

ANTICUERPOS MONOCLONALES QUE SE UNEN ESPECÍFICAMENTE A LA REGIÓN BETA DE LA FAMILIA TRBV-9 DEL RECEPTOR DE CÉLULAS T HUMANO, Y LOS MÉTODOS PARA SU USO.

5

DESCRIPCIÓN

Campo de la invención

La invención se refiere al campo de biotecnología y biomedicina, en particular a anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, así como a su uso. Más
10 específicamente, la presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado monoclonal que se une específicamente a una familia de receptor de células T humanas. La invención también se refiere a un ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, un vector de expresión, a un método para preparar dicho anticuerpo, y al uso de dicho anticuerpo el tratamiento de enfermedades o trastornos
15 asociados con la familia del receptor de células T humanas.

Antecedentes de la invención

Las enfermedades autoinmunes son causadas por linfocitos T autorreactivos (Haroon N et al., Arthritis Rheum. 2013 Oct;65(10):2645-54., Duarte J. et al., PloS One 2010 May 10;5(5):e10558; König M. et al., Front Immunol 2016 Jan 25;7:11). La técnica
20 anterior divulga que una secuencia del receptor de células T (TCR) es un marcador que permite identificar un clon de linfocitos T implicados en la patogénesis de una enfermedad autoinmune. Estructuralmente, las subunidades de los receptores de células T son miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas y se forman a partir de varios segmentos de genes. Las regiones variables de TCR forman el sitio de unión al antígeno de
25 TCR. Esto significa que son específicos de los clones, es decir, difieren en los linfocitos T que responden a antígenos distintos.

En términos de la homología de aminoácidos de segmentos de genes variables (V) dentro del dominio variable TCR, los receptores de células Ts se dividen en diferentes familias. De acuerdo con la nomenclatura IMGT, en la cadena beta se distinguen 26
30 familias distintas, y en la cadena alfa se distinguen 41 familias (Turner SJ et al., Nature

Reviews Immunology 2006, V.6, 883-894). Para determinar la familia de cadenas TCR, se usa el alineamiento múltiple de una secuencia de aminoácidos de prueba y secuencias de cadenas TCR conocidas, cuya información se resume en la base de datos IMGT ("The international ImMunoGeneTics information system", Lefranc M-P., Nucl Acids Res 2001; 29:207-209) available on the Internet at <http://www.imgt.org>. El alineamiento múltiple y la determinación de una familia de cadenas TCR se pueden realizar utilizando el paquete de software IgBlast.

El documento WO9006758 describe los anticuerpos monoclonales W112 y 2D1 contra las regiones de la cadena β de los dominios variables del receptor de células T humanas, que pertenecen a las familias TRBV5-3 y TRBV8-1, propuestos como un medio para el diagnóstico y la terapia de la artritis reumatoide. Dichos anticuerpos monoclonales reconocen entre 0,3 a 5% de los linfocitos T periféricos que portan TRBV5-3 y el 0,5 a 13% de los linfocitos T periféricos que portan TRBV8-1, respectivamente. Los resultados de muchos estudios que demuestran la participación de los linfocitos T en la patogénesis de la artritis reumatoide dieron lugar al uso de anticuerpos monoclonales específicos para las regiones de la cadena beta de los receptores T. En particular, Brennan et al., Clin Exp Immunol. 1988 Sep; 73(3): 417–423 han demostrado un porcentaje elevado de linfocitos T que portan TRBV5 y TRBV8 en muestras sinoviales de pacientes que sufren de artritis reumatoide en comparación con las sanas. El documento WO9405801 describe anticuerpos monoclonales para el diagnóstico y la terapia de artritis reumatoide que interactúan con un epítipo de la región variable VB3.1 del receptor de células T humanas, que interactúan con la subfamilia TCR V (beta) 3.1.

También se han descrito anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente la 13^o familia de la cadena beta de la TRC de rata. Los modelos animales han demostrado que, con la ayuda de estos anticuerpos, es posible eliminar preventivamente una pequeña población de células T, cuyo receptor T comprende la cadena beta VB13 (células T VB13+), y se ha demostrado que dicho procedimiento protege contra el desarrollo de diabetes tipo I en ratas de línea propensa a la diabetes, y también reduce significativamente el riesgo de desarrollar diabetes inducida por virus (Zhijun Liu et al., Diabetes. 2012 May; 61(5): 1160–

1168.). Al mismo tiempo, el resultado de la eliminación de las células T, cuyo receptor T comprende una familia distinta de la cadena beta (VB16), no difiere de la de los grupos de control. Es importante tener en cuenta que incluso la primera administración de un anticuerpo monoclonal contra VB13 da como resultado una disminución del 60% en el número de células T VB13+ en el bazo de la rata.

Se ha descrito una variante de consenso de TCR autoinmunes en pacientes con espondilitis anquilosante (AS o enfermedad de Bekhterev), se ha demostrado que está presente en el líquido sinovial y en la sangre periférica en pacientes con AS y ausente a la misma profundidad de análisis en donantes sanos, independientemente de su estado de alelo HLA* Faham M. et al., *Arthritis Rheumatol.* 2017;69(4):774-784; Komech E et al. 12th EJI-EFIS Tatra Immunology Conference; 2016 Sep 3-7; Strbske Pleso, Slovakia. Abstract book p. 39). Dichos TCR son miembros de la familia TRBV9 (de acuerdo con la nomenclatura IMGT). Se ha demostrado que los receptores de células T que portan cadenas beta de la familia TRBV9 también están involucrados en el desarrollo de una enfermedad autoinmune como la enfermedad celíaca (Petersen J et al., *J Immunol.* 2015; 194 (12): 6112-22). También se encuentran en la superficie de las células T sujetas a malignización en linfomas de células T y leucemias de células T, que incluyen el linfoma de células T causado por el virus de Epstein-Barr (EBV) (Toyabe S et al., *Clin Exp Immunol.* 2003; 134 (1): 92–97).

La solicitud No. RU2017145662 ha descrito recientemente anticuerpos monoclonales quiméricos capaces de unirse específicamente a la región de la cadena beta de la familia TRBV9 del receptor T humano, que se puede usar en la terapia de enfermedades autoinmunes y oncológicas, cuya patogénesis implica TCR que pertenecen a la familia TRBV9, por ejemplo, AS, enfermedad celíaca y algunos linfomas de células T y leucemias de células T.

Dichos anticuerpos son los únicos anticuerpos conocidos actualmente que se pueden usar para eliminar las células T que portan los TCR de la familia TRBV9. La principal desventaja de dichos anticuerpos es un grado relativamente bajo de humanización, es decir, comprenden regiones constantes de tipo humano y componentes estructurales,

pero tienen un dominio variable de tipo rata. El grado de humanización del fragmento variable de la cadena pesada de dichos anticuerpos es 72%, mientras que el del fragmento variable de la cadena liviana es de 69%.

El anticuerpo monoclonal original incluye:

- 5 1) un dominio variable de la cadena pesada (VH), que comprende 3 regiones hipervariables, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en donde

HCDR1 (de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1,

HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2

- 10 HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No 3;

2) un dominio variable de su cadena liviana (VL), que comprende 3 regiones hipervariables LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde:

LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4,

LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5,

- 15 LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

El anticuerpo monoclonal original anterior incluye los dominios variables de las cadenas pesada y liviana, que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO: 8 y 10.

- 20 El anticuerpo monoclonal original anterior incluye una cadena liviana, que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID No. 12, y una cadena pesada del anticuerpo, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No. 14.

Los ejemplos de secuencias de nucleótidos que codifican dichas secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas y livianas del anticuerpo original anterior se muestran en las SEQ ID NOs: 13 y 11.

- 25 La invención está dirigida a la generación de un anticuerpo monoclonal, que se puede usar para eliminar las células T que portan los TCR de la familia TRBV9, en particular para la terapia de AS, enfermedad celíaca y enfermedades sanguíneas malignas, cuya patogénesis implica los TCR de la familia TRBV9, y que se caracteriza por un alto grado de humanización. Al mismo tiempo, la humanización a menudo lleva a una disminución

crítica en la afinidad y/o solubilidad del anticuerpo. Por lo tanto, es una tarea relevante generar anticuerpos funcionales humanizados.

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal humanizado y
5 fragmento de unión al antígeno del mismo, que tiene la capacidad de unirse
específicamente con alta afinidad a la región de la cadena beta de la familia TRBV9 del
receptor T humano. Un anticuerpo de acuerdo con la invención se puede usar como un
medicamento para tratar enfermedades autoinmunes y oncológicas, cuya patogénesis
involucra los TCR pertenecientes a la familia TRBV9, por ejemplo, AS, enfermedad celíaca y
10 algunos linfomas de células T y leucemias de células T.

En formas de realización preferidas, un anticuerpo de la presente invención
comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) con tres regiones hipervariables

- 1) HCDR 1 (de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat) tiene la secuencia
de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1,
- 15 2) HCDR 2 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2
- 3) HCDR 3 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No 3;
- 2) un dominio variable de la cadena liviana (VL) con tres regiones hipervariables,
LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde:

- LCDR 1 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4,
- 20 LCDR 2 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5,
- LCDR 3 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

A menos que se indique específicamente lo contrario, el conocido esquema de
numeración de Kabat se usa de aquí en adelante para determinar las CDR de los
anticuerpos.

25 De este modo, los dominios variables de la cadena pesada y liviana del anticuerpo
comprenden sustituciones de aminoácidos en los fragmentos FR de los dominios variables
de la cadena pesada y liviana, que aumentan el grado de humanización del anticuerpo en
comparación con el original.

En algunas formas de realización, el dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención comprende al menos 10 sustituciones de aminoácidos humanizantes en comparación con el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo original, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID No 8.

5 En formas de realización preferidas, el dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID No: 16.

En algunas formas de realización, el dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención comprende otras sustituciones de aminoácidos que no alteran la especificidad del anticuerpo.

10 En algunas formas de realización, el dominio variable de la cadena liviana de un anticuerpo de la presente invención comprende al menos 10 sustituciones de aminoácidos humanizantes en comparación con el dominio variable de la cadena liviana del anticuerpo original, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID No 10.

En formas de realización preferidas, el dominio variable de la cadena liviana de un anticuerpo de la presente invención tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO 18.

En algunas formas de realización, el dominio variable de la cadena liviana de un anticuerpo de la presente invención comprende otras sustituciones de aminoácidos que no alteran la especificidad del anticuerpo.

En algunas formas de realización, los anticuerpos monoclonales de la invención son anticuerpos IgG humanos de longitud completa, por ejemplo, IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4.

En algunas formas de realización, un anticuerpo de la invención incluye una cadena pesada, cuya secuencia de aminoácidos es al menos 85% idéntica, o al menos 90% idéntica, o al menos 91% idéntica, o al menos 92%, o al menos 93% idéntica, o al menos 94%, o al menos 95%, o al menos 96%, o al menos 97%, o al menos 98% o al menos 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20.

En algunas formas de realización, un anticuerpo de la invención incluye una cadena liviana, cuya secuencia de aminoácidos es al menos 85% idéntica, o al menos 90% idéntica, o al menos 91% idéntica, o al menos 92%, o al menos 93% idéntica, o al menos

94%, o al menos 95%, o al menos 96%, o al menos 97%, o al menos 98% o al menos 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

En algunas formas de realización, un anticuerpo tiene una cadena liviana, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 22, and a cadena pesada, cuya
5 secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 20.

También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican los dominios variables de la cadena pesada y liviana de un anticuerpo de acuerdo con la invención, ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y livianas de los anticuerpos de acuerdo con la invención y sus fragmentos funcionales.

10 También se proporcionan casetes de expresión y vectores de expresión que incluyen un ácido nucleico de la presente invención y elementos reguladores necesarios para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped seleccionada. El vector o casete de expresión puede estar presente en la célula huésped como un elemento extracromosómico o integrado en el genoma celular como resultado de la introducción
15 (por transfección) de dicho casete o vector de expresión en la célula.

Además, se proporcionan células y líneas celulares estables que incluyen ácidos nucleicos, vectores o casetes de expresión de la presente invención, y métodos para su preparación.

También se proporciona un método para producir el anterior anticuerpo o
20 fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende cultivar la célula huésped anterior en un medio de cultivo en condiciones que aseguren la producción de dicho anticuerpo. En algunas realizaciones, un método incluye el posterior aislamiento y purificación del anticuerpo resultante.

También se proporciona a composición farmacéutica para prevenir o tratar una
25 enfermedad o trastorno mediado por la región de la cadena beta de la familia TRBV9 del receptor T humano, que comprende el anterior anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En una de las formas de realización, una composición farmacéutica está destinada a prevenir o tratar una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo: espondilitis anquilosante, enfermedad celíaca, leucemia de células T, linfoma de células T.

5 También se proporciona una combinación farmacéutica para prevenir o tratar a enfermedad o trastorno mediado por el receptor de células T humanas que portan la cadena beta de la familia TRBV9, que comprende el anterior anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo y al menos otro compuesto terapéuticamente activo.

En una de las formas de realización, una combinación farmacéutica está destinada a prevenir o tratar una enfermedad o trastorno que se selecciona del grupo: espondilitis
10 anquilosante, enfermedad celíaca, leucemia de células T, linfoma de células T.

En una forma de realización, una combinación o composición farmacéutica comprende otro compuesto terapéuticamente activo que se selecciona de una molécula pequeña, anticuerpo o hormonas esteroideas, tal como los corticosteroides.

También se proporciona un método para inhibir la actividad biológica del receptor
15 de células T, cuya cadena beta pertenece a la familia TRBV9, en un sujeto que necesita dicha inhibición, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva del anticuerpo anterior o fragmento de unión al antígeno del mismo.

También se proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por el receptor de células T humanas que portan la cadena beta de la familia
20 TRBV9, que comprende administrar a un sujeto que necesita tal tratamiento el anterior anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo o dicha composición farmacéutica, en una cantidad terapéuticamente efectiva.

En una de las formas de realización del método para tratar una enfermedad o trastorno, la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo: espondilitis anquilosante,
25 enfermedad celíaca, leucemia de células T, linfoma de células T.

También se proporciona el uso del anterior anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo o la anterior composición farmacéutica para tratar a un sujeto que necesita tal tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por el receptor de células T humanas que portan la cadena beta de la familia TRBV9.

En una de las formas de realización de uso, la enfermedad se selecciona del grupo: espondilitis anquilosante, enfermedad celíaca, leucemia de células T, linfoma de células T.

El resultado técnico de la presente invención consiste en obtener anticuerpos con un alto grado de humanización, que se unen específicamente con alta afinidad a los TCR, 5 cuya cadena beta pertenece a la familia TRBV9, y se puede usar para tratar enfermedades autoinmunes y oncológicas, cuya patogénesis implica TCR, cuya cadena beta pertenece a la familia TRBV9.

En formas de realización preferidas, un fragmento variable de la cadena pesada del anticuerpo se caracteriza por un grado de humanización de 87%. En formas de realización 10 preferidas, un fragmento variable de la cadena liviana del anticuerpo se caracteriza por un grado de humanización de 85%.

Breve descripción de los dibujos.

La Figura 1 muestra el resultado de clasificar los linfocitos T usando el anticuerpo MA-042.

15 La Figura 2 muestra el resultado de la citometría de flujo de linfocitos T después de un ensayo de actividad citotóxica en presencia del anticuerpo MA-042 a una concentración de 1 ng/ml (derecha) y 1 µg/ml (izquierda). El rectángulo muestra la población de CD45+CD3+TRBV9+.

La Figura 3 muestra el número de linfocitos T muertos en función de la concentración de 20 MA-042 para determinar la concentración media efectiva de MA-042 (CE50) en un ensayo de citotoxicidad.

Descripción detallada de la invención.

La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales aislados y fragmentos 25 funcionales de los mismos que tienen la capacidad de unirse específicamente a la región de la cadena beta de la familia TRBV9 del receptor T humano, con un mayor grado de humanización con respecto a los análogos. También se proporcionan ácidos nucleicos que

codifican anticuerpos y fragmentos de los mismos de la invención, casetes de expresión y vectores de expresión que incluyen un ácido nucleico de la presente invención y elementos reguladores necesarios para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped seleccionada. Además, se proporcionan células y líneas celulares estables que
5 incluyen ácidos nucleicos, vectores o casetes de expresión de la presente invención. También se proporciona un método para producir un anticuerpo monoclonal o un fragmento funcional del mismo, una composición farmacéutica y una combinación farmacéutica que comprende en una cantidad efectiva de un anticuerpo de la presente invención en combinación con uno o más excipientes, diluyentes o portadores
10 farmacéuticamente aceptables, y métodos para el diagnóstico y la terapia de AS y otras enfermedades usando anticuerpos de la presente invención.

Definiciones.

La invención se entenderá más fácilmente con la definición de algunos términos
15 primero.

Se entiende que los materiales y métodos proporcionados en la presente no se limitan a composiciones particulares y etapas del método, ya que pueden variar. Cabe señalar que, como se usa en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares incluyen la referencia plural correspondiente a menos que el contexto indique
20 claramente lo contrario.

El "receptor de células T" humano, también denominado como "TCR", "receptor T", es un complejo proteico heterodimérico que se encuentra en la superficie de un linfocito T. El receptor T está presente solo en los linfocitos T. La función principal de TCR es reconocer específicamente los antígenos procesados unidos a las moléculas del complejo
25 de histocompatibilidad mayor (HLA).

El TCR humano consiste en dos subunidades, cadenas α y β , o cadenas γ y δ , conectadas a través de un enlace disulfuro y acopladas a la membrana celular. Cada una de las cadenas de TCR tiene un dominio variable (V) N-terminal, un dominio de conexión y un dominio constante (C) conectado a un dominio transmembrana que ancla el receptor

en la membrana plasmática de linfocitos T. La longitud del dominio constante de las cadenas alfa y beta es de 91 y 129 residuos de aminoácidos, respectivamente. La longitud del dominio de conexión y transmembrana de la cadena alfa es de 30 y 17 residuos de aminoácidos (AAR), y la de la cadena beta es de 21 y 22 AAR. La longitud de los dominios variables de los receptores T varía de 104 a 125 AAR.

Una pequeña fracción de linfocitos T tiene los receptores T de tipo γ/δ . Están dispuestos de forma similar a los receptores α/β , pero difieren en su estructura primaria y tienen una serie de características funcionales. Exhiben una variabilidad mucho más baja (especificidad de clon limitada), reconocen antígenos en el complejo con moléculas presentadoras de antígeno "no clásicas" (no MHC) o incluso antígenos libres.

El receptor T reacciona con el complejo MHC/antígeno a través de seis regiones determinantes de complementariedad del mismo (CDR): tres regiones de cadena alfa y tres regiones de cadena beta. Estas CDR son regiones hipervariables, los bucles de dominios variables del receptor de células T, Valfa y Vbeta.

Los términos "TRBV9" o "familia TRBV9" se refieren a la novena familia de cadenas beta de receptores de células T, que se distingue de acuerdo con la nomenclatura IMGT, que se caracteriza porque la secuencia de aminoácidos de dominio variable de los mismos comprende motivos únicos de CDR1 (la secuencia de aminoácidos es S-G-D-L-S) y CDR2 (la secuencia de aminoácidos es Y-Y-N-G-E-E). El término "TCR de la familia TRBV9" se refiere a un receptor de células T, cuya cadena beta pertenece a la familia TRBV9.

El término "patológico" en relación con los linfocitos T o TCR significa que dicho TCR o un linfocito T que porta TCR están asociados con una enfermedad o patología y/o causan una enfermedad y/o contribuyen al desarrollo de una enfermedad.

El término "autoinmune" en relación con TCR significa que dicho TCR está involucrado en el desarrollo de una enfermedad autoinmune.

El término "anticuerpo" como se usa en la presente se refiere a una molécula de inmunoglobulina que consiste en cuatro cadenas de polipéptidos (dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L)) unidas por enlaces disulfuro. Las cadenas livianas se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican en gamma, mu, alfa,

delta o épsilon; determinan el isotipo del anticuerpo, tal como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente, y varios de ellos se pueden dividir en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Cada tipo de cadena pesada se caracteriza por una región constante específica.

5 Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada en la presente como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena liviana comprende una región variable de la cadena liviana (abreviada en la presente como LCVR o VL) y una región constante de la cadena liviana. La región constante de la
10 cadena liviana comprende un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), rodeadas de regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada VH y VL está compuesto por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal en el
15 siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

En la presente solicitud, 3 CDR de cadena pesada se denominan "HCDR1, HCDR2 y HCDR3", mientras que 3 CDR de cadena liviana se denominan "LCDR1, LCDR2 y LCDR3". Las CDR contienen la mayoría de los residuos que interactúan específicamente con el antígeno. Los residuos CDR-amino dentro de HCVR y LCVR de anticuerpos de acuerdo con
20 la presente invención están numerados y posicionados de acuerdo con el conocido esquema de numeración de Kabat, a menos que se indique lo contrario. La presente solicitud incluye los códigos de letras convencionales para aminoácidos, a menos que se indique lo contrario.

Los términos "anticuerpo anti-TRBV9", "anticuerpo contra TRBV9", "anticuerpo que
25 se une específicamente a la cadena beta de la familia TRBV9" y "anticuerpo contra la cadena beta de la familia TRBV9" son intercambiables en el contexto de la presente solicitud y se refieren a un anticuerpo que se une específicamente al epítipo de la cadena beta de la familia TRBV9 del receptor de células T humanas.

Además, el "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente solicitud puede ser un fragmento Fv de cadena simple que se puede obtenerse mediante la unión al ADN que codifica LCVR y HCVR a una secuencia ligadora (ver Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, p. 269-315, 1994). Se contempla que, independientemente de si se mencionan fragmentos o porciones, el término "anticuerpo" como se usa en la presente solicitud incluye dichos fragmentos o porciones, así como formas de cadena simple. Mientras la proteína mantenga su capacidad de unión específica o preferible a su blanco (por ejemplo, epítipo o antígeno), estará cubierta por el término "anticuerpo". Los anticuerpos pueden estar glicosilados o no y todavía están dentro del alcance de la invención.

Los términos "anticuerpo" y "anticuerpo monoclonal" para los fines de la presente solicitud se refieren a un anticuerpo monoclonal contra el TCR de la familia TRBV9. Como se usa en la presente, "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo de roedores, primates o familia Camelidae, con preferencia un anticuerpo murino, mono, camello o llama, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o anticuerpo completamente humano, a menos que se indique lo contrario.

La población de "anticuerpos monoclonales" se refiere a una población de anticuerpos homogénea o sustancialmente homogénea (es decir, al menos aproximadamente 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96%, con más preferencia al menos aproximadamente 97 o 98%, o incluso con más preferencia al menos el 99% de los anticuerpos en la población competirán por el mismo antígeno/epítipo en ELISA, o con más preferencia los anticuerpos son idénticos en términos de sus secuencias de aminoácidos). Los anticuerpos pueden estar glicosilados o no, pero aún estar dentro del alcance de la invención. Los anticuerpos monoclonales pueden ser homogéneos si tienen una secuencia de aminoácidos idéntica, aunque pueden diferir en la modificación post-traducción, por ejemplo, un patrón de glicosilación.

Las regiones variables de cada par de cadena liviana/pesada forman sitios de unión al antígeno de un anticuerpo. Como se usa en esta solicitud, una "parte de unión al antígeno", o "región de unión al antígeno", o "dominio de unión al antígeno" o "sitio de

unión al antígeno" se relacionan indistintamente con dicha parte de una molécula de anticuerpo que comprende residuos de aminoácidos que interactúan con el antígeno y le dan al anticuerpo especificidad y afinidad en relación con el antígeno. Esta parte de un anticuerpo incluye los residuos de aminoácidos "estructurales" necesarios para mantener la conformación adecuada de los residuos de unión al antígeno.

El término "anticuerpo humano", como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo, en el que las secuencias de dominios variables y constantes se derivan de secuencias humanas. Los anticuerpos humanos de acuerdo con la invención pueden incluir residuos de aminoácidos que no son típicos de los seres humanos (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis in vitro no dirigida o específica del sitio o mutación somática in vivo), por ejemplo, en CDR, y particularmente, en CDR3.

El término "humanizado", cuando se usa en referencia a anticuerpos, se usa para referirse a anticuerpos que se caracterizan por la presencia de regiones constantes y componentes estructurales similares a los humanos, pero que tienen regiones determinantes de complementariedad (CDR) que son típicas de las inmunoglobulinas de otros origen, o de fragmentos correspondientes de anticuerpos modificados.

Un anticuerpo "original", como se usa en esta solicitud, es un anticuerpo codificado por una secuencia de aminoácidos que se usa para obtener una variante. El anticuerpo original puede ser de anticuerpo de roedor, llama, quimérico, humanizado o humano.

El término "grado de humanización" en relación con los anticuerpos se usa para referirse al porcentaje de identidad de la secuencia de la región estructural del anticuerpo humanizado con una región estructural aceptora humana original que se utilizó para generar el anticuerpo humanizado y que se puede obtener de una biblioteca humana. Con preferencia, un anticuerpo de la invención comprende una región estructural que tiene al menos 80% de identidad, típicamente al menos 82%, más frecuentemente al menos 83%, por ejemplo, al menos 84%, o al menos 85%, o al menos 86%, o al menos 87% de identidad en relación con la región estructural obtenida de la biblioteca humana.

El término "sustituciones humanizantes" se refiere a sustituciones de aminoácidos que aumentan el grado de humanización de un anticuerpo o fragmento del mismo.

El término "quimérico" en referencia a los anticuerpos de la presente invención se usa para referirse a anticuerpos que se caracterizan por regiones constantes de tipo humano pero que tienen regiones variables de otro origen. En tales anticuerpos, los dominios variables de cadenas livianas y/o pesadas de origen no humano (por ejemplo, de origen de rata) están operativamente unidos a los dominios constantes de las cadenas correspondientes de origen humano.

El término "operativamente unido" o similar, cuando se usa para describir anticuerpos, se refiere a secuencias de polipéptidos que se colocan en una relación física (covalente, a menos que se indique lo contrario) y funcional entre sí. En las realizaciones más preferidas, las funciones de los componentes polipeptídicos de la molécula quimérica no cambian en comparación con las propiedades funcionales de los componentes polipeptídicos aislados. El término "unido operativamente" o similar, cuando se usa para describir ácidos nucleicos, significa que los ácidos nucleicos están unidos covalentemente para que no haya cambios en el marco de lectura y los codones de detención estén presentes en los puntos donde están unidos. Como es obvio para los expertos en la técnica, las secuencias de nucleótidos que codifican una proteína quimérica que comprende componentes "unidos operativamente" (proteínas, polipéptidos, secuencias ligadoras, dominios de proteínas, etc.) consisten en fragmentos que codifican dichos componentes, en donde dichos fragmentos están unidos covalentemente de modo que se produce una proteína quimérica de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo quimérico de acuerdo con la invención, durante la traducción y transcripción de la secuencia de nucleótidos.

Como se usa en la presente, el término "aislado" significa una molécula o una célula que se encuentran en un ambiente diferente del ambiente en el que la molécula o célula está in vivo.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la presente invención son recombinantes, es decir, obtenidos usando la técnica de ADN recombinante. El término "anticuerpo recombinante", como se usa en la presente, incluye todos los anticuerpos que se obtienen, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos

expresados usando un vector de expresión recombinante introducido en una célula huésped, anticuerpos aislados de un conjunto de bibliotecas combinatorias de anticuerpos humanos recombinantes, anticuerpos aislados de un animal que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (ver, por ejemplo, Taylor LD y col. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295). En algunas realizaciones, los anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis in vitro (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática in vivo) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien se derivan y se relacionan con secuencias de VH y VL de línea germinal humana, no pueden existir naturalmente dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos in vivo.

El término "se une específicamente" como se usa en esta solicitud se refiere a la situación en la que un miembro de un par de unión específico no se une significativamente a moléculas distintas de los compañeros de unión específicos del mismo. El término también es aplicable cuando, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención es específico para un epítopo particular que portado por varios antígenos; en este caso, el anticuerpo específico que comprende el dominio de unión al antígeno podrá unirse específicamente a varios antígenos que portan el epítopo. Por consiguiente, un anticuerpo monoclonal de la invención se une específicamente al epítopo de la cadena beta de la familia TRBV9 del receptor de células T humanas, mientras que no se une específicamente a las cadenas beta de TCR de otras familias y las cadenas alfa de TCR.

El término "epítopo" se refiere a la parte de una molécula capaz de ser reconocida y unida por un anticuerpo en una o más de las regiones de unión al antígeno del anticuerpo. Los epítopos a menudo consisten en una agrupación de moléculas de superficie químicamente activa, tal como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

Como se usa en la presente, el término "epítopo", entre otros, se refiere a un fragmento de polipéptido, que tiene actividad antigénica y/o inmunogénica en un animal, con preferencia en un mamífero, por ejemplo, un ratón, rata o ser humano. El término "epítopo antigénico" como se usa en esta solicitud es un fragmento de polipéptido que puede unirse específicamente al anticuerpo y se puede detectar mediante cualquier técnica bien conocida de la técnica anterior, por ejemplo, mediante el inmunoensayo estándar. Los epítopos antigénicos no son necesariamente inmunogénicos, sin embargo, pueden ser inmunogénicos. El "epítopo inmunogénico" como se usa en la presente se define como un fragmento de polipéptido que evoca una respuesta de anticuerpos en animales, según se determina por cualquier método conocido de la técnica anterior. El "epítopo no lineal" o el "epítopo conformacional" comprenden polipéptidos (o aminoácidos) no adyacentes dentro de una proteína antigénica que se une al anticuerpo específico del epítopo.

Las frases "propiedad biológica" o "característica biológica", o los términos "actividad" o "bioactividad" en referencia a un anticuerpo o fragmentos funcionales del mismo de la presente invención se usan indistintamente en esta solicitud e incluyen, pero sin limitación, la afinidad y especificidad del epítopo/antígeno, la capacidad de neutralizar o antagonizar la actividad de TCR que incluye la cadena beta que pertenece a la familia TRBV9.

Otras propiedades biológicas identificables de un anticuerpo incluyen, por ejemplo, reactividad cruzada (es decir, con homólogos no humanos de un péptido blanco, o con otras proteínas o tejidos, en general), y la capacidad de preservar altos niveles de expresión de proteínas en células mamíferas. Las propiedades o características mencionadas anteriormente se pueden observar, medir y/o evaluar usando técnicas reconocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, ELISA, ELISA competitivo, análisis de resonancia de plasmón superficial BIACORE o KINEXA, ensayos de inhibición in vitro o in vivo sin limitación., ensayos de unión al receptor, ensayos de producción y/o secreción de citoquinas o factores de crecimiento, y transducción de señales e

inmunohistoquímica de secciones de tejido obtenidas de diversas fuentes, que incluyen fuentes humanas, primates o de cualquier otro tipo.

Los términos "inhibir" o "neutralizar" como se usan en esta solicitud con respecto a la actividad de un anticuerpo de la invención se refieren a la capacidad de antagonizar sustancialmente, prohibir, prevenir, restringir, lentificar, interrumpir, eliminar, detener, reducir, por ejemplo de progresión o gravedad de lo que se inhibe que incluye, pero sin limitación a lo anterior, la actividad biológica del anticuerpo, o propiedad, enfermedad o afección.

Como se usa en la presente, el término "mutante" o "variante" se refiere a un anticuerpo descrito en la presente invención, en el que se añaden y/o sustituyen y/o suprimen y/o insertan uno o más aminoácidos en el extremo N-terminal y/o C-terminal y/o dentro de las secuencias de aminoácidos nativas de los anticuerpos de la presente invención o fragmentos de los mismos. Como se usa en la presente, el término "mutante" también se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína mutante. Además, el término "mutante" se refiere a cualquier variante que sea más corta o más larga que la proteína o el ácido nucleico.

El término "homología" se usa para describir la relación de las secuencias de nucleótidos o aminoácidos con otras secuencias de nucleótidos o aminoácidos, que se determina por el grado de identidad y/o similitud entre dichas secuencias que se comparan.

Como se usa en la presente, una secuencia de aminoácidos o nucleótidos es "sustancialmente similar" o "sustancialmente igual" que una secuencia de referencia si la secuencia de aminoácidos o nucleótidos tiene al menos un 85% de identidad con una secuencia especificada dentro de una región seleccionada para comparación. Por lo tanto, secuencias sustancialmente similares incluyen aquellas que tienen, por ejemplo, al menos 90% de identidad, o al menos 91% de identidad, o al menos 92% de identidad, o al menos 93% de identidad, o al menos 94% de identidad, o al menos 95% de identidad, o al menos 96% de identidad, o al menos 97% de identidad, o al menos 98% de identidad, o al menos

99% de identidad. Dos secuencias que son idénticas entre sí también son sustancialmente similares.

La identidad de secuencia se determina sobre la base de una secuencia de referencia. Los algoritmos para el análisis de secuencia son conocidos en la técnica, tal como se describe en IgBLAST de Ye et al. Nucleic Acids Res. 2013, W34-40. Para los propósitos de la presente invención, para determinar el nivel de identidad y similitud entre las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos, las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se pueden comparar con la ayuda del paquete de software IgBLAST proporcionado por el National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) usando el alineamiento con brechas con parámetros estándar. Para calcular el porcentaje de identidad, se usa la longitud completa de una secuencia de referencia, por ejemplo, una región variable.

Una referencia a un polipéptido "codificador" de secuencia de nucleótidos significa que el polipéptido se produce a partir de la secuencia de nucleótidos durante la traducción y transcripción del ARNm. De este modo, se puede indicar una cadena codificadora idéntica al ARNm y típicamente utilizada en la lista de secuencias y una cadena complementaria que sirve como molde para la transcripción. Como es obvio para los expertos en la técnica, el término también incluye cualquier secuencia de nucleótidos degenerada que codifica la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido incluyen secuencias que comprenden intrones.

Anticuerpos.

Como se mencionó anteriormente, la presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales humanizados aislados y fragmentos funcionales de los mismos que tienen la capacidad de unir específicamente a la región de la cadena beta de la familia TRBV9 del receptor T humano.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden ser anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, y se pueden usar como un medicamento para tratar AS y otras enfermedades, cuya patogénesis

implica TCR que pertenecen a la familia TRBV9, por ejemplo, enfermedad celíaca o linfoma de células T.

Un anticuerpo de acuerdo con la invención es monoclonal. Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden producir usando, por ejemplo, técnicas de hibridoma bien conocidas en la materia, así como tecnologías recombinantes, tecnologías de despliegue en fagos, tecnologías sintéticas o combinaciones de tales tecnologías u otras tecnologías bien conocidas en la técnica. El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en esta solicitud se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una copia única o un clon que incluye, por ejemplo, cualquier clon eucariota, procariota o fago, en lugar del método de producción del mismo.

Los anticuerpos humanizados y quiméricos se pueden generar mediante síntesis de péptidos o usando técnicas de ADN recombinante como se describe en la sección "Ácidos nucleicos" a continuación.

En algunas formas de realización, los anticuerpos de la presente invención son quiméricos y caracterizados porque tienen dominios variables de las cadenas liviana y pesada de origen no humano (por ejemplo, de origen de rata o murino), y dominios constantes de origen humano.

Un anticuerpo de la presente invención comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) con tres regiones hipervariables

1) HCDR1 (de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1,

2) HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2

3) HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No 3;

2) un dominio variable de la cadena liviana (VL) con tres regiones hipervariables, LCDR1, LCDR2 and LCDR3, en donde:

LCDR 1 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4,

LCDR 2 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5,

LCDR 3 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

A menos que se indique específicamente lo contrario, el bien conocido esquema de numeración de Kabat se usa de aquí en adelante para determinar las CDR de los anticuerpos.

5 En todas las realizaciones, los dominios variables de la cadena liviana y pesada de un anticuerpo de la presente invención son humanizados y diferentes de los del anticuerpo original ein sustituciones de aminoácidos humanizantes, en donde los dominios variables de la cadena pesada y liviana del anticuerpo comprenden sustituciones de aminoácidos en los fragmentos FR de los dominios variables de la cadena pesada y liviana, lo que aumenta el grado de humanización del anticuerpo en comparación con el original.

10 En algunas formas de realización, el dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención comprende al menos 10 sustituciones de aminoácidos humanizantes en comparación con el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo original, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID No 8.

15 En formas de realización preferidas, el dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID No: 16.

En algunas formas de realización, el dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención comprende otras sustituciones de aminoácidos que no alteran la especificidad del anticuerpo.

20 En algunas formas de realización, el dominio variable de la cadena liviana de un anticuerpo de la presente invención comprende al menos 10 sustituciones de aminoácidos humanizantes en comparación con el dominio variable de la cadena liviana del anticuerpo original, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID No 10.

25 En formas de realización preferidas, el dominio variable de la cadena liviana de un anticuerpo de la presente invención comprende sustituciones de aminoácidos y tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO 18.

En algunas formas de realización, el dominio variable de la cadena liviana de un anticuerpo de la presente invención comprende otras sustituciones de aminoácidos que no alteran la especificidad del anticuerpo.

En algunas formas de realización, los anticuerpos monoclonales de la invención son anticuerpos IgG humanos de longitud completa, por ejemplo, IgG1 o IgG2 o IgG3 o IgG4.

En algunas formas de realización, un anticuerpo de la invención incluye una cadena pesada, cuya secuencia de aminoácidos es al menos 85% idéntica, o al menos 90% idéntica, o al menos 91% idéntica, o al menos 92%, o al menos 93% idéntica, o al menos 94%, o al menos 95%, o al menos 96%, o al menos 97%, o al menos 98% o al menos 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20.

En algunas formas de realización, un anticuerpo de la invención incluye una cadena liviana, cuya secuencia de aminoácidos es al menos 85% idéntica, o al menos 90% idéntica, o al menos 91% idéntica, o al menos 92%, o al menos 93% idéntica, o al menos 94%, o al menos 95%, o al menos 96%, o al menos 97%, o al menos 98% o al menos 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

En algunas formas de realización, un anticuerpo tiene una cadena liviana, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 22, and a cadena pesada, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 20.

Como se sabe de la técnica anterior, las mutaciones se pueden introducir en secuencias de anticuerpos, que incluyen dominios variables, que no alteran sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse a un antígeno. Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención también pueden contener mutaciones adicionales que no conducen a una pérdida en la capacidad del anticuerpo para unirse a la cadena beta de la familia TRBV9 de TCR, pero pueden producir una disminución de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos o un aumento en afinidad u otras propiedades biológicas de los anticuerpos. En particular, es bien conocido por la técnica anterior, que se pueden hacer sustituciones conservadoras de aminoácidos en una secuencia de anticuerpos. La "sustitución conservadora" en el contexto de esta solicitud se refiere a una sustitución en la que un residuo de aminoácido se reemplaza con otro residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de los residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares son bien conocidas en la técnica, que incluyen cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas

laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargados (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales β -ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Con preferencia, las regiones CDR3 en los dominios VL y/o VH incluyen no más de cinco sustituciones conservadoras de aminoácidos, más frecuentemente no más de tres sustituciones conservadoras. Típicamente, las sustituciones conservadoras no se realizan en posiciones de aminoácidos que son críticas para unir el epítipo de la cadena beta de la familia TRBV9.

Las variantes anteriores (mutantes) de anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden obtener mediante síntesis de péptidos o usando técnicas de ADN recombinante como se describe en la sección "Ácidos nucleicos" a continuación.

En formas de realización preferidas, el anticuerpo comprende la región constante de la cadena pesada, tal como la región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, IgD humana. Con preferencia, la región constante de la cadena pesada es una región constante de la cadena pesada de IgG1 humana. Además, un anticuerpo puede comprender una región constante de la cadena liviana o una región constante de la cadena liviana kappa o una región constante de la cadena liviana lambda. Con preferencia, un anticuerpo comprende una región constante de la cadena liviana kappa.

En formas de realización preferidas, un fragmento variable de la cadena pesada del anticuerpo se caracteriza por grado de humanización de 87%. En formas de realización preferidas, un fragmento variable de la cadena liviana del anticuerpo se caracteriza por grado de humanización de 85%.

También se proporcionan fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos de la presente invención. El término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo (o "fragmento funcional de un anticuerpo" o "fragmento activo de un anticuerpo"), como se usa en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de

unión al antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos en el término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (a) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en dominios VL, VH, CL y CH1; (b) un fragmento F(ab)₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (c) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (d) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo; (e) un fragmento dAb (Ward et al. (1989) Nature 341: 544-546) que consiste en un dominio VH, y (f) una región determinante de complementariedad aislada (CDR).

Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, por métodos recombinantes, mediante un conector sintético que les permite formarse como una cadena de proteínas simple en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); ver, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena simple también se contemplan dentro del término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo. También incluyen otras formas de anticuerpos de cadena simple, tal como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una cadena de polipéptidos simple, pero utilizan un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, lo que fuerza a los dominios a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno (ver, por ejemplo, Holliger P. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak R.J. et al. (1994) Structure 2:1121-1123).

Los fragmentos de anticuerpos, tales como Fab y F(ab')₂, pueden obtener a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como la digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Además, los anticuerpos, los fragmentos de anticuerpos y las moléculas de inmuno adhesión se pueden obtener usando técnicas estándares de ADN recombinante.

Un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo puede ser parte de moléculas de inmunoadhesión más grandes formadas por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o fragmento de anticuerpo con una o más proteínas o péptidos. Los ejemplos de dichas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de una región central de estreptavidina para hacer una molécula scFv tetramérica (Kipriyanov SM et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6: 93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para obtener biomoléculas scFv bivalentes y de tamaño reducido (Kipriyanov SM et al. (1994) Mol. Immunol., 31: 1047-1058). Otros enlaces químicos entre fragmentos de anticuerpos también son bien conocidos por el estado de la técnica.

Los anticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos de acuerdo con la invención están presentes en forma aislada, es decir, dicha proteína está sustancialmente libre de la presencia de otras proteínas u otras moléculas biológicas naturales, tales como oligosacáridos, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, etc. ., en donde el término "sustancialmente libre" en este caso significa que menos del 70%, típicamente menos del 60%, y más frecuentemente menos del 50% de dicha composición que comprende la proteína aislada es otra molécula biológica natural. En algunas realizaciones, dichas proteínas están presentes en forma sustancialmente purificada, en donde el término "forma sustancialmente purificada" significa una pureza igual a al menos 95%, típicamente igual a al menos 97%, y más a menudo igual a al menos 99%.

Los métodos para purificar un anticuerpo obtenido mediante técnicas recombinantes o de hibridoma son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, la purificación se puede realizar por cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, especialmente afinidad por los antígenos específicos Proteína A o Proteína G) y cromatografía en columna de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o cualquier otra técnica estándar para purificar proteínas. Además, los anticuerpos obtenidos por la tecnología de acuerdo con la presente invención o sus fragmentos se pueden fusionar con secuencias de polipéptidos heterólogos (por ejemplo, una etiqueta de histidina) para facilitar la purificación.

La afinidad de anticuerpos se puede determinar usando el análisis estándar mediante la determinación de las constantes de disociación (KD). KD se calcula usando la ecuación $KD = k_{dis}/k_{on}$, donde k_{dis} es la constante de velocidad de disociación calculada experimentalmente y k_{on} es la constante de velocidad de asociación calculada experimentalmente del complejo anticuerpo-antígeno.

Los anticuerpos preferidos son los que se unen a un antígeno humano con un valor KD de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M; con preferencia no más de aproximadamente 1×10^{-8} M; más frecuentemente no más de aproximadamente 1×10^{-9} M; con más preferencia no más de aproximadamente 1×10^{-10} M, y con máxima preferencia no más de aproximadamente 1×10^{-11} M, por ejemplo, no más de aproximadamente 1×10^{-12} M.

Los anticuerpos preferidos incluyen el anticuerpo MA-042 descrito en detalle en la siguiente sección experimental.

Los anticuerpos y fragmentos de los mismos que se pueden usar en las presentes composiciones y métodos son anticuerpos y fragmentos biológicamente activos, es decir, son capaces de unir los epítomos antigénicos deseados y exhibir el efecto biológico directamente o indirectamente.

Los anticuerpos y sus fragmentos funcionales de acuerdo con la invención son capaces de unir específicamente el epítopo (región) de la cadena beta de la familia TRBV9. En formas de realización preferidas, como resultado de su unión específica a la cadena beta de la familia TRBV9, la inhibición de la actividad de los TCR que incluyen dicha cadena beta. Típicamente, la inhibición asciende con preferencia a al menos aproximadamente 20, o 30, o 40, o 50, o 60, o 70, o 80, o 90, o 95% o mayor.

En algunas formas de realización, un anticuerpo contra la cadena beta de la familia TRBV9 de acuerdo con la invención o un fragmento del mismo puede eliminar células T que portan TCR que comprende la cadena beta de la familia TRBV9. En algunas formas de realización, un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la invención puede proporcionar al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 50%, al menos

aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o aproximadamente 100% de eliminación de linfocitos T.

En una forma de realización preferida de la invención, el anticuerpo es el anticuerpo
5 MA-042.

El anticuerpo MA-042 incluye los dominios variables de la cadena pesada y livianas, que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NOs: 16 and 18.

El anticuerpo MA-042 incluye las cadenas pesada y liviana, que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NOs: 20 y 22, respectivamente.

10

Ácidos nucleicos.

La presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesadas y livianas de un anticuerpo de la presente invención, sus fragmentos funcionales y dominios variables, que se puede usar para obtener anticuerpos quiméricos
15 que incluyen los dominios variables de la invención fusionados operativamente con los dominios constantes conocidos de anticuerpos humanos.

En formas de realización preferidas, un ácido nucleico de la invención codifica un cadena pesada del anticuerpo, cuyo dominio variable contiene 3 regiones hipervariables, HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en donde

20 HCDR1 (de acuerdo con el esquema de numeración de Kabat) tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No 1;

HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No 2;

HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No 3.

En formas de realización preferidas, un ácido nucleico de la invención codifica una
25 cadena liviana del anticuerpo, cuyo dominio variable comprende 3 regiones hipervariables, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde:

LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No 4;

LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No 5;

LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No 6.

En formas de realización preferidas, un ácido nucleico de la invención codifica dominios variables de la cadena pesada y liviana del anticuerpo, que contiene sustituciones de aminoácidos en los fragmentos FR de los dominios variables de la cadena pesada y liviana, que aumentan el grado de humanización del anticuerpo en comparación con el original.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los homólogos y mutantes de dichas cadenas de anticuerpos, fragmentos funcionales y dominios de las mismas también están dentro del alcance de la presente invención.

En algunas formas de realización, un ácido nucleico codifica el dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención, que contiene al menos 10 sustituciones de aminoácidos humanizantes en comparación con el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo original, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID No 8.

En algunas formas de realización, a ácido nucleico codifica un cadena pesada del anticuerpo, cuyo dominio variable tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 16.

En algunas formas de realización, a ácido nucleico codifica una cadena liviana del anticuerpo, cuyo dominio variable comprende al menos 10 sustituciones de aminoácidos humanizantes en comparación con el dominio variable de la cadena liviana del anticuerpo original, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID No 10.

En algunas formas de realización, a ácido nucleico codifica una cadena liviana del anticuerpo, cuyo dominio variable tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID No: 18.

En algunas formas de realización, un ácido nucleico codifica una cadena pesada del anticuerpo, cuya secuencia de aminoácidos es al menos 85% idéntica, o al menos 90% idéntica, o al menos 91% idéntica, o al menos 92%, o al menos 93% idéntica, o al menos 94%, o al menos 95%, o al menos 96%, o al menos 97%, o al menos 98% o al menos 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20.

En algunas formas de realización, un ácido nucleico codifica una cadena liviana del anticuerpo, cuya secuencia de aminoácidos es al menos 85% idéntica, o al menos 90% idéntica, o al menos 91% idéntica, o al menos 92%, o al menos 93% idéntica, o al menos

94%, o al menos 95%, o al menos 96%, o al menos 97%, o al menos 98% o al menos 99% o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22.

Los ejemplos de ácidos nucleicos que codifican cadenas livianas y pesadas de la invención se muestran en las SEQ ID Nos: 19 y 21.

5 Los ácidos nucleicos que codifican los dominios variables de la cadena liviana y pesada de anticuerpo también son de interés. Los ácidos nucleicos que codifican los dominios variables de la cadena liviana y pesada del anticuerpo se pueden usar para la fusión que puede operar con los ácidos nucleicos los correspondientes dominios constantes de los anticuerpos.

10 En algunas formas de realización, a ácido nucleico codifica el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID No: 16.

En algunas formas de realización, a ácido nucleico codifica el dominio variable de la cadena liviana del anticuerpo, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID No:
15 18.

Los ejemplos de ácidos nucleicos que codifican los dominios variables de la cadena pesada y liviana del anticuerpo se muestran en las SEQ ID Nos: 15 and 17.

Como se usa en la presente, una "molécula de ácido nucleico" o "ácido nucleico" es una molécula de ADN, tal como una molécula de ADN genómico o una molécula de ADNc,
20 o una molécula de ARN, tal como una molécula de ARNm. En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico de la presente invención es una molécula de ADN (o ADNc) que contiene un marco de lectura abierto que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención y es capaz, en condiciones adecuadas (por ejemplo, condiciones intracelulares fisiológicas), de ser utilizado para la expresión en un sistema de
25 expresión heterólogo.

En algunas formas de realización, una molécula de ácido nucleico de la presente invención se produce por métodos de ingeniería genética. Los métodos para producir ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la disponibilidad de información de la secuencia de aminoácidos o información de la secuencia de nucleótidos

permite la preparación de moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención mediante síntesis de oligonucleótidos. En el caso de la información de la secuencia de aminoácidos, se pueden sintetizar varios ácidos nucleicos que difieren entre sí debido al código degenerado. Los métodos para seleccionar variantes de codones para un huésped deseado son bien conocidos en la técnica.

Los oligonucleótidos sintéticos se pueden preparar por el método de fosforamidita, y los constructos resultantes se pueden purificar de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, tales como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) u otros métodos como se describe en, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., (1989) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, y bajo las instrucciones descritas en, por ejemplo, United States Dept. of HHS, National Institute of Health (NIH) Guidelines for Recombinant DNA Research. Las moléculas de ADN largas de doble cadena de la presente invención se pueden sintetizar de la siguiente manera: mediante la síntesis de varios fragmentos más pequeños de complementariedad apropiada que comprenden términos apropiados capaces de cohesión con un fragmento adyacente. Los fragmentos adyacentes se pueden unir usando ADN ligasa o un método basado en PCR.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención también se pueden clonar a partir de fuentes biológicas.

La presente invención también abarca ácidos nucleicos que son homólogos, sustancialmente iguales, idénticos o derivados de los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la presente invención.

Los ácidos nucleicos de la invención están presentes en un ambiente distinto de aquel en el que están presentes en la naturaleza, por ejemplo, están aislados, presentes en una cantidad aumentada, presentes o expresados en sistemas in vitro o en células u organismos distintos de aquellos en que están presentes en la naturaleza.

Los cambios o diferencias en la secuencia de nucleótidos entre secuencias de ácido nucleico estrechamente relacionadas pueden representar cambios de nucleótidos en la secuencia que surgen durante el curso de la replicación o duplicación normal. Se pueden

diseñar e introducir específicamente otros cambios en la secuencia para fines específicos, tales como cambiar los codones de aminoácidos específicos o una secuencia de nucleótidos en una región reguladora. Dichos cambios específicos se pueden realizar in vitro usando una variedad de técnicas de mutagénesis o producir en organismos huésped
5 ubicados en condiciones de selección específicas que inducen o seleccionan estos cambios. Dichas variantes de secuencia obtenidas específicamente se pueden denominar "mutantes" o "derivadas" de la secuencia original.

Los ácidos nucleicos mutantes o derivados se pueden obtener en un ácido nucleico molde seleccionado de los ácidos nucleicos anteriores mediante modificación, supresión o
10 adición de uno o más nucleótidos en la secuencia molde, o una combinación de los mismos, para obtener una variante del ácido nucleico molde. Las modificaciones, adiciones o supresiones se pueden realizar por cualquier método conocido en la técnica (ver, por ejemplo, Gustin et al., *Biotechniques* (1993) 14: 22; Barany, *Gene* (1985) 37: 111-123; y Colicelli et al., *Mol. Gen. Genet.* (1985) 199: 537-539, Sambrook et al., *Molecular*
15 *Cloning: A Laboratory Manual*, (1989), CSH Press, pp. 15.3-15.108) que incluyen PCR propensa a errores, transposición, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, PCR de ensamblaje, mutagénesis por PCR sexual, mutagénesis in vivo, mutagénesis de casete, mutagénesis de ensamblaje recursivo, mutagénesis de ensamblaje exponencial, mutagénesis específica de sitio, mutagénesis aleatoria, reensamblaje de genes,
20 mutagénesis saturada de sitio genético (GSSM), reensamblaje de ligadura sintética (SLR), o una combinación de los mismos. Las modificaciones, adiciones o supresiones también se pueden realizar mediante un método que comprende recombinación, recombinación de secuencia recursiva, mutagénesis de ADN modificada con fosfotioato, mutagénesis de molde que contiene uracilo, mutagénesis dúplex con brecha, mutagénesis de reparación
25 de error de apareamiento, mutagénesis de cepa huésped deficiente en reparación, mutagénesis química, mutagénesis radiogénica, mutagénesis por supresión, mutagénesis por selección de restricción, mutagénesis de restricción-purificación, síntesis genética artificial, mutagénesis de ensamblaje, creación de multímeros de ácido nucleico quimérico y una combinación de los mismos.

También se proporcionan variantes degeneradas de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de la presente invención. Las variantes degeneradas de los ácidos nucleicos incluyen reemplazos de los codones de ácido nucleico con otros codones que codifican los mismos aminoácidos. En particular, las variantes degeneradas de los ácidos nucleicos se crean para aumentar la expresión en una célula huésped. En esta realización, los codones de ácido nucleico que son no preferidos o menos preferidos en los genes de la célula huésped se reemplazan con los codones sobrerrepresentados en las secuencias codificadoras en genes en la célula huésped, en donde dichos codones reemplazados codifican el mismo aminoácido.

Las modificaciones anteriores no alteran sustancialmente las propiedades de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos, pero pueden facilitar el plegamiento de proteínas en una célula huésped, disminuir la capacidad de agregación o modular otras propiedades bioquímicas de las proteínas, por ejemplo, el período de vida media. En algunas realizaciones, estas modificaciones no modifican las propiedades bioquímicas de la proteína. En algunas realizaciones, estas modificaciones llevan a una inmunogenicidad de anticuerpos reducida. Todos los tipos de modificaciones y mutaciones especificadas anteriormente se realizan a nivel de ácido nucleico.

Los ácidos nucleicos descritos se pueden aislar y preparar en una forma sustancialmente purificada. Una forma sustancialmente purificada significa que los ácidos nucleicos son al menos aproximadamente 50% puros, típicamente al menos aproximadamente 90% puros y típicamente son "recombinantes", es decir, flanqueados por uno o más nucleótidos con los que no están asociados típicamente en un cromosoma que aparece en la naturaleza en el organismo huésped natural del mismo.

También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión que comprenden una proteína de la presente invención, o fragmentos de la misma, que se analizan con más detalle a continuación. Los ácidos nucleicos que codifican dominios variables de la invención se pueden unir operativamente a los ácidos nucleicos que codifican los dominios constantes correspondientes de las cadenas livianas y pesadas de un anticuerpo. Los ácidos nucleicos que codifican las cadenas livianas y pesadas de un

anticuerpo se pueden unir operativamente a los ácidos nucleicos que codifican un péptido líder que facilita el transporte de productos de expresión desde la célula huésped. El péptido líder se elimina posteriormente durante la maduración del polipéptido.

Vector.

5 También se proporcionan un vector y otros constructos de ácido nucleico que comprenden los ácidos nucleicos descritos. El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido operativamente. Ciertos vectores se pueden replicar de forma autónoma en las células huésped en las que se introdujeron, mientras que otros vectores pueden integrarse en el

10 genoma de la célula huésped y replicarse junto con el genoma del huésped. Además, algunos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que se han ligado operativamente. Dichos vectores se denominan en la presente "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente "vectores de expresión") y los vectores ilustrativos son bien conocidos de la técnica anterior. Los vectores adecuados incluyen vectores virales y

15 no virales, plásmidos, cósmidos, fagos, etc., con preferencia plásmidos, y se usan para clonar, amplificar, expresar, transferir, etc., de una secuencia de ácido nucleico de la presente invención a un huésped apropiado. La elección del vector apropiado es obvia para los expertos en la materia. Un ácido nucleico de longitud completa o una porción del mismo se inserta en un vector típicamente por medio de unión de ADN ligasa a un sitio de

20 enzima de restricción escindido en el vector. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos deseada se puede insertar mediante recombinación homóloga in vivo, típicamente mediante la unión de regiones de homología al vector en los flancos de la secuencia de nucleótidos deseada. Las regiones de homología se añaden mediante ligación de oligonucleótidos, o mediante reacción en cadena de la polimerasa usando

25 cebadores que comprenden, por ejemplo, tanto la región de homología como una porción de la secuencia de nucleótidos deseada. Típicamente, un vector tiene un origen de replicación que asegura la propagación del mismo en las células huésped como resultado de la introducción del mismo en una célula como elemento extracromosómico. Un vector también puede comprender elementos reguladores que aseguran la expresión de un ácido

nucleico en la célula huésped y la generación del polipéptido diana. En el vector de expresión, dicho ácido nucleico está operativamente unido a una secuencia reguladora que puede incluir promotores, potenciadores, terminadores, operadores, represores e inductores, así como un codón de inicio del polipéptido. En algunas realizaciones, un ácido nucleico de la invención se une además operativamente a un péptido líder que asegura el aislamiento de un producto de expresión desde la célula huésped al espacio extracelular.

También se proporcionan casetes o sistemas de expresión usados entre otros para la obtención de los polipéptidos descritos (por ejemplo, las cadenas liviana y pesada de un anticuerpo de la invención o dominios variables de las cadenas liviana y pesada de un anticuerpo de la invención) sobre la base del mismo o para la replicación de las moléculas de ácido nucleico descritas. El casete de expresión puede existir como un elemento extracromosómico o se puede integrar en el genoma celular como resultado de la introducción de dicho casete de expresión en la célula. Para la expresión, un producto proteico codificado por el ácido nucleico de la invención se expresa en cualquier sistema de expresión conveniente, que incluye, por ejemplo, sistemas bacterianos, levaduras, insectos, anfibios o células de mamíferos. En el casete de expresión, un ácido nucleico blanco se une operativamente a secuencias reguladoras que pueden incluir promotores, potenciadores, secuencias de terminación, operadores, represores e inductores, así como un codón de inicio del polipéptido. En algunas realizaciones, un ácido nucleico de la invención se une además operativamente a un péptido líder que asegura el aislamiento de un producto de expresión desde la célula huésped al espacio extracelular. Los expertos en la técnica conocen métodos para obtener casetes o sistemas de expresión capaces de expresar el producto deseado.

Célula huésped.

Los sistemas de expresión anteriores se pueden usar en huéspedes procariotas o eucariotas. Se pueden usar células huésped, tales como *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, células de insectos en combinación con vectores de baculovirus, o células de un organismo superior, que no son células embrionarias humanas, tales como levaduras,

plantas, vertebrados, por ejemplo, células CHO (por ejemplo, ATCC CRL-9096), células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS (por ejemplo, ATCC CRL-1650, CRL-1651) y HeLa (por ejemplo, ATCC CCL-2) de la proteína.

Para producir un anticuerpo de la invención, la célula huésped se cotransforma con un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una cadena liviana del anticuerpo y un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. En algunas formas de realización, se usa un vector de expresión único, en el que se introducen los ácidos nucleicos que codifican las cadenas livianas y pesadas de un anticuerpo.

Para la expresión de cadenas livianas y pesadas, los vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas y livianas se transforman (co-transforman) en una célula huésped de tal manera que las cadenas livianas y pesadas se expresan en la célula huésped y con preferencia se secretan en el medio, en el que se cultivan las células huésped, y a partir del cual se pueden aislar los anticuerpos. Se consideran diversas interpretaciones del término "transformación" que incluyen una amplia gama de métodos comúnmente utilizados para introducir ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano, etc., como se describe en Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds) Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989; Ausubel F.M. et al. (Eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates (1989).

Cuando los vectores de expresión recombinantes que contienen los ácidos nucleicos del anticuerpo se introducen en las células huésped, los anticuerpos se obtienen mediante el cultivo de las células huésped durante un período de tiempo suficiente para expresar el anticuerpo en la célula huésped, o (con más preferencia) secretar el anticuerpo en el medio de cultivo, en el que crecen las células huésped. Los anticuerpos se pueden aislar de un medio de cultivo usando técnicas estándar de purificación de proteínas. Los expertos en la materia conocen bien las condiciones de cultivo celular y se describen en

Current Protocols in Cell Biology, Bonifacino J.S., Dasso M., Harford J.B., Lippincott-Schwartz J. y Yamada K.M. (eds.) publicado por John Wiley & Sons, Inc., 2000.

Si se usa cualquiera de las células huésped u otras células u organismos huéspedes adecuados para la replicación y/o expresión de los ácidos nucleicos de la invención, el ácido nucleico replicado resultante, la proteína o el polipéptido expresado están dentro del alcance de la invención como producto de la célula u organismo huésped. El producto se puede aislar mediante una técnica adecuada conocida en la materia.

Las líneas celulares, que expresan de forma estable las proteínas de la presente invención, se pueden seleccionar mediante los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, cotransfección con un marcador seleccionable, tal como dhfr, gpt, neomicina, higromicina, que permite la identificación y el aislamiento de las células transfectadas que contienen el gen integrado en un genoma).

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención también se pueden usar para determinar la expresión génica en una muestra biológica. Un método en el que se examinan las células para detectar la presencia de secuencias de nucleótidos específicas, tales como ADN o ARN genómico, está bien establecido en la técnica. Brevemente, se aísla ADN o ARNm de una muestra celular. El ARNm se puede amplificar mediante RT-PCR, usando transcriptasa inversa para formar una cadena de ADN complementaria, seguido de amplificación de reacción en cadena de polimerasa usando cebadores específicos para las secuencias de ADN presentes. Alternativamente, la muestra de ARNm se separa por electroforesis en gel, se transfiere a un portador adecuado, por ejemplo, nitrocelulosa, nylon, etc., y luego se examinó con un fragmento del ADN presente como sonda. También pueden ser útiles otras técnicas, tales como los ensayos de ligación de oligonucleótidos, hibridaciones in situ e hibridación con sondas de ADN inmovilizadas en un chip sólido. La detección de ARNm que hibrida con la secuencia presente es indicativa de la expresión génica en la muestra.

Uso terapéutico de los anticuerpos de la invención.

En un aspecto, un anticuerpo o fragmento activo del mismo de la presente invención se usa en el tratamiento de trastornos que están asociados con la actividad de linfocitos T patológicos que portan los TCR de la familia TRBV9 de superficie, por ejemplo, que exhiben actividad de linfocitos T autoinmunes en AS, enfermedad celíaca, linfomas de células T.

El término "paciente", como se usa en esta solicitud, se refiere a un mamífero que incluye pero no se limita a ratones, monos, seres humanos, mamíferos de ganado, mamíferos deportivos y mamíferos mascotas; con preferencia el término se aplica a seres humanos. En una forma de realización particular, el paciente se caracteriza además por una enfermedad o trastorno, o afección, mediada por la presencia en el cuerpo del mismo de TCR, cuya cadena beta pertenece a la familia TRBV9. Como se sabe de la técnica anterior, TCR, cuya cadena beta pertenece a la familia TRBV9, está asociada con AS y enfermedad celíaca. Además, el TCR, cuya cadena beta pertenece a la familia TRBV9, se puede asociar con el desarrollo de una serie de enfermedades sanguíneas, tales como linfoma de células T causado por el virus de Epstein-Barr.

Como se usa en la presente, se contempla que los términos "coadministración", "coadministrado" y "en combinación con" que se refieren al anticuerpo con uno o más agentes terapéuticos, significan, se refieren e incluyen lo siguiente:

1) administración simultánea de tal combinación de un anticuerpo de la invención y un agente terapéutico a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan juntos en una forma de dosis única que libera dichos componentes sustancialmente al mismo tiempo a dicho paciente,

2) administración simultánea de dicha combinación de un anticuerpo de la invención y un agente terapéutico a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan separados entre sí en formas de dosis separadas que dicho paciente toma sustancialmente al mismo tiempo, con lo cual dichos componentes se liberan sustancialmente al mismo tiempo a dicho paciente,

3) administración secuencial de dicha combinación de un anticuerpo de la invención y un agente terapéutico a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos

componentes se formulan separados entre sí en formas de dosis separadas que dicho paciente toma en ocasiones consecutivas con un intervalo de tiempo significativo entre cada administración, con lo cual dichos componentes se liberan en tiempos sustancialmente diferentes a dicho paciente; y también

- 5 4) administración secuencial de dicha combinación de un anticuerpo de la invención y un agente terapéutico a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan juntos en una forma de dosis única que libera dichos componentes de manera controlada con lo cual se liberan de manera simultánea, consecutiva y/o superpuesta en el mismo momento y/o en diferentes momentos en dicho
- 10 paciente, donde cada parte se puede administrarse por la misma o diferente vía.

Se puede administrar un anticuerpo de la invención sin tratamiento terapéutico adicional, es decir, como una terapia independiente. Además, el tratamiento con un anticuerpo de la invención puede comprender al menos un tratamiento terapéutico adicional (terapia de combinación). En algunas realizaciones de la invención, un

15 anticuerpo se puede coadministrar conjuntamente o formular con otro medicamento/fármaco para una enfermedad autoinmune u oncológica, cuya patogénesis implica TCR que comprenden la cadena beta TRBV9, por ejemplo, AC, enfermedad celíaca, linfoma de células T, leucemia de células T.

20 **Dosis y vías de administración.**

Se administrará un anticuerpo de la invención en una cantidad que sea efectiva en el tratamiento de la afección en cuestión, es decir, en dosis y durante los períodos de tiempo requeridos para lograr el resultado deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar de acuerdo con factores tales como la afección específica para tratar, edad,

25 sexo y peso de un paciente, y si el anticuerpo se administra solo o en combinación con una o más técnicas de tratamiento inmunosupresor o antiinflamatorio adicionales.

Los regímenes de dosis se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima. Por ejemplo, se puede administrar un bolo único, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo

indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en una forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Una forma de dosis estándar como se usa en la presente se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para
5 pacientes/sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico deseado. La especificación para las formas de dosis estándares de la invención está dictada típicamente por y depende directamente de (a) las características únicas de un agente quimioterapéutico y el efecto terapéutico o
10 profiláctico particular que se va a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de combinar tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en los sujetos.

Por lo tanto, un experto en la técnica puede apreciar, sobre la base de la descripción proporcionada en la presente, que las dosis y el régimen de dosificación se ajustan de acuerdo con métodos bien conocidos en las técnicas terapéuticas. Es decir, la dosis
15 máxima tolerable se puede establecer fácilmente, y la cantidad efectiva que proporciona un beneficio terapéutico detectable a un paciente también se puede determinar, al igual que los requerimientos temporales para administrar cada agente para proporcionar un beneficio terapéutico detectable al paciente. Por lo tanto, aunque algunas dosis y esquemas de régimen se dan como ejemplos en este documento, estos ejemplos de
20 ninguna manera limitan las dosis y los regímenes de administración que pueden ser necesarios para el paciente en la práctica de la presente invención.

Cabe señalar que los valores de dosis pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección a aliviar, y pueden incluir dosis únicas o múltiples. Además, se debe entender que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar
25 a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio de un profesional médico que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los rangos de dosis establecidos en la presente son solo a modo de ejemplo y no pretenden limitar el alcance o la práctica de las composiciones reivindicadas. Además, el régimen de dosificación con las composiciones de la presente invención se puede basar en diversos

factores, que incluyen el tipo de enfermedad, edad, peso, sexo, estado de salud del paciente, gravedad de un estado, vía de administración y un anticuerpo particular utilizado. Por lo tanto, el régimen de dosificación puede variar ampliamente, pero se puede determinar rutinariamente usando métodos estándares. Por ejemplo, las dosis se pueden ajustar en función de parámetros farmacocinéticos o farmacodinámicos, que pueden incluir efectos clínicos tales como efectos tóxicos y/o valores de laboratorio. Por lo tanto, la presente invención abarca el escalado de dosis intrapaciente según lo determine el experto en la materia. Los métodos para determinar las dosis y los regímenes apropiados son bien conocidos en la técnica y un experto en la técnica los puede entender una vez que se proporcionen las ideas descritas en la presente.

Los ejemplos de métodos de administración adecuados se proporcionaron anteriormente.

Se contempla que una dosis adecuada de un anticuerpo de la invención estará en el rango de 0,1-200 mg/kg, con preferencia 0,1-100 mg/kg, que incluye aproximadamente 0,5-50 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 1-20 mg/kg. Un anticuerpo se puede administrar, por ejemplo en una dosis de al menos 0,25 mg/kg, tal como al menos 0,5 mg/kg, que incluye al menos 1 mg/kg, por ejemplo al menos 1,5 mg/kg, tal como al menos 2 mg/kg, por ejemplo al menos 3 mg/kg, que incluye al menos 4 mg/kg, por ejemplo al menos 5 mg/kg; and por ejemplo hasta un máximo de 50 mg/kg, que incluye hasta un máximo de 30 mg/kg, por ejemplo hasta un máximo de 20 mg/kg, que incluye hasta un máximo de 15 mg/kg. La administración generalmente se repetirá en intervalos de tiempo apropiados, tal como una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas, y durante el tiempo que lo considere apropiado un médico responsable, que puede, en algunos casos, aumentar o reducir la dosis si es necesario.

Composición farmacéutica.

Se puede incorporar un anticuerpo de la invención en una composición farmacéutica adecuada para la administración a un paciente. Los anticuerpos de la invención se pueden

administrar solos o en combinación con un portador, diluyente y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, en dosis únicas o múltiples. Las composiciones farmacéuticas para administración están diseñadas para ser apropiadas para el modo de administración seleccionado, y se puede usar según sea apropiado diluyentes, portadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes dispersantes, buffers, tensioactivos, conservantes, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, agentes estabilizantes y similares. Dichas composiciones están diseñadas de acuerdo con técnicas convencionales como, por ejemplo, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995, que proporciona diversas técnicas para obtener las composiciones tal como están generalmente conocido por los practicantes.

"Medicamento (fármaco)": es un compuesto o una mezcla de compuestos como una composición farmacéutica en forma de comprimidos, cápsulas, polvos, liofilizados, inyecciones, infusiones, ungüentos y otras formas listas para restaurar, mejorar o modificar las funciones fisiológicas en los seres humanos y animales, y también para el tratamiento y prevención de enfermedades, para diagnóstico, anestesia, anticoncepción, cosmetología y otros. Cualquier método para administrar péptidos, proteínas o anticuerpos aceptados en la técnica se puede emplear adecuadamente para un anticuerpo de la invención.

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a uno o más componentes líquidos o sólidos compatibles que son adecuados para la administración en un mamífero, con preferencia un ser humano.

El término "excipiente" se usa en la presente para describir cualquier ingrediente distinto de los ingredientes anteriores de la invención. Estas son sustancias de naturaleza inorgánica u orgánica que se utilizan en la fabricación farmacéutica para proporcionar las propiedades fisicoquímicas necesarias a los medicamentos.

El término "buffer", "composición de buffer", "agente buffer" se refiere a una solución, que es capaz de resistir cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base, y que permite que el fármaco del anticuerpo resista los cambios

en el pH. En general, la composición farmacéutica con preferencia tiene un pH en el rango de 4,0 a 8,0. Los ejemplos de buffers utilizados incluyen, pero no se limitan a, soluciones buffer de acetato, fosfato, citrato, histidina, succinato, etc.

Los términos "agente tónico", "osmolito" o "agente osmótico", como se usan en la presente se refieren a un excipiente que puede aumentar la presión osmótica de una formulación de anticuerpo líquido. El fármaco "isotónico" es un fármaco que tiene una presión osmótica equivalente a la de la sangre humana. Los fármacos isotónicos típicamente tienen una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm/kg. Como agentes isotónicos se pueden usar, pero sin limitación, polioles, sacáridos y sacarosa, aminoácidos, sales metálicas, por ejemplo, cloruro de sodio, etc.

"Estabilizador" se refiere a un excipiente o una mezcla de dos o más excipientes que proporcionan la estabilidad física y/o química del agente activo. Como estabilizadores se pueden usar aminoácidos, por ejemplo, pero sin limitación, arginina, histidina, glicina, lisina, glutamina, prolina; tensioactivos, por ejemplo, entre otros, polisorbato 20 (nombre comercial: Tween 20), polisorbato 80 (nombre comercial: Tween 80), polietilen-polipropilenglicol y sus copolímeros (nombres comerciales: Poloxamer, Pluronic, dodecil sulfato de sodio (SDS); antioxidantes, por ejemplo, pero sin limitación, metionina, acetilcisteína, ácido ascórbico, monotioglicerol, sales de ácido sulfuroso, etc.; agentes quelantes, por ejemplo, pero sin limitación, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), citrato de sodio, etc.

Una composición farmacéutica es "estable" si el agente activo retiene la estabilidad física y/o la estabilidad química y/o la actividad biológica del mismo durante la vida útil especificada a la temperatura de almacenamiento, por ejemplo, de 2 a 8 °C. Con preferencia, el agente activo retiene tanto la estabilidad física como química, así como la actividad biológica. El período de almacenamiento se selecciona en función de los resultados de la prueba de estabilidad en condiciones de envejecimiento acelerado o natural.

Una composición que contiene un anticuerpo monoclonal de la invención se puede administrar a un paciente que presenta patologías como se describe en esta solicitud

usando técnicas de administración estándares, que incluyen administración peroral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual, o supositorio.

Una composición farmacéutica de la invención con preferencia contiene o es una
5 "cantidad terapéuticamente efectiva" de un anticuerpo de la invención. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad que es efectiva a las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo, y el peso de un sujeto, y la
10 capacidad de un anticuerpo o parte del mismo para provocar una respuesta deseada en un sujeto. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es aquella en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos del anticuerpo compensan los efectos tóxicos o perjudiciales. La "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a la cantidad que es efectiva a las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios para lograr el resultado
15 profiláctico deseado. Debido a que se prescribe una dosis profiláctica para individuos antes o en una etapa temprana de la enfermedad, típicamente una cantidad profilácticamente efectiva puede ser menor que una cantidad terapéuticamente efectiva.

Una cantidad terapéuticamente efectiva o profilácticamente efectiva es al menos una dosis mínima terapéuticamente beneficiosa que es menor que la dosis tóxica de un
20 agente activo. Por otro lado, una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de la invención es una cantidad que reduce, en mamíferos, con preferencia seres humanos, la actividad biológica de los clones autoinmunes, por ejemplo, a través de la unión de TCR, cuya cadena beta pertenece a la familia TRBV9, donde la presencia de dichos clones causa o contribuye a efectos patológicos indeseables, o la disminución de TCR, cuya cadena beta
25 pertenece a la familia TRBV9, causa un efecto terapéutico beneficioso en un mamífero, con preferencia un ser humano.

La vía de administración de un anticuerpo de la invención puede ser oral, parenteral, por inhalación o local. Con preferencia, los anticuerpos de la invención se pueden incluir en una composición farmacéutica aceptable para administración parenteral. El término

"parenteral" como se usa en esta solicitud incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal o intraperitoneal. Las inyecciones intravenosas, intraperitoneales o subcutáneas son las vías de administración preferidas. Los portadores farmacéuticos aceptables para tales inyecciones son bien conocidos de la técnica anterior.

5 Como se describe en las pautas apropiadas, las composiciones farmacéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de producción y almacenamiento en un recipiente, que es proporcionado, por ejemplo, por viales sellados herméticamente (ampollas) o jeringas. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas se pueden someter a esterilización por filtración después de preparar la composición, o se pueden hacer
10 microbiológicamente adecuadas mediante cualquier otra técnica. Una composición típica para una infusión intravenosa puede incluir 250-1000 ml de líquido, tal como solución de Ringer estéril, solución salina fisiológica, solución de dextrosa o solución de sal de Hank, y una dosis terapéuticamente efectiva (por ejemplo, 1-100 mg/ml o más) de un concentrado de anticuerpos. Las dosis pueden variar según el tipo y la gravedad de la
15 enfermedad. Es bien sabido por el estado de la técnica médica que las dosis para cualquiera de los pacientes dependen de múltiples factores, que incluyen tamaño del paciente, área de superficie corporal, edad, compuesto específico que se administrará, sexo, duración y vía de administración, estado general de salud y otros medicamentos administrados simultáneamente. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en un rango
20 de 0,001-1000 µg; sin embargo, se prevén dosis más bajas y más altas que este rango ilustrativo, especialmente dados los parámetros mencionados anteriormente. El régimen de dosis parenteral diario puede ser de 0,1 µg/kg a 100 µg/kg de peso corporal total, con preferencia de 0,3 µg/kg a 10 µg/kg, y más con preferencia de 1 µg/kg a 1 µg/kg, incluso con más preferencia de 0,5 a 10 µg/kg de peso corporal por día. El proceso de tratamiento
25 se puede controlar mediante una evaluación periódica del estado de salud del paciente. Para la administración repetida durante varios días o más, de acuerdo con la afección del paciente, el tratamiento se repite hasta la respuesta deseada o la supresión de los síntomas de una enfermedad. Sin embargo, también se pueden aplicar otros regímenes de dosificación no descritos en la presente. La dosis deseada se puede administrar mediante

dosificación en bolo simple o en bolo múltiple, o mediante una infusión continua de un anticuerpo de acuerdo con la degradación farmacocinética deseada por el profesional.

Estas cantidades estimadas de un anticuerpo dependen en gran medida de la decisión del médico. El efecto deseado es el factor clave para elegir una dosis y un régimen adecuados. Los factores considerados en la presente incluyen una determinada enfermedad a tratar, un determinado mamífero para recibir el tratamiento, estado clínico de un determinado paciente, causa del trastorno, sitio de administración de anticuerpos, tipo de anticuerpo específico, vía de administración, régimen de administración y otros factores bien conocidos en las artes médicas.

Los agentes terapéuticos de la invención se pueden congelar o liofilizar y reconstituir en un portador estéril apropiado antes de la administración. La liofilización y la reconstitución pueden provocar cierta pérdida de actividad del anticuerpo. Las dosis se pueden ajustar para compensar esta pérdida. En general, se prefieren valores de pH de composición farmacéutica de 6 a 8.

Artículo de manufactura (productos) y kits.

Una realización adicional de la invención es un artículo de manufactura que contiene productos utilizados para tratar enfermedades autoinmunes y afecciones relacionadas y enfermedades sanguíneas malignas, cuya patogénesis implica TCR que porta la cadena beta de la familia TRBV9. Dichas enfermedades incluyen, por ejemplo, AS, enfermedad celíaca, leucemia de células T, linfoma de células T y otras.

El artículo de manufactura es un recipiente con una etiqueta y un prospecto, que puede estar en un blíster y/o paquete. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, viales, ampollas, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar hechos de diversos materiales, tales como vidrio o material polimérico. El recipiente comprende una composición que es efectiva para tratar una determinada afección y puede tener un puerto de acceso estéril. Al menos un ingrediente activo en la composición es un anticuerpo de acuerdo con la invención. La etiqueta y el prospecto indican que el fármaco está destinado a usarse para tratar una determinada afección. La etiqueta y/o el prospecto contienen además

instrucciones para administrar la composición de anticuerpos en un paciente, que incluyen indicaciones, frecuencia, dosis, vía de administración, contraindicaciones y/o precauciones para tales productos terapéuticos. En una forma de realización, el prospecto indica que la composición está destinada al uso para el tratamiento.

5 Además, un artículo de manufactura puede comprender, sin limitación, otros productos necesarios para fines comerciales o necesarios para un consumidor, tales como solventes, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

La invención también se refiere a kits que se pueden usar para diversos fines, por ejemplo, para evaluar la capacidad de matar células T que portan los TCR de la familia
10 TRBV9, para la purificación o inmunoprecipitación del receptor TRBV9 de las células. Para aislamiento y purificación, el kit puede contener un anticuerpo acoplado a perlas (por ejemplo, perlas de sefarosa). El kit comprende un recipiente, una etiqueta y un prospecto.

Uso diagnóstico.

Los anticuerpos de la invención también se usan con fines de diagnóstico (por
15 ejemplo, in vitro, ex vivo). Por ejemplo, un anticuerpo se puede usar para detectar o medir el nivel de linfocitos T que comprenden los TCR de la familia TRBV9 en muestras obtenidas de un paciente (por ejemplo, muestra de tejido o una muestra de líquido corporal, tal como un exudado inflamatorio, sangre, líquido intestinal, saliva u orina). Los métodos adecuados para la detección y medición incluyen inmunoensayos, tales como
20 citometría de flujo, ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), ensayo quimioluminiscente, radioinmunoensayo e inmunohistología. La invención incluye además kits, por ejemplo, kits de diagnóstico que comprenden los anticuerpos descritos en la presente.

Para que esta invención se pueda entender mejor, se exponen los siguientes
25 ejemplos. Estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención de ninguna manera.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan en la presente como referencia. Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle mediante ilustración y ejemplo para evitar una

interpretación ambigua, los expertos en este campo sobre la base de las ideas descritas en esta invención tendrán bastante claro que se pueden hacer ciertos cambios y modificaciones sin desviarse de la esencia y alcance de las realizaciones incluidas de la invención.

5

Sección experimental

Ejemplo 1. Humanización in silico de las secuencias del dominio variable del anticuerpo

10 Como las secuencias originales (de referencia) se usaron las secuencias de dominios variables de la cadena pesada y liviana del anticuerpo anti-TRBV9-2, cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en las SEQ ID Nos: 8 y 10.

Las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de las cadenas pesadas y livianas se compararon con una mezcla de secuencias de línea germinal de los dominios variables de inmunoglobulinas humanas, secuencias de línea germinal de dominios variables de inmunoglobulinas de rata, secuencias de anticuerpos maduros humanos y de rata obtenidos de fuentes abiertas y bibliotecas de donantes proporcionadas por Biocad (Rusia). Se utilizó el paquete de software Ylab para el análisis (Biocad, Rusia).

20 El análisis determinó las posiciones y combinaciones de los mismos que son más similares a animales y no similares a humanos en las secuencias de dominios variables de anticuerpos de prueba. Al mismo tiempo, se determinaron las combinaciones de aminoácidos que se representan con mayor frecuencia en anticuerpos humanos en estas posiciones. Las secuencias artificiales de dominios variables que contienen sustituciones que aumentan el grado de humanización del anticuerpo se diseñaron sobre la base de los
25 datos resultantes.

Además, las secuencias de nucleótidos que codifican las variantes de aminoácidos presentes se optimizaron por codón para expresar el anticuerpo humanizado en la línea celular CHO. Las secuencias de nucleótidos humanizados de dominios variables de cadenas pesadas y livianas (SEQ ID Nos: 15 y 17) se sintetizaron de novo y se clonaron en

los vectores pEE-HC, pEE-CK, formato IgG1 (Xu et al. Front. Chem. Sci. Eng.2015, 9 (3): 376–380) en los sitios de restricción Sall/NheI y Sall/BsiWI, respectivamente.

Las secuencias de ácido nucleico de las cadenas livianas y pesadas resultantes se validaron mediante secuenciación de Sanger. El anticuerpo MA-042 se seleccionó para una investigación adicional, cuyas secuencias de aminoácidos y nucleótidos de cadenas liviana y pesada se muestran en las SEQ ID Nos: 19-22.

El anticuerpo MA-042 incluye los dominios variables de las cadenas pesada y liviana, que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEQ ID NOs: 16 y 18.

El grado de humanización del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo MA-042 fue del 87%, mientras que el del dominio variable de la cadena liviana fue del 85% (Tabla 1). El dominio constante de la cadena pesada está representado por el formato IgG1, alotipo Gm3.

Tabla 1. Comparación del grado de humanización entre los dominios variables del anticuerpo original y el anticuerpo MA-042

Anticuerpo	Grado de humanización del dominio variable de la cadena pesada, %	Grado de humanización del dominio variable de la cadena liviana, %
TRBV9-2	72	69
MA-042	87	85

Ejemplo 2. Preparación del anticuerpo recombinante y determinación de su afinidad

Los vectores que comprenden ácidos nucleicos que codifican las cadenas liviana y pesada del anticuerpo MA-042, obtenidos como se describe en el Ejemplo 1, se propagaron en células de E. coli y se purificaron usando un kit de purificación de ADN plasmídico de Qiagen (Alemania) y se usaron para transfectar la línea celular CHO-Fut8 usando polietilenimina lineal (PEI "MAX", "Polysciences", USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las mezclas de reacción resultantes se incubaron a 37 °C en un agitador. 9 días después de la transfección, el líquido de cultivo se separó de las células

mediante filtración a través de un filtro de 0,5/0,22 μm . Después de la filtración, el líquido de cultivo se usó para aislar anticuerpos usando cromatografía de afinidad en columnas de 0,2 ml PreDicator RoboColumn MabSelect SuRe (GE Healthcare, USA) equilibradas con solución salina buffer con fosfato (PBS, pH 7,4). La columna se lavó luego con 5 volúmenes de PBS. La proteína unida al portador se eluyó usando un buffer de glicina 0,1 M pH 3. Se recolectó el pico principal que contiene proteína y se ajustó el pH a neutro con buffer Tris 1 M (pH 7,5). Todas las etapas se realizaron con un caudal de flujo de 110 cm/h. La proteína se transfirió luego a PBS (pH 7,4) usando diálisis, se filtró a través de un filtro de 0,22 μm , se transfirió a nuevos tubos estériles.

La calidad del aislamiento se evaluó usando PAGE 12% en condiciones desnaturalizantes. La evaluación cuantitativa se realizó mediante la medición del microspectrofotómetro NanoDrop2000 a 280A. La proteína aislada se almacenó a -70°C .

La afinidad de anticuerpos se determinó en el sistema OctetRed 96 (ForteBio, USA). El antígeno a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ se inmovilizó sobre la superficie de los sensores AR2G (ForteBio) de acuerdo con el protocolo estándar y las instrucciones del fabricante. El análisis se realizó a 30°C usando PBS que comprende Tween 20 0,1% y BSA 0,1% como buffer de trabajo. Después del registro de referencia, los sensores se sumergieron en pocillos que contienen solución de anticuerpo durante 300 segundos, donde se asoció el complejo. La disociación del complejo en solución buffer se detectó durante 600 segundos.

Las curvas de unión, después de restar una señal de referencia, se analizaron usando el software Octet Data Analysis (Versión 9.0) de acuerdo con el procedimiento estándar y usando el modelo de interacción global 1: 1. Los datos resultantes (Tabla 2) mostraron que el anticuerpo específicamente y con alta afinidad se une al antígeno humano.

Tabla 2. Características de afinidad del anticuerpo MA-042

Anticuerpo	KD (M)	$k_{on}(1/\text{Ms})$	$k_{dis}(1/\text{s})$	R^2 completo

MA-042	<1,0E-12	3,19E+05	<1,0E-07	0,9758
--------	----------	----------	----------	--------

Ejemplo 3. Preparación de línea celular que produce en forma estable el anticuerpo en formato IgG1, y producción del anticuerpo

Las secuencias de las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo MA-042 se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 y se clonaron en vectores pSX en sitios de restricción HindIII, XbaI. Los plásmidos resultantes se cultivaron en células de E. coli y se aislaron 600-700 µg usando BenchPro (Life Technology, CUA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se linealizaron durante la noche usando endonucleasa PvuI, luego se precipitó con etanol, el precipitado se disolvió en agua, la concentración en el volumen final fue 900-1100 ng/µl.

La línea celular CHO-K1-S se cultivó en medio Gibco F12 de Ham (Thermo, USA). La transfección con constructos génicos que comprenden secuencias codificadoras de cadenas MA-042 se realizó mediante electroporación en Nucleofector™ (Lonza, Suiza) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

El día después de la transfección, las células transfectadas se sometieron a selección de antibióticos durante 24 días mediante la adición de puromicina (concentración final de 7,2 µg/ml) e higromicina B (concentración final de 640 µg/ml) al medio. Luego se seleccionaron los clones celulares resistentes a antibióticos de estructura homogénea que expresan un alto nivel de MA-042.

Para cultivar CHO-K1-S que expresa MA-042, se usó un medio de Ham F12 Gibco libre de suero (Thermo, USA) suplementado con 25-100 uM de 2-desoxi-2-fluoro-L-fucosa (CarboSynth, UK). El anticuerpo monoclonal MA-042 para estudios preclínicos se produjo en un fermentador biorreactor de uso único HyClone de 50 L (Thermo Fisher Scientific). Las células productoras se retiraron del líquido de cultivo usando un filtro de profundidad Millistak COHC (Merck-Millipore, USA). La purificación primaria del anticuerpo del medio de cultivo depurado se realizó en un sorbente de afinidad de proteína A. La proteína blanco se eluyó específicamente con buffer glicina pH 3,3-3,8 en condiciones ácidas. El

eluito recogido se expuso a pH ácido durante 30-60 minutos con el propósito de inactivación viral, y luego se neutralizó con solución de Tris-HCl 1 M a pH 6,5-7.0. La purificación cromatográfica final para eliminar posibles impurezas (ADN, proteínas de células productoras, ligando de sorbente afín liberado, agregados y fragmentos de anticuerpos) se realizó usando sorbente CptoAdhere (GE HealthCare LifeSciences) en un modo de flujo continuo. En consecuencia, la solución de proteína se hizo fluir a través de sorbente preparado equilibrado con buffer Tris con pH 6,5-7,0, bajo baja conductividad ($<3 \text{ mseg/cm}^2$). La proteína purificada se sometió luego a filtración de eliminación de virus usando el kit de filtro Viresolve PRO (Millipore, USA), se concentró y diafiltró contra el buffer final que contiene buffer de acetato (pH 5,0-5,5) y trehalosa.

Ejemplo 4. Uso del anticuerpo para la unión específica al TCR de la familia TRBV9.

Los anticuerpos monoclonales MA-042 obtenidos como se describe en el Ejemplo 3 se usaron para clasificar las subpoblaciones de linfocitos. Los anticuerpos se marcaron con fluoresceína usando un reactivo de isotiocianato de fluoresceína (Sigma, USA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El número de fluoróforos que reaccionaron con las moléculas de anticuerpos se controló mediante la relación del espectro de absorción a longitudes de onda de 495/280 nm.

Los linfocitos T se obtuvieron de sangre periférica de un donante sano. La sangre se recogió en tubos Vacuette EDTA (2x9 ml cada uno), la fracción mononuclear se aisló de acuerdo con el procedimiento estándar descrito en (Kovalchuk L. V. et al. Immunology: Workshop - 2010. - 176 p.). Después del aislamiento, las células se transfirieron a solución salina buffer con fosfato (PBS) que comprende albúmina sérica bovina 0,5% (BSA) y EDTA 2 mM. El número total de células y la viabilidad de las mismas se determinó mediante el método de tinción con azul de tripano como lo describe Lang N.R. (Stimulation of lymphocytes M.: Medicine, 1976.-288 p.). Se añadió un volumen igual de solución de azul de tripano 0,1% a la suspensión celular, las células azules teñidas (muertas) y no teñidas se contaron en una cámara Goryaev. Sobre la base de estos datos, se determinó el porcentaje de células muertas en la muestra de prueba.

Para confirmar la selectividad de la unión de MA-042 a la población blanco de linfocitos T que llevan TCR de membrana perteneciente a la familia TRBV9, se añadieron alícuotas de 500,000 células de fracción mononuclear al buffer PBS que comprende albúmina sérica bovina 0,5% (BSA), EDTA 2 mM pH8, anticuerpos MA-042 marcados con FITC, CD3-eFluor405 (marcador de linfocitos T) (eBioscience, USA) y CD45-PC5 (eBioscience, USA) (Marcador de leucocitos totales) a una concentración de 100 ng/ml. Se incubaron 50 µl de mezclas de reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos, después de lo cual las células se lavaron con buffer PBS suplementado con BSA0,5%, EDTA 2 mM. Después del procedimiento de tinción, las células se usaron para la clasificación mediante citometría de flujo (FACSARIA III, USA, Fig. 1). El uso de estos marcadores en la tinción permitió aislar las células de la población blanco, que tenían la superficie TRBV9+, CD3+, CD45+, así como obtener células de población negativa, es decir, las correspondientes al inmunofenotipo "TRBV9-, CD3+, CD45+". Las células de población TRBV9+ y TRBV9- de dos replicados se usaron para el aislamiento del ARN total y la secuenciación de las cadenas beta de TCR. Las fracciones celulares resultantes se colocaron en buffer RLT (Quagen, Alemania), se aisló el ARN a partir de ellas usando el kit de reactivo Quiagen RNAeasy mini kit #217004 (Quagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADNc se sintetizó en un molde de ARN aislado, los fragmentos de la cadena beta del receptor T se amplificaron de acuerdo con el protocolo descrito en Britanova et al (J Immunol, 2016, 196 (12) 5005-5013) usando el kit de síntesis de ADNc Mint (Eurogen, Rusia) Los adaptadores Illumina (USA) se ligaron a los amplicones producidos, la secuenciación se realizó en la plataforma MiSeq Illumina de acuerdo con el protocolo del fabricante del secuenciador. Los datos de secuenciación se analizaron utilizando el software MiGEC, MiXCR y VDJtools disponible en Internet en: <https://milaboratory.com>. El análisis de los repertorios resultantes de las cadenas beta de TCR mostró que las bibliotecas obtenidas mediante la clasificación usando el anticuerpo MA-042 se enriquecieron en un 93% con secuencias codificadas por el segmento del gen TRBV9, mientras que no se detectaron secuencias que comprenden TRBV9 en los repertorios de las cadenas beta de la fracción negativa "TRBV9-".

Ejemplo 5. Actividad funcional in vitro del anticuerpo MA-042

El anticuerpo monoclonal MA-042 se obtuvo como se describe en el Ejemplo 3. La fracción mononuclear de sangre humana se obtuvo como se describe en el Ejemplo 4. La actividad citotóxica de MA-042 se determinó usando el método de citofluorometría. Se usó una alícuota celular de la fracción mononuclear para calcular el número total de células, la viabilidad se determinó por la capacidad de teñir con azul de tripano. Para evaluar la eficiencia de la citotoxicidad, se incubaron $3-4 \times 10^6$ células en buffer PBS durante una hora con el anticuerpo MA-042 a una concentración de: 20 ng/ml 40 ng/ml 100 ng/ml 200 ng/ml 500 ng/ml y 1 μ g/ml, para "control cero", las células se incubaron sin añadir el anticuerpo. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS, se transfirieron a medio RPMI que comprende suero humano 10%, y se incubaron durante 72 horas en una incubador con CO₂. Las células luego se centrifugaron y se tiñeron con anticuerpos CD4-PE, CD3-eFluor405 (eBioscience, USA) y MA-042-FITC. Se usaron muestras teñidas de células en el análisis citométrico en el clasificador de células FacsAria III (BD, USA). El efecto citotóxico se evaluó mediante la disminución progresiva de la proporción de células positivas para TRBV9 en la población de linfocitos CD3+, una disminución en el número de células blanco correlacionadas con un aumento en la concentración de anticuerpos MA-042 hasta la eliminación completa de la población blanco. Se detectó la eliminación completa de la población blanco después de la tinción con MA-042 a una concentración de anticuerpo de 500 ng/ml. En "control cero", el porcentaje de linfocitos T TRBV9 se mantuvo sin cambios. La Fig. 2 muestra un resultado típico de citometría de flujo. Se obtuvo así el valor de EC50 (la concentración efectiva semimáxima se refiere a la concentración de anticuerpo para inducir la mitad del efecto máximo de un anticuerpo dado después de un período de tiempo especificado), que ascendió a 100 ng/ml para el anticuerpo MA-042 (Fig. 3) .

Ejemplo 6. Actividad funcional in vivo del anticuerpo MA-042

El anticuerpo monoclonal MA-042 se obtuvo como se describe en el Ejemplo 3. Se realizó una administración intravenosa única de MA-042 a macacos rhesus (*Macaca mulatta*) para evaluar la actividad específica y los parámetros farmacocinéticos básicos. El experimento se realizó en macacos rhesus machos sexualmente maduros con un peso de 4-10 kg, que fueron proporcionados por la Federal State Budget Scientific Institution "Scientific Research Institute of Medical Primatology". Después de la administración, los animales se sometieron a una cuarentena de 30 días.

Se estimó de forma preliminar que el contenido fraccional de linfocitos TRBV9+ en sangre periférica forma una cohorte de animales experimentales y de control. La sangre venosa de los animales se recogió en tubos de vacío EDTA (Vacurette, Greiner Bio-One, Austria) a 4 ml/tubo. Luego se aisló una fracción de células mononucleares (1.077 g/cm³ PanEco, Rusia) por gradiente de Ficoll. Para la inmunofenotipificación, se usaron 100.000 células, que se suplementaron con 1 µl de anticuerpos comerciales anti-CD8 PE/Cy5 (clon RPA-T8) (BioLegend, USA, anticuerpos anti-CD4-Alexa Fluor 488 (clon S3,5) (Thermo Fisher, USA y anticuerpos anti-CD2-PerCP Cy 5,5 (clon RPA-2.10) (BioLegend, USA), Anticuerpos anti-TcRVβ1 (TRBV9) -PE (Beckman Coulter, USA), incubados a temperatura ambiente durante 20 minutos y se lavó 2 veces con un volumen igual de solución de Hanks. Las muestras se analizaron usando el clasificador de células FACS Aria III (USA).

Durante el tiempo del experimento, los animales seleccionados se mantuvieron en jaulas metálicas individuales equipadas con contenedores de comida, portaetiquetas, a razón de 1 animal por jaula. La dieta estaba compuesta de alimentos todo en uno, frutas y verduras de acuerdo con los estándares de alimentación promedio. Los animales recibieron agua de un suministro central de agua.

Sobre la base de los resultados del análisis citométrico con anticuerpos contra los principales determinantes de la superficie de los linfocitos (CD4, CD8, CD2), los animales se dividieron en tres grupos a razón de 4 animales/grupo, incluido el grupo control. El grupo de control de animales recibió por vía intravenosa inmunoglobulina humana ("Inmunovenina", Microgen, Rusia).

A dos grupos experimentales se les administró MA-042 a dosis de 1 y 10 mg por animal, respectivamente, para un estudio comparativo del porcentaje (%) de células T TRBV9+ en la sangre periférica de macacos rhesus (*Macaca mulatta*) en función de la dosis del producto. La "inmunovenina" se diluyó con agua estéril de acuerdo con las instrucciones y se administró a una concentración de 10 mg por animal. El producto MA-042 se diluyó con solución salina buffer con fosfato de Dulbecco (DPBS) sin calcio y magnesio. Los productos se administraron en la vena ulnar de la extremidad anterior derecha en un volumen que no excede los 5 ml por inyección.

El período de observación duró 42 días. Las muestras de sangre se seleccionaron como se indica en la Tabla 3. La inmunofenotipificación y el análisis de las muestras se realizaron como se describió anteriormente.

Tabla 3. Esquema de muestro de sangre entera para determinar el porcentaje(%) de TRBV9+ entre las células T

Semana	Día	Hora	Comentarios
1	1	0	Base (antes de la primera administración)
1	4	72	72 horas después de la administración
1	7	144	144 horas después de la administración
3	15	336	336 horas después de la administración
4	25	576	576 horas después de la administración
6	42	984	984 horas después de la administración

Como resultado, 72 horas después de la administración de MA-042, los animales mostraron una eliminación casi completa de TRBV9+ en sangre periférica en ambas concentraciones. Se detectó una porción de linfocitos TRBV9+ 336 horas después de la administración del producto a una concentración de 1 mg/animal. No se detectaron linfocitos TRBV9+ en animales que recibieron el producto a una dosis de 10 mg. 42 días después de la administración, no se detectaron casos de linfocitos TRBV9+ en los grupos

experimentales; el grupo control exhibió el mismo nivel de linfocitos TRBV9+ que tenía antes del experimento.

Ejemplo 8. Preparación de la composición farmacéutica que comprende anticuerpo de la invención

La composición farmacéutica se obtuvo mediante técnicas estándares que son conocidas en la técnica.

Tabla 4. Concentraciones de los componentes de la composición farmacéutica

Componente	Concentración
Anticuerpo MA-042	10-50 mg/ml
Buffer citrato 10 mM a pH	6,0-7,0
Cloruro de sodio	50-150 mM
Sacarosa,trehalosa	0,3-0,5%
Agua para inyecciones	hasta 1 ml.

Ejemplo 9. Kit que comprende una composición farmacéutica con anticuerpos

Para producir kits con una forma de dosis que comprende una composición de anticuerpo MA-042, la composición farmacéutica preparada de acuerdo con el Ejemplo 5 se sella en ampollas o jeringas de 1 ml en condiciones estériles, se etiqueta y se envasa en envases de plástico o cartón.

Además, se incluye un prospecto en el envase de la ampolla.