



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 329 010**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01922629 .9**

96 Fecha de presentación : **23.03.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1265929**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.12.2002**

54 Título: **Inhibidores anti-C2/C2a de la activación del complemento.**

30 Prioridad: **23.03.2000 US 191429 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.11.2009

73 Titular/es: **Genentech, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080, US

72 Inventor/es: **Fung, Michael;**
Sun, Cecily y
Sun, William, N.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 329 010 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores anti-C2/C2a de la activación del complemento.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a moléculas inhibidoras específicas para C2 del complemento y su fragmento de activación C2a, el uso de tales moléculas inhibidoras para bloquear la activación del complemento vía la ruta clásica y la ruta de lectina, tratamiento de enfermedades asociadas a la activación excesiva del complemento, y la determinación diagnóstica de la cantidad de C2a presente en una muestra biológica.

Antecedentes de la invención

El sistema de complemento es parte del sistema inmunitario innato y consiste en muchos componentes que actúan en forma de cascada. Este sistema juega un papel central en la evacuación de complejos inmunitarios y en la respuesta inmune a agentes infecciosos, agentes extraños, células infectadas con virus y células tumorales. Sin embargo, el complemento también está implicado en inflamación patológica y en enfermedades autoinmunes. Por consiguiente, la inhibición de la activación excesiva o incontrolada de la cascada del complemento puede proporcionar un beneficio clínico a pacientes con tales enfermedades y condiciones.

El sistema de complemento puede ser activado de tres maneras, cada una de ellas por una de las dos rutas de activación principales, denominadas las rutas clásica y la alternativa (V.M. Holers, en *Clinical Immunology: Principles and Practice*, ed. R.R. Rich, Mosby Press, 1996, 363-391), o por una tercera ruta, la ruta de lectina activada por lectina de unión a manano (MBL) (M. Matsushita, *Microbiol. Immunol.*, 1996, 40:887-893; M. Matsushita *et al.*, *Immunobiol.*, 1998, 199:340-347; T. Vorup-Jensen *et al.*, *Immunobiol.*, 1998, 199:348-357).

La ruta clásica es una cascada dependiente de calcio/magnesio, que normalmente está activada por la formación de complejos antígeno-anticuerpo. C1, el primer complejo enzimático de la cascada, es un complejo pentamolecular que consiste en C1q, 2 moléculas C1r, y 2 moléculas C1s. Este complejo se une a un complejo antígeno-anticuerpo a través del dominio C1q para iniciar la cascada. Una vez activado, C1s escinde a C4 dando como resultado C4b, que a su vez une C2. C2 es escindido por C1s, dando como resultado la forma activada, C2a, unida a C4b y que forma la ruta clásica de la convertasa C3.

La ruta alternativa es una cascada dependiente de magnesio y es independiente de anticuerpos. Esta ruta está activada por una variedad de sustancias diversas que incluyen, por ejemplo, polisacáridos de la pared celular de levaduras y bacterias, y ciertos materiales de biopolímeros. Cuando la proteína C3 se une a ciertas superficies susceptibles, se escinde para rendir C3b, iniciando así, un bucle de amplificación.

La ruta de lectina implica activación del complemento por MBL a través de dos proteasas de serina séricas denominadas MASP-1 y MASP-2 (en oposición a C1r y C1s en la ruta clásica del complemento). Como la ruta clásica del complemento, la ruta de lectina del complemento también necesita C4 y C2 para la activación de C3 y otros componentes terminales adicionales aguas abajo en la cascada (C. Suankratay *et al.*, *Immunol.*, 1998, 160:3006-3016; Y. Zhang *et al.*, *Immunopharmacol.*, 1999, 42:81-90; Y. Zhang *et al.*, *Immunol.*, 1999, 97:686-692; C. Suankratay *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.*, 1999, 117:442-448). También se necesita la amplificación de la ruta alternativa para la hemólisis en el suero humano de la ruta de lectina (C. Suankratay *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 160:3006-3013; C. Suankratay *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.*, 1998, 113:353-359). En pocas palabras, la unión de MBL dependiente de Ca⁺⁺ a una superficie revestida con manano dispara la activación de C3 seguida de la activación de C4 y C2, y la activación aguas debajo de C3 y luego, los componentes terminales del complemento necesitan la ruta alternativa del componente para la amplificación.

La activación de la ruta del complemento genera fragmento biológicamente activos de proteínas del complemento, por ejemplo, anafilotoxinas de C3a, C4a y C5a el complejo de ataque a membrana sC5b-9 (MAC), que media las actividades inflamatorias que implican la quimiotaxis de leucocitos, la activación de macrófagos, neutrófilos, plaquetas, mastocitos y células endoteliales, la permeabilidad celular, la histólisis y el daño tisular (R. Schindler *et al.*, *Blood*, 1990, 76:1631-1638; T. Wiedmer, *Blood*, 1991, 78:2880-2886; M.P. Fletcher *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 1993, 265:H1750-1761).

C2 es una proteína plasmática de una sola cadena de peso molecular de 102 kD, que es específica de las rutas clásicas y de lectina del complemento. C4d unido a membrana expresa un sitio de unión que, en presencia de Mg⁺⁺, une la proenzima C2 cerca de su extremo amino terminal y la presenta para la escisión por C1s (para la ruta clásica del complemento) o por MASP-2 (para la ruta de lectina del complemento) para rendir un fragmento de 30 kD en el extremo amino terminal, C2b, y un fragmento de 70 kD en el extremo carboxilo terminal, C2a (S. Nagasawa *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1977, 74:2998-3003). El fragmento C2b puede ser liberado o permanecer débilmente unido a C4b. El fragmento C2a permanece unido a C4b para formar el complejo C4b2a, los componentes catalíticos de las convertasas C3 y C5 de las rutas del complemento clásicas y de lectina. La actividad enzimática en este complejo reside totalmente en C2a, C4b actúa para atar a C2a a la superficie activadora.

Los anticuerpos monoclonales (MAbs) para C2 humana y sus fragmentos C2a y C2b se hicieron inmunizando ratones con C2 humano purificado (E.I. Stenbaek *et al.*, Mol. Immunol., 1986, 23:879-886; T.J. Oglesby *et al.*, J. immunol., 1988, 141:926-932). Los nuevos MAbs anti-C2a de la presente invención se hicieron inmunizando ratones con un fragmento de C2a humana purificado y se mostró tener actividad inhibidora contra la activación de la ruta clásica del complemento (véase más abajo). Estos MAbs anti-C2a son diferentes del MAb anti-C2b conocido (véase T. J. Oglesby *et al.*, J. Immunol., 1988, 141:926-932) debido a que se unen a distintos segmentos de C2 e inhiben la ruta clásica del complemento al interferir sin la interacción entre C2 y C4 (T.J. Oglesby *et al.*, J. Immunol., 1998, 141:926-932). Debido a esta inhibición, los MAbs anti-C2a de la presente invención con los primeros MAb que se demuestra son eficaces inhibiendo la ruta clásica del complemento.

Marcar selectivamente C2a y/o la porción C2a de C2 para la inhibición completa de las rutas del complemento clásica y de lectina, tiene varias ventajas, que incluyen, por ejemplo: (1) C2 y C2a son específicas para las rutas del complemento clásica y de lectina, y por ello, la inhibición de C2 y/o C2a podría dar lugar a la inhibición completa y selectiva de estas dos rutas del complemento sin afectar la ruta alternativa del complemento; (2) la concentración de C2 en sangre humana es una de las más bajas (ca. 20 µg/ml) entre otros componentes solubles del complemento, por ello, los inhibidores de C2 o C2a pueden tener una ventaja de dosis única; y (3) ya que C2a es la subunidad catalítica de las convertasas C3 y C5, la inhibición de C2 o de la porción C2a de C2 puede bloquear la activación de C3 y C5.

La regulación a la baja de la activación del complemento se ha demostrado que es eficaz para tratar varias indicaciones de enfermedad en modelos animales y en estudios *ex vivo*, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis (Y. Wang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 1996, 93:8563-8568) artritis reumatoide (Y. Wang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 1995, 92:8955-8959), en la prevención de la inflamación asociada a circunvalación cardiopulmonar y hemodiálisis (C.S. Rinder *et al.*, J. Clin. Invest., 1995, 96:1564-1572; J.C.K. Fitch *et al.*, Circulation, 1999, 100:2499-2506; H.L. Lazar *et al.*, Circulation, 1999, 100:1438-1442), rechazo hiperagudo en transplante de órganos (T.J. Kroshus *et al.*, Transplantation, 1995, 60:1194-1202), infarto de miocardio (J. W. Homeister *et al.*, J. Immunol., 1993, 150:1055-1064; H.F. Weisman *et al.*, Science, 1990, 249:146-151), daño por reperfusión (E.A. Amsterdam *et al.*, Am. J. Physiol., 1995, 268:H448-H457), y síndrome de angustia respiratoria en adultos (R. Rabinovici *et al.*, J. Immunol., 1992, 149:1744-1750). Además, también están asociadas estrechamente a la activación del complemento otras condiciones inflamatorias y enfermedades autoinmunes/complejo inmunitario (V.M. Holers, *Ibid.*, B.P. Morgan, Eur. J. Clin. Invest. 1994, 24:219-228), que incluyen el daño térmico, asma severa, shock anafiláctico, inflamación del intestino, urticaria, angioedema, vasculitis, esclerosis múltiple, psoriasis, dermatomiositis, miastenia gravis, glomerulonefritis membranoproliferativa, y síndrome de Sjögren.

Anderson *et al.*, Biochem. Soc. Trans., 1987, 15(4):660-1 describen un anticuerpo monoclonal contra el componente C2 humano del complemento.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a moléculas inhibidoras que tienen una región de unión específica para C2a o la porción C2a de C2. La molécula inhibidora es un anticuerpo o un fragmento del mismo. Los fragmentos de anticuerpo pueden ser Fab, F(ab')₂, Fv o Fv de cadena sencilla. La molécula inhibidora puede estar en forma de una composición farmacéutica.

Una realización de la presente invención incluye una molécula inhibidora que comprende un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico, DesinmunizadoTM, humanizado o humano. Específicamente, el anticuerpo monoclonal puede ser el anticuerpo monoclonal denominado 175-62.

Otra realización de la invención es un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 175-62.

Otra realización de la invención incluye anticuerpos monoclonales o fragmentos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo 175-62. Estos anticuerpos pueden incluir Fab, F(ab')₂, Fv o Fv de cadena sencilla, y puede ser un anticuerpo quimérico, DesinmunizadoTM, humanizado o humano. Además, la presente invención incluye líneas celulares que producen el anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo que se une al mismo epítipo que al anticuerpo 175-62.

La presente invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de los mismos que inhiben la activación del complemento al inhibir las rutas del complemento clásica y de lectina. Las moléculas preferidas de la presente invención inhiben la activación del complemento en una relación molar de molécula inhibidora a C2 de 1:2.

Las moléculas inhibidoras de la presente invención pueden ser usadas para tratar una enfermedad o condición que está mediada por la activación excesiva o incontrolada del sistema del complemento al administrar, *in vivo* o *ex vivo*, una molécula inhibidora que se une específicamente a C2a o la porción C2a de C2.

Un ejemplo de un Mab, denominado 175-62, que se une a C2a y bloquea su capacidad de activar al complemento se generó tal como se describe más abajo. El hibridoma que produce este anticuerpo se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Blvd., Manassas, VA20110-2209, con el Número de Acceso PTA-1553, el 22 de Marzo de 2000.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la unión de MABs anti-C2a, Mab anti-C5 (137-76), y Mab anti-factor D (166-32) a C2a humano purificado en un ensayo ELISA. El eje Y representa la reactividad de los MABs con C2a expresada como densidad óptica (DO) a 450 nm y el eje X representa la concentración de los MABs. El MAB 175-62 muestra la reactividad más fuerte con C2a.

La Figura 2 muestra la inhibición de la hemólisis de la ruta clásica de glóbulos rojos de pollos sensibilizados (RBCs) por MABs anti-C2a en presencia de suero humano al 3%. Los controles fueron el Mab anti-factor D (166-32) y el Mab anti-C5 (137-76), los cuales inhiben de forma específica la ruta alternativa del complemento. El eje Y representa el % de inhibición de hemólisis, tal como se ha descrito en el texto. El eje X representa la concentración de MABs. Todos los MABs anti-C2a inhiben fuertemente la hemólisis de la ruta clásica.

La Figura 3 muestra que el MAB anti-C2a 175-62 inhibe la hemólisis de la ruta clásica (RC) en una relación molecular de 1:2 (MAB 175-62 con C2). Los círculos rellenos representan MAB 175-62. Los cuadrados vacíos representan la hemólisis en ausencia de MAB 175-62. El eje Y representa el % de inhibición de hemólisis. El eje X representa la concentración de los MABs. La actividad hemolítica de la ruta clásica de C2 (0,2 μ M) en suero humano normal está completamente inhibida cuando el suero se pre-trató con MAB 175-62 0,1 μ M.

La Figura 4 muestra un ensayo para valorar la inhibición de la hemólisis de la ruta alternativa de RBCs de conejo insensibilizado con MABs anti-C2a, anti-factor D y anti-C5, en presencia de suero humano al 10%. El eje Y representa el % de inhibición de hemólisis, tal como se describen en el texto. El eje X representa la concentración de los MABs. Los datos ilustran que ninguno de los MABs anti-C2a inhiben la ruta alternativa del complemento.

Descripción detallada

Descritas en la presente memoria están las moléculas inhibitoras que incluyen anticuerpos monoclonales así como formas homólogas, análogas y modificadas o derivados de los mismos, incluyendo fragmentos de inmunoglobulina tales como anticuerpos Fab, F(ab')₂, Fv o Fv de cadena sencilla. También están incluidas en esta descripción moléculas inhibitoras pequeñas, que incluyen péptidos, oligonucleótidos, peptidomiméticos y compuestos orgánicos.

Una realización de la invención incluye MABs anti-C2a, que se pueden alcanzar inmunizando roedores (por ejemplo ratones, ratas, hámster y cerdos de guinea) tanto con (1) C2a natural derivado de digestión enzimática de C2 purificado de plasma o suero humano, como (2) C2a recombinante o sus fragmentos expresados tanto por sistemas eucariotas como procariotas. Se pueden usar otros animales para la inmunización, por ejemplo, primates no humanos, ratones transgénicos que expresan inmunoglobulinas humanas, y ratones inmunodeficientes combinados severos (SCID) transplantados con linfocitos B humanos.

Los hibridomas se pueden generar por procedimientos convencionales uniendo linfocitos B de animales inmunizados con células de mieloma (por ejemplo, Sp2/0 y NS0), tal como se describe por G. Köhler y C. Milstein (Nature, 1975, 256:495-497). Además, los anticuerpos anti-C2a se pueden generar escrutando Fv recombinante de cadena sencilla o bibliotecas de Fab de linfocitos B humanos en un sistema de exposición de fagos. La especificidad de los MABs hacia C2a humano puede ser ensayada por un ensayo inmunosorbente unido a una enzima (ELISA), por inmunotransferencia Western, u otras técnicas inmunoquímicas.

La actividad inhibitora sobre la activación del complemento de los anticuerpos identificados en el proceso de escrutinio puede ser asegurada por ensayos hemolíticos usando RBCs de conejo o cerdo de guinea insensibilizados para la ruta alternativa del complemento, o RBCs de pollo u oveja sensibilizados para la ruta clásica del complemento. Aquellos hibridomas que exhiben una actividad inhibitora específica para la ruta clásica del complemento se clonan por dilución limitante. Los anticuerpos se purifican para la caracterización para la especificidad a C2a humano por los ensayos arriba descritos.

Cuando se tratan enfermedades inflamatorias o autoinmunes en seres humanos, los anticuerpos anti-C2a pueden ser anticuerpos quiméricos, DesinmunizadosTM, humanizados o humanos. Tales anticuerpos pueden reducir la inmunogenicidad, evitando así una respuesta de anticuerpo humano/anti-ratón (HAMA). Es preferible que el anticuerpo sea IgG4, IgG2 u otro IgG o IgM mutado genéticamente que no aumenta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (S.M. Canfield *et al.*, J. Exp. Med., 1991, 173:1483-1491) y la histólisis mediada por el complemento (Y. Xu *et al.*, J. Biol. Chem., 1994, 269:3468-3474; V.L. Pulito *et al.*, J. Immunol., 1996, 156:2640-2850).

Los anticuerpos quiméricos son producidos por procesos recombinantes bien conocidos en el estado de la técnica, y tienen una región animal variable y una región humana constante. Los anticuerpos inmunizados tiene un grado superior de secuencias peptídicas humanas que los anticuerpos quiméricos. En un anticuerpo humanizado, sólo las regiones determinantes de complementariedad (CDRs), que son las responsables de la unión del antígeno y la especificidad, derivan de animales. La secuencia aminoacídica que corresponde al anticuerpo animal, y sustancialmente todas las porciones restantes de la molécula (excepto, en algunos casos, pequeñas porciones de las regiones marco dentro de la región variable) derivan de humano y corresponden, en secuencia aminoacídica, al anticuerpo humano. Véase, por ejemplo, L. Riechmann *et al.*, Nature, 1988, 332:323-327; G. Winter, Patente de EE.UU. No. 5.225.539; C. Queen *et al.*, Patente de EE.UU. No. 5.530.101.

Los anticuerpos DesinmunizadosTM son anticuerpos en los que los epítomos T helper han sido eliminados, tal como se describe en la Solicitud de Patente Internacional PCT/GB98/01473. Estos tienen inmunogenicidad reducida o no tienen inmunogenicidad cuando se administran *in vivo*.

Los anticuerpos humanos se pueden hacer por diferentes métodos, incluyendo el uso de bibliotecas de expresión de inmunoglobulinas humanas (Stratagene Corp., La Jolla, CA) para producir fragmentos de anticuerpos humanos (VH, VL, Fv, Fd, Fa, o F(ab')₂) para construir anticuerpos humanos totales usando técnicas similares a aquellas para producir anticuerpos quiméricos. Los anticuerpos humanos también pueden ser producidos en ratones transgénicos con un genoma de inmunoglobulina humano. Tales ratones están disponibles en Abgenix, Inc., Fremont, California, y Medarex, Inc., Annandale, Nueva Jersey.

También se pueden crear moléculas de unión a una sola cadena peptídica en las que las regiones Fv de la cadena pesada y ligera están conectadas. Los anticuerpos de cadena sencilla ("scFv") y el método para su construcción están descritos en la Patente de EE.UU. No. 4.946.778. Alternativamente, Fab puede ser construido y expresado por medios similares (M.J. Evans *et al.*, J. Immunol. Meth., 1995, 184:123-138).

Anticuerpos, fragmentos de los mismos, y anticuerpos de cadena sencilla que derivan total o parcialmente de humano son menos inmunogénicos que los MAbs totales de murino, y por ello, es menos probable que provoquen una respuesta inmunitaria o alérgica. Consecuentemente, los anticuerpos que derivan de humano son más apropiados para la administración *in vivo* en seres humanos que los anticuerpos totales animales, especialmente cuando es necesaria la administración repetida o a largo plazo. Además, los fragmentos e anticuerpo de menor tamaño pueden ayudar a mejorar la biodisponibilidad tisular, que puede ofrecer una mejor acumulación de dosis en ciertas indicaciones de la enfermedad.

En base a las estructuras moleculares de las regiones variables de los anticuerpos anti-C2a, se puede usar el modelado molecular y el diseño molecular racional para generar y escrutar moléculas pequeñas que mimeticen las estructuras moleculares de la región de unión de los anticuerpos e inhibir las actividades de C2a. Estas moléculas pequeñas pueden ser péptidos, peptidomiméticos, oligonucleótidos o compuestos orgánicos. Las moléculas que imitan pueden ser usadas como inhibidores de la activación del complemento en indicaciones de inflamación y en enfermedades autoinmunes. Alternativamente, se pueden usar procedimientos de escrutinio a gran escala usados comúnmente en el campo para aislar moléculas pequeñas adecuadas a partir de bibliotecas de compuestos de combinación.

Aplicaciones de las Moléculas Anti-C2a

Las moléculas de unión anti-C2a descritas en la presente memoria, incluyendo los anticuerpos y fragmentos de la presente invención, pueden ser administrados a pacientes en una formulación farmacéutica adecuada por una variedad de rutas, que incluyen, pero no se limitan a, infusión intravenosa, inyección de bolo intravenoso, y rutas intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, subcutánea, intranasal, intratraqueal, intraespinal, intracraneal, y oral. Tal administración les permite unirse a C2a o C2 endógeno e inhibir así la generación de anafiloxinas de C3b, C3a y C5a, y C5b-9.

La posología estimada de tales anticuerpos y moléculas está entre 10 y 500 µg/ml de suero. La posología actual puede ser determinada en ensayos clínicos que siguen la metodología convencional para determinar las posologías óptimas, es decir, administrar varias posologías y determinar cual es la más eficaz.

Las moléculas inhibidoras anti-C2a pueden funcionar para inhibir la activación del complemento *in vivo* y las manifestaciones inflamatorias que la acompañan, tales como reclutamiento y activación de macrófagos, neutrófilos, plaquetas, mastocitos y células endoteliales, edema y daño tisular. Estas moléculas inhibidoras pueden ser usadas para el tratamiento de enfermedades o condiciones que están mediadas por la activación excesiva o incontrolada del sistema del complemento. Estas incluyen, pero no se limitan a: (1) daño tisular debido a isquemia-reperfusión tras infarto de miocardio agudo, aneurisma, derrame, shock hemorrágico, daño por aplastamiento, fallo multiorgánico, shock hipovolémico e isquemia intestinal; (2) enfermedades inflamatorias, tales como, quemaduras, endotoxemia y shock séptico, síndrome de angustia respiratoria en adultos, circunvalación cardiopulmonar, hemodiálisis, shock anafiláctico, asma severa, angioedema, enfermedad de Crohn, psoriasis, dermatomiositis, anemia falciforme, glomerulonefritis poststreptocócica, y pancreatitis; (3) rechazo a trasplantes, tales como, rechazo agudo de xenoinjertos; y (4) reacciones adversas a fármacos, tales como, alergia a fármacos, síndrome de extravasación inducido por IL-2 y alergia a medio de contraste radiográfico. Enfermedades autoinmunes que incluyen, pero no se limitan a, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, artritis reumatoide, enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple, también pueden ser tratadas con las moléculas inhibidoras descritas en la presente memoria, incluyendo los anticuerpos y fragmentos de la invención.

Las moléculas inhibidoras anti-C2a también pueden ser usadas de forma diagnóstica para establecer la presencia de, o medir, C2a en un espécimen de tejido o una muestra de fluido corporal, tal como suero, plasma, orina o líquido espinal. En esta solicitud, se pueden usar los formatos comunes de ensayo, tales como inmunohistoquímica o ELISA, respectivamente. Tales ensayos de diagnóstico pueden ser útiles para determinar si ciertos individuos son deficientes o sobre producen C2a.

Modelos Animales de la Eficacia Terapéutica de Inhibidores de C2a

La actividad terapéutica de las moléculas inhibidores de C2a en varias indicaciones de enfermedad descritas más arriba puede ser confirmada usando modelos animales disponibles para varias manifestaciones inflamatorias y autoinmunes.

Los modelos animales relevantes para varias enfermedades clínicas en humanos relacionadas con el complemento pueden ser usados para confirmar la eficacia *in vivo* de los inhibidores de C2a. Estos incluyen, pero no se limitan a: isquemia de miocardio/daño por reperfusión (H.F. Weisman *et al.*, Science, 1990, 249:146-151); infarto de miocardio (J.W. Homeister *et al.*, J. Immunol., 1993, 150:1055-1064), lupus eritematoso sistémico y glomerulonefritis (S.K. Datta, Meth. Enzimol., 1988, 162:385-442; D.J. Salvant *et al.*, Meth. Enzimol., 1988, 162:421-461), artritis reumatoide (Y. Wang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 1995, 92:8955-8959), síndrome de la angustia respiratoria en adultos (R. Rabinovici *et al.*, J. Immunol., 1992, 149:1744-1750), rechazo hiperagudo en trasplante de órganos (T.J. Kroschus *et al.*, Transplantation, 1995, 60:1194-1202), daño por quemadura (M.S. Mulligan *et al.*, J. Immunol., 1992, 148:1479-1485), circunvalación cardiopulmonar (C.S. Rinder *et al.*, J. Clin. Invest., 1995, 96:1564-1572).

Ejemplo 1

Generación de Hibridomas Mab anti C2a

A ratones macho A/J de ocho a doce semanas de edad (Harlasn, Houston, TX) se les inyectó de forma subcutánea 20 μ g de C2a en adyuvante de Freund completo (Difco Laboratories, Detroit, MI) en 200 μ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4. El C2a se generó por digestión enzimática usando C1s (Advanced Research Technologies, San Diego, CA) conjugado con Sepharose 6MB activada con CNBr (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), similar al procedimiento descrito en T.J. Oglesby, J. Immunol., 1988, 141:926-931. El C2a resultante luego se purificó pasándolo a través de una columna de HPLC de Sephadex 200 por extrusión de tamaño. La preparación de C2a se ensayó para ser > 95% pura por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)-dodecil sulfato sódico (SDS). C2a se purificó a partir de suero humano (Advanced Research Technologies).

A intervalos de dos semanas, los ratones se inyectaron dos veces de forma subcutánea con 20 μ g de C2a en adyuvante de Freund incompleto. Luego, dos semanas más tarde, tres días antes del sacrificio, a los ratones se les inyectó de nuevo de forma intraperitoneal 20 μ g del mismo antígeno en PBS.

Para cada hibridoma, se prepararon suspensiones de una sola célula a partir de bazo de un ratón inmunizado y se unieron con células de melanoma Sp2/0. 5 x 10⁸ de las Sp2/0 y 5 x 10⁸ de las células de bazo se unieron en un medio que contiene polietilenglicol al 50% (P.M. 1450) (Kodak, Rochester, NY) y dimetilsulfóxido al 5% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Luego, las células se ajustaron a una concentración de 1,5 x 10⁵ células de bazo por 200 μ l de la suspensión en medio Iscove (Gibco, Grand Island, NY), suplementado con suero fetal bovino al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 10 μ g/ml de estreptomina, hipoxantina 0,1 mM, aminopterina 0,4 μ M, y timidina 16 μ M. Se añadieron doscientos μ l de la suspensión celular a cada pocillo de aproximadamente cincuenta placas de microcultivo de 96 pocillos. Tras aproximadamente diez días, se retiraron los sobrenadantes del cultivo para escrutar la reactividad con C2a purificado en ELISA.

Los pocillos de placas de microensayo Immulon 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA) se cubrieron añadiendo 50 μ l de C2a humano purificado a 50 ng/ml durante toda la noche a temperatura ambiente. La baja concentración de C2a usada para cubrir permitió la selección de anticuerpos de alta afinidad. Tras separar la solución de recubrimiento girando la placa, se añadieron 200 μ l de BLOTTO (leche en polvo desnatada) en PBS a cada pocillo durante una hora para bloquear los lugares no específicos. Una hora más tarde, luego los pocillos se lavaron con un tampón PBST (PBS que contiene Tween 20 al 0,05%). Se recogieron cincuenta microlitros de los sobrenadantes del cultivo de cada pocillo de fusión y se mezclaron con 50 μ l de BLOTTO y luego se añadieron a los pocillos individuales de las placas de microensayo. Tras una hora de incubación, los pocillos se lavaron con PBST. Los anticuerpos de murino unidos luego se detectaron por reacción con anti-IgG de ratón en cabra conjugado con preoxidase de rábano picante (HRP) (específico de Fc) (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) y se diluyeron en BLOTTO a 1:2.000. La solución sustrato de peroxidasa que contiene 3,3',5,5'-tetrametil bencidina al 0,1% (Sigma) y peróxido de hidrógeno al 0,0003% (Sigma) se añadió a los pocillos para desarrollo de color durante 30 minutos. La reacción se terminó al añadir 50 μ l de H₂SO₄ 2 M por pocillo. La DO a 450 nm de la mezcla de reacción se leyó con un Lector de Elisa BioTek (BioTek Instruments, Winooski, VT).

Los sobrenadantes del cultivo de los pocillos positivos luego se ensayaron para la inhibición de la hemólisis de la ruta clásica de RBCs de pollo sensibilizados por suero humano titulado (3%) por el método descrito más abajo. Las células en aquellos pocillos positivos se clonaron por dilución limitante. Se ensayaron los MAbs de nuevo para la reactividad con C2a y C2 en el ELISA. Los hibridomas seleccionados se crecieron en matraces hiladores y se recogió el sobrenadante del cultivo gastado para la purificación del anticuerpo por cromatografía de afinidad de la proteína A. Se ensayaron diez MAbs para ser reactivos con C2a humano en ELISA. Estos MAbs se denominaron MAbs 175-50, 175-62, 175-97-1, 175-97-4, 175-101, 175-207, 175-283, 175-310, 175-322, y 175-326. Tal como se ve en la Figura 1, Mab 175-62, Mab 175-101, Mab 175-207, Mab 175-310, Mab 175-322, y Mab 175-326 reaccionaron fuertemente con C2a humano en ELISA. En particular, Mab 175-62 muestra la reactividad más fuerte con C2a entre estos enlazadores. De modo interesante, se une débilmente a C2 inmovilizado en ELISA.

Ejemplo 2

Inhibición de la hemólisis activada por el complemento

- 5 Para estudiar la actividad funcional de los MABs anti-C2a en la inhibición de la activación del complemento *in vitro*, se usaron dos ensayos hemolíticos.

Para la ruta clásica, se sensibilizaron con inmunoglobulinas de anti-RBC de pollo en conejo purificadas a 8 $\mu\text{g/ml}$ (Inter.-Cell Technologies, Hopewell, NJ), RBCs de pollo (5×10^7 células/ml), en gelatina/suero salino tamponado con veronal (GVB⁺⁺) que contiene MgCl_2 0,5 mM y CaCl_2 0,15 mM durante 15 minutos a 4°C. Luego, las células se lavaron con GVB⁺⁺. Las células lavadas se re-suspendieron en el mismo tampón a $1,7 \times 10^8$ células/ml. En cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo, se mezclaron 50 μl de suero humano normal (6%) con 50 μl de GVB⁺⁺ o MAB del ensayo diluido de forma seriada, luego se añadieron, a los pocillos que contienen las mezclas, 30 μl de la suspensión lavada de RBC de pollo sensibilizado. Se mezclaron cincuenta microlitros de suero humano normal (6%) con 80 μl de GVB⁺⁺ para dar al suero un color de fondo. La mezcla final se incubó a 37°C durante 30 minutos. Luego, la placa se agitó en un agitador de placas de micro-ensayo durante 15 segundos, seguido de centrifugación a 300 x g durante 3 minutos. Se recolectaron los sobrenadantes (80 μl) y se transfirieron a pocillos en placas de microensayo de 96 pocillos con fondo plano para medir la DO a 405 nm. El porcentaje de inhibición de hemólisis se definió como $100 \times [(\text{DO sin MAB} - \text{DO del color de fondo del suero}) - (\text{DO con MAB} - \text{DO del color de fondo del suero})] / (\text{DO sin MAB} - \text{DO color de fondo del suero})$.

Los datos en la Figura 2 muestran que los MABs anti-C2a 175-62, 175-207, 175-310, 175-322, y 175-326 inhiben fuertemente la hemólisis de la ruta clásica. El MAB anti-C5 137-76 también inhibe la hemólisis, pero no el MAB anti-factor D 166-32, que es específico para la inhibición de la ruta alternativa del complemento.

La relación estequiométrica de la inhibición entre MAB 175-62 y C2 en suero humano por los ensayos hemolíticos de la ruta clásica también se midió como se describe más arriba. Las diferentes relaciones molares de MAB 175-62 a C2 se ensayaron en los ensayos combinando suero humano normal (que contiene 20 $\mu\text{g/ml}$ o C2 0,2 μM) con MAB 175-62 0,4 μM , 0,2 μM o 0,1 μM . El control fue suero humano normal tratado con un volumen igual de GVB⁺⁺. Las mezclas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las mezclas luego se diluyeron de forma seriada en GVB⁺⁺. Se añadieron cien microlitros de las muestras de suero diluidas a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo redondo por duplicado. Luego, se añadieron treinta microlitros de RBCs de pollo sensibilizado a cada pocillo para la incubación tal como se describe más arriba. La mezcla final se incubó a 37°C durante 30 minutos. Luego, la placa se agitó en un agitador de placas de micro-ensayo durante 15 segundos, seguido de centrifugación a 300 x g durante 30 minutos. Se recogieron los sobrenadantes (80 μl) y se transfirieron a pocillos de placas de microensayo de 96 pocillos con fondo redondo para la medida de DO a 405 nm.

Los datos en la Figura 3 muestran que la actividad hemolítica de C2 en la ruta clásica (0,2 μM) en suero humano normal está completamente inhibida cuando el suero se pre-trató con MAB 175-62 0,1 μM . Por ello, MAB 175-62 inhibe C2 humano en una relación molar de 1:2 (MAB 175-62 a C2). En otras palabras, MAB 175-62 es un anticuerpo anti-C2 de muy alta afinidad. Cada uno de los sitios de unión a antígeno en la molécula de MAB 175-62 puede unir una molécula de C2.

Para la ruta alternativa, se lavaron tres veces los RBCs de ratón insensibilizado con gelatina/solución salina tamponada con veronal (GVB/Mg-EGTA) que contiene MgCl_2 2 mM y EGTA 1,6 mM. El EGTA a una concentración de 10 mM se usó para inhibir la ruta clásica (K. Whaley *et al.*, en A.W. Dodds (Eds.), Complement: A Practical Approach. Oxford University Press, Oxford, 1997, págs. 19-47). Los procedimientos del ensayo fueron similares a aquellos para la hemólisis de la ruta clásica tal como se describe más arriba. La concentración final de suero humano fue 10%.

Los datos en la Figura 4 muestran que ninguno de los MABs anti-C2a inhiben la hemólisis de la ruta alternativa, mientras que el MAB anti-factor D 166-32 inhibe eficazmente la hemólisis y MAB anti-C5 137-76 inhibe moderadamente la hemólisis. Junto con los resultados de las Figuras 2 y 3, los MABs anti-C2a han mostrado ser específicos para la ruta clásica del complemento.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula inhibidora que se une al componente C2a o la porción C2a de C2 del complemento, y que inhibe las rutas clásica y de lectina del complemento en una relación molar de molécula inhibidora a C2 de 1:2, donde la molécula inhibidora es un anticuerpo o fragmento del mismo.
2. Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al mismo epítipo en el componente C2a o la porción C2a de C2 del complemento que el anticuerpo monoclonal 175-62 producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo en Número de Acceso ATCC PTA-1553, donde dicho anticuerpo o fragmento inhibe las rutas clásica y de lectina del complemento en una relación molar de anticuerpo o fragmento a C2 de 1:2.
3. El fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el fragmento de anticuerpo es un Fab, F(ab')₂, Fv o Fv de cadena sencilla.
4. El anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el anticuerpo es monoclonal.
5. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 4, donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, desimmunizado, humanizado o humano.
6. Un anticuerpo monoclonal denominado 175-62 que se une al componente C2a o la porción C2a de C2 del complemento y es producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo el Número de Acceso ATCC PTA-1553.
7. Una línea celular que produce el anticuerpo monoclonal denominado 175-62, estando dicha línea celular depositada bajo el No. De Acceso ATCC PTA-1553.
8. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y un vehículo, excipiente, estabilizante o diluyente farmacológicamente aceptable.
9. Un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para uso como medicamento.
10. Uso de un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o condición que es infarto de miocardio agudo, aneurisma, derrame, shock hemorrágico, daño por aplastamiento, daño térmico, fallo multiorgánico, circunvalación cardiopulmonar, hemodiálisis, shock hipovolémico, o isquemia intestinal.
11. Uso de un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o condición que es una enfermedad inflamatoria, tal como, endotoxemia, shock séptico, síndrome de angustia respiratoria en adultos, shock anafiláctico, asma severa, angioedema, urticaria, glomerulonefritis membranoproliferativa, inflamación del intestino, pancreatitis o dermatomiositis.
12. Uso de un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o condición que es anemia falciforme o glomerulonefritis post-estreptocócica.
13. Uso de un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o condición que está implicada en rechazo de trasplante, tal como, rechazo hiperagudo de xenoinjerto.
14. Uso de un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o condición que es una reacción adversa a fármacos, tal como, una alergia a fármacos, síndrome de extravasación inducida por IL-2, o alergia a medio de contraste radiográfico.
15. Uso de un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o condición que es una enfermedad autoinmune, tal como, enfermedad de Crohn, síndrome de Sjögren, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, artritis reumatoide, enfermedad de Alzheimer o esclerosis múltiple.
16. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-15, donde el medicamento se destina a administración por infusión intravenosa, inyección en bolo intravenoso, administración intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, subcutánea, intranasal, intratraqueal, intraespinal o intracraneal, u oralmente.
17. Un método de diagnóstico que comprende detectar la cantidad de C2 o C2a en una muestra con el anticuerpo o fragmento del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
18. El método de diagnóstico de la reivindicación 17, donde el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal denominado 175-62 que es producido por el hibridoma depositado bajo el número de Acceso ATCC PTA-1553.

ES 2 329 010 T3

19. Un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para tratar una enfermedad o condición que es infarto de miocardio agudo, aneurisma, derrame, shock hemorrágico, daño por aplastamiento, daño térmico, fallo multiorgánico, circunvalación cardiopulmonar, hemodiálisis, shock hipovolémico, o isquemia intestinal.

5 20. Un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para tratar una enfermedad o condición que es una enfermedad inflamatoria, tal como, endotoxemia, shock séptico, síndrome de angustia respiratoria en adultos, shock anafiláctico, asma severa, angioedema, urticaria, glomerulonefritis membranoproliferativa, inflamación del intestino, pancreatitis o dermatomiositis.

10 21. Un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para tratar una enfermedad o condición que es anemia falciforme o glomerulonefritis post-estreptocócica.

15 22. Un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para tratar una enfermedad o condición que está implicada en rechazo de trasplante, tal como, rechazo hiperagudo de xenoinjerto.

23. Un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para tratar una enfermedad o condición que es una reacción adversa a fármacos, tal como, una alergia a fármacos, síndrome de extravasación inducida por IL-2, o alergia a medio de contraste radiográfico.

20 24. Un anticuerpo o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para tratar una enfermedad o condición que es una enfermedad autoinmune, tal como, enfermedad de Crohn, síndrome de Sjögren, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, artritis reumatoide, enfermedad de Alzheimer o esclerosis múltiple.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1 Reactividad de MAbs con C2a humano

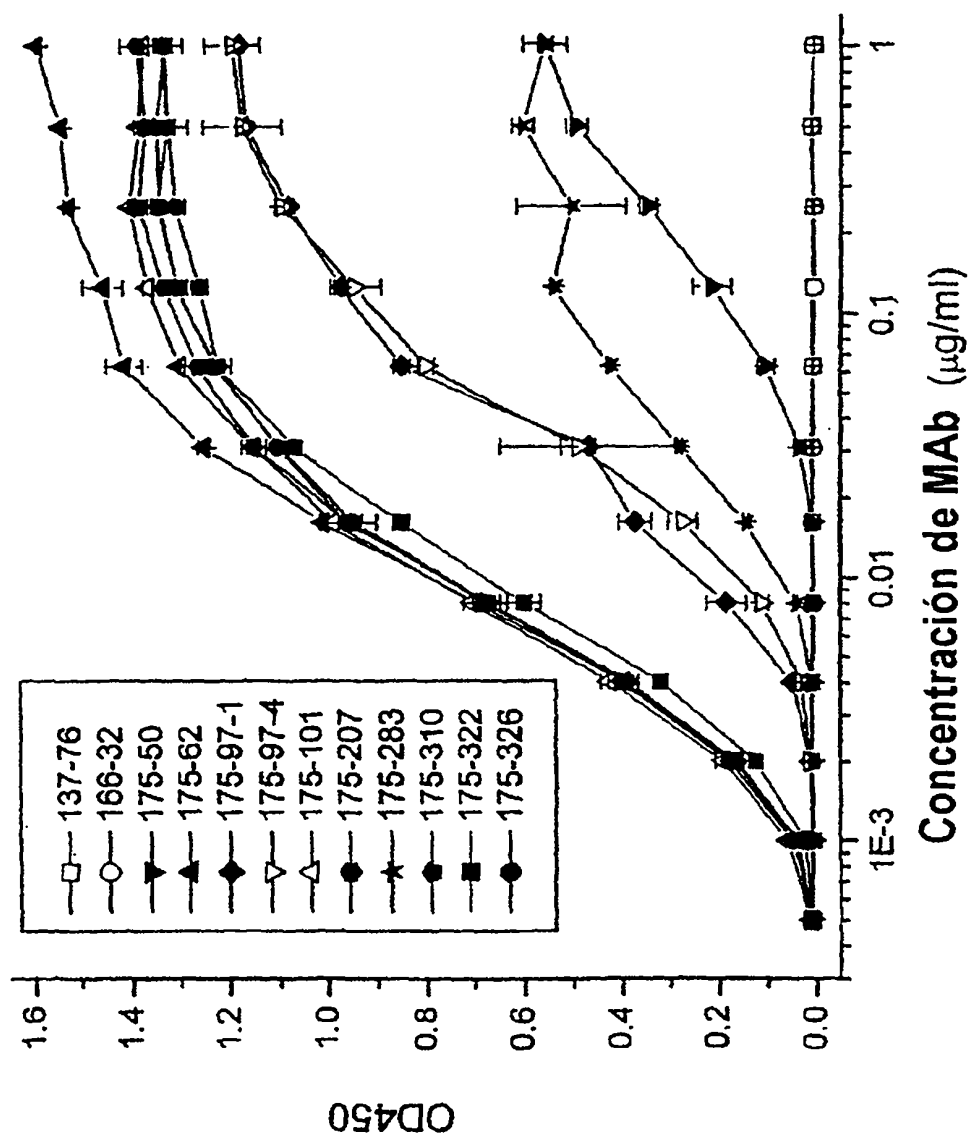


Fig. 2 Inhibición de hemólisis de CP por MAbs anti-C2a

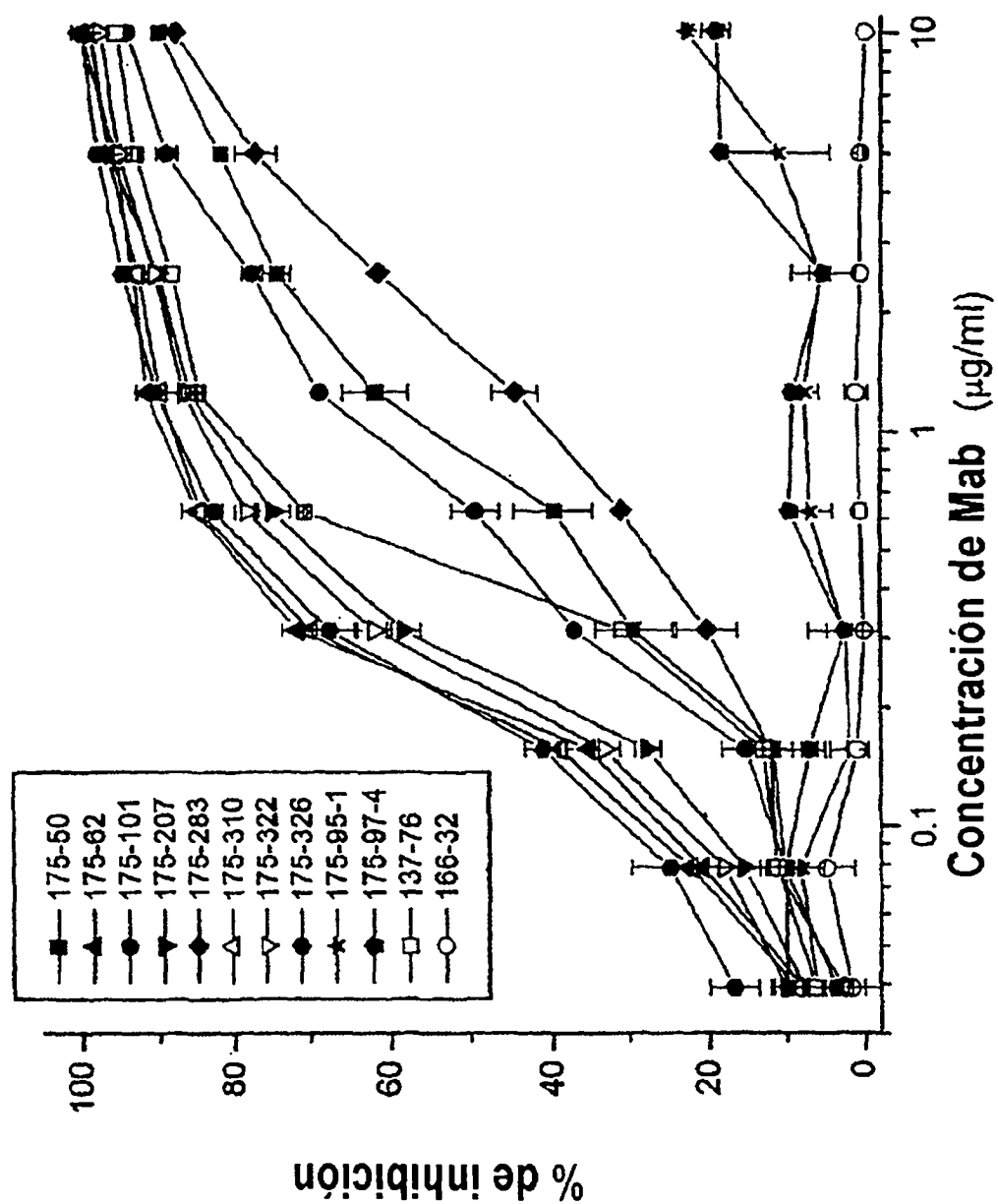


Fig. 3 MAb anti-C2A MAb 175-62 inhibe completamente la hemólisis de CP en una relación molar de 1:2 (MAb a C2)

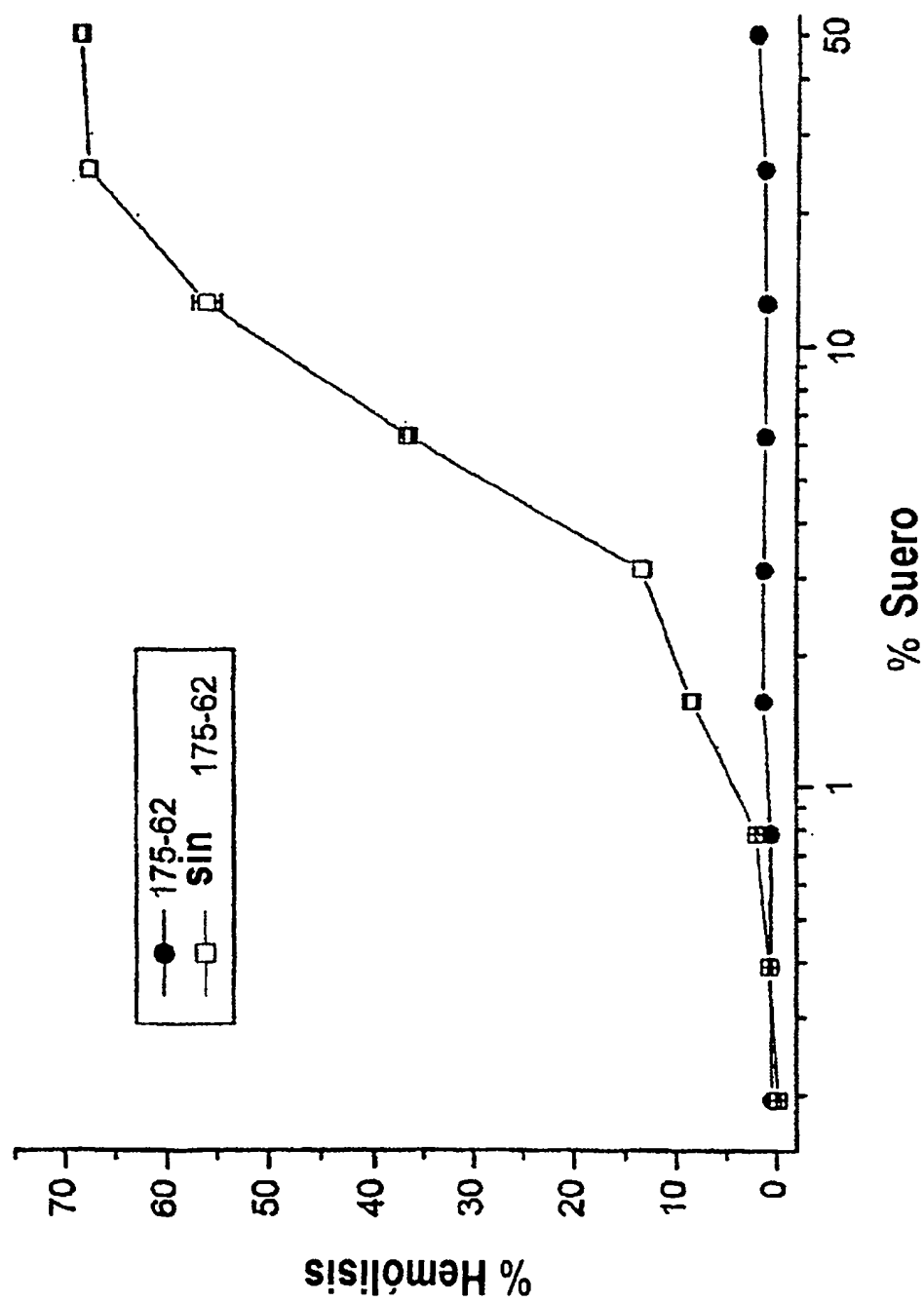


Fig. 4 No inhibición de hemólisis de AP por MAbs anti-C2a

