AGENTES ANTICUERPOS ANTI–CD25

RESUMEN- Objetivo y finalidad de la invención

La presente divulgación proporciona secuencias de anticuerpos encontradas en anticuerpos que se unen a CD25 humana. En particular, la presente divulgación proporciona secuencias de anticuerpos anti–CD25 humanos, que no bloquean la unión de CD25 a IL–2 ni la señalización de IL–2. Los anticuerpos y las porciones de unión a antígeno de los mismos que incluyen dichas secuencias se pueden usar en composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento, en particular para tratar el cáncer.

Sector tecnológico: Química

Subsector: Biotecnología.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

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

ANTECEDENTES

[02] La inmunoterapia contra el cáncer implica el uso del propio sistema inmunológico 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 inmunológico. Estas moléculas, o antígenos del cáncer, son más comúnmente proteínas, pero también incluyen moléculas como carbohidratos. La inmunoterapia implica, por tanto, la provocación del sistema inmunológico para atacar las células tumorales a través de estos antígenos diana. Sin embargo, los tumores malignos, en particular los tumores sólidos, pueden escapar de la vigilancia inmune 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 células T reguladoras (células Treg o Tregs) y, más específicamente, un balance desfavorable de células T efectoras (Tef) versus Treg (es decir, una baja proporción de Tef a Treg) (Smyth M. *et al.*, 2014).

[03] Desde su descubrimiento, se ha encontrado que las Treg son críticas para mediar la homeostasis inmune 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 las células efectoras, 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 efectivas y para el tratamiento del cáncer en general. Se piensa que los mecanismos de supresión empleados por las 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).

[04] Se ha demostrado sistemáticamente que las células 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 las células Treg y, lo que es más importante, una baja proporción de células T efectoras (Tef) con respecto a células Treg, se asocia con resultados deficientes en varios cánceres (Shang *et al*., 2015). A la inversa, una proporción alta de células 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 las 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 un objetivo específico para Treg.

[05] CD25 es uno de los objetivos moleculares potenciales para lograr el agotamiento de las Treg. De hecho, CD25, también conocida como la cadena alfa del receptor de alta afinidad de interleucina 2 (IL–2Rα), se expresa constitutivamente en niveles altos en células Treg, y está ausente o se expresa en niveles bajos en células T efectoras y, por lo tanto, es un objetivo prometedor 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).

[06] 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 descritos como anticuerpos anti–CD25 humanos; véase, por ejemplo, los documentos 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 células T efectoras (Queen C *et al*, 1989, y Bielekova B, 2013). Basiliximab es un anticuerpo quimérico anti–CD25 humano de ratón actualmente aprobado para enfermedades de injerto versus huésped, y daclizumab es un anticuerpo humanizado anti–CD25 aprobado para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

[07] Algunos otros anticuerpos anti–CD25 todavía permiten la unión de IL–2 a CD25, 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 describen 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 diseñado) 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 células Treg.

[08] Como se discutió anteriormente, la infiltración de células Treg en tumores, y en particular una baja proporción de células Tef a células Treg, puede llevar a un mal resultado clínico. CD25 se ha identificado como un marcador de Treg y, por lo tanto, podría ser un objetivo 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 citoquina clave para las respuestas de Tef. Los anticuerpos anti–CD25 que se han sometido a pruebas clínicas hasta el momento, aunque agotan las células Treg, también bloquean la señalización de IL–2 a través de CD25 (específicamente, un complejo CD25/CD122/CD132). Los presentes inventores han encontrado 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 las células Treg, mientras que aún permite que IL–2 estimule las células Tef, proporcionando anticuerpos que exhiben un fuerte efecto antineoplásico.

[09] 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 las Treg, en particular en tumores, y que se puedan utilizar en métodos para tratar el cáncer.

SÍNTESIS

[10] La presente invención proporciona nuevos agentes anticuerpos anti–CD25. En algunas formas de realización, los agentes anticuerpos anti–CD25 proporcionados son anticuerpos o fragmentos de unión a 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 las Treg, en particular dentro de los tumores. Los agentes anticuerpos 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 anticuerpo anti–CD25. Los agentes anticuerpos anti–CD25 se denominan, por lo tanto, agentes anticuerpos anti–CD25 no bloqueadores o no bloqueadores de IL–2.

[11] En algunas formas de realización, los agentes anticuerpos anti–CD25 o los fragmentos de unión a 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 formas de realización, 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 que la unión de CD25 sin bloquear la unión de IL–2 a CD25, o su señalización.

[12] Se ha encontrado sorprendentemente que los anticuerpos anti–CD25 que no bloquean la unión de IL–2 o la señalización a través de CD25 y agotan las Treg tienen fuertes efectos antitumorales, en particular tienen un efecto antitumoral más fuerte que los anticuerpos anti–CD25 que agotan las Treg pero bloquean la señalización de IL–2. Los anticuerpos aumentaron las proporciones CD4+ Tef/Treg y CD8+ Tef/Treg. El agotamiento efectivo de células Treg

infiltrantes del tumor al tiempo que se conserva la señalización de IL–2 en las células Tef conduce a un enfoque terapéutico para su uso en el tratamiento del cáncer solo o en combinación con otros agentes antineoplásicos.

[13] 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 a antígeno de los mismos. Las características estructurales y/o funcionales relevantes de los anticuerpos proporcionados se describen en el presente documento y hablan por sí mismas.

[14] En algunas formas de realización, los agentes anticuerpos anti–CD25 proporcionados se caracterizan por una o más características que están asociadas con la unión a un epítopo específico en el dominio extracelular de CD25 humano, y/o que los hacen particularmente susceptibles de uso y/o fabricación farmacéutica.

[15] Las tecnologías proporcionadas, incluidos los agentes anticuerpos anti–CD25 proporcionados (por ejemplo, los anticuerpos proporcionados o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos), las composiciones que los incluyen y/o sus usos, son útiles en medicina. En algunas formas de realización, dichas tecnologías proporcionadas son útiles en la terapia y/o la profilaxis del cáncer.

[16] En algunas formas de realización, los agentes anticuerpos anti–CD25 proporcionados se ejemplifican por los anticuerpos que tienen la secuencia de aCD25–a–686, y más en general anticuerpos o agentes que son o comprenden uno o más fragmentos de unión a antígeno o porciones de los mismos, por ejemplo que comprenden la secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–HCDR3 como región 3 determinante de complementariedad de cadena pesada variable, y/o, en algunas formas de realización, comprenden una o ambas secuencias aCD25–a–686 HCDR1 y HCDR2. Las referencias a los agentes anticuerpos anti–CD25 en este documento, tales como aCD25–a–686, incluyen

variantes de los mismos, incluidas las variantes maduradas por afinidad aCD25–a–686–m1, aCD25–a–686–m2, aCD25–a–686–m3, aCD25–a–686–m4 y aCD25–a–686–m5, a menos que el contexto implique lo contrario.

[17] En una forma de realización, se proporciona un agente anticuerpo anti–CD25 que comprende las secuencias de aminoácidos HCDR1, HCDR2 y HCDR3 de aCD25–a–6 86. En otra forma de realización, se proporciona un agente anticuerpo anti–CD25 que comprende las secuencias de aminoácidos HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de aCD25–a–686. En otra forma de realización, se proporciona un agente anticuerpo anti–CD25 que comprende la secuencia de aminoácidos pesada variable de aCD25–a–686. En otra forma de realización, se proporciona un agente anticuerpo anti–CD25 que comprende las secuencias de aminoácidos pesados variables y livianas variables de aCD25–a–686, o de una variante del mismo. Los agentes anticuerpos anti–CD25 equivalentes basados en las variantes maduradas por afinidad, aCD25–a–686–m1, aCD25–a–686–m2, aCD25–a–686–m3, aCD25–a–686–m4 y aCD25–a–686 –m5, también están específicamente contemplados.

[18] En algunas formas de realización, se proporciona un agente anticuerpo anti–CD25 que compite con aCD25–a–686 (o un fragmento de unión a antígeno o un derivado o variante del mismo, que incluye variantes maduradas por afinidad) para unirse al dominio extracelular de CD25 humano.

[19] En algunas formas de realización, los agentes anticuerpos anti–CD25 proporcionados (por ejemplo, los anticuerpos proporcionados o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, incluidas las variantes y derivados de los mismos, tales como las variantes maduradas por afinidad) se unen a CD25 humano con un Kd en el rango de 10^{-7} M o inferior (por ejemplo, en el rango de 10^{-8} o 10^{-9} o 10^{-10} o 10^{-11} o 10^{-12} o 10^{-13}). En algunas formas de realización, los agentes anticuerpos anti–CD25 proporcionados (por ejemplo, los anticuerpos proporcionados o los fragmentos de unión a antígeno de los

mismos, incluidas las variantes y derivados de los mismos, tales como las variantes maduradas por afinidad) se unen a CD25 humano con un valor Kd de 10^{-7} a 10^{-10}, o de 10^{-7} a 10^{-9}.

[20] En algunas formas de realización, los agentes anticuerpos anti–CD25 proporcionados (por ejemplo, los anticuerpos proporcionados o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, incluidas las variantes y derivados de los mismos) se unen a un epítopo en CD25 humano que está unido por aCD25–a–686 (o un fragmento de unión a antígeno o derivado o variante del mismo). En algunas formas de realización, tales agentes anticuerpos anti–CD25 proporcionados pueden unirse al dominio extracelular de CD25 humano. En algunas formas de realización, los agentes anticuerpos anti–CD25 proporcionados pueden unirse a un epítopo de CD25 (por ejemplo, cuando se evalúa usando uno o más ensayos como se describe aquí o de otra manera conocida en la técnica), en particular el identificado como aCD25ep–a (SEQ ID NO: 23). En algunas formas de realización, los agentes anticuerpos anti–CD25 proporcionados, o fragmentos de unión a antígeno, según la presente invención se unen específicamente al epítopo designado aCD25ep–a (SEQ ID NO: 23); o aCD25ep–b (SEQ ID NO: 24); o aCD25ep–c (SEQ ID NO: 25) (ver Fig. 2), o combinaciones de los mismos como, por ejemplo, pero sin limitación, los epítopos designados aCD25ep–b y aCD25ep–c, o los tres epítopos. En una forma de realización de la invención, los agentes anticuerpos anti–CD25 proporcionados, o fragmentos de unión a antígeno, se unen específicamente a aCD25ep–b y/o aCD25ep–c.

[21] En algunas formas de realización, los anticuerpos proporcionados o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden unirse a CD25 de humano y de primate no humano (por ejemplo, de mono Cynomolgus) (por ejemplo, a un epítopo extracelular en CD25 de humano y/o mono Cynomolgus) con un valor Kd en el rango de 10^{-7} M o inferior, por ejemplo, en el rango de 10^{-8} o 10^{-9} o 10^{-10} o 10^{-11} o 10^{-12} o 10^{-13}. En algunas formas de realización, los

agentes anticuerpos anti–CD25 proporcionados (por ejemplo, los anticuerpos proporcionados o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, incluidas las variantes y derivados de los mismos, tales como las variantes maduradas por afinidad) se unen a CD25 humano con un valor Kd de 10^{-7} a 10^{-10}, o de 10^{-7} a 10^{-9}.

[22] Entre otras cosas, la presente divulgación proporciona un procedimiento que puede utilizarse para identificar y/o caracterizar agentes anticuerpos anti–CD25 particularmente útiles (por ejemplo, anticuerpos anti–CD25 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos anti–CD25 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos caracterizados por ciertas características estructurales y/o funcionales, como la unión específica a CD25 humano (por ejemplo, a un epítopo extracelular del mismo), la inclusión de uno o más elementos de secuencia de CDR como se describe aquí (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. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti–CD25 particularmente útiles como se describe en la presente se caracterizan por una pluralidad de tales características. En algunas formas de realización, uno o más anticuerpos descritos en el presente documento pueden caracterizarse como agentes anticuerpos anti–CD25.

[23] Por lo tanto, tal como se ejemplifica en este documento, ciertos anticuerpos y/o fragmentos de unión a antígeno que comprenden secuencias aCD25–a686 (en particular, aCD25–a–686–HCDR3 y/o aCD25–a–686–LCDR3) se caracterizan por tales características estructurales y/o funcionales deseables; tales anticuerpos y/o fragmentos de unión a antígeno de los mismos

pueden denominarse en la presente memoria como agentes anticuerpos anti–CD25. Además, de acuerdo con la presente descripción, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que compiten con aCD25–a–686 pueden ser anticuerpos particularmente útiles; dichos anticuerpos y/o fragmentos de unión a antígeno de los mismos también pueden denominarse en la presente memoria como agentes anticuerpos anti–CD25.

[24] Los anticuerpos (y/o los fragmentos de unión a 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 usar con respecto a métodos que requieren o involucran apuntar a un epítopo como el identificado como aCD25ep–a, aCD25ep–b y/o aCD25ep–c (por ejemplo, aCD25ep–b y/o aCD25ep–c) dentro del dominio extracelular de CD25 humano. Los anticuerpos proporcionados o los fragmentos de unión a 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.

[25] En un aspecto, la presente invención proporciona una secuencia de aminoácidos CD25–a–686–HCDR3 y polipéptidos que la incluyen, tales como, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que comprenden la secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–HCDR3 (SEQ ID NO: 4) como región 3 determinante de complementariedad de cadena pesada variable. En algunas formas de realización, dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede caracterizarse adicionalmente por comprender otros elementos de secuencia de aminoácidos aCD25–a, tales como:

a) secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–HCDR1 (SEQ ID NO: 2) como región 1 determinante de complementariedad de cadena pesada variable; y/o

b) secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–HCDR2 (SEQ ID NO: 3) como región 2 determinante de complementariedad de cadena pesada variable.

[26] En algunas formas de realización, los anticuerpos proporcionados o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden comprender regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada variables definidas anteriormente (es decir, elementos de secuencia de aminoácidos de aCD25–a–686) además en el orden correcto, separados específicamente por secuencias de marco de anticuerpos, tales como los incluidos en la secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–HCDR123 (SEQ ID NO: 5), en particular para ejercer correctamente sus propiedades de unión y funcionales. Por ejemplo, en algunas formas de realización, un anticuerpo proporcionado o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede comprender una secuencia de aminoácidos de CD25–a–686–HCDR123 (SEQ ID NO: 5) y, opcionalmente:

a) una secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–LCDR1 como región 1 determinante de complementariedad de cadena liviana variable (SEQ ID NO: 6);

b) una secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–LCDR2 (SEQ ID NO: 7) como región 2 determinante de complementariedad de cadena liviana variable; y

c) una secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–LCDR3 (SEQ ID NO: 8) como región 3 determinante de complementariedad de cadena liviana variable.

[27] Por lo tanto, en algunas formas de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo que comprenden una cadena pesada variable que comprende una secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–HCDR123 (SEQ ID NO: 5). Preferiblemente, dicho anticuerpo aislado o fragmentos de unión a antígeno del mismo comprenden además una cadena liviana variable que comprende una

secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–LCDR123 (SEQ ID NO: 9), como se describe en los Ejemplos. Además, las secuencias de aminoácidos aCD25–a–686 también se refieren a secuencias de anticuerpos que están definidas por una serie de sustituciones con respecto a los elementos de secuencia de aminoácidos aCD25–a–686 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–686–HCDR3 (SEQ ID NO: 4). En una forma de realización adicional, las secuencias de aminoácidos aCD25–a–686 también se refieren a secuencias de anticuerpos que comprenden, como regiones 1, 2 y 3 determinantes de complementariedad de cadena pesada variable (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–686–HCDR1 (SEQ ID NO: 2), aCD25–a–686–HCDR2 (SEQ ID NO: 3) y aCD25–a–686–HCDR3 (SEQ ID NO: 4), y más preferiblemente una secuencia que contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones de aminoácidos dentro de aCD25–a–686–HCDR123 (SEQ ID NO: 5). Los anticuerpos que presentan dichos elementos de secuencia de aminoácidos aCD25–a–686 y tales sustituciones pueden presentar todavía las propiedades de unión y/o funcionales de aCD25–a–686, y de los agentes anticuerpos anti–CD25 en general.

[28] Por consiguiente, en una forma de realización, la presente invención proporciona un agente anticuerpo anti–CD25 (es decir, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende:

a. la secuencia de región de cadena pesada variable de aCD25–a–686 (SEQ ID NO: 5) (o una variante de la misma, 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–686 (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 liviana variable de aCD25–a–686 (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 liviana variable que tiene hasta 5 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de región de cadena liviana variable de aCD25–a–686 (o una variante de la misma, tal como una variante madurada por afinidad de la misma).

[29] En algunas formas de realización, las sustituciones de aminoácidos no se producen en una secuencia de CDR.

[30] En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un agente anticuerpo anti–CD25 (es decir, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo) que comprende:

a. la secuencia de región de cadena pesada variable de aCD25–a–686 (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–686 (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 liviana variable de aCD25–a–686 (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 liviana 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 liviana variable de aCD25–a–686 (o una variante de la misma, tal como una variante madurada por afinidad de la misma).

[31] En algunas formas de realización, 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 describe aquí). Por ejemplo, el agente 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 liviana variable que tiene al menos 95% de identidad con la secuencia de región de cadena liviana 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 marco de las secuencias de regiones de cadena pesada y liviana variables. En tales formas de realización, los agentes anticuerpos anti–CD25 que tienen ciertas identidades de secuencia comprenden las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y liviana completas del agente anticuerpo anti–CD25 del que se derivan.

[32] La invención también proporciona anticuerpos variantes, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de los anticuerpos descritos en el presente documento. La invención proporciona anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, en donde puede alterarse cualquier motivo DG en las cadenas livianas 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 livianas o pesadas de los anticuerpos, por ejemplo para reducir

la desamidación de asparagina y/o en donde puede alterarse cualquier metionina en las cadenas livianas 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.

[33] En tales formas de realización, el anticuerpo anti–CD25 o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser o puede derivarse, por ejemplo, de aCD25–a–686. Los anticuerpos anti–CD25 variantes proporcionan anticuerpos adicionales que tienen cualquiera de las propiedades de unión y funcionales de aCD25–a–686, y posiblemente todas. Por ejemplo, los anticuerpos anti–CD25 variante son anticuerpos que no bloquean IL–2.

[34] Por consiguiente, en algunas formas de realización, 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 estándar en la técnica para reducir la susceptibilidad a modificaciones químicas. 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.

[35] En una forma de realización de la invención, se proporciona un anticuerpo variante que tiene secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo como se describe en este documento (por ejemplo, las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de aCD25–a–686), o la cadena pesada variable y liviana variable de cualquier anticuerpo como se describe en este documento (por ejemplo, la cadena pesada variable y liviana variable de cualquiera de aCD25–

a–686), 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 descritas se pueden usar y formular como se describe para aCD25–a–686.

[36] En una forma de realización, el anticuerpo anti–CD25 o el fragmento de unión a antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de aCD25–a–686, en donde la metionina en la región de marco 4 está sustituida, preferiblemente con leucina o alanina, es decir, el residuo de aminoácido 117M de aCD25–a–686–HCDR123 (como se muestra en la Figura 1) se reemplaza por leucina o alanina.

La invención también proporciona anticuerpos madurados por afinidad, por ejemplo, variantes maduradas por afinidad derivadas de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. En algunas formas de realización, el anticuerpo o los fragmentos de unión a antígeno del mismo comprenden:

– una región HCDR2 seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–m1–HCDR2 (SEQ ID NO: 13), la secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–m2–HCDR2 (SEQ ID NO: 14), la secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–m3–HCDR2 (SEQ ID NO: 15), la secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–m4–HCDR2 (SEQ ID NO: 16) y la secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–m5–HCDR2 (SEQ ID NO: 17) y/o

– una región HCDR1 seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–m2–HCDR1 (SEQ ID NO: 10), la secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–m3–HCDR1 (SEQ ID NO: 2), la secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–m4–HCDR1 (SEQ ID NO: 11) y la secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–m5–HCDR1 (SEQ ID NO: 12).

En algunas formas de realización de la invención, los anticuerpos variantes o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos tienen las secuencias CDR pesadas que se proporcionan en la Tabla 2 (por ejemplo, de aCD25–a–686–m1, aCD25–a–686–m2, aCD25–a–686–m3, aCD25–a–686–m4 o aCD25–a–686–m5). En algunas formas de realización, el anticuerpo variante o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo puede tener las secuencias CDR de cadena liviana que se proporcionan en la Tabla 3 (por ejemplo, de aCD25–a–686–m1, aCD25–a–686–m2, aCD25–a–686–m3, aCD25–a–686–m4 o aCD25–a–686–m5). La presente invención proporciona específicamente las variantes maduradas por afinidad de aCD25–a–686 referidas aquí como aCD25–a–686–m1, aCD25–a–686–m2, aCD25–a–686–m3, aCD25–a–686–m4 y aCD25–a–686–m5, así como fragmentos de las mismas. Las variantes maduradas por afinidad descritas pueden usarse y formularse como se describe para aCD25–a–686.

[37] En una forma de realización, el anticuerpo variante o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo puede comprender una cadena pesada variable que comprende una secuencia seleccionada de una secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–m1–HCDR123 (SEQ ID NO: 18), una secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–m2–HCDR123 (SEQ ID NO: 19), una secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–m3–HCDR123 (SEQ ID NO: 20), una secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–m4–HCDR123 (SEQ ID NO: 21) y una secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–m5–HCDR123 (SEQ ID NO: 22). En una forma de realización, el anticuerpo variante o un fragmento de unión del anticuerpo del mismo puede comprender una cadena liviana variable que comprende una secuencia seleccionada de una secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–m1–LCDR123 (SEQ ID NO: 9), una secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–m2–LCDR123 (SEQ ID NO: 9), una secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–m3–LCDR123 (SEQ ID NO: 9), una secuencia de aminoácidos

aCD25–a–686–m4–LCDR123 (SEQ ID NO: 9) y una secuencia de aminoácidos aCD25–a–686–m5–LCDR123 (SEQ ID NO: 9). También se proporcionan variantes que tienen sustituciones de aminoácidos como se describe para aCD25–a–686 (por ejemplo, variantes que tienen hasta 5 sustituciones de aminoácidos en cada una de las regiones variables de cadena pesada y liviana). En una forma de 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.

[38] En algunas formas de realización, el anticuerpo anti–CD25 o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de aCD25–a–686m1, aCD25–a–686m2, aCD25–a–686m3, aCD25–a–686m4 o aCD25–a–686m5, en donde la metionina en la región de marco 4 está sustituida, preferiblemente con leucina o alanina, es decir, el residuo de aminoácido 117M de aCD25–a–686m1–HCDR123 (como se muestra en la Figura 14 (SEQ ID NO: 18)), el residuo de aminoácido 117M de aCD25–a–686m2–HCDR123 (como se muestra en la Figura 15 (SEQ ID NO: 19)), el residuo de aminoácido 117M de aCD25–a–686m3–HCDR123 (como se muestra en la Figura 16 (SEQ ID NO: 20)), el residuo de aminoácido 117M de aCD25–a–686m4–HCDR123 (como se muestra en la Figura 17 (SEQ ID NO: 21)) o el residuo de aminoácido 117M de aCD25–a–686m5–HCDR123 (como se muestra en la Figura 18 (SEQ ID NO: 22)) está reemplazado por leucina o alanina.

[39] En algunas formas de realización, la invención proporciona un método para preparar un anticuerpo anti–CD25 que comprende proporcionar un anticuerpo como se describe aquí (por ejemplo, aCD25–a–686 o un fragmento de unión a antígeno o variante del mismo), 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, según lo medido por la Kd. Los métodos para medir la afinidad son conocidos en la técnica y se describen en los ejemplos a continuación. Los anticuerpos madurados por afinidad producidos por tales métodos pueden formularse y usarse como se describe en este documento para los otros agentes anticuerpos anti–CD25.

[40] La maduración por afinidad se puede llevar a cabo de acuerdo con cualquier método adecuado conocido por el experto. Por ejemplo, los sistemas de visualización de anticuerpos *in vitro* se utilizan 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 visualización de repertorios de anticuerpos para permitir la selección subsiguiente de aglutinantes, y el aumentar la rigurosidad de la selección permite la selección de variantes de mayor y mayor afinidad. Los fragmentos de anticuerpos pueden expresarse en levaduras, ribosomas, partículas de presentación de fagos o por acoplamiento directo al ADN.

[41] 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 utilizan el escaneo de alanina o la mutagénesis dirigida al sitio para generar colecciones limitadas de variantes específicas. Además, los métodos de combinación aleatoria (*shuffling*) para obtener variantes combinadas del anticuerpo parental también se pueden usar para mejorar aún más la afinidad de los anticuerpos.

[42] Por consiguiente, en una forma de 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), combinación aleatoria (*shuffling*) (por ejemplo, *shuffling* de ADN, *shuffling* de cadena o *shuffling* de CDR) y el uso del sistema CRISPR–Cas9 para introducir modificaciones.

[43] 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).

[44] En algunas formas de realización, se proporciona un método para preparar una composición farmacéutica, que comprende proporcionar un anticuerpo preparado según un método anterior (es decir, para producir un anticuerpo por maduración por afinidad) y coformular el anticuerpo con al menos uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El anticuerpo utilizado en la preparación de la composición farmacéutica puede ser una variante de madurada por afinidad de aCD25–a–686. Las composiciones farmacéuticas producidas por tales métodos pueden usarse en los métodos de tratamiento de la presente invención como se describe en el presente documento para los otros agentes anticuerpos anti–CD25.

[45] Los anticuerpos y/o fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a CD25 como se describe en el presente documento (por ejemplo, un agente anticuerpo anti–CD25 que puede incluir uno o más elementos de secuencia de aminoácidos de aCD25–a–686 como aCD25–a–686–HCDR3 o aCD25–a–686–HCDR123, y/o que puede competir con aCD25–a–686 para unirse a CD25 humano y CD25 de primate no humano, por ejemplo

CD25 de mono Cynomolgus, etc.) pueden proporcionarse en cualquiera de una variedad de formatos. Por ejemplo, en algunas formas de realización, 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 formas de realización, un anticuerpo o fragmento de unión a 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 a antígeno del mismo. En algunas formas de realización, un anticuerpo proporcionado o fragmento de unión a 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 formas de realización, un anticuerpo proporcionado o fragmento de unión a antígeno del mismo es de un isotipo IgG, más particularmente un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. (En algunas formas de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es de la subclase de IgG1 humana. En otra forma de realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es de la subclase de IgG2 humana.) En algunas formas de realización, un anticuerpo proporcionado o un fragmento de unión a 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 anticuerpos anti–CD25, tal como una secuencia de aminoácidos aCD25–a–686, el anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno pueden estar comprendidos en un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo multiespecífico u otro formato multiespecífico que pueda estar disponible en la técnica.

[46] En algunas formas de realización, un agente anticuerpo anti–CD25 proporcionado comprende una entidad de unión a CD25 (por ejemplo, un

anticuerpo anti–CD25 o un fragmento de unión a antígeno del mismo) y una carga útil conjugada tal como un agente terapéutico o diagnóstico. En muchas de tales formas de realización, el agente se considera y/o se refiere como un "inmunoconjugado". Los ejemplos de tecnologías y compuestos que se pueden usar para generar inmunoconjugados específicos como anticuerpo–fármaco se describen 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).

[47] En algunas formas de realización, la presente invención proporciona secuencias de aminoácidos de aCD25–a–686 que identifican anticuerpos proporcionados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos (o una variante de los mismos, incluidas las variantes maduradas por afinidad proporcionadas). En algunas formas de realización, tales secuencias identifican anticuerpos proporcionados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a un epítopo en CD25 humano (como aCD25ep–a, aCD25ep–b y/o aCD25ep–c [por ejemplo, aCD25ep–b y/o aCD25ep–c]), y opcionalmente también un epítopo correspondiente de un CD25 de primate no humano, por ejemplo, de mono Cynomolgus y/o de un CD25 murino, ya sea como proteínas aisladas o en la superficie de células que expresan CD25 (tales como células inmunes o líneas celulares, por ejemplo células SU–DHL1).

[48] En algunas formas de realización, la presente invención proporciona anticuerpos anti–CD25 o fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a un epítopo de CD25 humano, en donde el epítopo comprende uno o más residuos de aminoácidos comprendidos en los aminoácidos 70–84 de la SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, el epítopo comprende al menos 4 aminoácidos, en donde el epítopo comprende uno o más aminoácidos comprendidos en los aminoácidos 70–84 de la SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, el epítopo comprende al menos 5 aminoácidos, al menos 6 aminoácidos, al menos 7 aminoácidos, al menos 8 aminoácidos, al menos 9

aminoácidos, al menos 10 aminoácidos, al menos 11 aminoácidos, al menos 12 aminoácidos, al menos 13 aminoácidos o al menos 14 o más aminoácidos en donde el epítopo comprende uno o más aminoácidos comprendidos en los aminoácidos 70–84 de la SEQ ID NO: 1. El epítopo puede ser lineal o conformacional, es decir, discontinuo. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti–CD25 o los fragmentos de unión a antígeno se unen específicamente a un epítopo de CD25 humano en donde el epítopo 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 70–84 de la SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, los anticuerpos anti–CD25 o los fragmentos de unión a antígeno se unen a un epítopo que comprende los aminoácidos 70–84 de la SEQ ID NO: 1.

[49] En algunas formas de realización, la presente invención proporciona procedimientos para seleccionar y/o caracterizar anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que comprenden una secuencia de aminoácidos aCD25–a–686 y/o que presentan características de unión comparables a los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden uno o más elementos de secuencia de aminoácidos de aCD25–a–686 (por ejemplo, que incluyen la secuencia de aminoácidos de aCD25–a–686–HCDR3 y/o que compiten con aCD25–a–686) 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 epítopo, en particular el identificado en los Ejemplos como aCD25ep–a (secuencia de proteína NSSHSSWDNQCQCTS (SEQ ID NO: 23); aminoácidos 70–84 en la secuencia de Uniprot P01589), el identificado en los Ejemplos como aCD25ep–b (secuencia de proteína KAMAYKEGTMLNCECKRGFR (SEQ ID NO: 24)) y/o el

identificado en los Ejemplos como aCD25ep–c (secuencia de proteína ATERIYHF (SEQ ID NO: 25)).

[50] Además, la presente invención también proporciona procedimientos para seleccionar anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que presentan características funcionales comparables con los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden uno o más elementos de secuencia de aminoácidos de aCD25–a–686, donde tales características incluyen 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 anticuerpos 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 estas características, pero posiblemente todas ellas cuando se evalúan en ensayos *in vitro* / *ex vivo*, ensayos basados en células y/o modelos animales.

[51] En algunas formas de realización, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un agente anticuerpo anti–CD25 tal como una secuencia de aminoácidos aCD25–a–686 (o una variante del mismo, incluidas las variantes maduradas por afinidad proporcionadas). En algunas formas de realización, tales 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 huésped tales como, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, de insectos, de peces, murinas, de simios o humanas.

[52] En algunas formas de realización, la presente invención proporciona células huésped que comprenden moléculas de ácido nucleico heterólogas (por ejemplo, vectores de ADN) que expresan un agente anticuerpo anti–CD25

proporcionado (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo) que tiene una o más propiedades, por ejemplo, como se describe aquí, de un agente anticuerpo anti–CD25 (por ejemplo, que comprende una secuencia de aminoácidos aCD25–a–686). En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona métodos para preparar un agente anticuerpo anti–CD25 (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo) que tiene una o más propiedades, por ejemplo, como se describe en el presente documento, de un agente anticuerpo anti–CD25 (por ejemplo, que comprende una secuencia de aminoácidos aCD25–a–686). En algunas formas de realización, tales métodos pueden comprender cultivar una célula huésped que comprende ácidos nucleicos (por ejemplo, ácidos nucleicos heterólogos que pueden comprender y/o administrarse a la célula huésped a través de vectores). En algunas formas de realización, dicha célula huésped (y/o las secuencias de ácido nucleico heterólogas) está dispuesta y construida de manera tal que el agente anticuerpo anti–CD25 (por ejemplo, el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo) se secreta de la célula huésped (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–686 y elementos de secuencia están destinados a ser utilizados en el contexto de, o junto con, tales células, como en receptores de células T artificiales que injertan la especificidad de un anticuerpo monoclonal en células T).

[53] En algunas formas de realización, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno puede estar afucosilado. Es bien sabido que la glicosilación 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 diseñan o aíslan de otra maneras) y las proteínas de fusión Fc, y la tecnología específica puede explotarse para obtener un anticuerpo con el perfil de glicosilación deseado (Liu

L, 2015). Las funciones efectoras que respaldan la citotoxicidad de un anticuerpo para su uso de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, un anticuerpo anti–CD25 como se describe en este documento, incluyendo, por ejemplo, un anticuerpo que puede ser o describirse como un agente anticuerpo anti–CD25) pueden mejorarse utilizando métodos para disminuir los niveles de fucosilación del anticuerpo. Los anticuerpos que comprenden elementos específicos de secuencia aCD25–a–686 que presentan dichas propiedades pueden generarse, por ejemplo, expresando una secuencia aCD25–a–686 que utiliza tecnologías para modificar por ingeniería genética 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 EP2480671.

[54] En algunas formas de realización, la presente invención proporciona composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) que comprenden un anticuerpo proporcionado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene propiedades deseables como se describe en el presente documento (por ejemplo, como se describe para los anticuerpos que aquí se denominan agentes anticuerpos anti–CD25, que incluyen específicamente, por ejemplo, anticuerpos aCD25–a–686 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, o anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que compiten con anticuerpos aCD25–a–686 por la unión con CD25). En algunas formas de realización, tales composiciones proporcionadas están destinadas y/o se emplean en un uso médico, tal como un uso terapéutico, de diagnóstico o profiláctico. En algunas formas de realización, dicha composición proporcionada puede comprender además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y/o puede usarse en el tratamiento del cáncer. En algunas formas de realización, 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 materia 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, por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa), mucosal, intratumoral, peritumoral, oral o tópica. En muchas formas de realización, las composiciones farmacéuticas proporcionadas, que comprenden un agente anticuerpo anti–CD25 como se describe en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo anti–CD25 o una porción de unión a antígeno del mismo), se formulan para administración parenteral (por ejemplo, mediante inyección y/o infusión). En algunas formas de realización, dicha composición farmacéutica proporcionada puede ser proporcionada, por ejemplo, en formato de jeringa prellenada o vial. En algunas formas de realización, tal composición farmacéutica proporcionada puede proporcionarse y/o utilizarse, por ejemplo, en forma seca (por ejemplo, liofilizada); alternativamente, en algunas formas de realización, dicha composición farmacéutica proporcionada se puede proporcionar y/o utilizar en forma líquida (por ejemplo, como solución, suspensión, dispersión, emulsión, etc.), en forma de gel, etc.

[55] En algunas formas de realización, la presente invención proporciona usos de agentes anticuerpos anti–CD25 (por ejemplo, anticuerpos anti–CD25 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) como se describe en el presente documento (por ejemplo, que comprenden un elemento de secuencia de aminoácidos de aCD25–a–686), y/o de una composición que los comprende, en el tratamiento y/o en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un cáncer, como neoplasia de células B, linfoma (linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, mielomas), un trastorno mieloproliferativo, un tumor sólido (como

carcinoma de mama, carcinoma de células escamosas, cáncer de colon, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer genitourinario, cáncer de recto, 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 sobre la base de la presencia de marcadores y antígenos específicos relevantes para el tumor, tales como CD20, HER2, PD–1, PD–L1, SLAM7F, 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, estas afecciones también pueden considerarse al definir estados precancerosos, no invasivos, de los cánceres anteriores, como cáncer *in situ*, el mieloma latente, gammapatía monoclonal de importancia indeterminada, neoplasia intraepitelial cervical, MALTomas / GALTomas y diversos trastornos linfoproliferativos. Preferiblemente, en algunas formas de realización, el sujeto que se está tratando tiene un tumor sólido.

[56] Por lo tanto, en algunas formas de realización, la presente invención proporciona métodos para tratar el cáncer en un sujeto, que comprenden administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende un agente anticuerpo anti–CD25 proporcionado (por ejemplo, anticuerpos anti–CD25 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) como se describe en este documento (por ejemplo, que comprenden las secuencias de aminoácidos de aCD25–a–686) o un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que compite con un anticuerpo que comprende secuencias de aminoácidos de

aCD25–a–686 para la unión de CD25. Preferiblemente, en algunas formas de realización, el sujeto tiene un tumor sólido.

[57] Por lo tanto, en algunas formas de realización, la presente invención proporciona un método para agotar células T reguladoras en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende un agente anticuerpo anti–CD25 proporcionado (por ejemplo, anticuerpos anti–CD25 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) como se describe en el presente documento (por ejemplo, que comprenden secuencias de aminoácidos de aCD25–a–686) o un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que compite con un anticuerpo que comprende secuencias de aminoácidos de aCD25–a–686 para la unión a CD25. En una forma de realización, el sujeto tiene un tumor sólido. En una forma de realización, el sujeto tiene un cáncer hematológico.

[58] En algunas formas de realización, los métodos proporcionados pueden 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 formas de realización, tal 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 de 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 inmune tal como un antagonista de PD–1, por ejemplo un anticuerpo anti–PD–1 o un anticuerpo anti–PD–L1. En ciertas formas de realización particulares, cuando tal 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 formas de realización 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 IFNα, IFN–ɣ, IL–2, IL–12, G–CSF y GM–CSF; complejos de coordinación de platino como cisplatino, oxaliplatino y carboplatino, antracendionas, urea sustituida como hidroxiurea, derivados de metilhidrazina que incluyen N–metilhidrazina (MIH) y procarbazina, supresores adrenocorticales como mitotano (o,p'–DDD) y aminoglutetimida; hormonas y antagonistas, incluidos antagonistas de adrenocorticosteroides como prednisona y equivalentes, dexametasona y aminoglutetimida; progestina 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 / equivalentes; antiandrógenos tales como flutamida, análogos de la hormona liberadora de gonadotrofina y leuprolida; antiandrógenos no esteroides tales como flutamida; moléculas que se dirigen a las vías de TGFβ, IDO (indoleamina 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.

[59] Aún más, la presente invención proporciona una variedad de kits o artículos de fabricación que contienen un agente anticuerpo anti–CD25 proporcionado (por ejemplo, un anticuerpo anti–CD25 o un fragmento de unión a antígeno del mismo) como se describe en el presente documento (por ejemplo, que comprende una secuencia de aminoácidos aCD25–a–686) o composiciones relacionadas, que permiten la administración, el almacenamiento u otro uso de tal anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, un kit provisto comprende un recipiente, una jeringa, un vial u otro recipiente que comprende dichas composiciones, opcionalmente junto con uno o más artículos de manufactura, diluyentes, reactivos, fases sólidas y/o instrucciones para el uso correcto del kit.

[60] En algunas formas de realización, la identificación, caracterización y/o validación de un agente anticuerpo anti–CD25 particular (por ejemplo, un anticuerpo anti–CD25 o un fragmento de unión a antígeno del mismo) como se describe en el presente documento (por ejemplo, que comprende secuencias de aminoácidos aCD25–a–686) 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 algunas formas de realización, dicha identificación, caracterización y/o validación pueden involucrar el análisis de la actividad en uno o más ensayos basados en

células, por ejemplo, utilizando diferentes configuraciones experimentales y/o un panel de líneas celulares seleccionadas (por ejemplo, derivadas de cáncer). En algunas formas de realización, particularmente dado el mecanismo inmunológico propuesto asociado a ciertos agentes anticuerpos anti–CD25 deseables, como se describe en este documento, las actividades, la identificación, la caracterización y/o la validación deseables pueden involucrar la recopilación de datos relevantes generados en modelos animales, en los que se inducen cánceres o en los que se implantan células cancerosas como xenoinjerto o como células derivadas del cáncer singénicas / alogénicas. De manera alternativa o adicional, en algunas formas de realización, se pueden utilizar modelos animales que implican la transferencia de células humanas como PBMC (es decir, modelos de ratones de PBMC 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 anticuerpos anti–CD25 en células inmunes humanas dentro de un sistema modelo.

[61] En algunas formas de realización, las secuencias relevantes de agentes anticuerpos anti–CD25 (por ejemplo, anticuerpos anti–CD25 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) como se describe en el presente documento (por ejemplo, que comprenden secuencias de aminoácidos de aCD25–a–686 o que de otra manera incluyen características estructurales y/o funcionales de un agente descrito aquí como agente 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, tales secuencias (posiblemente como secuencias codificantes de VH y VL optimizadas por codón) pueden clonarse junto con regiones constantes de IgG1 humanas (hIgG1) y expresarse utilizando un vector de expresión de anticuerpo y una línea celular apropiados (como una línea celular derivada de

CHO, por ejemplo, CHO–S). En algunas formas de realización 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 anticuerpos anti–CD25–hIgG1) se pueden analizar, por ejemplo, usando uno o más ensayos descritos en los ejemplos a continuación. Por ejemplo, tales anticuerpos proporcionados en formato hIgG1 pueden evaluarse para determinar su unión a PBMC humanas y de mono cynomolgus o Treg purificadas o Treg derivadas *in vitro* o líneas celulares CD25 positivas (como SU–DHL–1 o Karpas299), por ejemplo, utilizando citometría de flujo.

[62] Además, se puede evaluar el efecto de uno o más agentes anticuerpos anti–CD25 (por ejemplo, anticuerpos anti–CD25 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) como se describe en el presente documento (por ejemplo, que comprenden secuencias de aminoácidos de aCD25–a–686 o que de otra manera incluyen características estructurales y/o funcionales de un agente descrito aquí como un agente anticuerpo anti–CD25, como un agente anticuerpo anti–CD25–hIgG1) en células tumorales primarias humanas y/o células inmunes, incluidas las células T reguladoras, aisladas de donantes sanos humanos y/o pacientes. Para investigar los efectos potenciales de los agentes anticuerpos anti–CD25, los anticuerpos pueden usarse para tratar PBMC y/o células aisladas de tumores (y/u órganos como los ganglios linfáticos) y/o explantes de tumores u otros organoides 3D y/o células T reguladoras purificadas o generadas *in vitro* u otras células CD25 positivas, como algunas células NK o células dendríticas. Las 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 inmunes efectoras (por ejemplo, producción de granzima B, actividad citotóxica, desgranulación), las respuestas específicas de antígeno (según se mide, por ejemplo, por proliferación, desgranulación o producción de citoquinas 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 PBMC aisladas) o después del aislamiento desde diversos órganos y/o células de los animales, por ejemplo, mediante citometría de flujo o inmunohistoquímica.

[63] Alternativa o adicionalmente, una o más propiedades de los agentes anticuerpos anti–CD25 (por ejemplo, anticuerpos anti–CD25 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) como se describe aquí (por ejemplo, que comprenden secuencias de aminoácidos de aCD25–a–686 o que de otra manera incluyen características estructurales y/o funcionales de un agente descrito aquí como agente anticuerpo anti–CD25, como un agente anticuerpo anti–CD25 (hIgG1) pueden evaluarse, solas o en combinación, estudiando los efectos de dichos agentes anticuerpos anti–CD25 en células que expresan CD25 (por ejemplo, Treg o células cancerosas que expresan CD25). La lectura puede incluir destrucción celular, apoptosis celular, monitoreo de 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 citoquinas). Los efectos celulares de los anticuerpos pueden seguirse *in vivo* cuando se administran agentes anticuerpos aCD25–hIgG1 a monos cynomolgus o al modelo de ratón relevante.

[64] Con el fin de obtener información adicional sobre las interacciones moleculares entre un agente anticuerpo anti–CD25 proporcionado y CD25 humana, se puede determinar la estructura cristalina del agente anticuerpo

anti–CD25 (por ejemplo, para dar un ejemplo específico, un anticuerpo aCD25–a–686–hIgG1) y la proteína CD25 humana. La solubilidad y/o la estabilidad de los agentes anticuerpos anti–CD25 proporcionados (que incluyen específicamente, por ejemplo, los anticuerpos aCD25–a–686–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 $OD_{280/320}$.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[65] **Figura 1:** Secuencias de proteínas relevantes de aCD25–a–686. Cada CDR para la cadena pesada (aCD25–a–686–HCDR1 (SEQ ID NO: 2), aCD25–a–686–HCDR2 (SEQ ID NO: 3) y aCD25–a–686–HCDR3 (SEQ ID NO: 4)) y la cadena liviana (aCD25–a–686–LCDR1 (SEQ ID NO: 6), aCD25–a–686–LCDR2 (SEQ ID NO: 7) y aCD25–a–686–LCDR3 (SEQ ID NO: 8) se indica por separado y subrayada dentro de la secuencia de marco del anticuerpo de cadena pesada y liviana como se identificó inicialmente por el procedimiento de selección (aCD25–a–686–HCDR123 (SEQ ID NO: 5) y aCD25–a–686–LCDR123 (SEQ ID NO: 9), respectivamente).

[66] **Figura 2**: Secuencia de consenso de CD25 humana (código Uniprot P01589) (SEQ ID NO: 1). El dominio extracelular de CD25 madura, correspondiente a los aminoácidos 22–240, está subrayado. Se indica la posición de los epítopos aCD25–a–686 como preliminarmente identificados (aCD25ep–a, aCD25ep–b y aCD25ep–c).

[67] **Figura 3:** Caracterización de la unión de aCD25–a–686 a CD25 expresada en células Treg diferenciadas *in vitro* humanas **(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.

[68] **Figura 4:** Caracterización de la unión de aCD25–a–686 a CD25 expresada en células Pan T activadas con perlas CD3/CD28 humanas **(A)** y **(B)** o de mono Cynomolgus **(C)** y **(D)**, luego escalonadas en células T $CD4^+$ y $CD8^+$, a concentraciones crecientes de anticuerpo y en comparación con el control de isotipo IgG1 humano.

[69] **Figura 5:** Unión de aCD25–a–686 a CD25 his humana recombinante marcada y determinaciones de KD medidas por dos métodos: (A) interferometría de biocapa en el instrumento Octet Red 96 y (B) instrumento SPR Biacore 2000.

[70] **Figura 6:** Muestra la unión no competitiva de aCD25–a–686 e IL–2 **(A)** y la unión competitiva de un anticuerpo competitivo IL–2 con IL–2 **(B)** por interferometría de biocapa en el Octet Red 384 usando un ensayo de recipientes (*binning*) de formato sándwich estándar. El anticuerpo anti–CD25 humano, aCD25–a–686, 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 IL2 humana después de la asociación de antígenos indica un epítopo desocupado (no competidor), mientras que ninguna unión indica el bloqueo del epítopo (competidor).

[71] **Figura 7:** Muestra la unión no competitiva de aCD25–a–686 y daclizumab a CD25 por interferometría de biocapa en el sistema Octet Red 384 utilizando un ensayo de recipientes 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–686). La unión adicional por el segundo anticuerpo después de la asociación de antígenos indica un epítopo desocupado (no competidor), mientras que ninguna unión indica el bloqueo del epítopo (competidor).

[72] **Figura 8:** Caracterización de aCD25–a–686 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 utilizando PBMC 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 CD3 positivas que fosforilan STAT5.

[73] **Figura 9:** Caracterización funcional de aCD25–a–686 en comparación con el control de isotipo IgG1 humano, daclizumab, o el anticuerpo neutralizante anti–IL–2 humano de ratón disponible comercialmente como control positivo (clon: AB12–3G4) utilizando células Pan T. Las células se incubaron con 10 ug/ml de anticuerpo y luego se activaron con perlas de CD3/CD28 durante 72 horas antes del análisis por citometría de flujo. Los resultados muestran el porcentaje de células T CD4 **(A)** o CD8 **(B)** proliferantes positivas para granzima B.

[74] **Figura 10:** Caracterización funcional de aCD25–a–686 en comparación con el control de isotipo IgG1 humano 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 células NK purificadas 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 luego de la adición a las células NK. Los datos se normalizaron a los controles tratados con saponina.

[75] **Figura 11:** Caracterización funcional de aCD25–a–686 a–fucosilado en comparación con el control de isotipo aCD25–a–686 no modificado e 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 células NK purificadas 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 las células NK. Los datos se normalizaron a los controles tratados con saponina.

[76] **Figura 12:** Caracterización funcional de aCD25–a–686 en comparación con el control de isotipo IgG1 humano con respecto a la fagocitosis de células Treg diferenciadas *in vitro* en un ensayo ADCP. Las 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 marcadas con tinte eFluor450. Las células diana residuales se definieron como células que eran eFluor450+/CD14–. Se consideró que las células marcadas doblemente (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 × [(porcentaje de doble positivo) / (porcentaje de doble positivo + porcentaje de dianas residuales)].

[77] **Figura 13:** Ensayos de competencia en el Octet. Unión de aCD25–a–686 al rhCD25 inmovilizado seguido de aCD25–a–686 nuevamente (como control) o un segundo Ab, basiliximab (A), daclizumab (B), no bloqueador de referencia aCD25–a–646 (C) o 7G7B6 (D). Los no bloqueadores de los mAb de señal de IL–2 compiten entre sí (**C**) o con 7G7B6, también un mAb no bloqueador de referencia (**D**), mientras que no compiten con los bloqueadores de señalización de IL–2 como daclizumab o basiliximab (**A** y **B**).

[78] **Figura 14:** Secuencias de proteínas relevantes de aCD25–a–686–m1. Cada CDR para la cadena pesada (aCD25–a– 686–m1–HCDR1 (SEQ ID NO: 2), aCD25–a–686–m1–HCDR2 (SEQ ID NO: 13) y aCD25–a–686–m1–HCDR3 (SEQ ID NO: 4) y la cadena liviana (aCD25–a–686–m1–LCDR1 (SEQ ID NO: 6), aCD25–a–686–m1–LCDR2 (SEQ ID NO: 7) y aCD25–a–686–m1–LCDR3 (SEQ ID NO: 8)) se indica por separado y subrayada dentro de la secuencia de marco del anticuerpo de cadena pesada y liviana, como se identificó

inicialmente por el procedimiento de selección (aCD25–a–686–m1–HCDR123 (SEQ ID NO: 18) y aCD25–a–686–m1–LCDR123 (SEQ ID NO: 9), respectivamente).

[79] **Figura 15:** Secuencias de proteínas relevantes de aCD25–a–686–m2. Cada CDR para la cadena pesada (aCD25–a–686–m2–HCDR1 (SEQ ID NO: 10), aCD25–a–686–m2–HCDR2 (SEQ ID NO: 14) y aCD25–a–686–m2–HCDR3 (SEQ ID NO: 4)) y la cadena liviana (aCD25–a–686–m2–LCDR1 (SEQ ID NO: 6), aCD25–a–686–m2–LCDR2 (SEQ ID NO: 7) y aCD25–a–686–m2–LCDR3 (SEQ ID NO: 8)) se indica por separado y subrayada dentro de la secuencia de marco del anticuerpo de cadena pesada y liviana, como se identificó inicialmente por el procedimiento de selección (aCD25–a–686–m2–HCDR123 (SEQ ID NO: 19) y aCD25–a–686–m2–LCDR123 (SEQ ID NO: 9), respectivamente).

[80] **Figura 16:** Secuencias de proteínas relevantes de aCD25–a–686–m3. Cada CDR para la cadena pesada (aCD25–a–686–m3–HCDR1 (SEQ ID NO: 2), aCD25–a–686–m3–HCDR2 (SEQ ID NO: 15) y aCD25–a–686–m3–HCDR3 (SEQ ID NO: 4)) y la cadena liviana (aCD25–a–686–m3–LCDR1 (SEQ ID NO: 6), aCD25–a–686–m3–LCDR2 (SEQ ID NO: 7) y aCD25–a–686–m3–LCDR3 (SEQ ID NO: 8)) se indica por separado y subrayada dentro de la secuencia de marco del anticuerpo de cadena pesada y liviana, como se identificó inicialmente por el procedimiento de selección (aCD25–a–686–m3–HCDR123 (SEQ ID NO: 20) y aCD25–a–686–m3–LCDR123 (SEQ ID NO: 9), respectivamente).

[81] **Figura 17:** Secuencias de proteínas relevantes de aCD25–a–686–m4. Cada CDR para la cadena pesada (aCD25–a–686–m4–HCDR1 (SEQ ID NO: 11), aCD25–a–686–m4–HCDR2 (SEQ ID NO: 16) y aCD25–a–686–m4–HCDR3 (SEQ ID NO: 4)) y la cadena liviana (aCD25–a–686–m4–LCDR1 (SEQ ID NO: 6), aCD25–a–686–m4–LCDR2 (SEQ ID NO: 7) y aCD25–a–686–m4–LCDR3 (SEQ ID NO: 8)) se indica por separado y subrayada dentro de la

secuencia de marco del anticuerpo de cadena pesada y liviana, como se identificó inicialmente por el procedimiento de selección (aCD25–a–686–m4–HCDR123 (SEQ ID NO: 21) y aCD25–a–686–m4–LCDR123 (SEQ ID NO: 9), respectivamente).

[82] **Figura 18:** Secuencias de proteínas relevantes de aCD25–a–686–m5. Cada CDR para la cadena pesada (aCD25–a–686–m5–HCDR1 (SEQ ID NO: 12), aCD25–a–686–m5–HCDR2 (SEQ ID NO: 17) y aCD25–a–686–m5–HCDR3 (SEQ ID NO: 4)) y la cadena liviana (aCD25–a–686–m5–LCDR1 (SEQ ID NO: 6), aCD25–a–686–m5–LCDR2 (SEQ ID NO: 7) y aCD25–a–686–m5–LCDR3 (SEQ ID NO: 8)) se indica por separado y subrayada dentro de la secuencia de marco del anticuerpo de cadena pesada y liviana, como se identificó inicialmente por el procedimiento de selección (aCD25–a–686–m5–HCDR123 (SEQ ID NO: 22) y aCD25–a–686–m5–LCDR123 (SEQ ID NO: 9), respectivamente).

[83] **Figura 19:** Determinación de KD de anticuerpos madurados por afinidad purificados (IgG1) a la etiqueta rhCD25–his realizada por SPR en el instrumento Biacore 2000. (A) aCD25–a–686m1, (B) aCD25–a–686m2, (C) aCD25–a–686m3, (D) aCD25–a–686m4 y (E) aCD25–a–686m5.

[84] **Figura 20:** Ensayos de competencia en el Octet. Unión de aCD25–a–686–m1 al rhCD25 inmovilizado seguido de aCD25–a–686–m1 nuevamente (como control) o un segundo Ab, basiliximab (A), daclizumab (B), no bloqueador de referencia, aCD25–a–075 (C) o 7G7B6 (D). Los no bloqueadores de los mAb de señal de IL–2 compiten entre sí (**C**) o con 7G7B6, un mAb no bloqueador de referencia (**D**), mientras que no compiten con los bloqueadores de señalización de IL–2 como daclizumab o basiliximab (**A** y **B**).

[85] **Figura 21:** Caracterización de anticuerpos madurados por afinidad en comparación con el control de isotipo IgG1 parental aCD25–a–686 o humano con respecto a la unión a CD25 expresada en células Karpas 299 a concentraciones crecientes de anticuerpo y en comparación con el control de

isotipo IgG1 humano. (A) aCD25–a–686m1, (B) aCD25–a–686m2, (C) aCD25–a–686m3, (D) aCD25–a–686m4, y (E) aCD25–a–686m5.

[86] **Figura 22:** Caracterización de anticuerpos madurados por afinidad en comparación con el control de isotipo IgG1 humano aCD25–a–686 parental, daclizumab–hyp, 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 PBMC de origen humano. Las células se incubaron con 10 µg/ml de anticuerpo seguido de 10 U/ml de IL–2. El análisis se limitó al porcentaje de células CD3 positivas que fosforilan STAT5.

[87] **Figura 23:** Modelo *in vivo* que muestra la supresión del crecimiento tumoral después de la dosificación de: vehículo (A) y (C); o aCD25–a–686 (B), (D) y (E).

[88] **Figura 24:** Evaluación de la actividad terapéutica de 7D4 mIgG2a, 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 hembras. 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)** se evaluaron para la comparación.

[89] **Figura 25:** Caracterización de aCD25–a–686 sin modificar en comparación con aCD25–a–686 afucosilado, control de isotipo de IgG1 humana, daclizumab, anticuerpo neutralizante de IL–2 con respecto al bloqueo de la señalización de IL–2 en un ensayo de fosforilación de STAT5 utilizando PBMC de origen humano. Las células se incubaron con 10 µg/ml de anticuerpo y 10 UI/ml de IL–2. El análisis se limitó al porcentaje de células CD3 positivas que fosforilan STAT5. Se muestra la diferencia en la mediana de la intensidad de fluorescencia de PhosphoStat5 en células T CD3+ CD8+ con y sin activación de IL–2 en dosis bajas.

[90] **Figura 26:** Caracterización de ADCC de iTreg a través de células NK activadas por IL–2 por aCD25–a–686 a–fucosilado en comparación con aCD25–a–686 sin modificar, daclizumab y el control de isotipo IgG1 humano. La afucosilación más baja de aCD25–a–686 GlyMAXX en comparación con aCD25–a–686 aumenta su potencial de ADCC y permite una actividad potente a concentraciones más bajas. La capacidad de agotar Treg se monitoreó para daclizumab, aCD25–a–686 GlyMAXX y aCD25–a–686 en un ensayo de cocultivo de células NK humanas activadas con IL–2 con iTreg inducidas *in vitro*. La muerte de iTreg se cuantificó mediante análisis por citometría de flujo después de 6 horas. Las iTreg se marcaron con el tinte fluorescente PkH–26 antes del cocultivo. Antes de la medición de FACS, las células se tiñeron utilizando el tinte LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell para excluir las células muertas del análisis. Se escalonaron las células iTreg vivas (Aqua–, PkH–26+) y se usó el porcentaje de células positivas para calcular la lisis específica. La lisis específica se representó gráficamente para las condiciones respectivas frente a la concentración de anticuerpo usada. Se midieron los duplicados. Se muestra SEM para mediciones duplicadas.

[91] **Figura 27:** Recuento de células T intratumorales mediante análisis FACS 72 horas después de la administración de aCD25–a–686 a–fucosilado (aCD25 Mab GLyMAXX), MOXRO0916 o ipilimumab a ratones NOG humanizados con células madre inyectados con células de adenocarcinoma de próstata BxPC–3 en matrigel. Se aislaron linfocitos infiltrantes del tumor y se evaluaron en cuanto a la presencia de células T mediante citometría de flujo. Los linfocitos T CD8 humanos activados vivos (huCD45+, huCD3+, huCD8+ huCTLA–4+) y Treg (huCD45+, huCD3+, huCD4+, huCD25+ huFoxP3+) se escalonaron, los recuentos normalizados (por ug de tumor) se calcularon, y los valores se representaron para los respectivos grupos de tratamiento. La gráfica de cajas y bigotes se muestra para 5 animales por grupo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE CIERTAS FORMAS DE REALIZACIÓN

[92] A continuación se proporcionan ciertas definiciones de términos, medios técnicos y formas de realización utilizadas en el presente documento, muchos o la mayoría de los cuales confirman la comprensión común de los expertos en la técnica.

[93] **Administración:** Tal como se usa en este 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 formas de realización, la administración puede ser bronquial (incluida la instilación bronquial), bucal, enteral, intraarterial, intradérmica, intragástrica, intramedular, intramuscular, intranasal, intraperitoneal, intratecal, intravenosa, intraventricular, dentro de un órgano o tejido específico (por ejemplo, intrahepática, intratumoral, peritumoral, etc.), mucosal, nasal, oral, rectal, subcutánea, sublingual, tópica, traqueal (incluida la instilación intratraqueal), transdérmica, vaginal y vítrea. La administración puede implicar la dosificación intermitente. Alternativamente, la administración puede implicar una dosificación continua (por ejemplo, perfusión) durante al menos un período de tiempo seleccionado. Tal como se sabe 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).

[94] **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. Las formas de realización específicas de agentes que pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención incluyen moléculas pequeñas, fármacos, hormonas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, aptámeros, ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNsi,

ARNsh, oligonucleótidos antisentido, ribozimas), péptidos, miméticos de péptidos, etc. Un agente puede ser o comprender un polímero.

[95] **Anticuerpo:** Tal como se usa en este 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, 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 aproximadamente agentes tetraméricos de 150 kD que comprenden dos polipéptidos de cadena pesada idénticos (de aproximadamente 50 kD cada uno) y dos polipéptidos de cadena liviana idénticos (de aproximadamente 25 kD cada uno) que se asocian entre sí en lo que comúnmente se conoce como una estructura en "Y". Cada cadena pesada se compone de al menos cuatro dominios (cada uno de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud), un dominio variable amino–terminal (VH) (ubicado en las puntas de la estructura Y), seguido de tres dominios constantes: CH1, CH2 y el CH3 carboxi–terminal (ubicado en la base del vástago 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 liviana está compuesta por dos dominios: un dominio variable amino–terminal (VL), seguido de un dominio constante carboxi–terminal (CL), separados entre sí por otro "interruptor". Los tetrámeros de anticuerpos intactos se componen de dos dímeros de cadena pesada–cadena liviana en los que las cadenas pesada y liviana 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 glicosilados, típicamente 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 "marco" algo invariantes (FR1, FR2, FR3 y FR4). Cuando los anticuerpos naturales se pliegan, las regiones FR forman las hojas beta que proporcionan el marco estructural para los dominios, y las regiones de bucle CDR de las cadenas pesada y liviana se reúnen en un espacio tridimensional para crear un único sitio de unión a 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 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 glicosilación u otra modificación que pueda mejorar la capacidad de desarrollo del anticuerpo (Jarasch A *et al*., 2015).

[96] En algunas formas de realización, los anticuerpos producidos y/o utilizados de acuerdo con la presente invención incluyen dominios Fc glicosilados, incluyendo dominios Fc con tal glicosilación modificada o modificada por ingeniería genética. Para los fines de la presente invención, en ciertas formas de realización, cualquier polipéptido o complejo de polipéptidos que incluya suficientes secuencias de dominio de inmunoglobulina tal 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 formas de realización, 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 epítopos más o menos distintos dentro de un antígeno (como los diferentes epítopos dentro del dominio extracelular de CD25 humano que están asociados a diferentes anticuerpos anti–CD25 de referencia).

[97] 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 formas de realización, un anticuerpo es monoclonal. En algunas formas de realización, un anticuerpo tiene secuencias de región constante que son características de anticuerpos de ratón, conejo, primate o humano. En algunas formas de realización, 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 formas de realización apropiadas (a menos que se indique lo contrario o esté claro en el contexto) a cualquiera de los constructos o formatos conocidos o desarrollados en la técnica para utilizar características estructurales y funcionales del anticuerpo en una presentación alternativa, por ejemplo como fragmentos de unión a antígeno, tal como se define a continuación. Por ejemplo, un anticuerpo utilizado de acuerdo con la presente invención está en un formato seleccionado, entre otros, de IgG, IgE e IgM intactos, anticuerpos bi– o multi–específicos (por ejemplo, Zybodies®, etc.), dominios variables de cadena simple (scFv), fusiones de polipéptido–Fc, Fabs, 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 constructos para obtener receptores de células T artificiales que se utilizan para injertar la especificidad de un anticuerpo monoclonal en una célula T). Un anticuerpo enmascarado puede comprender un péptido bloqueador o

"enmascarador" que se une específicamente a la superficie de unión a antígeno del anticuerpo e interfiere con la unión a antígeno del anticuerpo. El péptido enmascarado está unido al anticuerpo por un enlazador escindible (por ejemplo, por una proteasa). La escisión selectiva del enlazador 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 a antígeno en el tumor y, por lo tanto, limitando los posibles problemas de toxicidad. En algunas formas de realización, 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 útil [por ejemplo, un resto detectable, un resto terapéutico, un resto catalítico, etc.], u otro grupo pendiente [por ejemplo, polietilenglicol, etc.]).

[98] El anticuerpo anti–CD25 denominado “aCD25–a–686 afucosilado” también puede denominarse aCD25 Mab GlyMAXX. Estas diferentes designaciones usadas aquí se refieren al mismo anticuerpo.

[99] **Agente anticuerpo no bloqueador de IL–2:** Los agentes anticuerpos anti–CD25 y los fragmentos de unión a antígeno de la presente invención son agentes anticuerpos no bloqueadores de IL–2. El término "agente anticuerpo no bloqueador de IL–2" se usa en este documento para referirse a aquellos agentes anticuerpos 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 anticuerpos 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 anticuerpo anti–CD25. Preferiblemente, los agentes anticuerpos 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 anticuerpo anti–CD25.

[100] La subunidad CD25 del receptor de IL–2 también se conoce como la subunidad alfa del receptor de IL–2 y se encuentra en las células T activadas, las células T reguladoras, las células B activadas, algunos timocitos, los precursores mieloides y los 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 de consenso de CD25 humana se muestra en la Figura 2.

[101] "Unión específica", "unirse específicamente" y "se unen específicamente" significan que el anticuerpo o fragmento de unión a 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 forma de realización preferida, la constante de disociación es menor que 10^{-8} M, por ejemplo en el rango de 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o 10^{-12} M. De acuerdo con algunas formas de realización de la invención, "unión específica", "unirse específicamente" y "se unen específicamente" pueden referirse a afinidad y/o avidez. En algunas formas de realización, la afinidad de los agentes anticuerpos anti–CD25 es de 10^{-8} a 10^{-6} (por ejemplo, aproximadamente 10^{-7}). En algunas formas de realización de la invención, la avidez de los agentes anticuerpos anti–CD25 es aproximadamente de 10^{-10} a 10^{-8} (por ejemplo, aproximadamente 10^{-9}). En algunas formas de realización de la invención, la afinidad y/o la avidez de los agentes anticuerpos anti–CD25 es aproximadamente de 1 nM a 700 nM, o aproximadamente de 1 a 600 nM, o aproximadamente de 1 a 500 nM, o aproximadamente de 1 a 400 nM, o aproximadamente de 1 a 300 nM.

[102] "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 formas de realización en las que el anticuerpo anti–CD25 o el fragmento de unión a 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 formas de realización particulares de la invención, tal como se describe en el presente documento, el anticuerpo anti–CD25 o el fragmento de unión a 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 que no bloquean 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 este 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".

[103] Algunos agentes anticuerpos 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 anticuerpos no están dentro del alcance de la presente invención. En cambio, los agentes anticuerpos 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 anticuerpo anti–CD25.

[104] 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 anticuerpo anti–CD25 puede ocurrir bajo las mismas o sustancialmente las mismas condiciones.

[105] En algunas formas de realización, 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 PMBC en presencia del anticuerpo anti–CD25 a una concentración de 10 ug/ml durante 30 minutos y luego agregar 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 para 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 x [(% de células $Stat5^+$ grupo sin anticuerpo – % de células $Stat5^+$ grupo de 10 ug/ml de anticuerpo) / (% de células $Stat5^+$ grupo sin Ab)].

[106] En algunas formas de realización, los agentes anticuerpos anti–CD25 como se describen en el presente documento se caracterizan porque agotan eficientemente las células T reguladoras infiltrantes del tumor, en particular dentro de los tumores.

[107] En algunas formas de realización, los agentes anticuerpos anti–CD25 se caracterizan porque se unen al receptor Fcy con alta afinidad, preferiblemente al menos un receptor Fcy activante con alta afinidad. Preferiblemente, el anticuerpo se une a al menos un receptor Fcy activante 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 formas de realización, los agentes anticuerpos anti–CD25 se caracterizan por otras características relacionadas con los receptores Fcγ, en particular:

(a) se unen a los receptores Fcγ con una relación activante a inhibitoria (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.

[108] En algunas formas de realización, el agente anticuerpo anti–CD25 es un anticuerpo IgG1, preferiblemente un anticuerpo IgG1 humano, que es capaz de

unirse a al menos un receptor activante de Fc. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a uno o más receptores seleccionados de FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIa y FcγRIIIb. En algunas formas de realización, el anticuerpo es capaz de unirse a FcγRIIIa. En algunas formas de realización, el anticuerpo es capaz de unirse a FcγRIIIa y FcγRIIa y opcionalmente a FcγRI. En algunas formas de realización, 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 formas de realización, el anticuerpo se une a un receptor inhibitorio, 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.

[109] En algunas formas de realización, los agentes anticuerpos 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 inmunes o células tumorales (por ejemplo, en cada caso, que expresan CD25 en su superficie). En algunas formas de realización, un agente anticuerpo anti–CD25 se caracteriza por una actividad (por ejemplo, nivel y/o tipo) razonablemente comparable con la de aCD25–a–686 con respecto a las células inmunes (por ejemplo, cuando se ponen en contacto con células inmunes, y particularmente con células inmunes que expresan CD25) y células tumorales. En algunas formas de realización, una actividad relevante es o comprende el agotamiento de células 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 células T, células B o células NK), sesgo del repertorio de células T, etc., y combinaciones de los mismos. En algunas formas de realización, 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 comparables en ausencia de la entidad o el resto. Alternativamente, o adicionalmente, en algunas formas de realización, un nivel y/o actividad incrementados son comparables o mayores que los observados en condiciones comparables cuando está presente un agente anticuerpo anti–CD25 de referencia (por ejemplo, un anticuerpo anti–CD25 de referencia apropiado, que en muchas formas de realización es un anticuerpo CD25 que bloquea la unión de IL–2 a CD25, como daclizumab o basiliximab). En muchas formas de realización, un agente anticuerpo anti–CD25 para usar de acuerdo con la presente descripción es o comprende una entidad o resto que se une, directa o indirectamente, a CD25, típicamente a su dominio extracelular. En algunas formas de realización, un agente anticuerpo anti–CD25 es, comprende, o compite por unirse a CD25 con un anticuerpo anti–CD25 como se ejemplifica en el presente documento, un fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, que comprende una o más CDR, todas las CDR de cadena pesada, todas las CDR de cadena liviana, todas las CDR, una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena liviana, o ambas regiones variables de cadena pesada y liviana), una variante madurada por afinidad del mismo (o un fragmento de unión a 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 formas de realización, un agente 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, elaboración, pruebas preclínicas y/o para identificar epítopos relevantes dentro de CD25 humano, tales como la secuencia identificada como aCD25ep–a, aCD25ep–b y/o aCD25ep–c (por ejemplo aCD25ep–b y/o aCD25ep–c), y/o para la formulación, administración y/o eficacia en contextos particulares (por ejemplo, para la terapia del cáncer), como se describe en este documento.

[110] **Antígeno:** El término "antígeno", tal como se usa en este documento, se refiere a un agente que provoca una respuesta inmune y/o que se une a un receptor de células T (por ejemplo, cuando es presentado por una molécula MHC) y/o receptor de células 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 de CD25, puede usarse para seleccionar bibliotecas de anticuerpos e identificar secuencias de anticuerpos candidatas para caracterizarse adicionalmente.

[111] **Fragmento de unión a antígeno:** Tal como se usa en este documento, el término "fragmento de unión a antígeno" abarca agentes que incluyen o comprenden una o más porciones de un anticuerpo como se describe en este documento, suficientes como para conferir al fragmento de unión a antígeno la capacidad de unirse específicamente al antígeno apuntado por el anticuerpo. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el término abarca cualquier polipéptido o complejo de polipéptidos que incluye elementos estructurales de inmunoglobulina suficientes para conferir una unión específica. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen, entre otros, inmunofarmacéuticos modulares pequeños ("SMIPsTM"), 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 DARPINs®, Avimers®, un DART, un anticuerpo similar a TCR, Adnectins®, Affilins®, Trans–bodies®, Affibodies®, un TrimerX®, microproteínas, Centyrins®, cuerpos de CoVX, péptidos bicíclicos, constructos de anticuerpos derivados del dominio Kunitz, o cualquier otro fragmento de anticuerpo, siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada. En algunas formas de realización, el término abarca otras estructuras de proteínas tales como péptidos engrampados, peptidomiméticos de unión tipo anticuerpo, proteínas de andamiaje de unión a anticuerpo, monocuerpos y/u otra estructura

de proteínas no anticuerpos, por ejemplo como se revisa en la literatura (Vazquez– Lombardi R *et al*., 2015). En algunas formas de realización, un fragmento de unión a 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 algunas formas de realización, un fragmento de unión a 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 liviana) 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 aCD25–a–686), y en particular al menos una CDR de cadena pesada, tal como una HCDR3 (por ejemplo, una secuencia aCD25–686–HCDR3). En algunas formas de realización, un fragmento de unión a 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 liviana) 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 una CDR de referencia, mientras mantiene la unión al objetivo del anticuerpo (por ejemplo, aCD25–a–686) del cual se derivó la CDR de referencia. En algunas formas de realización, un fragmento de unión a antígeno es o comprende un polipéptido o complejo del mismo que incluye las tres CDR (o, en algunas formas de realización, secuencias sustancialmente idénticas al mismo) de una cadena pesada o liviana de un anticuerpo de referencia (por ejemplo, de aCD25–a–686); en algunas formas de realización, un fragmento de unión a antígeno es o comprende un polipéptido o complejo del mismo que incluye las seis CDR (o, en algunas formas de realización, secuencias sustancialmente idénticas al mismo) de un anticuerpo de referencia (por

ejemplo, de aCD25–a–686). En algunas formas de realización, un fragmento de unión a antígeno es o comprende un polipéptido o complejo del mismo que incluye los dominios variables de cadena pesada y/o liviana (o, en algunas formas de realización, secuencias sustancialmente idénticas al mismo) de un anticuerpo de referencia (por ejemplo, de aCD25–a–686). En algunas formas de realización, el término "fragmento de unión a antígeno" abarca estructuras no peptídicas y no proteicas, 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 un objetivo particular, como un polipéptido. Los aptámeros son oligonucleótidos monocatenarios sintéticos cortos que se unen específicamente a diversos blancos moleculares, 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 otros blancos 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 *biopanning* conocido como SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment* – Evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) (ver, por ejemplo, Ellington *et al*, 1990; Tuerk *et al*, 1990; Ni *et al*, 2011). Los métodos para generar un aptámero para cualquier blanco dado son bien conocidos en la técnica. Se incluyen también aptámeros peptídicos que incluyen afímeros. Un afímero es una proteína pequeña, altamente estable, diseñada 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 inhibidores de la cisteína proteasa. Las proteínas Affimer se componen de un andamio, que es una proteína estable basada en el pliegue de la proteína cistatina. Muestran dos

bucles peptídicos y una secuencia N–terminal 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 proteico 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.

[112] **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, como un animal o un humano. La muestra biológica puede comprender tejido o fluido biológico.

[113] **Cáncer:** Los términos "cáncer", "malignidad", "neoplasia", "tumor" y "carcinoma" se usan de manera indistinta en este documento para referirse a células que exhiben un crecimiento relativamente anormal, no controlado y/o autónomo, de modo que exhiben 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 cualquiera y todos los cánceres. Para dar solo algunos ejemplos no limitativos, en algunas formas de realización, 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 Hodgkin), mielomas y trastornos mieloproliferativos; sarcomas, melanomas, adenomas, carcinomas de tejido sólido, carcinomas de células escamosas de boca, garganta, laringe y pulmón, cáncer de hígado, cánceres genitourinarios como cáncer de próstata, cérvix, vejiga, útero, 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 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, entre otros, linfomas, como linfomas de Hodgkin y leucemias linfocíticas, como la leucemia linfocítica crónica (CLL).

[114] **Terapia de combinación:** Tal como se usa en este documento, el término "terapia de combinación" se refiere a aquellas situaciones en las que un sujeto está expuesto simultáneamente a dos o más regímenes terapéuticos (por ejemplo, dos o más agentes terapéuticos). En algunas formas de realización, dos o más agentes pueden administrarse simultáneamente. Alternativamente, tales agentes pueden administrarse secuencialmente; de lo contrario, dichos agentes se administran en regímenes de dosificación superpuestos.

[115] **Comparable:** Tal como se usa en este 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 las conclusiones puedan ser razonablemente basadas en las diferencias o similitudes observadas. Estos 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.

[116] **Comprende:** Una composición o método descrito en este documento como "que comprende" uno o más elementos o pasos nombrados es abierto, lo que significa que los elementos o pasos nombrados son esenciales, pero otros elementos o pasos pueden agregarse dentro del alcance de la composición o método. También se entiende que cualquier composición o método descrito como "que comprende" (o "comprende") uno o más elementos o pasos nombrados también describe la correspondiente composición o método más limitada "que consiste esencialmente en" (o "consiste esencialmente en") los mismos elementos o pasos nombrados, lo que significa que la composición o el método incluyen los elementos o pasos esenciales nombrados y también pueden incluir elementos o pasos adicionales que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la composición o método.

[117] **Agotado:** Tal como se usa en este documento, las referencias a "agotado" o "agotamiento" (con respecto al agotamiento de células T reguladoras por un agente 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 formas de realización particulares de la invención como se describe en este documento, más del 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 99% de las células T reguladoras infiltrantes del tumor están agotadas.

[118] **Forma de dosificación:** Tal como se usa en este documento, el término "forma de dosificación" 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 formas de realización, dicha cantidad es una cantidad de dosis unitaria (o una fracción completa de la misma) apropiada para la administración de acuerdo con un régimen de dosificación que se ha

determinado que se correlaciona con un resultado deseado o beneficioso cuando se administra a una población relevante (es decir, con un régimen de dosificación 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 dosificación.

[119] **Régimen de dosificación:** Tal como se usa en este documento, el término "régimen de dosificación" se refiere a un conjunto de dosis unitarias (típicamente más de una) que se administran individualmente a un sujeto, típicamente separadas por períodos de tiempo. En algunas formas de realización, un agente terapéutico dado tiene un régimen de dosificación recomendado, que puede implicar una o más dosis. En algunas formas de realización, un régimen de dosificación comprende una pluralidad de dosis, cada una de las cuales está separada una de otra por un período de tiempo de la misma longitud. Alternativamente, un régimen de dosificación comprende una pluralidad de dosis y al menos dos períodos de tiempo diferentes que separan las dosis individuales. En algunas formas de realización, todas las dosis dentro de un régimen de dosificación son de la misma dosis unitaria. Alternativamente, diferentes dosis dentro de un régimen de dosificación son de diferentes cantidades. En algunas formas de realización, un régimen de dosificación comprende una primera dosis en una primera cantidad dosis, seguida de una o más dosis adicionales en una segunda cantidad de dosis diferente de la primera cantidad de dosis. Un régimen de dosificación 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 formas de realización, un régimen de dosificación se correlaciona con un resultado deseado o beneficioso cuando se administra a una población relevante (es decir, es un régimen de dosificación terapéutica).

[120] **Epítopo:** Tal como se usa en este documento, el término "epítopo" se refiere a una porción de un antígeno que está unido por un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En algunas formas de realización, cuando el antígeno es un polipéptido, un epítopo es conformacional en el sentido de que está compuesto de 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 epítopos conformacionales son aquellos que comprenden residuos de aminoácidos que no son contiguos en el dominio extracelular de CD25; los epítopos lineales son aquellos compuestos de residuos de aminoácidos que son contiguos en el dominio extracelular de CD25. En algunas formas de realización, los epítopos utilizados de acuerdo con la presente invención se proporcionan por medio de referencia a aquellos unidos a los agentes anticuerpos anti–CD25 proporcionados en este documento (por ejemplo, por aCD25–a–686 y definidos como aCD25ep–a, aCD25ep–b y/o aCD25ep–c [por ejemplo aCD25ep–b y/o aCD25ep–c]). Los medios para determinar la secuencia exacta y/o particularmente los residuos de aminoácidos del epítopo para aCD25–a–686 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 fagos, tecnologías de presentación de levadura o técnicas de (co)cristalografía.

[121] **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 polipéptidos o secuencias de 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, entre otros, 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 resulta en 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 x 100). En general, las referencias al % de identidad en este documento se refieren al % de identidad a lo largo de toda la molécula, a menos que el contexto especifique o implique lo contrario.

[122] **Célula efectora inmune:** Una célula efectora inmune se refiere a una célula inmune que está involucrada en la fase efectora de una respuesta inmune. Las células inmunes ejemplares incluyen una célula de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (por ejemplo, células B y células T que incluyen células T citolíticas (CTL)), células asesinas, células asesinas naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleares, granulocitos, mastocitos y basófilos.

[123] Las células efectoras inmunes involucradas en la fase efectora de una respuesta inmune pueden expresar receptores Fc específicos y llevar a cabo funciones inmunes 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 inmunológico, o en la unión a células que presentan antígenos. Como se discutió, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden optimizarse para la capacidad de inducir ADCC y/o ADCP.

[124] **Células T reguladoras:** Tal como se usa en este documento, "células T reguladoras" ("Treg", "células Treg" o "Tregs") se refieren a un linaje de linfocitos T CD4 + especializados en el control de la autoinmunidad, alergia e infección. Por lo general, regulan las actividades de las poblaciones de células T, pero también pueden influir en ciertos tipos de células del sistema inmunológico innato. Las Treg se suelen identificar por la expresión de los biomarcadores CD4, CD25 y Foxp3, y la baja expresión de CD127. Las células Treg de origen natural constituyen normalmente alrededor del 5–10% de los linfocitos T CD4+ periféricos. Sin embargo, dentro de un microambiente tumoral (es decir, células Treg que se infiltran en el tumor), pueden constituir hasta un 20–30% de la población total de linfocitos T CD4+.

[125] Las células Treg humanas activadas pueden matar directamente a las células diana, como las células T efectoras y las APC, a través de vías dependientes de perforina o granzima B; las células Treg de antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA4 +) inducen la expresión de indoleamina 2,3–dioxigenasa (IDO) por las APC, y estas a su vez suprimen la activación de las células T al reducir el triptófano; las células Treg pueden liberar interleucina–10 (IL–10) y factor de crecimiento transformante (TGFβ) *in*

vivo, y por lo tanto inhibir directamente la activación de las células T y suprimir la función de APC al inhibir la expresión de moléculas MHC, CD80, CD86 e IL–12. Las células 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 las células T efectoras.

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

[127] **Farmacéuticamente aceptable**: Tal como se usa en este documento, el término "farmacéuticamente aceptable" aplicado al vehículo, diluyente o excipiente usado para formular una composición como se describe aquí significa que el vehículo, diluyente o excipiente debe ser compatible con los otros ingredientes de la composición y no es perjudicial para el destinatario del mismo.

[128] **Composición farmacéutica**: Tal como se usa en este 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 formas de realización, el agente activo está presente

en una dosis unitaria apropiada para la administración en un régimen terapéutico que muestra una probabilidad estadísticamente significativa de lograr un efecto terapéutico predeterminado cuando se administra a una población relevante. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para la administración en forma sólida o líquida, incluidas las adaptadas para lo siguiente: administración oral, por ejemplo, empapados (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos, por ejemplo, aquellos destinados a la administración bucal, sublingual, y absorción sistémica, bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación a la lengua; administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa, intratumoral o epidural como solución o suspensión estéril, o formulación de liberación sostenida; aplicación tópica, por ejemplo, como crema, ungüento o parche o aerosol de liberación controlada aplicado a la piel, los pulmones o la cavidad oral; por vía intravaginal, intrarrectal, sublingual, ocular, transdérmica, nasal, pulmonar y otras mucosas.

[129] **Tumor sólido**: Tal como se usa en este 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 mesenquimático en tejidos tales como hueso esponjoso, cartílago, grasa, músculo, vascular, hematopoyético o tejidos conectivos 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.

[130] **Cantidad terapéuticamente efectiva**: Tal como se usa en este documento, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" 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 de acuerdo con un régimen de dosificación 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 exitoso en un sujeto particular.

[131] **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 anticuerpo anti–CD25 proporcionado, como se ejemplifica por aCD25–a–686, 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 formas de realización, el tratamiento puede implicar la administración directa de un agente anticuerpo anti–CD25 como el aCD25–a–686 (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 mediante un régimen 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 anticuerpo anti–CD25 como el aCD25–a–686 *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).

[132] **Dosificación y administración**. Las composiciones farmacéuticas que comprenden un agente anticuerpo anti–CD25 como se describe en el presente documento (por ejemplo, un anti–CD25 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, por ejemplo que comprende la secuencia de aminoácidos aCD25–a–686– HCDR3) para uso de acuerdo con la presente invención, pueden ser preparado para el almacenamiento y/o entrega utilizando cualquiera de una variedad de técnicas y/o tecnologías conocidas y/o disponibles para los expertos en la materia. En algunas formas de realización, un agente anticuerpo anti–CD25 proporcionado se administra de acuerdo con un régimen de dosificación aprobado por una autoridad reguladora como la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) y/o la Agencia Europea de Medicamentos (EMEA), por ejemplo, para la indicación pertinente. En algunas formas de realización, un agente anticuerpo anti–CD25 proporcionado se administra en combinación con uno o más agentes o terapias, que pueden administrarse de acuerdo con un régimen de dosificación aprobado por una autoridad reguladora como la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) y/o la Agencia Europea de Medicamentos (EMEA), por ejemplo, para la indicación correspondiente. Sin embargo, en algunas formas de realización, el uso de un Agente anticuerpo anti–CD25 proporcionado puede permitir una dosificación reducida (por ejemplo, una menor cantidad de agente activo en una o más dosis, un número menor de dosis y/o una frecuencia de dosis reducida) de un agente o terapia aprobado utilizado en combinación con la terapia con agentes anticuerpos anti–CD25. En algunas formas de realización, 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 anticuerpo anti–CD25 (por ejemplo, modificado como

un inmunoconjugado, un anticuerpo de dominio único o un anticuerpo biespecífico).

[133] Además, en algunas formas de realización, puede ser deseable adaptar los regímenes de dosificación y, en particular, diseñar regímenes de dosificación secuencial, en función de los niveles de expresión de umbral y/o 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 estas formas de realización, los regímenes de dosificación terapéutica se pueden combinar o ajustar a la luz de los métodos de detección que evalúan la expresión de uno o más marcadores inducibles u otros criterios antes y/o durante la terapia.

[134] En algunas formas de realización, la dosificación y la administración de acuerdo con 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 dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. Una forma preferida puede depender del modo de administración deseado y/o la aplicación terapéutica, típicamente en forma de soluciones inyectables o infundibles, tales como composiciones similares a las usadas para tratar sujetos humanos con anticuerpos.

[135] En algunas formas de realización, los ingredientes pueden prepararse con portadores que protegen el agente contra la liberación y/o degradación rápida, como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, 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 utilizando composiciones farmacéuticas y regímenes de dosificación que son consistentes con una buena práctica médica y apropiados para el agente relevante (por ejemplo, para agentes 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, mucosal, por inhalación, tópica, bucal, nasal, rectal o parenteral (por ejemplo, infusión intravenosa, intratumoral, intranodal, administración 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 violación).

[136] En algunas formas de realización, un régimen de dosificación 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 fluidos de interés en el sujeto. En algunas formas de realización, diferentes agentes administrados en combinación pueden administrarse a través de diferentes rutas de administración y/o de acuerdo con diferentes cronogramas. Alternativamente, o adicionalmente, en algunas formas de realización, una o más dosis de un primer agente activo se administran sustancialmente simultáneamente, y en algunas formas de realización a través de una vía común y/o como parte de una composición única con uno o más agentes activos.

[137] Los factores que deben considerarse al optimizar las vías y/o el cronograma de dosificación para un régimen terapéutico dado pueden incluir, por ejemplo, el cáncer particular que se está tratando (por ejemplo, tipo, etapa, ubicación, etc.), la condición 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.

[138] Los expertos en la materia 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 ubicación 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 formas de realización, una o más características de una composición farmacéutica particular y/o de un régimen de dosificación utilizado pueden modificarse con el tiempo (por ejemplo, aumentando o disminuyendo la cantidad de agente 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 anticuerpo anti–CD25 como se describe aquí). En general, el tipo, la cantidad y la frecuencia de dosificación de los agentes activos de acuerdo con la presente invención se rigen por los requisitos de seguridad y eficacia que se aplican cuando el agente relevante se administra a un mamífero, preferiblemente un ser humano. En general, tales características de la dosificación se seleccionan para proporcionar una respuesta terapéutica particular y típicamente detectable en comparación con lo que se observa en ausencia de terapia. En el contexto de la presente invención, una respuesta terapéutica deseable ejemplar puede implicar, pero sin limitaciones, inhibición y/o disminución del crecimiento del tumor, tamaño del tumor, metástasis, uno o más de los síntomas y efectos secundarios asociados 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 describen en la literatura. Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente eficaz de agentes anticuerpos 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.

[139] Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente anticuerpo anti–CD25 como agente activo o composición que comprende dicho agente puede determinarse fácilmente usando técnicas disponibles en el arte, que incluyen, por ejemplo, considerar uno o más factores como la enfermedad o afección que se trata, la etapa 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.

[140] En algunas formas de realización, la cantidad terapéuticamente eficaz es una dosis efectiva (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 formas de realización, tales directrices pueden ajustarse al peso molecular del agente activo. La dosificación también puede variar según la vía de administración, el ciclo de tratamiento o, en consecuencia, el protocolo de escalación 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 a antígeno del mismo que comprende la secuencia de aminoácidos de aCD25–a–686–HCDR3 a dosis crecientes.

[141] Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de elaboración y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el anticuerpo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes 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 ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos para preparar soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y el secado por congelación que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución filtrada previamente estéril. La fluidez adecuada de una solución 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 surfactantes. 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.

[142] 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, como en ampollas o en recipientes de dosis múltiples que contienen un conservante. Las formulaciones para administración parenteral incluyen, pero sin limitaciones,

suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, pastas y formulaciones implantables de liberación sostenida o biodegradables como se discute aquí. Las formulaciones inyectables estériles pueden prepararse usando un diluyente o solvente no tóxico parenteralmente aceptable, como agua o 1,3 butanodiol. Otras formulaciones administrables por vía parenteral que son útiles incluyen aquellas que comprenden el ingrediente activo en forma microcristalina, en una preparación liposomal, 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.

[143] Cada composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la presente invención puede incluir agentes dispersantes farmacéuticamente aceptables, agentes humectantes, agentes de suspensión, agentes isotónicos, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, vehículos, excipientes, sales o estabilizantes no tóxicos para los sujetos en las dosis y concentraciones empleadas. Una lista no exhaustiva de tales compuestos farmacéuticamente aceptables adicionales incluye tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo 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, teoclato, 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); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, 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 carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal, como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína Zn); y/o surfactantes no iónicos como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

[144] En algunas formas de realización, cuando se utilizan dos o más agentes activos de acuerdo con la presente invención, tales agentes pueden administrarse simultánea o secuencialmente. En algunas formas de realización, la administración de un agente está programada específicamente en relación con la administración de otro agente. En algunas formas de realización, los regímenes de dosificación relativa deseados para agentes administrados en combinación pueden evaluarse o determinarse empíricamente, por ejemplo, utilizando modelos *ex vivo, in vivo* y/o *in vitro*; en algunas formas de realización, dicha evaluación o determinación empírica se realiza *in vivo*, en un paciente particular o en una población de pacientes (por ejemplo, de modo que se realiza una correlación).

[145] En algunas formas de realización, uno o más agentes activos utilizados en la práctica de la presente invención se administran de acuerdo con un régimen de dosificación intermitente que comprende al menos dos ciclos. Cuando se administran dos o más agentes en combinación, y cada uno de ellos mediante un régimen de ciclos intermitente de este tipo, se pueden interdigitar entre sí dosis individuales de diferentes agentes. En algunas formas de realización, se administra una o más dosis del segundo agente un período de tiempo después de una dosis de un agente anticuerpo anti–CD25 como se describe en el presente documento. En algunas formas de realización, cada dosis del segundo agente se administra un período de tiempo después de una dosis de agente anticuerpo anti–CD25 como se describe en el presente

documento. En algunas formas de realización, se administra una o más dosis del segundo agente un período de tiempo antes de una dosis de un agente anticuerpo anti–CD25. En algunas formas de realización, un agente anticuerpo anti–CD25 como se describe en el presente documento también se puede administrar en regímenes que involucran no solo la administración subsiguiente por la misma vía sino también por vías de administración alternativas, como la administración subcutánea (o intramuscular) y la administración intratumoral, dentro de uno o más ciclos de tratamiento durante una, dos, cuatro o más semanas, repitiendo dicho ciclo con el mismo régimen (o extendiendo el intervalo entre administraciones), dependiendo de las respuestas del paciente. Además, en algunas formas de realización, el régimen preciso seguido (por ejemplo, número de dosis, espaciamiento de las dosis (por ejemplo, en relación con la otra o con otro evento 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.

[146] Al utilizar cualquiera de las vías de administración, dosis y/o regímenes como se describe en el presente documento, un agente anticuerpo anti–CD25 como se describe en este documento se puede identificar, caracterizar y/o validar, por ejemplo, teniendo en cuenta uno o más criterios que se miden en los pacientes mediante biopsias, muestras de sangre y otros criterios clínicos. En algunas formas de realización, como una alternativa o además de la evaluación directa del tamaño del tumor y/o la metástasis, la eficacia terapéutica de un agente anticuerpo anti–CD25 como se describe aquí se puede determinar en métodos en los que se evalúan uno o más criterios generales diferentes: disminución de células T reguladoras en circulación, tumores y/o órganos linfoides, citotoxicidad directa en células cancerosas (apoptosis y necrosis de células cancerosas), aumento de infiltración tumoral, células inmunes (como células T infiltrantes del tumor CD4–positivas y/o CD8–positivas), aumento de las células inmunitarias que circulan en la sangre

(poblaciones totales o subpoblaciones específicas de linfocitos, células NK, monocitos, células dendríticas, macrófagos, células B, etc.) y/o que presentan alguna expresión diferencial pre y post–tratamiento solo en pacientes que respondieron o no respondieron (según lo determinado por secuenciación de ARN, citometría de flujo de masa y/u otro enfoque de secuenciación de masa). Alternativamente, o adicionalmente, en algunas formas de realización, dicha identificación, caracterización y/o validación puede implicar el seguimiento a nivel molecular mediante la detección de ARNm y/o expresión de proteínas de una o más proteínas o conjuntos de proteínas específicas. En algunas formas de realización, una o más de tales técnicas pueden permitir la identificación o información relevante para evaluar la respuesta a un agente anticuerpo anti–CD25 como se describe aquí, 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.

[147] Dichos enfoques y datos inmunológicos o biológicos pueden permitir la determinación no solo de uno o más parámetros o características de eficacia y/o seguridad, sino que, en algunas formas de realización, pueden proporcionar una justificación para elegir una dosis, una vía o un régimen de dosificación particulares, por ejemplo que se pueden utilizar en uno o más ensayos clínicos para una indicación dada, solo y/o en combinación con otros medicamentos, protocolos de atención estándar o inmunoterapias que pueden proporcionar beneficios terapéuticos adicionales. Por lo tanto, en una serie de formas de realización adicionales de la invención, se utiliza un agente anticuerpo anti–CD25 como se describe en el presente documento en un método para tratar a un paciente que padece una enfermedad (como el cáncer) o para prevenir una enfermedad (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 (como un tumor, una muestra de sangre o una fracción de sangre), post o pretratamiento con tal formulación.

Tales métodos pueden permitir, por lo tanto, definir uno o más biomarcadores, o una firma de expresión génica más compleja (o distribución de la población celular) que esté asociada a la cantidad terapéuticamente eficaz de un agente anticuerpo anti–CD25 deseable, el biomarcador terapéuticamente relevante que predice que un sujeto puede tener una respuesta antitumoral o antiinfecciosa después del tratamiento con un agente anticuerpo anti–CD25 como se describe aquí, o el biomarcador terapéuticamente relevante que predice que un sujeto puede responder al tratamiento con un compuesto después del tratamiento con un agente anticuerpo anti–CD25.

[148] Alternativa o adicionalmente, en algunas formas de realización, la dosificación y administración de un agente anticuerpo anti–CD25 particular como se describe 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 (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, mamas, ovarios, próstata y testículos) para identificar la relación entre la expresión de CD25 en varias subpoblaciones inmunes y no inmunes y/o su relación con medidas de infiltrado celular y/o marcadores de cáncer relevantes asociados con subgrupos de células cancerosas o células inmunes (como Foxp3 y PD–1 / PD–L1). La expresión de CD25 se puede limitar (o no) a subconjuntos inmunitarios en el tejido tumoral (como en las células 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

sugiere usos apropiados de agentes anticuerpos 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.

[149] Artículos de Fabricación y kits: En algunas formas de realización de la invención, se proporciona un agente anticuerpo anti–CD25 como se describe en este documento en un artículo de fabricación separado. En algunas formas de realización de la invención, un artículo de fabricación que contiene un agente anticuerpo anti–CD25 se proporciona en o con un recipiente con una etiqueta. Los recipientes adecuados pueden incluir, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. En algunas formas de realización, un recipiente puede formarse a partir de cualquiera o una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. En algunas formas de realización, un recipiente contiene una composición que es efectiva para tratar una enfermedad, trastorno o afección particular, o etapa o tipo de la misma. En algunas formas de realización, un recipiente puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Por ejemplo, en algunas formas de realización, una composición que comprende un agente 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 envase indica que la composición se utiliza para tratar la condición de elección.

[150] En algunas formas de realización, un artículo de fabricación puede comprender además un contenedor separado que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución 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 e insertos de

paquetes con instrucciones de uso. Por ejemplo, en algunas formas de realización, un artículo de fabricación puede permitir proporcionar cada uno o el agente en una formulación intravenosa como una solución 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.

[151] En algunas formas de realización, un agente 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 solución acuosa apropiada que se proporcione o no con los kits, u otros tipos de unidad de dosis utilizando cualquier portador farmacéutico compatible. Se pueden proporcionar una o más formas de dosificación unitaria de un agente anticuerpo anti–CD25 en un paquete o dispositivo dispensador. Un paquete o dispositivo de este tipo puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o plástico, como un envase tipo blister. Para utilizar correctamente tales kits de partes, puede incluir además tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos de paquetes con instrucciones para el uso en el tratamiento del cáncer.

[152] En algunas formas de realización, 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 utilizar para informar sobre el uso correcto y/o el monitoreo 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

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

<u>Materiales y métodos</u>

[154] *Preparación de antígeno CD25*

Se adquirieron CD25–HIS de ratón, CD25–Fc humano y proteínas recombinantes sin etiquetar de R&D Systems Biotechne. Las proteínas recombinantes de mono Cynomolgus CD25–Fc y CD25–HIS se adquirieron de Sino Biological. La biotinilación de los reactivos de proteínas se realizó con el kit de biotinilación de sulfo–NHS EZ–Link, Thermo Scientific, nº 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 biotinilación de relación molar 1: 7.5 (kit de biotinilación sulfo–NHS EZ–Link, Thermo Scientific, nº 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 solución. La biotinilación se confirmó a través de la unión del sensor de estreptavidina de las proteínas marcadas en un ForteBio.

[155] *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 naïve cada una de ~10^9 de diversidad como se describió anteriormente (ver, por ejemplo: Xu *et al*, 2013; WO2009036379; WO2010105256; WO2012009568). Se realizaron ocho selecciones paralelas, utilizando las ocho bibliotecas naïve para las selecciones de CD25 humano monomérico.

[156] Para las dos primeras rondas de selección, se realizó una técnica de clasificación de cuentas magnéticas utilizando el sistema de Miltenyi MAC, esencialmente como se describe (Siegel *et al*.2004). Brevemente, las células de levadura (~10^{10} células / biblioteca) se incubaron 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 500 µl de microesferas de estreptavidina (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Cat. # 130–048–101) se agregaron 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 (Milteni Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania. 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.

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

[158] Para la primera ronda de selección de FACS, aproximadamente 4×10^7 de levadura se sedimentaron, 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 de antígeno CD25 de ratón monomérico biotinilado durante 15 minutos a 30 ˚C. Las levaduras luego se lavaron dos veces y se tiñeron con $F(ab')_2$ kappa–FITC antihumano de cabra diluido 1: 100 (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, Nº de cat. 2062–02) y con estreptavidina–Alexa Fluor 633 (Life Technologies, Grand Island, NY, Nº de cat. S21375) diluida 1: 500, o extravidina–ficoertirina (Sigma–Aldrich, St. Louis, 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 colador. La clasificación se realizó utilizando un clasificador FACS ARIA (BD Biosciences) y se determinaron las puertas 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 para determinar la unión de CD25 humana

para aumentar o identificar los aglutinantes de reactividad cruzada en la tercera ronda de FACS (que se describe a continuación).

[159] La segunda y tercera ronda de FACS para las poblaciones seleccionadas humanas incluyeron clasificaciones positivas para aglutinantes CD25 o 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 una ordenación negativa o viceversa, para enriquecer una población de unión completa con una cantidad limitada de unión poliespecífica. Se colocó en placa y se secuenció una muestra de la salida de las tres selecciones de la ronda.

[160] La cuarta ronda de FACS consistió predominantemente en una selección positiva utilizando 10 nM de CD25 de mono cynomolgus dimérico biotinilado como antígeno. Una muestra de estas selecciones se colocaron en placas y se secuenciaron, de manera similar a la realizada con la salida de la selección de la tercera ronda.

[161] *Maduración por afinidad de clones identificados en selecciones naïve*

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

[162] Posteriormente a las selecciones de cuentas de MAC, se realizaron tres rondas de clasificación FACS. La primera de estas rondas utilizó CD25 humano monomérico a 100 nM, CD25 de mono cynomolgus 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 utilizando 100 o 10 nM de CD25 murino.

[163] 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 naïve (descrita anteriormente) con contenedores conocidos en CD25 humano para seleccionar anticuerpos que compitieron o no con ese recipiente) con CD25 humano dimérico biotinilado 10 nM durante 30 minutos antes de la incubación con levadura durante 30 minutos.

[164] Las colonias individuales de cada ronda de selección de FACS descritas anteriormente se colocaron en placas y se seleccionaron para la caracterización de la secuenciación.

[165] *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 ºC con agitación. Después de la inducción, las células de levadura se sedimentaron y los sobrenadantes se recogieron para purificación. Las IgG se purificaron utilizando 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, Cat. # 1943200250).

[166] *Producción de una IgG1 humana aCD25–a–686 a–fucosilada expresada en células de mamíferos:*

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) utilizando técnicas de clonación convencionales (no basadas en PCR). El ADNc de la enzima PIB–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 en base a la cromatografía de intercambio

aniónico. Evitria utiliza células CHO K1 adaptadas a la suspensión (recibidas originalmente de ATCC y adaptadas al crecimiento libre de 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 de Evitria. Las células se cultivaron después de la transfección en eviMake2, un medio libre de suero y componente animal. El sobrenadante se recogió mediante centrifugación y posterior filtración (filtro de 0.2 µm). El anticuerpo se purificó utilizando MabSelect™ SuRe™. El patrón de glicosilación de los anticuerpos se caracterizó utilizando LC / MS y mostró > 99% de a–fucosilación.

[167] *Mediciones de afinidad de anticuerpos anti–CD25*:

Las mediciones de afinidad de ForteBio se realizaron midiendo la KD en el Octet Red96 como se describió anteriormente (ver, por ejemplo, Estep *et al*, (2013)). Los sensores se equilibraron fuera de línea en el tampón de ensayo durante 10 minutos y luego se controlaron en línea durante 60 segundos para el establecimiento de la línea de base. Se cargaron 32 nM de IgG en línea en sensores AHC durante 5 min. Luego, las diluciones en serie 1: 3 (de 1 uM a 4 nM) del CD25 humano HIS etiquetado con HOM recombinante se asociaron a la IgG cargada durante 10 min. Posteriormente, se transfirieron al tampón de ensayo durante 6,6 min para la medición de la tasa de desconexión. Los datos de cinética se ajustaron usando un modelo de enlace global 1: 1 en el software de análisis de datos Forte Bio 9.0 con resta de referencia (ver Figura 5A).

[168] La afinidad por los anticuerpos anti CD25 humanos también se determinó midiendo su KD por SPR en un Biacore 2000 (ver Figura 5B) utilizando un chip de sensor CM–5 con una temperatura ambiente de experimento de 25 °C. El anticuerpo antihumano se inmovilizó inicialmente a través de todas las células de flujo en el tampón de análisis (pH 7.4, HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween 20 al 0.05%) a una RU de entre 12.000 y 14.000 durante 10

minutos. El ligando (artículos de ensayo de anticuerpos) se cargó subsiguientemente a un nivel de captura entre 145–190RU. El analito (CD25 humano recombinante etiquetado con his) se asoció luego en el tampón de análisis de una dilución de 2 veces, comenzando a 400 nM con una concentración más baja de 3.13 nM durante 6 minutos. La disociación se realizó en tampón de análisis durante 10 minutos. Los pasos de regeneración entre las concentraciones de la muestra se realizaron en glicina 10 mM, pH 1.7 durante 10 minutos. Se mantuvo un caudal de 25 µl/min durante todo el proceso. Los datos de cinética se ajustaron utilizando un software de análisis de cambio conformacional de reacción de dos estados global proporcionado por Biacore con la resta de referencia.

[169] *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.) utilizando un ensayo de empacado en sándwich estándar. El anticuerpo CD25 antihumano (aCD25–a–686) 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 humano 100 nM seguido de IL–2 humana 100 nM. Los datos se procesaron utilizando el software de análisis de datos Forte Bio 7.0. La unión adicional por la IL2 humana después de la asociación de antígenos indica un epítopo desocupado (no competidor), mientras que ninguna unión indica el bloqueo del epítopo (competidor).

[170] *Binning* de epítopos

La combinación de epítopos de los anticuerpos se realizó en un sistema Forte Bio Octet Red384 (Pall Forte Bio Corporation, Menlo Park, CA) utilizando un ensayo de agrupación en formato sándwich estándar. El anticuerpo CD25 anti–IgG humano 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. Luego, los sensores se expusieron a un antígeno objetivo 100 nM seguido de

daclizumab o basiliximab. Los datos se procesaron utilizando el software de análisis de datos 7.0 de ForteBio. La unión adicional por el segundo anticuerpo después de la asociación de antígenos indica un epítopo desocupado (no competidor), mientras que ninguna unión indica el bloqueo de epítopo (competidor).

[171] *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, células Treg diferenciadas *in vitro* y la línea de células T de mono Cynomolgus HSC–F. La unión a CD25 que expresaba las líneas celulares humanas (SU–DHL–1 y SR–786) se examinó primero bloqueando las células con Trustain (Biolegend) antes de la incubación con anticuerpos anti–CD25 titulados en una serie de dilución semi–log de una concentración superior de 20 µg/ml, durante 30 minutos a 4 ˚C antes de ser lavadas e incubadas con anticuerpo anti–IgG Fc 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 activaron utilizando los parámetros FSC vs SSC por citometría de flujo durante la adquisición de la muestra. La intensidad por media geométrica de las células teñidas se representó en un gráfico XY, representando la intensidad por 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 EC_{50}.

[172] La unión a CD25 que expresan Treg diferenciadas *in vitro* se examinó mediante la tinción de artículos de ensayo (anticuerpos anti–CD25 primarios) con 30 µg/ ml de anticuerpos seguido de una dilución en serie semi–log (7 puntos) durante 30 minutos en hielo. Esto fue seguido por tinción con un anticuerpo secundario (Alexa Fluor 647–AffiniPure fragmento Fab de cabra anti–IgG humana (H + L) – (Jackson ImmunoResearch)) concentración de 1 µg/ ml durante 30 minutos en hielo. Todas las muestras se tiñeron por duplicado.

Las células vivas se activaron utilizando los parámetros FSC vs SSC por citometría de flujo durante la adquisición de la muestra. La intensidad de fluorescencia media (MFI) de las células teñidas se representó en un gráfico XY, representando gráficamente el MFI contra el registro de la concentración, y los datos se ajustaron a una curva de regresión no lineal a partir de la cual se calculó la EC_{50}.

[173] La unión a CD25 que expresan PBMC activadas de mono Cynomolgus y humano se examinó mediante la tinción de artículos de ensayo (anticuerpos anti–CD25 primarios) con 20 μg/ml de anticuerpos seguido de dilución en serie semi–log (7 puntos) durante 30 minutos en hielo. Esto fue seguido por tinción con un anticuerpo secundario (anticuerpo de conejo anti–humano Fcg F(ab')2 (Jackson ImmunoResearch)) concentración de 5 μg/ml durante 30 minutos en hielo. Todas las muestras se tiñeron por triplicado. Para minimizar la reticulación de la muerte celular inducida por la unión del anticuerpo secundario, se examinaron las líneas celulares en cohortes de tinción de 4 artículos de ensayo a la vez. Los linfocitos vivos se activaron utilizando los parámetros FSC vs SSC mediante citometría de flujo durante la adquisición de la muestra. La intensidad de fluorescencia media (MFI) de los subconjuntos de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ se representaron en un gráfico XY, representando gráficamente el MFI contra el registro de la concentración, y los datos se ajustaron a una curva de regresión no lineal a partir de la cual se calculó la EC_{50}.

[174] La unión a células Karpas299 que expresan CD25 se examinó mediante tinción de artículos de ensayo (anticuerpos anti–CD25 primarios) con 20 µg/ml de anticuerpos seguido de dilución en serie semi–log (7 puntos) durante 30 minutos en hielo. A esto le siguió una tinción con un anticuerpo secundario (fragmento de FGγ anti–IgG humano de Alexa Fluor 647–AffiniPure F(ab')2 – (Jackson ImmunoResearch)) de 1 µg/ml durante 30 minutos en hielo. Todas las muestras se tiñeron por duplicado. Las células vivas se activaron utilizando los

parámetros FSC vs SSC por citometría de flujo durante la adquisición de la muestra. La intensidad de fluorescencia media (MFI) de las células teñidas se representó en un gráfico XY, representando gráficamente el MFI contra el registro de la concentración, y los datos se ajustaron a una curva de regresión no lineal a partir de la cual se calculó la EC_{50}.

[175] *Reclonación, producción y caracterización de aCD25–a–686 como IgG1 humana expresada en células de mamíferos*: 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 la cadena pesada de IgG1 humana y las regiones constantes de cadena liviana kappa (P01857 y P01834 respectivamente). Los ADNc de cadena pesada y liviana de longitud completa se verificaron mediante secuenciación en vectores finales y luego se volvieron a clonar para expresarlos utilizando la Tecnología QMCF (Icosagen), un sistema de expresión episomal estable que utiliza células basadas en CHO (CHOEBNALT85) y vectores apropiados para la producción de proteínas recombinantes, anticuerpos, células CHOEBNALT85 se transfectaron con 1 µg de los plásmidos de expresión para la producción de anticuerpos. 48 h después de la transfección, se agregaron 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 100 mM L–Arg. Los anticuerpos IgG1 humanos producidos en células CHOEBNALT85 se caracterizaron por su afinidad hacia CD25 humano recombinante, reactividad cruzada hacia murino,

y CD25 cyno, y la combinación de epítopos frente a los anticuerpos de unión a CD25 seleccionados.

[176] *Mapeo de epítopos aCD25–a–686*:

Diferentes conjuntos de péptidos lineales, de bucle único, simuladores de giro β, simuladores de puente disulfuro, puentes disulfuro discontinuos, simuladores péptidos discontinuos que representan la secuencia CD25 humana (Uniprot, registro nro. P01589) se sintetizaron utilizando 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–686 a cada uno de los péptidos sintetizados se probó en un ELISA (Pepscan, Países Bajos). Las matrices de péptidos se incubaron con solución 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 agregaron el sustrato de peroxidasa 2,2'–azino–di–3–etilbenzotiazolina sulfonato (ABTS) y 20 µl/ml de H2O2 al 3%. Después de una hora, se midió el desarrollo de color. El desarrollo de color se cuantificó con un dispositivo de carga acoplada (CCD), una cámara y un sistema de procesamiento de imágenes. Los valores obtenidos de la cámara CCD varían de 0 a 3000 mAU, similar 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.

[177] También se realizó espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno / deuterio (HDx). El antígeno CD25 se marcó con deuterio por incubación en agua tamponada y deuterada (D2O) en ausencia (estado de proteína 1) y la presencia de un fragmento Fab del anticuerpo aCD25–a–686 (estado de proteína 2) en varias ocasiones. Después de los diversos tiempos de etiquetado, el agua deuterada se enfrió mediante la adición de un tampón de enfriamiento. Para el control, se preparó una muestra sin deuteración

(incubación en agua normal tamponada) y con 90% de deuteración (incubación en agua deuterada tamponada [ver más abajo]) en paralelo.

[178] Posteriormente, todas las muestras se digirieron con proteasa con pepsina / FXVIII, los péptidos resultantes se separaron mediante HPLC de fase inversa y se identificaron mediante detección MS / MS utilizando un espectrómetro de masas Thermo Orbitrap Fusion Lumos. Para la evaluación de datos para identificar péptidos con diferentes niveles de deuteración en el antígeno CD25 en el estado de proteína 1 y el estado de proteína 2, respectivamente, se usaron las herramientas de software disponibles comercialmente, Peaks Studio de Bioinformatics Solutions Inc. (BSI) y HDExaminer de Sierra Analytics.

Los detalles del experimento son:

[179] *(A) Herramientas, reactivos y soluciones:*

Antígeno: El antígeno huCD25 (IL2R alfa) se adquirió de R&D Systems #223–2A/CF, c = 52.9 ppm/µl en KH2PO4 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5, lote KY051509A.

Anti–CD25–Fab: el fragmento Fab purificado de aCD25–a–686 se produjo por digestión con GingisKhan® (Genovis, B0–GKH–020) durante la noche a 37 °C y purificación secuencial en una columna Mab Select (flujo continuo), purificación por afinidad en una columna de selección kappa (GE Healthcare) y una SEC preparativa. El fragmento Fab tenía una concentración de 51,3 pmol/µl en TRIS 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5.

H2O–tampón: tris (hidroximetil) aminometano 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 en H2O.

D2O–tampón: tris (hidroximetil) aminometano 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 en D2O.

Tampón de enfriamiento: 4 M de urea, 0,17 M KH2PO4, 0,3 M TCEP, pH 2,8

Robot de pipeteado y etiquetado: tecnologías Leap, automuestreador PAL HTC

Estado de la proteína 1 (antígeno solo): 8.23 µl del antígeno se diluyeron con 102.27 µl de tampón H2O y se proporcionaron en una gradilla de muestras templada a 0 ° C del robot.

Estado de proteína 2 (antígeno más aglutinante): se agregaron 7,4 µl del antígeno a 19,59 µl de anti–CD25–Fab y se diluyeron en 70,51 µl de H2O–tampón, también en la gradilla de muestras templada a 0 ° C.

Tiempos de etiquetado: 0, 1, 10, 60, 300 min.

[180] *(B) Etiquetado de CD25 no unido (estado de proteína 1) y unido (estado de proteína 2) con deuterio*

B1) Identificación de péptidos y tiempo de etiquetado de 0 min (sin control de deuteración): El robot diluyó 5.2 µl de estado de proteína 1 en 46.8 µl de H2O–buffer en una gradilla de muestras a 20 ° C. 39 µl de los mismos se transfieren y se mezclan en 39 µl de tampón de enfriamiento en la gradilla de muestras templada a 0 ° C. Después de un tiempo de enfriamiento de 300 s, se inyectaron 50 µl (9,85 pmol de antígeno) de esta muestra en el sistema de medición.

B2) Muestra totalmente deuterada (90% de control de deuteración): Se diluyeron 6,7 µl del antígeno en 11,3 µl de tampón H2O y se mezclaron con 162 µl de clorhidrato de guanidina deuterado 6 M a un contenido final de D2O del 90%.La incubación fue de 5 h a temperatura ambiente. 39 µl de los mismos se transfirieron a un tampón de enfriamiento a 0ºC. Después de 300 s de tiempo de enfriamiento, se inyectaron 50 µl (49.23 pmol de antígeno) de esta muestra en el sistema de medición.

B3) Varios tiempos de etiquetado (1, 10, 60 y 300 min) con enfriamiento subsiguiente: El robot diluyó 5.2 µl de estado de proteína 1 en 46.8 µl de D2O–buffer en una gradilla de muestras a 20 ° C. Después del tiempo de etiquetado respectivo, se transfirieron 39 µl del mismo y se mezclaron en 39 µl de tampón de enfriamiento en la gradilla de muestras templada a 0 ° C. Después de un

tiempo de enfriamiento de 300 s, se inyectaron en el sistema de medición 50 µl (9.85 pmol de antígeno CD25 y 23.08 pmol Fab) de esta muestra.

El mismo procedimiento también se realizó con proteína estado 2.

Todas las muestras de etiquetado (etiquetado de 0, 1, 10, 60 y 300 min) y la muestra completamente deuterada se realizaron por triplicado.

[181] *(C) Análisis de muestras etiquetadas de deuterio y muestras de control:*

Las muestras de B) se cargaron en un sistema enfriado (0 ° C) Waters NanoAcquity UPLC (Waters Corp., Milford, MA).La digestión en línea con pepsina / FXVIII (NovaBioAssays, # NBA2018209) se realizó a 20 ° C. A 0 ° C 3 min. Desalinización (Waters VanGuard C18, 1.7 µm, 2.1x5 mm) y separación de fase inversa (Waters BEH C18, 1.7 µm, 1x100 mm) usando un gradiente de 8–35% con 0.23% de ácido fórmico en acetonitrilo (pH 2.5) en 7 minutos para todas las muestras de marcaje, y en 25 minutos para la identificación del péptido a un caudal de 40 µl / min se realizó.

El análisis de masas se realizó con un espectrómetro de masas Thermo Orbitrap Fusion Lumos utilizando electropulverización de iones positivos.

Para la identificación de péptidos utilizando la muestra de 0min–tiempo de marcación (B1), se utilizó la disociación de colisión de mayor energía (HCD) en paralelo con la transferencia de electrones / disociación de colisión de mayor energía (EThcD) en el modo de adquisición dependiente de datos (DDA).

Para todas las mediciones de etiquetado, un modo de escaneo completo fue suficiente.

[182] *(D) Evaluación de datos:*

Peaks Studio, Bioinformatics Solutions Inc. (BSI) se utilizó para la identificación de péptidos de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

HDExaminer, Sierra Analytics se utilizó para determinar la incorporación de deuterio en péptidos de los diferentes tiempos de etiquetado y el control totalmente deuterado en comparación con el control no deuterado (tiempo de etiquetado de 0 min) según las instrucciones del proveedor.

Se identificaron dos epítopos adicionales: aCD25ep–b ($_{37}$ KAMAYKEGTMLNCECKRGFR $_{56}$ – SEQ ID NO: 24) y aCD25ep–c ($_{135}$ ATERIYHF $_{142}$ – SEQ ID NO: 25)

[183] *Los ensayos de competición Ab CD25 antihumanos:*

Las competiciones de anticuerpos se realizaron en un sistema Forte Bio Octet Red96 (Pall Forte Bio Corp., EE. UU.) Utilizando un ensayo de unión secuencial estándar. 26.8 nM de CD25 humano recombinante etiquetado se cargó en Biosensores Ni–NTA durante 200 s. Después del paso de la línea de base en el tampón cinético, los sensores se expusieron a 66,6 nM del primer anticuerpo para 600 o 1800, seguido de un segundo anticuerpo anti–CD25 (también a 66,6 nM para 600 o 1800).Los datos se procesaron utilizando el software de análisis de datos Forte Bio 9.0.La unión adicional por un segundo anticuerpo indica un epítopo desocupado (sin competencia por el epítopo), mientras que ninguna unión indica bloqueo por epítopo (competencia por el epítopo).

Resultados

[184] Los anticuerpos monoclonales (mAb) que se unen a la secuencia de proteína extracelular CD25 humana recombinante (rhCD25) se aislaron utilizando una biblioteca de presentación de anticuerpos basada en levadura como se describe en los 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 determinar la unión de rhCD25.

[185] Sobre la base de la unión a rhCD25, la unicidad de la secuencia y los niveles de expresión, se identificó un panel de mAbs. Estos anticuerpos se caracterizaron además por la unión a secuencias de proteína de dominio extracelular CD25 de ratón y mono Cynomolgus. Los clones se caracterizaron mostrando valores de unión de IgG a rhCD25 monovalentes y/o secuencias de

proteínas extracelulares de cyno CD25 recombinantes que están comprendidas entre 10^{-8} M y 10^{-10} M. Además, cada anticuerpo se caracterizó por competir o no con la IL–2 Ligando o referencia anti–CD25 anticuerpo daclizumab. Los clones de anticuerpos también se evaluaron al nivel de unión a células humanas que expresan diferentes niveles de CD25, como la línea celular de linfoma, SU–DHL–1 y células Treg diferenciadas *in vitro*, mediante citometría de flujo.

[186] Los resultados de la unión a rhCD25, el agrupamiento cruzado y el 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 de humano y mono cynomolgus**	**Grupo de clasificación de epítopo**	**Competidor de unión de IL-2 a CD25**	**Afinidad por IgG CD25-His humana recombinante**	
				ForteBio KD (M)	**Biacore KD (M)**
aCD25-a-686	Sí	3	No	2.33E-09	3.2E-09
Daclizumab	Sí	1	Sí	6.00E-10	6.10E-10

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

[187] Finalmente, para eliminar las secuencias de anticuerpos que serían propensas a la agregación y la interacción no específica, los anticuerpos se seleccionaron en un ensayo de reactivo específico poli (PSR) y espectroscopia de nanopartículas de autointeracción de captura de afinidad (AC–SINS), un enfoque eso 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 últimos ensayos y, como tal, no se eliminaron del panel.

[188] Entre los aciertos seleccionados que se secuenciaron y caracterizaron como se describió anteriormente, el clon aCD25–a–686 es un anticuerpo que

presenta nuevas regiones determinantes de complementariedad (CDR; Fig. 1) que no compiten por la unión de CD25 humano con Daclizumab ni con Basiliximab (Figura 13 A y B), pero compite por la unión con el anticuerpo no bloqueador, 7G7B6, y el no bloqueador de referencia, aCD25–a–646 (Figura 13 C y D. El estudio de mapeo de epítopos que se ha llevado a cabo utilizando la tecnología Pepscan) indican que aCD25–a–686 se une a CD25 humano en la región de los aminoácidos 70–84 (Fig. 2) y se une a secuencias de proteínas extracelulares de CD25 humano con un valor Kd en el rango de 10^{-8} M a 10^{-10} M.

[189] *Medición cinética de CD25: resistencia de unión mediante afinidad y/o avidez*

[190] Se realizaron las siguientes investigaciones adicionales relacionadas con afinidad y avidez. La unión de los anticuerpos CD25 al antígeno CD25 humano se investigó mediante resonancia de plasmón superficial utilizando un instrumento BIACORE T200 (GE Healthcare). Alrededor de 8000 unidades de resonancia (RU) del sistema de captura (20 µg / ml de Fab antihumano; código de pedido del Human Fab Capture Kit: 28–9583–25; GE Healthcare) se acoplaron 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).

[191] El tampón de funcionamiento y de dilución fue PBS–P a pH 7,4 (tampón fosfato 20 mM, KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, surfactante 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 solución de 3 µg / ml durante 60 segundos a una velocidad de flujo de 10 µl / min. La asociación del antígeno CD25 se midió mediante la inyección de soluciones de CD25 humanas durante 180 segundos a una velocidad de flujo de 30 µl / min, comenzando con una concentración de 1000 nM hasta 1 nM en pasos de dilución 1:10.La fase de disociación se activó

cambiando de la inyección de la solución de muestra al tampón de ejecución 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 a granel se corrigieron restando la respuesta obtenida de una superficie de referencia Fab antihumana; las inyecciones en blanco también se restan (= doble referencia).

[192] Las propiedades de unión de los anticuerpos CD25 se evaluaron mediante el uso de diversas variantes de antígeno CD25, es decir, antígeno monomérico producido en la empresa (P1AA5872) y dos antígenos CD25 disponibles comercialmente (Sino Biologicals cat. nro.10165–H08H; Sistemas de I + D cat. 223–2A / CF).

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

Tabla 4:

Forma de CD25	Fuerza de unión	Modelo de ajuste
Sino Biological (~20% dímero)	2.5 nM	Reacción en dos estados
R&D Systems (~10% dímero)	5.8 nM	Reacción en dos estados
Interna (0% dímero)	244 nM	1:1 Langmuir

[194] Por lo tanto, las secuencias aCD25–a–686 (Fig. 1) identifican anticuerpos que se unen específicamente a CD25, y cuyas actividades asociadas a las características funcionales que definen los Agentes anticuerpos anti–CD25, como se usa ese término en el presente documento, pueden evaluarse funcionalmente por células. Ensayos basados o modelos animales.

[195] **Ejemplo 2: Modelos basados en células para validar agentes moduladores de anticuerpos CD25**

Materiales y métodos

[196] *Señalización de IL–2 in vitro mediante el ensayo de fosforilación STAT5:* El bloqueo de IL–2 se caracterizó utilizando un ensayo de fosforilación STAT5, en el que se examinó la señalización de IL–2.Las PBMC previamente congeladas (Stemcell Technologies) se cultivaron en placas de pocillos con fondo de 96 U en presencia de 10 µg / ml de anticuerpos anti–CD25 durante 30 minutos antes de agregar IL–2 (Peprotech) a 10U / ml o concentraciones variables de 0.25U / 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 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 tampón de tinción eBp3cience ™ Foxp3 / factor de transcripción (Invitrogen) y se trataron con BD Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences). Las células se tiñeron 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 clones 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 utilizando FCS–H versus FCS–A, y los linfocitos se definieron utilizando los parámetros SSC–A versus FCS–A. Las células T $CD3^+$ se definieron utilizando un gráfico de CD3 PerCP–Cy5.5–A versus FCS–A y se dibujó una puerta en un histograma que muestra el recuento frente a STAT5 Alexa Fluor 647–A para determinar la población de células T $STAT5^+$ $CD3^+$.El porcentaje de bloqueo de la señalización de IL–2 se calculó de la siguiente manera:% de bloqueo = 100 x [(% de células $Stat5^+$ grupo No Ab –% de células $Stat5^+$ 10ug / ml grupo Ab) / (% de células $Stat5^+$ grupo No Ab)]. El

análisis adicional de la fosforilación de STAT5 por diferentes subgrupos de células T (CD4 $^{+}$, CD8 $^{+}$, CD4 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$, células T ingenuas 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 con GraphPad Prism v7 (resultados no mostrados).

[197] El bloqueo de IL–2 de los anticuerpos fucosilados y afucosilados se caracterizó utilizando el ensayo de fosforilación STAT5 como se describió anteriormente. Las PBMC humanas se incubaron durante 30 minutos en hielo con un anticuerpo de control de isotipo IgG1, un anticuerpo neutralizante de IL–2, daclizumab, aCD25–a–686 y aCD25–a–686 afucosilados a 10 ug / ml. La estimulación se realizó con IL–2 (Proleukine, Novartis 10 U/ml) durante 10 minutos. Las células se tiñeron y se sometieron a citometría de flujo utilizando el conjunto de tampón de tinción eBp3cience ™ Foxp3 / Factor de transcripción (Invitrogen), el BD Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences) y los anticuerpos marcados con fluorocromo (CD3–PerCP–Cy5.5 clon UCHT1 – Biolegend, CD4 BUV397 clon RPA–T4 – Biolegend, CD8 PE / Cy7 clon SK1 – Biolegend, FoxP3 + – PE clon 206D – Biolegend, STAT5–Alexa Fluor 647 clon 47 / stat5 / pY694 BD Bioscience).Las muestras fueron adquiridas y analizadas como anteriormente. Se calculó la diferencia en la intensidad de fluorescencia media de PhosphoStat5 en células T CD3 + CD8 + con y sin baja activación de IL–2.Se midieron los duplicados.

[198] *Ensayo de activación de células T in vitro:*

El impacto de la señalización de IL–2 en las respuestas de Tef se caracterizó en un ensayo de activación de células T, en el que se examinó la regulación y proliferación de la granzima B intracelular (GrB). Las células Pan T humanas primarias previamente congeladas (Stemcell Technologies) se marcaron con colorante de proliferación celular eFluor450 (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante, y se agregaron a placas de pocillos con fondo de 96 U a 1x10 ^{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 Pen–Strep (Sigma).Luego, las células se trataron con 10 µg / ml de anticuerpos anti–CD25 o anticuerpos de control seguidos de T–Activator humano CD3 / CD28 (20: 1 célula a relación de perlas; Gibco) y se incubaron durante 72 horas a 37 ˚ C, 5% de CO2 incubadora humidificada para evaluar la activación de células T, las células se tiñeron con el colorante de viabilidad fijable eBioscience efluor780 (Invitrogen), seguido de anticuerpos marcados con fluorocromo para marcadores de células 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 fija y se permeabiliza con el conjunto de búfer de tinción de eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor (Invitrogen) antes de la tinción para GrB intracelular y FoxP3 intranuclear (clon de Granzyme B–PE GB11 BD Bioscience, clon de FoxP3–APC 236A / E7). Las muestras se obtuvieron en el citómetro de flujo Fortessa LSR X20 (BD Bioscience) y se analizaron con el software BD FACSDIVA. Los dobletes se excluyeron utilizando FCS–H versus FCS–A, y los linfocitos se definieron utilizando los parámetros SSC–A versus FCS–A. Los subconjuntos de células T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ controlados de los linfocitos CD3 $^{+}$ vivos se evaluaron utilizando una gráfica de GrB–PE–A versus eFluor450–A de proliferación. Los resultados se presentaron como porcentaje de células GrB positivas proliferantes de las poblaciones de células T CD4^{+} o CD8^{+} completas. Los gráficos y el análisis estadístico se realizaron con GraphPad Prism v7.

[199] *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 SU–DHL–1 o SR–786 (CD25 positivo) líneas celulares humanas como células diana con células NK humanas como Fuente de las células efectoras. Las células NK se aislaron a partir de PBMC de donantes

sanos utilizando el kit de aislamiento negativo de células NK (Stemcell Technologies).Las células NK se cultivaron durante la noche en presencia de 2 ng / ml de IL–2 (Peprotech).–786 SR células diana SU–DHL–1, o se cargaron con calceína–AM (ThermoFisher) y se sembraron, 4 repeticiones por condición, en presencia de anticuerpos de isotipo anti–CD25 o por 30 minutos a 37 ˚ C 5% de CO2.Después de la incubación, se añadieron las células NK a los pocillos a un objetivo: efectoras (T: E) proporción 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 con relación a 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 utilizando 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 registro de la concentración, y los datos se ajustaron a una curva de regresión no lineal a partir de la cual se calculó el valor de EC50.

[200] La capacidad para mediar en ADCC y agotar las células positivas para CD25 también se caracterizó por Daclizumab, aCD25–a–686 y aCD25–a–686 afucosilado en un ensayo de cocultivo de células NK humanas activadas con IL–2 con iTreg inducidos *in vitro*. La muerte de iTreg se cuantificó mediante análisis de citometría de flujo después de 6 horas.

[201] Las células NK humanas activadas con IL–2 se prepararon como sigue. Las PBMC humanas se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll. Se obtuvieron capas leucocitarias del centro de donación de sangre Zúrich. Para aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) nuevas, la capa leucocitaria se diluyó con el mismo volumen de DPBS (Gibco por Life Technologies, Cat. No. 14190 326). Se suministraron tubos de centrífuga de polipropileno de 50 ml (TPP, No. de Cat. 91050) con Histopaque

1077 de 15 ml (SIGMA Life Science, Cat. No. 10771, polisucrosa y diatrizoato de sodio, ajustado a una densidad de 1.077 g/ml) y la solución de capa lustrosa se colocó sobre el Histopaque 1077.Los tubos se centrifugaron durante 30 minutos a 400 xg, a temperatura ambiente y con baja aceleración y sin rotura. Posteriormente, se recogieron las PBMC de la interfaz, se lavaron tres veces con DPBS y se resuspendieron en medio de cultivo que consistía en medio RPMI 1640 (Gibco por Life Technology, Cat. No. 42401–042) suministrado con suero bovino fetal al 10% (FBS, Gibco por Life Technology, Cat. No. 16000–044, Lote 941273, irradiado con rayos gamma, libre de micoplasma e inactivado por calor a 56 ° C durante 35 min) y 1% (v / v) de GlutaMAX I (GIBCO de Life Technologies, Cat. No.35050 038).Las células NK se purificaron a partir de estas PBMC humanas en reposo utilizando el kit de aislamiento de células NK humanas MACS (Miltenyi Biotech, Cat. 130–092–657) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células NK fueron activadas durante la noche en medio de cultivo suplementado con IL–2 (PreproTech, Nº de Cat. 200–02, [100 U / ml]) a 37 ° C en una atmósfera saturada de agua a 5% de CO2.

[202] Los preparativos se prepararon de la siguiente manera. Las PBMC humanas se aislaron como se describe anteriormente. Las células T CD4 vírgenes se aislaron utilizando el kit de aislamiento II de células T CD4 vírgenes humanas (Miltenyi Biotech, Cat. 130–094–131) según las instrucciones del fabricante. Las células T CD4 naïve se ajustaron a una densidad celular de 1 x 10^{6} células / ml en medio de diferenciación Treg compuesta de X–Vivo 15 (Lonza, Cat. No. BE04–744Q) suplementado con humano inactivado por calor suero AB (Sigma, Cat. Nro. H3667, [v / w 10%]), N–acetilcisteína (Sigma, nº de catálogoA9165, [2 mg/ml]), Glutamax (Gibco, Cat. No.35050–038, 1x), piruvato de Na (Gibco, Cat. No.11360–070,1x), Hepes (Gibco, No. de Cat. 15630–056, 1x), aminoácidos no esenciales (Gibco, Cat. No.11140–035 Stock, 1x), Pen / Strep (Gibco, Cat. No. 15070–063, 1x), B–mercaptoetanol (Gibco, Cat. Nro.

31350–010, [50 uM]), Proleuquina / Aldesleuquina (Novartis, [300 U/ml]), Rapamicina (Sigma, Cat. nro. R8781, [109 nM]) y rhTGFb1 (Miltenyi Biotec, Cat. No. 130–095–066, [10 ng/ml]). Para la activación de las células T, se agregaron las dynabeads CD3 / CD28 (Gibco, Cat. Nro. 11131D) del activador T en una proporción de 1 perla a 1 célula. Antes de la adición, las perlas se lavaron una vez con PBS. Los iTreg se diferenciaron durante 6 días a una densidad celular de 0.5 – 2 x 10^{6} células / ml a 37 ° C en una atmósfera saturada de agua al 5% de CO_2.En caso de crecimiento excesivo, se añadieron diariamente medios de diferenciación de iTreg recién preparados. Después del período de diferenciación, los Dynabeads se eliminaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando el DynaMagnet. Las células se congelaron hasta su uso posterior. Un día antes del ensayo de ADCC, las iTreg se quemaron y se marcaron utilizando el kit de enlace de células fluorescentes rojas PkH–26 (Sigma, Nº de catálogo PKH26GL–1KT) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se sedimentaron mediante centrifugación a 400 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con medio RPMI–1640 (sin aditiva).Las células se tiñeron durante 5 minutos a temperatura ambiente en el diluyente proporcionado C que contenía PkH – 26 colorante (concentración final.[1×10^{-6} M]).El exceso de colorante se unió mediante la adición de FBS y luego se eliminó mediante 3 etapas de lavado en medios de cultivo como se describió anteriormente.

[203] 0.2x10^{5} PKH–26 marcadas células iTreg por pocillo fueron sembradas en una placa de cultivo celular bien de fondo en U 96 en medio de cultivo y se almacenaron durante la noche a 37 ° C y 5% de CO_2 en una incubadora (Hera Cell 150). Las células NK activadas con IL–2 se prepararon como se describió anteriormente y se agregaron a una densidad de 1 x 10^{5} células por pocillo. Se agregó una fila de dilución en serie de un anticuerpo de control de isotipo, Daclizumab, aCD25–a–686 GlyMAXX y aCD25–a–686, respectivamente, a un

volumen total de 200 uL por pocillo. Las células se cultivaron durante 6 horas a 37 ° C y 5% de CO_2 en una incubadora (Hera Cell 150).

[204] Después de eso, todas las células se sedimentaron mediante centrifugación a 400 xg a 4ºC. Los sedimentos se lavaron con tampón FACS enfriado con hielo (DPBS (Gibco por Life Technologies, No. de Cat. 14190 326) w / BSA (0.1% v / w, Sigma–Aldrich, Cat. No. A9418) y se tiñeron con LIVE / Colorante de células muertas Aqua fijable DEAD™ (ThermoFischer Scientific, nº de cat. L34957, dilución 1: 500 en PBS) durante 20 minutos a 4 °C. Las células se sometieron a citometría de flujo utilizando un LSR–Fortessa de 5 láser (software BD Bioscience con DIVA).Se calcularon células vivas de iTreg (Aqua–, PkH–26 +) y se usó el porcentaje de células positivas para calcular la lisis específica. La lisis específica se representó gráficamente para las condiciones respectivas frente a la concentración de anticuerpos utilizada para analizar la potencia de ADCC de los anticuerpos probados.

[205] *Ensayo ADCP in vitro:*

Los ensayos de fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCP) se realizaron utilizando Treg diferenciados in vitro como células diana y macrófagos derivados de monocitos como células efectoras. Se aislaron PBMC de conos de leucocitos mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. Los monocitos (células CD14 +) se aislaron utilizando microesferas 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 añaden medios frescos que contienen M–CSF después de 3 días. Las células T reguladoras (Treg) se aislaron utilizando el kit de diferenciación de células Treg humanas (R&D Systems).Estas células se incubaron en una incubadora humidificada con CO_2 al 5% a 37 ° C durante 5 días y se marcaron con eFluor450–Dye (Invitrogen), según las recomendaciones del fabricante. En el día 5, los macrófagos y los Treg marcados con eFluor450 se cultivan durante

4 horas a una relación de 10 a 1 efector a diana en presencia de anticuerpos o controles anti–CD25, como se describe más adelante. Las células diana (Treg) se agregaron a $1x10^{4}$ células / pocillo, mientras que las células efectoras (macrófagos) se agregaron a $1x10^{5}$ células / pocillo, para una relación efector / diana de 10 a 1.Los anticuerpos anti–CD25 se agregaron luego a una concentración superior de 1 μ g / ml seguido de una serie de registros (7 puntos) en duplicados. Las células y los anticuerpos se incubaron durante 4 horas a 37 ° C 5% CO_2.Para evaluar ADCP, las células se colocaron en hielo, se tiñeron con el marcador de superficie celular CD14 (clon de CD14–PerCP–Cy5.5 MfP9 BD Biosciences) y se fijaron con el tampón de fijación de eBioscience. Se realizó un análisis citométrico de flujo de dos colores utilizando el Fortessa LSR X20. Las células diana residuales se definieron como células que eran eFluor450–dye $^{+}$ / CD14 $^{-}$.Los macrófagos fueron definidos como CD14 $^{+}$.Se consideraron de doble células marcadas (eFluor450–dye + / CD14 +) para representar la fagocitosis de los objetivos 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 objetivos residuales)].

[206] *Estadísticas*:

Se utilizó el software Prism (GraphPad) para realizar el ajuste de curvas para determinar los valores de EC50 y la actividad máxima.

Resultados

[207] El anticuerpo aCD25–a–686, 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 utilizando el octeto mostró que aCD25–a– 686 no afecta la unión de IL– 2 a CD25 (Figura 6).Esto se confirmó en el ensayo STAT5 en el presente documento aCD25–a–686 y aCD25–a–686 afucosilado 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 y Figura 25).Daclizumab, que se ha demostrado que bloquea la interacción de CD25 con IL–2 a través del llamado epítopo "Tac" (Queen C *et al*, 1989 y Bielekova B, 2013) se une a un epítopo diferente al aCD25–a–686 (La Figura 7), que puede explicar por qué Daclizumab bloquea la señalización de IL–2 y el aCD25–a–686 y el aCD25–a–686 afucosilado no bloquea la señalización de IL–2 en el ensayo de fosforilación de STAT5 (Figura 8 y 25).Además, Daclizumab reduce las respuestas efectoras de las células T activadas, probablemente debido a su bloqueo de la señalización de IL–2, mientras que aCD25–a–686, que no bloquea la señalización de IL–2, no tiene un impacto negativo en las respuestas de las células T (Figura 9). Finalmente, aCD25–a–686 mata las células que expresan CD25, las células tumorales o las células T reguladoras, a través de ADCC (Figura 10) y ADCP (Figura 12) cuando se compara con el anticuerpo de isotipo IgG1. El anticuerpo aCD25–a–686 a–fucosilado aumenta aún más la destrucción de células CD25 positivas en comparación con el anticuerpo CD25 no modificado a través de ADCC (Figura 11).

[208] Como se muestra en la Figura 26 no modificada aCD25–a–686, aCD25–a–686 y Daclizumab afucosilados fueron capaces de mediar la ADCC y agotar las células positivas para CD25.El daclizumab, un anticuerpo que interfiere con la unión de IL–2 a CD25, fue el menos potente. Esta interferencia con la unión de IL–2 a CD25 aumenta la concentración de IL–2 necesaria para la señalización de IL–2 en células positivas para CD25, ya que solo el receptor de IL–2 de baja afinidad es funcional. El menor estado de afucosilación de aCD25–a–686 afucosilado en comparación con aCD25–a–686 aumenta su potencial ADCC con una lisis máxima más alta del 97% en comparación con el 80% y un valor de EC50 reducido de [0.21 uG/ml] a [0.01 uG/ml].

[209] En conclusión, aCD25–a–686 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 del efector T. aCD25–a–686 es, por lo tanto, un anticuerpo reductor de Treg que podría aplicarse para el tratamiento del cáncer, como monoterapia o en combinación.

[210] **Ejemplo 3: Producción de variantes de agentes moduladores de anticuerpos CD25**

[211] aCD25–a–686 se sometió a una maduración de afinidad adicional. La optimización se realizó mediante la introducción de diversidades en las regiones variables de cadena pesada. El CDRH3 del anticuerpo se recombinó en una biblioteca prefabricada con CDRH1 y las variantes de CDRH2 de una diversidad de 1×10^{8} y las selecciones se realizaron con una ronda de MACS y cuatro rondas de FACS como se describe en el descubrimiento ingenuo. En las rondas de FACS, se examinaron las bibliotecas para determinar la unión de PSR, la reactividad cruzada de las especies, la reactividad cruzada del antígeno y la presión de afinidad, y se realizó la clasificación para obtener una población con las características deseadas. Para estas selecciones, las presiones de afinidad se aplicaron mediante la valoración del antígeno monomérico biotinilado o mediante la preincubación del antígeno biotinilado con Fab o IgG parental durante 30 minutos y luego aplicando esa mezcla precompletada a la biblioteca de levaduras durante un período de tiempo que permitiría alcanzar la selección un equilibrio. Los anticuerpos de mayor afinidad fueron capaces de ser clasificados.

[212] Las variantes que muestran las mejores afinidades se seleccionaron para la producción de mamíferos y se caracterizaron adicionalmente usando los ensayos descritos anteriormente en los Ejemplos 1 y 2.

[213] Resultados

[214] Las secuencias de los anticuerpos variantes, incluidas sus regiones determinantes de complementariedad, seleccionadas para una caracterización adicional, se muestran en las Figuras 14–18 y en las Tablas 2 y 3.

[215] **Tabla 2:**

	HCDR1	**HCDR2**	**HCDR3**
aCD25-a-686	GTFSSLAIS (SEQ ID NO: 2)	GIIPIFGTANYAQKFQG (SEQ ID NO: 3)	ARGGSVSGTLVDFDI (SEQ ID NO: 4)
aCD25-a-686-m1	GTFSSLAIS (SEQ ID NO: 2)	AIIPVFGTASYAQKFQG (SEQ ID NO: 13)	ARGGSVSGTLVDFDI (SEQ ID NO: 4)
aCD25-a-686-m2	GTFSSLAIT (SEQ ID NO: 10)	GIIPIFGDASYAQKFQG (SEQ ID NO: 14)	ARGGSVSGTLVDFDI (SEQ ID NO: 4)
aCD25-a-686-m3	GTFSSLAIS (SEQ ID NO: 2)	GIIPIFGDANYAQKLQG (SEQ ID NO: 15)	ARGGSVSGTLVDFDI (SEQ ID NO: 4)
aCD25-a-686-m4	GTFSALAIS (SEQ ID NO: 11)	GIIPLFGRANYAQKFQG (SEQ ID NO: 16)	ARGGSVSGTLVDFDI (SEQ ID NO: 4)
aCD25-a-686-m5	GTFSSLAIF (SEQ ID NO: 12)	GIIPVFGQANYAQKFQG (SEQ ID NO: 17)	ARGGSVSGTLVDFDI (SEQ ID NO: 4)

[216] **Tabla 3:**

	LCDR1	**LCDR2**	**LCDR3**
aCD25-a-686	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 6)	KASSLES (SEQ ID NO: 7)	QQYNIYPIT (SEQ ID NO: 8)
aCD25-a-686-m1	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 6)	KASSLES (SEQ ID NO: 7)	QQYNIYPIT (SEQ ID NO: 8)
aCD25-a-686-m2	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 6)	KASSLES (SEQ ID NO: 7)	QQYNIYPIT (SEQ ID NO: 8)
aCD25-a-686-m3	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 6)	KASSLES (SEQ ID NO: 7)	QQYNIYPIT (SEQ ID NO: 8)
aCD25-a-686-m4	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 6)	KASSLES (SEQ ID NO: 7)	QQYNIYPIT (SEQ ID NO: 8)
aCD25-a-686-m5	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 6)	KASSLES (SEQ ID NO: 7)	QQYNIYPIT (SEQ ID NO: 8)

[217] Los experimentos de unión a células de Karpas 299 confirmaron que la unión de los anticuerpos variantes a CD25 mejoró con respecto a los clones parentales entre 2 y 10 veces (Figura 21).Los anticuerpos variantes se unen a secuencias de proteínas extracelulares CD25 humanas con un valor de Kd en el rango de 10^{-8} M a 10^{-10} M y también se mejoró en comparación con el clon parental aproximadamente 2 a 7 veces (Figura 19).

Los ensayos de competencia mostraron que el anticuerpo variante aCD25–a–686m1 no compitió por la unión a CD25 humana con Daclizumab o con basiliximab (pero sí compite por la unión con el anticuerpo no bloqueador, 7G7B6, y el no bloqueador de referencia, aCD25–a–075 (Figura 20).

[218] El ensayo STAT5 mostró que los anticuerpos variantes aCD25–a–686–m1, aCD25–a–686–m2, aCD25–a–686–m3, aCD25–a–686–m4 y aCD25–a–686–m5 no bloquearon IL Señalización –2, comparable al clon parental aCD25–a–686, mientras que la señalización de IL–2 fue bloqueada completamente por el anticuerpo de referencia Daclizumab (Figura 22).Daclizumab, que se ha demostrado que bloquea la interacción de CD25 con IL–2 a través del llamado epítopo "Tac", se une a un epítopo diferente a aCD25–a–686 y sus variantes, lo que puede explicar por qué Daclizumab bloquea la señalización de IL–2 y el aCD25–a–686 y sus variantes no bloquean la señalización de IL–2 en el ensayo de fosforilación de STAT5 (Figura 22).

En conclusión, se ha demostrado que los anticuerpos de la variante CD25–a–686 no interfieren con la señalización de IL–2 y son comparables a su clon parental. En particular, aunque los anticuerpos de la variante aCD25–a– 686 madurados por afinidad muestran un aumento de la unión a la célula y al CD25 recombinante, las variantes no mostraron ningún aumento en el bloqueo de la señal de IL–2.Esto confirma la unión al epítopo observado en CD25, puede lograr el efecto deseado, de no bloqueo de la señalización de IL–2 a través de CD25.

[219] **Ejemplo 4:** *Análisis terapéutico de un anticuerpo no bloqueador:*

[220] En el día 0, se implantaron 1 x 10^{7} células SU–DHL–1 en 200 µl de RPMI 1640 en el flanco derecho. En el día 12, los ratones con tumores palpables se aleatorizaron en un tratamiento con vehículo o aCD25–a–686 2 mg/kg, dos veces por semana. En el día 15, los ratones con un tamaño de tumor de 100–200mm ^{3} se asignaron al azar y se dosificaron con vehículo, aCD25–a–686 2 mg/kg, dos veces por semana o una sola dosis de aCD25–a–686 a 10 mg/kg.

[221] Resultados

[222] En un modelo in vivo se demostró la supresión del crecimiento tumoral después de la dosificación con aCD25–a–686.El anticuerpo aCD25–a–686 evitó el crecimiento en 9/10 ratones con tumores palpables a dosis de 2 mg/kg, dos veces por semana (Figura 23 (A) – (B)).En ratones con un tamaño de tumor de 100–200mm 3, aCD25–a–686 también impidió el crecimiento del tumor a dosis de 2 mg/kg, dos veces por semana y 10 mg de dosis única / kg (Figura 23 (C) – (E)).

[223] **Ejemplo 5: 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 inyectaron 3x10 ^{5} células tumorales CT26 en Matrigel al 0% subcutáneamente en el flanco, n = 15 por grupo. Los animales se asignaron al azar a grupos de tratamiento según el peso corporal del Día 1.El tratamiento se inició el día 6 y los ratones se trataron con una inyección de cada anticuerpo (isotipo IgG2a de ratón, anticuerpo neutralizante de IL–2, PC61 mIgG1, un CD25 anti–ratón que bloquea la señalización de IL–2 del isotipo IgG1 de ratón y 7D4 mIgG2a, una señalización de IL–2 no bloqueador de CD25 anti–ratón del isotipo IgG2a de ratón) a 200 µg / animal. Los animales recibieron tratamientos de monoterapia, con un grupo por anticuerpo, o tratamiento combinado de 7D4 mIgG2a y el anticuerpo neutralizante IL–2 o 7D4 mIgG2a y PC61 mIgG1.Los ratones se sacrificaron cuando el volumen del tumor alcanzó 2000 mm3 o 50 días, lo que se alcanzó primero.

[224] Resultados

El anticuerpo 7D4 mIgG2a que no destruye la IL–2 que merma el CD25 indujo el rechazo del tumor en ratones tratados, mientras que los otros anticuerpos no mostraron ningún efecto como monoterapia en comparación con el control de isotipo IgG2a de ratón. La combinación con anticuerpos bloqueadores de IL2,

ya sea PC61 mIgG1 o IL2 nAb, anula la actividad terapéutica del anticuerpo no bloqueador de IL–2 7D4 mIgG2a (Figura 24). Esto demuestra que la característica de bloqueo no IL–2 de 7D4 mIgG2a es clave para la actividad terapéutica. También sugiere que la actividad terapéutica de este anticuerpo se basa en la respuesta inmune antitumoral mediada por las células T efectoras, 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 bloqueador anti–CD25 sin IL–2 como se describe aquí en la terapia del cáncer.

[225] **Ejemplo 6:**

El aCD25–a–686 afucosilado se probó en un modelo de cáncer de adenocarcinoma pancreático humano. Ipilimumab y MOXRO0916 se probaron como compuestos de referencia. Ipilimumab es un inhibidor del punto de control inmunitario, que agota las células Treg positivas para CTLA–4.MOXRO0916 es un inmunoagonista dirigido a Ox40, que se ha demostrado que agota las células Treg in vitro.

[226] Las células BXPC3 (células de adenocarcinoma pancreático humano) se obtuvieron originalmente de ECACC (Colección Europea de Cultivos Celulares) y, después de la expansión, se depositaron en el banco de células interno de Glycart. Las células BXPC3 se cultivaron en RPMI que contenía FCS al 10% (PAA Laboratories, Austria), Glutamax al 1%.Las células se cultivaron a 37 ° C en una atmósfera saturada de agua al 5% de CO2. Las células en medio RPMI (w / o) y matrigel 1: 1 (100 uL) se inyectaron por vía subcutánea en el flanco de ratones humanizados anestesiados con una aguja de 22G a 30G.Charles River proporcionó ratones hembra NSG y se trasplantaron internamente con células madre hematopoyéticas humanas (HSC). Los ratones se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos con ciclos diarios de 12 h de luz / 12 h de oscuridad según las pautas comprometidas (GV–Solas; Felasa;

TierschG). El protocolo del estudio experimental fue revisado y aprobado por el gobierno local (ZH193–2014). Después de la llegada, los animales se mantuvieron durante una semana para acostumbrarse a un nuevo entorno y para la observación. El monitoreo continuo de la salud se llevó a cabo de manera regular. Para la humanización, a los ratones se les inyectó busulfano (15 20 mg/kg) y 24 horas después se inyectaron 100,000 HSC humanas (adquiridas de StemCell Technologies).

[227] 14 días antes de la inyección celular, los ratones se sangraron y se examinaron para determinar la cantidad de células T humanas en la sangre y se asignaron al azar en consecuencia. Los ratones fueron inyectados por vía subcutánea el día de estudio 0 con $1x10^{6}$ BxPC3. Los calibradores se midieron de 2 a 3 veces por semana durante todo el experimento con un calibre. En el día 14, los ratones se asignaron al azar para el tamaño del tumor con un tamaño promedio de tumor de 237 mm^3. El día 21, los ratones recibieron ip una sola inyección de vehículo, aCD25–a–686 [4 mg/kg], MOXRO0916 [10 mg/kg] o Ipilimumab [10 mg/kg]. Los grupos de tratamiento fueron vehículo, aCD25–a–686 afucosilado e ipilimumab. Todos los ratones fueron inyectados iv con 200 µl de la solución apropiada. Los ratones en el grupo de vehículo se inyectaron con tampón de histidina. Para obtener la cantidad apropiada de compuesto por 200 µl, las soluciones de reserva se diluyeron con tampón de histidina cuando fue necesario. No se observaron eventos adversos y los ratones toleraron bien el tratamiento. El experimento finalizó el día 24 del estudio.

[228] Los tumores, la sangre y el bazo se recogieron el día de la terminación (día 24) y se almacenaron en PBS hasta la preparación de suspensiones de células individuales. La eritrólisis de muestras de sangre completa se realizó durante 3 minutos a temperatura ambiente utilizando el tampón BD Pharm Lyse (BD, Cat. Nro. 555899) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los esplenocitos se aislaron mediante homogeneización del bazo a través del colador de células (filtro de nylon 70um, BD Falcon) seguido de eritrólisis como

se describe anteriormente. Se prepararon suspensiones de células individuales tumorales utilizando el Disociador suave MACS (Miltenyi) y el homogeneizado se digirió durante 30 minutos a 37 °C con DNAsa I ([0.025 mg/ml], RocheDiagnostics, Cat. Nro. 11284932001) y colagenasa D ([1 mg/ml], RocheDiagnostics, Cat. Nro. 11088882001). Posteriormente, las suspensiones celulares se filtraron a través de filtros de nylon (filtro de nylon 70um, BD Falcon) para eliminar los residuos. Todas las preparaciones se lavaron con exceso de tampón FACS helado. Las células se tiñeron en la superficie con anticuerpos fluorescentes conjugados con colorante CD3 antihumano (clon OKT3, BioLegend, Cat.– 317322), CD4 (clon OKT4, BioLegend, Cat. No. 317434), CD8 (clon SK1, BD, Cat. Nro. 564629), CD25 (clon 2A3, BD Pharmingen, Cat.–No. 335824.), CTLA–4 (clon BNI3, BioLegend, Cat. Nro. 368514) y CD45 (clon, Clon: 2D1, BioLegend, Cat. Nro. 368514) en presencia de CD16 / CD32 anti–ratón de rata purificado (clon 2.4G2, BD, Cat. Nro. 553142) durante 30 min a 4 °C, oscuro, en tampón FACS. Para la detección de FoxP3, las células se tiñeron utilizando el conjunto de tampones de tinción del factor de transcripción Foxp3 (eBioscience, Cat.No.00–5523–00) y el anti–humano FoxP3 (clon 150D / E, eBioscience, Cat. No. 12–4774). 42) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se resuspendieron en tampón FACS antes de que se adquirieran al día siguiente utilizando 5–laser LSR–Fortessa (BD Bioscience con el software DIVA).Tregs (CD45 +, CD3 +, CD4 +, CD25 + FoxP3 +) y células CD8 T activadas (CD45 +, CD3 +, CD8 +, CTLA4 +) se clasificaron, recuentos normalizados (por uL de sangre, mg de bazo o mg de tumor) calculados y valores representados para los respectivos grupos de tratamiento.

[229] <u>Resultados:</u>

El anticuerpo anti – CD25, el aCD25 –a–686 afucosilado, mostró un agotamiento selectivo de las células Treg intratumorales. Se utilizaron ratones humanizados inyectados con BxPC–3, una línea celular de adenocarcinoma

pancreático humano que expresaba CEA. Las células T CD8 y las células Treg se infiltran con el tiempo en el estroma tumoral, pero las células T CD8 no son capaces de controlar el crecimiento del tumor. Los recuentos intratumorales de células T CD8 activadas, así como las células T CD4 reguladoras 72 horas después de la inyección se compararon después de una inyección única de aCD25–a–686 afucosilado, así como MOXRO0916 e Ipilimumab.

[230] Todos los anticuerpos fueron capaces de disminuir los recuentos de Treg intratumoral en comparación con los animales de control tratados con vehículo, pero un aumento del recuento de células T CD8 activadas intratumoral solo fue evidente después de la administración de aCD25–a–686 afucosilado (Figura 27).Por lo tanto, solo el aCD25 –a–686 afucosilado permitió el agotamiento selectivo de la Treg intratumoral, sin alterar la expansión de las células T CD8.Debido a la terminación de todos los animales 72 horas después de la terapia para aislar tumores para la evaluación de linfocitos intratumorales, no fue posible seguir el crecimiento del tumor durante un tiempo prolongado. Sin embargo, ya después de 72 horas hubo una tendencia a la reducción del volumen del tumor en animales tratados con aCD25–a–686 afucosilados en comparación con los animales de control tratados con vehículo.

[231] **Secuencias**

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

SEQ ID NO:	**Descripción de las secuencias de anticuerpos**	**También se conoce como:**
1	CD25 humano	Código uniprot p01589
2	aCD25–a–686 cadena pesada variable CDR1	CD25–a–686–HCDR1 aCD25–a–686–m1 – HCDR1 aCD25–a–686–m3 – HCDR1
3	ACD25–a–686 CDR2 de cadena pesada variable	aCD25–a–686–HCDR2

4	ACD25–a–686 CDR3 de cadena pesada variable	aCD25–a–686–HCDR3 aCD25–a–686–m1–HCDR3 aCD25–a–686–m2–HCDR3 aCD25–a–686–m3–HCDR3 aCD25–a–686–m4–HCDR3 aCD25–a–686–m5–HCDR3
5	aCD25–a–686 CDR de cadena pesada variable 1, 2, 3 y FR 1, 2, 3, 4	aCD25–a–686–HCDR123 secuencia de cadena pesada variable de aCD25–a–686
6	aCD25–a–686 cadena liviana variable CDR1	aCD25–a–686–LCDR1 aCD25–a–686–m1–LCDR1 aCD25–a–686–m2–LCDR1 aCD25–a–686–m3–LCDR1 aCD25–a–686–m4–LCDR1 aCD25–a–686–m5–LCDR1
7	aCD25–a–686 cadena liviana variable CDR2	aCD25–a–686–LCDR2 aCD25–a–686–m1–LCDR2 aCD25–a–686–m2–LCDR2 aCD25–a–686–m3–LCDR2 aCD25–a–686–m4–LCDR2 aCD25–a–686–m5–LCDR2
8	aCD25–a–686 cadena liviana variable CDR3	aCD25–a–686–LCDR3 aCD25–a–686–m1–LCDR3 aCD25–a–686–m2–LCDR3 aCD25–a–686–m3–LCDR3 aCD25–a–686–m4–LCDR3 aCD25–a–686–m5–LCDR3
9	aCD25–a–686 cadena liviana variable CDR 1, 2, 3 y FR 1, 2, 3, 4	aCD25–a–686–LCDR123 aCD25–a–686–m1–LCDR123 aCD25–a–686–m2–LCDR123 aCD25–a–686–m3–LCDR123 aCD25–a–686–m4–LCDR123 aCD25–a–686–m5–LCDR123 secuencia de cadena liviana variable de aCD25–a–686 secuencia de cadena liviana

		variable de aCD25–a–686–m1 secuencia de cadena liviana variable de aCD25–a–686–m2 secuencia de cadena liviana variable de aCD25–a–686–m3 secuencia de cadena liviana variable de aCD25–a–686–m4 secuencia de cadena liviana variable de aCD25–a–686–m5
10	aCD25–a–686–m2 variable cadena pesada CDR1	aCD25–a–686–m2 – HCDR1
11	aCD25–a–686–m4 cadena pesada variable CDR1	aCD25–a–686–m4 – HCDR1
12	aCD25–a–686–m5 cadena pesada variable CDR1	aCD25–a–686–m5 – HCDR1
13	aCD25–a–686–m1 cadena pesada variable CDR2	aCD25–a–686–m1 – HCDR2
14	ACD25–a–686–m2 de cadena pesada CDR2 variable	aCD25–a–686–m2 – HCDR2
15	aCD25–a–686–m3 cadena pesada variable CDR2	aCD25–a–686–m3 – HCDR2
16	aCD25–a–686–m4 cadena pesada variable CDR2	aCD25–a–686–m4 – HCDR2
17	aCD25–a–686–m5 cadena pesada variable CDR2	aCD25–a–686–m5 – HCDR2
18	aCD25–a–686–m1 cadena pesada variable CDR 1, 2, 3 y FR 1, 2, 3, 4	aCD25–a–686–m1–HCDR123 secuencia de cadena pesada variable de aCD25–a–686–m1
19	aCD25–a–686 m2 de cadena pesada CDR 1, 2, 3 y FR 1, 2, 3, 4	aCD25–a–686–m2–HCDR123 secuencia de cadena pesada variable de aCD25–a–686–m2
20	aCD25–a–686–m3 de cadena pesada variable CDR 1, 2, 3 y FR 1, 2, 3, 4	aCD25–a–686–m3–HCDR123 secuencia de cadena pesada variable de aCD25–a–686–m3
21	aCD25–a–686–m4 cadena pesada variable	aCD25–a–686–m4–HCDR123

	CDR 1, 2, 3 y FR 1, 2, 3, 4	secuencia de cadena pesada variable de aCD25–a–686–m4
22	aCD25–a–686–m5 cadena pesada variable CDR 1, 2, 3 y FR 1, 2, 3, 4	aCD25–a–686–m5–HCDR123 secuencia de cadena pesada variable de aCD25–a–686–m5
23	Epítopo	aCD25ep–a
24	Epítopo	aCD25ep–b
25	Epítopo	aCD25ep–c

EQUIVALENTES Y ALCANCE

[232] 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 formas de realización incluidas en el presente documento.

[233] De manera similar, las formas singulares "una", "uno", “el” y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[234] A menos que se defina lo contrario anteriormente, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento también se pueden usar en la práctica o el ensayo de la presente invención. En general, las nomenclaturas utilizadas en relación con las técnicas de cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, genética y proteínas y ácidos nucleicos descritas en este documento son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica, o según las especificaciones del fabricante.

[235] Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se incorporan aquí como referencia para divulgar y describir los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones.

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 Y et 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

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

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

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

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

Hallett W et al., 2008. Biol Blood Marrow Transplant 14:1088–1099;

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

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

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;

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

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

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.

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;

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