

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
11 de noviembre de 2010 (11.11.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/127642 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 16/00 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

Victor [CU/CU]; Calle 1ra Edif. 2 Apto.11 e/ 184 y 186,
Rpto. Flores. Playa, Ciudad de La Habana 12100 (CU).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CU2010/000002

(74) Mandatario: DEL PORTILLO DE JUAN, Ingrid;
Bufete Internacional S.A., 5ta Avenida No. 4002 esquina
a 40, Miramar, Playa, Ciudad de La Habana 12100 (CU).

(22) Fecha de presentación internacional:
3 de mayo de 2010 (03.05.2010)

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
2009-0071 4 de mayo de 2009 (04.05.2009) CU

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR
[CU/CU]; Calle 216 esq. 15, Atabey, Playa., Ciudad de la
Habana 11600 (CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): MATEO
DE ACOSTA DEL RIO, Cristina [CU/CU]; Calle C
#9510 e/ 6 y 10, Altahabana, Boyeros, Ciudad de La
Habana 10500 (CU). VAZQUEZ LOPEZ, Ana, Maria
[CU/CU]; Mayía Rguez # 455 entre Carmen y Patrocinio,
10 de Octubre, Ciudad de La Habana 10500 (CU).
LOPEZ REQUENA, Alejandro [CU/CU]; Avenida de
Acosta # 210 (bajos), entre Juan Bruno Zayas y Luz
Caballero, 10 Octubre, Ciudad de La Habana 10500
(CU). FERNANDEZ MARRERO, Yuniel [CU/CU];
Lagunas # 115 apto1 e/ Campanario y, Manrique, Centro
Habana, Ciudad de La Habana 10100 (CU). SOTO
LOPEZ, Yosdel [CU/CU]; Ave 241 #14632 e/ 146 y 148
Bauta., La Habana 32100 (CU). BRITO NAVARRO,

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: ANTIBODIES THAT RECOGNIZE SULPHATIDES AND SULPHATED PROTEOGLYCANS AND THE USE THEREOF

(54) Título : ANTICUERPOS QUE RECONOCEN SULFATIDOS Y PROTEOGLICANOS SULFATADOS Y SU USO

(57) Abstract: The present invention relates to the field of biotechnology and particularly to novel products for use in human health. The present invention provides novel monoclonal antibodies that specifically and with high affinity recognize sulphatides and sulphated proteoglycans. The anti-sulphatide and anti-sulphated proteoglycan antibodies described in the present specification constitute important diagnostic and therapeutic agents for acting on pathological processes associated with the appearance of atherosclerotic plaques. According thereto, the invention provides pharmaceutical compositions that comprise the monoclonal antibodies of the invention or fragments derived from these antibodies for therapeutic and diagnostic use in association with cardiovascular diseases. Additionally, the present invention relates to fragments of the monoclonal antibodies that recognize sulphatides and sulphated proteoglycans, such that said fragments may be used in the treatment or diagnosis of this pathological condition.

(57) Resumen: La presente invención está relacionada con el campo de la biotecnología Y particularmente con nuevos productos para ser usados en la salud humana. La presente invención proporciona nuevos anticuerpos monoclonales que reconocen de manera específica y con alta afinidad sulfátidos y proteoglicanos sulfatados. Los anticuerpos anti-sulfátidos y anti-proteoglicanos sulfatados descritos en la presente memoria descriptiva, proporcionan importantes agentes diagnósticos y terapéuticos para actuar sobre procesos patológicos asociados a la aparición de placas ateroscleróticas. Según esto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos monoclonales de la invención o los fragmentos derivados de estos anticuerpos para su uso terapéutico y diagnóstico asociado a enfermedades cardiovasculares. Adicionalmente la presente invención se relaciona con los fragmentos de los anticuerpos monoclonales que reconocen sulfátidos y proteoglicanos sulfatados, de modo que dichos fragmentos puedan ser usados en la terapia o el diagnóstico de esta patología.



WO 2010/127642 A1

ANTICUERPOS QUE RECONOCEN SULFATIDOS Y PROTEOGLICANOS SULFATADOS Y SU USO.

Sector Técnico.

- 5 La presente invención está relacionada con nuevos anticuerpos monoclonales que reconocen de manera específica y con alta afinidad sulfátidos y proteoglicanos sulfatados. También la presente invención se relaciona con las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos monoclonales de la invención o los fragmentos derivados de estos anticuerpos.
- 10 Adicionalmente la presente invención se relaciona con un juego de reactivos útil en el diagnostico de enfermedades cardiovasculares que comprende los anticuerpos de la invención o sus fragmentos.

Estado de la técnica anterior:

- 15 Después de más de 30 años de desarrollada la tecnología de hibridomas para la obtención de anticuerpos monoclonales (AcM) murinos (Koehler y Milstein Nature, 256: 495-497, (1975), los mismos han resultado muy útiles en el diagnóstico de enfermedades y en la investigación básica, pero solo 20 anticuerpos han sido registrados para la terapia en humanos (Pharma Vitae, Monoclonal antibodies Update, 6-20 363, 2008) demostrando su eficacia en humanos, lo que ha sido en gran medida debido a su corta vida media en sangre, así como al pobre reconocimiento de las funciones efectoras murinas por el sistema inmune humano, y además por la respuesta inmunológica que provoca el origen murino de los mismos al ser inyectados en pacientes (respuesta HAMA, siglas en inglés de human anti-mouse antibodies).
- 25 Numerosos estudios han mostrado que, después de la administración de un anticuerpo extraño, la respuesta inmune producida en el paciente puede ser considerablemente fuerte y eliminar sustancialmente la utilidad terapéutica del anticuerpo después de un tratamiento inicial. Más aún, después de administrar a un paciente un AcM murino, tratamientos ulteriores con anticuerpos murinos no relacionados podrían no ser efectivos
- 30 e incluso peligrosos debido a la reactividad cruzada conocida como respuesta HAMA según el reporte de Khazaeli, M.B. y col. Journal of Immunotherapy 15: 42-52 (1994). De lo antes expuesto se infiere la necesidad de obtención de versiones de los anticuerpos terapéuticos, que sean menos inmunogénicas en humanos, que se obtengan de forma sencilla y económica y que resulten adecuados para la fabricación
- 35 de formulaciones terapéuticas u otros usos. Morrison S.L. y col. Adv Immunol., 44: 65-92 (1989). Se han desarrollado varios métodos para humanizar anticuerpos de ratón o de rata y así disminuir la respuesta xenogénica contra proteínas extrañas al ser estos inyectados en humanos. Uno de los primeros intentos para reducir la inmunogenicidad ha sido generar

anticuerpos "quiméricos", en los cuales los dominios variables de las proteínas murinas se insertan en dominios constantes de moléculas humanas, con lo cual no sólo se logra la disminución de la inmunogenicidad, sino también la activación de las funciones efectoras del sistema inmune. Morrison S.L. y col. PNAS USA, 81: 6851-6855 (1984).

5 Estas moléculas quiméricas mantienen las características del anticuerpo original en relación con la unión al antígeno y su región constante no es inmunogénica.

La aterosclerosis y sus consecuencias tienen una enorme incidencia en la población mundial y constituyen la principal causa de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados. Melián, A. y col. Am. J. Pathol., 155:775 (1999) y
10 en Cuba desde hace varios años (OMS, 2004, Anuario Estadístico, MINSAP, 2007).

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica de carácter multifactorial que contribuye en gran medida a la patogénesis del infarto del miocardio y cerebral, de la gangrena, y de la pérdida de las funciones en las extremidades. Greaves, D. R. y col.
15 Trends Immunol 22: 180-181 (2001); Ross, R. y col. Am Heart J 138(5 Pt 2): S419-20 (1999).

Una de las principales causas de la aterosclerosis es la hipercolesterolemia. Las lipoproteínas de bajo peso molecular (LDL) en su tránsito a través de la pared arterial son atrapadas en la matriz extracelular de la íntima arterial, por interacciones con los proteoglicanos, y sufren modificaciones oxidativas. Las lipoproteínas unidas a proteoglicanos de la íntima arterial son más susceptibles a sufrir modificaciones, tanto en su porción lipídica como proteica, tales como la oxidación y la hidrólisis enzimática, con lo que aumenta su potencial aterogénico. La apoB-100 contiene varias regiones por medio de las cuales se puede unir a las cadenas de glucosaminoglicanos de los proteoglicanos y todas tienen en común la presencia de varios aminoácidos básicos.
20 Camejo, G., E. y col. Atherosclerosis 139: 205-22, (1998); Chang, T. Y. y col. Curr Opin Lipidol 12: 289-96 (2001); Camejo, G., U. y col. Atheroscler Suppl 3: 3-9 (2002). La densidad de cargas negativas en los glicosaminoglicanos influye en la interacción con las LDL, de manera que el grado de sulfatación afecta la interacción de las LDL con proteoglicanos. Sambandam T. y col. Arterioscler Thromb, 11: 561-568 (1991)
25

Por otra parte, las LDL oxidadas pueden ser internalizadas por los macrófagos a través de los receptores basureros en la superficie de estas células, lo cual conduce a la acumulación de colesterol intracelular con la consiguiente formación de las células espumosas. Estos eventos representan los principales pasos que inician la respuesta inflamatoria, con la intervención de monocitos/macrófagos, mastocitos, células dendríticas, células T y NKT. Camejo, G. y col. Atherosclerosis 139(2): 205-22 (1998); Hurt-Camejo, E. y col. Invest Clin 42 Suppl 1: 43-73 (2001); Skalen, K., M. y col. Nature 417:750-754 (2002).
30

Existen evidencias experimentales que demuestran la participación de los proteoglicanos

presentes en la superficie de los macrófagos, en la unión de las LDL oxidadas a estas células, así como en la internalización o incorporación de estas partículas para formar finalmente las células espumosas. Halvorsen B. y col. *Biochem J.* 331:743-752 (1998).

Es indiscutible que la adopción de estilos de vida más sanos en conjunto con el uso de
5 agentes anti-trombóticos y reductores de lípidos han tenido un impacto en la disminución del riesgo de que se desarrollen eventos cardiovasculares, pero estas estrategias aún son insuficientes para eliminar estos riesgos totalmente

Como se mencionó anteriormente, la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria multifactorial donde diversos antígenos son importantes en su desarrollo, por lo que se
10 están desarrollando diferentes estrategias de inmunoterapia activa y pasiva con el objetivo de lograr un mayor impacto terapéutico en esta enfermedad.

Una de estas estrategias son las terapias basadas en incrementar las HDL, debido a la relación inversa que existe entre HDL-colesterol y enfermedad cardiovascular. La CETP es una enzima clave en el metabolismo de las HDL y se considera una diana potencial
15 para la terapia, ya que reduciendo su actividad se aumentan los niveles de HDL. La estrategia de utilización de vacunas que induzcan la producción de anticuerpos que se unan e inhiban la función de CETP ha sido descrita en WO 1997/041227 y WO 2006/133196. Sin embargo, estudios recientes que muestran el fallo en un ensayo clínico fase III utilizando el Torcetrapib como inhibidor de la CETP han hecho dudar de
20 esta estrategia. Nicholls S. J. y col. *Circulation.* 9; 118:2506-14 (2008); Hermann M. y col. *Curr Hypertens Rep*, 11:76-80 (2009).

Algunos autores han descrito vacunas utilizando LDL oxidadas como inmunógenos con vistas a inhibir la formación de placas de ateroma. Palinski W. y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:821-25 (1995); Ameli S y col. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16:1074-79 (1996); Freigang S. y col. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 18:1972-82 9 (1998); Zhou X. y col. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:108-14 (2001); George J. y col. *Atherosclerosis* 138:147-52 (1998); Fredrikson G.N. y col. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:879-84 (2003); US
25 2008/0070265A1.

30 Otra estrategia es la obtención de vacunas terapéuticas y profilácticas basadas en fragmentos específicos de la apolipoproteína C-III oxidada, con el objetivo de inducir una respuesta inmune capaz de prevenir o reducir la formación de lesiones ateroscleróticas (WO 2001/064008, WO 2003/020765, WO 2004/080375 y WO 2004/081045).

35 Otro acercamiento vacunal descrito se basa en un péptido conjugado a un aldehído como el MDA ó 4-HNE para inducir anticuerpos que interactúen con receptores alfa/beta de las células T e impidan la formación de las lesiones ateroscleróticas (WO 2001/068119).

Algunos autores han abogado por la importancia en la aterosclerosis de vacunas contra patógenos para prevenir el desarrollo de placas de ateromas (WO1998/033510, US 006291437 B1, US 6471965 B1, US006808713 B1).

5 Otra estrategia propuesta para retardar o reducir la severidad de la aterosclerosis, causada por ingestión de colesterol en la dieta, es el uso de vacunas contra esteroides (US 2002/0018808 A1).

La inmunoterapia pasiva como herramienta terapéutica también puede jugar un papel importante en la aterosclerosis. La inmunización pasiva para tratar o prevenir la aterosclerosis utilizando anticuerpos humanos dirigidos contra fragmentos oxidados o modificados de la Apo B100 ha sido descrita (US 005196324^a, US 2007/0098725 A1, US 2008/0075716 A1).

También se ha propuesto como combinación terapéutica en el tratamiento o para la prevención de la aterosclerosis, la inmunización pasiva con anticuerpos con especificidad por la fosforilcolina (US 2007/0286868 A1, US 2007/0122419 A1).

15 Otra estrategia descrita es el uso de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que específicamente se unen a M-CSF humano (US 2007326414 B2).

El uso de anticuerpos monoclonales que prevengan la adhesión de los monocitos al endotelio vascular y que por tanto impidan la invasión por estas células del endotelio y los tejidos que lo rodean, es otro acercamiento terapéutico para esta enfermedad (US 20 005541296 A).

Se ha descrito el uso de AcMs como inhibidores del receptor de la glicoproteína IIb/IIIa y por ende de la agregación plaquetaria (WO 1999/052551, US 005976532 A).

Además, se han obtenido AcMs humanos contra epítopos peptídicos protectivos de la apolipoproteína CIII para su uso en inmunoterapia pasiva (WO 25 2004/081046). También, el uso de inmunoglobulinas intravenosas (IVIG) puede tener un efecto ateroprotectivo. Udi N y col. Autoimmunity reviews 7:445-452 (2008).

No han sido descritos AcMs quiméricos que reaccionen con sulfátidos y glicosaminoglicanos sulfatados, que reconozcan macrófagos y lesiones ateroscleróticas, y que al ser administrados en bajas dosis inhiban la formación de lesiones ateroscleróticas y con la capacidad de inducir una respuesta de anticuerpos contra estas moléculas sulfatadas.

35 Descripción detallada de la invención:

La presente invención se relaciona con anticuerpos monoclonales caracterizados porque reconocen sulfátidos y proteoglicanos sulfatados o fragmentos derivados de estos anticuerpos.

Los anticuerpos anti-sulfatidos y anti-proteoglicanos sulfatados de la invención son preferiblemente monoclonales. También se incluyen dentro del alcance de la invención fragmentos de anticuerpos como los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH y F(ab')₂, de los anticuerpos anti-sulfatidos y anti-proteoglicanos sulfatados proporcionados en la presente memoria descriptiva. Estos fragmentos de anticuerpos se pueden crear por medios tradicionales, como digestión enzimática, o se pueden generar mediante técnicas recombinantes. Estos fragmentos de anticuerpos pueden ser quiméricos o humanizados. Estos fragmentos son útiles para los fines diagnósticos y terapéuticos que se exponen en la presente descripción.

La invención también engloba formas de realización de anticuerpos y fragmentos sustancialmente puros

En una realización particular, el anticuerpo de la presente invención está caracterizado por las siguientes secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera:

Cadena pesada:

HCDR1 SEQ ID: 1 RYSVH

HCDR2 SEQ ID: 2 MIWGGGSTDYNSALKS

HCDR3 SEQ ID: 3 SGVRRGRAQAWFAY

HFR1 SEQ ID: 7 QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSL S

HFR2 SEQ ID: 8 WVRQPPGKGLEWLG

HFR3 SEQ ID: 9 RLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCAR

HFR4 SEQ ID: 10 WGQGT LVT VSA

Cadena Ligera:

LCDR1 SEQ ID: 4 KASQDVSTAVA

LCDR2 SEQ ID: 5 SASYRYT

LCDR3 SEQ ID: 6 QQHYSTPWT

LFR1 SEQ ID: 11 DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC

LFR2 SEQ ID: 12 WYQQKPGQSPKLLIY

LFR3 SEQ ID: 13 GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYC

LFR4 SEQ ID: 14 FGGGTKLELK

Adicionalmente el anticuerpo de la invención comprende las regiones constantes IgG1 humana para cadena pesada y Ck humana para la cadena ligera.

Esta invención engloba composiciones, incluidas composiciones farmacéuticas, que comprenden un anticuerpo anti-sulfatidos y anti-proteoglicanos sulfatados de la invención o fragmentos derivados de los mismos. Como se usa en la presente memoria

descriptiva, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos que se unen a sulfatidos y proteoglicanos sulfatados.

Estas composiciones pueden comprender además, transportadores adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyan soluciones tamponadas o adyuvantes, que son bien conocidos en la materia.

En otra forma de realización la presente invención se relaciona con la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal cuyas secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera son las que se muestran a continuación.

10 Cadena pesada:

HCDR1 SEQ ID: 1 RYSVH

HCDR2 SEQ ID: 2 MIWGGGSTDYNSALKS

HCDR3 SEQ ID: 3 SGVRRGRAQAWFAY

15

HFR1 SEQ ID: 7 QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSL S

HFR2 SEQ ID: 8 WVRQPPGKGLEWLG

HFR3 SEQ ID: 9 RLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCAR

HFR4 SEQ ID: 10 WGQGLTVTVSA

20 Cadena Ligera:

LCDR1 SEQ ID: 4 KASQDVSTAVA

LCDR2 SEQ ID: 5 SASYRYT

LCDR3 SEQ ID: 6 QQHYSTPWT

25

LFR1 SEQ ID: 11 DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC

LFR2 SEQ ID: 12 WYQQKPGQSPKLLIY

LFR3 SEQ ID: 13 GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYC

LFR4 SEQ ID: 14 FGGGTKLELK

30 En un tercer aspecto, la presente invención se relaciona con un juego de reactivos útil en el diagnóstico de lesiones ateroscleróticas que comprende uno de los anticuerpos de la invención o fragmentos derivados de los mismos. Y más particularmente el juego de reactivos comprende el anticuerpo monoclonal con las secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera descritas previamente.

35 En un aspecto adicional la presente invención se relaciona con el uso de los anticuerpos de la invención para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, particularmente aquellas que muestran evidencias de lesiones ateroscleróticas.

El término anticuerpo generalmente se refiere a anticuerpo monoclonal y más particularmente a un anticuerpo monoclonal murino o a un anticuerpo quimérico.

Obtención de los anticuerpos:

En general los anticuerpos monoclonales anti- sulfatidos y anti-proteoglicanos sulfatados de la invención pueden obtenerse por el método de obtención del hibridoma, descrito por primera vez en Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975) a partir de ratones inmunizados con extractos de glicolipidos obtenidos a partir de fuentes naturales o sintéticos. Las células del bazo de ratones inmunizados se funden con células de mieloma P3.X63Ag8 6.5.3, se cultivan en medio selectivo según lo descrito y se seleccionan los clones productores por detección de inmunoglobulinas en el sobrenadante de cultivo por medio de la técnica de ELISA.

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos con la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones productores se pueden subclonar mediante los procedimientos de dilución limitante y se pueden crecer mediante métodos estándar de crecimiento de cultivo celular (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* en un animal en forma de tumores ascíticos.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, de los fluidos ascíticos o del suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, como por ejemplo, la proteína A-sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos de la invención también se pueden obtener por técnicas de ingeniería genética manipulando adecuadamente los genes de inmunoglobulinas murinas. Por ejemplo, los anticuerpos quimericos de la invención se pueden obtener a partir de ARN obtenido de las células productoras de los anticuerpos monoclonales murinos, por las técnicas convencionales de manipulación de genes, tales como amplificación, clonación, secuenciación y digestión de genes, entre otras, descritas por el arte previo, por ejemplo en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, *et al.* eds., (2003)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, y ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)).

La síntesis de ADNc y amplificación por la PCR (de las siglas en Ingles de la Reacción en Cadena de la Polimerasa) de las regiones variables del anticuerpo se puede realizar a partir del RNA que codifica el anticuerpo murino, se sintetiza cDNA, se amplifican las

regiones variables VK y VH por PCR, esto se puede realizar siguiendo las técnicas convencionales descritas para tales efectos por el arte previo.

Los productos de las PCRs para cada una de las cadenas pesada y ligera respectivamente se clonan en los vectores utilizados para la secuenciación de genes. Los clones resultantes se secuencian usando cualquiera de los métodos descritos para tal efecto, por ejemplo, el método de los dideoxinucleótidos usando T7 ADN Polimerasa según las especificaciones del fabricante.

Los genes de la región variable de las cadenas pesada VH y ligera VK se obtienen por restricciones enzimáticas de las construcciones intermedias y son clonados en los respectivos vectores de expresión siguiendo las técnicas convencionales para la construcción de genes quiméricos. Para tales fines son útiles cualquiera de los vectores descritos para la expresión eficiente de proteínas recombinantes, particularmente de anticuerpos monoclonales.

Para la expresión del anticuerpo quimérico, se pueden usar las células NS0, las cuales son electroporadas con el DNA de las construcciones en los respectivos vectores de expresión que contienen los genes del anticuerpo. Estas células se crecen en medio selectivo. La detección de los clones productores de inmunoglobulina se realiza por la medición en el sobrenadante de los cultivos empleando un ELISA (ensayo de inmunoadsorción enzimática).

20 Selección de los anticuerpos con la especificidad y la función deseadas:

En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la presente invención se pueden detectar por diversas técnicas que para estos fines se describen en el arte previo, por ejemplo, por un ensayo de ELISA (ensayo de inmunoadsorción enzimática).

25 Mediante la técnica de Elisa se puede verificar el reconocimiento de los diferentes clones productores de anticuerpos y se seleccionan aquellos clones que muestran la especificidad deseada.

En ciertas formas de realización de la invención se analiza la actividad biológica de los anticuerpos producidos en la misma. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención se prueban por su actividad de unión al antígeno.

Los ensayos de unión al antígeno que se conocen en la especialidad y pueden ser usados en la presente memoria descriptiva incluyen, entre otros, ensayos de unión competitiva o directa que usan técnicas como ensayos tipo western, radioinmunoensayos, ELISA, inmunoanálisis de doble anticuerpo (tipo "sandwich"), ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A. Los ensayos de unión a antígeno ilustrativos se incluyen más adelante en la sección Ejemplos.

En la presente invención, adicionalmente se pueden identificar aquellos clones que producen anticuerpos con capacidad de reconocer placas de ateroma en cortes de aorta humana, esto se puede realizar utilizando técnicas inmunohistoquímicas convencionales y descritas en el arte previo.

- 5 En otro aspecto se puede medir la capacidad de inducir respuesta anti-heparina en ratones por los anticuerpos de la presente invención. Para esto, diferentes grupos de animales se inmunizan con los anticuerpos de la invención y las muestras de suero de dichos animales se analizan para la presencia de anticuerpos anti-heparina.
- 10 En un aspecto adicional se puede medir el efecto anti-aterosclerótico de los anticuerpos de la presente invención, para esto se puede usar un modelo, de inducción de lesiones ateroscleróticas en conejos con Lipofundín (Takács E, Hársing J, Fűzesi S, Jellinek H . 1986 Arteriosclerosis developing in rabbits after lipofundin administration. Morphol Igazsagugyi Orv Sz. 26:99-105; Noa M & Más R (1992). Ateromixol y lesión
- 15 aterosclerótica en conejos inducida por lipofundin. *Progresos en Ciencias Médicas*, 6: 14-19).

Composición farmacéutica:

En una forma de realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos de la presente invención.

- 20 En una forma de realización, una composición que comprende un anticuerpo comprende, además, un excipiente, el cual es farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención proporciona un juego de reactivos que comprende una composición que comprende uno o más anticuerpos de la invención; y adicionalmente puede comprender una solución tamponada. En una forma de

- 25 realización, la solución tamponada es farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, una composición que comprende un anticuerpo, comprende, además, una molécula transportadora, que, en algunas formas de realización, es farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, un juego de reactivos comprende también instrucciones para la administración o el
- 30 uso de la composición (por ejemplo, el anticuerpo) a un sujeto.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención se preparan para su conservación mediante la mezcla de anticuerpos con el grado deseado de pureza con moléculas transportadoras, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 20th edition (2000)), en forma de soluciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones liofilizadas. Los transportadores, excipientes, o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en todas las dosis y concentraciones empleadas.

Los anticuerpos de la invención están presentes en la composición farmacéutica en combinación en cantidades que sean eficaces para el fin que se pretende.

5 Las formulaciones para administrar *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

En un aspecto, la invención enseña como usar un anticuerpo de la invención en la preparación de un fármaco para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, como una enfermedad cardiovascular.

10 Los anticuerpos de la invención se pueden usar para tratar, inhibir, retrasar la progresión, prevenir/retrasar aparición de lesiones ateroscleróticas, mejorar o prevenir enfermedades, trastornos o procesos asociados a la expresión y/o actividad de una o más moléculas antigénicas.

Según la presente invención una dosis terapéutica de estos anticuerpos estaría en el rango entre 10 microgramos y 10 mg por dosis, preferiblemente entre 15 100 microgramos y 1 mg por dosis. El anticuerpo de la invención se administra(n) por cualquier medio adecuado, incluyendo las vías parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para tratamiento local, la vía intralesional.

20 En otro aspecto, la invención proporciona un juego de reactivos para diagnosticar un trastorno, como una enfermedad cardiovascular.

EJEMPLOS:

Los siguientes ejemplos de realización tienen como objetivo ilustrar la invención pero en ningún caso limitar su alcance.

25 En los siguientes ejemplos todas las enzimas de restricción o modificación utilizadas, así como reactivos y materiales fueron obtenidos de fuentes comerciales a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplo 1. Reconocimiento por el AcM quimérico anti-SO₃ de sulfátidos de cerebro bovino

30 Usando la técnica ELISA, placas PolySorp, Nunc, se recubrieron con 50 μ L/pozo de una solución de sulfátidos de cerebro bovino, a una concentración de 4 μ g/mL en metanol, y se dejó evaporar el solvente incubándolas durante 90 minutos a 37°C. Luego se bloquearon con 200 μ L/pozo de SSTF conteniendo 1% de seroalbúmina bovina (SAB) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se les añadieron 50 35 μ L/pozo de diferentes concentraciones del anticuerpo quimérico anti-SO₃- en SSTF-T y se incubaron durante una hora a 37°C. Luego se lavaron con SSTF y se les adicionó 50 μ L/pozo de un antisuero de chivo anti-cadena gamma humana conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma). Después de incubar las placas durante 1 hora a 37°C, se lavaron las

placas nuevamente y se les adicionó 100 μ L/pozo de la solución sustrato, consistente en 1 mg/mL de *p*-nitrofenilfosfato, en solución tampón dietanolamina, pH 9,8. La absorbancia del producto de reacción se midió luego de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, en un lector de ELISA a 405 nm.

5 Como control negativo se empleó un AcM quimérico modificado a partir de la sustitución de R por S en la región variable de la cadena pesada en la posición 98 del AcM quimérico anti-SO₃⁻.

En la Figura 1 se muestra la reactividad contra los sulfátidos de los diferentes AcMs quiméricos. En el gráfico se observa que el AcM quimérico anti-SO₃⁻ reconoce a los sulfátidos incluso a una concentración tan baja como 0,01 μ g/ml. En cambio, el AcM quimérico modificado en la posición 98 no mostró reactividad alguna.

Ejemplo 2. Ensayo de reconocimiento de heparina

Posteriormente se evaluó si el AcM quimérico anti-SO₃⁻ reconocía moléculas sulfatadas de mayor complejidad que los sulfátidos. Para el estudio se escogió la heparina, molécula altamente sulfatada y usada como modelo de glucosaminoglicanos sulfatados.

Los ensayos para heparina se realizaron basados en una técnica de ELISA para biglicano, desarrollada por Skalen, K. M. y cols (Nature 417: 750-754 , 2002), con algunas modificaciones. Placas de microtitulación Maxisorp (Nunc) se recubrieron con heparina (Sigma) a 10 μ g/mL (100 μ L/pozo) en solución salina tamponante de Hepes (SSTH) (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,4) y se incubaron toda la noche a 4°C. Se lavaron las placas tres veces con SSTH y luego se bloquearon con SSTH conteniendo SAB al 1%, (SSTH-SAB) durante una hora a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con SSTH-Tween 20 al 0,02% (SSTH-T) y se añadieron diluciones seriadas del AcM quimérico anti-SO₃⁻, partiendo de una concentración inicial de 40 μ g/mL en tampón de unión (10 mM Hepes, 20 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, pH 7,4), durante una hora a temperatura ambiente. Como control negativo se empleó el anticuerpo quimérico modificado a partir de la sustitución de R por S en la región variable de la cadena pesada en la posición 98 del AcM quimérico anti-SO₃⁻. Se lavaron las placas dos veces con SSTH-T y seguidamente se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con un antisuero de chivo anti-cadena gamma humana conjugada a fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, EUA) en SSTH-T conteniendo SAB 0,1%. Se realizaron los lavados correspondientes y el revelado se realizó mediante el uso del sustrato *p*-nitrofenilfosfato disuelto en tampón dietanolamina, pH 9,8. La absorbancia a 405 nm del producto se cuantificó en un lector de ELISA (Organon Teknica, Austria).

Como se muestra en la Figura 2, el AcM quimérico anti-SO₃⁻ tuvo una alta reactividad contra la heparina. En cambio, el anticuerpo quimérico modificado utilizado como control de isotipo no mostró reactividad a ninguna de las concentraciones estudiadas.

Ejemplo 3: Reconocimiento de la línea celular J774 por citometría de flujo.

Los monocitos y los macrófagos son importantes en los procesos inflamatorios, como la aterosclerosis (Østerud B, Bjørklid E. *Physiol Rev* 83:1069-1112, 2003). Estas células sintetizan proteoglicanos y se ha demostrado que algunas de las vías de incorporar LDL oxidadas por los macrófagos en el proceso de formación de las células espumosas involucran a los proteoglicanos de la membrana celular (Halvorsen B y cols. *Biochem J.* 331:743-752, 1998). Para determinar si el anticuerpo quimérico anti-SO₃⁻ era capaz de reconocer macrófagos, se realizó un experimento de citometría de flujo utilizando la línea celular de macrófagos murinos J774, la cual se cultivó en medio DMEM-F12 (Gibco BRL, Paisley, Escocia) suplementado con 8% de suero fetal de ternera inactivado (SFT; Gibco), 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomina.

Las células (0.5 x 10⁶ por tubo), se incubaron con 20 µL/tubo de suero inactivado de conejo durante 10 minutos a 37°C para bloquear los receptores Fc-gamma. Posteriormente, se añadieron los AcMs quiméricos anti-SO₃⁻ y el anticuerpo quimérico modificado como control de isotipo, ambos biotinilados a 10 µg/mL, en solución salina tamponada con fosfatos (SSTF), pH 7,4, conteniendo 1% de seroalbúmina bovina, (Sigma, St. Louis, MO) y 0.01% de azida sódica por 30 minutos en baño de hielo. Después de lavar las células, estas se incubaron con un complejo estreptavidina-isotiocianato de fluoresceína (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), a una dilución 1/200, durante 30 minutos en baño de hielo. Las células se lavaron, se resuspendieron en SSTF conteniendo azida sódica al 1% y se analizaron en un citómetro de flujo (Becton- Dickinson, San Jose, CA).

Como se observa en la Figura 3, el anticuerpo quimérico utilizado como control de isotipo, no reconoció a las células de la línea J774. En cambio, el anticuerpo quimérico anti-SO₃⁻ reconoció el 93.7% de las células.

Ejemplo 4: Reconocimiento de placa de ateroma en aorta humana.

La determinación inmunohistoquímica (IHQ) del reconocimiento del anticuerpo quimérico anti-SO₃⁻ se realizó en fragmentos de aorta humana fijados en formalina y embebidos en parafina. Se emplearon cortes de tejido de 4 µm, que se montaron sobre láminas silanizadas y se incubaron a 68°C durante 12 horas. Los cortes de tejidos se desparafinaron en xilol y se hidrataron en etanol a concentraciones decrecientes. Luego se aclararon durante 5 minutos en agua bidestilada y se lavaron en SSTF. El desenmascaramiento antigénico se realizó empleando un baño termostático ajustado a una temperatura de 100 °C. Las láminas inmersas en tampón citrato pH 6.0 se mantuvieron en el baño durante 30 minutos, y luego se hirvieron en tampón citrato pH

6,8 durante 10 minutos, utilizando un horno microondas. Los cortes se dejaron enfriar durante 20 minutos, y posteriormente se lavaron con agua destilada y en SSTF. La peroxidasa endógena se inhibió con una solución de H₂O₂ al 3% durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavó con SSTF, y se aplicaron el anticuerpo quimérico anti-SO₃⁻ y el anticuerpo control de isotipo biotinilados, a una concentración de 50 µg/mL, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó con SSTF y se añadió el complejo estreptavidina-peroxidasa (Anacrom Diagnostics) por igual tiempo y temperatura. Finalmente, las secciones de tejido se incubaron con una mezcla fresca de solución de 3,3'-diaminobencidina (DAB) en 1 mL de tampón sustrato durante 3 a 5 min. El contraste se realizó con hematoxilina de Mayer, se procedió a la deshidratación en alcoholes a concentraciones ascendentes, se clarificó en xilol y finalmente se montaron las láminas en medio permanente Eukitt (Kinder GmbH & CO). La evaluación se realizó utilizando un microscopio de luz blanca (Leica).

La Figura 4 muestra como el anticuerpo quimérico anti-SO₃⁻ reaccionó intensamente con las muestras de las lesiones ateroscleróticas presentes en la aorta, observándose reactividad con macrófagos cargados de grasa o células espumosas y con el núcleo lipídico de las lesiones. (la reactividad se muestra en color marrón intenso). La figura muestra como el anticuerpo utilizado como control de isotipo no reconoció los cortes de aorta humana

20

Ejemplo 5: Capacidad de inducir respuesta anti-heparina en ratones por el anticuerpo quimérico anti-SO₃⁻ .

Se utilizaron 10 ratones BALB/c hembras, que recibieron 50 µg del anticuerpo quimérico anti-SO₃⁻ en 200 µL por vía subcutánea. Las inmunizaciones se realizaron cada 14 días hasta completar un total de cuatro dosis. El anticuerpo quimérico anti-SO₃⁻ se administró en ausencia de adyuvante o proteína transportadora. Se tomaron muestras de suero los días 0 y 49 (siete días después de la cuarta dosis).

La presencia de anticuerpos anti-heparina en el suero de los animales inmunizados se midió utilizando la técnica de ELISA descrita en el Ejemplo 2, utilizando placas MaxiSorp recubiertas con heparina (10µg/mL, 100 µL/pozo). Los sueros de los ratones se ensayaron a una dilución 1/100 en tampón de unión, 100 µL/pozo. Como anticuerpo secundario se utilizó un antisuero de chivo anti-IgG e IgM de ratón conjugado a fosfatasa alcalina (Jackson).

La Figura 5 muestra los resultados obtenidos al ensayar los sueros de los ratones tomados los días 0 y 49. No se detectó presencia de anticuerpos anti-heparina en los sueros preinmunes (día 0) de ninguno de los animales. En cambio, se detectó la presencia de dichos anticuerpos séricos luego de que los ratones se inmunizaron con el anticuerpo quimérico anti-SO₃⁻. Este resultado indica que el anticuerpo quimérico anti-

SO₃⁻ no solo reconoce fuertemente la heparina, sino que tiene la capacidad sorprendente de inducir una respuesta contra esta molécula (efecto vacuna).

Ejemplo 6: Efecto anti-aterosclerótico del anticuerpo quimérico anti-SO₃⁻ .

- 5 Para evaluar si el anticuerpo quimérico anti-SO₃⁻ era capaz de producir un efecto biológico *in vivo*, se utilizó un modelo, previamente descrito, de inducción de lesiones ateroscleróticas en conejos con Lipofundín (Takács E y cols. *Morphol Igazsagugyi Orv Sz.* 26:99-105, 1998; Noa M & Más R. *Progresos en Ciencias Médicas*, 6: 14-19, 1992).
- 10 Se utilizaron 15 conejos Nueva Zelandia que se dividieron en tres grupos de cinco conejos cada uno. El grupo 1 no recibió ningún tratamiento (control negativo). El grupo 2 recibió diariamente, por ocho días, 2 mL de Lipofundín por kg de peso (Braun), por vía intravenosa. Al grupo 3 se le administró tres dosis de 100 µg del anticuerpo quimérico anti-SO₃⁻ en SSTF por vía subcutánea a intervalos de siete días, y el día de la última
- 15 inmunización se inició la administración diaria de Lipofundín con el mismo esquema que se utilizó en los animales del grupo 2. Todos los conejos se sacrificaron bajo anestesia un día después de recibir la última dosis de Lipofundín y los animales controles negativos del grupo 1 se sacrificaron también ese día. Se obtuvieron las aortas de los animales y se realizó el estudio de las mismas por anatomía patológica para determinar
- 20 la presencia de lesiones ateroscleróticas macroscópicas y microscópicas. En las aortas de los conejos del grupo 1 que no recibieron ningún tratamiento no se observaron lesiones macroscópicas. En todas las aortas provenientes de los conejos del grupo 2 que recibieron durante ocho días 2 mL de Lipofundín por kg de peso se observaron lesiones macroscópicas. En las aortas de los conejos que recibieron
- 25 previamente tres dosis del anticuerpo quimérico anti-SO₃⁻ y luego se les administró el Lipofundín, no se observaron lesiones macroscópicas. Para el estudio de lesiones microscópicas, fragmentos de las aortas se fijaron en formalina y se embebieron en parafina. Se emplearon cortes de tejido de 4 µm, que se montaron sobre láminas silanizadas y la tinción se realizó con hematoxilina-eosina. La
- 30 evaluación se realizó utilizando un microscopio de luz blanca (Leica). Al evaluar los cortes de tejido de aorta de los conejos que no recibieron ningún tratamiento, todos mostraban la estructura normal de las arterias, sin presentar alteraciones, como se muestra en la Figura 6.
- En los cortes de aorta de todos los conejos del grupo que recibió el lipofundín se
- 35 observaron las lesiones características: presencia de engrosamiento de la pared arterial hacia la íntima, con depósitos de material extracelular entre las fibras musculares, elásticas y colágenas, así como distorsión de la arquitectura tisular. En cambio, en las muestras de tres de los conejos que recibieron tres dosis del anticuerpo quimérico anti-SO₃⁻ y luego se les administró el Lipofundín, no se observaron lesiones microscópicas.

En las muestras de los restantes dos conejos se observaron algunas alteraciones tisulares dadas por discreto engrosamiento en algunas zonas de la pared arterial, con algún depósito de material extracelular entre las fibras. No se observaron engrosamientos en la íntima.

5

Breve descripción de las figuras:

Figura 1. Reconocimiento de sulfátidos por el AcM quimérico anti-SO₃⁻.

10 Diferentes concentraciones del AcM quimérico anti-SO₃⁻ y del AcM quimérico control de isotipo fueron añadidas a placas de ELISA recubiertas con los sulfátidos a una concentración de 4 µg/mL en metanol. La reactividad se detectó con un antisuero de chivo anti-cadena gamma humana conjugada a fosfatasa alcalina. La absorbancia a 405 nm del producto se cuantificó en un lector de ELISA. (*p<0.05, Prueba de U de Mann-Whitney)

15

Figura 2. Reconocimiento de heparina por el AcM quimérico anti-SO₃⁻.

20 Diferentes concentraciones del AcM quimérico anti-SO₃⁻ y del AcM quimérico control de isotipo fueron añadidas a placas de ELISA recubiertas con heparina a una concentración de 10 µg/mL en SSTH. La reactividad se detectó con un antisuero de chivo anti-cadena gamma humana conjugada a fosfatasa alcalina. La absorbancia a 405 nm del producto se cuantificó en un lector de ELISA. (*p<0.05, Prueba de U de Mann-Whitney)

25

Figura 3. Reconocimiento de la línea celular J774 por el AcM quimérico anti-SO₃⁻.

Las células se incubaron con 10 µg/mL de los anticuerpos biotinilados. La reacción se reveló con un antisuero de chivo anti-IgG humana conjugado a FITC y se analizó por citometría de flujo.

30

Figura 4. Reconocimiento de placas de ateroma humanos por el AcM quimérico anti-SO₃⁻.

35 Fragmentos de aorta humana fijados en formalina y embebidos en parafina (4 µm) se incubaron con el anticuerpo quimérico anti-SO₃⁻ y el anticuerpo control de isotipo biotinilados. La reacción se reveló con un complejo estreptavidina-peroxidasa. Los epítomos reconocidos por el AcM anti-SO₃⁻ se indican por la coloración marrón intensa y los núcleos de las células se contratiñeron con hematoxilina. (400 X).

Figura 5: Respuesta de anticuerpos contra heparina inducidos por la inmunización con el AcM quimérico anti-SO₃⁻.

Muestras de sueros obtenidos de ratones BALB/c los días 0 y 49 del inicio de las inmunizaciones con el AcM quimérico anti-SO₃⁻ se ensayaron por ELISA. Cada símbolo es el valor obtenido del suero de un ratón. pl y hl: preinmune e hiperinmune, respectivamente (*p<0.05, prueba U de Mann-Whitney).

Figura 6: Efecto del tratamiento con el AcM quimérico anti-SO₃⁻ en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas en el modelo de Lipofundin en conejos.

10 Cortes histológicos de las aortas torácicas de conejos representativos de los diferentes grupos de estudio. (A) Grupo 1, animal no tratado, donde se aprecia la estructura normal de las arterias, sin presentar alteraciones. (B) Grupo 2, animal tratado con Lipofundín, donde se observa la presencia de engrosamiento de la pared arterial hacia la íntima, con depósitos de material extracelular entre las fibras musculares, elásticas y
15 colágenas, así como distorsión de la arquitectura tisular. (C y D) Grupo 3, animales inmunizados con el AcM quimérico anti-SO₃⁻ y a los que luego se les administró Lipofundín; no se observan lesiones tisulares evidentes ni engrosamientos en la íntima.
Tinción hematoxilina-eosina 180X

20

25

ANTICUERPOS QUE RECONOCEN SULFATIDOS Y PROTEOGLICANOS SULFATADOS Y SU USO.

REIVINDICACIONES

5

1. Un anticuerpo monoclonal para el diagnostico y tratamiento de enfermedades cardiovasculares caracterizado porque el anticuerpo reconoce sulfatidos y proteoglicanos sulfatados

10

2. El anticuerpo monoclonal según reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia de las regiones determinantes de la complementariedad de la región variable de las cadenas pesada y ligera es la que se muestra a continuación:

Cadena Pesada

HCDR1 SEQ ID: 1 RYSVH

15

HCDR2 SEQ ID: 2 MIWGGGSTDYNSALKS

HCDR3 SEQ ID: 3 SGVRRGRAQAWFAY

Cadena Ligera

LCDR1 SEQ ID: 4 KASQDVSTAVA

LCDR2 SEQ ID: 5 SASRYT

20

LCDR3 SEQ ID: 6 QQHYSTPWT

3. El anticuerpo monoclonal según reivindicación 2, caracterizado porque la secuencia de las regiones de marco de la región variable de las cadenas pesada y ligera es la que se muestra a continuación:

25

Cadena Pesada

HFR1 SEQ ID: 7 QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSL

HFR2 SEQ ID: 8 WVRQPPGKGLEWLG

HFR3 SEQ ID: 9 RLSISKDNSKSKVFLKMNSLQTDDTAMYCAR

HFR4 SEQ ID: 10 WGQGTLVTVSA

30

Cadena Ligera

LFR1 SEQ ID: 11 DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC

LFR2 SEQ ID: 12 WYQQKPGQSPKLLIY

LFR3 SEQ ID: 13 GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYC

LFR4 SEQ ID: 14 FGGGTKLELK

35

4. El anticuerpo monoclonal según reivindicación 3, caracterizado porque la secuencia de las regiones constantes son IgG1 humana para cadena pesada y Ck humana para la cadena ligera.

5. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende uno de los anticuerpos de las reivindicaciones 1 a 4 o los fragmentos de los mismos.
- 5 6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, caracterizada porque adicionalmente comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, caracterizada porque además comprende un adyuvante.
- 10 8. Un juego de reactivos útil en el diagnóstico de lesiones ateroscleróticas caracterizado porque comprende uno de los anticuerpos de las reivindicaciones 1 a 4 o sus fragmentos.
- 15 9. El uso de un anticuerpo monoclonal que reconoce sulfatidos y proteoglicanos sulfatados para la manufactura de un medicamento útil para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades cardiovasculares.
- 20 10. Uso del anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 4 para la manufactura de un medicamento útil para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

25

30

35

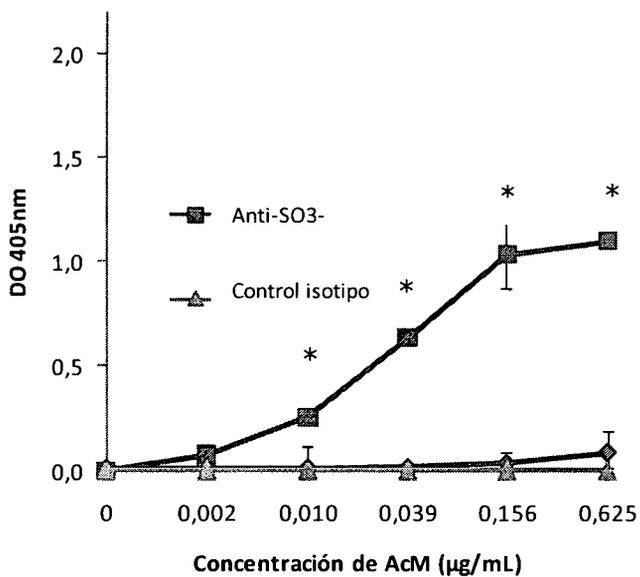


Figura 1

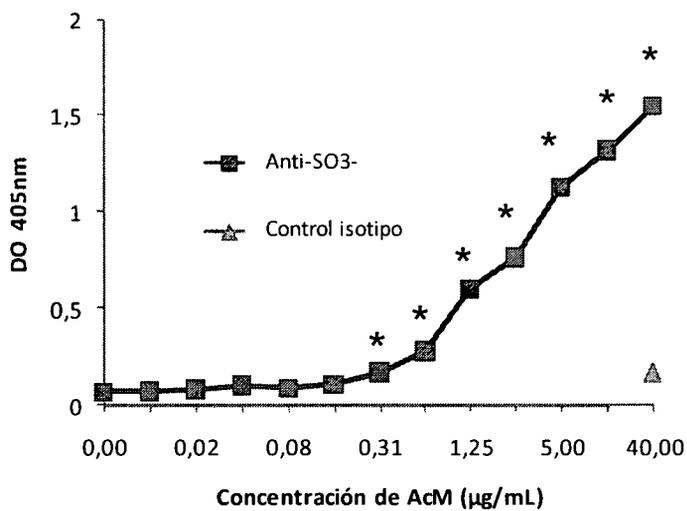


Figura 2.

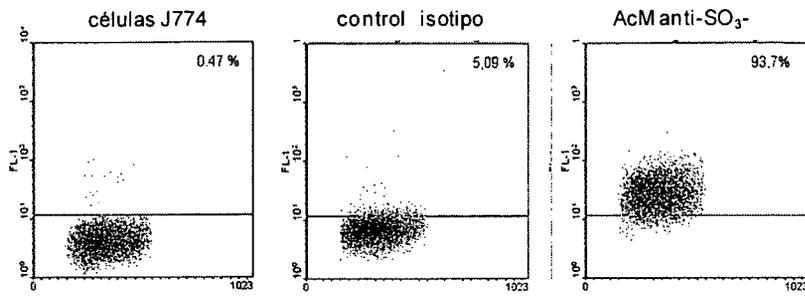


Figura 3

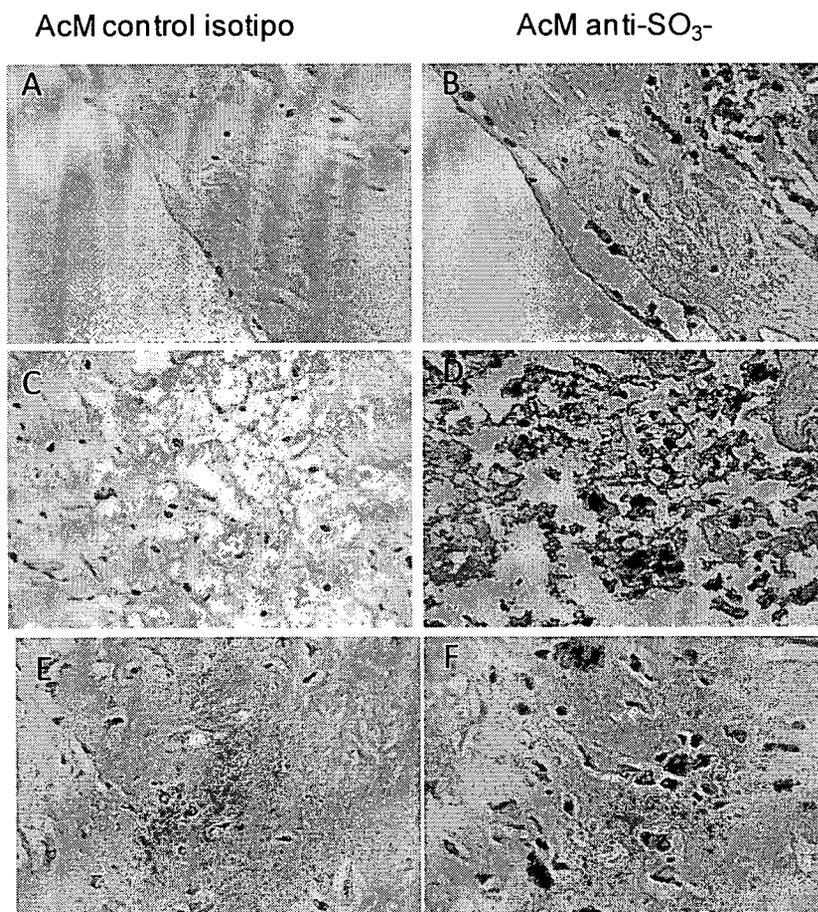


Figura 4.

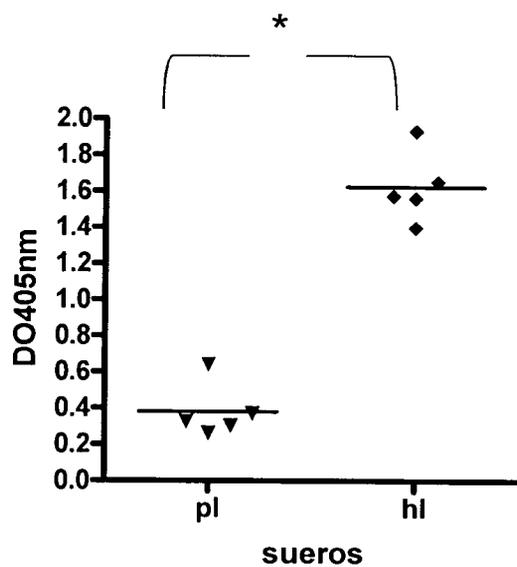


Figura 5:

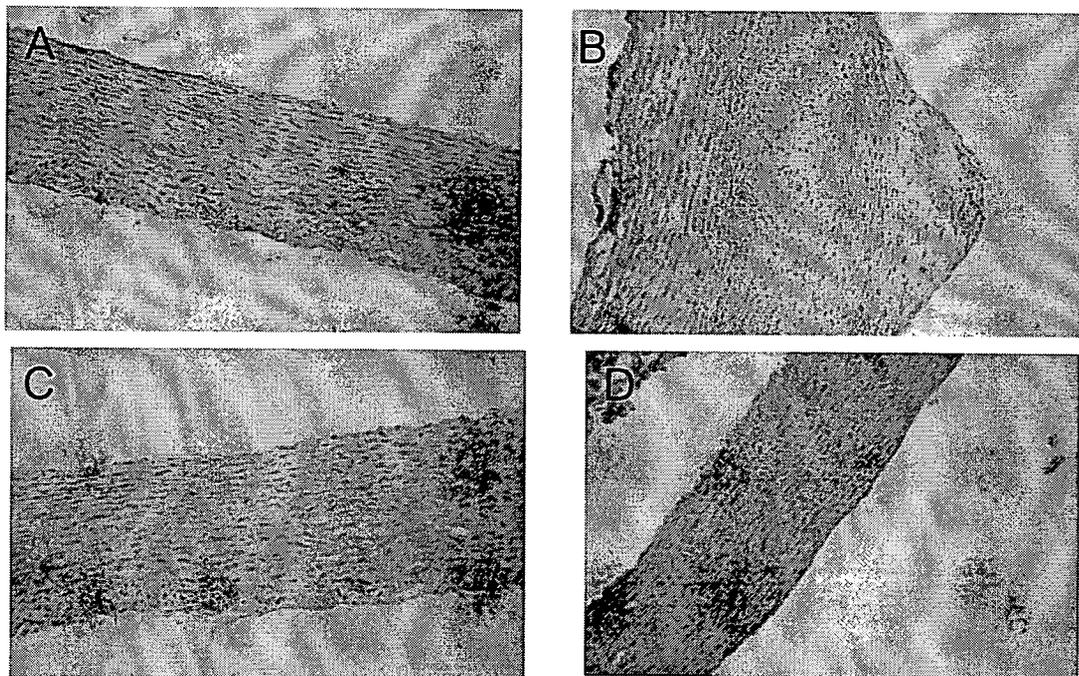


Figura 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CU2010/000002

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/00 C07K16/18 A61P9/10
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAKASHIMA YUTAKA ET AL: "Early atherosclerosis in humans: role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans." CARDIOVASCULAR RESEARCH 1 JUL 2008 LNKD-PUBMED:18430750, vol. 79, no. 1, 1 July 2008 (2008-07-01), pages 14-23, XP009137187 ISSN: 0008-6363	1,5,6,8, 9
Y	abstract; pg. 19-20; fig. 5 ----- -/--	2-4,7,10

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 August 2010

Date of mailing of the international search report

19/08/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bernhardt, Wiebke

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/CU2010/000002

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RADHAKRISHNAMURTHY B ET AL: "A MONOCLONAL ANTIBODY THAT RECOGNIZES HYALURONIC ACID BINDING REGION OF AORTA PROTEOGLYCAN" ATHEROSCLEROSIS, ELSEVIER IRELAND LTD, IE LNKD- DOI:10.1016/0021-9150(93)90127-G, vol. 98, no. 2, 25 January 1993 (1993-01-25), pages 179-192, XP000577781 ISSN: 0021-9150	1,5,6,8,9
Y	abstract; figures	2-4,7
X	LARK M W ET AL: "Arterial chondroitin sulfate proteoglycan: localization with a monoclonal antibody." THE JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY : OFFICIAL JOURNAL OF THE HISTOCHEMISTRY SOCIETY OCT 1988 LNKD- PUBMED:3047228, vol. 36, no. 10, October 1988 (1988-10), pages 1211-1221, XP009137185 ISSN: 0022-1554	1,5,6,8,9
Y	abstract; figures	2-4,7
X	SOBUE M ET AL: "PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODY TO DERMATAN SULFATE PROTEOGLYCAN" JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY, vol. 36, no. 5, 1988, pages 479-486, XP009137175 ISSN: 0022-1554	1,5,6,8,9
Y	abstract; fig. 2B	2-4,7
Y	EP 1 411 064 A2 (CENTRO IMMUNOLOGIA MOLECULAR [CU]; MATEO DE ACOSTA DEL RIO CHRIST [CU]) 21 April 2004 (2004-04-21) whole document; in particular page 4	2-4,7,10
Y	LOPEZ-REQUENA A ET AL: "Chimeric anti-N-glycolyl-ganglioside and its anti-idiotypic MAbs: Immunodominance of their variable regions" HYBRIDOMA AND HYBRIDOMICS 200308 US, vol. 22, no. 4, August 2003 (2003-08), pages 235-243, XP009137195 ISSN: 1536-8599 the whole document	2-4,7,10
Y	WO 2008/046724 A1 (PF MEDICAMENT [FR]; GOETSCH LILIANE [FR]; JOUHANNEAUD ALEXANDRA [FR]) 24 April 2008 (2008-04-24) drawing 9/10, Seq ID No. 31 and 32	3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/CU2010/000002

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
EP 1411064	A2	21-04-2004	AR 033122 A1 03-12-2003			
			AR 033123 A1 03-12-2003			
			AT 406386 T 15-09-2008			
			AT 378356 T 15-11-2007			
			AU 2002308347 B2 14-09-2006			
			BG 108227 A 30-04-2005			
			BG 108228 A 30-04-2005			
			BR 0208675 A 03-08-2004			
			BR 0208676 A 08-04-2008			
			CA 2441845 A1 17-10-2002			
			CA 2443372 A1 17-10-2002			
			CN 1507452 A 23-06-2004			
			CN 1535282 A 06-10-2004			
			CN 101054417 A 17-10-2007			
			WO 02081661 A2 17-10-2002			
			WO 02081496 A2 17-10-2002			
			CZ 20032641 A3 14-07-2004			
			CZ 20032668 A3 14-07-2004			
			DE 60223547 T2 18-09-2008			
			DK 1384726 T3 15-12-2008			
			DK 1411064 T3 25-03-2008			
			EC SP034787 A 28-01-2004			
			EC SP034788 A 28-01-2004			
			EP 1384726 A2 28-01-2004			
			EP 1798243 A2 20-06-2007			
			ES 2312610 T3 01-03-2009			
			ES 2296986 T3 01-05-2008			
			HK 1066818 A1 07-12-2007			
			HK 1070080 A1 04-07-2008			
			HR 20030805 A2 31-08-2005			
			HR 20030806 A2 31-08-2005			
			HU 0401355 A2 28-10-2004			
			IL 158246 A 31-05-2010			
			IS 6964 A 23-09-2003			
			IS 6965 A 23-09-2003			
			JP 2004528033 T 16-09-2004			
			JP 4366080 B2 18-11-2009			
			JP 2004525953 T 26-08-2004			
			KR 20080080680 A 04-09-2008			
			MX PA03008738 A 11-12-2003			
			MX PA03008739 A 11-12-2003			
			NO 20034436 A 02-12-2003			
			NO 20034437 A 02-12-2003			
			NZ 528598 A 24-03-2005			
			NZ 528599 A 24-03-2005			
			PT 1384726 E 05-12-2008			
			EP 1411064	A2		PT 1411064 E 12-02-2008
						SG 161737 A1 29-06-2010
						SI 1411064 T1 30-04-2008
			WO 2008046724	A1	24-04-2008	AR 063061 A1 23-12-2008
						AU 2007312437 A1 24-04-2008
						CA 2663561 A1 24-04-2008
						CN 101516394 A 26-08-2009
						EP 2081592 A1 29-07-2009
						FR 2906533 A1 04-04-2008
JP 2010504743 T 18-02-2010						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/CU2010/000002

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		KR 20090057469 A	05-06-2009
		US 2010146650 A1	10-06-2010
		ZA 200902697 A	28-04-2010

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/CU2010/000002

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

INV. C07K16/00 C07K16/18 A61P9/10

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) **EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, Sequence Search, WPI Data**

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	<p>NAKASHIMA YUTAKA ET AL: "Early atherosclerosis in humans: role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans." CARDIOVASCULAR RESEARCH 1 JUL 2008 LNKD-PUBMED:18430750, vol. 79, no. 1, 1 Julio 2008 (2008-07-01), Páginas 14-23, XP009137187 ISSN: 0008-6363</p>	<p>1,5,6,8,9</p>
Y	<p>Resumen; pg. 19-20; fig. 5 <p style="text-align: center;">----- -/--</p> </p>	<p>2-4,7,10</p>

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>“&” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional <p style="text-align: center;">11 Agosto 2010</p>	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional <p style="text-align: center;">19/08/2010</p>
--	---

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Funcionario autorizado <p style="text-align: center;">Bernhardt, Wiebke</p>
N° de fax	N° de teléfono

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Abril, Octubre Agosto

Solicitud internacional N°

PCT/CU2010/000002

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	RADHAKRISHNAMURTHY B ET AL: "A MONOCLONAL ANTIBODY THAT RECOGNIZES HYALURONIC ACID BINDING REGION OF AORTA PROTEOGLYCANS" ATHEROSCLEROSIS, ELSEVIER IRELAND LTD, IE LNKD- DOI:10.1016/0021-9150(93)90127-G, vol. 98, no. 2, 25 Enero 1993 (1993-01-25), Páginas 179-192, XP000577781 ISSN: 0021-9150	1,5,6,8,9
Y	Resumen ; Figuras	2-4,7
X	LARK M W ET AL: "Arterial chondroitin sulfate proteoglycan: localization with a monoclonal antibody." THE JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY : OFFICIAL JOURNAL OF THE HISTOCHEMISTRY SOCIETY OCT 1988 LNKD- PUBMED:3047228, vol. 36, no. 10, Octubre 1988 (1988-10), Páginas 1211-1221, XP009137185 ISSN: 0022-1554	1,5,6,8,9
Y	Resumen ; Figuras	2-4,7
X	SOBUE M ET AL: "PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODY TO DERMATAN SULFATE PROTEOGLYCAN" JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY, vol. 36, no. 5, 1988, Páginas 479-486, XP009137175 ISSN: 0022-1554	1,5,6,8,9
Y	Resumen ; fig. 2B	2-4,7
Y	EP 1 411 064 A2 (CENTRO INMUNOLOGIA MOLECULAR [CU]; MATEO DE ACOSTA DEL RIO CHRIST [CU]) 21 Abril 2004 (2004-04-21) Todo el documento ; en particular Página 4	2-4,7,10
Y	LOPEZ-REQUENA A ET AL: "Chimeric anti-N-glycolyl-ganglioside and its anti-idiotypic MAbs: Immunodominance of their variable regions" HYBRIDOMA AND HYBRIDOMICS 200308 US, vol. 22, no. 4, Agosto 2003 (2003-08), Páginas 235-243, XP009137195 ISSN: 1536-8599 Todo el documento	2-4,7,10
	WO 2008/046724 A1 (PF MEDICAMENT [FR]; GOETSCH LILIANE [FR]; JOUHANNEAUD ALEXANDRA [FR]) 24 Abril 2008 (2008-04-24) Figura 9/10, Seq ID No. 31 y 32	3

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/CU2010/000002

EP 1411064	A2	21-04-2004	AR	033122	A1	03-12-2003
			AR	033123	A1	03-12-2003
			AT	406386	T	15-09-2008
			AT	378356	T	15-11-2007
			AU	2002308347	B2	14-09-2006
			BG	108227	A	30-04-2005
			BG	108228	A	30-04-2005
			BR	0208675	A	03-08-2004
			BR	0208676	A	08-04-2008
			CA	2441845	A1	17-10-2002
			CA	2443372	A1	17-10-2002
			CN	1507452	A	23-06-2004
			CN	1535282	A	06-10-2004
			CN	101054417	A	17-10-2007
			WO	02081661	A2	17-10-2002
			WO	02081496	A2	17-10-2002
			CZ	20032641	A3	14-07-2004
			CZ	20032668	A3	14-07-2004
			DE	60223547	T2	18-09-2008
			DK	1384726	T3	15-12-2008
			DK	1411064	T3	25-03-2008
			EC	SP034787	A	28-01-2004
			EC	SP034788	A	28-01-2004
			EP	1384726	A2	28-01-2004
			EP	1798243	A2	20-06-2007
			ES	2312610	T3	01-03-2009
			ES	2296986	T3	01-05-2008
			HK	1066818	A1	07-12-2007
			HK	1070080	A1	04-07-2008
			HR	20030805	A2	31-08-2005
			HR	20030806	A2	31-08-2005
			HU	0401355	A2	28-10-2004
			IL	158246	A	31-05-2010
			IS	6964	A	23-09-2003
			IS	6965	A	23-09-2003
			JP	2004528033	T	16-09-2004
			JP	4366080	B2	18-11-2009
			JP	2004525953	T	26-08-2004
			KR	20080080680	A	04-09-2008
			MX	PA03008738	A	11-12-2003
			MX	PA03008739	A	11-12-2003
			NO	20034436	A	02-12-2003
			NO	20034437	A	02-12-2003
			NZ	528598	A	24-03-2005
			NZ	528599	A	24-03-2005
			PT	1384726	E	05-12-2008
EP 1411064	A2		PT	1411064	E	12-02-2008
			SG	161737	A1	29-06-2010
			SI	1411064	T1	30-04-2008
WO 2008046724	A1	24-04-2008	AR	063061	A1	23-12-2008
			AU	2007312437	A1	24-04-2008
			CA	2663561	A1	24-04-2008
			CN	101516394	A	26-08-2009
			EP	2081592	A1	29-07-2009
			FR	2906533	A1	04-04-2008
			JP	2010504743	T	18-02-2010

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/CU2010/000002

KR	20090057469 A	05-06-2009
US	2010146650 A1	10-06-2010
ZA	200902697 A	28-04-2010
