

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 523**

21 Número de solicitud: 201730207

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.02.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.09.2018

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2018/070103

71 Solicitantes:

INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (100.0%)
Avenida de Monforte de Lemos, 5
28029 Madrid ES

72 Inventor/es:

NOTARIO MUÑOZ, Laura y
LAUZURICA GÓMEZ, Pilar

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **USO DE MODULADORES DE LA FUNCIÓN DE CD69 PARA LA MOVILIZACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE PRECURSORES HEMATOPOYÉTICOS**

57 Resumen:

Uso de moduladores de la función de CD69 para la movilización y proliferación de precursores hematopoyéticos.

La presente invención se refiere al uso de moduladores que inhiben la función de la molécula CD69, preferiblemente de un anticuerpo anti-CD69, para la elaboración de un medicamento para provocar la proliferación y salida o movilización de células hematopoyéticas desde médula ósea en un sujeto, de modo que es útil para la prevención y/o tratamiento de leucopenias, trombopenia, y/o pancitopenia.

Uso de moduladores de la función de CD69 para la movilización y proliferación de precursores hematopoyéticos

DESCRIPCIÓN

5

En la presente invención se demuestra que el uso de moduladores de CD69 produce la movilización de precursores hematopoyéticos y su acumulación en sangre y órganos linfoides periféricos. Las células movilizadas pueden ser extraídas de sangre para ser posteriormente trasplantadas al paciente. Por lo tanto, dichos moduladores son útiles para la prevención y tratamiento de leucopenias primarias o secundarias, como las derivadas de tratamientos con quimioterapia o radioterapia que destruyen células hematopoyéticas. La presente invención se puede encuadrar, por tanto, en el campo de la medicina dentro del sector farmacológico para su aplicación en el sector sanitario.

10

15

ESTADO DE LA TÉCNICA

Muchos animales, incluyendo seres humanos, en ciertas condiciones exhiben una incapacidad para proporcionar las cantidades necesarias o beneficiosas de elementos sanguíneos, bien a raíz de determinadas enfermedades o por tratamientos terapéuticos. Por ejemplo, la leucopenia es un trastorno de la sangre caracterizado por la disminución del número de leucocitos en sangre que puede ser causada por determinados tratamientos tales como quimioterapia o radioterapia.

20

25

La producción de células de la sangre se mantiene por las células madre/progenitoras hematopoyéticas (HSPC) que residen en nichos especializados dentro de la médula ósea (MO). Uno de los principales mecanismos que conserva los HSPC en sus nichos de MO implica la interacción del receptor CXCR4 con el factor derivado del estroma α -quimioquinas 1 (SDF-1/CXCL12). Mientras CXCR4 se expresa en la superficie de las HSPC, SDF-1 se expresa en la superficie de células que recubren los nichos de HSPC. Hay otros factores implicados como los que muestran actividad quimiotáctica de HSPCs. Las HSPCs responden a los gradientes de esfingosina-1-fosfato (S1P) por medio de su receptor para S1P1. Los agonistas de este receptor movilizan células mientras que los antagonistas actúan de forma opuesta (Curr Opin Hematol 2013, 20:281–288).

30

35

Existen tratamientos con distintos factores que afectan a la interacción de las HSPCs con su nicho. El más utilizado en la práctica clínica es el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), que se combina en determinados casos con el compuesto AMD3100 (Phenylenebis(methylene)]bis [1,4,8,11-tetraazacyclo tetradecane) que interfiere con la interacción de CXCR4 y CXCL12/SDF-1. Estos tratamientos causan la salida de HSPCs de nichos de la médula ósea y el tráfico a la sangre periférica, un proceso denominado 'movilización'. El fenómeno de movilización se utiliza clínicamente para adquirir HSPC para auto-trasplante y alotrasplante. Sin embargo, con G-CSF solo, el 35% de pacientes es incapaz de movilizar un número suficiente de células HSPC para asegurar el injerto y la recuperación hematopoyética sostenida. Así, resulta de particular interés la identificación de nuevos agentes que por sí solos o en combinación con los anteriores conduzcan a más eficientes estrategias de movilización, especialmente en aquellos pacientes que están en riesgo de fracaso de movilización. Entre otros movilizadores se están probando en la actualidad: moduladores de CXCL12/CXCR4, inhibidores de la molécula de adhesión celular vascular-1/antígeno 4 muy tardío (VCAM/VLA-4), hormona paratiroidea, inhibidores del proteosoma, Gro β y estabilizadores de HIF. Sin embargo, todos estos tratamientos presentan efectos secundarios (Hopman RK *et al.* 2014 Blood Rev 28(1):31-40). Igualmente, entre las estrategias en desarrollo están la utilización de los moduladores de receptores de S1P, como por ejemplo el agonista FTY720, también utilizado para esclerosis múltiple y que tiene efectos secundarios, como daño cardíaco.

Los estudios más recientes se focalizan en la composición de las células progenitoras movilizadas en cuanto a células madre y progenitores leucocitarios, y sobre cómo las diferentes estrategias de movilización según las células movilizadas para los injertos de precursores hematopoyéticos (autotrasplantes y alotrasplantes), pueden influir en el resultado de los pacientes. El tratamiento farmacológico para la movilización de HSPCs, su obtención de sangre y su implantación, es un campo de intenso estudio. Las HSPCs son utilizadas para terapias con células en medicina regenerativa para los pacientes con infarto agudo de miocardio, lesión de la médula espinal, y los accidentes cerebrovasculares, entre otros, además de para el trasplante hematopoyético para la reconstitución, tras tratamientos como radiación ionizante o quimioterapia, de las células sanguíneas en muchas neoplasias hematológicas y varios tipos de tumores sólidos. En el contexto del trasplante de células HPSCs, en particular, un bajo número de ellas resulta en una baja eficacia del trasplante, lo que puede afectar notablemente a la supervivencia de los pacientes sometidos al mismo.

Por lo tanto, expandir el número de células trasplantadas ha sido una meta buscada durante mucho tiempo. Células hematopoyéticas se requieren también para acortar el tiempo de neutropenia después de quimioterapia citotóxica previa a trasplantes. Sin embargo, a día de hoy existe el problema de que la movilización de células progenitoras hematopoyéticas o HPSCs, especialmente en algunos pacientes, es pobre y para un correcto tratamiento o prevención de las patologías indicadas se requieren estrategias de movilización más eficientes. Por otra parte, debido al éxito en la aplicación de células madre para el tratamiento de trastornos hematopoyéticos, los investigadores de otras especialidades clínicas están buscando una fuente de células madre que puedan usarse de manera segura y eficaz para el tratamiento de órganos dañados (por ejemplo, corazón, médula espinal o hígado). Así, continúa el interés por estrategias de tratamiento eficientes utilizando células con potencial de diferenciación amplio como las obtenidas de los tejidos hematopoyéticos. Por lo tanto, se necesita un método que consiga una más eficaz salida de precursores hematopoyéticos desde médula ósea tanto para aplicaciones terapéuticas como preventivas, por ejemplo frente a la leucopenia.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La nueva estrategia descrita en esta invención para la movilización de células progenitoras hematopoyéticas desde médula ósea al sistema sanguíneo y linfático está fundamentada en la modulación de la molécula leucocitaria CD69. Aquí se demuestra que la modulación de CD69 se puede usar para regular la movilidad de células progenitoras hematopoyéticas desde su nicho en la médula ósea a la sangre, linfa y órganos linfáticos, para posteriormente tratar una variedad de situaciones médicas que requieren trasplante de estas HSPCs. La invención, además, describe cómo la modulación de CD69 en médula ósea induce la proliferación de precursores hematopoyéticos, principalmente aquellos que incluyen células madre, además de inducir proliferación en células linfoides y mieloides, superior a la inducida por el movilizador AMD3100.

En la presente invención se demuestra concretamente que el empleo de anticuerpos monoclonales específicos para CD69-humano constituye una terapia eficaz para la proliferación y movilización de células progenitoras hematopoyéticas desde la médula ósea hacia la sangre periférica y el sistema linfático. Además, este tratamiento permite

la expansión de las células progenitoras hematopoyéticas mientras preserva su capacidad regenerativa.

5 La utilización de la molécula CD69 como diana para la proliferación y movilización de
precursores hematopoyéticos desde médula ósea es una estrategia nueva, ya que no
se ha vinculado hasta la fecha el uso de moduladores de la molécula CD69 con la
proliferación y movilización de precursores hematopoyéticos. Así, se ha descrito que
los ratones CD69 (-/-) tienen un desarrollo de células hematopoyéticas en general
10 normal con subpoblaciones leucocitarias normales en sangre periférica (Lauzurica *et al.*, 2000, *Blood*, 95(7): 2312-20, PMID: 10733501; Esplugues *et al.*, 2003, *J Exp Med*,
197(9): 1093-106, PMID: 12732655). No se encontraron diferencias en las
poblaciones precursoras analizadas en médula ósea, aunque el número de los
progenitores *stem* hematopoyéticos no fue examinado en profundidad entre CD69(-/-)
y CD69(+/+). Además, en esos trabajos se demostró que los procesos de maduración
15 linfocitaria no estaban alterados en los ratones CD69(-/-) y así, las funciones de las
células NK y CTLs del ratón deficiente en CD69 mostraron una actividad citotóxica
similar a la del ratón salvaje y los linfocitos deficientes en CD69 tenían una respuesta
proliferativa normal a estímulos tanto de células T como B.

20 En la presente invención se demuestra el papel de CD69 como modulador de la
proliferación y movilización de HSPCs, lo que indica que es posible el empleo de esta
molécula como diana en la obtención de las células precursoras sanguíneas para
trasplantes autólogos o alogénicos previo a la eliminación de las células
hematopoyéticas por tratamientos como quimioterapia y otros necesarios para
25 eliminar distintas patologías.

La manipulación de la molécula CD69 como regulador de la proliferación y
movilización de las células progenitoras hematopoyéticas puede impulsar el desarrollo
de nuevos tratamientos para obtener precursores para reconstituir el sistema
30 hematopoyético dañado, incluyendo la combinación de reguladores de CD69 con
tratamientos ya establecidos de movilización de precursores en la clínica médica.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un modulador de
CD69 para provocar o inducir la proliferación de precursores hematopoyéticos en
35 médula ósea y su salida o movilización desde la médula, *in vitro* o *in vivo* en un sujeto;
o para la elaboración de un medicamento, donde dicho medicamento es utilizado

preferiblemente para provocar o inducir la proliferación de precursores hematopoyéticos y su salida o movilización desde médula ósea en un sujeto. Es decir, la presente invención se refiere a un modulador de CD69 para su uso como medicamento, preferiblemente donde dicho medicamento es para provocar o inducir la proliferación de precursores hematopoyéticos y su salida (movilización) desde médula ósea en un sujeto. La inducción de la proliferación de los precursores producida por el modulador de CD69 mejorará la recuperación (es decir la movilización y recolección) de un número adecuado de dichos precursores, y por tanto facilitará una rápida disposición del sujeto a sucesivas movilizaciones de precursores, en caso necesario.

10

CD69 pertenece a la familia de las lectinas tipo C y su gen se sitúa en la región génica del complejo NK (Número de acceso al GenBank: Q07108). Como se usa aquí, CD69, también conocida como "proteína de activación muy temprana", "molécula de inducción de activación" y "gp34/28", se refiere a la proteína CD69 de mamífero, preferiblemente a la proteína de CD69 humana. El término "CD69 humano" se refiere a un polipéptido que tiene (o es homólogo a) al menos un 80, 81, 82, 83, 84 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de identidad con una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, o que está codificado por: (a) una secuencia de ácido nucleico que codifique para la proteína CD69 humana (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifique para CD69 humano según SEQ ID NO: 2); (b) una secuencia de ácido nucleico degenerada a una secuencia de CD69 humano natural; (c) un ácido nucleico de secuencia homóloga a (por ejemplo, al menos sobre un 85%, 90%, 95% idéntico a) la secuencia de ácido nucleico para CD69 humano natural, preferiblemente a la SEQ ID NO: 2; o (d) una secuencia de ácido nucleico que hibride con alguna de las secuencias de ácido nucleico indicadas con anterioridad bajo condiciones astringentes, preferiblemente, condiciones altamente astringentes. En una realización preferida, el CD69 es una variante o alelo natural de CD69. Ejemplos de secuencias del polipéptido CD69 que se encuentran dentro del ámbito de la presente invención, aparte de la SEQ ID NO: 1, son, pero sin limitarnos, AR380696 (secuencia 1241 de US6607879), AX774846 (secuencia 162 de WO03038129), CS500461 (secuencia 162 de EP1767656), FB715394 (secuencia 19 de WO2007140011).

15

20

25

30

El experto en la materia conoce que CD69 es una molécula que se expresa rápida y transitoriamente durante la activación de los leucocitos tras un desafío inmune. CD69 se expresa en todos los linajes hematopoyéticos excepto eritrocitos, y aunque se

detecta *in vivo* en algunos subtipos de linfocitos T y B en tejidos linfoides periféricos (Testi R. *et al.*, 1994, Immunol Today, 15(10): 479-83, PMID:7945773; Sancho D. *et al.*, 2005, Trends Immunol., 26(3): 136-40, PMID:15745855), su expresión es mucho más intensa y persistente en infiltrados leucocitarios incluidos los de diversas enfermedades inflamatorias crónicas como artritis reumatoide y hepatitis viral crónica, en los leucocitos responsables del rechazo de trasplantes, los leucocitos involucrados en la respuesta alérgica, células inmunitarias en las lesiones ateroscleróticas, linfocitos que infiltran tumores o durante infecciones persistentes. Existen evidencias de que CD69 está involucrado en la activación de células derivadas de la médula ósea (Testi R. *et al.*, 1994, Immunol Today, 15(10): 479-83, PMID:7945773). No obstante, el desarrollo hematopoyético y la maduración de los linfocitos T son casi normales en ratones deficientes para CD69 en condiciones fisiológicas (Lauzurica *et al.*, 2000 Blood Apr 1 95(7):2312-20). Sin embargo, como se ha explicado anteriormente, la utilización de la molécula CD69 como diana para la proliferación y movilización de precursores hematopoyéticos desde médula ósea es una estrategia nueva, ya que no se ha vinculado hasta la fecha el uso de moduladores de la molécula CD69 con la proliferación y movilización de precursores hematopoyéticos.

El término “idéntico” o “sustancialmente idéntico” se refiere a una primera secuencia de aminoácidos o nucleótidos que contiene un número suficiente de aminoácidos o nucleótidos idénticos o equivalentes (es decir, con cadenas laterales semejantes, sustituciones de aminoácidos conservados, etc.) a una segunda secuencia de aminoácidos o nucleótidos, tal que la primera y la segunda secuencia tienen actividades similares. En el caso de anticuerpos, el segundo anticuerpo tiene la misma especificidad y al menos un 50% de la afinidad demostrada con el primero.

Los cálculos de identidad entre dos secuencias se pueden llevar a cabo como sigue: las secuencias se alinean para realizar una comparación óptima (es posible introducir espacios vacíos (*gaps*) en una o ambas secuencias para un alineamiento óptimo y las secuencias no idénticas pueden descartarse). De forma ideal, la longitud de una secuencia de referencia alineada para comparación de secuencia es al menos un 30% de la secuencia total, aunque es tanto mejor cuanto mayor es el porcentaje. Así, se comparan los residuos aminoacídicos o los nucleótidos de ambas cadenas en posiciones correspondientes. Cuando existe una coincidencia exacta para ambas secuencias en una posición determinada, entonces ambas secuencias son idénticas en dicha posición (se emplea el término “identidad”). El porcentaje de identidad entre

dos secuencias es en función del número de posiciones idénticas encontradas en ambas secuencias, teniendo en cuenta el número de gaps cuya introducción se requiere para un alineamiento óptimo, así como la longitud de los mismos.

5 La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede realizarse empleando algoritmos matemáticos. Idóneamente, se emplea el algoritmo de Needleman y Wunsch (Needleman y Wunsch (1970), J. Mol. Biol. 48:444-453), que se ha implementado en el programa GAP del paquete de software GCG, empleando bien una matriz Blossum 62, bien una PAM250 y un *gap weight* de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ó 4 y una *length weight* de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. Otra forma idónea de calcular el porcentaje de identidad es emplear el programa GAP del software GCG, empleando una matriz NWSgapdna.CMP y un *gap weight* de 40, 50, 60, 70 u 80 y una *length weight* de 1, 2, 3, 4, 5, ó 6. El grupo de parámetros de referencia (que debería emplearse si el investigador no está seguro de los parámetros que deben aplicarse para determinar si una molécula está dentro de la limitación de identidad de la invención) está constituido en una matriz Blossum 62 con una penalización de gap de 12, una extensión de la penalización de gap de 4 y una penalización de *frameshift gap* de 5.

20 En la presente invención se entiende por “precursor hematopoyético” o “células precursoras de múltiples linajes” o “células madre hematopoyéticas” células hematopoyéticas que no expresen marcadores de linajes hematopoyéticos maduros (lin-) y que preferiblemente incluyen, pero sin limitarnos, células SCA+ CD34+ y alta expresión del marcador c-Kit (c-Kit^{hi}) (Grant A. Challen *et al* Cytometry A. 2009 Jan; 75(1): 14–24). Además, estas células precursoras hematopoyéticas pueden ser clasificadas de acuerdo a la expresión de los marcadores FLT3 y CD34 en: LT-HSC o *long term* HSC (KSL CD34^{neg} FLT3^{neg}), ST-HSC o *short term* HSC (KSL CD34⁺ FLT3^{neg}) o MPP o progenitores multipotentes (KSL CD34⁺ FLT3⁺) (Merchant A, *Blood* 2010, 115(12):2391-2396).

30 En la presente invención la salida o movilización de los precursores hematopoyéticos desde la médula ósea es mayoritariamente hacia la sangre, linfa y órganos linfoides periféricos del mismo sujeto, de forma similar al reparto de células hematopoyéticas en estado basal, es decir en ausencia de movilización inducida externamente como se propone en la presente invención. Mayoritariamente, la movilización hacia órganos es

hacia tejidos linfáticos como, por ejemplo pero sin limitarnos, bazo y ganglios y en proporción menor hacia órganos no linfoides, mucosas, piel y otros órganos internos.

5 En una realización preferida del primer aspecto de la invención la proliferación y salida de precursores hematopoyéticos desde la médula ósea sirve para la prevención y/o el tratamiento de trastornos hematopoyéticos asociados a una producción deficiente de células sanguíneas, tales como por ejemplo pero sin limitarnos, leucopenia, trombopenia o pancitopenia en un sujeto, es decir, el medicamento al que se refiere la presente invención previene y/o trata trastornos hematopoyéticos asociados a una
10 producción deficiente de células sanguíneas, preferiblemente las mencionadas enfermedades. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un modulador de CD69 para su uso en la prevención y/o tratamiento de trastornos hematopoyéticos asociados a una producción deficiente de células sanguíneas, preferiblemente de leucopenia, trombopenia o pancitopenia en un sujeto. Preferiblemente la leucopenia es
15 neutropenia, linfopenia, eosinopenia o monocitopenia. Así, esta prevención y/o tratamiento ocurre en el mismo individuo donde se ha inducido previamente una proliferación y movilización de los precursores hematopoyéticos como se indica en la presente invención.

20 En otra realización preferida del primer aspecto de la invención la proliferación y salida de precursores hematopoyéticos desde la médula ósea sirve para la obtención de dichos precursores para un trasplante. Es decir, la presente invención se refiere al uso de un modulador de CD69 para la obtención de dichos precursores para un trasplante. Dado que la administración del modulador de CD69 induce la proliferación de estos
25 precursores, es posible realizar sucesivas rondas de obtención de dichos precursores.

El trasplante puede ser en el mismo individuo donde se ha inducido la proliferación y movilización de los precursores hematopoyéticos (autólogo) o en otro individuo (allogénico o heterólogo). El trasplante alogénico puede ser singénico, alogénico de
30 hermano HLA (antígeno de histocompatibilidad) idéntico, haploidentico o de donante no emparentado. Por tanto, cuando el trasplante es alogénico, la prevención y/o tratamiento de trastornos hematopoyéticos asociados a una producción deficiente de células sanguíneas, preferiblemente de leucopenia, trombopenia o pancitopenia, ocurre en un individuo al que se le han trasplantado los precursores hematopoyéticos
35 obtenidos (extraídos) tras la proliferación y movilización de los mismos en el primer individuo.

En la presente invención se entiende por “modulador” una sustancia de cualquier naturaleza que de cualquier forma modifique la función de CD69 e incluye, pero no exclusivamente, bloqueantes, inhibidores, antagonistas y/o agonistas. La actividad de CD69 puede ser modulada por la modificación de los niveles y/o de la actividad de la proteína CD69, o por la modificación de los niveles a los que se transcriben los genes que codifican CD69, de modo que los niveles de actividad de la proteína CD69 en la célula son modulados.

Ejemplos de moduladores de CD69 incluyen, pero no se limitan a, antisentido de CD69, preferiblemente antisentido de mRNA, ARNi (ácido ribonucleico de interferencia) para interferir con el mensajero de CD69, una molécula de anticuerpo anti-CD69, y otros compuestos identificados por algún método descrito aquí, por ejemplo, compuestos que interaccionan con CD69, pequeñas moléculas que se unan a CD69 y antagonicen su actividad, y moléculas de anticuerpo anti-CD69 moduladores. Ejemplos de pequeñas moléculas incluyen, pero no se limitan a, péptidos, peptidomiméticos (por ejemplo peptoides), aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, compuestos orgánicos e inorgánicos (incluyendo compuestos heteroorgánicos y organometálicos) con peso molecular menor de unos 5000 g/mol, y sales, ésteres y otras formas aceptables farmacológicamente de tales compuestos. Ejemplos de otros moduladores de CD69 incluyen, pero no se limitan a: moduladores (antagonistas, agonistas y bloqueantes) del receptor de CD69 (CD69R), polipéptidos, péptidos, peptidomiméticos, formas solubles de CD69R, proteínas de fusión moduladoras de CD69R, por ejemplo, proteínas de fusión de moduladores de CD69R con proteínas del suero (por ejemplo proteínas de fusión de CD69R con inmunoglobulinas, o de CD69R con albúmina de suero humana) u otras formas de proteínas de fusión moduladoras de CD69R diseñadas para aumentar la vida media en el suero y/o la multivalencia.

El término “inhibidor”, como se usa aquí, se refiere principalmente a una molécula que disminuye el nivel de actividad de la proteína o gen (o mRNA) de CD69 en una célula. Los agentes inhibidores pueden ser sustancias que son capaces de unirse a un receptor y provocar una respuesta en la célula basada en una disminución de la actividad de CD69, así como sustancias que no solamente no activan el receptor, sino que en realidad bloquean su activación por los agonistas.

35

El término “bloqueante”, como se usa aquí es una molécula, como por ejemplo un anticuerpo, que se une a CD69 sin provocar reacción pero previene que otras moléculas, por ejemplo otros anticuerpos, se unan a CD69.

5 En una realización más preferida, el modulador de CD69 se selecciona de la lista que consiste en: inhibidor, agonista, antagonista, bloqueante o un RNA de interferencia. En una realización más preferida, el modulador es un anticuerpo monoclonal (pudiendo tener dicho anticuerpo actividad inhibidora, agonista, antagonista o bloqueante, por ejemplo) o una mezcla de anticuerpos monoclonales. Preferiblemente
10 el anticuerpo monoclonal se selecciona de la lista que consiste en: anticuerpo humanizado, anticuerpo humano, anticuerpo quimérico, anticuerpo deinmunizado, fragmentos de anticuerpos y nanocuerpo (o *nanobodies*, anticuerpos de dominio simple o anticuerpos V_HH).

15 Métodos para generar anticuerpos monoclonales (tanto humanos, murinos, de camélidos o de otros vertebrados), humanizar anticuerpos, generar anticuerpos quiméricos, deinmunizar anticuerpos y generar fragmentos de anticuerpos son conocidos por el experto en la materia.

20 Ejemplos de moléculas moduladoras de CD69 incluyen, pero no se limitan a, moléculas de anticuerpo que unen CD69 e interfieren con la unión de CD69 y un polipéptido que se une a CD69, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD69 humano, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD69 humano análogo al anticuerpo monoclonal anti-CD69 2.8 descrito aquí o a cualquier anticuerpo anti-CD69 conocido en la bibliografía
25 que pueda actuar como antagonista o bloqueante o agonista (o una molécula de anticuerpo basada en él, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo, o un anticuerpo quimera, humanizado o desimmunogénico) o una molécula de anticuerpo que se une al epítipo unido por tal anticuerpo, o una molécula que compita por la unión con tal anticuerpo, o una molécula de anticuerpo que se una o interfiera con la unión de otro
30 anticuerpo o ligando a uno o más de los residuos de aminoácidos del CD69 humano, preferiblemente a los residuos Glu 140, Asp171, Glu 180, Glu 185, Glu 187, Phe 175, Met 184, Leu 190, Glu 185 y Lys188.

Preferiblemente el anticuerpo es un anticuerpo frente a CD69 humano. Más
35 preferiblemente el anticuerpo es el denominado anticuerpo monoclonal 2.8, que se une específicamente a CD69 humano, donde dicho anticuerpo comprende una

cadena pesada que comprende las regiones variables CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, respectivamente, y una cadena ligera que comprende las regiones variables CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de secuencias aminoacídicas SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, respectivamente. Este anticuerpo monoclonal anti-CD69 2.8 comprende, más preferiblemente, una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 10, las cuales comprenden los dominios variables CDR anteriormente mencionados. El anticuerpo monoclonal anti-CD69 2.8, que específicamente reconoce la molécula CD69 humana, se generó mediante la fusión de células de mieloma NS-1 con células de bazo de un ratón CD69 (-/-) que previamente se había inmunizado 3 veces con células pre-B 300-19 que expresan la molécula CD69 humana por haber sido transfectadas con el cDNA específico. La especificidad se define por el reconocimiento de células humanas CD69+, pero no de las células de ratón CD69 (+/+) ni CD69 (-/-). Así, anti-CD69 2.8 reconoce la molécula CD69 humana pero no la de ratón.

Una molécula de anticuerpo anti-CD69 es una molécula de anticuerpo que interacciona con (por ejemplo, se une a) CD69, preferiblemente a la proteína de CD69 humana. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo anti-CD69 se une al dominio extracelular de CD69 (por ejemplo, a un epítipo de CD69 localizado fuera de la célula). Ejemplos de anticuerpos monoclonales frente a CD69 humano incluyen, pero no se limitan a, una molécula de anticuerpo anti-CD69 humano análoga u homóloga al anticuerpo anti-CD69 humano 2.8, una molécula de anticuerpo anti-CD69 humano análoga u homóloga al anticuerpo anti-CD69 humano 2.22 o un anticuerpo anti-CD69 humano conocido en la bibliografía que pueda actuar como agonista, bloqueante, antagonista o eliminador de CD69 o moléculas de anticuerpo que reconocen epítopos que solapen con el epítipo reconocido por tal anticuerpo o que compitan con tal anticuerpo para la unión.

Ejemplos de anticuerpos anti-CD69 humano conocidos en la bibliografía y que se pueden utilizar en la presente invención incluyen: TP1/8, TP1/22, TP 1/28, TP 1/33, TP 1/55 (como se describe, por ejemplo, en Cebrián, *et al.*, 1988, J Exp Med., 168(5): 1621-37); CH/4, CH/1, CH/2, FAB/1 (como se describe por ejemplo en Sánchez-Mateos, Sánchez-Madrid, 1991, Immunol., 21(10): 2317-25); L78, MLR3, FN61, FN50 (como se describe, por ejemplo, en Schwarting, R. *et al.* (Eds) Leukocyte Typing IV, Springer-Verlag, New York, 1989, p. 428); MLR3 (como se describe, por ejemplo, en

Corte *et al.*, 1981, Eur J Immunol., 11(2), 162-164); EA-1; Leu 23 (como se describe, por ejemplo, en Lanier, *et al.*, 1988, J Exp Med., 167(5): 1572-85); y C1.18, E16.5 (como se describe, por ejemplo, en Gerosa, *et al.*, 1991, Mol Immunol., 28(1-2): 159-68).

5

Ejemplos de moléculas de anticuerpo que se pueden usar en la invención incluyen pero no se limitan a: una molécula de anticuerpo que interacciona con, por ejemplo, se une a, un epítipo que incluye uno o más residuos de la región cuello de un polipéptido de CD69 (por ejemplo, uno o más residuos del 62-84 del CD69 humano); una
 10 molécula de anticuerpo que interacciona con, por ejemplo, se une a, uno o más residuos del dominio exterior (o dominio de reconocimiento de carbohidratos, CRD) de un polipéptido de CD69 (por ejemplo, uno o más residuos de los residuos 82 a 199 del CD69 humano); una molécula de anticuerpo que interacciona con, por ejemplo, se une a, un epítipo que incluye uno o más residuos del dominio intracelular de un
 15 polipéptido de CD69 (por ejemplo, uno o más residuos de 1-40 del CD69 humano); una molécula de anticuerpo que interacciona con, por ejemplo, se une a, un epítipo al que cuando se une modula, por ejemplo, aumenta o reduce, la interacción de las regiones de CD69 citoplásmico y/o transmembrana con un efector, cuya actividad puede determinarse por los métodos descritos aquí (por ejemplo, incremento de
 20 expresión de receptores CXCR4 y/o S1P1, producción de TGF-[beta] , activación de MAPK, o señalización por Ca²⁺); una molécula de anticuerpo que interacciona con, por ejemplo, se une a, un epítipo (por ejemplo, un epítipo conformacional o lineal), el cual se modula cuando el anticuerpo está unido, por ejemplo, aumenta o reduce la formación de dímeros de CD69 (por ejemplo, un epítipo que incluye el residuo Cys68
 25 del CD69 humano o un residuo localizado cerca de la Cys68); una molécula de anticuerpo que puede modular la unión de un ligando de CD69, por ejemplo, un anticuerpo que puede inhibir, por ejemplo inhibir competitivamente, o potenciar la unión de un ligando a CD69; una molécula de anticuerpo que interacciona con, por ejemplo, se une a, o que puede inhibir o potenciar la unión de un ligando a uno o más
 30 residuos de aminoácidos del CD69 humano, preferiblemente a los residuos Glu 140, Asp171, Glu 180, Glu 185, Glu 187, Phe 175, Met 184, Leu 190, Glu 185 y Lys188.

En una realización preferida, la molécula de anticuerpo anti-CD69 se une a todo o parte del epítipo reconocido por un anticuerpo descrito aquí como, por ejemplo, por
 35 un anticuerpo anti-CD69 humano conocido en la bibliografía que puede actuar como un antagonista o un eliminador, o por un anticuerpo anti-CD69 humano análogo a un

anticuerpo anti-CD69 de ratón, por ejemplo, anticuerpo 2.2, 2.3, o H1.2F3 (descrito, por ejemplo, en Esplugues *et al.* 2003 J Exp Med May 5, 197(9):1093-106). El anticuerpo anti-CD69 se puede unir a uno o más residuos de los epítomos descritos o competir por la unión a un anticuerpo que se une a uno de los epítomos descritos. La

5 molécula de anticuerpo anti-CD69 puede inhibir, por ejemplo, inhibir competitivamente, la unión de un anticuerpo descrito aquí, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD69 humano conocido en la bibliografía como los aquí descritos frente al CD69 humano. Una molécula de anticuerpo anti-CD69 puede unirse a un epítomo, por ejemplo, un epítomo conformacional o lineal, de manera que cuando interaccionen se

10 prevenga la unión de uno de los anticuerpos descritos aquí, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD69 humano conocido en la bibliografía como los aquí descritos frente a CD69 humano. El epítomo puede estar muy próximo o funcionalmente asociado, por ejemplo, un epítomo solapante o adyacente en secuencia lineal o conformacionalmente, a uno de los reconocidos por un anticuerpo descrito aquí, por

15 ejemplo, un anticuerpo anti-CD69 humano conocido en la bibliografía como los aquí descritos frente al CD69 humano.

En un ejemplo preferido, la interacción, por ejemplo, la unión, entre una molécula de anticuerpo anti-CD69 y CD69 ocurre con alta afinidad (por ejemplo, constante de

20 afinidad de al menos $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, preferiblemente, entre $3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ y $3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, o sobre $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) y especificidad. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo anti-CD69 modula la respuesta inmune, por ejemplo, actúa como un bloqueante, antagonista o eliminador de CD69.

25 Como se usa aquí, "unión específica" o "especificidad" se refiere a la propiedad del agente de unión, preferiblemente el anticuerpo, de: (1) unirse a CD69, por ejemplo, una proteína de CD69 humano, con una afinidad de al menos $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, y (2) preferentemente unirse a CD69, por ejemplo, la proteína de CD69 humano, con una afinidad que es al menos dos veces, 50 veces, 100 veces, 1000 veces, o mayor que

30 su afinidad de unión a un antígeno no específico (por ejemplo, sero albúmina bovina, caseína) distinto a CD69.

Como puede verse en la presente invención, muchos tipos de moléculas de anticuerpo anti-CD69, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de ellos que se unan al

35 antígeno, son útiles en los métodos de esta invención. Las moléculas de anticuerpo pueden ser de varios isotipos, incluyendo: IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2 (por ejemplo,

IgG2a, IgG2b), IgG3, IgG4), IgM, IgA1, IgA2, IgD, o IgE. Una molécula de anticuerpo preferida es de isotipo IgG. Las moléculas de anticuerpo pueden ser de longitud completa (p.e, un anticuerpo IgG1 o IgG4) o pueden incluir sólo un fragmento de unión al antígeno (por ejemplo, un Fab, F (ab')₂, Fv o una cadena sencilla de un fragmento Fv).

El término “antígeno” hace referencia a una molécula, tal como un péptido, un hidrato de carbono, un glicolípido, una glicoproteína o una molécula que es reconocida y se une a un anticuerpo. La parte del antígeno que es la diana de la unión del anticuerpo corresponde al determinante antigénico. En el contexto de la presente invención, el antígeno es un péptido de CD69, preferiblemente de CD69 humano.

El anticuerpo es preferiblemente una molécula de anticuerpo diseñada por los métodos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, un anticuerpo humanizado.

Los anticuerpos, u otros agentes descritos aquí, pueden ser evaluados por su capacidad para actuar como moduladores de CD69.

Como se usa aquí, el término “molécula de anticuerpo”, se refiere a una molécula que incluye un número suficiente de regiones determinantes de complementariedad (CDRs), preferiblemente 6, presentadas en una disposición que permite la unión de las CDRs al antígeno conocido. Así, el término incluye anticuerpos completos (incluyendo los anticuerpos naturales y los diseñados por Biología Molecular), y fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos naturales o diseñados. El término incluye varios tipos de anticuerpos o moléculas de anticuerpo, incluyendo los mono-específicos, monoclonales, recombinantes, humanos, y no humanos, por ejemplo, murinos. También se incluyen anticuerpos de cadena sencilla, intracuerpos y anticuerpos bivalentes. También se incluyen moléculas de anticuerpo quiméricas, con un CDR distinto injertado, humanizados, desimmunogénicos, así como otras que hayan sido diseñadas para reducir la inmunogenicidad, por ejemplo, aquellos con CDRs derivados de una fuente no humana, por ejemplo, de un animal no humano como el ratón, y/o derivados de la generación parcial o totalmente al azar de secuencias, por ejemplo, usando un método de selección en fagos. Tales fragmentos no humanos pueden ser insertados en moléculas humanas, humanizadas, o en otras disposiciones que las hagan menos antigénicas cuando se administren a un humano.

Así, una molécula de anticuerpo puede tener CDRs de una fuente no humana, por ejemplo, de un anticuerpo no humano, por ejemplo, de una inmunoglobulina de ratón u otra inmunoglobulina no humana, de una secuencia consenso, o de una secuencia generada por selección de fagos, o cualquier otro método para generar diversidad; y
5 teniendo una disposición que es menos antigénica en una estructura humana que no humana, por ejemplo, en el caso de CDRs de una inmunoglobulina no humana, menos antigénico que la estructura no humana de la cual los CDRs no humanos se tomaron.

10 La estructura de la inmunoglobulina puede, por ejemplo, ser humana, no humana humanizada, por ejemplo, de un ratón, de estructura modificada para reducir la antigenicidad en humanos, o una estructura sintética, por ejemplo, una secuencia consenso o de un método de generación de diversidad *in vitro*.

15 Las moléculas de anticuerpo preferidas pueden incluir al menos una, y preferiblemente dos, regiones variables de la cadena pesada (VH) o sus fragmentos de unión al antígeno, y al menos una o preferiblemente dos regiones variables de la cadena ligera (VL) o sus fragmentos de unión al antígeno. Las regiones VH y VL se subdividen en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de
20 complementariedad (CDR), interespaciadas con regiones que son más conservadas, llamadas regiones estructurales (FR). La extensión de las regiones estructurales y los CDRs son conocidas por el experto en la materia. Preferiblemente, cada VH y VL de una molécula de anticuerpo se compone de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestos desde el extremo amino-terminal al carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1,
25 CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Los CDRs y FRs pueden proceder de diferente origen.

La cadena VH o VL de una molécula de anticuerpo puede incluir todo o parte de una región constante de la cadena ligera o pesada. En un ejemplo, la molécula de
30 anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas y dos ligeras de inmunoglobulinas, donde las cadenas pesadas y ligeras se interconectan por, por ejemplo, puentes disulfuro. La región constante de la cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. La región constante de la cadena ligera se compone de un dominio, CL. La región variable de las cadenas pesadas y ligeras contiene un
35 dominio de unión que interacciona con el antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos median típicamente la unión de la molécula de anticuerpo a tejidos del

huésped o factores, incluyendo varios tipos celulares del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) de la vía clásica del sistema de complemento. Las moléculas de anticuerpo pueden incluir IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como todos sus subtipos), donde las cadenas ligeras pueden ser del tipo kappa o lambda.

Como se discute arriba, los fragmentos de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo están dentro del término "molécula de anticuerpo". Un fragmento de unión al antígeno, como se usa aquí, puede referirse a una porción de un anticuerpo que se une específicamente a CD69 (por ejemplo, CD69 humano). Ejemplos de fragmentos de unión incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd, que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv, que consiste en los dominios VL y VH de un brazo sencillo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb, que consiste en un dominio VH; y (vi) una o más CDRs aisladas con suficiente estructura para unirse específicamente, por ejemplo, una porción de unión al antígeno de una región variable.

Los fragmentos de anticuerpo pueden también producirse por métodos químicos, por ejemplo, por rotura de un anticuerpo intacto con una proteasa, tal como la pepsina o la papaína, u, opcionalmente, tratando el producto digerido con un agente reductor. Alternativamente, se pueden producir fragmentos útiles usando células huésped transformadas con genes truncados de las cadenas pesadas y/o ligeras.

Una porción de unión al antígeno de una región variable de la cadena ligera y una porción de unión al antígeno de una región variable de la cadena pesada, por ejemplo, los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, pueden ser unidos, usando métodos recombinantes, por una unión sintética que les permita constituir una cadena sencilla de proteína en que el par de regiones VL y VH forme moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv)). Tales anticuerpos de cadena sencilla son también incluidos dentro del término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas, y los fragmentos son estudiados para su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

El término “anticuerpo o molécula de anticuerpo monoespecífico” se refiere a un anticuerpo o molécula de anticuerpo que muestra una sola especificidad de unión y afinidad por una diana particular, por ejemplo, un epítipo. Este término incluye un anticuerpo monoclonal o una composición de anticuerpos monoclonales. El anticuerpo anti-CD69 en la presente invención es monoclonal, más preferiblemente es un anticuerpo monoclonal humanizado.

Los “anticuerpos monoclonales” son poblaciones homogéneas de anticuerpos idénticos, producidos por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única célula madre y una célula plasmática tumoral, que están dirigidos contra un único sitio o determinante antigénico. El procedimiento de obtención del anticuerpo monoclonal de la invención puede realizarse según métodos convencionales, conocidos en el estado de la técnica. Básicamente, el método consiste en inmunizar un animal con un conjugado que comprende una macromolécula que confiere inmunogenicidad y posteriormente extraer células del bazo del animal inmunizado, que se fusionan con células de mieloma en presencia de un inductor de la fusión, tal como PEG-1500 por procedimientos estándar. Los hibridomas se seleccionan y se subclonan por dilución. Los clones aptos para su expansión se constituyen en una línea celular de hibridoma. A continuación, dicha línea celular de hibridoma se cultiva en un medio de cultivo adecuado para que las células de hibridoma produzcan anticuerpos y los secreten al medio, y se recoge posteriormente el sobrenadante del medio de cultivo que contiene los anticuerpos monoclonales producidos. Opcionalmente, dichos anticuerpos pueden purificarse por medios convencionales, tales como cromatografía de afinidad, proteína A-Sefarosa, cromatografía con hidroxapatito, electroforesis en gel o diálisis.

El anticuerpo en la presente invención también puede ser un anticuerpo recombinante. El término “anticuerpo o molécula de anticuerpo recombinante”, como se emplea aquí, se refiere a anticuerpos o moléculas de anticuerpo que se preparan, expresan, crean o aíslan usando métodos recombinantes, tales como moléculas de anticuerpo expresadas usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, moléculas de anticuerpo aisladas de un organismo recombinante, una librería de anticuerpos combinatoria, moléculas de anticuerpo aisladas de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana o moléculas de anticuerpo preparadas, expresadas, creadas o aisladas por cualquier otro medio que suponga la combinación de secuencias génicas de inmunoglobulinas

humanas con otras secuencias de DNA. Tales moléculas de anticuerpo recombinantes incluyen moléculas de anticuerpo humanizadas, con CDR injertado, quiméricas, deimmunizadas, generadas *in vitro* (por ejemplo, por selección de fagos), y pueden incluir opcionalmente regiones constantes derivadas de las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana.

Los anticuerpos monoclonales, quiméricos y humanizados, que han sido modificados por, por ejemplo, destrucción, adición, o sustitución de otras porciones del anticuerpo, por ejemplo, la región constante, pueden ser utilizados también en la presente invención. Por ejemplo, un anticuerpo puede ser modificado como sigue: (i) por destrucción de la región constante; (ii) por sustitución de la región constante con otra región constante, por ejemplo, una región constante que aumente la vida media, estabilidad o afinidad del anticuerpo, o una región constante de otra especie o clase de anticuerpo; o (iii) por la modificación de uno o más aminoácidos de la región constante para alterar, por ejemplo, el número de sitios de glicosilación, la función de la célula efectora, la unión a receptores Fc (FcR), la fijación de complemento, y/o el transporte a través de la placenta, entre otros.

En una realización particular, la región constante del anticuerpo puede ser reemplazada por otra región constante de, por ejemplo, una especie diferente. Este reemplazamiento puede ser realizado usando técnicas de Biología Molecular. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica la región VL o VH de un anticuerpo puede ser convertido a un gen de cadena pesada o ligera de longitud completa, respectivamente, por la unión operativa de los ácidos nucleicos que codifican para VH o VL a otros ácidos nucleicos que codifiquen las regiones constantes de las cadenas pesadas o ligeras. Las secuencias de los genes de las regiones constantes de las cadenas pesadas y ligeras humanas son conocidas por el experto en la materia. Preferiblemente, la región constante es humana, pero la región constante de otras especies, por ejemplo, roedores (por ejemplo, ratón o rata), primate, camello, conejo, pueden usarse también. Las regiones constantes de estas especies son conocidas.

Los métodos para la alteración de la región constante de un anticuerpo se conocen. Los anticuerpos con función alterada, por ejemplo, afinidad alterada por un ligando efector, tal como el FcR en una célula o el componente C1q del complemento, pueden ser producidos por reemplazamiento de al menos un residuo aminoácido en la porción constante del anticuerpo con un residuo distinto (ver, por ejemplo, EP 388,151 A1, US

5,624,821 y US 5,648,260) y pueden ser utilizados en la presente invención. Tipos similares de alteraciones se han descrito, de manera que si se aplican a inmunoglobulinas murinas o de otras especies, reducirían o eliminarían estas funciones.

5

En una realización preferida, el anticuerpo de la invención está unido a un agente de marcaje que permita su localización y/o identificación, mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos.

10 Conjugados de moléculas de anticuerpo:

Las moléculas de anticuerpo de la invención pueden conjugarse, de manera covalente o no covalente, con otras estructuras, p.e., agentes terapéuticos o señales, p.e., toxinas (p.e., proteínas, (p.e., difteria o ricina) o toxinas químicas), isótopos terapéuticos, u otras estructuras terapéuticas.

15

De acuerdo con esto, una molécula de anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana puede ser derivatizada o unida a otra molécula funcional (p.e., otro péptido o proteína). Los anticuerpos y las porciones de anticuerpo de la invención incluyen formas derivatizadas o modificadas de cualquier forma de los anticuerpos aquí descritos, incluyendo las moléculas de inmuno adhesión. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención pueden ser unidos funcionalmente (por unión química, fusión genética, asociación no covalente o de otra forma) a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo, (p.e., un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puedan mediar la asociación de un anticuerpo o una porción de anticuerpo con otra molécula (tal como la región principal de la estreptavidina o una cola de polihistidina).

20

25

30

Un tipo de anticuerpo derivatizado se produce por entrecruzamiento de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de diferentes tipos, p.e., para crear anticuerpos biespecíficos).

35

Agentes entrecruzantes adecuados son aquellos que son heterobifuncionales, teniendo dos grupos reactivos distintos separados por un espaciador apropiado (p.e.,

m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida ester) u homobifuncionales (p.e., disuccinimidil suberato).

Agentes detectables útiles con los que un anticuerpo de la invención o porción del mismo pueden ser derivatizados (o marcados) pueden incluir componentes fluorescentes, varias enzimas, grupos prostéticos, materiales luminiscentes o bioluminiscentes, átomos de metal con emisión de fluorescencia, p.e., europio (Eu), y otros lantánidos, y materiales radiactivos (descritos abajo). Ejemplos de agentes detectables por fluorescencia incluyen la fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenesulfonilo, ficoeritrina, y otros del mismo tipo. Un anticuerpo puede ser también derivatizado con enzimas detectables, tales como la fosfatasa alcalina, la peroxidasa de rábano, la [beta] -galactosidasa, la acetil-colin-esterasa, la glucosa oxidasa y otras del mismo tipo. Cuando un anticuerpo se derivatiza con una enzima detectable, se detecta por la adición de reactivos que la enzima usa como sustratos para generar un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando el agente detectable de la peroxidasa de rábano está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobenzidina lleva a un producto de reacción coloreado que es detectable. Un anticuerpo puede ser también derivatizado con un grupo prostético (p.e., estreptavidina/biotina y avidina/biotina). Por ejemplo, un anticuerpo puede ser derivatizado con biotina y detectado a través de la medida indirecta de la unión de la avidina o la estreptavidina. Ejemplos de materiales de adecuada fluorescencia incluyen la umbeliferona, la fluoresceína, el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, la diclorotriazinilamina fluoresceína, el cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente es el luminol; y ejemplos de materiales bioluminiscentes son la luciferasa, luciferina y aecuorina.

Un anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana o un fragmento de él que se una al antígeno puede ser conjugado a otra entidad molecular, típicamente una marca o un agente o estructura terapéutica (p.e., citotóxica o citostática).

30

Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es destructivo para las células con que interacciona. Ejemplos son el taxol, la citocalasina B, la gramicidina D, el bromuro de etidio, la emetina, la mitomicina, el etopóxido, el tenopóxido, la vincristina, la vinblastina, la colchicina, la doxorubicina, la daunorubicina, la dihidroxi-antracín-diona, la mitoxantrona, la mitramicina, la actinomicina D, la 1-dehidrotestosterona, los glucocorticoides, la procaína, la tetracaína, la lidocaína, el

35

propranolol, la puromicina, los maitansinoides, p.e., maitansinol (ver US 5,208,020), CC-1065 (ver US 5, 475, 092, 5, 585, 499, 5,846,545) y análogos u homólogos de estos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos, (p.e., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbacina),
5 agentes alquilantes (p.e., mecloretamina, tioepa clorambucilo, CC-1065, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino); antraciclina (p.e., daunorubicina (antes daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p.e., dactinomomicina (antes actinomomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (p.e., vincristina, vinblastina, taxol y maitansinoides).
10 Un anticuerpo anti-polipéptido de activación temprana o un fragmento de unión al antígeno de éste puede conjugarse a otra entidad molecular, p.e., una estructura que module la inmunogenicidad y/o la vida media. En un ejemplo, la entidad molecular es polietileno glicol (PEG) o derivados de éste. La PEGilación es un método de conjugación química que puede reducir la inmunogenicidad potencial y/o extender la vida media. Varios métodos de PEGilación de un anticuerpo se conocen. Ver, p.e.,
15 Bhandra et al. (2002) Pharmazie 57(1):5-29.

Otros reactivos de unión a un polipéptido de activación temprana (es decir, moduladores de CD69):
20

Se define un "reactivo de unión a un polipéptido de activación temprana" como un agente que interacciona (se une) con el polipéptido de activación temprana, preferiblemente de origen humano. La interacción ocurre preferentemente con alta afinidad (con una constante de unión de al menos 10^7 M^{-1} , preferiblemente entre 10^8 y 10^{10} M^{-1}) y especificidad. Los reactivos de unión a un polipéptido de activación temprana pueden ser antagonistas o eliminadores (deplecionantes) de CD69. Como ejemplos de reactivos de unión al polipéptido de activación temprana se pueden citar anticuerpos contra el polipéptido de activación temprana (como los reseñados anteriormente), así como moléculas de pequeño tamaño molecular o peptidomiméticos.
25
30

De utilidad en esta invención se incluyen agentes miméticos del polipéptido de activación temprana. Estos agentes, entre los que se incluyen péptidos, compuestos semipeptídicos o no peptídicos (como moléculas orgánicas de pequeño tamaño molecular), son inhibidores de la actividad del polipéptido de activación temprana.
35

En una encarnación óptima, el agente es parte de una librería combinatorial, por ejemplo una colección de péptidos o moléculas orgánicas, o parte de una librería de productos naturales. En estas circunstancias, un grupo de compuestos de test puede incluir 10 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 o 10^8 compuestos, que comparten características estructurales o funcionales.

En su forma actual, esta invención incluye librerías de agentes de unión al polipéptido de activación temprana. La génesis de librerías combinatoriales está bien caracterizada en la literatura y se ha revisado exhaustivamente. Las librerías de compuestos de esta invención pueden prepararse de acuerdo a diferentes métodos, algunos de los cuales han sido previamente caracterizados. Por ejemplo, una estrategia denominada de división puede implementarse de la siguiente manera: se colocan microsferas de sustrato polimérico funcionalizado en diferentes recipientes de reacción; existe una gran variedad de sustratos poliméricos adecuados para la síntesis peptídica en fase sólida, y algunos están disponibles comercialmente (como ejemplos, ver M. Bodansky *Principles of Peptide Synthesis*, 2 edición (1993), Springer-Verlag, Berlin). Se añade a cada alícuota de microsferas una solución conteniendo un aminoácido activado, y las reacciones se llevan a cabo, resultando en una serie de aminoácidos inmovilizados, cada uno en un recipiente de reacción. Las alícuotas de microsferas derivatizadas se lavan y se reúnen (recombinación), y este conjunto se divide nuevamente, colocando cada alícuota en un nuevo recipiente de reacción, añadiéndose un nuevo aminoácido activado a cada alícuota. Este ciclo se repite hasta que se consiguen péptidos de la longitud deseada. Los aminoácidos añadidos en cada ciclo se seleccionan aleatoriamente, o bien se pueden seleccionar para obtener una librería dirigida, es decir, en la que ciertas partes del inhibidor se seleccionan por un método no aleatorio, por ejemplo, para seleccionar inhibidores con identidad o similitud estructural con un péptido conocido capaz de interactuar con un anticuerpo, como por ejemplo el sitio de unión de antígeno de anticuerpos anti-idiotípicos. Así se puede obtener una amplia variedad de compuestos peptídicos, peptidomiméticos no peptídicos.

Esta estrategia de división produce una librería de péptidos, algunos de ellos inhibidores, que pueden utilizarse para preparar una librería de compuestos de ensayo de la invención. En otro ejemplo ilustrativo, se genera una librería de diversómeros de acuerdo con el método de Hobbs DeWitt et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:6909 (1993)). Otros métodos de síntesis, como el de la bolsita de té de Houghten (ver

Houghten *et al.*, Nature 354:84-86 (1991)) pueden emplearse para generar librerías de compuestos de la invención sujeto.

Posteriormente se pueden realizar *screenings* (barridos), para determinar qué
5 miembros de la librería poseen una actividad deseable, y si así es, identificar el principio activo. Se han descrito métodos de análisis combinatorial de *screening* de librerías (ver Gordon *et al.*, J. Med. Chem., supra). Las librerías de compuestos solubles se pueden identificar por cromatografía de afinidad con un receptor apropiado para aislar ligandos para el receptor, seguida por la identificación de los ligandos
10 aislados por técnicas convencionales, como espectrometría de masas, RMN y similares. Los compuestos inmovilizados pueden identificarse poniéndolos en contacto con un receptor soluble, preferiblemente acoplado a un marcador (fluoróforos, enzimas colorimétricas, radioisótopos, compuestos luminiscentes y similares) que pueden ser detectados indicando unión al ligando. Alternativamente, los compuestos
15 inmovilizados pueden ser liberados selectivamente, permitiéndose su difusión a través de una membrana para interactuar con un receptor.

Así, se puede probar la interacción de los compuestos identificados mediante *screening* con el polipéptido de activación temprana ensayando la capacidad de cada
20 compuesto para interactuar con el mismo, por ejemplo, incubando el compuesto investigado con el polipéptido de activación temprana y un lisado en un recipiente de reacción adecuado, como una placa estándar de 96 pocillos. En esta situación, la actividad de cada compuesto individual puede ser determinada, empleándose como control un pocillo o pocillos sin el compuesto ensayado. Tras la incubación, la
25 actividad de cada compuesto puede determinarse en cada pocillo. Por tanto, pueden determinarse las actividades de una pluralidad de compuestos en paralelo.

Así se puede determinar simultáneamente la unión de grandes cantidades de compuestos diferentes. Por ejemplo, los compuestos se pueden sintetizar en
30 microsferas de resina sólida siguiendo un patrón una microesfera-un compuesto; los compuestos se pueden inmovilizar en la resina a través de un puente fotolábil. Posteriormente, las esferas (100,000 o más) pueden combinarse en células de levadura y pulverizarse en forma de nano-gotas, de tal manera que cada gota incluya una única esfera (y por lo tanto un compuesto). La exposición de las nano-gotas a la
35 luz UV resulta en la liberación de los compuestos de las gotas, lo que resulta en un método que permite el *screening* rápido de librerías de gran tamaño.

Las librerías combinatoriales de compuestos pueden sintetizarse con etiquetas que codifican la identidad de cada miembro de la librería. En general, este método incluye el uso de marcadores inertes, pero fácilmente detectables, que se unen al soporte sólido o a los compuestos. Cuando se encuentra un compuesto activo (por una de las técnicas descritas anteriormente), la identidad de dicho compuesto se determina por la identificación de la etiqueta que le acompaña. Este método de marcaje permite la síntesis de grandes librerías de compuestos que pueden identificarse incluso a niveles muy bajos. Tal esquema de marcaje puede ser útil (por ejemplo, en el sistema de *screening* de nano-gota), para identificar compuestos liberados de las microsferas.

10

Por otro lado, se entiende que los anticuerpos anti-CD69 de esta invención pueden tener sustituciones adicionales conservativas o no esenciales, que no tienen un efecto sustancial en la funcionalidad de los mismos. Se puede determinar si una sustitución en concreto será tolerable (no afectará adversamente a las propiedades biológicas deseadas, como la actividad de unión) de acuerdo con lo descrito por Bowie *et al.* (1990) *Science* 247:1306-1310. Una sustitución de aminoácido conservada se define como aquella en la que un residuo es reemplazado por otro que posee una cadena lateral similar, lo que está bien establecido en la literatura. Las familias de aminoácidos con cadenas laterales semejantes son: cadenas laterales básicas (lisina, arginina, histidina), ácidas (ácidos aspártico y glutámico), cadenas laterales no cargadas pero polares (glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales [beta] -ramificadas (treonina, valina, isoleucina) y aromáticas (tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

25

Un residuo no esencial se define como aquel que puede ser alterado con respecto a la forma salvaje (*wild type*) del reactivo de unión (anticuerpo u otros), sin inhibir, o mejor aún, sin alterar sustancialmente la actividad biológica, mientras que un residuo de aminoácido esencial es aquel que resulta en dichos cambios.

30

En la presente invención también se puede utilizar un antisuero que comprende el anticuerpo que reconoce la CD69, preferiblemente humana, de la presente invención para los usos aquí descritos.

35

El término "antisuero" se refiere a un suero obtenido tras la inmunización de un animal con un inmunógeno. El antisuero comprende anticuerpos específicos de dicho

inmunógeno generados tras la respuesta inmune producida en el animal. En el contexto de la presente invención, el inmunógeno es CD69 o un fragmento de CD69 y el antisuero comprende anticuerpos específicos generados frente a CD69.

5 En la presente invención también se puede utilizar una composición farmacéutica que comprende el modulador (preferiblemente el anticuerpo) de CD69, preferiblemente humana, de la presente invención para los usos aquí descritos.

10 En la presente invención, los términos "composición", "composición farmacéutica", "fármaco" y "medicamento" se utilizan indistintamente.

15 El término "composición farmacéutica" aquí se refiere a cualquier sustancia que se usa para la prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o cura de enfermedades en seres humanos o animales. La composición farmacéutica de la invención puede ser utilizada sola o en combinación con otras composiciones farmacéuticas. En el contexto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o medicamento caracterizado por que comprende el modulador de la invención o el polinucleótido que lo codifica, lo que permite su expresión en el organismo a ser tratado, en una cantidad terapéuticamente efectiva, tal que el modulador de la invención realiza su función en el tejido o célula diana.

20 En una forma de realización preferida la composición también comprende un excipiente y / o un vehículo farmacéutico aceptable.

25 El término "excipiente" se refiere a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición de la invención y activamente estabiliza o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de dar consistencia o sabor. Por lo tanto, los portadores pueden tener la función de mantener los ingredientes juntos, como en el caso de almidones, azúcares o celulosas, función de edulcorantes, función como un colorante, función protectora de la composición, tales como para aislar el aire y/o humedad, llenando el papel de un comprimido, cápsula u otra forma de presentación, como es el caso del fosfato de calcio di-básico, función de desintegración para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otros excipientes que no se mencionan en este párrafo.

35

El término "portador o vehículo farmacéutico", se refiere a una sustancia utilizada en la composición farmacéutica o medicamento para diluir cualquier componente de la presente invención incluido en el mismo a un volumen o peso dado. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos, lo que permitirá una mejor dosificación y administración o dar cuerpo y forma a la composición. Cuando la presentación es líquida, el portador farmacológicamente aceptable es el diluyente.

En otra forma de realización preferida la composición farmacéutica comprende también un adyuvante.

Aquí, el término "adyuvante" se refiere a un agente que aumenta el efecto del modulador de la invención cuando se administra conjuntamente o formando parte del mismo protocolo de tratamiento. Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse en la composición farmacéutica de la presente invención son los conocidos por los expertos en la técnica.

En una realización preferida el inhibidor es un RNA de interferencia, un microRNA o una cadena de ácido nucleico antisentido.

En la presente invención, en una realización preferida, el sujeto ha sido o va a ser tratado con quimioterapia y/o radioterapia y/o con cualquier otro tratamiento que induzca una producción deficiente de células sanguíneas, preferiblemente que induzca leucopenia, trombopenia y/o pancitopenia, en un sujeto.

En otra realización más preferida el modulador de CD69 o medicamento que lo comprende además se utiliza en combinación con al menos un modulador adicional que se selecciona de la lista que consiste en: factor estimulante de colonias, factor estimulante de granulocitos y macrófagos, un inhibidor de CXCR4, un modulador de c-kit, un modulador de CXCL12/CXCR4 (preferiblemente es un inhibidor de CXCL12/CXCR4), un agonista de SIP, un inhibidor de VCAM/VLA-4, hormona paratiroidea, un inhibidor del proteasoma, Groß y/o un estabilizador de HIF. Este uso combinado puede ser simultáneo o secuencial.

En una realización aún más preferida el inhibidor de CXCL12/CXCR4 es TG-0054, 1,1'-[1,4-Fenilenbis(metileno)]bis [1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano] (AMD3100, plerixaflor o Mozobil), NOX-A12, C28H54N8, pol6326, BKT-140 o T6-0054.

En otra realización aún más preferida el agonista de SIP es SEQ2871.

En otra realización aún más preferida el inhibidor del proteasoma es Bortezomib.

5 En otra realización aún más preferida Groß es SB-251353.

En otra realización aún más preferida el estabilizador de HIF es FG-4497.

10 En la presente invención el modulador de CD69 o medicamento que lo comprende se administra, preferiblemente, de forma oral, parenteral, intra-muscular, intra-peritoneal, intra-arterial, intra-venosa, intra-traqueal, intra-nasal, transdérmica, intra-dérmica, intra-vaginal, intravesicular, epidural, subcutánea, cutánea, tópica, ótica, oftálmica, inhalatoria, sublingual, vaginal, rectal, gastroentérica o mucosa.

15 En otra realización preferida del primer aspecto de la invención el modulador de CD69 o medicamento que lo comprende se administra preferiblemente desde 4 a 24 horas (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 horas) antes de la proliferación y movilización de células de médula ósea. En una realización más preferida el modulador de CD69 o medicamento que lo comprende se administra
20 preferiblemente durante 5, 6 o 7 días al sujeto. Preferiblemente el modulador de CD69 o medicamento que lo comprende se administra repetidamente en dosis sucesivas cada 5 o 7 días (5, 6 o 7), o hasta que la mejora en la condición del sujeto se vea o se espere.

25 La dosis del modulador administrada es una cantidad terapéuticamente efectiva.

En la presente invención el término "cantidad terapéuticamente eficaz o efectiva" (o dosis terapéuticamente eficaz") se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de producir un efecto deseado (en la presente invención la modulación de CD69) y
30 generalmente se determina por características de los compuestos, la vía y frecuencia de administración de la misma forma y de otros factores, incluyendo la edad, estado del paciente y de la gravedad de la alteración o trastorno.

En otra realización aún más preferida el sujeto es un ser humano (hombre o mujer de
35 cualquier edad).

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método, preferiblemente *in vitro*, de obtención de precursores hematopoyéticos útiles para un trasplante que comprende:

- 5 a. administrar a un sujeto un modulador de CD69, preferiblemente un anticuerpo anti-CD69, o el medicamento definido en la presente invención;
- b. recolectar desde sangre, linfa u órganos linfáticos las células madre hematopoyéticas del sujeto del paso (a), es decir, de un sujeto que recibió previamente un modulador de CD69, preferiblemente un anticuerpo anti-CD-69, o el medicamento definido en la presente invención,
10 preferiblemente se realiza la recolección por aféresis; y
- c. almacenar las células obtenidas en el paso (b) hasta su utilización.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso *in vitro* de un modulador de CD69, preferiblemente de un anticuerpo anti-CD69, o del medicamento definido en
15 la presente invención, para la obtención de precursores hematopoyéticos. Este aspecto de la invención se refiere a la administración *in vitro* (*ex vivo*) del modulador de CD69 o del medicamento que lo comprende a médula ósea aislada para provocar la proliferación, y así permitir la obtención, de precursores hematopoyéticos.

20 La presente invención también se refiere a un método de obtención de células progenitoras hematopoyéticas que incluyen células SCA+ CD34+ y alta expresión del marcador c-Kit (c-Kit^{hi}) y que no expresen marcadores de linajes hematopoyéticos maduros (lin-), útiles para un trasplante que comprende:

- 25 a. administrar a un sujeto un modulador de CD69, preferiblemente un anticuerpo anti-CD69, o el medicamento definido en la presente invención;
- b. Recolectar la fracción de leucocitos que comprende células SCA+, CD34+, alta expresión del marcador c-Kit (c-Kit^{hi}) y que no expresen marcadores de linajes hematopoyéticos maduros (lin-), y
- 30 c. Opcionalmente almacenar las células obtenidas en el paso (b) hasta su utilización.

En la presente memoria los términos "aminoácidos", "secuencia de aminoácidos", "polipéptido", "péptido" y "oligopéptido" se utilizan indistintamente.

En la presente memoria los términos "nucleótidos", "secuencia de nucleótidos", "polinucleótido", "secuencia de nucleótidos", "ácido nucleico" y "oligonucleótido" se utilizan indistintamente.

- 5 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y
10 no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Los experimentos se realizaron en ratones HU:CD69 +/- humanizados, que son
15 ratones transgénicos portadores de la molécula CD69 humana pero deficientes para la molécula CD69 de ratón (MU:CD69/-). En todos los experimentos, los ratones HU:CD69+/- se trataron con 500 µg de Ac anti-hCD69 2.8 24 h antes del análisis, excepto cuando se indican los tiempos.

- 20 **FIG. 1.** El tratamiento con anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD69 humano 2.8 induce movilización y salida de precursores hematopoyéticos desde la médula ósea hacia órganos periféricos. Los ratones HU:CD69+/- fueron tratados con una dosis de 500 µg de Ac anti-hCD69 2.8 a día 0. A, muestra la evolución temporal (4 horas, 1 día, 3 días, 6 días o 9 días) del número total de células en la médula ósea y en bazo y B, muestra
25 la expresión de CD69 en timocitos de ratones no tratados (blanco) y de ratones tratados (gris).

- FIG. 2.** El tratamiento con anti CD69 humano promueve la salida de células linfoides y mieloides de médula ósea hacia la periferia. Los ratones HU:CD69+/- se trataron con
30 500 µg de Ac anti-hCD69 2.8 24 h antes del análisis. A, Porcentajes en médula ósea y en bazo y B, Números en médula ósea y en bazo de las principales subpoblaciones linfoides y mieloides que fueron analizadas mediante citometría de flujo. Conjunto de datos de dos experimentos.

- 35 **FIG. 3.** Comparación del efecto de anti-CD69 humano 2.8 con el del inhibidor de CXCR4, AMD3100. Los ratones HU:CD69+/- se trataron con 500 µg de Ac anti-hCD69

2.8 24 h antes del análisis, o con AMD3100 (150 µg/ratón) o PBS i.p. (control) 1h antes del análisis. Se muestra el efecto de ambos tratamientos en el número total de células en los órganos indicados (A) y en el número de células de subpoblaciones leucocitarias en médula ósea (B) y bazo (C). Conjunto de datos de dos experimentos.

5

FIG. 4. El tratamiento con anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD69 humano 2.8 induce la salida de precursores hematopoyéticos tempranos y un gran aumento de precursores multipotentes en médula ósea. Los ratones HU:CD69+/- se trataron con 500 µg de Ac anti-hCD69 2.8 24 h antes del análisis por citometría de flujo de células de Médula Ósea y Bazo. A-B. Se muestra el porcentaje y el número de los precursores hematopoyéticos tempranos dentro de los precursores que son negativos para marcadores de linajes (lin-). La subpoblación lin-Sca+cKit^{int}, representa los precursores comunes a la línea linfoide (CLP) y la lin-, Sca+, cKit^{hi} (KSL) los precursores primitivos que contienen las células madre en médula ósea A y en bazo B. C. Las subpoblaciones LT-HSC, ST-HSC y MPP se clasificaron de acuerdo a su expresión de CD34 y FLT3, seleccionadas por su expresión Sca+, C-kit^{hi}. Porcentajes y números de células de las subpoblaciones indicadas en médula ósea. Conjunto de datos de tres experimentos.

10

15

20

FIG. 5. Un aumento de la tasa de proliferación se observa en ratones HuCD69 +/- tratados con anti-humana-CD69 *in vivo*. Los ratones se trataron con 500 µg de anti-hCD69 2,9 i.v, PBS i.v (control) o AMD3100 i.p. según corresponda y se sacrificaron un día después. Los ratones recibieron 1 mg de BrdU intraperitonealmente y tres horas más tarde los ratones fueron sacrificados. Se recogieron células de médula ósea y bazo. Las células totales se clasificaron en células Lin + y Lin- y se analizó el porcentaje de BrdU en ambas subpoblaciones. A, Dentro de Lin+, la incorporación de Brdu fue medido en las poblaciones linfoides y mieloides presentes en médula ósea y bazo. B, Por otro lado, las células Lin- también se tiñeron con Sca y c-Kit para diferenciar dos subpoblaciones de células madre hematopoyéticas: KSL (Lin-Sca1 + c-kit^{hi}) y células CLP (progenitores linfoides comunes: Lin-Sca1 + c-kit^{int}). Las células KSL se analizaron según expresión de CD34 y FLT3: LT-HSC o HSC a largo plazo (KSL CD34^{neg} FLT3^{neg}), ST-HSC o corto plazo HSC (KSL CD34 + FLT3^{neg}) y MPP o progenitores multipotentes (KSL CD34 + FLT3 +). La tasa de proliferación celular se evaluó en todas las subpoblaciones en la médula ósea y en el bazo mediante citometría de flujo. C, Número de Unidades Formadoras de Colonias obtenidas mediante plaqueo de 10⁵ células de Médula ósea en Medio Completo de

25

30

35

Metilcelulosa, contadas después de 10 días de cultivo. Se ha llevado a cabo una vez comparándolo con AMD3100, pero es un experimento representativo de tres comparando el tratamiento con anti- CD69 humano con los ratones no tratados.

5 **FIG 6.** Expresión de CXCR4 en ratones tratados con anti-CD69 humano 2.8. Se muestra la detección en superficie de CXCR4 en células de bazo y de la médula ósea mediante citometría de flujo. Los ratones HU:CD69+/- se trataron con 500 µg de Ac anti-hCD69 2.8 24 h antes del análisis por citometria de flujo. A, expresión medida en porcentaje (%) y en Geometric Mean (GM) en Médula Ósea y en Bazo como es
10 indicado. B, Muestra el número de células que expresan CXCR4.

FIG. 7. La repetición del tratamiento con anti-CD69 humano 2.8 mantiene el efecto de movilización de leucocitos desde la médula ósea. Los ratones HU:CD69 +/- fueron tratados 12 y 5 días antes del análisis. Se muestra el número total de células en los
15 órganos indicados (A), peso de los órganos (B), porcentajes de subpoblaciones de leucocitos en médula ósea (C) y número de células de subpoblaciones de leucocitos en médula ósea (D), en bazo (E) y timo (F). Un experimento independiente de dos experimentos.

20 **FIG. 8.** El tratamiento con anti- CD69 humano 2.8 en individuos HU:CD69 +/- induce un aumento en el número de células T reguladoras CD25+Foxp3+CD4+ y no reguladoras. Se muestra la expresión en superficie de CD25 y del factor FoxP3 intranuclear en células de bazo, ganglios y timo medida mediante citometría de flujo de bazo (A), ganglios (B) y timo (C). Los ratones HU:CD69+/- fueron tratados 12 y 5
25 días antes del análisis. Conjunto de datos de dos experimentos.

FIG. 9. El tratamiento con anti-CD69 murino 2.2 igualmente tiene efecto de movilización de leucocitos desde la médula ósea en el ratón WT. Los ratones WT CD69+/+ se trataron con 500 µg de Ac anti-CD69 murino 2.2 24 h antes del análisis.
30 Se muestra el número total de células en los órganos indicados (A), peso del bazo (B), número de células de subpoblaciones de leucocitos en médula ósea (C) y número de células de subpoblaciones de leucocitos en bazo (D).

EJEMPLOS

35

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1: El tratamiento con anticuerpo monoclonal (Acm) anti-CD69 humano 2.8 contribuye a la salida desde médula ósea de células hematopoyéticas a la circulación del sistema sanguíneo y linfático.

Los anticuerpos monoclonales anti-CD69 descritos que reconocen la molécula CD69 humana no reconocen la molécula de ratón y viceversa, es decir son específicos de especie. Para conocer el efecto que el tratamiento con Acm anti-CD69 humano tiene *in vivo*, se ha utilizado el modelo de ratón HU:CD69 +/- humanizado, transgénico portador de la molécula CD69 humana pero deficiente para la molécula CD69 de ratón (MU:CD69/-). Así, los efectos vistos por los tratamientos sobre CD69 humano no se verán influidos por la presencia de la molécula CD69 de ratón. En este modelo se realizaron distintas pautas de inyección del Acm anti-CD69 humano 2.8 de isotipo IgG1 cuyo Fc no reacciona ni con el sistema de complemento ni con los receptores Fc de células leucocitarias.

La movilización de células desde la médula a la sangre y órganos periféricos se provoca por distintos tratamientos demandados en la práctica clínica. En la figura 1 se demuestra la capacidad del Acm anti-CD69 para movilizar células desde la médula ósea. Se presentan los resultados del análisis de células hematopoyéticas de ratones HU:CD69 +/-, no tratados (control) y tratados con Acm anti-CD69 humano 2.8 con una sola dosis (500µg) y se examinó la cinética de salida de precursores de médula ósea. Se observó un descenso del número de células de la médula ósea que alcanza su máximo entre las 4 y las 24 horas (4hrs fue el primer tiempo examinado), aumentando el número de células paulatinamente desde las 48 hrs hasta los 9 días. El descenso del número de células en la médula ósea a las 24 horas es superior al 25% del inicial. Correspondientemente, pero en una cinética más lenta, el bazo experimentó un incremento del número de células cuyo máximo se alcanza a los 3 días del tratamiento, (Fig. 1A), disminuyendo posteriormente con una dinámica lenta. Consideramos el examen del bazo como una lectura indirecta del número de células de la sangre. Además, observamos que la acción del Acm afecta la expresión de CD69, no detectándose en timocitos de ratones HU:CD69 +/- tratados con Acm anti-CD69 humano 2.8, mientras que es alta en los no tratados (Fig. 1B). Las principales poblaciones linfoides y mieloides de la médula ósea y del bazo fueron analizadas a las

24 horas del tratamiento con el anticuerpo anti CD69 humano. De acuerdo con el importante descenso de células totales en la médula ósea, se observó una gran reducción en el número de células de las poblaciones más abundantes, linfocitos B, macrófagos y neutrófilos, mientras el resto de las poblaciones permanecen iguales y los eosinófilos aumentan (Fig. 2B). Debido a que el tratamiento induce una salida de neutrófilos muy importante esta disminución se detecta en el análisis del % (Fig. 2A). En bazo, encontramos aumentados los números de la mayoría de las poblaciones analizadas (Fig. 2B).

La producción de células de la sangre se mantiene por las células madre/progenitoras hematopoyéticas (HSPC) que residen en nichos especializados dentro de la médula ósea. Existen tratamientos con distintos factores que afectan a la interacción de las HSPCs con su nicho. En la práctica clínica uno de los factores utilizados es AMD3100 que interfiere con la interacción de CXCR4 con CXCL12/SDF-1. En este ejemplo se comparará el efecto del anti-CD69 humano 2.8 y AMD3100. Caracterizamos el efecto en la movilización de precursores hematopoyéticos del tratamiento con Acm anti-CD69 humano 2.8 y lo comparamos con el del inhibidor de CXCR4 AMD3100 (Fig. 3). Aunque no conocemos la cinética exacta de movilización por el tratamiento con Acm anti-CD69 humano 2.8 (una sola dosis de 500 µg), elegimos analizar el efecto a las 24hrs del tratamiento y lo comparamos con el del inhibidor de CXCR4 a 1 hr, cuando es conocido que alcanza el máximo de células movilizadas en sangre. El descenso del número total de células de médula ósea es similar en ambos tratamientos y el incremento de células en bazo, también es similar (Fig. 3A). En el análisis de las subpoblaciones de la médula ósea de ratones tratados con anti-CD69 humano 2.8 (Fig. 3B) se observa que se movilizan todos los tipos celulares de forma similar a la inducida por AMD3100 aunque hay características diferentes. En el bazo, se observan diferencias siendo las más acusadas en linfocitos B, neutrófilos y macrófagos (Fig. 3C).

Igualmente en los tratamientos a 24hrs con anti-CD69 humano 2.8 analizamos la movilización estudiando los precursores hematopoyéticos pluripotentes, caracterizados por la ausencia de marcadores de alguno de sus linajes (linfocitos T, B, NK, células mieloides, neutrófilos, monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas), lo que se denomina lin⁻, y clasificados según la expresión de Sca y c-Kit (fig. 4). Observamos que existía un incremento significativo de células de la subpoblación lin⁻, Sca⁺, cKit^{hi}, que contienen precursores primitivos y un aumento de

la población lin-Sca+cKit^{int} que está compuesta de los precursores comunes a la línea linfoide (CLP), tanto en la médula ósea de los individuos tratados como en el bazo. Así, el tratamiento moviliza estas células precursoras primitivas, ya que se encuentran en bazo, pero también sorprendentemente aumentó el número de estas células en la médula ósea. Este dato fue corroborado por el análisis de células progenitoras primitivas con marcadores que definen poblaciones dentro de las Lin- que se consideran células madre hematopoyéticas de largo término (lin- LT-HSC), es decir que son células madre que permanecen durante mucho tiempo dando lugar a la siguiente población, denominada células madre hematopoyéticas de corto término, que es de menor duración y que da lugar a los progenitores multipotentes (MPP) (Fig. 4C). Se observa un incremento muy significativo en las subpoblaciones más primitivas inducido por el tratamiento.

Cuando valoramos la capacidad proliferativa en las células de la médula ósea y bazo en individuos tratados con anti-CD69 humano observamos que el tratamiento incrementa la capacidad de proliferar de la mayoría de las células tanto linfoides como mieloides, y ocurre tanto en médula ósea como en bazo (Fig. 5A). También evaluamos la capacidad de proliferación inducida por el tratamiento con 2.8 en poblaciones de células precursoras lin- y lo comparamos con individuos no tratados y tratados con una dosis de AMD3100 (Fig. 5B). Los resultados indican que la acción del Acm anti-CD69 2.8 en médula ósea induce una proliferación celular en las poblaciones HSCs y MPP que supera en más del doble la producida por AMD3100 y la observada en ausencia de tratamiento. Así, la proliferación inducida por anti-CD69 en gran parte es debida a un efecto intrínseco del anticuerpo en las HSCs y no al proceso homeostático derivado de la salida de células de la médula ósea, ya que también AMD3100 induce salida de precursores similar a anti-CD69 pero la proliferación inducida por AMD3100 es mucho menor.

El gran aumento en la proliferación de HSPCs inducido por anti-CD69 es compatible con el aumento de estos precursores que encontramos en la médula ósea a pesar de observar que el tratamiento también moviliza estas células, ya que las observamos en el bazo. Pero la inducción de proliferación de HSPCs, especialmente en las más primitivas LT-HSCs y ST-HSCs, tiene el riesgo de inducir la pérdida de capacidad de célula madre. Así, medimos esta capacidad por medio del ensayo de producción de unidades formadoras de colonias (Fig. 5C) encontrando que se correlacionaba el número de células HSCs con la capacidad de producir colonias, lo que demuestra que

la proliferación inducida por anti-CD69 no hace perder la capacidad formadora de colonias.

5 Igualmente, el tratamiento con anti-CD69 induce una gran proliferación en las subpoblaciones hematopoyéticas de precursores encontradas en el bazo, que es muy superior a la inducida por el tratamiento con AMD3100 (Fig. 5B).

10 Como anteriormente ha sido descrito, CXCR4 es la quimoquina más relevante en la movilización de células hematopoyéticas por su interacción con su ligando CXCL12, interacción que equilibra el balance entre la salida y la retención celular desde la médula ósea hacia la periferia. La expresión de CXCR4 fue medida tanto en médula ósea como en bazo (Fig. 6). Las gráficas muestran tanto el porcentaje como la Geometric Mean (media geométrica), observándose un incremento de la expresión de CXCR4 tanto en la médula ósea como en el bazo de los ratones tratados con anti-
15 CD69 humano 2.8, así como en el número de células que expresan CXCR4 en el bazo con el tratamiento, no encontrándose cambios en médula ósea. Esta observación apunta a la regulación de CXCR4 por la vía de CD69 afectando a la movilización de precursores.

20 En conjunto, por tanto, la molécula CD69 es diana de fármacos para la movilización y proliferación de precursores hematopoyéticos.

Ejemplo 2: Estudio de la movilización de precursores hematopoyéticos por dos sucesivos tratamientos con el Acm anti-CD69 humano 2.8.

25 Posteriormente, dada la cinética de salida de células de médula ósea observada en la figura 1, nos planteamos si era posible inducir la movilización con dos sucesivos tratamientos con una menor cantidad de anti-CD69 humano 2.8. Este tipo de tratamiento podía ser útil en procesos que requieran tratamientos a largo plazo. Cuando los ratones fueron tratados con dos dosis de anticuerpo (200 µg/dosis) a los
30 12 días y 5 días antes del análisis, se observó que en los ratones tratados comparado con los no tratados el número absoluto de células de médula ósea descendió de forma importante y aumentó en bazo y ganglios linfáticos y no se observaron cambios significativos en timo entre ratones tratados y no tratados (Fig. 7A). El peso del bazo estaba aumentado correspondiendo con el cambio celular observado en este órgano,
35 mientras que no cambió el del timo (Fig. 7B). En conjunto, la movilización inducida por

los 2 tratamientos es similar a lo observado con un único tratamiento con 500µg del anticuerpo. Así mismo, el análisis de los subtipos leucocitarios movilizados con el Acm anti-CD69 2.8 muestra que decrecen tanto las células linfoides como las mieloides en la médula ósea e incrementan en localizaciones periféricas pero no varían en timo (Fig.7C-F). Además, el análisis de las poblaciones linfoides y mieloides en bazo reveló que la mayoría de subpoblaciones linfoides se encontraban aumentadas cuando los ratones habían sido tratados con el anti-CD69 2.8, mientras que dentro de las células mieloides solo los eosinófilos estaban aumentados (Fig. 7E). Por último, analizamos las células del timo y no observamos cambios en las poblaciones observadas (Fig. 7F).

Es importante destacar que el tratamiento con el Acm anti-CD69 2.8 indujo en las poblaciones T reguladoras CD25+CD4+ un aumento proporcional a los incrementos en células totales en localizaciones periféricas, no variando en timo (Fig. 8). Así, la presencia de células reguladoras que aumentan de forma proporcional en bazo (Fig. 8A) y ganglios (Fig. 8B) al aumento de células no reguladoras FoxP3-CD25- dará mayor seguridad de una buena regulación del proceso de implante, ya que en la recuperación después de un trasplante hematopoyético tan crucial es la reconstitución hematopoyética como la inmune.

20

Ejemplo 3: Estudio de la movilización de precursoras hematopoyéticas por tratamiento con el Acm anti-CD69 murino 2.2.

Para estudiar si la molécula CD69 de ratón actúa como la molécula CD69 humana en la movilización de precursores hematopoyéticos, utilizamos el anticuerpo anti CD69 de ratón 2.2, el cual reconoce específicamente CD69 de ratón para tratar ratones WT y por tanto que expresan CD69. Los ratones WT CD69+/+ se trataron con 500 µg de Ac anti-CD69 murino 2.2 24 h antes del análisis y el resultado se analizó en médula ósea, bazo y ganglios (Fig. 9). El tratamiento con anti-CD69 murino 2.2 tiene efecto de movilización de leucocitos desde la médula ósea a periferia medido en bazo y nódulos (Fig. 9 A). El tamaño del bazo aumenta proporcionalmente (Fig. 9B). El número de células de distintas subpoblaciones de leucocitos en médula ósea disminuyó en múltiples subpoblaciones (Fig. 9 C), y aumentó en distintas subpoblaciones de bazo (Fig. 9 D). Así, en este ejemplo se demuestra que un anticuerpo específico anti-CD69 de ratón actuando *in vivo* sobre la molécula CD69 de ratón induce una movilización de progenitores hematopoyéticos similar a la observada con el anticuerpo específico anti-

35

CD69 humano actuando *in vivo* sobre la molécula CD69 humana. Esto apunta a que la función de la molécula CD69 es similar en las 2 especies, ratón y humano.

5 Teniendo en cuenta los 3 ejemplos, los resultados indican que la acción sobre la molécula CD69 con anticuerpos específicos induce una salida de precursores hematopoyéticos y un aumento de éstos que incluyen HSCs a la circulación periférica. Anti-CD69 induce una proliferación de HSCs que aumenta esta población celular rápidamente sin perder su capacidad formadora de colonias. Durante esta
10 movilización se induce un cambio en la expresión de CXCR4, potencialmente la vía de actuación para inducir la salida de precursores. En conjunto se demuestra que la molécula CD69 actúa de diana para la movilización de precursores hematopoyéticos.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un inhibidor de CD69 para la elaboración de un medicamento para provocar la proliferación de precursores hematopoyéticos y su salida desde médula ósea en un sujeto, donde el inhibidor es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a CD69, un RNA de interferencia, un microRNA o una cadena de ácido nucleico antisentido.
5
2. Uso de un inhibidor de CD69 según la reivindicación 1 donde el medicamento es para la prevención o el tratamiento de leucopenia, trombopenia y/o pancitopenia en un sujeto.
10
3. Uso según la reivindicación 2 donde la leucopenia es neutropenia, linfopenia, eosinopenia y/o monocitopenia.
15
4. Uso según la reivindicación 1 donde el medicamento es para la obtención de dichos precursores para un trasplante.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde el anticuerpo monoclonal se selecciona de la lista que consiste en: anticuerpo humanizado, anticuerpo humano, anticuerpo quimérico, anticuerpo deinmunizado, fragmentos de anticuerpos y nanocuerpo.
20
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde el inhibidor de CD69 es el anticuerpo monoclonal 2.8 que se une específicamente a CD69 humano, donde dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 10.
25
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde el sujeto ha sido o va a ser tratado con quimioterapia y/o radioterapia.
30
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde el medicamento se administra de forma oral, parenteral, intra-muscular, intra-peritoneal, intra-arterial, intra-venosa, intra-traqueal, intra-nasal, transdérmica, intra-dérmica, intra-vaginal, intravesicular, epidural, subcutánea, cutánea, tópica, ótica, oftálmica, inhalatoria, sublingual, vaginal, rectal, gastroentérica o mucosa.
35

9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde el medicamento se administra durante 5, 6 o 7 días.
- 5 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde el sujeto es un ser humano.
- 10 11. Uso *in vitro* de un inhibidor de CD69 para la obtención de precursores hematopoyéticos, donde el inhibidor de CD69 es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a CD69, un RNA de interferencia, un microRNA o una cadena de ácido nucleico antisentido.
12. Método *in vitro* de obtención de precursores hematopoyéticos útiles para un trasplante que comprende:
- 15 a. Recolectar desde una muestra aislada de sangre, linfa u órganos linfáticos las células madre hematopoyéticas de un sujeto que recibió previamente un inhibidor de CD69; y
- b. almacenar las células obtenidas en el paso (a) hasta su utilización,
- 20 donde el inhibidor de CD69 es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a CD69, un RNA de interferencia, un microRNA o una cadena de ácido nucleico antisentido.

FIG. 1A

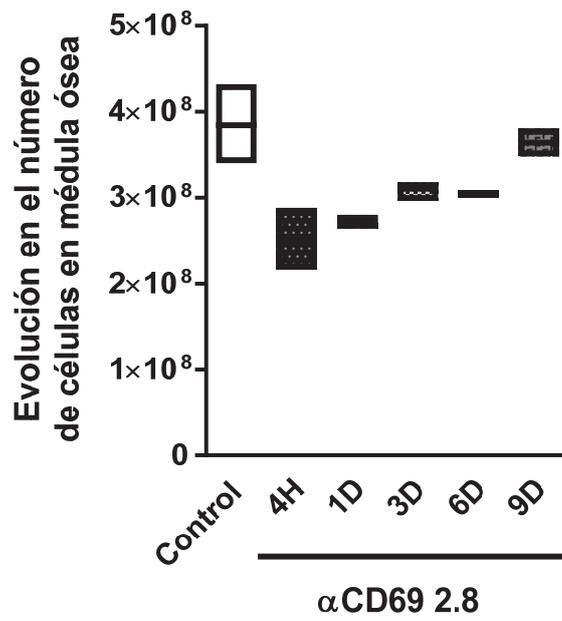
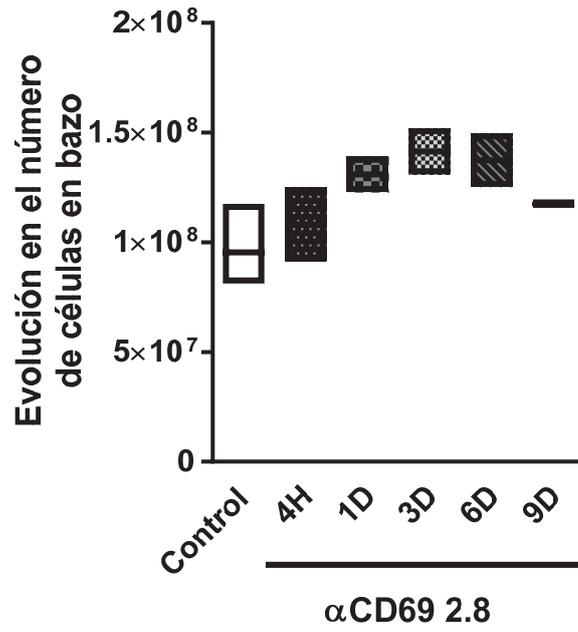


FIG. 1B

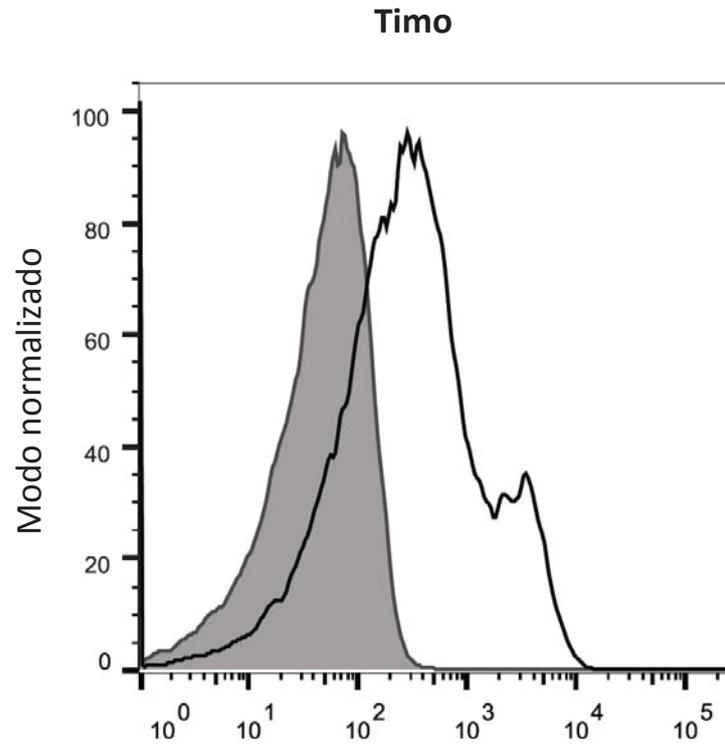
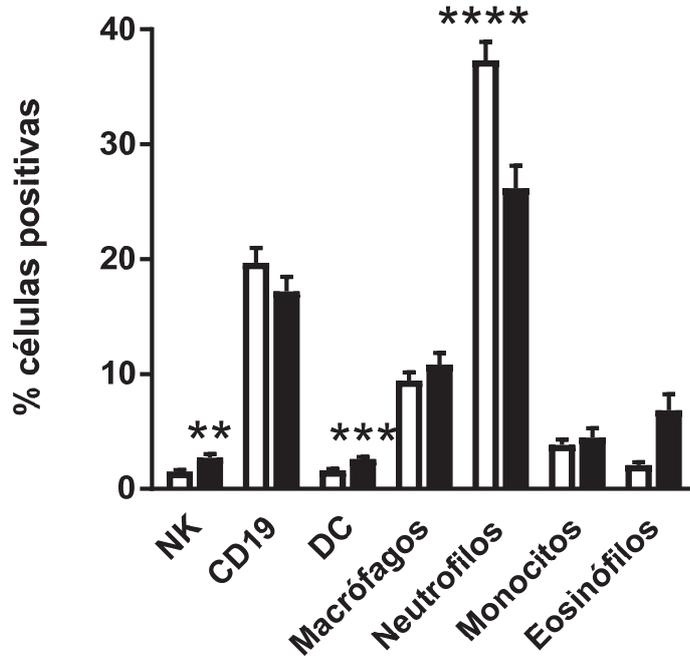


FIG. 2A

□ Control
 ■ αCD69

Médula Ósea



Bazo

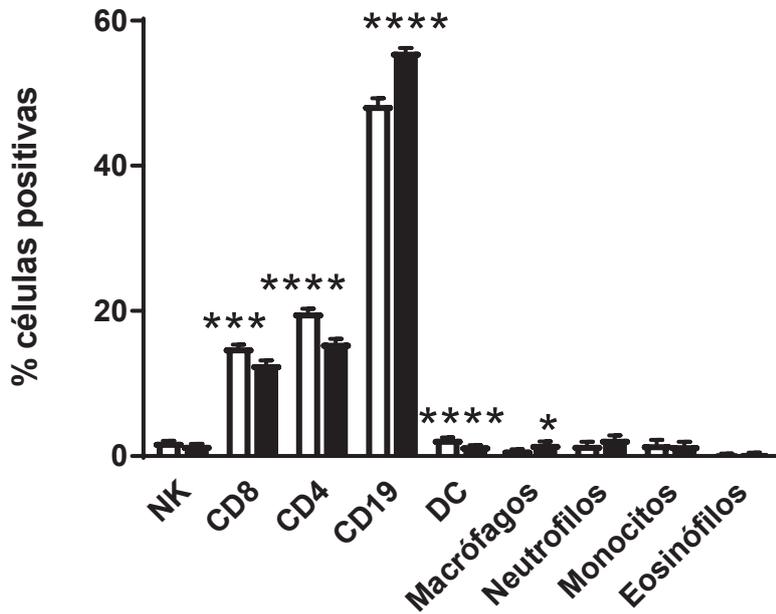
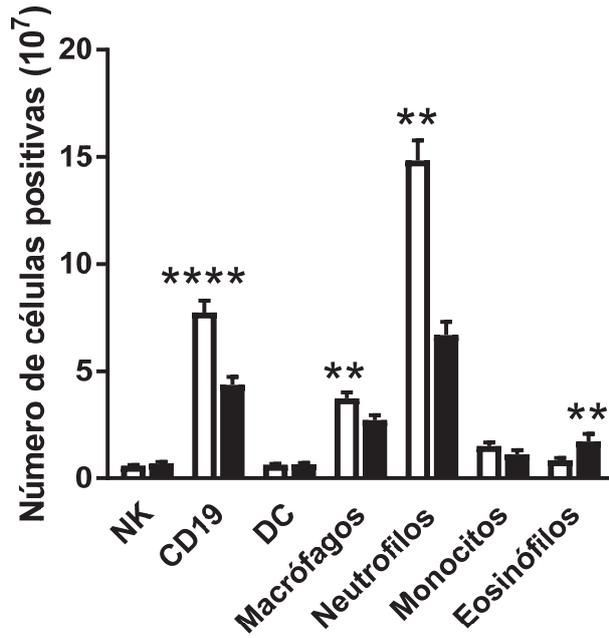


FIG. 2B

□ Control
 ■ α CD69

Médula Ósea



Bazo

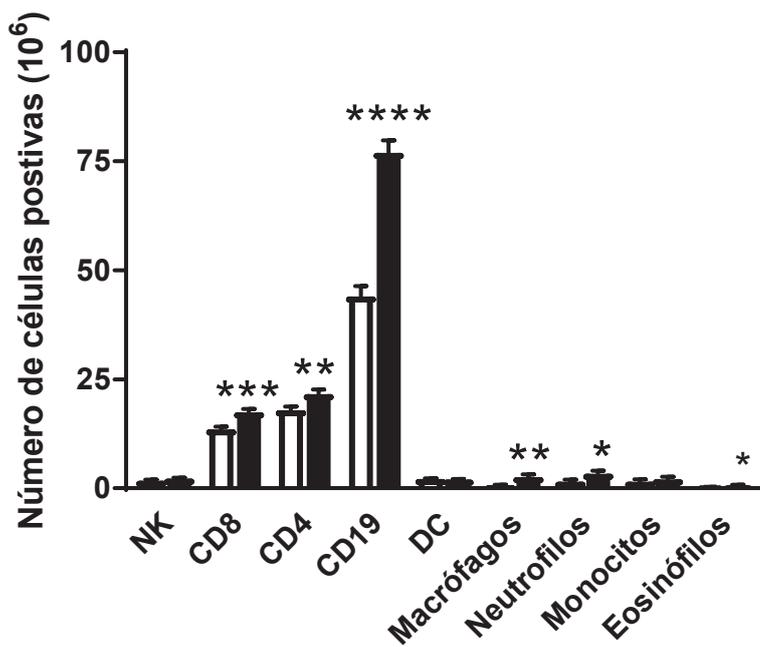


FIG. 3A

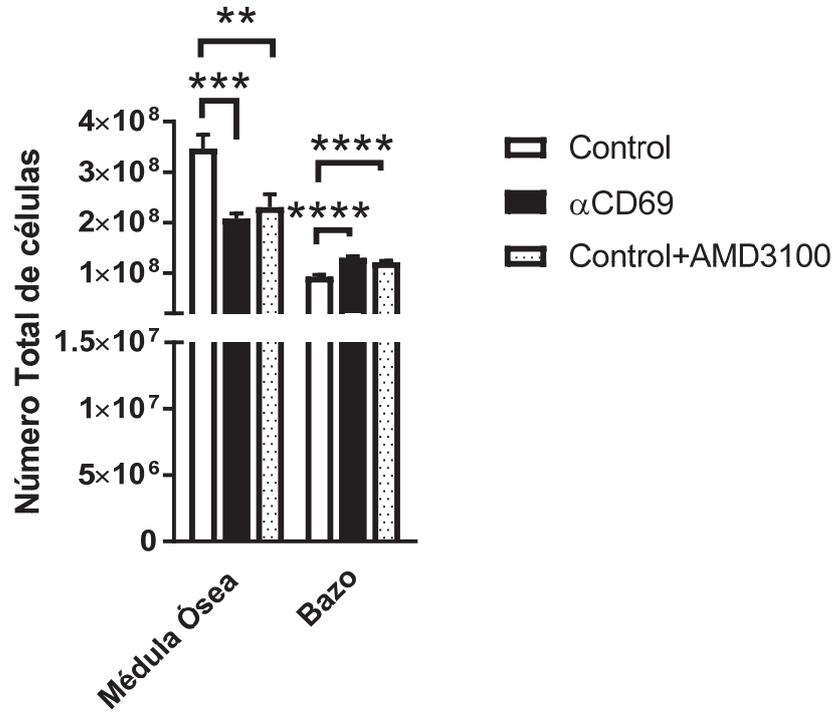


FIG. 3B

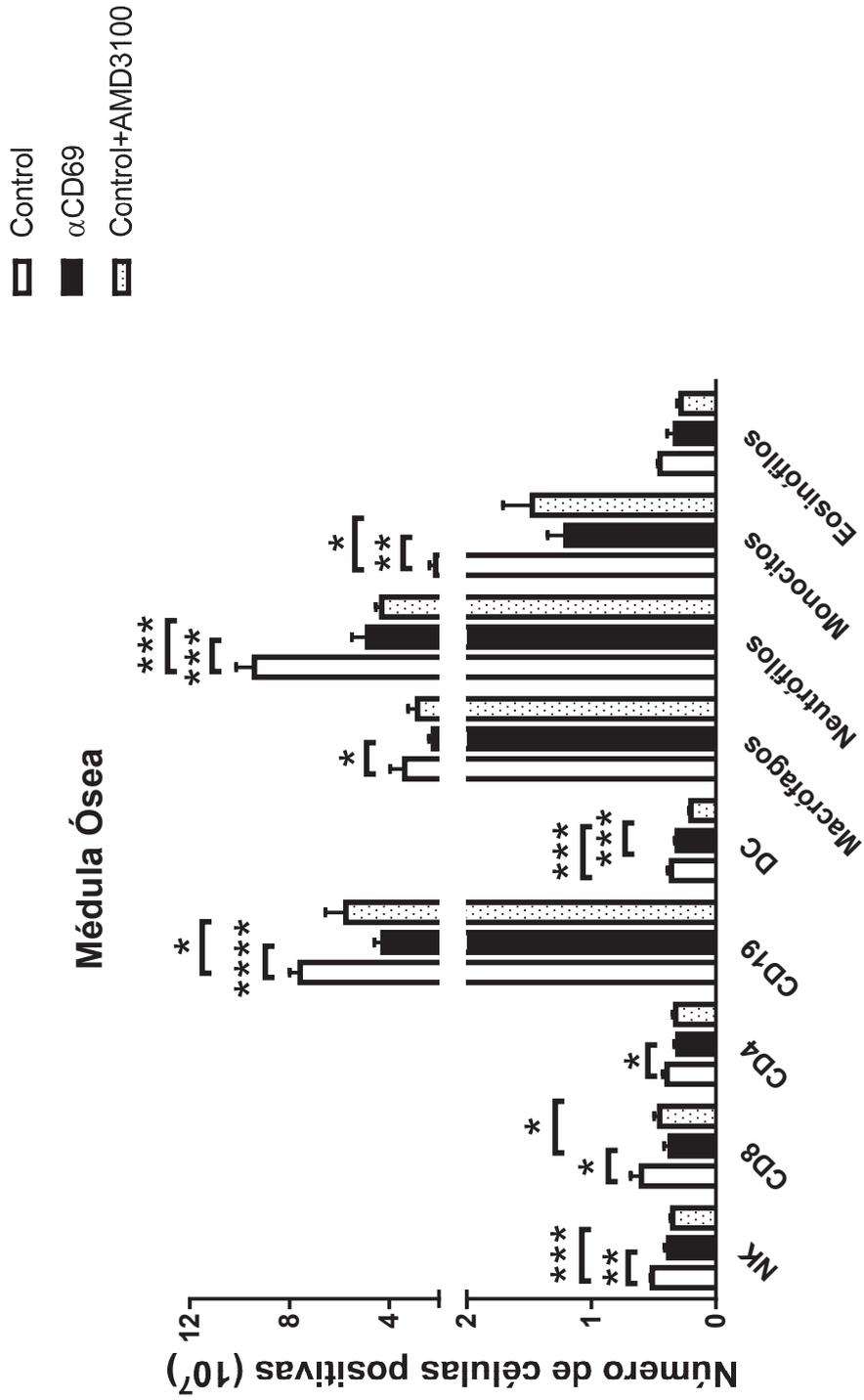


FIG. 3C

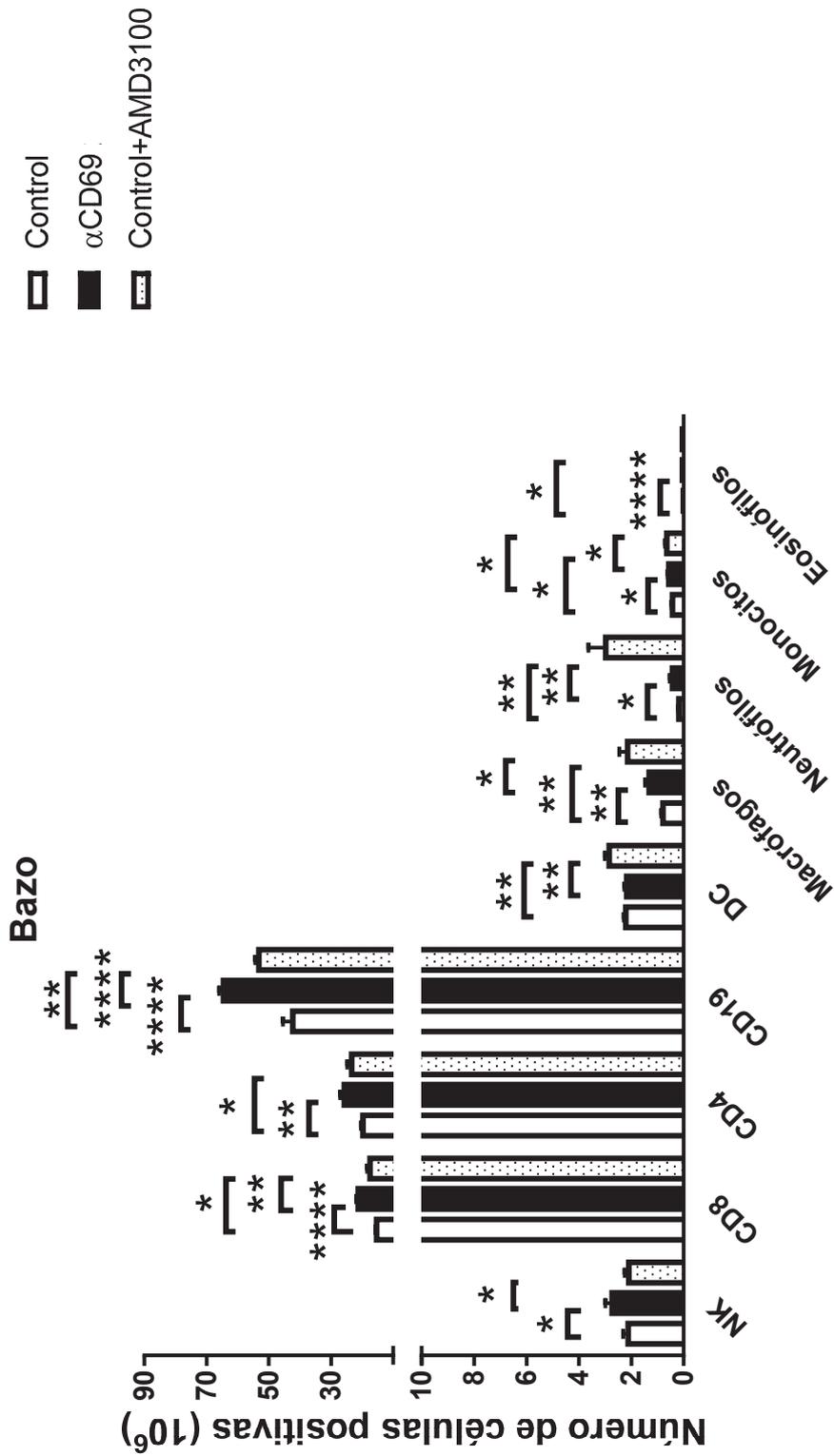


FIG. 4A

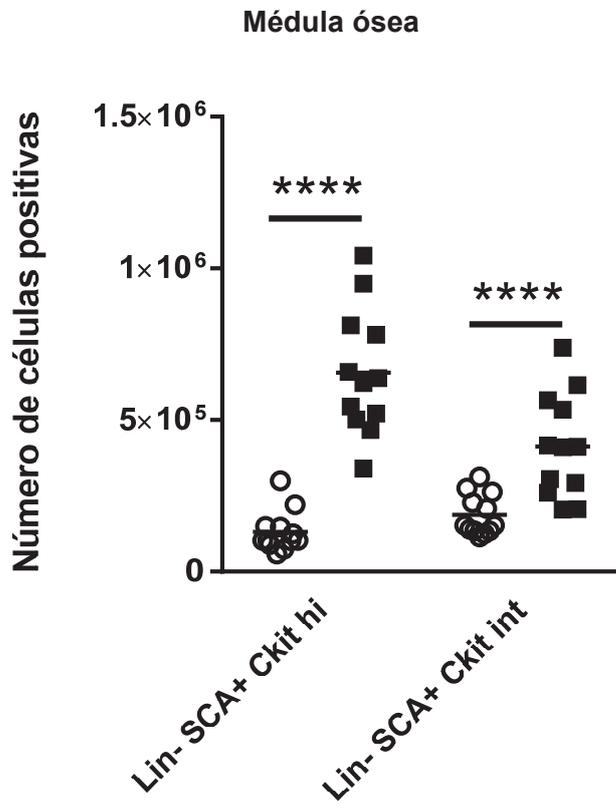
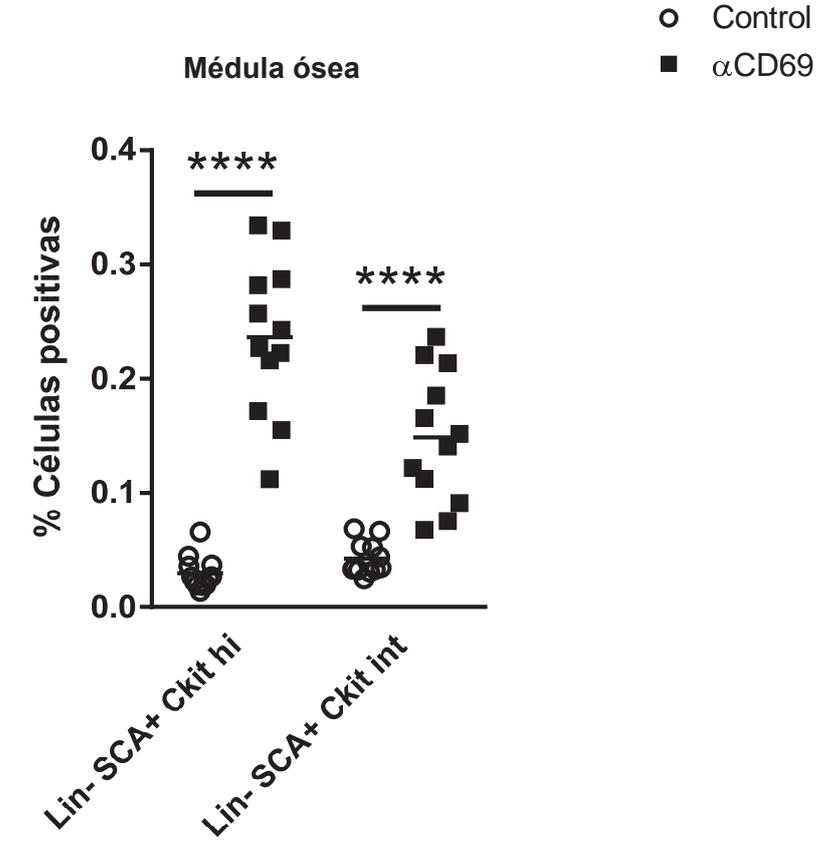


FIG. 4B

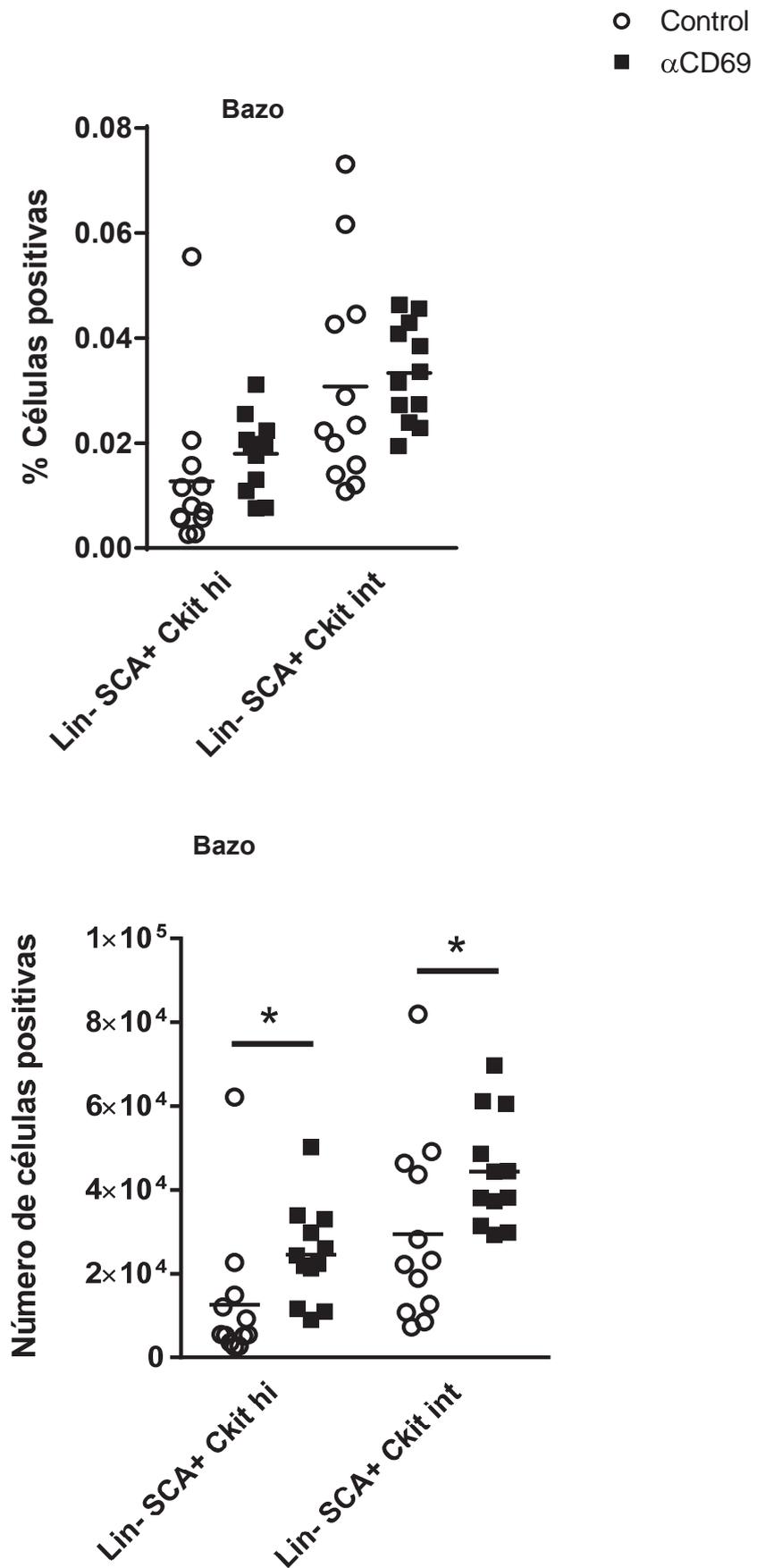


FIG. 4C

○ Control
 ■ α CD69

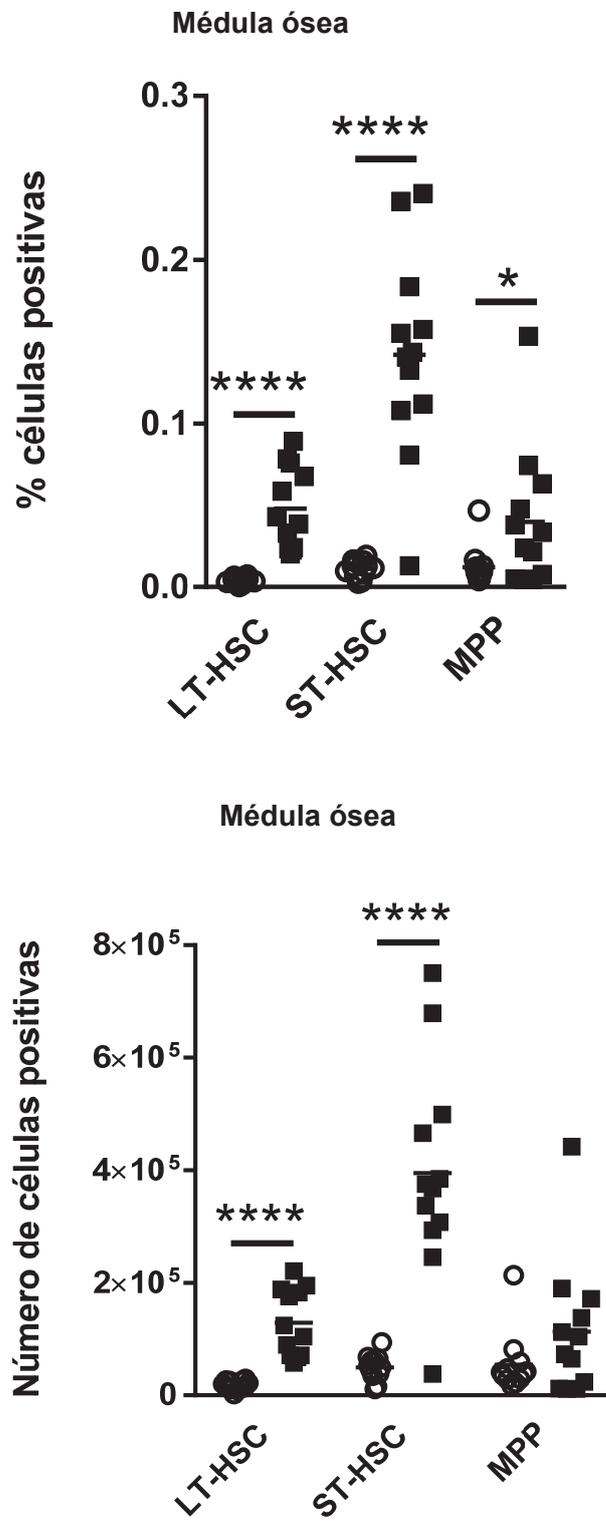


FIG. 5A

Control
 αCD69

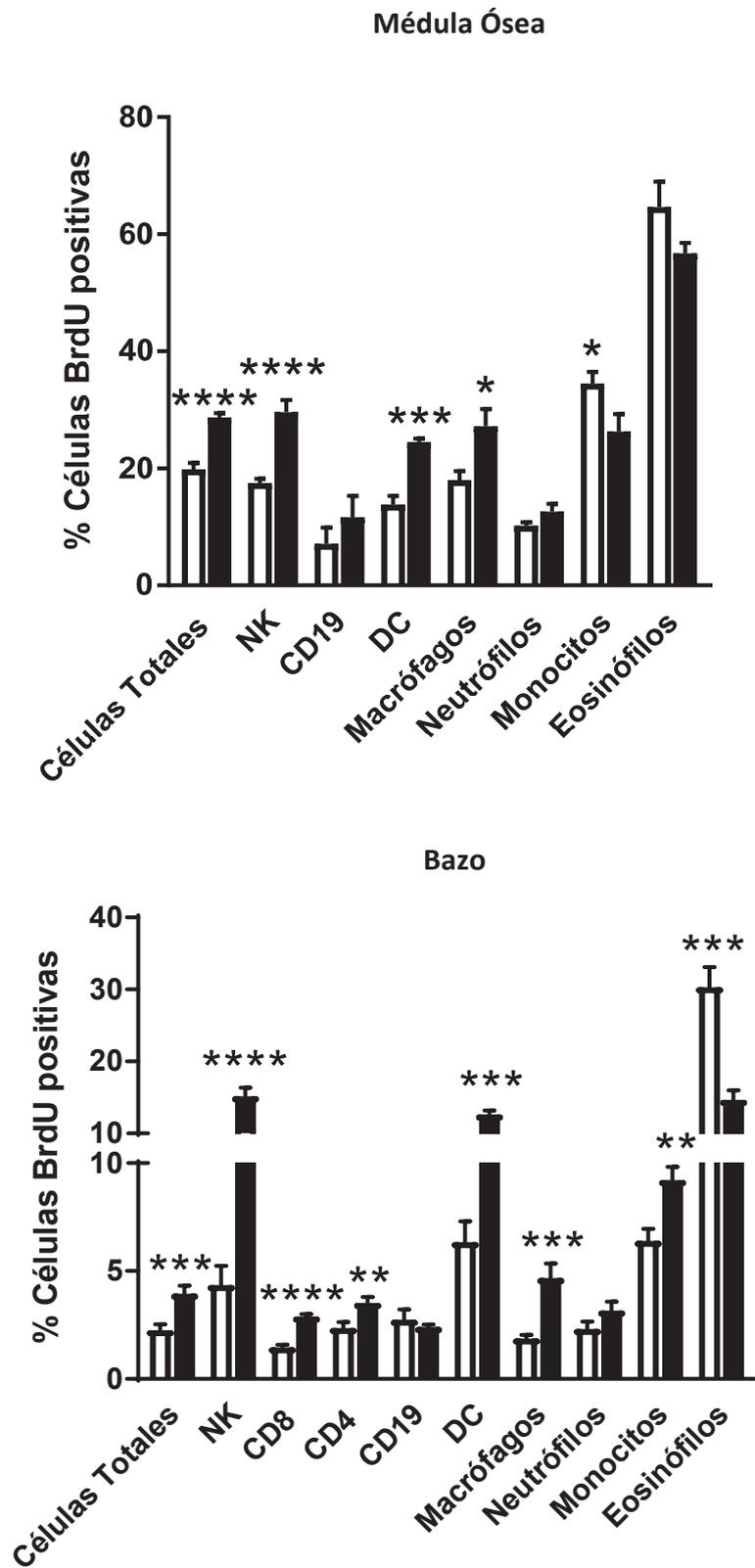


FIG. 5B

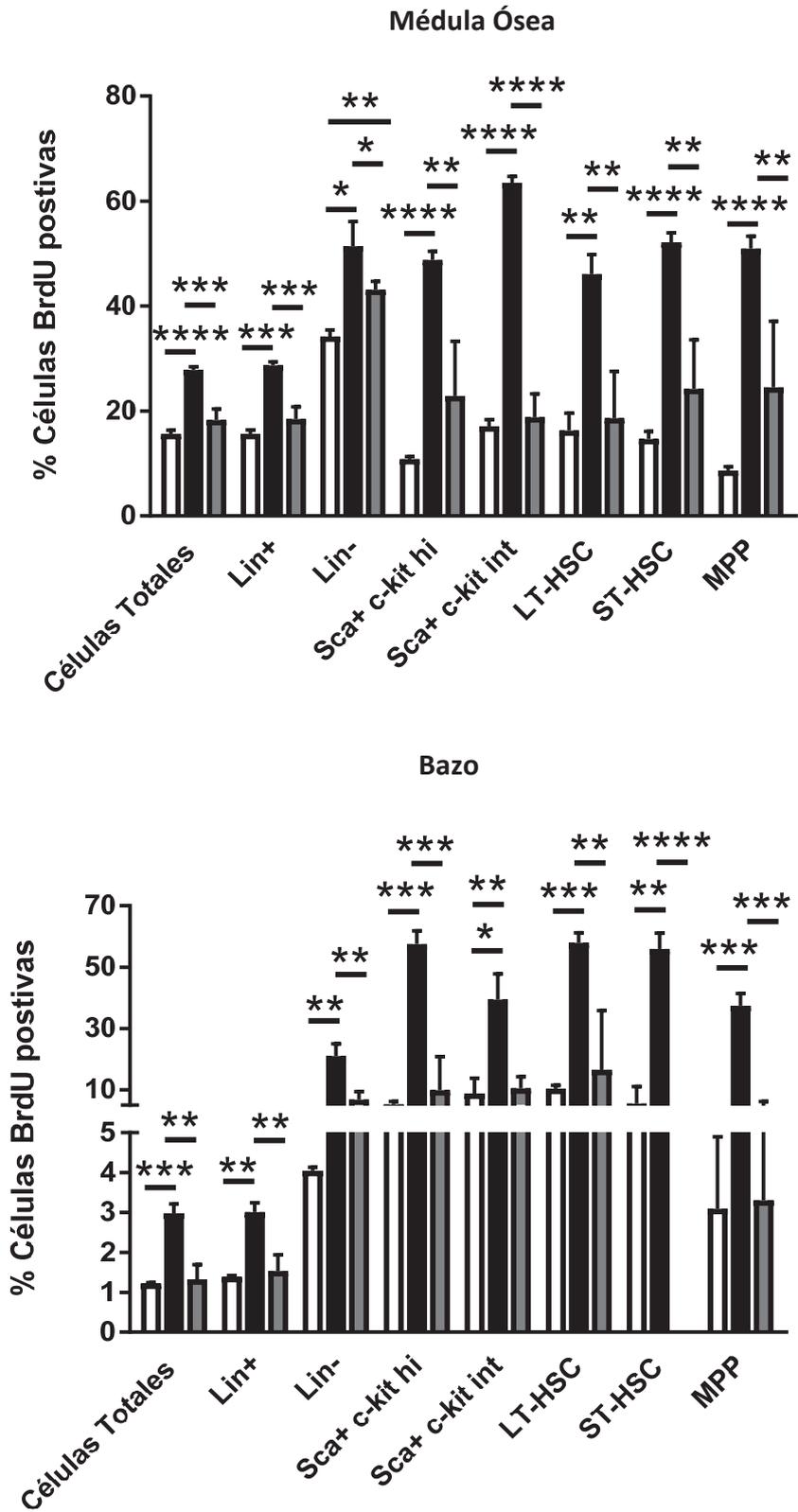
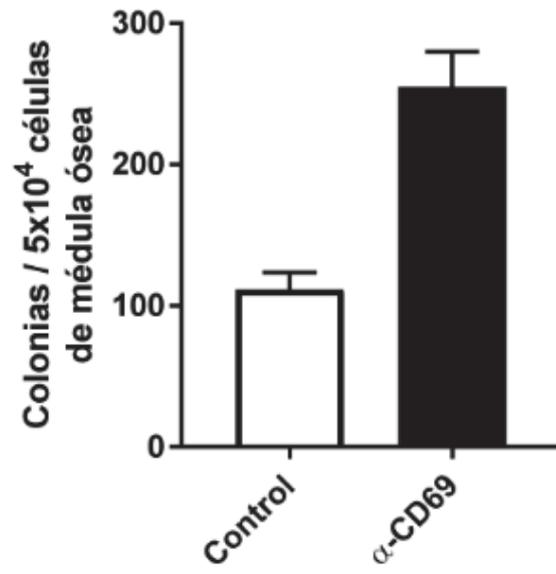


FIG. 5C



Control
 αCD69

FIG. 6A

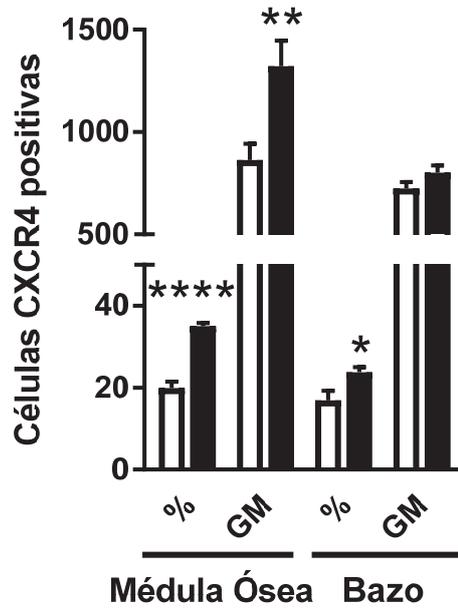


Fig 6B

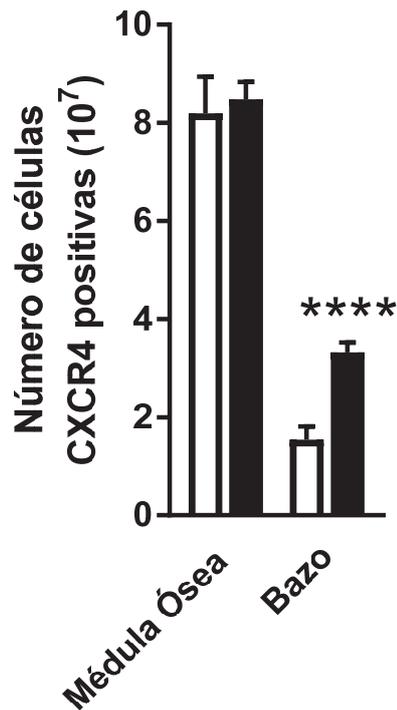


FIG. 7A

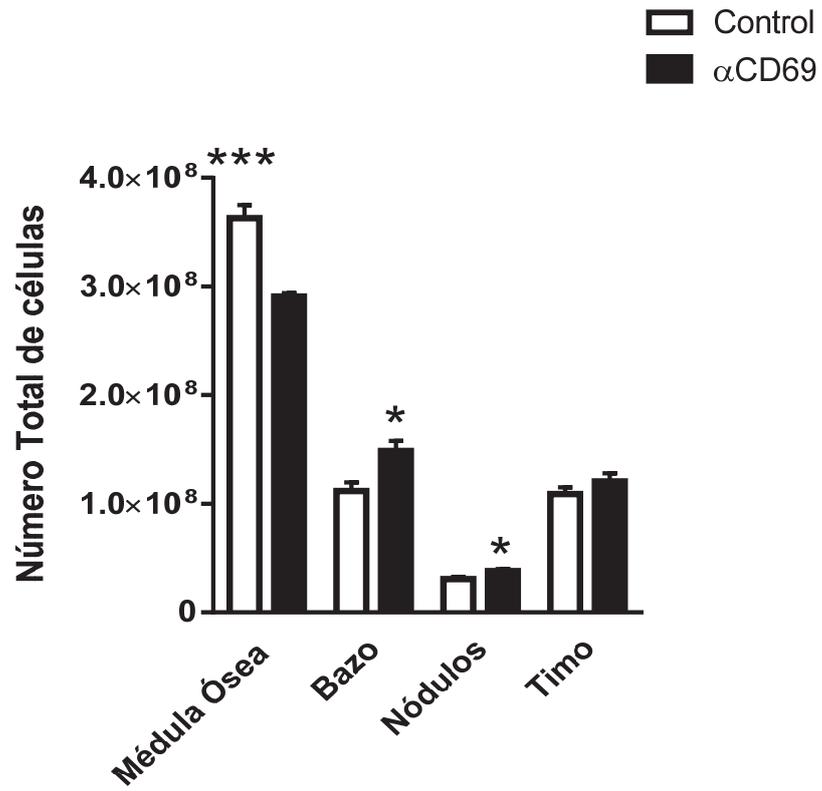


FIG. 7B

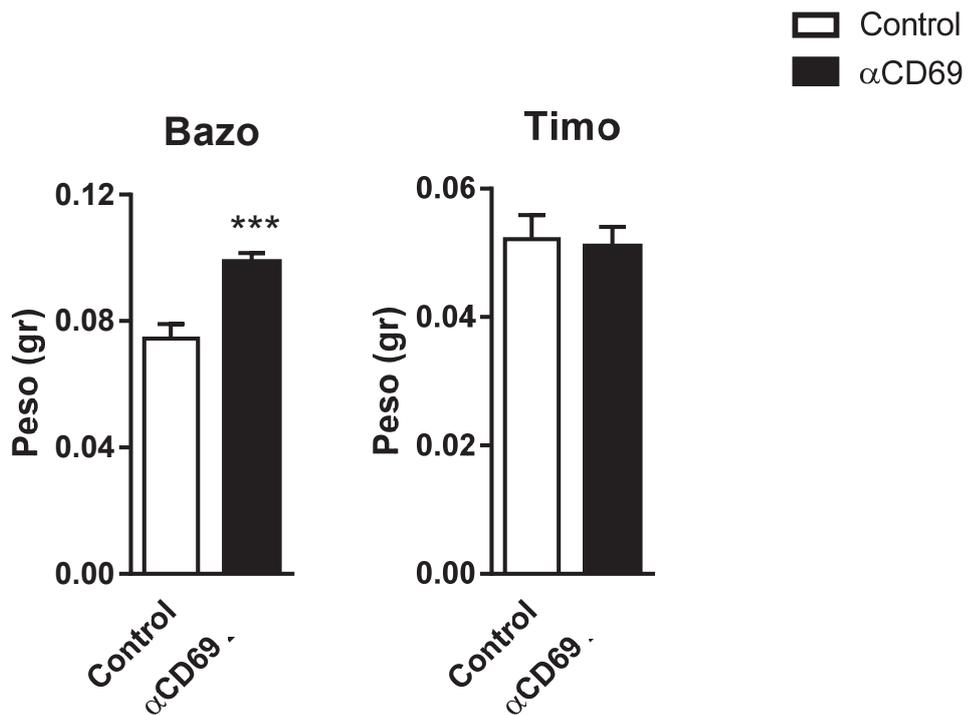


FIG. 7C

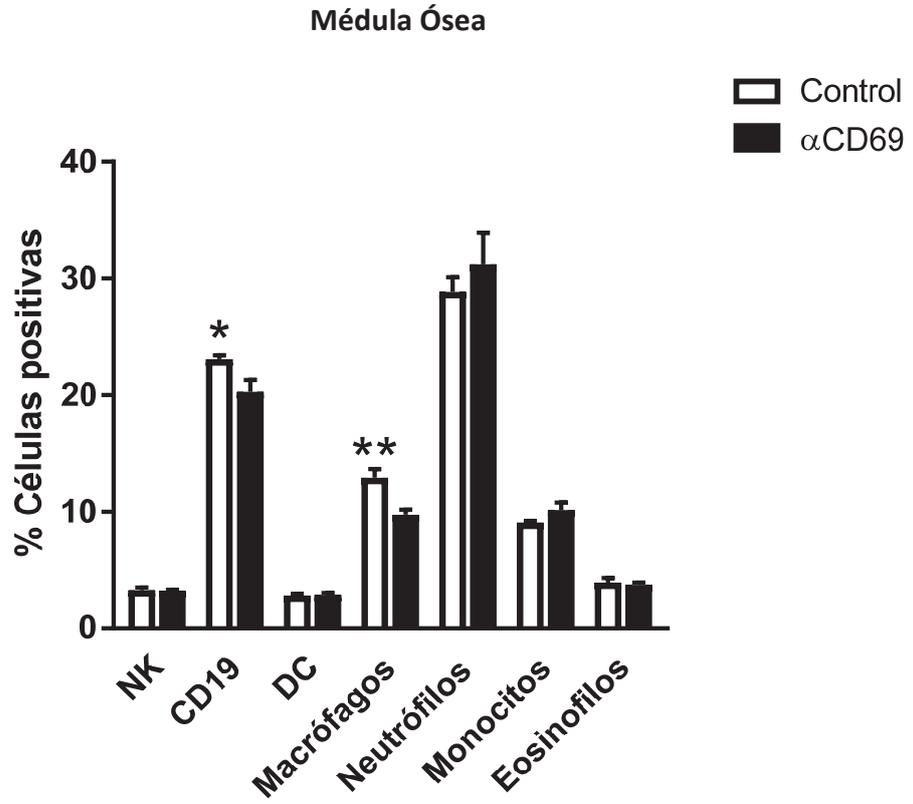


FIG. 7D

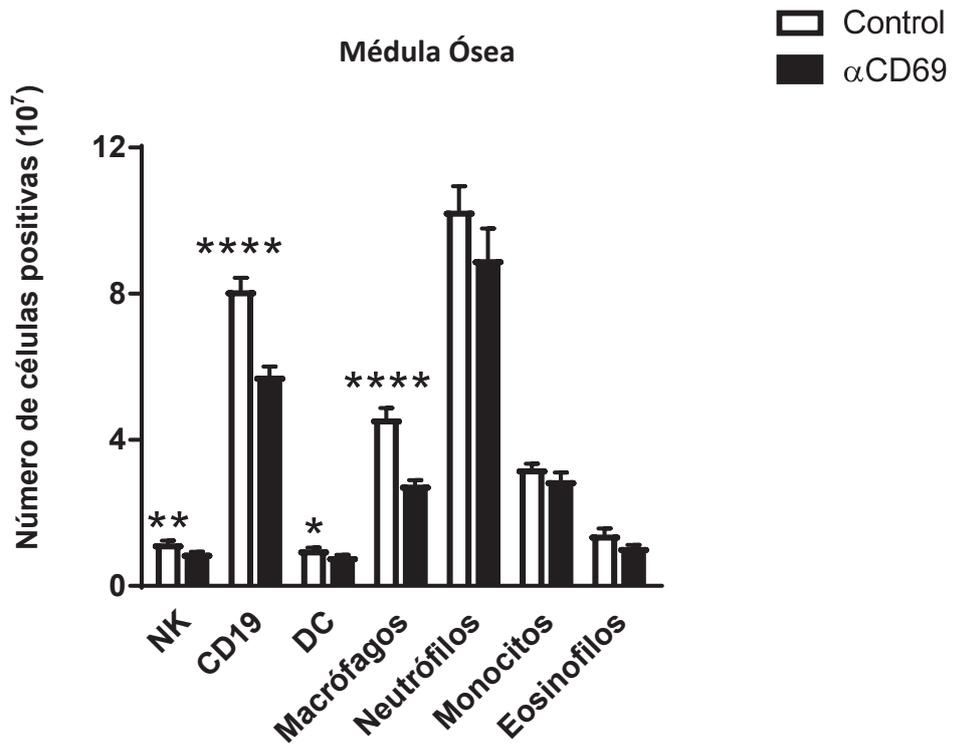


FIG. 7E

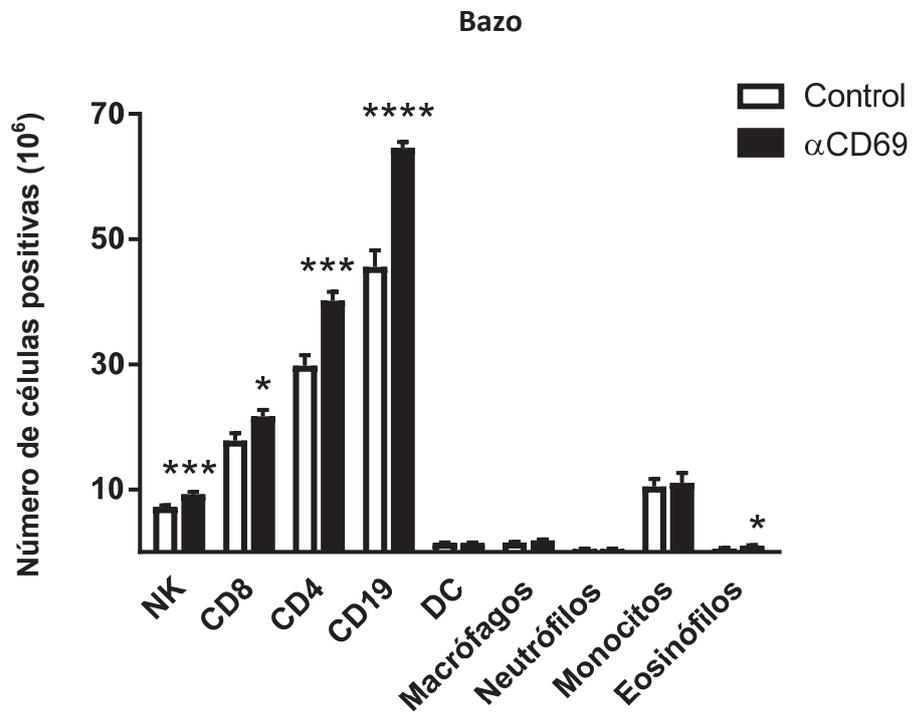


FIG. 7F

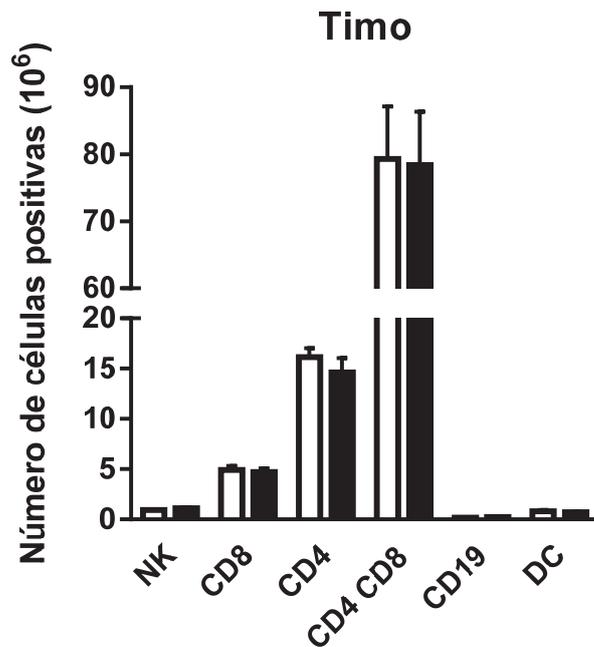


FIG. 8A

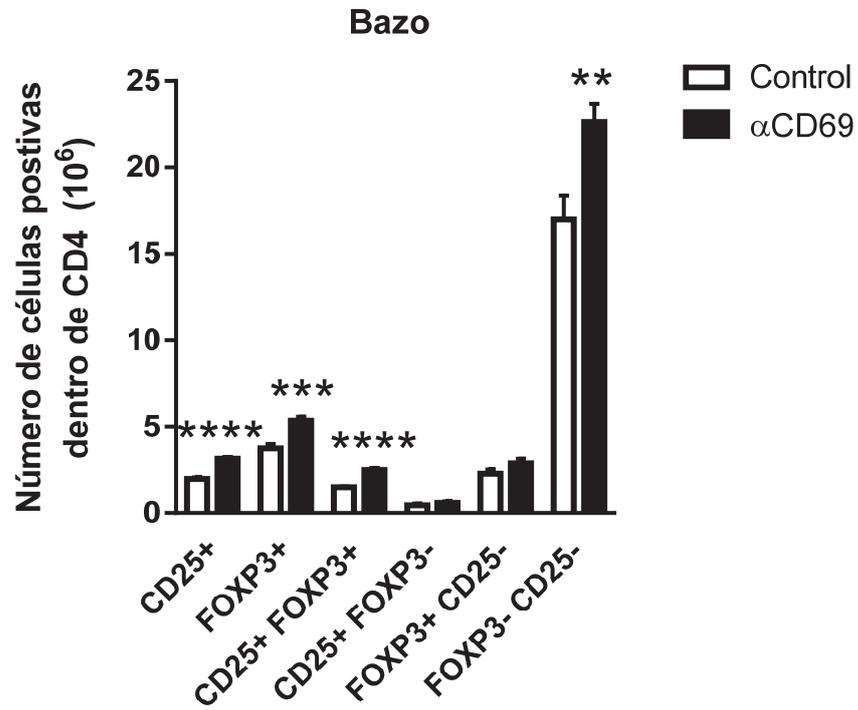


FIG. 8B

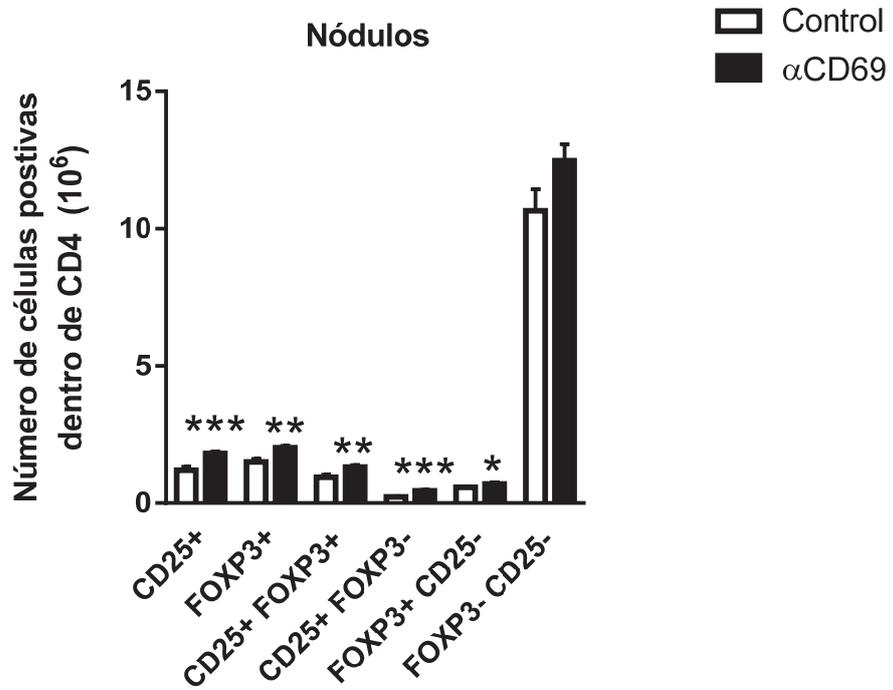


FIG. 8C

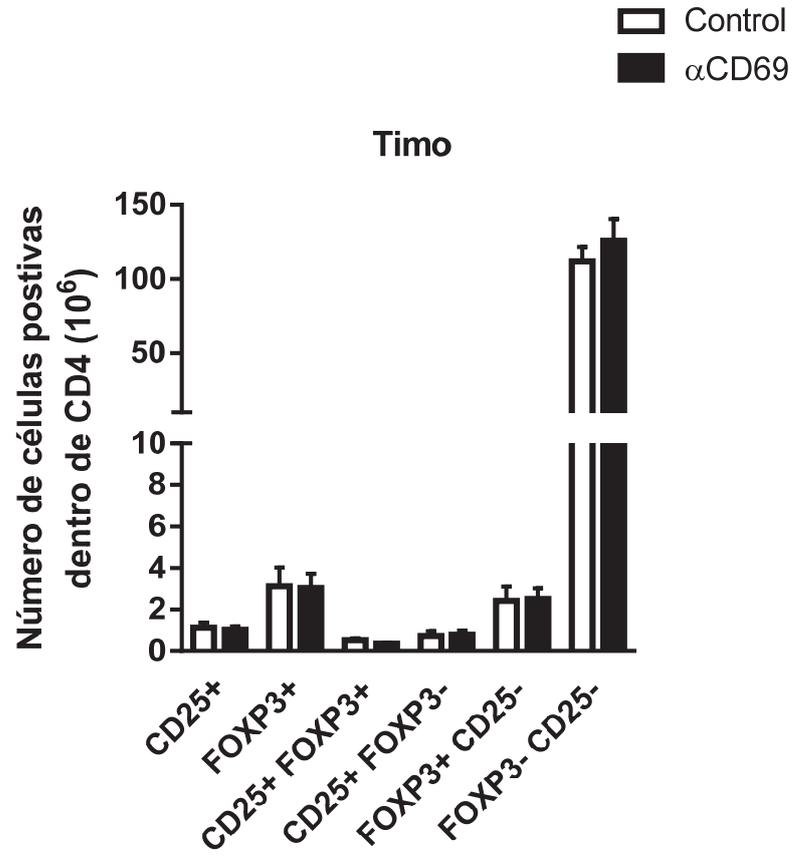


FIG. 9A

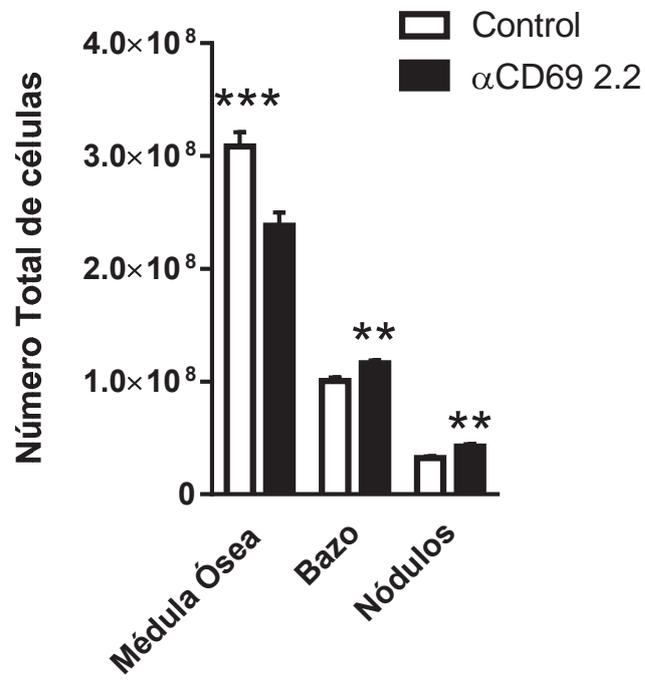


FIG. 9B

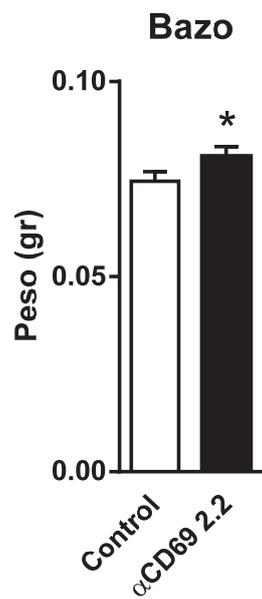


FIG. 9C

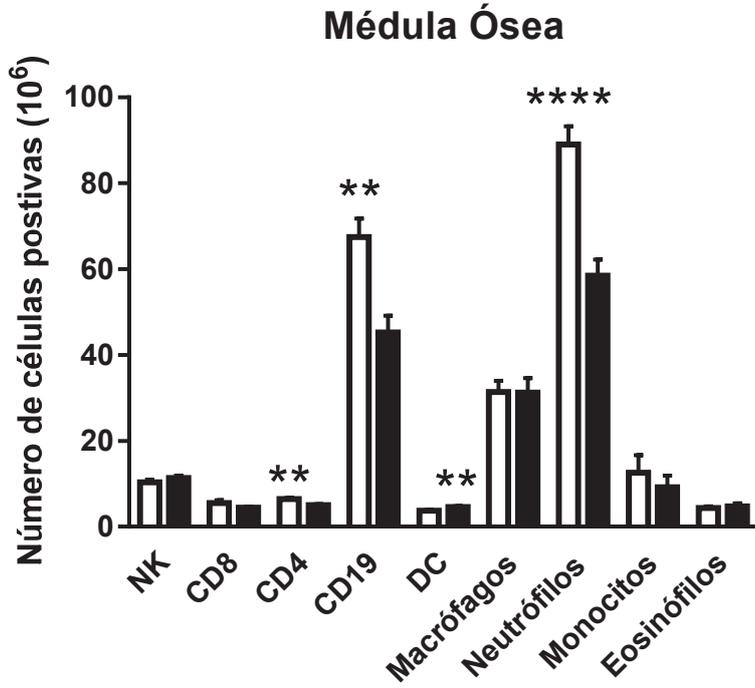
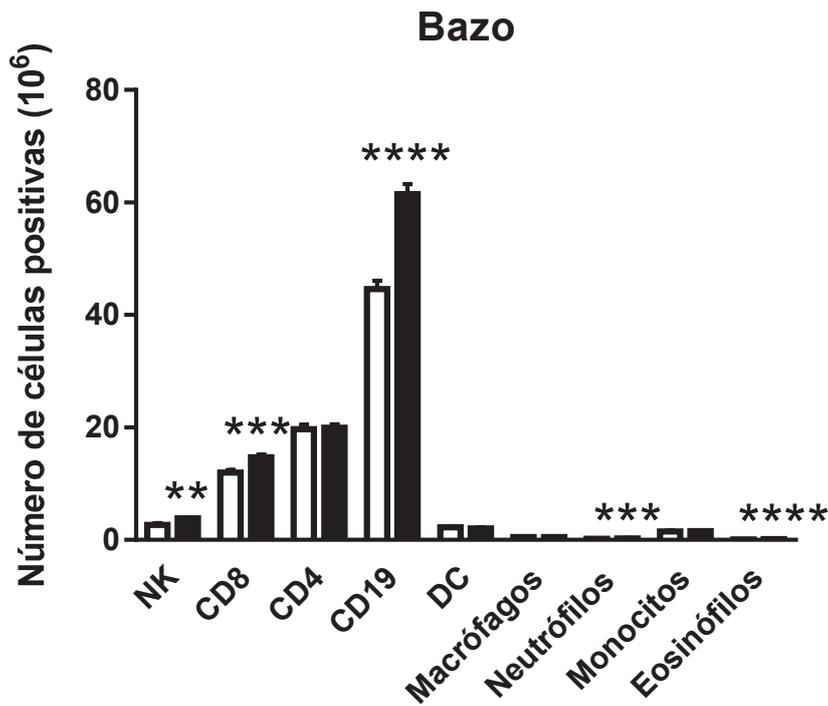


FIG. 9D



ES 2 682 523 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Instituto de Salud Carlos III
 <120> Uso de moduladores de la función de CD69 para la movilización y proliferación de precursores hematopoyéticos
 <130> ES1613.8
 <160> 10
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 199
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Met Ser Ser Glu Asn Cys Phe Val Ala Glu Asn Ser Ser Leu His Pro
 1 5 10 15

Glu Ser Gly Gln Glu Asn Asp Ala Thr Ser Pro His Phe Ser Thr Arg
 20 25 30

His Glu Gly Ser Phe Gln Val Pro Val Leu Cys Ala Val Met Asn Val
 35 40 45

Val Phe Ile Thr Ile Leu Ile Ile Ala Leu Ile Ala Leu Ser Val Gly
 50 55 60

Gln Tyr Asn Cys Pro Gly Gln Tyr Thr Phe Ser Met Pro Ser Asp Ser
 65 70 75 80

His Val Ser Ser Cys Ser Glu Asp Trp Val Gly Tyr Gln Arg Lys Cys
 85 90 95

Tyr Phe Ile Ser Thr Val Lys Arg Ser Trp Thr Ser Ala Gln Asn Ala
 100 105 110

Cys Ser Glu His Gly Ala Thr Leu Ala Val Ile Asp Ser Glu Lys Asp
 115 120 125

Met Asn Phe Leu Lys Arg Tyr Ala Gly Arg Glu Glu His Trp Val Gly
 130 135 140

Leu Lys Lys Glu Pro Gly His Pro Trp Lys Trp Ser Asn Gly Lys Glu
 145 150 155 160

Phe Asn Asn Trp Phe Asn Val Thr Gly Ser Asp Lys Cys Val Phe Leu
 165 170 175

Lys Asn Thr Glu Val Ser Ser Met Glu Cys Glu Lys Asn Leu Tyr Trp
 180 185 190

ES 2 682 523 A1

Ile Cys Asn Lys Pro Tyr Lys
195

<210> 2
<211> 1662
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
caagagctcc agcaaagact ttcactgtag cttgacttga cctgagatta actagggaat 60
cttgagaata aagatgagct ctgaaaattg tttcgtagca gagaacagct ctttgcattcc 120
ggagagtgga caagaaaatg atgccaccag tccccatttc tcaacacgtc atgaagggtc 180
cttccaagtt cctgtcctgt gtgctgtaat gaatgtggtc ttcattacca ttttaattcat 240
agctctcatt gccttatcag tgggccaata caattgtcca ggccaataca catttctcaat 300
gccatcagac agccatgttt cttcatgctc tgaggactgg gttggctacc agaggaaatg 360
ctactttatt tctactgtga agaggagctg gacttcagcc caaaatgctt gttctgaaca 420
tggtgctact cttgctgtca ttgattctga aaaggacatg aactttctaa aacgatacgc 480
aggtagagag gaacactggg ttggactgaa aaaggaacct ggtcacccat ggaagtggtc 540
aaatggcaaa gaatttaaca actggttcaa cgttacaggg tctgacaagt gtgtttttct 600
gaaaaacaca gaggtcagca gcatggaatg tgagaagaat ttatactgga tatgtaacaa 660
accttaacaa taataaggaa acgtgttcac ttattgacta ttatagaatg gaactcaagg 720
aaatctgtgt cagtggatgc tgctctgtgg tccgaagtct tccatagaga ctttgtgaaa 780
aaaaatttta tagtgtcttg ggaattttct tccaaacaga actatggaaa aaaaggaaga 840
aattccagga aaatctgcac ttgtggcttt tattgccatg agctagaagc atcacaggtt 900
gaccaataac catgccaag aatgagaaga atgactatgc aacctttgga tgcactttat 960
attattttga atccagaaat aatgaaataa ctaggcgtgg acttactatt aattgctgaa 1020
tgactaccaa cagtgagagc ctttcatgca tttgcactat tggaaggagt tagatgtttg 1080
tactagatac tgaatgtaaa caaaggaatt atggctggta acatagtttt tagtctaatt 1140
gaatccctta aactcagga gcatttataa atggcaaatg cttatgaaac taagatttgt 1200
aatattttctc tctttttaga gaaatttgcc aatttacttt gttatttttc cccaaaaaga 1260
atgggatgat cgtgtattta tttttttact tcctcagctg tagacaggtc cttttcgatg 1320
gtacatattt ctttgccttt ataacttttt atacagtgtc ttacagagaa aagacataag 1380
caaagactat gaggaatatt tgcaagacat agaatagtgt tggaaaatgt gcaatatgtg 1440
atgtggcaaa tctctattag gaaatattct gtaatcttca gacctagaat aatactagtc 1500
ttataatagg tttgtgactt tcctaaatca attctattac gtgcaatact tcaatacttc 1560
atttaaaata tttttatgtg caataaaatg tatttgtttg tttttgtgt tcagtacaat 1620
tataagctgt ttttatatat gtgaaataaa agtagaataa ac 1662

<210> 3

ES 2 682 523 A1

<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable CDR-H1 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 2.9 frente a CD69

<400> 3

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His
1 5 10

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable CDR-H2 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 2.9 frente a CD69

<400> 4

Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asn

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable CDR-H3 de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 2.9 frente a CD69

<400> 5

Ser Asn Trp Asp Glu Thr Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable CDR-L1 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal 2.9 frente a CD69

<400> 6

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

ES 2 682 523 A1

<220>
<223> Región variable CDR-L2 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal 2.9 frente a CD69

<400> 7

Asn Ala Lys Ile Leu Val Glu
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región variable CDR-L3 de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal 2.9 frente a CD69

<400> 8

Gln His His Tyr Gly Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 9
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia comprendida en la cadena pesada del anticuerpo monoclonal 2.9 frente a CD69

<400> 9

Gly Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp
20 25 30

Met His Trp Val Lys Gln Arg His Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
50 55 60

Asn Lys Gly Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ile
85 90 95

Arg Ser Asn Trp Asp Glu Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Gly
115 120

ES 2 682 523 A1

<210> 10
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia comprendida en la cadena ligera del anticuerpo monoclonal 2.9 frente a CD69

<400> 10

Ala Met Ala Asp Tyr Lys Asp Ile Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ala Ser
1 5 10 15

Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
20 25 30

Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Glu
35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Ile Leu Val Glu Gly Val
50 55 60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys
65 70 75 80

Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His
85 90 95

His Tyr Gly Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

Lys Arg