación externamente al cuerpo o administrando compuestos radioconjugados), un antígeno antitumoral o anticuerpo marcador (el antígeno o marcador es, por ejemplo, CD4, CD38, CA125, PSMA, c-MET, VEGF, CD137, VEGFR2, CD20, HER2, HER3, SLAMF7, CD326, CAIX, CD40, CD47 o receptor de EGF), un inhibidor del punto de control o un anticuerpo inmunomodulador (por ejemplo, un anticuerpo dirigido a PD-1, PD-L1, TIM3, CD38, GITR, CD134, CD134L, CD137, CD137L, CD80, CD86, B7-H3, B7-H4, B7RP1, LAG3, ICOS, TIM3, GAL9, CD28, AP2M1, SHP-2, OX-40, VISTA, TIGIT, BTLA, HVEM, CD160, etc.), una vacuna (en particular, una vacuna contra el cáncer, por ejemplo GVAX), un adyuvante, protocolo de uso estándar, uno o más compuestos adicionales que se dirigen a las células cancerosas o estimulan una respuesta inmunitaria contra las células cancerosas, o cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, el agente adicional es un inhibidor del punto de control inmunitario, tal como un antagonista de PD-1, por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1. En ciertas realizaciones particulares, cuando dicho al menos un agente o terapia adicional es o comprende un anticuerpo, el formato y/o el antígeno dirigido por dicho anticuerpo puede elegirse entre los enumerados en la literatura y posiblemente adaptarse a un cáncer dado (Sliwkowski M & Mellman I, 2013; Redman JM et al., 2015; Kijanka M et al., 2015). Dichos antígenos y los anticuerpos correspondientes incluyen, sin limitación, CD22 (blinatumomab), CD20 (rituximab, tositumomab), CD56 (lorvotuzumab), CD66e/CEA (labetuzumab), CD152/CTLA-4 (ipilimumab), CD221/IGF1R (MK-0646), CD326/Epcam (edrecolomab), CD340/HER2 (trastuzumab, pertuzumab) y EGFR (cetuximab, panitumumab). En realizaciones en las que el al menos un agente o terapia adicional es un agente quimioterapéutico, el agente quimioterapéutico puede ser uno de los conocidos en la técnica para usar en la terapia contra el cáncer. Dichos agentes quimioterapéuticos incluyen, sin limitación, agentes alquilantes, antraciclinas, epotilonas, nitrosoureas, etileniminas/metilmelamina, alquilsulfonatos, agentes alquilantes, antimetabolitos, análogos de pirimidina, epipodofilotoxinas, enzimas tales como L-asparaginasa; modificadores de la respuesta biológica, tales como IFN α , IFN- γ , IL-2, IL-12, G-CSF y GM-CSF; complejos de coordinación de platino, tales como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino, antracenodionas, urea sustituida, tal como hidroxiiurea, derivados de metilhidrazina que incluyen N-metilhidrazina (MIH) y procarbazona, supresores corticoadrenales, tales como mitotano (o,p'-DDD) y aminoglutetimida; hormonas y antagonistas, incluidos antagonistas de adrenocorticosteroides, tales como prednisona y equivalentes, dexametasona y aminoglutetimida; progestina, tales como el caproato de hidroxiprogesterona, acetato de medroxiprogesterona y acetato de megestrol; estrógenos, tales como dietilestilbestrol y equivalentes de etinilestradiol; antiestrógenos, tales como tamoxifeno; andrógenos que incluyen propionato de testosterona y fluoximesterona I equivalentes; antiandrógenos, tales como flutamida, análogos de la hormona liberadora de gonadotropina y leuprolida; antiandrógenos no esteroideos, tales como flutamida; moléculas que se dirigen a las vías de TGF β , IDO (indolamina desoxigenasa), arginasa y/o CSF1R; inhibidores de PARP, tales como olaparib, veliparib, iniparib, rucaparib; e inhibidores de MET, tales como tivantinib, foretinib, golvatinib, cabozantinib y crizotinib.

Aún más, la presente divulgación proporciona una variedad de kits o artículos de fabricación que contienen un agente de anticuerpo anti-CD25 proporcionado (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25 o fragmento de unión al antígeno del mismo) como se describe en el presente documento (por ejemplo, que comprende una secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674) o composiciones relacionadas, que permiten la administración, el almacenamiento u otro uso de dicho anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno. Un kit proporcionado comprende un recipiente, una jeringa, un vial u otro recipiente que comprenda dichas composiciones, opcionalmente junto con uno o más artículos de fabricación, diluyentes, reactivos, fases sólidas y/o instrucciones para el uso correcto del kit.

En el presente documento también se divulga la identificación, caracterización y/o validación de un agente de anticuerpo anti-CD25 particular (por ejemplo, anticuerpo anti-CD25 o un fragmento de unión al antígeno del mismo) como se describe en el presente documento (por ejemplo, que comprende secuencias de aminoácidos de aCD25-a-674) para un uso particular, tal como un uso médico, y en particular para tratar el cáncer, pueden realizarse usando uno o más ensayos o sistemas como se describe en el presente documento. En algunos casos, dicha identificación, caracterización y/o validación pueden involucrar el análisis de la actividad en uno o más ensayos basados en células, por ejemplo, usando diferentes configuraciones experimentales y/o un panel de líneas celulares seleccionadas (por ejemplo, líneas celulares derivadas de cáncer). En algunos casos, particularmente dado el mecanismo inmunológico propuesto asociado a ciertos

agentes de anticuerpo anti-CD25 deseables, como se describe en el presente documento, las actividades, la identificación, la caracterización y/o la validación deseables pueden involucrar la recopilación de datos relevantes generados en modelos animales, en donde se inducen cánceres o en donde se implantan células cancerosas como un xenoinjerto o como células singénicas/allogénicas derivadas del cáncer. De manera alternativa o adicional, en algunos casos, se pueden utilizar modelos animales que implican la transferencia de células humanas, tales como CMSP (es decir, modelos de ratones de CMSP humanizadas) o células madre hematopoyéticas CD34+ solas (es decir, ratones humanizados CD34+) o células madre hematopoyéticas CD34+ junto con hígado y timo (por ejemplo, ratones NSG-BLT) para permitir evaluar la actividad de los agentes de anticuerpo anti-CD25 en células inmunitarias humanas dentro de un sistema modelo.

En algunos casos, las secuencias relevantes de agentes de anticuerpo anti-CD25 (por ejemplo, anticuerpos anti-CD25 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) como se describe en el presente documento (por ejemplo, que comprenden secuencias de aminoácidos de aCD25-a-674 o que de otra manera incluyen características estructurales y/o funcionales de un agente descrito en el presente documento como agente de anticuerpo anti-CD25) pueden clonarse y/o expresarse en el contexto de un marco de anticuerpo que es más apropiado o deseable por razones farmacéuticas y/o técnicas. Por ejemplo, dichas secuencias (posiblemente como secuencias codificantes de VH y VL optimizadas por codón) pueden clonarse junto con regiones constantes de IgG1 humanas (hIgG1) y expresarse usando un vector de expresión de anticuerpo y una línea celular apropiados (tal como una línea celular derivada de CHO, por ejemplo, CHO-S). En algunos casos particulares, la expresión y la secreción de secuencias de anticuerpos proporcionadas en anticuerpos de formato IgG1 humanos pueden analizarse después de la transfección en condiciones reducidas en lisados celulares y en condiciones no reducidas en sobrenadantes que se usarán más adelante para purificar el anticuerpo (mediante cromatografía de afinidad, filtración en gel y/u otra técnica apropiada). La unión y/u otras propiedades funcionales de las secuencias de anticuerpos anti-CD25 proporcionadas, en formato de IgG1 humana (por ejemplo, agentes de anticuerpo anti-CD25-hIgG1) se pueden analizar, por ejemplo, usando uno o más ensayos descritos en los Ejemplos a continuación. Por ejemplo, dichos anticuerpos proporcionados en formato hIgG1 pueden evaluarse para determinar su unión a CMSP humanas y de macaco cangrejero o Treg purificados o Treg derivados *in vitro* o líneas celulares CD25 positivas (tales como SU-DHL-1 o Karpas299), por ejemplo, usando citometría de flujo.

Además, se puede evaluar el efecto de uno o más agentes de anticuerpo anti-CD25 (por ejemplo, anticuerpos anti-CD25 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) como se describe en el presente documento (por ejemplo, que comprenden secuencias de aminoácidos de aCD25-a-674 o que de otra manera incluyen características estructurales y/o funcionales de un agente descrito en el presente documento como un agente de anticuerpo anti-CD25, tal como un agente de anticuerpo anti-CD25-hIgG1) en células tumorales primarias humanas y/o células inmunitarias, incluidos los linfocitos T reguladores, aislados de donantes sanos humanos y/o pacientes. Para investigar los posibles efectos de los agentes de anticuerpo anti-CD25, los anticuerpos pueden usarse para tratar CMSP y/o células aisladas de tumores (y/u órganos, tales como los ganglios linfáticos) y/o explantes de tumores u otros organoides 3D y/o linfocitos T reguladores purificados o generados *in vitro* u otras células CD25 positivas, tales como algunos linfocitos NK o células dendríticas. Las posibles lecturas potenciales comprenden la viabilidad, eliminación y/o apoptosis de las células CD25 positivas, la destrucción de células tumorales, la proliferación y función de las células inmunitarias efectoras (por ejemplo, producción de granzima B, actividad citotóxica, desgranulación), las respuestas específicas de antígeno (como se mide, por ejemplo, por proliferación, desgranulación o producción de citocinas en respuesta a un antígeno). Alternativa o adicionalmente, pueden tratarse ratones o primates no humanos, y puede seguirse el estado celular en muestras de sangre (analizadas como sangre entera o CMSP aisladas) o después del aislamiento de diversos órganos y/o células de los animales, por ejemplo, mediante citometría de flujo o inmunohistoquímica.

Alternativa o adicionalmente, una o más propiedades de los agentes de anticuerpo anti-CD25 (por ejemplo, anticuerpos anti-CD25 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos) como se describe en el presente documento (por ejemplo, que comprenden secuencias de aminoácidos de aCD25-a-674 o que de otra manera incluyen características estructurales y/o funcionales de un agente descrito en el presente documento como un agente de anticuerpo anti-CD25, tal como un agente de anticuerpo anti-CD25-hIgG1) pueden evaluarse, solas o en combinación, estudiando los efectos de dichos agentes de anticuerpo anti-CD25 en células que expresan CD25 (por ejemplo, Treg o células cancerosas que expresan CD25). La lectura puede incluir destrucción celular, apoptosis celular, monitorización de la señalización intracelular (por ejemplo, fosforilación de Stat-5), impacto en la unión de IL-2 a CD25 y señalización (por ejemplo, fosforilación de Stat-5 u otra señalización corriente abajo del receptor de IL-2) y actividades funcionales dependientes de IL-2 (por ejemplo, proliferación y producción de citocinas). Los efectos celulares de los anticuerpos pueden seguirse *in vivo* cuando se administran agentes de anticuerpo aCD25-hIgG1 a macacos cangrejeros o al modelo de ratón relevante.

Con el fin de obtener información adicional sobre las interacciones moleculares entre un agente de anticuerpo anti-CD25 proporcionado y CD25 humano, se puede determinar la estructura cristalina del agente de anticuerpo anti-CD25 (por ejemplo, para dar un ejemplo específico, un anticuerpo aCD25-a-674-hIgG1) y la proteína CD25 humana. La solubilidad y/o la estabilidad de los agentes de anticuerpo anti-CD25 proporcionados (que incluyen específicamente, por ejemplo, los anticuerpos aCD25-a-674-hIgG1) se pueden evaluar mediante estudios de solubilidad, estudios de estrés acelerado, estudios de congelación y descongelación, y estudios de estabilidad formal. La agregación de los anticuerpos puede ir seguida de una inspección visual, cromatografía de exclusión por tamaño y dispersión dinámica de luz y absorbancia DO_{280/320}.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- Figura 1:** Secuencias de proteínas relevantes de aCD25-a-674. Cada CDR para la cadena pesada (aCD25-a-674-HCDR1 (SEQ ID NO: 2), aCD25-a-674-HCDR2 (SEQ ID NO: 3) y aCD25-a-674-HCDR3 (SEQ ID NO: 4)) y la cadena ligera (aCD25-a-674-LCDR1 (SEQ ID NO: 6), aCD25-a-674-LCDR2 (SEQ ID NO: 7) y aCD25-a-674-LCDR3 (SEQ ID NO: 8)) se indica por separado y subrayada dentro de la secuencia de marco del anticuerpo de cadena pesada y ligera como se identificó inicialmente por el procedimiento de selección (aCD25-a-674-HCDR123 (SEQ ID NO: 5) y aCD25-a-674-LCDR123 (SEQ ID NO: 9), respectivamente).
- Figura 2:** Secuencia consenso de CD25 humano (código Uniprot P01589) (SEQ ID NO: 1). El dominio extracelular de CD25 maduro, correspondiente a los aminoácidos 22-240, está subrayado. Se indica la posición de los epítopos de aCD25-a-674 como preliminarmente identificados (aCD25ep-a y aCD25ep-b).
- Figura 3:** Caracterización de la unión de aCD25-a-674 a CD25 expresada en linfocitos Treg diferenciados *in vitro* humanos (A), células SU-DHL-1 (B) o células SR-786 (C) a concentraciones crecientes de anticuerpo y en comparación con el control de isotipo IgG1 humano.
- Figura 4:** Caracterización de la unión de aCD25-a-674 a CD25 expresada en linfocitos Pan T activados con perlas CD3/CD28 humanas (A) y (B) o de macaco cangrejero (C) y (D), luego seleccionadas en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, a concentraciones crecientes de anticuerpo y en comparación con el control de isotipo IgG1 humano.
- Figura 5:** Unión de aCD25-a-674 a CD25-his humana recombinante marcada medida por interferometría de biocapa en el instrumento Octet Red 96. Se cargó 20,83 nM de rhCD25-his en el biosensor Ni NTA seguido por concentraciones variables de anticuerpo (como se muestra en las Figuras) y luego se los dejó disociar en tampón Kinetics.
- Figura 6:** Muestra la unión no competitiva de aCD25-a-674 e IL-2 (A) y la unión competitiva de un anticuerpo que compite por IL-2 con IL-2 (B) por interferometría de biocapa en el Octet Red 384 usando un ensayo de agrupación de formato sándwich estándar. El anticuerpo anti-CD25 humano, aCD25-a-674, se cargó en sensores AHQ. Los sensores se expusieron luego a 100 nM de CD25 humana, seguido de IL-2 humana. La unión adicional por IL-2 humana después de la asociación del antígeno indica un epítipo desocupado (no competidor), mientras que ninguna unión indica el bloqueo del epítipo (competidor).
- Figura 7:** Muestra la unión no competitiva de aCD25-a-674 y daclizumab a CD25 por interferometría de biocapa en el sistema Octet Red 384 usando un ensayo de agrupación de formato sándwich estándar. El anticuerpo monoclonal de referencia anti-CD25 humano daclizumab se cargó en sensores AHQ. Los sensores se expusieron luego a 100 nM de antígeno CD25 humano, seguido por el anticuerpo anti-CD25 humano (aCD25-a-674). La unión adicional por el segundo anticuerpo después de la asociación del antígeno indica un epítipo desocupado (no competidor), mientras que ninguna unión indica el bloqueo del epítipo (competidor).
- Figura 8:** Caracterización de aCD25-a-674 en comparación con el control de isotipo IgG1 humano, daclizumab, o en ausencia de un anticuerpo primario con respecto al bloqueo de la señalización de IL-2 en un ensayo de fosforilación de STAT5 usando CMSP de origen humano. Las células se incubaron con 10 µg/ml de anticuerpo, seguido de concentraciones crecientes de IL-2 (como se muestra en las Figuras). El análisis se limitó al porcentaje de células positivas para CD3 que fosforilan STAT5.
- Figura 9:** Caracterización funcional de aCD25-a-674 en comparación con el control de isotipo IgG1 humana con respecto a la destrucción de líneas celulares positivas para CD25 en un ensayo de ADCC. Las células con expresión alta o baja de CD25, células SU-DHL-1 (A) o SR-786 (B), respectivamente, se cultivaron conjuntamente con linfocitos NK purificados en presencia de concentraciones variables de anticuerpo (como se muestra en las Figuras). La lisis de las células diana se midió mediante la liberación de calceína en el sobrenadante a las cuatro horas después de la adición a los linfocitos NK. Los datos se normalizaron a los controles tratados con saponina.
- Figura 10:** Caracterización funcional de aCD25-a-674 a-fucosilado en comparación con aCD25-a-674 no modificado y control de isotipo IgG1 humana con respecto a la destrucción de líneas celulares positivas para CD25 en un ensayo de ADCC. Las células con expresión alta o baja de CD25, células SU-DHL-1 (A) o SR-786 (B), respectivamente, se cultivaron conjuntamente con linfocitos NK purificados en presencia de concentraciones variables de anticuerpo (como se muestra en las Figuras). La lisis de las células diana se midió mediante la liberación de calceína en el sobrenadante a las cuatro horas después de la adición a los linfocitos NK. Los datos se normalizaron a los controles tratados con saponina.
- Figura 11:** Caracterización funcional de aCD25-a-674 en comparación con el control de isotipo IgG1 humana con respecto a la fagocitosis de linfocitos Treg diferenciados *in vitro* en un ensayo de ADCP. Los Treg se cocultivaron con macrófagos diferenciados con MCSF en presencia de concentraciones variables de anticuerpos (como se muestra en las Figuras). Se realizó un análisis por citometría de flujo de dos colores con macrófagos teñidos con CD14⁺ y Treg marcados con el colorante eFluor450. Las células diana residuales se definieron como células que eran positivas para el colorante eFluor450/CD14⁺. Se consideró que las células marcadas doblemente (positivas para el colorante eFluor450/CD14⁺) representan la fagocitosis de las dianas por los macrófagos. La fagocitosis de las células diana se calculó con la siguiente

ecuación: % de fagocitosis = $100 \times [(\text{porcentaje de doble positivo}) / (\text{porcentaje de doble positivo} + \text{porcentaje de dianas residuales})]$.

Figura 12: Evaluación de la actividad terapéutica de mIgG2a 7D4, un anticuerpo de agotamiento de Treg, no bloqueador de IL-2 anti-CD25 de ratón, solo **(D)** y en combinación con un anticuerpo neutralizante de IL-2 **(E)** o un anticuerpo bloqueador de IL-2 **(F)** en ratones portadores de tumores de colon singénicos CT26 en ratones BALB/c hembra. Se evaluaron la actividad del control de IgG2a de ratón **(A)**, un anticuerpo neutralizante de IL-2 solo **(B)** y un anticuerpo bloqueador de IL-2 solo **(C)** para comparación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE CIERTAS REALIZACIONES

A continuación, se proporcionan ciertas definiciones de términos, medios técnicos y realizaciones usadas en el presente documento, muchos o la mayoría de los cuales confirman la comprensión común de los expertos en la técnica.

Administración: Tal como se usa en el presente documento, el término “administración” se refiere a la administración de una composición a un sujeto. La administración a un sujeto animal (por ejemplo, a un ser humano) puede ser por cualquier vía apropiada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la administración puede ser bronquial (incluida la instilación bronquial), yugal, enteral, intrarterial, intradérmica, intragástrica, intramedular, intramuscular, intranasal, intraperitoneal, intratecal, intravenosa, intraventricular, dentro de un órgano o tejido específico (por ejemplo, intrahepática, intratumoral, peritumoral, etc.), mucosa, nasal, oral, rectal, subcutánea, sublingual, tópica, traqueal (incluida la instilación intratraqueal), transdérmica, vaginal y vítea. La administración puede implicar la administración intermitente. Alternativamente, la administración puede implicar una administración continua (por ejemplo, perfusión) durante al menos un periodo de tiempo seleccionado. Como se conoce en la técnica, la terapia con anticuerpos se administra comúnmente por vía parenteral, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, subcutánea o intratumoral (por ejemplo, particularmente cuando se desean altas dosis dentro de un tumor).

Agente: El término “agente”, tal como se usa en el presente documento, puede referirse a un compuesto o entidad de cualquier clase química, que incluye, por ejemplo, polipéptidos, ácidos nucleicos, sacáridos, moléculas pequeñas, metales o combinaciones de los mismos. Agentes específicos que se pueden utilizar según la presente divulgación incluyen moléculas pequeñas, fármacos, hormonas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, aptámeros, ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNip, ARNhp, oligonucleótidos antisentido, ribozimas), péptidos, miméticos de péptidos, etc. Un agente puede ser o comprender un polímero.

Anticuerpo: Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” se refiere a un polipéptido que incluye elementos de secuencia de inmunoglobulina canónica suficientes para conferir una unión específica a un antígeno diana particular, tal como CD25, CD25 humano en particular, y dominio extracelular de CD25 humano. Como se conoce en la técnica, los anticuerpos intactos como se producen en la naturaleza son agentes tetraméricos de aproximadamente 150 kD que comprenden dos polipéptidos de cadena pesada idénticos (de aproximadamente 50 kD cada uno) y dos polipéptidos de cadena ligera idénticos (de aproximadamente 25 kD cada uno) que se asocian entre sí en lo que comúnmente se conoce como una estructura en “forma de Y”. Cada cadena pesada comprende al menos cuatro dominios (cada uno de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud), un dominio variable aminoterminal (VH) (ubicado en las puntas de la estructura en Y), seguido de tres dominios constantes: CH1, CH2 y el CH3 carboxiterminal (ubicado en la base del tallo de la Y). Una región corta, conocida como el “interruptor”, conecta las regiones constante y variable de cadena pesada. La “bisagra” conecta los dominios CH2 y CH3 con el resto del anticuerpo. Dos enlaces disulfuro en esta región bisagra conectan los dos polipéptidos de cadena pesada entre sí en un anticuerpo intacto. Cada cadena ligera comprende dos dominios, un dominio variable aminoterminal (VL), seguido de un dominio constante carboxiterminal (CL), separados entre sí por otro “interruptor”. Los tetrámeros de anticuerpos intactos comprenden dos dímeros de cadena pesada-cadena ligera en los que las cadenas pesada y ligera están unidas entre sí por un único enlace disulfuro; otros dos enlaces disulfuro conectan las regiones de bisagra de cadena pesada entre sí, de modo que los dímeros se conectan entre sí y se forma el tetrámero. Los anticuerpos producidos naturalmente también están glucosilados, normalmente en el dominio CH2, y cada dominio tiene una estructura caracterizada por un “pliegue de inmunoglobulina” formado a partir de dos hojas beta (por ejemplo, hojas de 3, 4 o 5 cadenas) empaquetadas una contra otra en un barril beta antiparalelo comprimido. Cada dominio variable contiene tres bucles hipervariables conocidos como “regiones determinantes de complemento” (CDR1, CDR2 y CDR3; tal como se entiende en la técnica, por ejemplo, según el esquema de numeración de Kabat) y cuatro regiones “estructurales” algo invariantes (FR1, FR2, FR3 y FR4). Cuando los anticuerpos naturales se pliegan, las regiones FR forman las hojas beta que proporcionan la región estructural para los dominios, y las regiones de bucle CDR de las cadenas pesada y ligera se reúnen en un espacio tridimensional para crear un único sitio de unión al antígeno hipervariable ubicado en la punta de la estructura en Y. La región Fc de los anticuerpos naturales se une a los elementos del sistema de complemento, y también a los receptores en las células efectoras, incluidas, por ejemplo, las células efectoras que median en la citotoxicidad. Como se conoce en la técnica, la afinidad y/u otros atributos de unión de las regiones Fc para los receptores Fc se pueden modular a través de la glucosilación u otra modificación que pueda mejorar la capacidad de desarrollo del anticuerpo (Jarasch A et al., 2015).

En algunas realizaciones, los anticuerpos producidos y/o utilizados según la presente invención incluyen dominios Fc glucosilados, incluyendo dominios Fc con dicha glucosilación modificada o manipulada. Para los fines de la presente invención, en ciertas realizaciones, cualquier polipéptido o complejo de polipéptidos que incluya suficientes secuencias

de dominio de inmunoglobulina como se encuentran en los anticuerpos naturales puede denominarse y/o usarse como un “anticuerpo”, ya sea que dicho polipéptido se produzca de forma natural (por ejemplo, generado por un organismo que reacciona a un antígeno), o producido por ingeniería recombinante, síntesis química, u otro sistema o metodología artificial. En algunas realizaciones, un anticuerpo es policlonal u oligoclonal, que se genera como un panel de anticuerpos, cada uno asociado a una única secuencia de anticuerpo y que une epítomos más o menos distintos dentro de un antígeno (tales como los diferentes epítomos dentro del dominio extracelular de CD25 humano que están asociados a diferentes anticuerpos anti-CD25 de referencia).

Los anticuerpos policlonales u oligoclonales se pueden proporcionar en una única preparación para usos médicos como se describe en la literatura (Kearns JD et al., 2015). En algunas realizaciones, un anticuerpo es monoclonal. En algunas realizaciones, un anticuerpo tiene secuencias de región constante que son características de anticuerpos de ratón, conejo, primate o humano. En algunas realizaciones, los elementos de secuencia de anticuerpo son humanizados, primatizados, quiméricos, etc., como se conoce en la técnica. Además, el término “anticuerpo”, tal como se usa en el presente documento, puede referirse en casos apropiados (a menos que se indique lo contrario o esté claro en el contexto) a cualquiera de las construcciones o formatos conocidos en la técnica o desarrollados para utilizar características estructurales y funcionales del anticuerpo en una presentación alternativa, por ejemplo, como fragmentos de unión al antígeno, tal como se define a continuación. Por ejemplo, un anticuerpo utilizado según la presente invención está en un formato seleccionado de, pero no se limita a, IgG, IgE e IgM intactas, anticuerpos bi- o multi-específicos (por ejemplo, Zybodies®, etc.), dominios variables de cadena simple (scFv), fusiones de polipéptido-Fc, Fab, anticuerpos cameloides, anticuerpos de tiburón de cadena pesada (IgNAR), anticuerpos enmascarados (por ejemplo, Probodies®) o proteínas de fusión con polipéptidos que permiten la expresión y exposición en la superficie celular (como scFv dentro de construcciones para obtener receptores de linfocitos T artificiales que se usan para injertar la especificidad de un anticuerpo monoclonal en un linfocito T). Un anticuerpo enmascarado puede comprender un péptido bloqueador o “enmascarador” que se une específicamente a la superficie de unión al antígeno del anticuerpo e interfiere con la unión al antígeno del anticuerpo. El péptido enmascarador está unido al anticuerpo por un conector escindible (por ejemplo, por una proteasa). La escisión selectiva del conector en el entorno deseado, por ejemplo, en el entorno tumoral, permite que el péptido de enmascaramiento/bloqueo se disocie, permitiendo que se produzca la unión al antígeno en el tumor y, por lo tanto, limitando los posibles problemas de toxicidad. En algunas realizaciones, un anticuerpo puede carecer de una modificación covalente (por ejemplo, la unión de un glicano) que tendría si se produjera de forma natural. Alternativamente, un anticuerpo puede contener una modificación covalente (por ejemplo, unión de un glucano, una carga activa [por ejemplo, un resto detectable, un resto terapéutico, un resto catalítico, etc.], u otro grupo lateral [por ejemplo, polietilenglicol, etc.]).

Agente de anticuerpo no bloqueador de IL-2: Los agentes de anticuerpo anti-CD25 y los fragmentos de unión al antígeno de la presente invención son agentes de anticuerpo no bloqueadores de IL-2. El término “agente de anticuerpo no bloqueador de IL-2” se usa en el presente documento para referirse a aquellos agentes de anticuerpo anti-CD25 (por ejemplo, anticuerpos no bloqueadores de IL-2 anti-CD25) que son capaces de unirse específicamente a la subunidad CD25 del receptor de IL-2 sin bloquear la unión de IL-2 a CD25 o la señalización de IL-2 a través de CD25. Los agentes de anticuerpo anti-CD25 permiten al menos el 50 % de la señalización de IL-2 en respuesta a la unión de IL-2 a CD25 en comparación con el nivel de señalización en ausencia del agente de anticuerpo anti-CD25. Preferiblemente, los agentes de anticuerpo anti-CD25 permiten al menos el 75 % de la señalización de IL-2 en respuesta a CD25 en comparación con el nivel de señalización en ausencia del agente de anticuerpo anti-CD25.

La subunidad CD25 del receptor de IL-2 también se conoce como la subunidad alfa del receptor de IL-2 y se encuentra en linfocitos T activados, linfocitos T reguladores, linfocitos T activados, algunos timocitos, precursores mieloides y oligodendrocitos. CD25 se asocia con CD122 y CD132 para formar un complejo heterotrimérico que actúa como el receptor de alta afinidad para IL-2. La secuencia consenso de CD25 humano se muestra en la Figura 2.

“Unión específica”, “unirse específicamente” y “se unen específicamente” significan que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno tiene una constante de disociación (K_d) para el antígeno de interés de menos de aproximadamente 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o 10^{-12} M. En una realización preferida, la constante de disociación es menor que 10^{-8} M, por ejemplo, en el intervalo de 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o 10^{-12} M. Según algunas realizaciones de la invención, “unión específica”, “unirse específicamente” y “se unen específicamente” pueden referirse a afinidad y/o aidez. En algunas realizaciones, la afinidad de los agentes de anticuerpo anti-CD25 es de 10^{-8} a 10^{-6} (por ejemplo, aproximadamente 10^{-7}). En algunas realizaciones de la invención, la aidez de los agentes de anticuerpo anti-CD25 es aproximadamente de 10^{-10} a 10^{-8} (por ejemplo, aproximadamente 10^{-9}). En algunas realizaciones de la invención, la afinidad y/o la aidez de los agentes de anticuerpo anti-CD25 es aproximadamente de 1 nM a 700 nM, o aproximadamente de 1 a 600 nM.

“No bloqueador de IL-2”, tal como se usa en el presente documento y las referencias a “no bloqueador”, “no bloquea” y similares (con respecto al no bloqueo de la unión de IL-2 a CD25 en presencia del anticuerpo anti-CD25) incluyen realizaciones en donde el anticuerpo anti-CD25 o el fragmento de unión al antígeno inhiben menos del 50 % de la señalización de IL-2 en comparación con la señalización de IL-2 en ausencia de los anticuerpos. En realizaciones particulares de la invención, tal como se describe en el presente documento, el anticuerpo anti-CD25 o el fragmento de unión al antígeno inhibe menos de aproximadamente el 40 %, 35 %, 30 %, preferiblemente menos de aproximadamente el 25 % de la señalización de IL-2 en comparación con la señalización de IL-2 en ausencia de los anticuerpos. Los anticuerpos anti-CD25 no bloqueadores de IL-2 permiten la unión a CD25 sin interferir con la unión de IL-2 a CD25, o sin

interferir sustancialmente con la unión de IL-2 a CD25. Las referencias en el presente documento a un anticuerpo no bloqueador de IL-2 pueden expresarse alternativamente como un anticuerpo anti-CD25 que “no inhibe la unión de la interleucina 2 a CD25” o como un anticuerpo anti-CD25 que “no inhibe la señalización de IL-2”.

Algunos agentes de anticuerpo anti-CD25 pueden permitir la unión de IL-2 a CD25, pero aun así bloquear la señalización a través del receptor de CD25. Dichos agentes de anticuerpo no están dentro del alcance de la presente invención. En cambio, los agentes de anticuerpo anti-CD25 que no bloquean IL-2 permiten la unión de IL-2 a CD25 para facilitar al menos el 50 % del nivel de señalización a través del receptor de CD25 en comparación con la señalización en ausencia del agente de anticuerpo anti-CD25.

La señalización de IL-2 a través de CD25 puede medirse mediante los métodos descritos en los Ejemplos y como se conoce en la técnica. La comparación de la señalización de IL-2 en presencia y ausencia del agente de anticuerpo anti-CD25 puede ocurrir en las mismas o sustancialmente las mismas condiciones.

En algunas realizaciones, la señalización de IL-2 puede determinarse midiendo los niveles de proteína STAT5 fosforilada en las células, usando un ensayo de fosforilación de Stat-5 estándar. Por ejemplo, un ensayo de fosforilación de Stat-5 para medir la señalización de IL-2 puede involucrar el cultivo de células CMSP en presencia del anticuerpo anti-CD25 a una concentración de 10 ug/ml durante 30 minutos y luego añadir concentraciones variables de IL-2 (por ejemplo, a 10 U/ml o a concentraciones variables de 0,25 U/ml, 0,74 U/ml, 2,22 U/ml, 6,66 U/ml o 20 U/ml) durante 10 minutos. Las células pueden entonces ser permeabilizadas y los niveles de proteína STAT5 pueden medirse con un anticuerpo marcado fluorescente contra un péptido STAT5 fosforilado analizado por citometría de flujo. El porcentaje de bloqueo de la señalización de IL-2 se puede calcular de la siguiente manera: % de bloqueo = $100 \times [(\% \text{ de células Stat5}^+ \text{ grupo sin anticuerpo} - \% \text{ de células Stat5}^+ \text{ grupo de 10 ug/ml de anticuerpo}) / (\% \text{ de células Stat5}^+ \text{ grupo sin Ab})]$.

En algunas realizaciones, los agentes de anticuerpo anti-CD25, como se describen en el presente documento, se caracterizan porque agotan eficientemente los linfocitos T reguladores infiltrantes del tumor, en particular dentro de los tumores.

En algunas realizaciones, los agentes de anticuerpo anti-CD25 se caracterizan porque se unen al receptor de Fcγ con alta afinidad, preferiblemente al menos un receptor de Fcγ activante con alta afinidad. Preferiblemente, el anticuerpo se une a al menos un receptor de Fcγ activador con una constante de disociación de menos de aproximadamente 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M. En algunas realizaciones, los agentes de anticuerpo anti-CD25 se caracterizan por otras características relacionadas con los receptores de Fcγ, en particular:

(a) se unen a los receptores de Fcγ con una relación entre activante a inhibidor (A/I) superior a 1; y/o

(b) se unen a al menos uno de FcγRI, FcγRIIc y FcγRIIIa con mayor afinidad de la que se unen a FcγRIIb.

En algunas realizaciones, el agente de anticuerpo anti-CD25 es un anticuerpo IgG1, preferiblemente un anticuerpo IgG1 humano, que es capaz de unirse a al menos un receptor de Fc activante. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a uno o más receptores seleccionados de FcγRI, FcγRIIc y FcγRIIc, FcγRIIIa y FcγRIIIb. En algunas realizaciones, el anticuerpo es capaz de unirse a FcγRIIIa. En algunas realizaciones, el anticuerpo es capaz de unirse a FcγRIIIa y FcγRIIIa y opcionalmente a FcγRI. En algunas realizaciones, el anticuerpo es capaz de unirse a estos receptores con alta afinidad, por ejemplo, con una constante de disociación de menos de aproximadamente 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a un receptor inhibidor, FcγRIIb, con baja afinidad. En un aspecto, el anticuerpo se une a FcγRIIb con una constante de disociación superior a 10^{-7} M, superior a 10^{-6} M o superior a 10^{-5} M.

En algunas realizaciones, los agentes de anticuerpo anti-CD25 deseables como se describen en el presente documento se caracterizan porque son citotóxicos o inducen la fagocitosis de células que expresan CD25 (por ejemplo, que expresan niveles altos de CD25) tales como células supresoras inmunitarias o células tumorales (por ejemplo, en cada caso, que expresan CD25 en su superficie). En algunas realizaciones, un agente de anticuerpo anti-CD25 se caracteriza por una actividad (por ejemplo, nivel y/o tipo) razonablemente comparable al de aCD25-a-674 con respecto a las células inmunitarias (por ejemplo, cuando se ponen en contacto con células inmunitarias, y particularmente con células inmunitarias que expresan CD25) y células tumorales. En algunas realizaciones, una actividad relevante es o comprende el agotamiento de linfocitos Treg (por ejemplo, en un tumor sólido), o ciertas células que expresan CD25 (por ejemplo, células de alta expresión) por ADCP, ADCC o CDC, promoción de la expansión de linfocitos T, linfocitos B o linfocitos NK), sesgo del repertorio de linfocitos T, etc., y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, un nivel y/o actividad incrementados, o un nivel disminuido y/o un cambio aumentado o ausente en el nivel o la actividad, se evalúan o determinan con relación a lo observado en condiciones por lo demás comparables en ausencia de la(s) entidad(es) o resto(s). Alternativamente, o adicionalmente, en algunas realizaciones, un nivel y/o actividad incrementados son comparables o mayores que los observados en condiciones comparables cuando está presente un agente de anticuerpo anti-CD25 de referencia (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25 de referencia apropiado, que en muchas realizaciones es un anticuerpo CD25 que bloquea la unión de IL-2 a CD25, tal como daclizumab o basiliximab). En muchas realizaciones, un agente de anticuerpo anti-CD25 para su uso según la presente divulgación es o comprende una entidad o resto que se une, directa o indirectamente, a CD25, normalmente a su dominio extracelular. También se describen agentes de

anticuerpo anti-CD25 que comprenden o compiten por unirse a CD25 con un anticuerpo anti-CD25 como se ejemplifica en el presente documento, un fragmento de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, que comprende una o más CDR, todas las CDR de cadena pesada, todas las CDR de cadena ligera, todas las CDR, una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera, o ambas regiones variables de cadena pesada y ligera), una variante madurada por afinidad del mismo (o un fragmento de unión al antígeno del mismo), o cualquier formato alternativo (por ejemplo, quimérico, humanizado, multiespecífico, de isotipo alternativo, etc.) de cualquiera de los anteriores. Alternativa o adicionalmente, en algunas realizaciones, un agente de anticuerpo anti-CD25 como se describe en el presente documento puede caracterizarse por una o más características que pueden ser características que son ventajosas para la selección, fabricación (pruebas preclínicas y/o para identificar epítomos relevantes dentro de CD25 humano, tales como la secuencia identificada como aCD25ep-a y aCD25ep-b), y/o para la formulación, administración y/o eficacia en contextos particulares (por ejemplo, para la terapia del cáncer), como se desvela en el presente documento.

Antígeno: El término “antígeno”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un agente que provoca una respuesta inmunitaria y/o que se une a un receptor de linfocitos T (por ejemplo, cuando es presentado por una molécula MHC) y/o receptor de linfocitos B. Un antígeno que provoca una respuesta humoral implica la producción de anticuerpos específicos de antígeno o, como se muestra en los Ejemplos para el dominio extracelular CD25, puede usarse para seleccionar bibliotecas de anticuerpos e identificar secuencias de anticuerpos candidatas para caracterizarse adicionalmente.

Fragmento de unión al antígeno: Tal como se usa en el presente documento, el término “fragmento de unión al antígeno” engloba agentes que incluyen o comprenden una o más porciones de un anticuerpo como se describe en el presente documento, suficientes como para conferir al fragmento de unión al antígeno la capacidad de unirse específicamente al antígeno seleccionado por el anticuerpo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el término engloba cualquier polipéptido o complejo de polipéptidos que incluye elementos estructurales de inmunoglobulina suficientes para conferir una unión específica. Los ejemplos de fragmentos de unión al antígeno incluyen, entre otros, inmunofarmacéuticos modulares pequeños (“SMIPTM”), anticuerpos de cadena simple, anticuerpos cameloides, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, anticuerpos de dominio único de tiburón), diacuerpos de cadena simple o en tándem (TandAb®), VHH, Anticalins®, Nanobodies®, minicuerpos, BiTE®, proteínas con repetición de anquirina o DARPIN®, Avimer®, un DART, un anticuerpo similar a TCR, Adnectin®, Affilin®, Trans-bodies®, Affibodies®, un TrimerX®, microproteínas, Centyrins®, cuerpos de CoVX, péptidos bicíclicos, construcciones de anticuerpos derivadas del dominio Kunitz, o cualquier otro fragmento de anticuerpo, siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada. En algunos casos, el término engloba otras estructuras de proteínas, tales como péptidos engrapados, peptidomiméticos de unión similar al anticuerpo, proteínas de andamiaje de unión similar al anticuerpo, monocuerpos y/u otro armazón de proteínas distintas de anticuerpos, por ejemplo como se revisa en la literatura (Vazquez- Lombardi R et al., 2015). En algunos casos, un fragmento de unión al antígeno es o comprende un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos incluye uno o más elementos estructurales reconocidos por los expertos en la técnica como una región determinante de complementariedad (CDR). En algunos casos, un fragmento de unión al antígeno es o comprende un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos incluye al menos una CDR de referencia (por ejemplo, al menos una CDR de cadena pesada y/o al menos una CDR de cadena ligera) que es sustancialmente idéntica a la que se encuentra en un anticuerpo anti-CD25 como se describe en el presente documento (por ejemplo, en un elemento de secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674), y en particular al menos una CDR de cadena pesada, tal como una HCDR3 (por ejemplo, una secuencia aCD25-674-HCDR3). En algunos casos, un fragmento de unión al antígeno es o comprende un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos incluye al menos una CDR (por ejemplo, al menos una CDR de cadena pesada y/o al menos una CDR de cadena ligera) que es idéntica en secuencia o contiene un pequeño número (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) de alteraciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, adiciones o eliminaciones; en muchos casos, sustituciones) en relación con dicha CDR de referencia, mientras mantiene la unión a la diana del anticuerpo (por ejemplo, aCD25-a-674) del cual se derivó la CDR de referencia. Un fragmento de unión al antígeno es o comprende un polipéptido o complejo del mismo que incluye las tres CDR (o, en algunas realizaciones, secuencias sustancialmente idénticas al mismo) de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de referencia (por ejemplo, de aCD25-a-674); también se describe un fragmento de unión al antígeno que es o comprende un polipéptido o complejo del mismo que incluye las seis CDR (o las secuencias descritas sustancialmente idénticas al mismo) de un anticuerpo de referencia (por ejemplo, de aCD25-a-674). En algunas realizaciones, un fragmento de unión al antígeno es o comprende un polipéptido o complejo del mismo que incluye los dominios variables de cadena pesada y/o ligera (o, en algunas realizaciones, secuencias sustancialmente idénticas al mismo) de un anticuerpo de referencia (por ejemplo, de aCD25-a-674). También se describe el término “fragmento de unión al antígeno” que engloba estructuras no peptídicas y no proteínicas, tales como aptámeros de ácido nucleico, por ejemplo, aptámeros de ARN y aptámeros de ADN. Un aptámero es un oligonucleótido (por ejemplo, ADN, ARN o un análogo o derivado del mismo) que se une a una diana particular, tal como un polipéptido. Los aptámeros son oligonucleótidos monocatenarios sintéticos cortos que se unen específicamente a diversas dianas moleculares, tales como moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos, e incluso células y tejidos. Estas pequeñas moléculas de ácido nucleico pueden formar estructuras secundarias y terciarias capaces de unirse específicamente a proteínas u otras dianas celulares, y son esencialmente un equivalente químico de los anticuerpos. Los aptámeros son altamente específicos, de tamaño relativamente pequeño y no inmunogénicos. Los aptámeros generalmente se seleccionan de un método de ciclos de selección conocido como SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment - Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) (véanse, por ejemplo, Ellington et al., 1990; Tuerk et al., 1990; Ni et al., 2011). Los métodos de generación de un aptámero para cualquier diana dada son bien conocidos en la técnica. Se engloban también aptámeros peptídicos que incluyen afímeros. Un afímero es una proteína pequeña, altamente estable, manipulada para mostrar bucles peptídicos que

proporcionan una superficie de unión de alta afinidad para una proteína diana específica. Es una proteína de bajo peso molecular, 12-14 kDa, derivada de la familia de cistatinas de inhibidores de la cisteína proteasa. Las proteínas afímeras están compuestas de un armazón, que es una proteína estable basada en el pliegue de la proteína cistatina. Muestran dos bucles peptídicos y una secuencia aminoterminal que se puede aleatorizar para unir diferentes proteínas diana con alta afinidad y especificidad similares a los anticuerpos. La estabilización del péptido sobre el andamiaje proteínico restringe las posibles conformaciones que puede tomar el péptido, aumentando así la afinidad y especificidad de unión en comparación con las bibliotecas de péptidos libres.

Muestra biológica: Tal como se usa en el presente documento, los términos “muestra biológica” o “muestra” normalmente se refieren a una muestra obtenida o derivada de una fuente biológica de interés (por ejemplo, un tejido u organismo o cultivo celular), como se describe en el presente documento. Una fuente de interés puede ser un organismo, tal como un animal o un humano. La muestra biológica puede comprender tejido o líquido biológico.

Cáncer: Los términos “cáncer”, “tumor maligno”, “neoplasia”, “tumor” y “carcinoma” se usan de manera indistinta en el presente documento para referirse a células que presentan un crecimiento relativamente anormal, no controlado y/o autónomo, de modo que presentan un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa de control de la proliferación celular. En general, las células de interés para la detección o el tratamiento en la presente solicitud incluyen células precancerosas (por ejemplo, benignas), malignas, premetastásicas, metastásicas y no metastásicas. Las enseñanzas de la presente divulgación pueden ser relevantes para todos y cada uno de los cánceres. Para dar solo algunos ejemplos no limitativos, en algunas realizaciones, las enseñanzas de la presente divulgación se aplican a uno o más cánceres tales como, por ejemplo, cánceres hematopoyéticos que incluyen leucemias, linfomas (de Hodgkin y no hodgkinianos), mielomas y trastornos mieloproliferativos; sarcomas, melanomas, adenomas, carcinomas de tejido sólido, carcinomas de células escamosas de la boca, la garganta, la laringe y el pulmón, cáncer de hígado, cánceres genitourinarios, tales como cáncer de próstata, cuello uterino, vejiga, útero y endometrio, y carcinomas de células renales, cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cánceres gastrointestinales y cánceres del sistema nervioso, lesiones benignas, tales como papilomas, y similares. Los anticuerpos de la invención se pueden usar para el tratamiento de tumores que expresan CD25+. El tratamiento del cáncer que involucra tumores que expresan CD25 puede incluir, pero no se limita a, linfomas, como linfomas de Hodgkin y leucemias linfocíticas, tales como la leucemia linfocítica crónica (LLC).

Terapia de combinación: Tal como se usa en el presente documento, el término “terapia de combinación” se refiere a aquellas situaciones en las que un sujeto está expuesto simultáneamente a dos o más pautas terapéuticas (por ejemplo, dos o más agentes terapéuticos). En algunas realizaciones, dos o más agentes pueden administrarse simultáneamente. Alternativamente, dichos agentes pueden administrarse secuencialmente; de lo contrario, dichos agentes se administran en pautas de administración superpuestas.

Comparable: Tal como se usa en el presente documento, el término “comparable” se refiere a dos o más agentes, entidades, situaciones, efectos, conjuntos de condiciones, etc., que pueden no ser idénticos entre sí, pero que son lo suficientemente similares para permitir la comparación (por ejemplo, por nivel y/o actividad) entre ellos para que puedan extraerse razonablemente conclusiones basándose en las diferencias o similitudes observadas. Dichos conjuntos comparables de condiciones, efectos, circunstancias, individuos o poblaciones se caracterizan por una pluralidad de características sustancialmente idénticas y una o una pequeña cantidad de características variadas. Los expertos en la técnica entenderán, en contexto, qué grado de identidad se requiere en cualquier circunstancia dada para que dos o más de dichos agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, efectos o poblaciones, etc., sean considerados comparables.

Que comprende: Una composición o método descrito en el presente documento como “que comprende” uno o más elementos o etapas nombrados es abierto, lo que significa que los elementos o etapas nombrados son esenciales, pero otros elementos o etapas pueden añadirse dentro del alcance de la composición o método. También se entiende que cualquier composición o método descrito como “que comprende” (“comprende”) uno o más elementos o etapas nombrados también describe la correspondiente composición o método más limitada “que consiste esencialmente en” (o “consiste esencialmente en”) los mismos elementos o etapas nombrados, lo que significa que la composición o método incluyen los elementos o etapas esenciales nombrados y también pueden incluir elementos o etapas adicionales que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s) de la composición o método.

Agotado: Tal como se usa en el presente documento, las referencias a “agotado” o “agotamiento” (con respecto al agotamiento de linfocitos T reguladores por un agente de anticuerpo anti-CD25) significan que el número, la proporción o el porcentaje de Treg disminuyen en relación con cuando no se administra el anticuerpo anti-CD25 que no inhibe la unión de la interleucina 2 a CD25. En realizaciones particulares de la invención como se describe en el presente documento, más de aproximadamente el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 99 % de los linfocitos T reguladores infiltrantes del tumor están agotadas.

Forma de administración: Tal como se usa en el presente documento, el término “forma de administración” se refiere a una unidad físicamente discreta de un agente activo (por ejemplo, un agente terapéutico o de diagnóstico) para la administración a un sujeto. Cada unidad contiene una cantidad predeterminada de agente activo. En algunas

realizaciones, dicha cantidad es una cantidad de dosis unitaria (o una fracción completa de la misma) apropiada para la administración según una pauta de administración que se ha determinado que se correlaciona con un resultado deseado o beneficioso cuando se administra a una población relevante (es decir, con una pauta de administración terapéutica). Los expertos en la materia apreciarán que la cantidad total de una composición terapéutica o agente administrado a un sujeto en particular es determinada por uno o más médicos a cargo y puede implicar la administración de múltiples formas de administración.

Pauta de administración: Tal como se usa en el presente documento, el término "pauta de administración" se refiere a un conjunto de dosis unitarias (normalmente más de una) que se administran individualmente a un sujeto, normalmente separadas por periodos de tiempo. En algunas realizaciones, un agente terapéutico dado tiene una pauta de administración recomendada, que puede implicar una o más dosis. En algunas realizaciones, una pauta de administración comprende una pluralidad de dosis, cada una de las cuales está separada una de otra por un periodo de tiempo de la misma longitud. Alternativamente, una pauta de administración comprende una pluralidad de dosis y al menos dos periodos de tiempo diferentes que separan las dosis individuales. En algunas realizaciones, todas las dosis dentro de una pauta de administración son la misma cantidad de dosis unitaria. Alternativamente, diferentes dosis dentro de una pauta de administración son de diferentes cantidades. En algunas realizaciones, una pauta de administración comprende una primera dosis en una primera cantidad de dosis, seguida de una o más dosis adicionales en una segunda cantidad de dosis diferente de la primera cantidad de dosis. Una pauta de administración puede comprender una primera dosis en una cantidad de la primera dosis, seguida de una o más dosis adicionales en una cantidad de la segunda dosis igual a la cantidad de la primera dosis. En algunas realizaciones, una pauta de administración se correlaciona con un resultado deseado o beneficioso cuando se administra a una población relevante (es decir, es una pauta de administración terapéutica).

Epítipo: Tal como se usa en el presente documento, el término "epítipo" se refiere a una porción de un antígeno que es unida por un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. En algunos casos, cuando el antígeno es un polipéptido, un epítipo es conformacional en el sentido de que comprende porciones de un antígeno que no son covalentemente contiguas en el antígeno, pero que están cercanas entre sí en el espacio tridimensional cuando el antígeno está en una conformación relevante. Por ejemplo, para CD25, los epítipos conformacionales son aquellos que comprenden residuos de aminoácidos que no son contiguos en el dominio extracelular de CD25; los epítipos lineales son aquellos compuestos de residuos de aminoácidos que son contiguos en el dominio extracelular de CD25. En algunos casos, los epítipos utilizados según la presente invención se proporcionan por medio de referencia a aquellos unidos a los agentes de anticuerpo anti-CD25 proporcionados en el presente documento (por ejemplo, por aCD25-a-674 y definidos como aCD25ep-a y aCD25ep-b). Los medios para determinar la secuencia exacta y/o particularmente los residuos de aminoácidos del epítipo para aCD25-a-674 son conocidos en la literatura y en los Ejemplos, incluida la competición con péptidos, a partir de secuencias de antígenos, que se unen a la secuencia de CD25 de diferentes especies, truncado, y/o mutagenizado (por ejemplo, mediante escaneo de alanina u otra mutagénesis dirigida al sitio), detección basada en presentación de fagos, tecnologías de presentación de levadura o técnicas de (co)cristalografía.

Identidad: El porcentaje (%) de identidad como se conoce en la técnica es la relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, según se determina comparando las secuencias. En la técnica, identidad también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias de polipéptidos o polinucleótidos, según sea el caso, como se determina por la coincidencia entre cadenas de dichas secuencias. Si bien existen varios métodos para medir la identidad entre dos polipéptidos o dos secuencias de polinucleótidos, los métodos comúnmente empleados para determinar la identidad se codifican en programas informáticos. Los programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programas GCG (Devereux, et al., Nucleic Acids Research, 12, 387 (1984), BLASTP, BLASTN y FASTA (Atschul et al., J. Molec. Biol. 215, 403 (1990)). El porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico se determina alineando las secuencias con fines de comparación óptimos (por ejemplo, se pueden introducir espacios en la primera secuencia para una mejor alineación con la secuencia) y comparando los residuos de aminoácidos o los nucleótidos en las posiciones correspondientes. La "mejor alineación" es una alineación de dos secuencias que da como resultado el porcentaje de identidad más alto. El porcentaje de identidad se determina por el número de residuos de aminoácidos o nucleótidos idénticos en las secuencias que se comparan (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas / número total de posiciones × 100). En general, las referencias al % de identidad en el presente documento se refieren al % de identidad a lo largo de toda la longitud de la molécula, a menos que el contexto especifique o implique lo contrario.

Célula efectora inmunitaria: Una célula efectora inmunitaria se refiere a una célula inmunitaria que está involucrada en la fase efectora de una respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias a modo de ejemplo incluyen una célula de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (por ejemplo, linfocitos B y linfocitos T que incluyen linfocitos T citotóxicos (CTL)), linfocitos citotóxicos, linfocitos citotóxicos naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleares, granulocitos, mastocitos y basófilos.

Las células efectoras inmunitarias involucradas en la fase efectora de una respuesta inmunitaria pueden expresar receptores de Fc específicos y llevar a cabo funciones inmunitarias específicas. Una célula efectora puede inducir citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), por ejemplo, un neutrófilo capaz de inducir ADCC. Una célula efectora también puede inducir una fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP), que consiste en la fagocitosis de un antígeno diana, una célula diana o un microorganismo, por ejemplo, macrófagos capaces

de ADCP. Por ejemplo, los monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos que expresan FcγR están implicados en la destrucción específica de células diana y en la presentación de antígenos a otros componentes del sistema inmunitario, o en la unión a células que presentan antígenos. Tal y como se trató, los anticuerpos según la presente invención pueden optimizarse para la capacidad de inducir ADCC y/o ADCP.

Linfocitos T reguladores: Tal como se usa en el presente documento, “linfocitos T reguladores” (“Treg”, “linfocitos Treg” o “Tregs”) se refieren a un linaje de linfocitos T CD4+ especializados en el control de la autoinmunidad, alergia e infección. Normalmente, regulan las actividades de las poblaciones de linfocitos T, pero también pueden influir en ciertos tipos de células del sistema inmunitario innato. Los Treg se suelen identificar por la expresión de los biomarcadores CD4, CD25 y Foxp3, y la baja expresión de CD127. Los linfocitos Treg de origen natural constituyen normalmente aproximadamente el 5-10 % de los linfocitos T CD4+ periféricos. Sin embargo, dentro de un microambiente tumoral (es decir, linfocitos Treg que se infiltran en el tumor), pueden constituir hasta el 20-30 % de la población total de linfocitos T CD4+.

Los linfocitos Treg humanos activados pueden destruir directamente a las células diana, tales como los linfocitos T efectoros y las APC, a través de vías dependientes de perforina o granzima B; los linfocitos Treg de antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA4+) inducen la expresión de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) por las APC, y estas a su vez suprimen la activación de los linfocitos T al reducir el triptófano; los linfocitos Treg pueden liberar interleucina-10 (IL-10) y factor de crecimiento transformante (TGFB) *in vivo*, y por lo tanto inhibir directamente la activación de los linfocitos T y suprimir la función de APC al inhibir la expresión de moléculas MHC, CD80, CD86 e IL-12. Los linfocitos Treg también pueden suprimir la inmunidad al expresar altos niveles de CTLA4 que pueden unirse a CD80 y CD86 en las células presentadoras de antígeno y prevenir la activación adecuada de los linfocitos T efectoros.

Paciente: Tal como se usa en el presente documento, el término “paciente” o “sujeto” se refiere a cualquier organismo al que se le administra o puede administrar una composición, por ejemplo, con fines experimentales, de diagnóstico, profilácticos, cosméticos y/o terapéuticos. Los pacientes típicos incluyen animales (por ejemplo, mamíferos, tales como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y/o humanos). En algunas realizaciones, un paciente es un humano. En algunas realizaciones, un paciente sufre o es susceptible a uno o más trastornos o afecciones. Un paciente puede presentar uno o más síntomas de un trastorno o afección, o puede haber sido diagnosticado con uno o más trastornos o afecciones (tales como cáncer o presencia de uno o más tumores). En algunas realizaciones, el paciente está recibiendo o ha recibido cierta terapia para diagnosticar y/o tratar dicha enfermedad, trastorno o afección.

Farmacéuticamente aceptable: Tal como se usa en el presente documento, el término “farmacéuticamente aceptable” aplicado al vehículo, diluyente o excipiente usado para formular una composición como se desvela en el presente documento significa que el vehículo, diluyente o excipiente debe ser compatible con los otros componentes de la composición y no es perjudicial para el destinatario de la misma.

Composición farmacéutica: Tal como se usa en el presente documento, el término “composición farmacéutica” se refiere a una composición en la que se formula un agente activo junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, el agente activo está presente en una dosis unitaria apropiada para la administración en una pauta terapéutica que muestra una probabilidad estadísticamente significativa de lograr un efecto terapéutico predeterminado cuando se administra a una población relevante. Una composición farmacéutica puede formularse para administración en forma sólida o líquida, incluidas las adaptadas para lo siguiente: administración oral, por ejemplo, pociones (disoluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos, por ejemplo, aquellos destinados a absorción yugal, sublingual y sistémica, bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación a la lengua; administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa, intratumoral o epidural como disolución o suspensión estéril, o formulación de liberación sostenida; aplicación tópica, por ejemplo, como crema, ungüento o parche de liberación controlada o espray aplicado a la piel, los pulmones o la cavidad bucal; por vía intravaginal, intrarrectal, sublingual, ocular, transdérmica, nasal, pulmonar y a otras superficies mucosas.

Tumor sólido: Tal como se usa en el presente documento, el término “tumor sólido” se refiere a una masa anormal de tejido que generalmente no contiene quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos o malignos. Los diferentes tipos de tumores sólidos se nombran según el tipo de células que los forman. Los ejemplos de tumores sólidos son sarcomas (incluidos los cánceres que surgen de células transformadas de origen mesenquimatoso en tejidos, tales como hueso esponjoso, cartílago, grasa, músculo, tejidos conjuntivos vasculares, hematopoyéticos o fibrosos), carcinomas (incluidos los tumores que surgen de células epiteliales), melanomas, linfomas, mesotelioma, neuroblastoma, retinoblastoma, etc. Los cánceres que involucran tumores sólidos incluyen, sin limitaciones, cáncer cerebral, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer duodenal, cáncer de esófago, cáncer de mama, cáncer de colon y recto, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de boca, sarcoma, cáncer de ojo, cáncer de tiroides, cáncer de uretra, cáncer de vagina, cáncer de cuello, linfoma y similares.

Cantidad terapéuticamente eficaz: Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” significa una cantidad (por ejemplo, de un agente o de una composición farmacéutica) que es suficiente, cuando se administra a una población que sufre o es susceptible a una enfermedad y/o afección según una pauta de administración terapéutica, para tratar dicha enfermedad y/o afección. Una cantidad terapéuticamente eficaz es aquella que reduce la incidencia y/o la gravedad, estabiliza y/o retrasa la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad,

trastorno o afección. Los expertos en la técnica apreciarán que una “cantidad terapéuticamente eficaz” no requiere, de hecho, que se logre un tratamiento satisfactorio en un sujeto particular.

Tratamiento: Tal como se usa en el presente documento, el término “tratamiento” (también “tratar” o “tratando”) se refiere a cualquier administración de una sustancia (por ejemplo, un agente de anticuerpo anti-CD25 proporcionado, como se ejemplifica por aCD25-a-674, o cualquier otro agente) que alivia o mejora de forma parcial o completa, revive, inhibe, retrasa la aparición, reduce la gravedad y/o reduce la incidencia de uno o más síntomas. En algunas realizaciones, el tratamiento puede implicar la administración directa de un agente de anticuerpo anti-CD25, tal como aCD25-a-674 (por ejemplo, como una composición acuosa inyectable, que comprende opcionalmente un vehículo, excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, para usar en la inyección intravenosa, intratumoral o peritumoral) o la administración usando una pauta que comprende obtener células del sujeto (por ejemplo, de la sangre, un tejido o un tumor, con o sin selección sobre la base de la presencia o ausencia de la expresión de un marcador), poniendo en contacto dichas células con un agente de anticuerpo anti-CD25, tal como aCD25-a-674, *ex vivo*, y administrando dichas células al sujeto (con o sin una selección sobre la base de la presencia o ausencia de la expresión de un marcador).

Dosis y administración. Las composiciones farmacéuticas que comprenden un agente de anticuerpo anti-CD25 como se describe en el presente documento (por ejemplo, un anti-CD25 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, por ejemplo, que comprende la secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-HCDR3) pueden ser preparadas para el almacenamiento y/o entrega usando cualquiera de una variedad de técnicas y/o tecnologías conocidas y/o disponibles para los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, un agente de anticuerpo anti-CD25 proporcionado se administra según una pauta de administración aprobado por una autoridad reguladora, tal como la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) y/o la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), por ejemplo, para la indicación pertinente. En algunas realizaciones, un agente de anticuerpo anti-CD25 proporcionado se administra en combinación con uno o más agentes o terapias, que pueden administrarse según una pauta de administración aprobada por una autoridad reguladora, tal como la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) y/o la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), por ejemplo, para la indicación pertinente. Sin embargo, en algunas realizaciones, el uso de un agente de anticuerpo anti-CD25 proporcionado puede permitir una administración reducida (por ejemplo, una menor cantidad de activo en una o más dosis, un número menor de dosis y/o una frecuencia de dosis reducida) de un agente o terapia aprobado usado en combinación con la terapia con agentes de anticuerpo anti-CD25. En algunas realizaciones, la dosis y/o la administración pueden adaptarse a otros fármacos que también se administran, el estado del paciente y/o el formato del agente de anticuerpo anti-CD25 (por ejemplo, modificado como un inmunoconjugado, un anticuerpo de dominio único o un anticuerpo biespecífico).

Además, en algunas realizaciones, puede ser deseable adaptar las pautas de administración y, en particular, diseñar pautas de administración secuenciales, en función del ritmo y/o los niveles de expresión de umbral de CD25, ya sea para tipos de células particulares, tumores particulares o tipos de los mismos, o poblaciones de pacientes particulares (por ejemplo, portadores de marcadores genéticos). En algunas de dichas realizaciones, las pautas de administración terapéutica se pueden combinar o ajustar en vista de los métodos de detección que evalúan la expresión de uno o más marcadores inducibles u otros criterios antes y/o durante la terapia.

En algunas realizaciones, la dosis y la administración según la presente invención utilizan un agente activo que tiene un grado de pureza deseado combinado con uno o más vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables en cualquier forma o variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de administración líquidas, semisólidas y sólidas, tales como disoluciones líquidas (por ejemplo, disoluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. Una forma preferida puede depender del modo de administración previsto y/o la aplicación terapéutica, normalmente en forma de disoluciones inyectables o infundibles, tales como composiciones similares a las usadas para tratar sujetos humanos con anticuerpos.

En algunas realizaciones, el (los) componente(s) puede(n) prepararse con vehículos que protegen el (los) agente(s) contra la liberación y/o degradación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como polianhídridos, ácido poliglicólico, poliortoésteres y ácido poliláctico. En general, cada agente activo se formula, se dosifica y se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz usando composiciones farmacéuticas y pautas de administración que son consistentes con una buena práctica médica y apropiados para el (los) agente(s) relevante(s) (por ejemplo, para agentes, tales como los anticuerpos). Las composiciones farmacéuticas que contienen agentes activos pueden administrarse por cualquier método apropiado conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, administración oral, mucosa, por inhalación, tópica, yugal, nasal, rectal o parenteral (por ejemplo, intravenosa, infusión, intratumoral, intranodal, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, transdérmica u otros tipos que impliquen la ruptura física de un tejido de un sujeto y la administración de la composición farmacéutica a través de dicha brecha).

En algunas realizaciones, una pauta de administración para un agente activo particular puede involucrar la administración intermitente o continua (por ejemplo, por perfusión o sistema de liberación lenta), por ejemplo, para lograr un perfil farmacocinético deseado particular u otro patrón de exposición en uno o más tejidos o líquidos de interés en el sujeto. En algunas realizaciones, diferentes agentes administrados en combinación pueden administrarse a través de diferentes vías de administración y/o según diferentes programas. Alternativamente, o adicionalmente, en algunas realizaciones, una o

más dosis de un primer agente activo se administran sustancialmente simultáneamente con, y en algunas realizaciones a través de una vía común y/o como parte de una composición única con, uno o más agentes activos.

Los factores que deben considerarse al optimizar las vías y/o el programa de administración para una pauta terapéutica dada pueden incluir, por ejemplo, el cáncer particular que se está tratando (por ejemplo, tipo, estadio, localización, etc.), la situación clínica del sujeto (por ejemplo, edad, estado general de salud, peso, etc.), el lugar de administración del agente, la naturaleza del agente (por ejemplo, un anticuerpo u otro compuesto basado en proteínas), el modo y/o la vía de administración del agente, la presencia o ausencia de terapia de combinación, y otros factores conocidos por los médicos.

Los expertos en la técnica apreciarán, por ejemplo, que una vía específica de administración puede afectar la cantidad de dosis y/o la cantidad de dosis requerida puede afectar la vía de administración. Por ejemplo, cuando las concentraciones particularmente altas de un agente dentro de un sitio o localización particular (por ejemplo, dentro de un tejido u órgano) son de interés, la administración focalizada (por ejemplo, la administración intratumoral) puede ser deseable y/o útil. En algunas realizaciones, una o más características de una composición farmacéutica particular y/o de una pauta de administración utilizada pueden modificarse con el tiempo (por ejemplo, aumentando o disminuyendo la cantidad de activo en cualquier dosis individual, aumentando o disminuyendo los intervalos de tiempo entre dosis, etc.), por ejemplo, para optimizar un efecto o respuesta terapéutica deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o biológica que esté relacionada con las características funcionales de un agente de anticuerpo anti-CD25 como se describe en el presente documento). En general, el tipo, la cantidad y la frecuencia de administración de los agentes activos según la presente invención se rigen por los requisitos de seguridad y eficacia que se aplican cuando el (los) agente(s) relevante(s) se administran a un mamífero, preferiblemente un ser humano. En general, dichas características de la administración se seleccionan para proporcionar una respuesta terapéutica particular y normalmente detectable en comparación con lo que se observa en ausencia de terapia. En el contexto de la presente invención, una respuesta terapéutica deseable a modo de ejemplo puede implicar, pero no se limita a, inhibición y/o disminución del crecimiento del tumor, tamaño tumoral, metástasis, uno o más de los síntomas y efectos secundarios que se asocian con el tumor, así como el aumento de la apoptosis de las células cancerosas, la disminución o el aumento terapéuticamente relevante de uno o más marcadores celulares o marcadores circulantes y similares. Dichos criterios pueden evaluarse fácilmente mediante cualquiera de una variedad de métodos inmunológicos, citológicos y otros que se desvelan en la literatura. Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente eficaz de agentes de anticuerpo anti-CD25, solos o en combinación con un agente adicional, puede determinarse como suficiente para potenciar la destrucción de células cancerosas como se describe en los Ejemplos.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de anticuerpo anti-CD25 como agente activo o composición que comprende dicho agente puede determinarse fácilmente usando técnicas disponibles en la técnica, que incluyen, por ejemplo, considerar uno o más factores tales como la enfermedad o la afección que se trata, el estadio de la enfermedad, la edad, la salud y la condición física del mamífero que se está tratando, la gravedad de la enfermedad, el compuesto particular que se administra y similares.

En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz es una dosis eficaz (y/o una dosis unitaria) de un agente activo que puede ser de al menos aproximadamente 0,01 mg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 0,05 mg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, al menos aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, o más (por ejemplo, 0,01, 0,1, 0,3, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 o 50 mg/kg de peso corporal). Un experto en la técnica entenderá que, en algunas realizaciones, dichas directrices pueden ajustarse al peso molecular del agente activo. La dosis también puede variar según la vía de administración, el ciclo de tratamiento o, en consecuencia, el protocolo de aumento de dosis que puede usarse para determinar la dosis máxima tolerada y la toxicidad limitante de la dosis (si corresponde) en relación con la administración del anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende la secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-HCDR3 a dosis crecientes.

Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una disolución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. Las disoluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el anticuerpo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de los componentes enumerados anteriormente, seguido de esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y otros componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos para preparar disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y el secado por congelación que produce un polvo del principio activo más cualquier componente adicional deseado de una disolución filtrada previamente estéril. La fluidez adecuada de una disolución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

La formulación de cada agente debe ser deseablemente estéril, como puede lograrse por filtración a través de membranas de filtración estériles, y luego envasarse, o venderse en una forma adecuada para la administración en bolo o para la administración continua. Las formulaciones inyectables pueden prepararse, envasarse o venderse en forma de dosis

unitaria, tal como en ampollas o en recipientes de dosis múltiples que contienen un conservante. Las formulaciones para administración parenteral incluyen, pero no se limitan a, suspensiones, disoluciones, emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, pastas y formulaciones implantables de liberación sostenida o biodegradables como se trata en el presente documento. Las formulaciones inyectables estériles pueden prepararse usando un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, tal como agua o 1,3-butanodiol. Otras formulaciones administrables por vía parenteral que son útiles incluyen aquellas que comprenden el principio activo en forma microcristalina, en una preparación liposómica, o como un componente de sistemas de polímeros biodegradables. Las composiciones para liberación sostenida o implantación pueden comprender materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables, tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero o sal poco soluble.

Cada composición farmacéutica para su uso según la presente invención puede incluir agentes dispersantes, agentes humectantes, agentes de suspensión, agentes isotónicos, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, vehículos, excipientes, sales o estabilizantes farmacéuticamente aceptables no tóxicos para los sujetos en las dosis y concentraciones empleadas. Una lista no exhaustiva de dichos compuestos farmacéuticamente aceptables adicionales incluye tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, que incluyen ácido ascórbico y metionina; sales que contienen aniones farmacológicamente aceptables (tales como acetato, benzoato, bicarbonato, bisulfato, isotionato, lactato, lactobionato, laurato, malato, maleato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, tanato, tartrato, teocato, tosilato, tietioduro y sales de valerato); conservantes (tales como cloruro de octadecidimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; cloruro de sodio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como la albúmina sérica; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, ácido glutámico, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos, tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

En algunas realizaciones, donde se utilizan dos o más agentes activos según la presente invención, dichos agentes pueden administrarse simultánea o secuencialmente. En algunas realizaciones, la administración de un agente está programada específicamente en relación con la administración de otro agente. En algunas realizaciones, las pautas de administración deseadas para agentes administrados en combinación pueden evaluarse o determinarse empíricamente, por ejemplo, usando modelos *ex vivo*, *in vivo* y/o *in vitro*; en algunas realizaciones, dicha evaluación o determinación empírica se realiza *in vivo*, en un paciente particular o población de pacientes (por ejemplo, de modo que se realiza una correlación).

En algunas realizaciones, uno o más agentes activos utilizados en la práctica de la presente invención se administran según una pauta de administración intermitente que comprende al menos dos ciclos. Donde se administran dos o más agentes en combinación, y cada uno de ellos mediante dicho régimen de ciclos intermitente, se pueden entrelazar entre sí dosis individuales de diferentes agentes. En algunas realizaciones, se administra una o más dosis del segundo agente un periodo de tiempo después de una dosis de un agente de anticuerpo anti-CD25 como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, cada dosis del segundo agente se administra un periodo de tiempo después de una dosis de agente de anticuerpo anti-CD25 como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, se administra una o más dosis del segundo agente un periodo de tiempo antes de una dosis de un agente de anticuerpo anti-CD25. En algunas realizaciones, un agente de anticuerpo anti-CD25 como se describe en el presente documento también se puede administrar en pautas que involucran no solo la administración subsiguiente por la misma vía, sino también por vías de administración alternativas, tales como por administración subcutánea (o intramuscular) y administración intratumoral, dentro de uno o más ciclos de tratamiento durante una, dos, cuatro o más semanas, repitiendo dicho ciclo con la misma pauta (o extendiendo el intervalo entre administraciones), dependiendo de las respuestas del paciente. Además, en algunas realizaciones, la pauta precisa seguida (por ejemplo, número de dosis, espaciamiento de las dosis (por ejemplo, en relación con la otra o con otro evento, tal como la administración de otra terapia), cantidad de dosis, etc., puede ser diferente para uno o más ciclos en comparación con uno o más ciclos adicionales.

Al usar cualquiera de las vías de administración, dosis y/o pautas como se describe en el presente documento, un agente de anticuerpo anti-CD25 como se describe en el presente documento se puede identificar, caracterizar y/o validar, por ejemplo, teniendo en cuenta uno o más criterios que se miden en los pacientes usando biopsias, muestras de sangre y/u otros criterios clínicos. En algunos casos, como una alternativa o además de la evaluación directa del tamaño del tumor y/o la metástasis, la eficacia terapéutica de un agente de anticuerpo anti-CD25 como se describe en el presente documento se puede determinar en métodos en donde se evalúan uno o más criterios generales diferentes: disminución de linfocitos T reguladores en la circulación, tumores y/o órganos linfoides, citotoxicidad directa en células cancerosas (apoptosis y necrosis de células cancerosas), aumento de infiltración tumoral, células inmunitarias (tales como linfocitos T infiltrantes del tumor CD4-positivos y/o CD8-positivos), aumento de las células inmunitarias que circulan en la sangre (poblaciones totales o subpoblaciones específicas de linfocitos, linfocitos NK, monocitos, células dendríticas, macrófagos, linfocitos B, etc.) y/o que presentan alguna expresión diferencial antes frente a después del tratamiento solo en pacientes que respondieron o no respondieron (como se determina por secuenciación de ARN, citometría de flujo de masa y/u otro enfoque de secuenciación de masa). Alternativamente, o adicionalmente, la identificación, caracterización y/o validación descritas pueden implicar el seguimiento a nivel molecular mediante la selección de ARNm y/o la expresión de proteínas

de una o más proteínas específicas o conjuntos de proteínas. En algunos casos, una o más de dichas técnicas puede permitir la identificación o información relevante para evaluar la respuesta a un agente de anticuerpo anti-CD25, como se describe en el presente documento, por ejemplo, que puede estar relacionada con la distribución de tejidos y/o marcadores para poblaciones celulares específicas dentro (o cerca) del tumor y/o circulando en la sangre.

Dichos enfoques y datos inmunológicos pueden permitir la determinación no solo de uno o más parámetros o características de eficacia y/o seguridad, sino que, en algunas realizaciones, pueden proporcionar una justificación para elegir una dosis, una vía o una pauta de administración particulares, por ejemplo que se pueden utilizar en uno o más ensayos clínicos para una indicación dada, solo y/o en combinación con otros fármacos, protocolos de tratamientos habituales o inmunoterapias que pueden proporcionar beneficios terapéuticos adicionales. Por lo tanto, también se describe un agente de anticuerpo anti-CD25 como se describe en el presente documento que se usa en un método de tratamiento de un paciente que padece una enfermedad (tal como cáncer) o prevención de una enfermedad (tal como el cáncer) después de determinar la presencia (y/o ausencia) combinada de expresión a nivel de ARN y/o proteína para uno o más genes en las células o tejidos del paciente (tal como un tumor, una muestra de sangre o una fracción de sangre), antes o después del tratamiento con dicha formulación. Dichos métodos pueden permitir, por lo tanto, definir en uno o más biomarcadores, o una firma de expresión génica más compleja (o distribución de la población celular) que está asociada a la cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de anticuerpo anti-CD25 deseable, el (los) biomarcador(es) terapéuticamente relevante(s) que predicen que un sujeto puede tener una respuesta antitumoral o antiinfecciosa después del tratamiento con un agente de anticuerpo anti-CD25 como se describe en el presente documento, o el (los) biomarcador(es) terapéuticamente relevante(s) que predicen que un sujeto pueda responder al tratamiento con un compuesto después del tratamiento con un agente de anticuerpo anti-CD25.

Alternativa o adicionalmente, la dosis y administración de un agente de anticuerpo anti-CD25 particular como se desvela en el presente documento puede establecerse preliminarmente y/o evaluarse posteriormente en vista de la expresión de CD25 en cánceres humanos y/u otros tejidos humanos, por ejemplo, mediante recopilación de datos sobre la distribución de CD25 en subconjuntos estromales y/o inmunitarios en diversos cánceres, tejidos y/o pacientes. Dichos datos pueden generarse mediante el uso de tecnologías comunes (tales como citometría de flujo, citometría de masas, inmunohistoquímica o bibliotecas de expresión de ARNm) en todos los tipos de cáncer y/o tejidos comunes (sistema nervioso central, esófago, estómago, hígado, colon, recto, pulmón, vejiga, corazón, riñón, tiroides, páncreas, útero, piel, mama, ovario, próstata y testículos) para identificar la relación entre la expresión de CD25 en varias subpoblaciones inmunitarias y no inmunitarias y/o su relación con medidas de infiltrado celular y/o marcadores de cáncer relevantes asociados con subconjuntos de células cancerosas o células inmunitarias (tales como Foxp3 y PD-1/PD-L1). La expresión de CD25 se puede confinar (o no) a subconjuntos inmunitarios en el tejido tumoral (tal como en los linfocitos NK y otras células inmunitarias reguladoras o efectoras), y las correlaciones entre la expresión de CD25 y los inhibidores del punto de control inmunitario pueden determinarse si son positivas, lo que indica usos apropiados de agentes de anticuerpo anti-CD25 en combinación con compuestos dirigidos a dicho inhibidor del punto de control inmunitario, por ejemplo, un antagonista de PD-1, tal como un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1.

Artículos de fabricación y kits: en algunas realizaciones de la divulgación, se proporciona un agente de anticuerpo anti-CD25 como se describe en el presente documento en un artículo de fabricación separado. En algunos casos de la divulgación, un artículo de fabricación que contiene un agente de anticuerpo anti-CD25 se proporciona en o con un recipiente con una etiqueta. Los recipientes adecuados pueden incluir, por ejemplo, frascos, viales, jeringas y tubos de ensayo. En algunos casos, un recipiente puede formarse a partir de cualquiera o una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. En algunos casos, un recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar una enfermedad, trastorno o afección particular, o etapa o tipo del mismo. En algunas realizaciones, un recipiente puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Por ejemplo, en algunos casos, una composición que comprende un agente de anticuerpo anti-CD25 como se describe en el presente documento se envasa en viales de vidrio transparente con un tapón de goma y un sello de aluminio. La etiqueta en, o asociada con, el recipiente indica que la composición se usa para el tratamiento de la afección de elección.

En algunos casos, un artículo de fabricación puede comprender además un recipiente separado que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa, y/o puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas prospectos con instrucciones de uso. Por ejemplo, en algunos casos, un artículo de fabricación puede permitir proporcionar cada uno o el agente en una formulación intravenosa como una disolución acuosa estéril que contiene un total de 2 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 50 mg o más que son formulados con diluyentes y tampones apropiados, a una concentración final de 0,1 mg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml, o en una concentración más alta.

En algunos casos, un agente de anticuerpo anti-CD25, como se describe en el presente documento, puede proporcionarse dentro de los kits de partes en forma de liofilizado que debe reconstituirse con cualquier disolución acuosa apropiada que se proporcione o no con los kits, u otros tipos de dosis unitaria usando cualquier vehículo farmacéutico compatible. Se pueden proporcionar una o más formas farmacéuticas unitarias de un agente de anticuerpo anti-CD25 en un envase o dispositivo dispensador. Dicho envase o dispositivo puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o plástico, tal

como un envase alveolado. Para usar correctamente dichos kits de partes, puede comprender además tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas prospectos con instrucciones para el uso en el tratamiento del cáncer.

En algunos casos, las instrucciones que están asociadas con un artículo de fabricación o los kits descritos en el presente documento pueden tener la forma de una etiqueta, un folleto, una publicación, un registro, un diagrama o cualquier otro medio que se pueda usar para informar sobre el uso correcto y/o la monitorización de los posibles efectos de los agentes, formulaciones y otros materiales en el artículo de fabricación y/o en el kit. Las instrucciones pueden proporcionarse junto con el artículo de fabricación y/o en el kit.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos que se unen a CD25 *in vitro*

Materiales y métodos

Preparación del antígeno CD25

Se adquirieron proteínas CD25-HIS de ratón, CD25-Fc humano y recombinantes sin etiquetar de R&D Systems Biotechne. Las proteínas recombinantes de macaco cangrejero CD25-Fc y CD25-HIS se adquirieron de Sino Biological. La biotinylation de los reactivos de proteínas se realizó usando el kit EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation, Thermo Scientific, n.º de cat. 21425. El antígeno CD25 se concentró hasta ~1 mg/ml y el tampón se intercambió en PBS antes de la adición de un reactivo de biotinylation de relación molar 1:7,5 (kit EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation, Thermo Scientific, n.º de cat. 21425). La mezcla se mantuvo a 4 °C durante la noche antes de otro intercambio de tampón para eliminar la biotina libre en la disolución. La biotinylation se confirmó a través de la unión del sensor de estreptavidina de las proteínas marcadas en un ForteBio.

Metodología de interrogación y selección de bibliotecas para el aislamiento de anticuerpos anti-CD25:

Se diseñaron, generaron y propagaron ocho bibliotecas de levaduras sintéticas humanas intactas cada una de ~10⁹ de diversidad como se describió anteriormente (véase, por ejemplo: Xu et al., 2013; documentos de patente WO2009036379; WO2010105256; WO2012009568). Se realizaron ocho selecciones paralelas, usando las ocho bibliotecas intactas para las selecciones de CD25 humano monomérico.

Para las dos primeras rondas de selección, se realizó una técnica de clasificación en perlas magnéticas utilizando el sistema de Miltenyi MAC, esencialmente como se describe (Siegel et al., 2004). Brevemente, se incubaron células de levadura (~10¹⁰ células / biblioteca) con 3 ml de antígeno CD25 10 nM biotinilado dimérico humano durante 15 minutos a 30 °C en tampón de lavado FACS (PBS con 0,1 % de BSA). Después de lavar una vez con 50 ml de tampón de lavado enfriado con hielo, el sedimento celular se resuspendió en 40 ml de tampón de lavado, y se añadieron 500 µl de microesferas de estreptavidina (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania. N.º de cat. 130-048-101) a la levadura y se incubaron durante 15 minutos a 4 °C. A continuación, las levaduras se sedimentaron, se resuspendieron en 5 ml de tampón de lavado y se cargaron en una columna MACS LS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania. n.º de cat. 130-042-401). Después de cargar los 5 ml, la columna se lavó 3 veces con 3 ml de tampón de lavado FACS. Luego, la columna se retiró del campo magnético y la levadura se eluyó con 5 ml de medio de crecimiento y luego se cultivó durante la noche.

Posteriormente a las dos rondas de MACS, se realizaron cuatro rondas de clasificación usando citometría de flujo (FACS), que se describen en los tres párrafos siguientes.

Para la primera ronda de selección de FACS, se hizo sedimentar 4×10⁷ levadura, se lavaron tres veces con tampón de lavado y se incubaron con 10 nM de cada uno del antígeno humano dimérico biotinilado o 200 nM del antígeno CD25 de ratón monomérico biotinilado durante 15 min a 30 °C. Las levaduras se lavaron a continuación dos veces y se tñieron con F(ab')₂ kappa-FITC anti-humano de cabra diluido 1:100 (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, n.º de cat. 2062-02) y con estreptavidina-Alexa Fluor 633 (Life Technologies, Grand Island, NY, n.º de cat. S21375) diluida 1:500, o ExtrAvidin-ficoeritrina (Sigma-Aldrich, St. Louis, n.º de cat. E4011) diluida 1:50, reactivos secundarios durante 15 min a 4 °C. Después de lavar dos veces con tampón de lavado enfriado con hielo, los sedimentos celulares se resuspendieron en 0,4 ml de tampón de lavado y se transfirieron a tubos de clasificación tapados con filtro. La clasificación se realizó usando un clasificador FACS ARIA (BD Biosciences) y se determinaron las ventanas de clasificación para seleccionar solo la unión a CD25. Las poblaciones seleccionadas murinas de la primera ronda de FACS se combinaron en un grupo. Este conjunto se clasificó a continuación para determinar la unión de CD25 humana para aumentar o identificar los aglutinantes de reactividad cruzada en la tercera ronda de FACS (descrita a continuación).

La segunda y tercera ronda de FACS para las poblaciones seleccionadas humanas implicaron clasificaciones positivas para aglutinantes CD25 o clasificaciones negativas para disminuir los aglutinantes poliespecíficos reactivos (Xu et al., 2013). Dependiendo de la cantidad de unión poliespecífica o unión de diana de una salida de selección específica, una clasificación positiva siguió a una clasificación negativa o viceversa, para enriquecer una población de unión completa con una cantidad limitada de unión poliespecífica. Se sembró y secuenció una muestra de la salida de las tres selecciones de la ronda.

La cuarta ronda de FACS consistió predominantemente en una selección positiva usando CD25 10 nM de macaco cangrejero dimérico biotinilado como antígeno. A continuación se sembró una muestra de estas selecciones y se secuenció, de manera similar a la realizada con la salida de la selección de la tercera ronda.

Maduración por afinidad de clones identificados en selecciones intactas

Se usaron las cadenas pesadas de las salidas de clasificación negativa del aglutinante poliespecífico para preparar bibliotecas de diversificación de cadenas ligeras usadas para cuatro rondas de selección adicionales. La primera de estas rondas de selección utilizó perlas de Miltenyi MAC conjugadas con CD25 humano 10 nM dimérico biotinilado como antígeno o CD25 murino 100 nM monomérico biotinilado como antígeno.

Posteriormente a las selecciones de perlas de MAC, se realizaron tres rondas de clasificación por FACS. La primera de estas rondas usó CD25 humano monomérico a 100 nM, CD25 de macaco cangrejero dimérico a 10 nM o CD25 murino monomérico a 200 nM. La segunda ronda de FACS fue una selección negativa con el reactivo de poliespecificidad para enriquecer una población de unión completa con una cantidad limitada de unión poliespecífica. La tercera ronda de FACS incluyó una titulación del antígeno CD25 humano hasta 1 nM, así como una selección paralela usando CD25 murino 100 o 10 nM.

En paralelo a la tercera ronda de FACS descrita en el párrafo inmediatamente anterior, se realizaron selecciones de competencia. Para las selecciones de la competencia, se incubaron 200 nM de IgG competidora (de la selección intacta (descrita anteriormente) con agrupaciones conocidas en CD25 humano para seleccionar anticuerpos que compitieron o no con esa selección) con CD25 humano dimérico biotinilado 10 nM durante 30 minutos antes de la incubación con levadura durante 30 minutos.

Las colonias individuales de cada ronda de selección de FACS descritas anteriormente se sembraron y se seleccionaron para la caracterización de la secuenciación.

Producción y purificación de IgG y Fab:

Los clones de levadura se cultivaron hasta la saturación y luego se indujeron durante 48 horas a 30 °C con agitación. Después de la inducción, las células de levadura se sedimentaron y los sobrenadantes se recogieron para la purificación. Las IgG se purificaron usando una columna de proteína A y se eluyeron con ácido acético, pH 2,0. Los fragmentos Fab se generaron mediante digestión con papaína y se purificaron sobre la matriz de afinidad CaptureSelect IgG-CH1 (Life Technologies, n.º de cat. 1943200250).

Producción de una IgG1 humana aCD25-a-674 a-fucosilada expresada en células de mamífero:

Se realizó la síntesis de secuencias codificantes de VH y VL optimizadas en codón para el anticuerpo y se clonaron los ADNc de las regiones variables en el vector de expresión del anticuerpo (Evitria, Suiza) usando técnicas de clonación convencionales (no basadas en PCR). El ADNc de la enzima GDP-6-desoxi-d-lixo-4-hexulosa reductasa (RMD) de la oxidorreductasa se clonó en un vector de expresión (Evitria, Suiza). El ADN plasmídico se preparó en condiciones de baja endotoxina basadas en la cromatografía de intercambio aniónico. Evitria usa células CHO K1 adaptadas a la suspensión (recibidas originalmente de ATCC y adaptadas al crecimiento sin suero en cultivo en suspensión en Evitria) para la producción. La semilla se cultivó en medio eviGrow, un medio libre de suero y componente animal, definido químicamente. Las células se transfectaron con vectores de expresión para la IgG1 y la enzima RMD usando eviFect, el reactivo de transfección patentado y preparado a medida de Evitria. Las células se cultivaron después de la transfección en eviMake2, un medio sin suero y sin componente animal. El sobrenadante se recogió mediante centrifugación y posterior filtración (filtro de 0,2 µm). El anticuerpo se purificó usando MabSelect™ SuRe™. El patrón de glucosilación de los anticuerpos se caracterizó utilizando CL/EM y mostró > 99 % de a-fucosilación.

Mediciones de afinidad de anticuerpos anti-CD25:

La afinidad de los anticuerpos CD25 se determinó midiendo su Kd por ForteBio. Las mediciones de afinidad de ForteBio se realizaron generalmente como se describió anteriormente (Estep et al., 2013). Brevemente, las mediciones de afinidad de ForteBio se realizaron cargando IgG en línea en sensores AHQ. Los sensores se equilibraron fuera de línea en tampón de ensayo durante 30 min y luego se monitorizaron en línea durante 60 segundos para el establecimiento del nivel basal. Las mediciones de unión monovalente se obtuvieron cargando el dímero CD25 en los sensores de AHC, seguido de la exposición a anticuerpo Fab 100 nM en disolución. Para la medición de la unión de la aidez, los sensores de Ni-NTA se cargaron con antígeno 20,83 nM (marcado con HIS CD25 humano recombinante) durante 5 min, luego se transfirieron al tampón de ensayo durante 0,5 min para el lavado y nuevamente durante 1 min en el tampón de ensayo para la determinación del nivel basal. A continuación, el anticuerpo se asoció a diferentes concentraciones (ver Figura 5) durante 20 min. Posteriormente, se transfirieron a un tampón de ensayo durante 26,6 minutos para la medición de la tasa de disociación. Los datos de cinética se ajustaron usando un modelo de unión 1:1 en el software de análisis de datos proporcionado por ForteBio.

Unión del ligando:

La unión de los anticuerpos a los ligandos se realizó en un sistema Forte Bio Octet Red384 (Pall Forte Bio Corp., EE. UU.) usando un ensayo de preclasificación en sándwich estándar. El anticuerpo anti-CD25 humano (aCD25-a-674) se cargó en sensores AHQ y los sitios de unión a Fc no ocupados en el sensor se bloquearon con un anticuerpo IgG1 humano no relevante. Los sensores se expusieron a CD25 100 nM humano seguido de IL-2 humana 100 nM. Los datos se procesaron usando el software de análisis de datos de Forte Bio 7.0. La unión adicional por IL-2 humana después de la asociación de antígenos indica un epítipo desocupado (no competidor), mientras que ninguna unión indica el bloqueo del epítipo (competidor).

Agrupación de epítipos:

La agrupación de epítipos de los anticuerpos se realizó en un sistema Forte Bio Octet Red384 (Pall Forte Bio Corporation, Menlo Park, CA) usando un ensayo de agrupación en formato sándwich estándar. El anticuerpo IgG anti-CD25 humano se cargó en sensores AHQ y los sitios de unión a Fc desocupados en el sensor se bloquearon con un anticuerpo IgG1 humano no relevante. A continuación, los sensores se expusieron a un antígeno diana 100 nM seguido de daclizumab o basiliximab. Los datos se procesaron usando el software de análisis de datos de ForteBio 7.0. La unión adicional por el segundo anticuerpo después de la asociación del antígeno indica un epítipo desocupado (no competidor), mientras que ninguna unión indica el bloqueo del epítipo (competidor).

Unión de anticuerpos anti-CD25 a células que expresan CD25:

Los aciertos candidatos se evalúan mediante la unión a líneas celulares humanas de linfoma, SU-DHL-1 y SR-786, Karpas299, linfocitos Treg diferenciadas *in vitro* y la línea de linfocitos T de macaco cangrejero HSC-F. La unión a las líneas celulares humanas que expresaban CD25 (SU-DHL-1 y SR-786) se examinó bloqueando en primer lugar las células con Trustain (Biolegend) antes de la incubación con anticuerpos anti-CD25 titulados en una serie de dilución semilogarítmica de una concentración superior de 20 µg/ml, durante 30 minutos a 4 °C antes de ser lavadas e incubadas con anticuerpo Fc IgG anti-humano conjugado con PE (Biolegend). Las células se lavaron de nuevo y se resuspendieron en tampón FACS que contenía DAPI y se adquirieron en Intellicyt iQue. Las células vivas se seleccionaron usando los parámetros FSC frente a SSC por citometría de flujo durante la adquisición de la muestra. La intensidad media geométrica de las células teñidas se representó en un gráfico XY, representando la intensidad media geométrica contra el logaritmo de la concentración, y los datos se ajustaron a una curva de regresión no lineal a partir de la cual se calculó la CE50.

La unión a CD25 que expresan Treg diferenciados *in vitro* se examinó mediante la tinción de artículos de prueba (anticuerpos anti-CD25 primarios) con 30 µg/ml de anticuerpos seguido de una serie de dilución semilogarítmica (7 puntos) durante 30 minutos en hielo. A esto le siguió una tinción con una concentración de anticuerpo secundario (Alexa Fluor 647-AffiniPure Fab Fragment Goat Anti-Human IgG (H + L) - (Jackson ImmunoResearch)) de 1 µg/ml durante 30 minutos en hielo. Todas las muestras se tiñeron por duplicado. Las células vivas se seleccionaron usando los parámetros FSC frente a SSC por citometría de flujo durante la adquisición de la muestra. La intensidad de fluorescencia media (IFM) de las células teñidas se representó en un gráfico XY, representando gráficamente la IFM frente al logaritmo de la concentración, y los datos se ajustaron a una curva de regresión no lineal a partir de la cual se calculó la CE50.

Se examinó la unión a CMSP activadas de macaco cangrejero y humanas que expresaban CD25 mediante la tinción de artículos de prueba (anticuerpos anti-CD25 primarios) con 20 µg/ml de anticuerpos seguido de series de dilución semilogarítmica (7 puntos) durante 30 minutos en hielo. A esto le siguió una tinción con una concentración de anticuerpo secundario (Fcγ F(ab')₂ de conejo anti-humano (Jackson ImmunoResearch)) de 5 µg/ml durante 30 minutos en hielo. Todas las muestras se tiñeron por triplicado. Para minimizar la muerte celular inducida por reticulación mediante la unión del anticuerpo secundario, se examinaron las líneas celulares en cohortes de tinción de 4 artículos de prueba a la vez. Los linfocitos vivos se seleccionaron usando los parámetros FSC frente a SSC mediante citometría de flujo durante la adquisición de la muestra. La intensidad de fluorescencia media (IFM) de los subconjuntos de linfocitos T CD4+ y CD8+ seleccionados se representaron en un gráfico XY, representando gráficamente IFM frente al logaritmo de la concentración, y los datos se ajustaron a una curva de regresión no lineal a partir de la cual se calculó la EC50.

Se examinó la unión a células Karpas299 que expresan CD25 mediante tinción de artículos de prueba (anticuerpos anti-CD25 primarios) con 20 µg/ml de anticuerpos seguido de series de dilución semilogarítmica (7 puntos) durante 30 minutos en hielo. A esto le siguió una tinción con una concentración de anticuerpo secundario (Alexa Fluor 647-AffiniPure F(ab')₂ Fragment Rabbit Anti-Human IgG Fcγ fragment - (Jackson ImmunoResearch)) de 1 µg/ml durante 30 minutos en hielo. Todas las muestras se tiñeron por duplicado. Las células vivas se seleccionaron usando los parámetros FSC frente a SSC por citometría de flujo durante la adquisición de la muestra. La intensidad de fluorescencia media (IFM) de las células teñidas se representó en un gráfico XY, representando gráficamente la IFM contra el logaritmo de la concentración, y los datos se ajustaron a una curva de regresión no lineal a partir de la cual se calculó la CE50.

Reclonación, producción y caracterización de aCD25-a-674 como IgG1 humana expresada en células de mamífero: Genewiz realizó la síntesis de secuencias codificantes de VH y VL optimizadas en codón para el anticuerpo. Los ADNc de las regiones variables se clonaron en el vector de expresión del anticuerpo (Icosagen, EST) que contiene las regiones constantes de la cadena pesada y de la cadena ligera kappa de IgG1 humana (P01857 y P01834 respectivamente). Los

ADNC de cadena pesada y ligera de longitud completa se verificaron mediante secuenciación en vectores finales y luego se volvieron a clonar para expresarlos usando la tecnología QMCF (Icosagen), un sistema de expresión episómica estable que usa células basadas en CHO (CHOEBNALT85) y vectores apropiados para la producción de proteínas recombinantes, anticuerpos, las células CHOEBNALT85 se transfectaron con 1 µg de plásmidos de expresión para la producción de anticuerpos. 48 h después de la transfección, se añadieron 700 µg/ml de G418 para seleccionar el plásmido que contiene la población celular. Para la producción, la temperatura se cambió a 30 °C y los cultivos se alimentaron adicionalmente. Al final de la producción, los sobrenadantes de cultivo se clarificaron por centrifugación (1000 g, 30 min y 15 °C), se añadió PMSF, y los sobrenadantes se procesaron o se congelaron hasta su purificación. Los anticuerpos hIgG1 se purificaron mediante cromatografía de afinidad MabSelect SuRe seguida de filtración en gel Superdex 200 en PBS o PBS L-Arg 100 mM. Los anticuerpos IgG1 humanos producidos en células CHOEBNALT85 se caracterizaron por su afinidad hacia CD25 humano recombinante, reactividad cruzada hacia murino, y CD25 de cangrejero, y la agrupación de epítomos frente a los anticuerpos de unión a CD25 seleccionados.

Mapeo de epítomos aCD25-a-674:

Se sintetizaron diferentes conjuntos de péptidos lineales, de bucle único, miméticos de giro β, miméticos de puente disulfuro, puentes disulfuro discontinuos, miméticos de epítomos discontinuos que representan la secuencia de CD25 humana (Uniprot, registro n.º P01589) usando la síntesis de Fmoc en fase sólida (Pepscan BV, Países Bajos; Timmermann P et al., 2007; Langedijk JP et al., 2011). La unión del anticuerpo a-674 a cada uno de los péptidos sintetizados se probó en un ELISA (Pepscan, Países Bajos). Las matrices de péptidos se incubaron con disolución de anticuerpo primario (durante la noche a 4 °C). Después del lavado, las matrices de péptidos se incubaron con una dilución 1/1000 de un conjugado de anticuerpo peroxidasa adecuado (2010-05; Southern Biotech) durante una hora a 25 °C. Después del lavado, se añadieron el sustrato de peroxidasa sulfonato de 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina (ABTS) y 20 µl/ml de H₂O₂ al 3 por ciento. Después de una hora, se midió el desarrollo de color. El desarrollo de color se cuantificó con una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD) y un sistema de procesamiento de imágenes. Los valores obtenidos de la cámara CCD oscilan desde 0 hasta 3000 mUA, similares a un lector de ELISA estándar de 96 pocillos. Para verificar la calidad de los péptidos sintetizados, se sintetizó un conjunto separado de péptidos de control positivo y negativo en paralelo y se seleccionaron con anticuerpos de control irrelevantes.

Ensayos de competición de Ab CD25 anti-humano:

Las competiciones de anticuerpos se realizaron en un sistema Forte Bio Octet Red96 (Pall Forte Bio Corp., EE. UU.) usando un ensayo de unión secuencial estándar. Se carga CD25his humano recombinante 26,8 nM marcado en biosensores Ni-NTA durante 200 s. Después de la etapa de nivel basal en tampón cinético, los sensores se expusieron a 66,6 nM del primer anticuerpo durante 600 s, seguido de un segundo anticuerpo anti-CD25 (también a 66,6 nM durante 600 s). Los datos se procesaron utilizando el software de análisis de datos de Forte Bio 9.0. La unión adicional por un segundo anticuerpo indica un epítomo desocupado (sin competencia por el epítomo), mientras que ninguna unión indica bloqueo por epítomo (competencia por el epítomo).

Resultados

Los anticuerpos monoclonales (mAb) que se unen a la secuencia de proteína extracelular de CD25 humana recombinante (rhCD25) se aislaron usando una biblioteca de presentación de anticuerpos basada en levadura como se describe en Materiales y métodos. Estos anticuerpos se secuenciaron y se produjeron clones únicos en células de levadura (Barnard GC et al., 2010). Los sobrenadantes de cultivo celular para cada clon de levadura que expresan una secuencia de anticuerpo única se seleccionaron para la unión de rhCD25.

Basándose la unión a rhCD25, la unicidad de la secuencia y los niveles de expresión, se identificó un panel de mAb. Estos anticuerpos se caracterizaron además por la unión a secuencias de proteína del dominio extracelular de CD25 de ratón y macaco cangrejero. Los clones se caracterizaron mostrando valores de unión de IgG a rhCD25 monovalentes y/o secuencias de proteínas extracelulares de CD25 de cangrejero recombinantes que están comprendidas entre 10⁻⁸ M y 10⁻¹⁰ M. Además, cada anticuerpo se caracterizó por competir o no con el ligando de IL-2 o anticuerpo anti-CD25 de referencia daclizumab. Los clones de anticuerpos también se evaluaron al nivel de unión a células humanas que expresan diferentes niveles de CD25, tales como la línea celular de linfoma, SU-DHL-1 y linfocitos Treg diferenciados *in vitro*, mediante citometría de flujo.

Los resultados de la unión a rhCD25, la agrupación cruzada y los análisis de unión competitiva de IL-2 se muestran en la Tabla 1 (Figura 3-7).

Tabla 1:

Anticuerpo	Unión a células que expresan CD25 humano y de cangrejero	Grupo de agrupación cruzada de epítomos	Competidor de la unión de IL-2 a CD25	Avidez de CD25-His (M) humano por Kd de IgG de ForteBio
aCD25-a-674	Sí	3	No	2,12E-09
Daclizumab	Sí	1	Sí	6,00E-10

La unión de los anticuerpos anti-CD25 se muestra en las Figuras 3-7.

Finalmente, para eliminar las secuencias de anticuerpos que serían propensas a la agregación y a interacción no específica, los anticuerpos se seleccionaron en un ensayo de reactivo poliespecífico (PSR) y espectroscopia de nanopartículas de autointeracción por captura por afinidad (AC-SINS), un enfoque que permite la selección de alto rendimiento para el desarrollo de anticuerpos en etapa temprana (Liu Y et al., 2014). Ninguno de los anticuerpos seleccionados obtuvo una puntuación positiva en los ensayos posteriores y, por lo tanto, no se eliminaron del panel.

Entre los aciertos seleccionados que se secuenciaron y caracterizaron como se describió anteriormente, el clon aCD25-a-674 es un anticuerpo que presenta novedosas regiones determinantes de complementariedad (CDR; Fig. 1) que compiten por la unión de CD25 humano ni con daclizumab ni con basiliximab. El estudio de mapeo de epítomos que se ha llevado a cabo usando la tecnología Pepscan indicaría que aCD25-a-674 se une a CD25 humano en la región de los aminoácidos 150-158 y 176-186 (Fig. 2) y se une a secuencias de proteínas extracelulares de CD25 humano con un valor Kd en el intervalo de 10^{-8} M a 10^{-10} M.

Medición cinética de CD25 - fuerza de unión mediante afinidad y/o avidez

Se realizaron las siguientes investigaciones adicionales relacionadas con la afinidad y la avidez. La unión de anticuerpos CD25 al antígeno CD25 humano se investigó mediante resonancia de plasmón superficial usando un instrumento BIACORE T200 (GE Healthcare). Se acoplaron aproximadamente 8000 unidades de resonancia (UR) del sistema de captura (20 µg/ml de Fab anti-humano; código de pedido del Human Fab Capture Kit: 28-9583-25; GE Healthcare) en un chip CM5 (GE Healthcare BR-1005-30) a pH 5,0 utilizando un kit de acoplamiento de amina suministrado por GE Healthcare (BR-1000-50).

El tampón de migración y de dilución fue PBS-P a pH 7,4 (tampón fosfato 20 mM, KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, tensioactivo P20 al 0,05 %; GE Healthcare, código de pedido 28-9950-84). La celda de flujo se ajustó a 25 °C y el compartimiento de la muestra a 12 °C. El anticuerpo CD25 se capturó inyectando una disolución de 3 µg/ml durante 60 segundos a un caudal de 10 µl/min. La asociación del antígeno CD25 se midió mediante la inyección de disoluciones de CD25 humano durante 180 s a un caudal de 30 µl/min, comenzando con una concentración de 1000 nM hasta 1 nM en etapas de dilución 1:10. La fase de disociación se activó cambiando de la inyección de la disolución de muestra al tampón de migración y se monitorizó durante hasta 600 segundos. La superficie se regeneró lavando con dos inyecciones consecutivas de 1 minuto de glicina 10 mM, pH 2,1 (proporcionadas por el kit) a un caudal de 10 µl/min. Las diferencias del índice de refracción global se corrigieron restando la respuesta obtenida de una superficie de referencia de Fab anti-humano; las inyecciones en blanco también se restan (= doble referencia).

Se evaluaron las propiedades de unión de los anticuerpos CD25 mediante el uso de diversas variantes de antígeno CD25, es decir, antígeno monomérico producido en la empresa (P1AA5872) y dos antígenos CD25 disponibles comercialmente (n.º de cat. de Sino Biologicals 10165-H08H; n.º de cat. de R&D Systems 223-2A/CF).

Para el cálculo de KD y los parámetros cinéticos, Biacore proporcionó los modelos de ajuste que se usaron para obtener resultados de ajuste de curva óptimos. El ajuste de Langmuir 1:1 se usó para P1AA5872 y el ajuste cinético de dos estados para CD25 de Sino Biologicals y R&D Systems.

Tabla 2:

Forma de CD25	Fuerza de unión	Modelo de ajuste
Sino Biological (~20 % dímero)	40 nM	Reacción en dos estados
(continuación)		
Forma de CD25	Fuerza de unión	Modelo de ajuste
R&D Systems (~10 % dímero)	48 nM	Reacción en dos estados
Interna (0 % dímero)	517 nM	1:1 Langmuir

Por lo tanto, las secuencias de aCD25-a-674 (Fig. 1) identifican anticuerpos que se unen específicamente a CD25, y cuyas actividades asociadas a las características funcionales que definen los agentes de anticuerpo anti-CD25, como se usa ese término en el presente documento, pueden evaluarse funcionalmente por ensayos basados en células o modelos animales.

Ejemplo 2: Modelos basados en células para validar agentes de anticuerpo moduladores de CD25**Materiales y métodos****5 Señalización de IL-2 in vitro mediante el ensayo de fosforilación STAT5:**

El bloqueo de IL-2 se caracterizó usando un ensayo de fosforilación STAT5, en el que se examinó la señalización de IL-2. Se cultivaron CMSP previamente congeladas (Stemcell Technologies) en placas de 96 pocillos con fondo de U en presencia de 10 µg/ml de anticuerpos anti-CD25 durante 30 minutos antes de añadir IL-2 (Peprotech) a concentraciones variables de 0,25 U/ml, 0,74 U/ml, 2,22 U/ml, 6,66 U/ml o 20 U/ml durante 10 minutos en RPMI 1640 (Life Technologies) que contiene 10 % de FBS (Sigma), L-glutamina 2 mM (Life Technologies) y 10.000 U/ml de Pen-Strep (Sigma). La fosforilación de STAT5 inducida por IL-2 se detuvo cuando las células se fijaron y se permeabilizaron con el conjunto de tampones de tinción de eBioscience™ Foxp3/factor de transcripción (Invitrogen) y se trataron con BD Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences). Las células se tiñeron a continuación simultáneamente con anticuerpos marcados con fluorocromo de superficie e intracelular (STAT5-Alexa Fluor 647 clon 47/stat5/pY694 BD Bioscience, CD3-PerCP-Cy5.5 clon UCHT1 Biolegend, CD4-BV510 clon SK3 BD Bioscience, CD8-Alexa Fluor 700 clon RPA-T8 Invitrogen, CD45RA-PE-Cy7 clon HI100 Invitrogen, FoxP3-Alexa Fluor 488 clon 236A/E7 Invitrogen) y se adquirieron muestras en el citómetro de flujo Fortessa LSR X20 (BD Bioscience) y se analizaron utilizando el software BD FACSDIVA. Los dobletes se excluyeron usando FCS-H frente a FCS-A, y los linfocitos se definieron usando los parámetros SSC-A frente a FCS-A. Los linfocitos T CD3⁺ se definieron usando un gráfico de CD3 PerCP-Cy5.5-A frente a FCS-A y se dibujó una ventana en un histograma que muestra el recuento frente a STAT5 Alexa Fluor 647-A para determinar la población de linfocitos T STAT5⁺CD3⁺. El porcentaje de bloqueo de la señalización de IL-2 se calculó de la siguiente manera: % de bloqueo = $100 \times [(\% \text{ de células Stat5}^+ \text{ Grupo sin Ab} - \% \text{ de células Stat5}^+ \text{ 10 ug/ml Grupo Ab}) / (\% \text{ de células Stat5}^+ \text{ Grupo sin Ab})]$. El análisis adicional de la fosforilación de STAT5 por diferentes subconjuntos de linfocitos T (CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺FoxP3⁺, linfocitos T intactos y de memoria) también se evaluó mediante la selección de los subconjuntos respectivos y se analizó como anteriormente. Los gráficos y el análisis estadístico se realizaron usando GraphPad Prism v7 (resultados no mostrados).

30 Ensayo de activación de linfocitos T in vitro:

El impacto de la señalización de IL-2 en las respuestas de Tef se caracterizó en un ensayo de activación de linfocitos T, en el que se examinó la regulación por incremento y proliferación de la granzima B (GrB) intracelular. Los linfocitos Pan T humanos primarios previamente congelados (Stemcell Technologies) se marcaron con colorante de proliferación celular eFluor450 (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante, y se añadieron a placas de 96 pocillos con fondo en U a 1×10^5 células/pocillo en RPMI 1640 (Life Technologies) que contenían FBS al 10 % (Sigma), L-glutamina 2 mM (Life Technologies) y 10.000 U/ml de Pen-Strep (Sigma). A continuación, las células se trataron con 10 µg/ml de anticuerpos anti-CD25 o anticuerpos de control seguidos de Human T-Activator CD3/CD28 (relación 20:1 de célula a perlas; Gibco) y se incubaron durante 72 horas en una estufa de incubación humidificada a 37 °C, 5 % de CO₂. Para evaluar la activación de linfocitos T, las células se tiñeron con eBioscience Fixable Viability Dye efluor780 (Invitrogen), seguido de anticuerpos marcados con fluorocromo para marcadores de linfocitos T de superficie (CD3-PerCP-Cy5.5 clon UCHT1 Biolegend, CD4-BV510 clon SK3 BD Bioscience, CD8-Alexa Fluor 700 clon RPA-T8 Invitrogen, CD45RA-PE-Cy7 clon HI100 Invitrogen, CD25-BUV737 clon 2A3 BD Bioscience), y luego se fijaron y se permeabilizaron con el conjunto de tampones de tinción de eBioscience™ Foxp3/factor de transcripción (Invitrogen) antes de la tinción para GrB intracelular y FoxP3 intranuclear (Granzyme B-PE clon GB11 BD Bioscience, FoxP3-APC clon 236A/E7). Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo Fortessa LSR X20 (BD Bioscience) y se analizaron usando el software BD FACSDIVA. Los dobletes se excluyeron usando FCS-H frente a FCS-A, y los linfocitos se definieron usando los parámetros SSC-A frente a FCS-A. Los subconjuntos de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ seleccionados de los linfocitos CD3⁺ vivos se evaluaron usando una gráfica de GrB-PE-A frente a eFluor450 A de proliferación. Los resultados se presentaron como el porcentaje de células GrB positivas proliferantes de las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ completas.

50 Ensayo de ADCC in vitro:

Se realizaron ensayos de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ensayos ADCC) para la caracterización de anticuerpos anti-CD25 humanos usando líneas celulares humanas SU-DHL-1 o SR-786 (CD25 positivo) como células diana con linfocitos NK humanos como fuente de células efectoras. Los linfocitos NK se aislaron de CMSP de donantes sanos usando el kit de aislamiento negativo de linfocitos NK (Stemcell Technologies). Los linfocitos NK se cultivaron durante la noche en presencia de 2 ng/ml de IL-2 (Peprotech). Se cargaron células diana SU-DHL-1 o SR-786 con calceína-AM (ThermoFisher) y se sembraron, 4 repeticiones por condición, en presencia de anticuerpos anti-CD25 o de isotipo durante 30 minutos a 37 °C, 5 % de CO₂. Después de la incubación, se añadieron los linfocitos NK a los pocillos en una proporción de diana:efectoras (D:E) de 1:10 (10.000 células diana y 100.000 células efectoras) y se incubaron durante 4 horas a 37 °C, 5 % de CO₂. La lectura de la fluorescencia de calceína en el sobrenadante se realizó en un lector de placas BMG Fluostar. El porcentaje de lisis específica se calculó en relación con las células diana solas (lisis del 0 %) y las células diana tratadas con saponina al 0,1 % (lisis del 100 %). Los gráficos de los datos sin procesar se produjeron usando Graphpad Prism v7 para generar curvas de respuesta a la dosis. El porcentaje de lisis de células diana se representó en un gráfico XY, representando gráficamente la liberación porcentual de calceína AM normalizada

frente al logaritmo de la concentración, y los datos se ajustaron a una curva de regresión no lineal a partir de la cual se calculó CE50.

Ensayo de ADCP in vitro:

Se realizaron ensayos de fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCP) usando Treg diferenciados *in vitro* como células diana y macrófagos derivados de monocitos como células efectoras. Se aislaron CMSP de conos de leucocitos mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. Los monocitos (células CD14+) se aislaron usando microperlas CD14 (Miltenyi Biotec). Los monocitos se cultivaron durante 5 días en presencia de 50 ng/ml de M-CSF en RPMI 1640 (Life Technologies) que contenía FBS al 10 % (Sigma), L-glutamina 2 mM (Life Technologies) y 10.000 U/ml de Pen-Strep (Sigma), se añade medio fresco que contiene M-CSF después de 3 días. Los linfocitos T reguladores (Treg) se aislaron usando el kit de diferenciación de linfocitos Treg humanos (R&D Systems). Estas células se incubaron en una estufa de incubación humidificada con a 37 °C, 5 % de CO₂, durante 5 días y se marcaron con el colorante eFluor450 (Invitrogen), según las recomendaciones del fabricante. En el día 5, los macrófagos y los Treg marcados con el colorante eFluor450 se cocultivan durante 4 horas en una proporción de 10 a 1 efectoras a diana en presencia de anticuerpos anti-CD25 o controles, como se describe más adelante. Las células diana (Treg) se añadieron a 1×10⁴ células/pocillo, mientras que las células efectoras (macrófagos) se añadieron a 1×10⁵ células/pocillo, para una relación efectoras/diana de 10 a 1. Los anticuerpos anti-CD25 se añadieron a continuación a una concentración superior de 1 µg/ml seguido de una serie logarítmica (7 puntos) en duplicados. Las células y los anticuerpos se incubaron durante 4 horas a 37 °C, 5 % de CO₂. Para evaluar ADCP, las células se dispusieron en hielo, se tiñeron con el marcador de superficie celular CD14 (CD14-PerCP-Cy5.5 clon MfP9 BD Biosciences) y se fijaron con el tampón de fijación de eBioscience. Se realizó un análisis de citometría de flujo de dos colores usando el Fortessa LSR X20. Las células diana residuales se definieron como células que eran positivas para el colorante eFluor450/CD14⁻. Los macrófagos se definieron como CD14⁺. Se consideró que las células con marcado doble (positivas para el colorante eFluor450/CD14⁺) representaban la fagocitosis de las dianas por los macrófagos. La fagocitosis de las células diana se calculó con la siguiente ecuación: % de fagocitosis = 100 × [(porcentaje de doble positivo) / (porcentaje de doble positivo + porcentaje de dianas residuales)].

Estadística:

Se usó el software Prism (GraphPad) para realizar el ajuste de curvas para determinar los valores de CE50 y la actividad máxima.

Resultados

El anticuerpo aCD25-a-674, como otros anticuerpos CD25 que se han identificado y caracterizado en el Ejemplo 1, se evaluó adicionalmente con respecto a su capacidad para no interferir con la señalización de IL-2 y su capacidad para destruir las células diana que expresan CD25. El ensayo de unión de ligandos usando Octet mostró que aCD25-a-674 no afecta la unión de IL-2 a CD25 (Figura 6). Esto se confirmó en el ensayo STAT5 donde aCD25-a-674 no bloqueó la señalización de IL-2 independientemente de las concentraciones de IL-2 analizadas, mientras que la señalización de IL-2 fue bloqueada completamente por el anticuerpo de referencia daclizumab (Figura 8). Daclizumab, que se ha mostrado que bloquea la interacción de CD25 con IL-2 a través del llamado epítipo "Tac" (Queen C et al., 1989 y Bielekova B, 2013) se une a un epítipo diferente a aCD25-a-674 (Figura 7), que puede explicar por qué daclizumab bloquea la señalización de IL-2 y aCD25-a-674 no bloquea la señalización de IL-2 en el ensayo de fosforilación STAT5 (Figura 8). Finalmente, aCD25-a-674 destruye las células que expresan CD25, las células tumorales o los linfocitos T reguladores, a través de ADCC (Figura 9) y ADCP (Figura 11) cuando se compara con el anticuerpo de isotipo IgG1. El anticuerpo aCD25-a-674 a-fucosilado aumenta aún más la destrucción de células CD25 positivas en comparación con el anticuerpo CD25 no modificado a través de ADCC (Figura 10).

En conclusión, aCD25-a-674 se ha caracterizado y demuestra una destrucción potente de células CD25 positivas (Tregs o líneas celulares de cáncer) y no interfiere con la señalización de IL-2 y, por lo tanto, no inhibe las respuestas de efectoras T. aCD25-a-674 es, por lo tanto, un anticuerpo reductor de Treg que podría aplicarse para el tratamiento del cáncer, como monoterapia o en combinación.

Ejemplo 3: Producción de variantes de agentes de anticuerpo moduladores de CD25

aCD25-a-634 se puede someter a una maduración de afinidad adicional. La optimización se realiza mediante la introducción de diversidades en las regiones variables de cadena pesada. El CDRH3 del anticuerpo se recombina en una biblioteca prefabricada con variantes de CDRH1 y CDRH2 de una diversidad de 1×10⁸ y las selecciones se realizan con una ronda de MACS y cuatro rondas de FACS como se describe en el descubrimiento intacto. En las rondas de FACS, se examinan las bibliotecas para la unión de PSR, la reactividad cruzada de las especies, la reactividad cruzada del antígeno y la presión de afinidad, y se realiza la clasificación para obtener una población con las características deseadas. Para estas selecciones, se aplican las presiones de afinidad mediante la disminución progresiva del antígeno monomérico biotinilado o mediante la preincubación del antígeno biotinilado con Fab o IgG parental durante 30 minutos y luego aplicando esa mezcla previamente complejada a la biblioteca de levaduras durante un periodo de tiempo que permitiría que la selección alcanzara un equilibrio. Los anticuerpos de mayor afinidad son entonces capaces de ser clasificados.

A continuación se seleccionan variantes que muestran las mejores afinidades para la producción de mamíferos y se caracterizaron adicionalmente usando los ensayos descritos anteriormente en los Ejemplos 1 y 2.

Ejemplo 4: Experimento con un modelo de ratón

Materiales y métodos

Actividad terapéutica de un anticuerpo no bloqueador de IL-2: a ratones BALB/c hembra obtenidos de Charles River se les inyectó 3×10^5 células tumorales CT26 en Matrigel al 0 % por vía subcutánea en el flanco, $n = 15$ por grupo. Los animales se aleatorizaron a grupos de tratamiento basándose en el peso corporal del día 1. El tratamiento se inició en el día 6 y los ratones se trataron con una inyección de cada anticuerpo (isotipo IgG2a de ratón, anticuerpo neutralizante de IL-2, mlgG1 PC61, una CD25 anti-ratón que bloquea la señalización de IL-2 del isotipo IgG1 de ratón y mlgG2a 7D4, un CD25 anti-ratón que no bloquea la señalización de IL-2 del isotipo IgG2a de ratón) a 200 μ g/animal. Los animales recibieron tratamientos de monoterapia, con un grupo por anticuerpo, o tratamiento combinado de mlgG2a 7D4 y el anticuerpo neutralizante de IL-2 o mlgG2a 7D4 y mlgG1 PC61. Los ratones se sacrificaron cuando el volumen del tumor alcanzó 2000 mm³ o 50 días, lo que se alcanzó primero.

Resultados

El anticuerpo anti-CD25 no bloqueador de IL-2 reductor mlgG2a 7D4 indujo el rechazo del tumor en ratones tratados, mientras que los otros anticuerpos no mostraron ningún efecto como monoterapia en comparación con la IgG2a de ratón de control de isotipo. La combinación con anticuerpos bloqueadores de IL-2, ya sea mlgG1 PC61 o nAb IL2, anula la actividad terapéutica del anticuerpo no bloqueador de IL-2 mlgG2a 7D4 (Figura 12). Esto demuestra que la característica no bloqueadora de IL-2 de mlgG2a 7D4 es clave para la actividad terapéutica. También sugiere que la actividad terapéutica de este anticuerpo se basa en la respuesta inmunitaria antitumoral mediada por los linfocitos T efectores, que dependen de la señalización de IL-2 para una actividad óptima. Estos resultados muestran que la ausencia de actividad bloqueadora de IL-2/CD25 se requiere para una actividad terapéutica óptima del anticuerpo dirigido contra CD25 y apoya el uso de un anticuerpo anti-CD25 no bloqueador de IL-2 como se describe en el presente documento en la terapia del cáncer.

Secuencias

A continuación se proporciona un resumen de las secuencias incluidas en la solicitud:

SEQ ID NO	Descripción de secuencias de anticuerpos	También se denomina:
1	CD25 humano	Código Uniprot P01589
2	CDR1 de cadena pesada variable de aCD25-a-674	CD25-a-674-HCDR1
(continuación)		
SEQ ID NO	Descripción de secuencias de anticuerpos	También se denomina:
3	CDR2 de cadena pesada variable de aCD25-a-674	aCD25-a-674-HCDR2
4	CDR3 de cadena pesada variable de aCD25-a-674	aCD25-a-674-HCDR3
5	CDR 1, 2, 3 y FR 1, 2, 3, 4 de cadena pesada variable de aCD25-a-674	aCD25-a-674-HCDR123; secuencia de cadena pesada variable de aCD25-a-674
6	CDR1 de cadena ligera variable de aCD25-a-674	aCD25-a-674-LCDR1
7	CDR2 de cadena ligera variable de aCD25-a-674	aCD25-a-674-LCDR2
8	CDR3 de cadena ligera variable de aCD25-a-674	aCD25-a-674-LCDR3
9	CDR 1, 2, 3 y FR 1, 2, 3, 4 de cadena ligera variable de aCD25-a-674	aCD25-a-674-LCDR123; secuencia de cadena ligera variable de aCD25-a-674
10	Epítipo	aCD25ep-a
11	Epítipo	aCD25ep-b

EQUIVALENTES Y ALCANCE

Los expertos en la materia apreciarán que la presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas y no por los Ejemplos u otra descripción de ciertas realizaciones incluidas en el presente documento.

De manera similar, las formas en singular “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referentes al plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

A menos que se defina lo contrario anteriormente, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento también se puede usar en la práctica o el ensayo de la presente invención. En general, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, genética y proteínas y ácidos nucleicos descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica, o según las especificaciones del fabricante.

REFERENCIAS

Barnard GC et al., 2010. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 37:961-71.

Beck A et al., 2017. *Nat Rev Drug Discov.* 16:315-337.

Bielekova B., 2013. *Neurotherapeutics*, 10(1):55-67

Dantal J et al., 1991, *Transplantation* 52:110-5

Estep P et al., 2013 *MAbs.* 5(2):270-8.

Kearns JD et al., 2015. *Mol Cancer Ther.* 14:1625-36.

Kijanka M et al., 2015. *Nanomedicine.* 10:161-174.

Langedijk JP et al., 2011. *Analytical Biochemistry.* 417:149-155.

Liu L, 2015. *J Pharm Sci.* 104:1866-84.

Liu Y et al., 2014. *MAbs.* 6:483-92.

Lowenthal J.W et al., 1985. *J. Immunol.*, 135, 3988-3994

Moreau, J.-L et al., 1987. *Eur. J. Immunol.* 17,929-935;

Onishi H et al., 2012 *Anticanc. Res.* 32, 997-1003

Queen C et al., 1989. *PNAS.* 86(24):10029-10033

Redman JM et al., 2015. *Mol Immunol.* 67: 28-45.

Setiady Yet al., 2010. *Eur J Immunol.* 40:780-6),

Shang B et al., 2015, *Sci Rep.* 5:15179

Siegel RW et al., 2004. *J Immunol Methods.* 286:141-53.

Sliwkowski M & Mellman I, 2013. *Science.* 341:1192-8.

Timmermann P et al., 2007, *J. Mol. Recognit.*, 20, 283-99.

Volk HD et al., 1989 *Clin. exp. Immunol.* 76, 121-5

Vazquez-Lombardi R et al., 2015. *Drug Discov Today.* 20:1271-83.

Xu Y et al., 2013. *Protein Eng Des Sel.* 26:663-70

Smyth M et al., 2014, *Immunol Cell Biol.* 92, 473-4

Elpek et al., 2007 *J Immunol.* 178(11):6840-8.;

Golgher et al., 2002 *Eur J Immunol.* 32(11):3267-75;

Jones et al., 2002; *Cancer Immun.* 22;2:1

Onizuka et al., 1999 Cancer Res. 59(13):3128-33.;

Shimizu et al., 1999 J Immunol. 163(10):5211-8

5 Hodi et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 3005-3010

Quezada et al., 2006, J Clin Invest. 116(7):1935-45

10 Vargas A et al., 2017, Immunity, 46(4):577-586)

Kohm A et al., 2006, J Immunol. 176: 3301-5;

Hallett Wet al., 2008. Biol Blood Marrow Transplant 14:1088-1099;

15 Fecci P et al., 2006 Clin Cancer Res. 12:4294-4305;

McNeill A et al., 2007. Scand J Immunol 65: 63-9;

20 Couper K et al., 2007. J Immunol. 178: 4136-4146;

O'Mahony D et al., 2008, Blood, 112(11), 231;

Oh et al., 2017, Oncotarget 8(29) 47440-4753;

25 Kreitman RJ et al., 2016, Clin Cancer Res, 22(2) 310-318;

Flynn MJ et al 2016, Mol Cancer Ther 15(11) 2709-2721;

30 Ellington et al. Nature. 1990; 346(6287): 818-822;

Tuerk et al., Science. 1990; 249(4968):505-510;

Ni et al., Curr Med Che 2011; 18(27):4206-14.

35 Jarasch A et al., Pharm Sci. 2015 Jun;104(6):1885-1898;

Rajpal et al., Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(24):8466-71;

40 Steinwand et al., MAbs, 2014, 6(1):204-18

Sampson JH et al., 2012, PLoS ONE, 7(2); e31046

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-CD25 o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende:
 - a) la secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-HCDR3 (SEQ ID NO: 4) como región 3 determinante de complementariedad de cadena pesada variable;
 - b) la secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-HCDR1 (SEQ ID NO: 2) como región 1 determinante de complementariedad de cadena pesada variable;
 - c) la secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-HCDR2 (SEQ ID NO: 3) como región 2 determinante de complementariedad de cadena pesada variable;
 - d) la secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-LCDR1 (SEQ ID NO: 6) como región 1 determinante de complementariedad de cadena ligera variable;
 - e) la secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-LCDR2 (SEQ ID NO: 7) como región 2 determinante de complementariedad de cadena ligera variable; y
 - f) la secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-LCDR3 (SEQ ID NO: 8) como región 3 determinante de complementariedad de cadena ligera variable.
2. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-HCDR123 (SEQ ID NO: 5) y/o una cadena ligera variable que comprende una secuencia de aminoácidos de aCD25-a-674-LCDR123 (SEQ ID NO: 9).
3. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de cualquier reivindicación precedente, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo:
 - es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de dominio, un anticuerpo de cadena simple, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento variable de cadena simple (scFv), un fragmento scFv-Fc, un anticuerpo de cadena simple (scAb),
 - es un anticuerpo de unión al antígeno de conejo, ratón, quimérico, humanizado o completamente humano;
 - se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos de isotipo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4;
 - está comprendido en un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico o un inmunoconjugado que comprende además un agente terapéutico o de diagnóstico; y/o
 - está afucosilado.
4. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de cualquier reivindicación precedente, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo:
 - no inhibe la unión de interleucina 2 (IL-2) a CD25; y/o
 - no inhibe la señalización de interleucina 2 (IL-2) a través de CD25.
5. Una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Un vector de ácido nucleico que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5.
7. Una célula hospedadora que comprende el vector de ácido nucleico de la reivindicación 6.
8. Un método de producción de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende cultivar una célula hospedadora de la reivindicación 7.
9. Una composición que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9 o el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha composición es para su uso en el tratamiento del cáncer.
11. La composición o anticuerpo para su uso según la reivindicación 10, en donde el anticuerpo es para administración simultánea o secuencial en cualquier orden, con un segundo agente, a un sujeto.
12. La composición o anticuerpo para su uso según la reivindicación 10 u 11, en donde el segundo agente es:
 - un inhibidor del punto de control inmunitario, preferiblemente un antagonista de PD-1, más preferiblemente un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1; o
 - una vacuna contra el cáncer.
13. La composición o anticuerpo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde el sujeto tiene un tumor sólido o un tumor canceroso hematológico.

14. Un método de preparación de un anticuerpo anti-CD25 que comprende proporcionar un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y someter el anticuerpo a maduración por afinidad, en donde el anticuerpo anti-CD25 producido tiene una mayor afinidad por CD25 que el anticuerpo parental.
- 5 15. Un método de preparación de una composición farmacéutica que comprende proporcionar un anticuerpo preparado según un método de la reivindicación 14 y formular conjuntamente el anticuerpo con al menos uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

aCD25-a-674-HCDR1 **aCD25-a-674-HCDR2** **aCD25-a-674-HCDR3**
 YTFTSYMH IINPSGGSTSYAQKFQG ARGGAEYIPAEIFQH

aCD25-a-674-HCDR123:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVWRQAPGQGLEWMGIINPS
GGSTSYAQKFQGRTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDAVYYCARGGAEYIPAEIF
QHWGQGTLTVSS

aCD25-a-674-LCDR1 **aCD25-a-674-LCDR2** **aCD25-a-674-LCDR3**
 RASQSVSSYLA DASNRAT QQRPFLLPT

aCD25-a-674-LCDR123

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRPFLLPTFGGGTKVEIK

FIGURA 1

10	20	30	40	50
<u>MDSYLLMWGL LTFIMVPGCQ AELCDDDPPE IPHATFKAMA YKEGTM LNCE</u>				
60	70	80	90	100
<u>CKRGFPRIKS GSLYMLCTGN SSHSSWDNQC QCTSSATRNT TKQVTFQPEE</u>				
110	120	130	140	150
<u>QKERKTTEMQ SPMQPVDAQS LPGHCREPPP WENEATERIY HFVVGQMVY</u>				
160	170	180	190	200
aCD25ep-b aCD25ep-a				
<u>QCVQGYRALH RGP AESVCKM THGKTRWTQP QLICTGEMET SQFPGE EKFPQ</u>				
210	220	230	240	250
<u>ASPEGRFESE TSCLVTTTDF QIQTEMAATM ETSIFTTEYQ VAVAGCVLL</u>				
260	270			
ISVLLLSGLT WQRRQRKSRR TI				

FIGURA 2

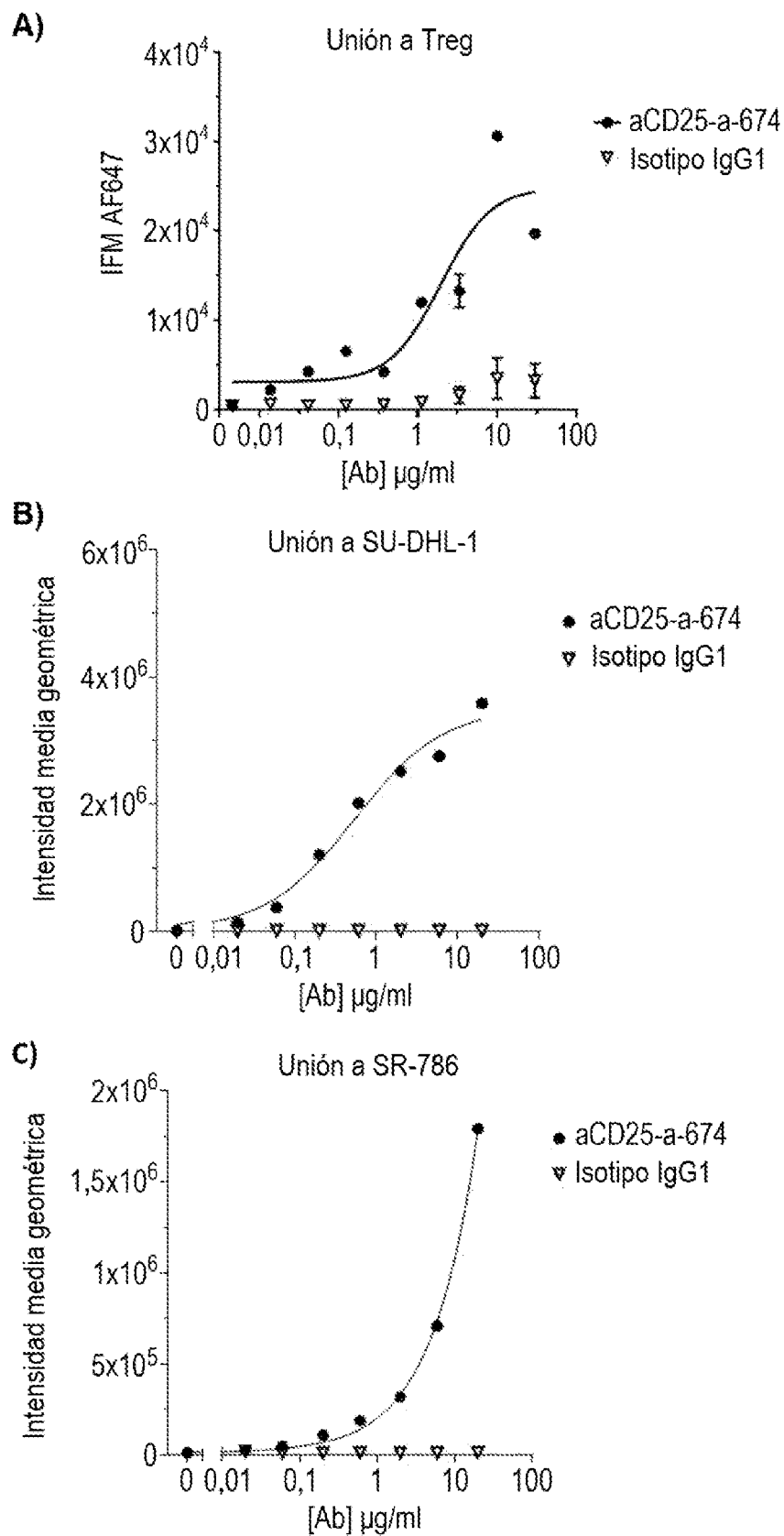


FIGURA 3

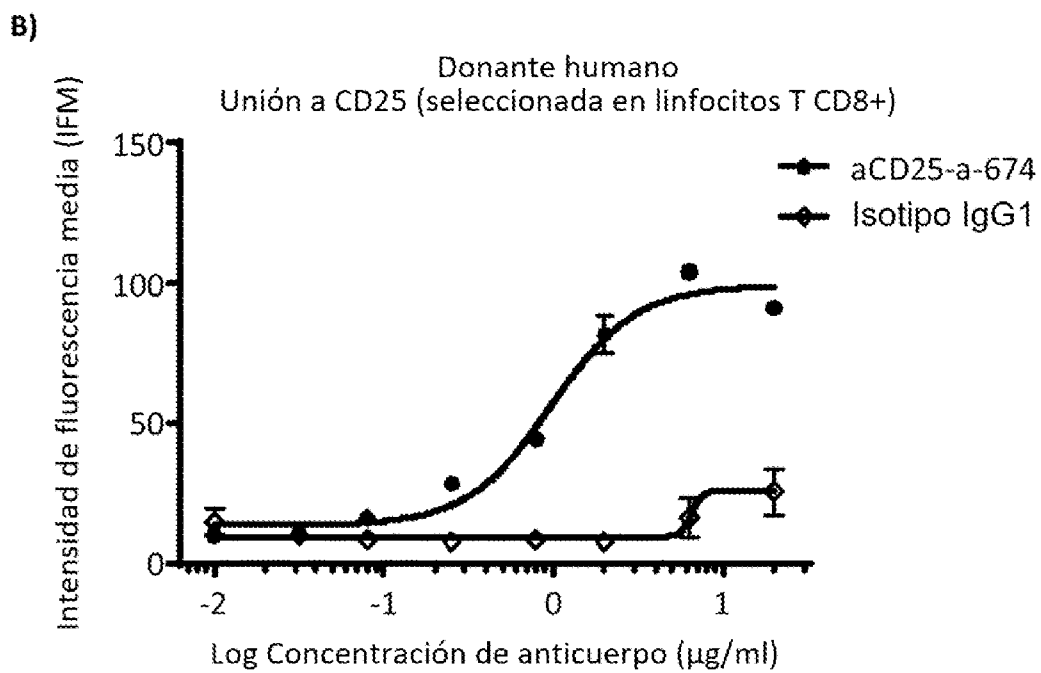
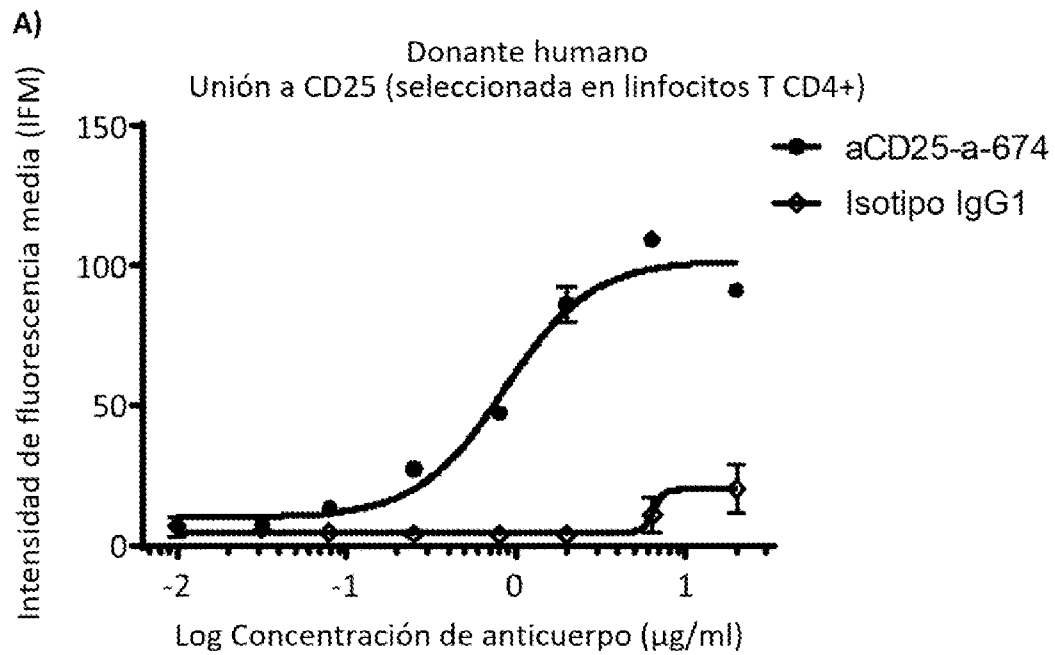


FIGURA 4

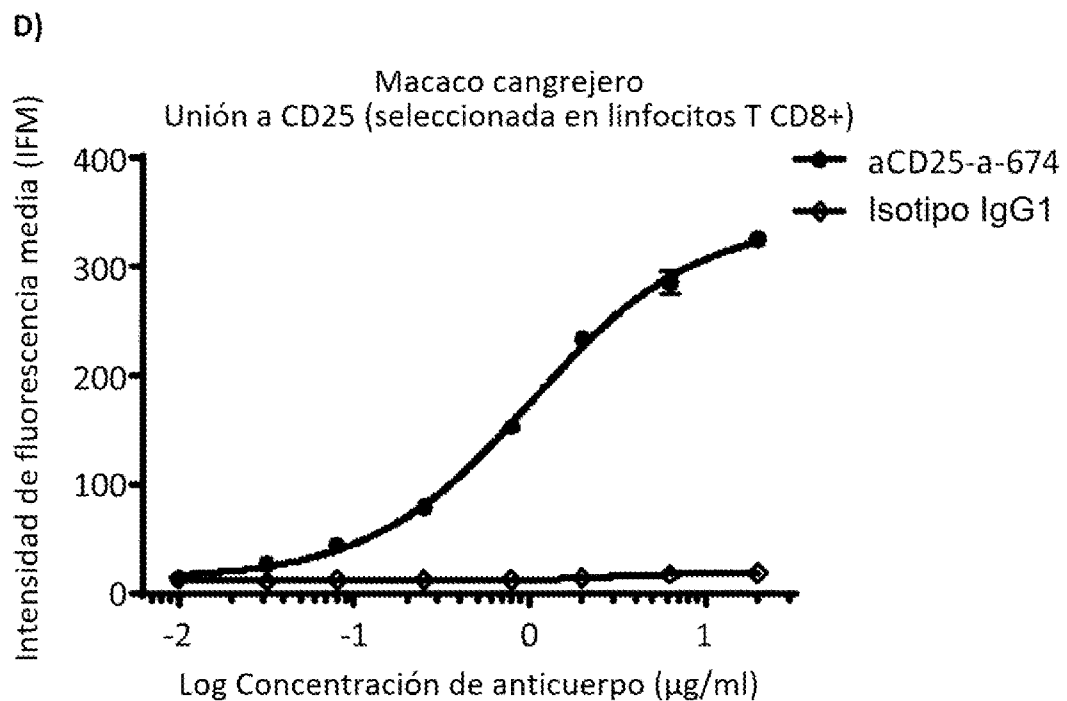
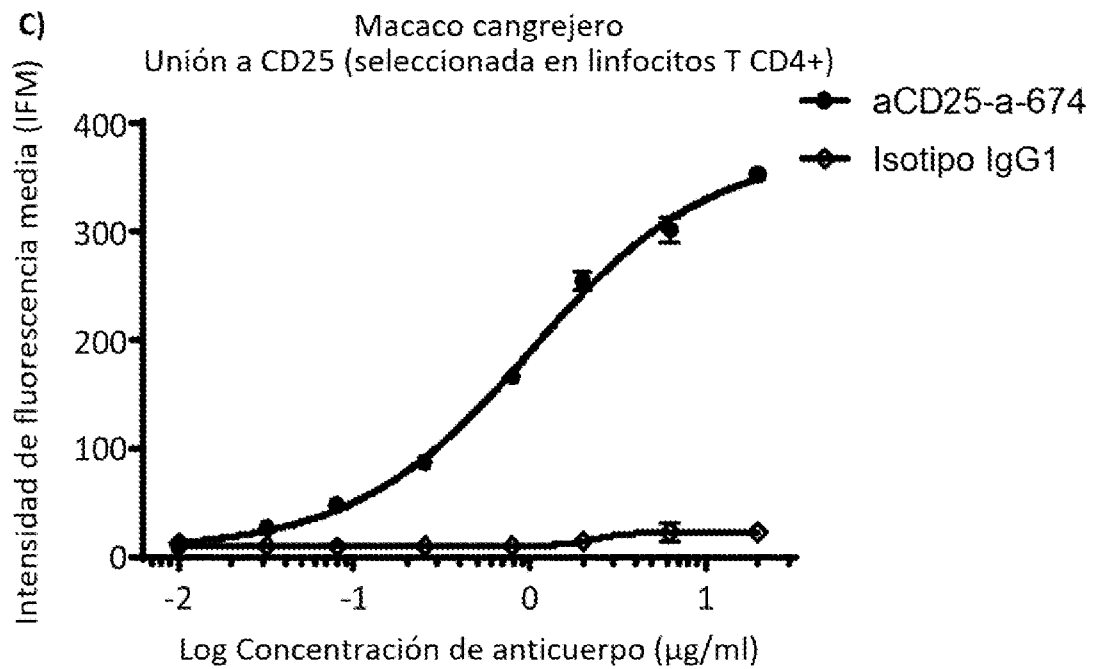


Figura 4 Cont.

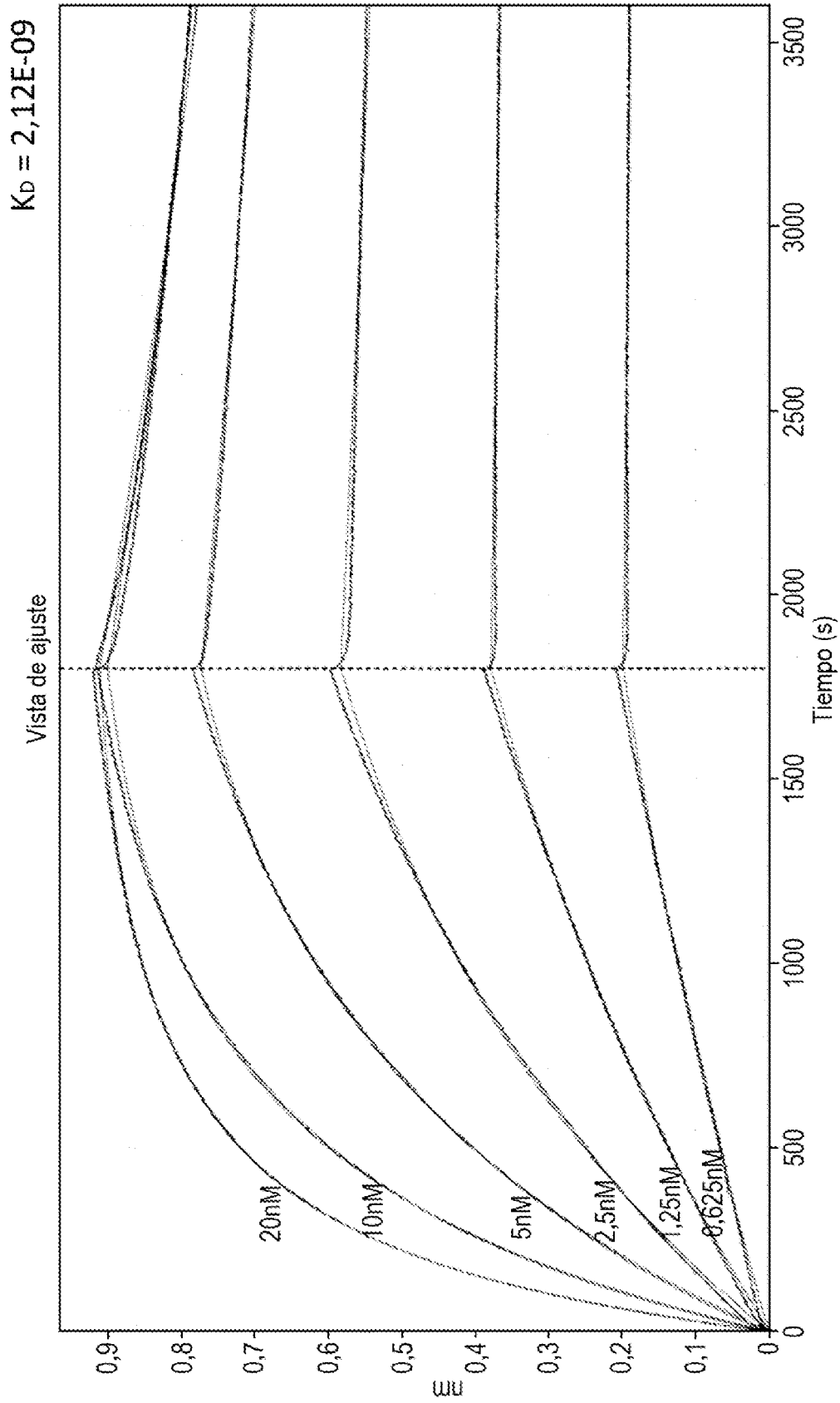


Figura 5

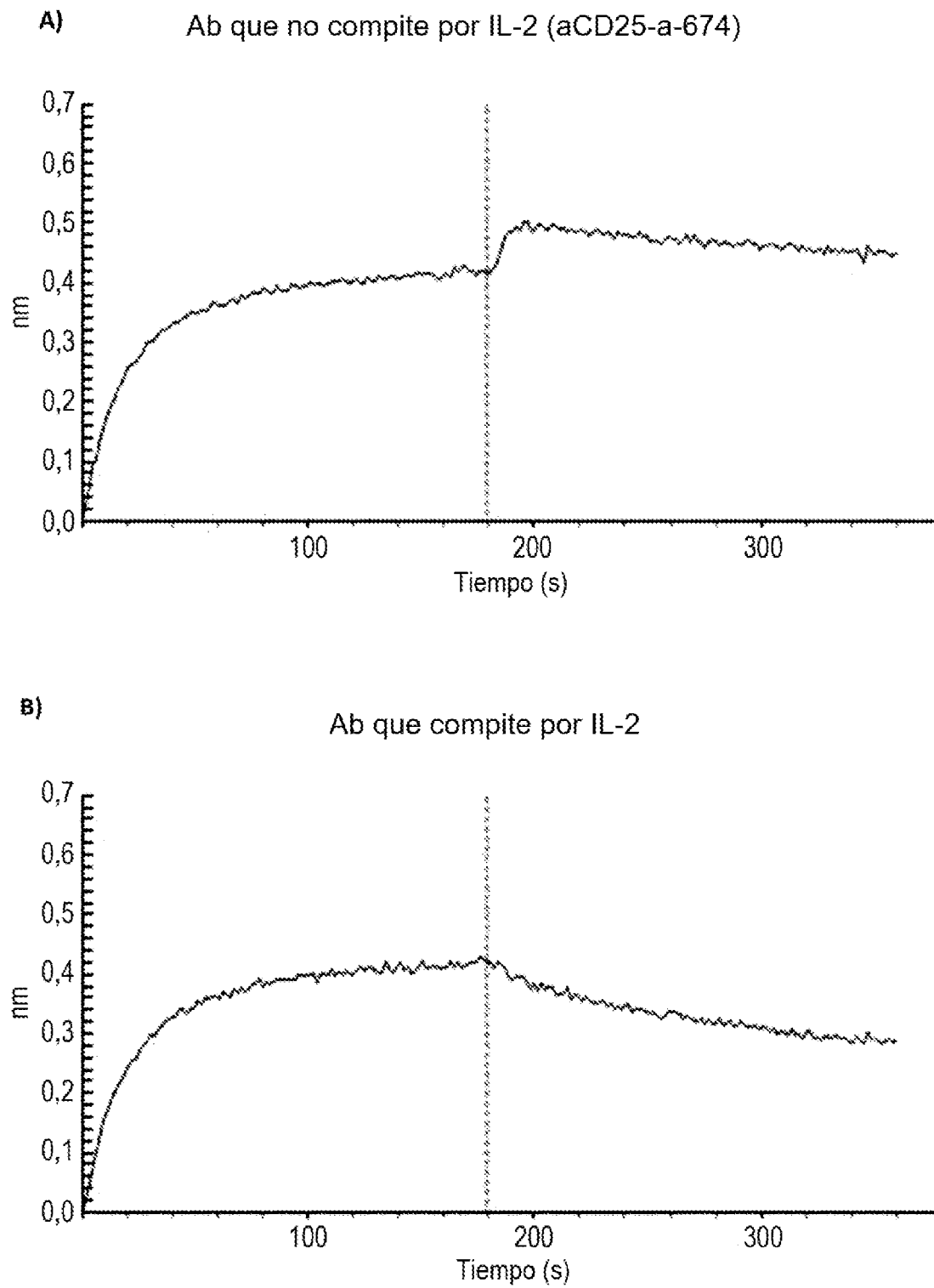


FIGURA 6

Unión competitiva a daclizumab determinada por Octet

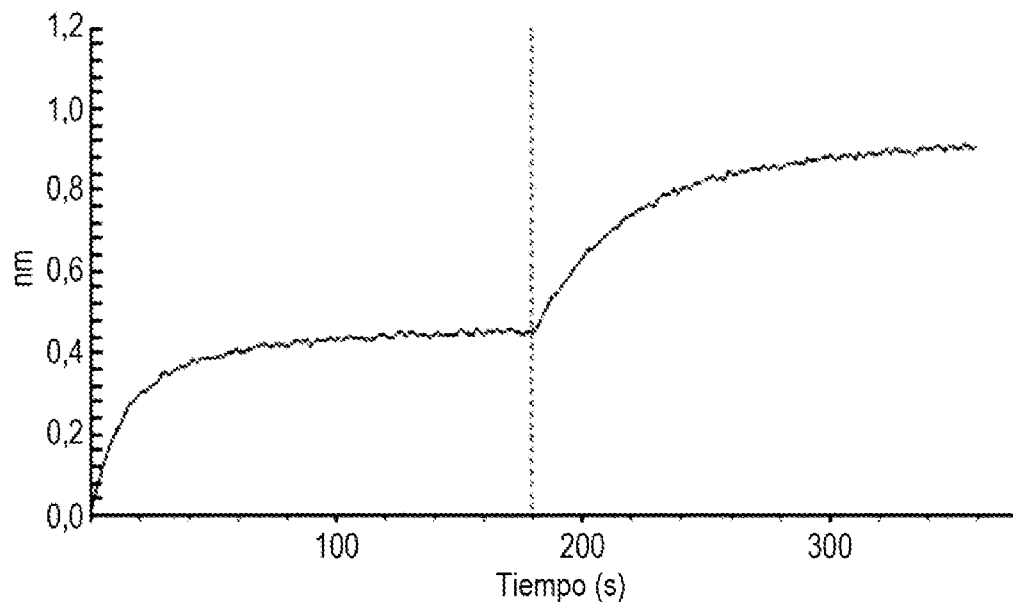


FIGURA 7

Valoración de IL2

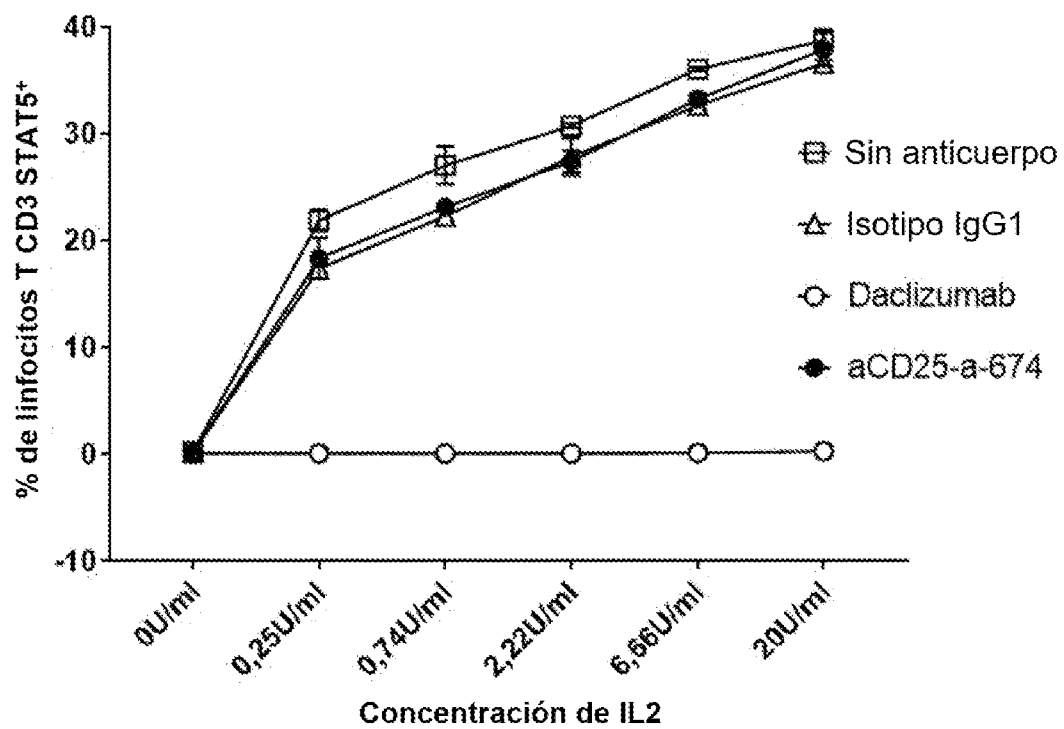


FIGURA 8

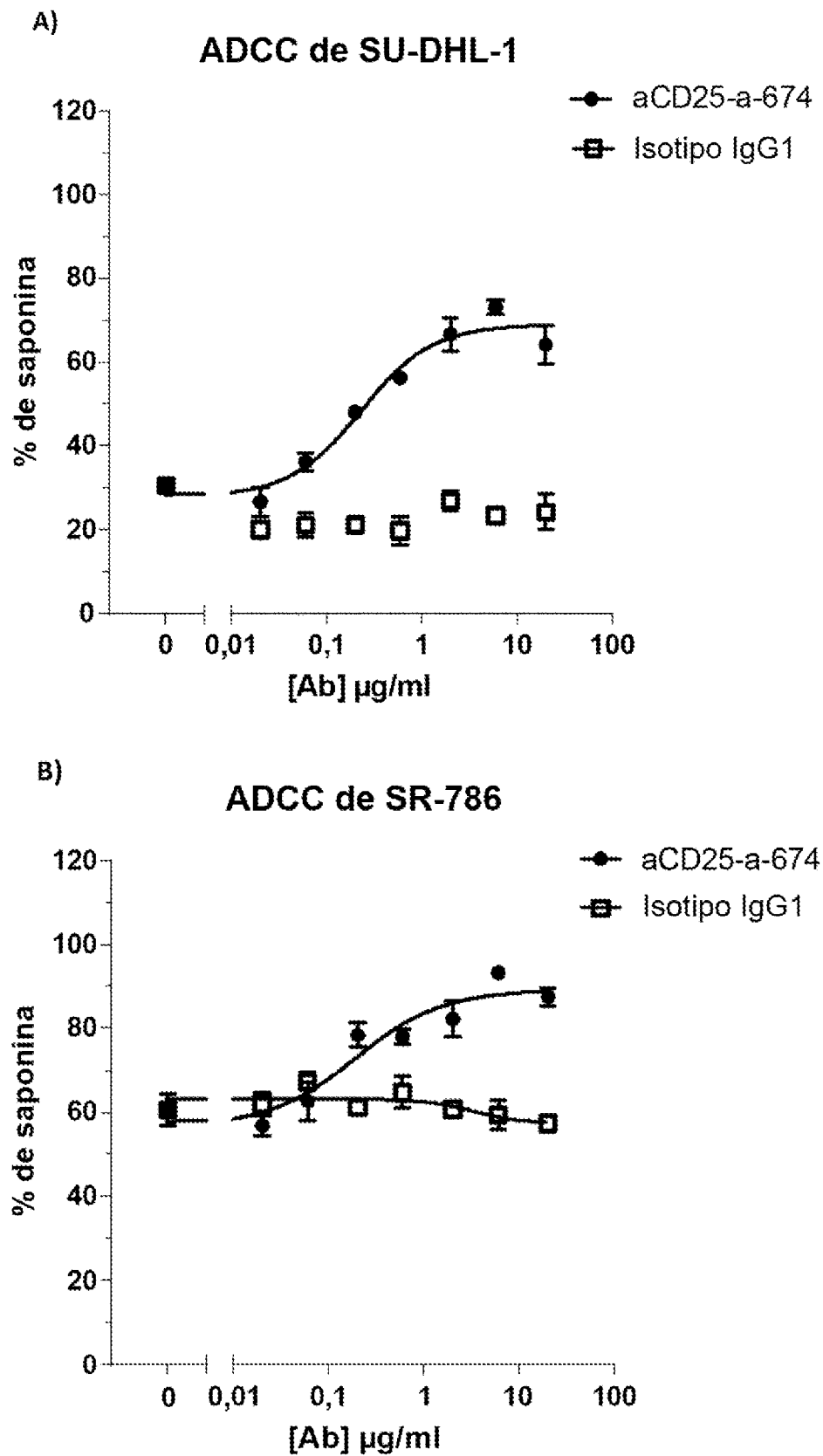


FIGURA 9

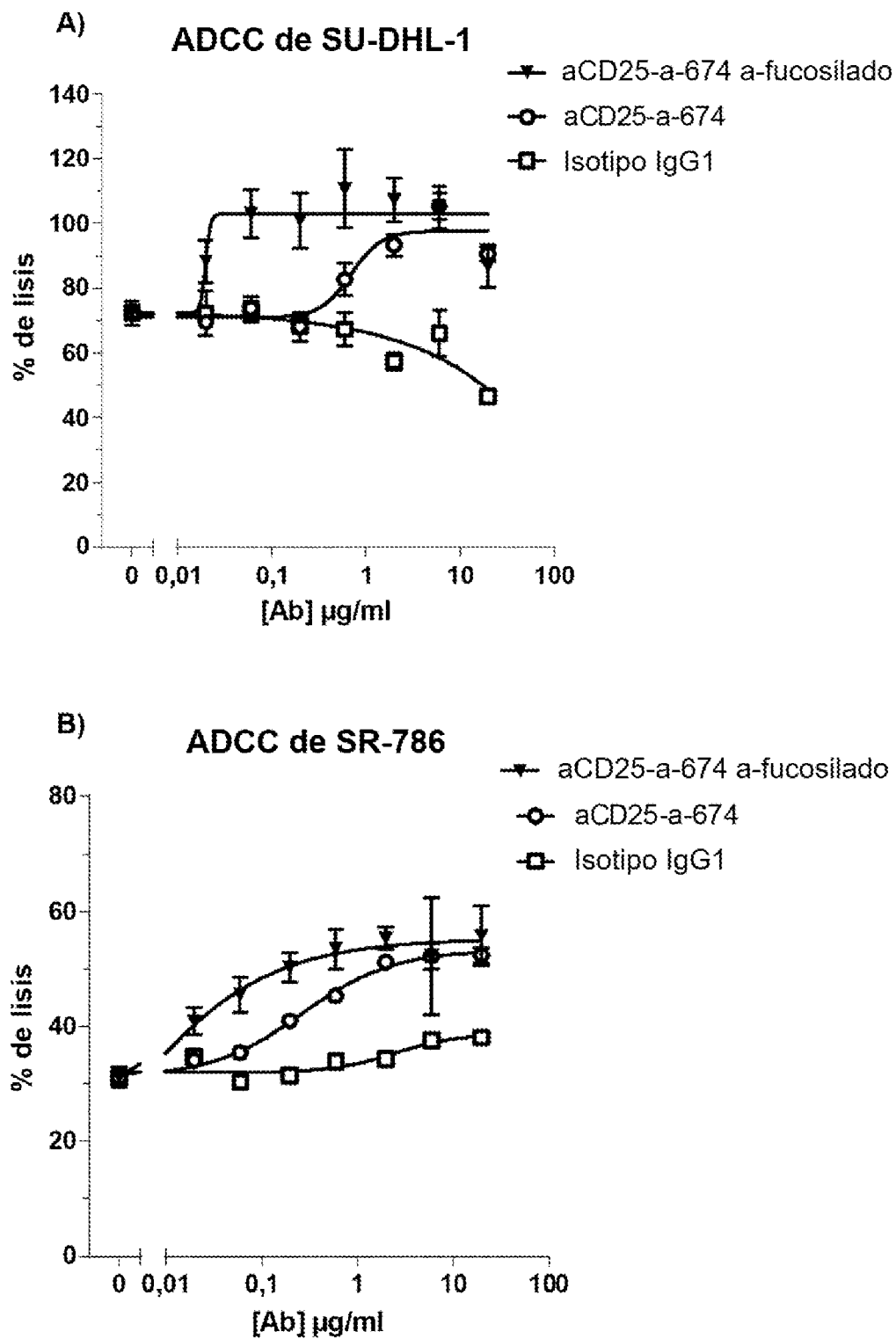


Figura 10

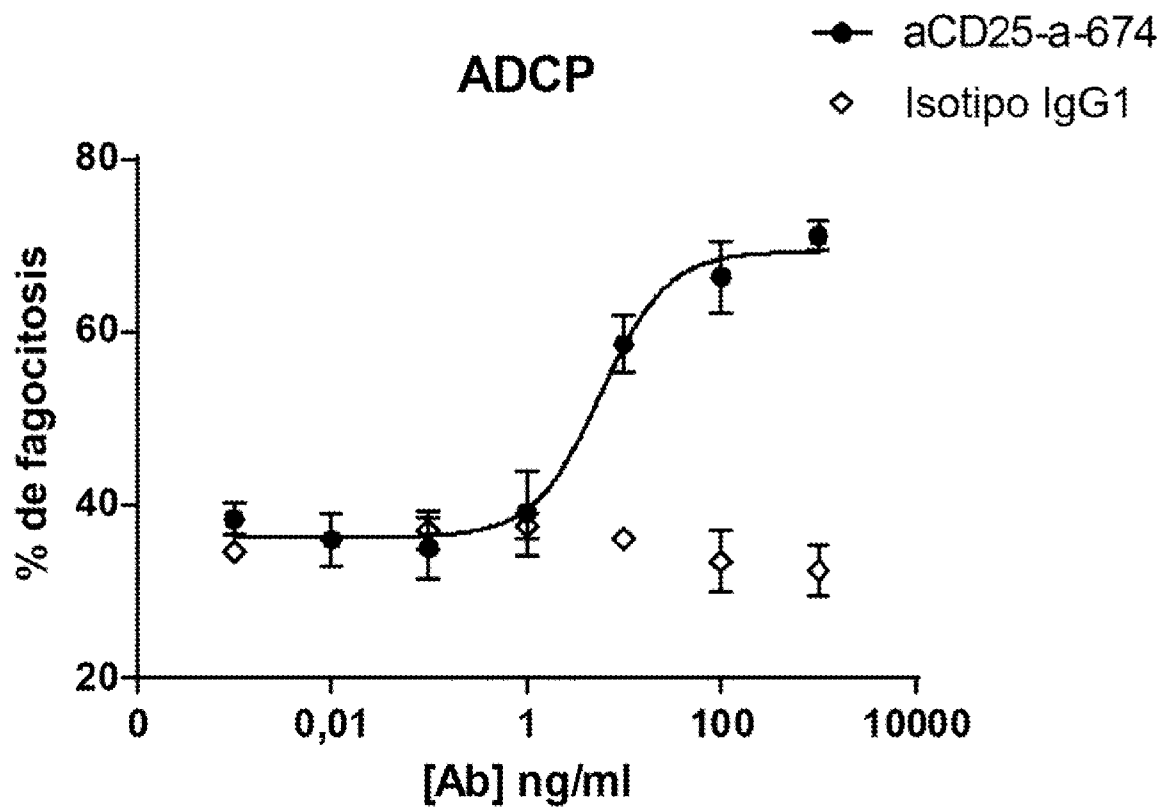


FIGURA 11

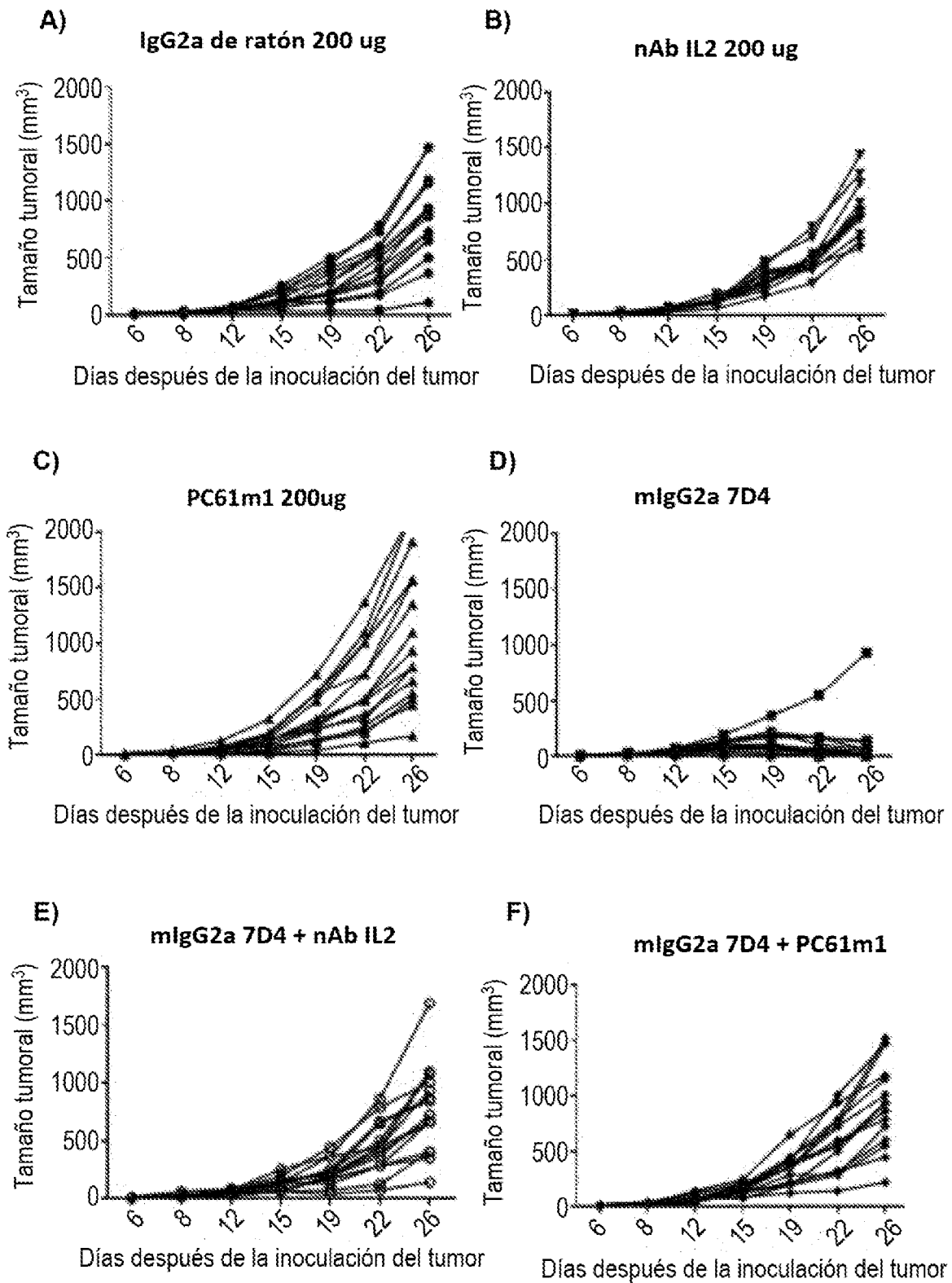


Figura 12