



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 322 643**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **01962800 .7**

(96) Fecha de presentación : **29.06.2001**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1299421**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **09.04.2003**

(54) Título: **Anticuerpos para MCP-1 humano.**

(30) Prioridad: **30.06.2000 GB 0016138**

(73) Titular/es: **NOVARTIS AG.**
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.06.2009

(72) Inventor/es: **Hiestand, Peter;**
Hofstetter, Hans;
Payne, Trevor, Glyn;
Urfer, Roman y
Di Padova, Franco, E.

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.06.2009

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Anticuerpos para MCP-1 humano.

5 Esta invención está relacionada con anticuerpos para la proteína químico atrayente de monocito humano (MCP)-1 y al uso de tales anticuerpos para el tratamiento de enfermedades y trastornos que involucran migración y activación de monocitos y células T, por ejemplo enfermedades inflamatorias.

10 La aplicación de la patente Japonesa publicada JP 05276986, (Sumitomo Electric Co.) describe la preparación de anticuerpos monoclonales de roedores para MCP-1 humano útiles para determinar MCP-1 y para tratar y diagnosticar enfermedades que involucran infiltración de macrófagos. La aplicación de la patente Japonesa publicada JP 09067399 (Mitsui Toatsu) describe la preparación de anticuerpos monoclonales humanos para MCP-1 humano de células sanguíneas periféricas humanas EBV transformadas para uso en el tratamiento de inflamación. La aplicación de la patente Japonesa publicada JP 11060502 (Teijin) describe el uso de un inhibidor de MCP-1, en particular un anticuerpo humano anti-MCP-1 para el tratamiento de infarto cerebral.

15 Nosotros ahora hemos preparado anticuerpos mejorados para MCP-1 humano para uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos que involucran la migración y activación de monocitos y células T.

20 Como corresponde la invención provee una molécula de enlace que comprende (a) un sitio de enlace para antígeno que comprende un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que comprende en secuencia regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, teniendo dicho CDR1 la secuencia de aminoácido His-Tyr-Trp-Met-Ser, teniendo dicho CDR2 la secuencia de aminoácido Asn-Ile-Glu-Gln-Asp-Gly-Ser-Glu-Lys-Tyr-Tyr-Vaf-Asp-Ser-Val-lys-Gly, y teniendo dicho CDR3 la secuencia de aminoácido Asp-Leu-Glu-Gly-Leu-His-Gly-Asp-Gly-Tyr-Phe-Asp-
25 Leu; y (b) un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que comprende en secuencia regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3' teniendo dicho CDR1' la secuencia de aminoácido Arg-Ala-Ser-Gln-Gly-Vaf-Ser-Ser-Ala-Leu-Ala, teniendo dicho CDR2' la secuencia de aminoácido Asp-Ala-Ser-Ser-Leu-Glu-Ser, y teniendo dicho CDR3' la secuencia de aminoácido Gln-Gln-Phe-Asn-Ser-Tyr-Pro.

30 A no ser que se indique lo contrario, cualquier cadena polipéptida es aquí descrita teniendo una secuencia de aminoácido que comienza en el extremo N-terminal y termina en el extremo C-terminal.

35 Cuando el sitio de enlace del antígeno compuesto por ambos dominios el V_H y el V_L , éstos pueden ser localizados en la misma molécula polipéptida o, preferiblemente, cada dominio puede estar en una cadena diferente, siendo el dominio V_H parte de una cadena pesada de inmunoglobulina o un fragmento del mismo y siendo el V_L parte de una cadena ligera de inmunoglobulina o un fragmento del mismo.

40 Con "molécula enlazadora MCP-1" se quiere decir cualquier molécula capaz de enlazarse al antígeno MCP-1 sola o asociada con otras moléculas. La reacción de enlace puede ser mostrada por métodos estándar (ensayos cualitativos) incluyendo, por ejemplo, un bioensayo para determinar la inhibición del MCP-1 enlazándose a su receptor, es decir, el receptor quimioquina (CCR)-2, por ejemplo CCR2B, o cualquier tipo de ensayos de enlace, con referencia a una prueba de control negativo en el cual es usado un anticuerpo de especificidad no relacionada, pero preferiblemente del mismo isotipo. Ventajosamente, el enlace de las moléculas enlazadoras MCP-1 de la invención a MCP-1 puede ser mostrado, por ejemplo, en un ensayo BIACore.

45 Ejemplos de moléculas que se enlanzan a antígenos incluyen anticuerpos como los producidos por células B o por hibridomas y químéricos, CDR-injertado o anticuerpos humanos o cualquier fragmento del mismo, por ejemplo, fragmentos F(ab')₂ y fragmentos Fab.

50 Un anticuerpo de cadena simple consiste de los dominios variables de las cadenas pesadas y livianas de un anticuerpo enlazado covalentemente por un conector péptido usualmente consistiendo de desde 10 a 30 aminoácidos, preferiblemente desde 15 a 25 aminoácidos. Por consiguiente, tal estructura no incluye la parte constante de las cadenas pesadas y ligeras y se cree que el pequeño separador péptido debe ser menos antigenógeno que una parte constante completa. Por "anticuerpo químérico" se quiere decir un anticuerpo en el que las regiones constantes de cadenas pesadas o ligeras o ambas son de origen humano mientras que los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras son de origen no humano (por ejemplo murina) o de origen humano pero derivada de un anticuerpo humano diferente. Por "anticuerpo CDR-injertado" se quiere decir un anticuerpo en el que las regiones hipervariables (CDRs) son derivadas de un anticuerpo donante, tal como un anticuerpo no humano (por ejemplo murina) o un anticuerpo humano diferente, mientras todas o substancialmente todas las otras partes de la inmunoglobulina por ejemplo, las regiones constantes y sus partes altamente conservadas de los dominios variables, es decir, las regiones esquema, son derivadas de un anticuerpo receptor, por ejemplo un anticuerpo de origen humano. Un anticuerpo CDR-injertado puede sin embargo contener algunos aminoácidos de la secuencia donadora en las regiones esquema, por ejemplo en las partes de las regiones esquema adyacentes a las regiones hipervariables. Por "anticuerpo humano" se quiere decir un anticuerpo en el cual las regiones constantes y variables de las cadenas pesadas y ligeras son todas de origen humano, o substancialmente idénticas a secuencias de origen humano, no necesariamente del mismo anticuerpo e incluye anticuerpos producidos por ratones en los cuales la variable de inmunoglobulina de murina y genes de parte constante han sido remplazados por sus contrapartes humanas, por ejemplo, como es descrito en términos generales en EP 0546073 B1,

ES 2 322 643 T3

USP 5545806, USP 5569825, USP 5625126, USP 5633425, USP 5661016, USP 5770429, EP 0 43 8474 B1 y EP 0 463151 B1.

Moléculas enlazadoras MCP-1 particularmente preferidas de la invención son anticuerpos humanos especialmente

- 5 anticuerpos AAV293, AAV294 y ABN912 como son descritos más adelante en los Ejemplos. (El anticuerpo AAV293 es un anticuerpo humano IgG3/k y ABN912 es un anticuerpo humano IgG4/k, pero son esencialmente idénticos en otros aspectos. El anticuerpo AAV284 es un anticuerpo humano IgG1/k que tiene dominios variables que son idénticos a aquellos de AAV293 excepto para cambios de un único aminoácido en FR1, CDR2 y FR3 de V_H y CDR1' y FR3' de V_L , como son descritos más adelante en los Ejemplos).

10 Por lo tanto en anticuerpos químéricos preferidos los dominios variables de las cadenas pesada y ligera son de origen humano, por ejemplo aquellos del anticuerpo ABN912 que son mostrados en Seq. Id. No. 1 y Seq. Id. No. 2. Los dominios de región constante preferiblemente también consisten de dominios de región constantes humanos apropiados, por ejemplo como descrito en "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat E.A. *et al*, US
15 Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health.

20 Regiones hipervariables pueden estar asociadas con cualquier clase de regiones esquema, aunque preferiblemente son de origen humano. Regiones esquema apropiadas son descritas en Kabat E.A. *et al*, *ibid*. El esquema de cadena pesada preferido es un esquema de cadena pesada humana, por ejemplo aquella del anticuerpo ABN912 que es mostrado en Seq. Id. No. 1. Consiste en la secuencia de las regiones FR1, FR2, FR3 y FR4. En una forma similar, Seq. Id. No. 2 muestra el esquema de cadena ligera ABN912 que consiste, en secuencia, de FR1', FR2', FR3' y FR4'. Regiones esquema alternativas preferiblemente regiones esquema humanas, pueden ser usadas a aquellas mostradas en Seq. Id. No. 1 y Seq. Id. No. 2, por ejemplo como descrito en Kabat *et al*. *Ibid*. Algunos residuos de aminoácido de las regiones esquema, en particular en las partes del esquema adyacentes a las regiones hipervariables, pueden ser
25 diferentes de aquellas de la región esquema relevante definida, por ejemplo, para influenciar las propiedades de enlace.

30 Como corresponde, la invención también provee una molécula de enlace MCP-1 que comprende por lo menos un sitio de enlace de antígeno que comprende un primer dominio que tiene una secuencia de aminoácido substancialmente idéntica a aquellas mostradas en Seq. Id. No. 1 comenzando con el aminoácido en la posición 1 y terminando con el aminoácido en la posición 122 o un primer dominio como fue descrito arriba y un segundo dominio que tiene una secuencia de aminoácido substancialmente idéntica a aquella mostrada en Seq. Id. No. 2, comenzando con aminoácido en la posición 1 y terminando con aminoácido en la posición 109.

35 Anticuerpos monoclonales criados contra una proteína encontrada naturalmente en todos los humanos son típicamente desarrollados en un sistema no humano por ejemplo en ratones. Como consecuencia directa de esto, un anticuerpo xenogénico como el producido por un hibridoma, cuando es administrado a humanos, provoca una respuesta inmune no deseada que es predominantemente mediada por la parte constante de la inmunoglobulina xenogénica. Esto limita claramente el uso de tales anticuerpos ya que no pueden ser administrados sobre un período de tiempo prolongado. Por lo tanto es particularmente preferido usar anticuerpos de cadena simple, de dominio simple, químéricos, CDR-injertado, o especialmente anticuerpos humanos que no es probable que provoquen una respuesta alogénica substancial cuando son administrados a humanos.

40 En vista de lo anterior, una molécula de enlace MCP-1 preferida de la invención es seleccionada de un anticuerpo humano anti MCP-1 que comprende por lo menos

45 a) una cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento del mismo que comprende (i) un dominio variable que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3 y (ii) la parte constante del fragmento del mismo de una cadena pesada humana; dicho CDR1 teniendo la secuencia de aminoácido His-Tyr-Trp-Met-Ser, dicho CDR2 teniendo la secuencia de aminoácido Asn-Ile-Glu-Gln-Asp-Gly-Ser-Glu-Lys-Tyr-Tyr-Val-Asp-Ser-Val-Lys-Gly, y dicho CDR3 teniendo la secuencia de aminoácido Asp-Leu-Glu-Gly-Leu-His-Gly-Asp-Gly-Tyr-Phe-Asp-Leu y

50 b) una cadena ligera de inmunoglobulina o fragmento del mismo que comprende (i) un dominio variable que comprende la región hipervariable CDR3' y también opcionalmente las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y (ii) la parte constante o fragmento del mismo de una cadena ligera humana, dicho CDR1' teniendo la secuencia de aminoácido Arg-Ala-Ser-Gln-Gly-Val-Ser-Ser-Ala-Leu-Ala, dicho CDR2' teniendo la secuencia de aminoácido Asp-Ala-Ser-Ser-Leu-Glu-Ser, y dicho CDR3' teniendo la secuencia de aminoácido Gln-Gln-Phe-Asn-Ser-Tyr-Pro.

55 60 Alternativamente, una molécula enlazadora MCP-1 de la invención puede ser seleccionada de una molécula enlazadora de cadena simple que comprende un sitio de enlace de antígeno compuesta de

65 a) un primer dominio que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, dichas regiones hipervariables teniendo las secuencias de aminoácido como se muestra en la secuencia Seq. Id. No. 1,

b) Un segundo dominio que comprende las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3', dichas regiones hipervariables teniendo las secuencias de aminoácido como se muestra en Seq. Id. No. 2 y

ES 2 322 643 T3

- c) Un conector péptido que esta enlazado al extremo N-terminal del primer dominio y el extremo C-terminal del segundo dominio o al extremo C-terminal del primer dominio y al extremo N-terminal del segundo dominio.
- 5 Como es bien conocido, cambios menores en una secuencia de aminoácido tales como supresión, adición o sustitución de uno, algunos o hasta varios aminoácidos puede llevar a una forma alélica de la proteína original que tiene propiedades substancialmente idénticas.

Por lo tanto, por el término “equivalentes directos del mismo” se quiere decir cualquier molécula de enlace de 10 dominio simple MCP-1 (molécula X).

(i) En el cual las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3 tomados como un todo son por lo menos 80% homólogas, preferiblemente por lo menos 90% homólogas, más preferiblemente por lo menos 95% homólogas a las regiones hipervariables como son mostradas en Seq. Id. No. 1 y,

15 (ii) Que es capaz de inhibir el enlace de MCP-1 a su receptor substancialmente hasta el mismo punto que una molécula referencia que tiene regiones esquema idénticas a aquellas de la molécula X pero teniendo regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3 idénticos a aquellos mostrados en Seq. Id. No. 1

20 o cualquier molécula MCP-1 teniendo por lo menos dos dominios por sitio de enlace (molécula X')

(i) En los cuales las regiones hipervariables CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2' y CDR3' tomadas como un todo son por lo menos 80% homólogas, preferiblemente por lo menos 90% homólogas, más preferiblemente por lo menos 95% homólogas, a las regiones hipervariables como son mostradas en Seq. Id. No. 1 y 2 y

25 (ii) El cual es capaz de inhibir el enlace de MCP-1 a su receptor substancialmente hasta el mismo punto que una molécula referencia que tiene regiones esquema y partes constantes idénticas a la molécula X', pero teniendo regiones hipervariables CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2' y CDR3', idénticas a aquellas mostradas en Seq. Id. No. 1 y 2.

30 En la presente descripción secuencias de aminoácidos son por lo menos 80% homólogas entre uno y otro si tienen por lo menos residuos de aminoácidos 80% idénticos en una posición similar cuando las secuencias están alineadas óptimamente, espacios o inserciones en las secuencias de aminoácidos siendo contadas como residuos no idénticos.

35 La inhibición del enlace de MCP-1 a su receptor puede ser convenientemente probada en varios ensayos incluyendo tales ensayos son descritos de aquí en adelante en este texto. Por el término “hasta el mismo punto” se quiere decir que la referencia y las moléculas equivalentes exhiben, en base estadística, curvas de inhibición de enlace MCP-1 esencialmente similares en uno de los ensayos a los que se hace referencia arriba. Por ejemplo, las moléculas de 40 enlace MCP-1 de la invención típicamente tienen IC₅₀s para inhibición del enlace de MCP-1 a su receptor (CCR2B) los cuales están entre +/- x 5 de esto de, preferiblemente substancialmente lo mismo que, el IC₅₀ de la molécula referencia correspondiente cuando es ensayado como fue descrito arriba.

45 Por ejemplo, el ensayo usado puede ser un ensayo de inhibición competitivo de enlace de MCP-1 por receptor MCP-1 enlazado por membrana (CCR2B) y las moléculas de enlace MCP-1 de la invención, por ejemplo usando tecnología SPA como es descrito más adelante en los Ejemplos.

Más preferiblemente, el anticuerpo humano MCP-1 comprende por lo menos

- 50 a) Una cadena pesada que comprende un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácido substancialmente idéntica a aquella mostrada en Seq. Id. No. 1 comenzando con el aminoácido en posición 1 y terminando con el aminoácido en posición 122 y la parte constante de una cadena humana pesada; y
- b) Una cadena ligera que comprende un dominio variable teniendo una secuencia de aminoácido substancialmente idéntica a aquella mostrada en Seq. Id. No. 2 comenzando con el aminoácido en la posición 1 y terminando con el aminoácido en posición 109 y la parte constante de una cadena humana ligera.

60 La parte constante de una cadena humana pesada puede ser del tipo $\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4, \mu, \alpha_1, \alpha_2, \delta$ ó ϵ , preferiblemente del tipo γ , más preferiblemente del tipo γ_4 , mientras que la parte constante de una cadena humana ligera puede ser del tipo κ o λ (el cual incluye los subtipos $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$) pero es preferible del tipo κ . Las secuencias de aminoácidos de todas estas partes constantes están dadas en Kabat *et al ibid.*

65 Una molécula de enlace MCP-1 de la invención puede ser producida por técnicas de ADN recombinante. En vista de esto, una o más moléculas de ADN codificando la molécula enlazadora deben ser construidas, ubicadas bajo secuencias control apropiadas y transferidas en un organismo huésped adecuado para expresión.

ES 2 322 643 T3

En una manera muy general, hay provistas concordantemente

Moléculas ADN codificando una molécula de enlace MCP-1 de dominio simple, de la invención, una molécula de enlace MCP-1 de cadena simple de la invención, una cadena pesada o ligera o fragmentos del mismo o una molécula de enlace MCP-1 de la invención y

- (i) El uso de las moléculas de ADN de la invención para la producción de una molécula de enlace MCP-1 de la invención por medios recombinantes.

10 El presente estado de la técnica es tal que el trabajador diestro en la técnica es capaz de sintetizar las moléculas de ADN de la invención dada la información provista aquí es decir las secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables u las secuencias de ADN que las codifican. Un método para construir un gen de dominio variable es por ejemplo descrita en EPA 239 400 y puede ser resumida brevemente como sigue: Un gen que codifica un dominio variable de un MAb de cualquier especificidad es clonado. Los segmentos de ADN codificando las regiones esquema e hipervariables están fusionadas unas a otras con sitios de restricción apropiados en las uniones. Los sitios de restricción pueden ser generados en las posiciones apropiadas por mutagénesis de la molécula de ADN por procedimientos estándar. Casetes CDR sintéticos de doble cadena son preparados por síntesis de ADN de acuerdo a las secuencias dadas en Seq. Id. No. 1 o 2. Estos casetes son provistos con extremos pegajosos para poder ser ligados en las uniones del esquema.

20 Además, no es necesario tener acceso al mRNA de una línea celular de un hibridoma productor para poder obtener una construcción de ADN que codifique para las moléculas MCP-1 de enlace para la invención. Por lo tanto la aplicación PCT WO 90/07861 da instrucciones completas para la producción de un anticuerpo por técnicas recombinantes de ADN dada solamente información escrita en cuanto a la secuencia nucleótido del gen. El método comprende la síntesis de un número de oligonucleótidos, su amplificación por el método PCR, y su empalme para dar la secuencia deseada de ADN.

30 Son disponibles públicamente los vectores de expresión que comprenden un promotor adecuado o genes que codifican partes constantes de cadena pesada y ligera. De ese modo, una vez una molécula de ADN de la invención es preparada puede ser convenientemente transferida en un vector de expresión apropiado. Moléculas de ADN codificando anticuerpos de cadena simple también pueden ser preparadas por métodos estándar, por ejemplo, los descritos en WO 88/1649.

35 En vista de lo anterior no es necesario un hibridoma o un depósito de línea celular para cumplir con los criterios de suficiencia de descripción.

En una modalidad particular la invención incluye primeras y segundas construcciones de ADN para la producción de una molécula MCP-1 de enlace como es descrito abajo:

40 La primera construcción de ADN codifica una cadena pesada o fragmento del mismo y comprende

- a) Una primera parte que codifica un dominio variable comprendiendo alternativamente regiones esquema e hipervariables, dichas regiones hipervariables siendo en secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 las secuencias de aminoácido de las cuales son mostradas en Seq. Id. No. 1; ésta primera parte comenzando con un codón codificando el primer aminoácido del dominio variable y terminando con un codón codificando el último aminoácido del dominio variable, y
- b) Una segunda parte codificando una parte constante de cadena pesada o fragmento del mismo el cual inicia con un codón codificando el primer aminoácido de la parte constante de la cadena pesada y termina con un codón codificando el último aminoácido de la parte constante o fragmento del mismo, seguido por un codón de parada.

55 Preferiblemente, la primera parte codifica un dominio variable teniendo una secuencia de aminoácido substancialmente idéntico a la secuencia de aminoácido como es mostrada en Seq. Id. No. 1 comenzando con el aminoácido en la posición 1 y terminando con el aminoácido en posición 122. más preferiblemente la primera parte tiene la secuencia de nucleótido como es mostrada en Seq. Id. No. 1 comenzando con el nucleótido en la posición 1 y terminando con el nucleótido en la posición 366. También preferiblemente, la segunda parte codifica la parte constante de una cadena humana pesada, más preferiblemente la parte constante de la cadena humana $\gamma 4$. Esta segunda parte puede ser un fragmento de ADN de origen genómico (que consta de intrones) o un fragmento de cADN (sin intrones).

60 La segunda construcción de ADN codifica una cadena ligera o fragmento del mismo y comprende

- a) Una primera parte la cual codifica un dominio variable que comprende alternativamente regiones esquema e hipervariables; dichas regiones hipervariables siendo CDR1', CDR2' y CDR3', las secuencias de aminoácidos las cuales son mostradas en Seq. Id. No. 2; esta parte comenzando con un codón que codifica el primer aminoácido del dominio variable y terminando con un codón que codifica el último aminoácido del dominio variable, y

ES 2 322 643 T3

- 5 b) Una segunda parte codificando una parte constante de cadena ligera o fragmento del mismo que inicia con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de la cadena ligera y termina con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante o fragmento del mismo seguido por un codón de parada.

10 Preferiblemente, esta primera parte codifica un dominio variable teniendo una secuencia de aminoácido substancialmente idéntica a la secuencia de aminoácido como es mostrada en Seq. Id. No. 2 comenzando con el aminoácido en la posición 1 y terminando con el aminoácido en la posición 109. Más preferiblemente, la primera parte tiene la secuencia de nucleótido como es mostrada en Seq. Id. No. 2 comenzando con el nucleótido en la posición 1 y terminando con el nucleótido en la posición 327. También preferiblemente la segunda parte codifica la parte constante de una cadena humana ligera, más preferiblemente la parte constante de la cadena humana κ .

15 La invención también incluye moléculas MCP-1 de enlace en la cual una o más, típicamente solamente algunos, de los residuos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2' o CDR3' son cambiados de los residuos mostrados en Seq. Id. No. 1 y Seq. Id. No. 2; por ejemplo por mutación por ejemplo mutagénesis sitio dirigida de las correspondientes secuencias de ADN. La invención incluye las secuencias de ADN que codifican para tales moléculas cambiadas MCP-1 de enlace. La invención también incluye moléculas de enlace en las cuales uno o más, típicamente solo algunos, de los residuos de las regiones esquema son cambiados de los residuos mostrados en Seq. Id. No. 1 y Seq. Id. No. 2.

20 En la primera y segunda construcción de ADN, la primera y segunda parte puede ser separada por un intrón, y, un mejorador puede ser convenientemente localizado en el intrón entre las primeras y segundas partes. La presencia de tal mejorador el cual es transcrita pero no traducido, puede asistir en la transcripción eficiente. En modalidades particulares la primera y segunda construcción de ADN comprende el mejorador de un gen de cadena pesada ventajosamente de origen humano.

25 Cada una de las construcciones de ADN son situadas bajo el control de secuencias adecuadas de control de expresión, en particular bajo el control de un promotor apropiado. Cualquier tipo de promotor puede ser usado, provisto que esté adaptado al organismo huésped en el cual las construcciones de ADN serán transferidas para expresión. Sin embargo, si la expresión tomara lugar en una célula de mamífero, será particularmente preferido usar el promotor de un gen de inmunoglobulina.

30 El anticuerpo deseado puede ser producido en un cultivo celular o en un animal transgénico. Un animal transgénico adecuado puede ser obtenido de acuerdo a métodos estándar que incluyen micro inyectar en huevos la primera y segunda construcción de ADN situada bajo adecuadas secuencias control transfiriendo tales huevos preparados en hembras pseudo-preñadas apropiadas y seleccionando un descendiente expresando el anticuerpo deseado.

35 Cuando las cadenas de anticuerpos son producidas en un cultivo celular, las construcciones de ADN deben ser primero insertadas en un vector de expresión simple o en dos vectores de expresión separados pero compatibles, la última posiblemente siendo preferida.

40 Concordantemente, la invención también provee un vector de expresión capaz de replicarse en una línea celular procariótica o eucariótica que comprende por lo menos una de las construcciones de ADN descritas arriba.

45 Cada vector de expresión que contiene construcciones de ADN es después transferido a un organismo huésped adecuado. Cuando construcciones de ADN son insertadas separadamente en dos vectores de expresión, éstos deben ser transferidos separadamente, es decir un tipo de vector por célula, o co-transferida, siendo preferida esta última posibilidad. Un organismo huésped apropiado puede ser una bacteria, una levadura o una línea celular de mamíferos, esta última siendo preferida. Más preferiblemente, la línea celular de mamíferos es de origen linfoide, por ejemplo un 50 mieloma, hibridoma o una línea de células B inmortalizada, que convenientemente no expresa ninguna cadena pesada o ligera de anticuerpos endógenos, por ejemplo la línea celular SP 2/0.

55 Para expresión en células de mamíferos se prefiere que la secuencia de codificación de la molécula MCP-1 de enlace esté integrada en el ADN celular del huésped dentro de un locus que permita o favorezca expresión de alto nivel de la molécula MCP-1 de enlace. Células en las cuales la secuencia de codificación de la molécula MCP-1 de enlace está integrada en tal loci favorable pueden ser identificadas y seleccionadas en base a los niveles de la molécula MCP-1 de enlace que éstos expresan. Cualquier marcador seleccionable apropiado puede ser usado para preparación de células huésped que contienen la secuencia codificadora de la molécula MCP-1 de enlace; por ejemplo, un dhfr gen/metotrexato o sistema de selección equivalente puede ser usado. Sistemas para expresión de las moléculas MCP-1 de enlace de la invención incluyen sistemas de amplificación/selección basados en GS, tales como esos descritos en EP 0256055 B, EP 0323997 B y EP 0338841 B.

60 En un aspecto posterior de la invención se provee un proceso para la producción de una molécula MCP-1 de enlace que comprende (i) cultivar un organismo que es co-transformado con vectores de expresión como se define arriba y (ii) recuperando la molécula MCP-1 de enlace del cultivo.

Más preferiblemente la molécula MCP-1 de enlace de la invención es un anticuerpo humano, por ejemplo los anticuerpos AAV293, AAV294 o ABN912, y puede ser producido por cultivación de una línea celular hibridoma

ES 2 322 643 T3

correspondiente, o preferiblemente de una línea celular recombinante que contiene ADN que codifica para el anticuerpo humano, incluyendo ADN alterado para alterar el anticuerpo isotipo u otra función o propiedad del anticuerpo.

De acuerdo con la presente invención se ha encontrado que el anticuerpo AAV294 y más especialmente los anticuerpos AAV293 y ABN912 reaccionan entrecruzadamente con eotaxina-1 humana recombinante. Como tales estos anticuerpos reaccionan con eotaxina-1 como también con MCP-1, y pueden ser usados para inhibir el enlace de eotaxina-1 a su receptor, en adición a inhibir el enlace de MCP-1 a su receptor. La secreción de eotaxina está implicada en enfermedades y problemas alérgicos incluyendo enfermedades alérgicas inflamatorias de las vías respiratorias, tales como asma. Anticuerpos, en particular anticuerpos químicos y CDR-injertados y especialmente anticuerpos humanos que tienen especificidad de enlace para ambos MCP-1 y eotaxina, por ejemplo MCP-1 humano y eotaxina humana, y el uso de tales anticuerpos para el tratamiento de enfermedades mediadas por MCP-1 o eotaxina, son descritos por la presente.

Por lo tanto en un aspecto posterior la invención incluye un anticuerpo para MCP-1 que reacciona entrecruzadamente con eotaxina.

Ventajosamente los anticuerpos de éste aspecto de la invención son anticuerpos que son capaces de inhibir el enlace de MCP-1 a su receptor y son capaces de inhibir el enlace de eotaxina a su receptor.

En aspectos aun posteriores la invención incluye:

- i) El uso de un anticuerpo para MCP-1 que reacciona entrecruzadamente con eotaxina-1 que es capaz de inhibir el enlace de MCP-1 y eotaxina-1 a sus receptores, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o problema MCP-1 mediado o eotaxina-1 mediado;
- ii) Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo para MCP-1 que reacciona entrecruzadamente con eotaxina-1 que es capaz de inhibir el enlace de MCP-1 y eotaxina a sus receptores, en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable, diluyente o vehículo.

En estos aspectos posteriores el anticuerpo MCP-1 preferiblemente reacciona entrecruzadamente con eotaxina-1 y las enfermedades eotaxina-mediadas son preferiblemente enfermedades eotaxina-1 mediadas.

Para los propósitos de la presente descripción un anticuerpo es “capaz de inhibir el enlace de MCP-1 y eotaxina a sus receptores” si el anticuerpo es capaz de inhibir el enlace de MCP-1 y eotaxina a sus receptores substancialmente hasta el mismo punto que los anticuerpos AAV294, AAV293 o ABN912, donde “hasta el mismo punto” tiene sentido como definido arriba.

En la presente descripción la frase “enfermedad MCP-1 mediada” y “enfermedad eotaxina-mediada” abarca todas las enfermedades y condiciones médicas en las cuales MCP-1 o eotaxina, en particular eotaxina-1, juega un papel, que puede ser directo o indirecto, en la enfermedad o condición médica, incluyendo la causa, desarrollo, progresión, persistencia o patología de la enfermedad o condición.

En la presente descripción los términos “tratamiento” o “tratar” se refieren a ambos tratamientos profilácticos o preventivos como también curativos o tratamiento modificador de la enfermedad, incluyendo tratamiento del paciente en riesgo de contraer la enfermedad o sospechoso de haber contraído la enfermedad como también a pacientes que están enfermos o han sido diagnosticados de sufrir de una enfermedad o condición médica, que incluyen supresión del relapso clínico.

Los anticuerpos AAV293 y ABN912 tienen afinidad de enlace para MCP-1 que es más alto que afinidades previamente reportadas para anticuerpos anti-MCP-1, por ejemplo anticuerpos anti MCP-1 humanos. Por lo tanto ABN912 tiene una constante de equilibrio de disociación K_D para enlazarse a MCP-1 de menos de aproximadamente 50 pM, por ejemplo aproximadamente 43 pM. Esta alta afinidad de enlace hace del ABN912 particularmente apropiado para aplicaciones terapéuticas.

Por lo tanto en otro aspecto posterior la invención provee un anticuerpo para MCP-1 que tiene un K_D para enlazarse a MCP-1 de aproximadamente 50 pM o menos. Éste aspecto de la invención también incluye usos, métodos y composiciones para tales anticuerpos de alta afinidad, como los descritos arriba para anticuerpos para MCP-1 que reaccionan entrecruzadamente con eotaxina.

Además de acuerdo con la presente invención se ha encontrado que el anticuerpo ABN912 se enlaza a un epítopo antigénico de MCP-1 que incluye el residuo Arginina en la posición 24 de MCP-1. Por lo tanto ventajosamente el anticuerpo ABN912 es capaz de interferir directamente con el enlace de MCP-1 a su receptor (CCR2B); Arg24 es un residuo importante de MCP-1 para el enlace de MCP-1 a CCR2B. Adicionalmente el sitio de enlace para ABN912 incluye el Arg18, y residuos Lys49 de MCP-1.

Concordantemente en otro aspecto posterior la invención incluye un anticuerpo para MCP-1 que se enlaza a un epítopo antigénico de MCP-1 que incluye el residuo de Arginina en la posición 24 de MCP-1. Preferiblemente el

epitopo antigénico también incluye el residuo de Arginina en la posición 18 y el residuo de Lisina en la posición 49 de MCP-1. Similarmente este aspecto de la invención incluye usos, métodos y composiciones como descritas arriba para anticuerpos para MCP-1 que reaccionan entrecruzadamente con eotaxina.

5 Las moléculas MCP-1 de enlace como se definen arriba, en particular moléculas MCP-1 de enlace de acuerdo al primer y segundo aspecto de la invención; anticuerpos para MCP-1 que reaccionan entrecruzadamente con eotaxina, en particular anticuerpos que son capaces de inhibir el enlace de MCP-1 y eotaxina a sus receptores; anticuerpos para MCP-1 que tienen un K_D para enlazarse a MCP-1 de aproximadamente 50 pM o menos; y anticuerpos para MCP-1 que se enlanzan a un epitopo antigénico de MCP-1 que incluye residuo de Arginina en la posición 24 de MCP-1 y de
10 aquí en adelante se refiere a éstos como "Anticuerpos de la Invención".

Preferiblemente los Anticuerpos de la Invención son moléculas MCP-1 de enlace de acuerdo al primero y segundo aspectos de la invención. Ventajosamente los Anticuerpos de la Invención son anticuerpos humanos, más preferiblemente el anticuerpo ABN912 o el equivalente directo del mismo.
15

Los Anticuerpos de la Invención inhiben los efectos de MCP-1 en su células objetivo y por lo tanto son indicados para uso en el tratamiento de enfermedades o problemas MCP-1 mediados. Éstas y otras actividades farmacológicas de los Anticuerpos de la Invención pueden ser demostradas en métodos de prueba estándar, por ejemplo como se describen abajo:
20

1. Inhibición de enlace de MCP-1 a células de expresión CCR2B

Un prerrequisito para funciones de señalización y efectoras de MCP-1 es su interacción con el receptor CCR2B. La tecnología de ensayo de proximidad de centelleo (SPA) es usado para demostrar que Anticuerpos de la Invención inhiben el enlace de MCP-1 a membranas celulares que expresan éste receptor.
25

Membranas de CCR2B expresando células CHO son incubadas con un rango de concentración desde anticuerpo objetivo (por ejemplo 10^{-14} M a 10^{-8} M) y el enlace residual de (125-1)-MCP-1 es medido por SPA usando cuentas de aglutinina de germen de trigo. Anticuerpos de la Invención típicamente tienen un IC_{50} s en el rango de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 nM, especialmente de aproximadamente 0.5 nM (por ejemplo 461 ± 206 pM) al ponerse a prueba en éste ensayo.
30

2. Inhibición de la señalización MCP-1 mediada

El potencial de Anticuerpos de la Invención para inhibir efectos fisiológicos provocados por MCP-1 es determinado midiendo la movilización celular de Ca^{2+} inducida por MCP-1 en la presencia y ausencia del anticuerpo.
35

La medida de la respuesta del calcio es realizada con un CCR2B ejecutado establemente expresando la línea celular CHO y con células THP-1 con uso de tinciones fluorescentes y análisis FACS como descrito de aquí en adelante en los Ejemplos. Anticuerpos de la Invención típicamente tienen un IC_{50} s en el rango desde aproximadamente 0.05 a aproximadamente 10 nM, especialmente de aproximadamente 0.5 nM (por ejemplo 390 ± 20 pM) al ponerse a prueba en este ensayo.
40

Los Anticuerpos de la Invención ventajosamente reaccionan entrecruzadamente con eotaxina, en particular eotaxina-1, y por lo tanto ventajosamente pueden inhibir los efectos de eotaxina en sus células objetivo y por lo tanto son adicionalmente indicadas para uso en el tratamiento de eotaxina puede ser determinada usando tecnología de biosensor óptico, tal como BIAcore (Karlsson *et al.* J. Immunol. Meth. 1991; 145:229-240).
45

Como se indica en los ensayos de arriba los Anticuerpos de la Invención bloquean potentemente los efectos de MCP-1, y preferiblemente reaccionan entrecruzadamente con eotaxina. Concordantemente, los Anticuerpos de la Invención tienen utilidad farmacéutica como sigue:
50

Los Anticuerpos de la Invención son útiles para la profilaxis y tratamiento de enfermedades o condiciones médicas mediadas por MCP-1 o eotaxina. MCP-1 juega un papel importante en el tráfico de leucocitos, en particular en la migración de monocitos de sitios inflamatorios y por lo tanto los Anticuerpos de la Invención pueden ser usados para inhibir la migración de monocitos por ejemplo en el tratamiento de condiciones inflamatorias, alergias y condiciones alérgicas, enfermedades autoinmunes, rechazo de injertos, cánceres que involucran infiltración de leucocitos, estenosis o reestenosis, ateroesclerosis, artritis reumatoidea y osteoartritis. Enfermedades o condiciones que pueden ser tratadas con los Anticuerpos de la Invención incluyen: condiciones inflamatorias o alérgicas, incluyendo enfermedades respiratorias alérgicas tales como asma, rinitis alérgica, COPD, enfermedades pulmonares por hipersensibilidad, neumonitis por hipersensibilidad, enfermedad pulmonar intersticial (ILD), (por ejemplo fibrosis pulmonar idiopática, o ILD asociada con enfermedades autoinmunes tales como RA, SLE, etc.); anafilaxia o respuestas por hipersensibilidad, alergias a fármacos (por ejemplo a penicilinas o cefalosporinas), y alergias a picaduras de insectos; enfermedades inflamatorias del intestino, tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa; espondiloartropatías, esclerodoma; psoriasis y dermatosis inflamatorias tales como dermatitis, eczema, dermatitis atópica, dermatitis alérgica por contacto, urticaria; vasculitis;
55 60 65

ES 2 322 643 T3

Enfermedades autoinmunes, en particular enfermedades autoinmunes con una etiología incluyendo un componente inflamatorio tales como artritis (por ejemplo artritis reumatoide, artritis crónica progresiva, artritis psoriática y artritis deformans) y enfermedades reumáticas, incluyendo condiciones inflamatorias y enfermedades reumáticas que involucran perdida de hueso, dolor inflamatorio, hipersensibilidad (incluyendo hipersensibilidad de ambas vías respiratorias e hipersensibilidad reumática) y alergias. Enfermedades auto-inmunes específicas para las cuales los Anticuerpos de la Invención pueden ser utilizados incluyen problemas hematológicos autoinmunes (incluyendo por ejemplo anemia hemolítica, anemia aplásica, anemia de glóbulos rojos puros, trombocitopenia idiopática), lupus eritematoso sistémico, policondritis, esclerodema, granulomatosis de Wegener, dermatomiositis, hepatitis activa crónica, miastenia gravis, psoriasis, síndrome de Steven-Johnson, *sprue* idiopático, enfermedad intestinal inflamatoria autoinmune (incluyendo por ejemplo colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, Síndrome de Intestino Irritable), tiroiditis autoinmune, enfermedad de Behcet, oftalmopatía endocrina, enfermedad de Graves, sarcoidosis, esclerosis múltiple, cirrosis primaria biliar, diabetes juvenil (diabetes mellitus tipo I), uveítis (anterior y posterior), queratoconjuntivitis sicca y queratoconjuntivitis vernal, fibrosis pulmonar intersticial, y glomerulonefritis (con y sin síndrome nefrótico, por ejemplo incluyendo síndrome nefrótico idiopático o nefropatía de cambios mínimos); rechazo de injerto (por ejemplo en trasplantes incluyendo corazón, pulmón, corazón-pulmón combinado, hígado, riñón, pancreático, piel, o trasplantes de córnea) incluyendo rechazo de aloinjerto o rechazo de xenoinjerto o enfermedad de injerto-versus-huésped, y arterioesclerosis asociada con trasplante de órganos; atherosclerosis; cáncer con infiltración de leucocitos de la piel u órganos; estenosis o reestenosis de la vasculatura, particularmente de las arterias, por ejemplo la arteria coronaria, incluyendo estenosis o reestenosis que resulta de intervención vascular, como también hiperplasia neointimal; y otras enfermedades o condiciones que involucran respuestas inflamatorias incluyendo lesión de reperfusión, malignidades hematológicas, toxicidad inducida por citoquina (por ejemplo choque séptico o choque endotóxico), polimiositis, dermatomiositis, y enfermedades granulomatosas incluyendo sarcoidosis.

Los Anticuerpos de la Invención son particularmente útiles para tratar enfermedades del metabolismo de hueso y cartílago incluyendo osteoartritis, osteoporosis y otras artritis inflamatorias, por ejemplo artritis reumatoide, y pérdida de hueso en general, incluyendo pérdida de hueso relacionada con la edad, y en particular enfermedad periodontal.

Para las indicaciones arriba mencionadas, la dosis apropiada será, por supuesto, variable dependiendo de, por ejemplo, al particular Anticuerpo de la Invención que va a ser empleado, el huésped, el modo de administración y la naturaleza y severidad de la condición que está siendo tratada. Sin embargo, en uso profiláctico, se indica generalmente que se obtienen resultados satisfactorios a dosis desde aproximadamente 0.05 mg a aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal, más usualmente desde aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 5 mg por kilogramo de peso corporal. La frecuencia de la dosificación para uso profiláctico estará normalmente entre el rango de aproximadamente una vez por semana hasta aproximadamente una vez cada 3 meses, más usualmente en el rango de aproximadamente una vez cada 2 semanas hasta aproximadamente una vez cada 10 semanas, por ejemplo una vez cada 4 u 8 semanas. El Anticuerpo de la Invención es convenientemente administrado parenteralmente, intravenosamente, por ejemplo, en la vena antecubital u otra vena periférica, intramuscularmente, o subcutáneamente. Por ejemplo, un tratamiento profiláctico típicamente comprende la administración del Anticuerpo de la Invención una vez al mes hasta una vez cada 2 o 3 meses, o menos frecuente.

Composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser manufacturadas de forma convencional. Una composición de acuerdo a la invención es preferiblemente provista en forma liofilizada. Para la administración inmediata es disuelta en un vehículo acuoso adecuado, por ejemplo agua estéril para inyección o solución salina fisiológica amortiguada estéril. Si se considera deseable hacer una solución de mayor volumen para administración por infusión en lugar de un bolo inyectable, es ventajoso incorporar albúmina de suero humano o la sangre heparinizada del paciente en la solución salina en el momento de la formulación. La presencia de un exceso de tales proteínas inertes fisiológicas previene la pérdida del anticuerpo por adsorción en las paredes del envase y tubos usados con la solución de infusión. Si se usa albúmina, una concentración apropiada es desde 0.5 a 4.5% por peso de la solución salina.

La invención es posteriormente descrita por medio de ilustraciones sólo en los siguientes Ejemplos, que hacen referencia a los diagramas que los acompañan:

Figura 1

A - Una gráfica que muestra actividad de eosinofiloperoxidasa (EPO) para varias biopsias por perforación, de monos Rhesus tratados y no tratados;

B - Una gráfica similar que muestra actividad mieloperoxidasa (MPO) para las biopsias;

Figura 2 - fotografías que muestran tinción eosinofílica para muestras histológicas de cuatro monos Rhesus ambos antes y después de tratamiento con ABN912 y CGP44290 (un anticuerpo control);

Figura 3 - gráficas que muestran migración (%) de células Th en trasplantes de piel humana para varios sistemas de tratamiento, y

Figura 4 - una gráfica que muestra las afinidades relativas de enlace de mutantes ABN912 para enlazarse a MCP-1.

ES 2 322 643 T3

Ejemplos

- Ratones transgénicos elaborados para expresar el repertorio humano IgG κ en lugar de el repertorio de inmunoglobulina de murina (Fishwild *et al.*, 1996, Nat Biotechnol., 14, 845-851) son usados para generar anticuerpos para MCP-1 humano. Las células B de estos ratones son inmortalizadas por tecnología hibridoma estándar y células hibridoma de murina son obtenidas las cuales secretan el anticuerpo IgG3 κ humano AAV293.

Ejemplo 1

10 *Inmunización de Ratones y Generación de la Línea Celular de Hibridoma*

Inmunización

15 Cuatro ratones Medarex (ratones Nos. 16194-16197, Medarex Inc. Annadale, NJ, USA) son inmunizados con MCP-1 recombinante humano (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), 100 μ g de proteína por ratón en Adyuvante de Freund Completo en los días 0 a 14 (i.p.) y dia 26 (i.v.). En el día 41 ninguno de los ratones muestra suero de anticuerpo detectable. Los ratones son posteriormente inmunizados con rhMCP-1, 100 μ g de proteína por ratón s.c. en Adyuvante de Freund Incompleto en los días 49 y 65. Cuando fueron ensayados en el día 106, se detectó un substancial 20 título de anticuerpo anti-MCP-1 en el suero de uno de los ratones (ratón No. 16194). Éste ratón es reforzado 7 veces adicionales antes de la fusión: 100 μ g de proteína por ratón en salina los días 106 (i.p.), 119 (s.c.) y 135 (i.p.), y 25 μ g de proteína por ratón en salina los días -4 (x2 - i.v. e i.p.) y -3 y -2 (ambos i.p.) antes de la fusión.

25 *Fusión y Selección de Hibridoma*

En el día de la fusión el ratón 16194 es sacrificado por inhalación de CO₂ y las células totales del bazo (4.8×10^7) son fusionadas por un método de rutina usando PEG 4000 con células PAI-O (5×10^7), una línea celular de mieloma de ratón. Las células fusionadas son cultivadas en placas en 720 pozos (1 ml/pozo) que contiene una capa alimentadora de células peritoneales de ratón (Balb/c ratón), en RPMI 1640 suplementado con HAT, 10% suero fetal de ternero inactivado con calor, 5×10^{-5} M β -mercaptoetanol 50 μ g/ml Gentamicina. El medio de cultivo es intercambiado cada 4^o día y después de 14 días el medio HAT es intercambiado por medio HT, es decir que se omite Aminopterina. De los 30 720 pozos inicialmente cultivados, 461 pozos (64%) son positivos para crecimiento de hibridoma. Los sobrenadantes 35 son recolectados y examinados para anticuerpos monoclonales reactivos de MCP-1 en un ELISA. Siete anticuerpos monoclonales de la subclase IgG son identificados. La clonación es realizada usando placas microtítulo de pozos 4 x 96, cultivando en las placas 0.5 células/100 μ l por pozo. Los clones son revisados microscópicamente después de 8 días, 100 μ l de medio de cultivo son agregados y probados para sobrenadante al día siguiente en un ELISA. El hibridoma más reactivo, clon 149 es seleccionado para posterior clonación y caracterización. El sub clon 149-12 de 40 hibridoma es seleccionado basado en la actividad inhibitoria en un ensayo de movilización de calcio dependiente de rhMCP-1 de su producto IgG3 κ anticuerpo monoclonal, AAV293.

Pureza y secuencias parciales de aminoácidos de secuenciamento de Aminoácidos de cadena pesada y ligera

45 Cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo purificado AAV293 son separadas por SDS-PAGE y los aminoácidos amino-terminales son determinados por degradación Edman. Secuencias cADN codificando para los dominios variables de cadena pesada y ligera son obtenidos por amplificación PCR de cADN obtenido de mARN de las células hibridoma clonadas y completamente secuenciadas. Las secuencias del aminoácido amino-terminal de dominios variables de cadena pesada y ligera y las correspondientes secuencias de ADN son dadas en Seq. Id. No. 1 y Seq. Id. No. 50 2 abajo, en los cuales se muestran los CDRs en letra en negrilla.

55

60

65

ES 2 322 643 T3

Seq. Id no. 1

	30	60
5	GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GGA GGC TTG GTC CAG CCT GGG GGG TCC CTG AGA CTC	
	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser	
10	Leu Arg Leu	
	10	20
	90 CDR1	
15	TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGT CAC TAC TGG ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT	
	Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr Trp Met Ser Trp Val	
20	Arg Gln Ala	
	30	40
	150 CDR2	
25	CCA GGG AAA GGG CTG GAG TGG CTG GCC AAC ATA GAG CAA GAT GGA AGT GAG AAA TAC TAT	
	Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Asn Ile Glu Gln Asp Gly Ser Glu	
30	Lys Tyr Tyr	
	50	60
	210	
35	GTG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAT TCA CTG TAT	
	Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn	
40	Ser Leu Tyr	
	70	80
	270	
45	CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TTC TGT GCG AGG GAT CTT	
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala	
50	Arg Asp Leu	
	90	100
	CDR3	
55	330	
	GAA GGT CTA CAT GGG GAT GGG TAC TTC GAT CTC TGG GGC CGT GGC ACC CTG GTC ACC GTC	
	Glu Gly Leu His Gly Asp Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr	
60	Leu Val Thr Val	
	110	120
	TCT TCA	
65	Ser Ser	

ES 2 322 643 T3

Seq. Id no. 2

	30	60
5	GCC ATC CAG TTG ACA CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ATC	
10	Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Ile	10 20
15		
20	CDR1 90	120
25	CTC ATC TGC CGG GCA AGT CAG GGC GTT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT CAG CAG AAA CCA	
30	Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro	30 40
35		
40	150 CDR2	180
45	GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC CCA TCA	
50	Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser	50 60
55		
60	210	240
65	AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG CCA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT	
70	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Pro Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	70 80
75		
80	270 CDR3	300
85	GAA GAT TTT GCA ACT TAT TTC TGT CAA CAG TTT AAT AGT TAC CCT CTC ACT TTC GGC GGA	
90	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly	90 100
95		
100	GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGA ACT	
105	Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr	

Un anticuerpo posterior monoclonal anti-MCP-1 es también obtenido como se describe arriba, el producto del anticuerpo monoclonal IgG1/ κ , AAV294. Este anticuerpo enlaza a MCP-1 con aproximadamente 3-veces menos afinidad que el anticuerpo AAV293 y se encuentra que tiene secuencias de aminoácido V_H y V_L que son idénticas a aquellas del anticuerpo AAV293 excepto que, en V_H AAV294 tiene Val en lugar de Ala en la posición 24, Phe en lugar de Tyr en la posición 60 y Ser en lugar de Asn en la posición 74, y en V_L AAV294 tiene Tyr en lugar de Ser en la posición 30 y Thr en lugar de Pro en la posición 69.

ES 2 322 643 T3

Construcción de vectores de expresión para cadenas pesadas y ligeras

Los V_L y V_H clonados que codifican secuencias fueron amplificados por PCR e insertados por medio de sitios apropiados de restricción en vectores casete que proveen el promotor de inmunoglobulina, las secuencias líder del anticuerpo RFT2 (Heinrich *et al.* (1989) J. Immunol. 143, 3589-97), parte de los segmentos J y un sitio de empalme del donador. El casete de cadena ligera que contiene la región entera V_L , secuencia promotor y líder para secreción fue transferida a un vector de expresión que contiene el gen Ck humano, el mejorador de cadena pesada de inmunoglobulina, y la murina modificada dhfr cADN para selección por metotrexato (MTX).

El casete de cadena pesada fue transferido concordantemente a un vector de expresión codificando el gen humano IgG4, el mejorador de cadena pesada de inmunoglobulina, y el gen de resistencia a neomicina para selección.

Ambas cadenas pesada y ligera están en una configuración en los vectores de expresión que asemeja la configuración del genoma de genes de inmunoglobulina reorganizados la cual se piensa que es crucial para expresión de alto nivel.

Para la producción de anticuerpos los vectores de arriba son co-transfeccionados a una línea celular huésped apropiada, por ejemplo la línea celular SP2/0. Células que contienen las secuencias vector son seleccionadas por selección de metotrexato, y líneas celulares seleccionadas son cultivadas para expresar el anticuerpo ABN912 (humano IgG4/κ anti-humano anticuerpo MCP-1).

Se alinearon vectores de expresión que llevan los genes de cadena pesada y ligera de NVP-ABN912, respectivamente, fueron alineados y las células Sp2/0 fueron transfectadas por electroporación. Las células transfectadas crecieron por 20 horas en medio no selectivo RPMI con suero fetal de ternero (FCS) y selección G418 fue aplicada por 48-72 horas a 1.4 mg/ml. Se adaptaron recipientes transfectados para medio RPMI libre de FCS que contiene aditivos comúnmente usados (Piruvato, glutamina, albúmina de suero humana, transferrina, insulina). Clones de alta producción fueron aislados después de amplificación de dos pasos con metotrexato a 200 nM y 1 μ M. La estabilidad de producción de clones y sub-clones fue evaluada en cultivos T175 sobre un período de tiempo de cuatro-cinco meses de cultivo continuo, con experimentos adicionales. Para clones de alta producción fue realizada una escala más arriba de escala de laboratorio a cultivación por biorreactor. Fueron obtenidas varias líneas celulares de alta producción, útiles para producción de ABN912. La cantidad máxima de producto acumulado obtenido en cultivos de sobre crecimiento fue 504 mg/l.

35 Ejemplo 2

Datos Bioquímicos y Biológicos

El anticuerpo monoclonal humano ABN912 se enlaza a MCP-1 humano y neutraliza su función in vitro. El anticuerpo monoclonal es posteriormente caracterizado por su enlace con MCP-1 recombinante humano por dos métodos bioquímicos independientes, por análisis Biacore y análisis por ensayo de proximidad de centelleo (SPA). La especificidad del anticuerpo ABN912 para otras CC-quimoquininas o MCP-1 no humano es evaluado por BIACore y la inhibición de enlace de MCP-1 a células expresando CCR2B por ABN912 es demostrado por SPA. La actividad biológica de ABN912 hacia MCP-1 recombinante y producido naturalmente es demostrado en ensayos de movilización de Ca^{2+} en células que expresan CCR2B. La actividad de ABN912 hacia sus células objetivo naturales, monocitos de sangre humana periférica (hPBMC), es demostrado por un ensayo de quimiotaxis indicado por MCP-1.

2.1 Análisis BIACore

Las constantes de índice de asociación y disociación para el enlace de MCP-1 recombinante humano a ABN912 inmovilizado están determinadas por análisis BIACore y el valor derivado de K_D . El ABN912 es inmovilizado sobre una superficie con sensores y el enlace de MCP-1 recombinante es medido por resonancia plasmón de superficie (BIACORE 2000 Instrument Handbook. March 1999 (Version AC); <http://www.biacore.com>). Los resultados obtenidos se dan en la Tabla de abajo.

Constante de índice de Asociación [$M^{-1}s^{-1}$]	(n=30)	$(1.3 \pm 0.1) \times 10^7$
Constante de índice de Disociación [s^{-1}]	(n=30)	$(5.0 \pm 0.1) \times 10^{-4}$
Constante de equilibrio de Disociación K_D [M]	(n=30)	$(43.0 \pm 2.9) \times 10^{-12}$

ABN912 se enlaza a MCP-1 recombinante humano con una afinidad muy alta.

2.2. Selectividad de Quimioquina y perfil específico por especie

Para poder determinar la especificidad de la interacción de MCP-1 con ABN912, un número de MCP-1 no-humano y CC-quimioquinas son evaluadas por su potencial para interacturar con ABN912 por BIACore.

5 2.2.1 Interacciones con MCP-1 no-primate

Una serie de MCP-1 de especies comúnmente usadas en laboratorios es evaluada para enlaces al anticuerpo ABN912. Las medidas son realizadas inyectando una solución de 5 nM de quimioquina en una célula de flujo de 10 BIACore que fue previamente cargada con ABN912. Después de 8 minutos la cantidad de quimioquina enlazada es medida para cada quimioquina investigada. Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla de abajo como el porcentaje enlazándose a cada quimioquina comparado a MCP-1 recombinante humano (100%).

Quimioquina	Porcentaje de enlace de ABN912 Promedio \pm SEM, n = 3
Rec hu MCP-1	100
Rec ratón JE/MCP-1	-0.4 \pm 0.2
Rec rata MCP-1	-0.2 \pm 2.3
Rec conejo MCP-1	0.9 \pm 0.4
Rec perro MCP-1	1.3 \pm 0.3
Rec cerdo MCP-1	0.5 \pm 0.4
Rec cobayo MCP-1	2.3 \pm 0.2
ABN912 es específico para MCP-1 humano y no reacciona entrecruzadamente con el MCP-1 de ninguna de las otras especies muestreadas.	

35 2.2.2 Interacciones con quimioquinas recombinantes

Para lograr determinar el perfil de reactividad cruzada de ABN912 a otras CC-quimioquinas, su potencial de enlace al anticuerpo es evaluado por el procedimiento descrito arriba. El porcentaje de enlace de cada quimioquina comparado con MCP-1 recombinante humano es mostrado en la Tabla abajo.

Quimioquina	Enlace a ABN912 Promedio \pm SEM, n = 3
rh MCP-1	100
rh MCP-2	6.2 \pm 0.9
rh MCP-3	4.3 \pm 4.3
rh MCP-4	-2.4 \pm 0.6
rh LEC	-2.8 \pm 0.3
rh RANTES	-2.7 \pm 0.4
rh MIP- 1 α	-2.8 \pm 0.9
rh MIP- 1 β	-2.9 \pm 0.1
rh eotaxina	52.6 \pm 1.9
ABN912 es específico para MCP-1 humano y no reacciona entrecruzadamente con MCP-2, MCP-3, MCP-4, LEC, RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β , pero si reacciona entrecruzadamente significativamente con eotaxina humana, es decir eotaxina-1 humana. También se encontró que el AAV294 reacciona entrecruzadamente significativamente con eotaxina.	

ES 2 322 643 T3

2.3 Inhibición de enlace de MCP-1 a células que expresan CCR2B

La tecnología SPA (Ensayo de Proximidad de Centelleo) es usada para mostrar que el anticuerpo ABN912 previene MCP-1 de enlazarse a las membranas celulares que expresan el receptor CCR2B. Membranas CCR2B que expresan 5 células CHO (CHO#84 - ver abajo) son incubadas con un parámetro de concentraciones de ABN912 (10^{-14} M a 10^{-8} M) y el enlace residual de (125-I)-MCP-1 radioactivo es medido por SPA usando cuentas de aglutinina de germen de trigo. El promedio IC_{50} [M] obtenido de tres experimentos independientes es $(461 \pm 206) \times 10^{-12}$. ABN912 previene MCP-1 de enlazarse a membranas celulares que expresan el receptor CCR2B.

10

2.4 Inhibición de señalización mediada por MCP-1

15

Un evento temprano de señalización inducida por MCP-1 es la movilización de Ca^{2+} intracelular que puede ser medido usando tinciones fluorescentes.

15

20

25

Mediciones de respuestas de calcio son realizadas usando la línea celular CHO#84, una línea celular CHO transfecada establemente para expresar el receptor de quimioquina CCR2B. Las células CHO#84 son cultivadas en medio MEM alfa sin ribonucleasas y deoxiribonucleasas, con glutamax-1 suplementado con FCS dializado al 10%, 200 U/ml de Penicilina/Estreptomicina y 80 nM de metotrexato como agente selectivo. Cuando el cultivo celular es denso pero antes de su confluencia, las células son lavadas con PBS y separadas por una incubación corta con tripsina-EDTA (1 min max).

30

Las células CHO#84 son lavadas una vez están en RPMI, por 7 min en centrifugación a 250g y resuspendidas a 3.5×10^6 células/ml en amortiguador Hepes 0.5% BSA que contiene 0.04% de ácido pluronico, 1.0 μ M de rojo fura y 0.3 μ M de fluo-3. Las células son cargadas con estas sondas fluorescentes de calcio por 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad, con agitación suave de vez en cuando (6-8 veces). Las células son recolectadas dos veces en amortiguador Hepes 0.5% BSA por centrifugación, y el aglomerado es resuspendido a 1.5 para 2×10^6 células/ml en amortiguador Hepes 0.5% BSA. Las células están ahora listas para estimulación y medición de calcio y son almacenadas a temperatura ambiente en la oscuridad hasta su uso.

35

40

45

Tanto los anticuerpos como la quimioquina (MCP-1, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) son preparados como soluciones de 24 veces la concentración y mezcladas una con la otra a temperatura ambiente por 5-8 min antes de agregarlo a las células. Ambas fluorescencias, la verde y la roja, son medidas versus tiempo con un citómetro de flujo (FACS, Becton Dickinson). Para cada muestra celular, la fluorescencia de las células precargadas con las sondas de Ca fluorescentes es primero registrada por 15 segundos para obtener los valores de estado basal. La adquisición de datos es interrumpida brevemente para estimular las células con la adición de un pequeño volumen de estímulo (diez veces concentrado de quimioquina con o sin anticuerpo) y las medidas de fluorescencia son resumidas. La medición total de fluorescencia tarda 51 segundos.

50

Los indicadores de Ca^{2+} usados exhiben cambios recíprocos en intensidad de fluorescencia sobre el enlace a calcio; la fluorescencia de rojo fura disminuye mientras que la fluorescencia fluo-3 aumenta. Para cada experimento, la fluorescencia roja y verde son registradas y las proporciones entre la fluorescencia verde y roja son calculadas y graficadas contra tiempo. Una "proporción de estado basal" y una "proporción de estimulación" son respectivamente definidas como el valor media de las proporciones obtenidas justo antes de la estimulación y el valor media de las proporciones máximas obtenido después de la estimulación. La intensidad de la respuesta es cuantificada por un Índice de Estimulación (S.I.) dado por una "proporción de estimulación" dividida por "proporción de estado basal". Los Índices de Estimulación obtenidos en la presencia de anticuerpo son expresados como porcentaje de S.I. obtenido en la presencia del solvente solo.

55

La inhibición (%) de un anticuerpo A1 disuelto en solvente S1 es dado por la fórmula:

$$100 - [S.I._{A1} \times 100] / S.I._{S1}$$

55

60

La inhibición por ABN912 es comparada a la del anticuerpo precursor, AAV293, y un anti-MCP-1 murina anticuerpo no relacionado disponible comercialmente (R&D Systems). También como el inmunógeno usado para cultivar AAV293 fue MCP-1 humano no glicosilado recombinante de *E. coli*, sobrenadante MCP-1 de TNF α -estimulado HUVEC (Células Endoteliales de la Vena Umbilical Humana) también es usado para estimular las células CHO#84 y el efecto antagonista de ABN912 en medidas de movilización de Ca^{2+} como fue descrito arriba. Los resultados obtenidos están dados en la Tabla abajo

65

ES 2 322 643 T3

MCP-1 Humano		MCP-1 Anti-humano mAb		
Fuente	Molaridad (nM)	ABN912 Humano (IC ₅₀ en nM)	AAV293 Humano (IC ₅₀ en nM)	Murina R&D Sistemas (IC ₅₀ en nM)
<i>E. coli</i> (noglicosilado)	0.3	0.1 ± 0.02	0.20 ± 0.00	
	1	0.39 ± 0.02	0.66 ± 0.16	0.73 ± 0.09
	3	1.53 ± 0.47	2.12 ± 0.06	
HUVEC (glicosilado)	1	0.33 ± 0.01	0.73 ± 0.04	0.95 ± 0.49
ABN912 inhibe específicamente la movilización de Ca ²⁺ inducida por MCP-1 en células CHO#84, con potencia similar tanto para MCP-1 derivado de E. Coli como para MCP-1 derivado de HUVEC.				

2.5 Inhibición de quimiotaxis MCP-1 inducida

La habilidad de ABN912 para inhibir el efecto quimiotáctico de MCP-1 en hPBMC (Células Monocíticas de Sangre humana Periférica) es medida en una cámara de Boyden basado en ensayos de quimiotaxis. Los HPBMC son preparados con Lymphoprep™ y 2 x 10⁶ monocitos por ml son usados como entrada. ABN912 o un anticuerpo no relacionado (control negativo) es agregado a las proporciones molares indicadas en los compartimentos inferiores y superiores de cada cámara. La quimiotaxis es inducida con 5.7 nM de MCP-1 recombinante humano o 1 nM fMIFL (control negativo) en la cámara inferior. Se le permite a las células migrar de la cámara superior a la cámara inferior por un período de 90 minutos a temperatura ambiente. El número de células que han migrado es determinado por tinción y conteo. Se encontró que la dosis de ABN912 inhibe dependientemente la quimiotaxis MCP-1 inducida de hPBMCs. El efecto de ABN912 en quimiotaxis MCP-inducida es específico; el anticuerpo no relacionado no tiene efecto y ABN912 no tiene efecto en quimiotaxis fMIFL inducida.

2.6 Inhibición de emigración de leucocitos en monos Rhesus

Este modelo mecánico fue usado para probar si la emigración MCP-1-inducida de leucocitos a la piel de monos Rhesus pude ser inhibida por NVP-ABN912 cuando es administrado como un bolo inyectable i.v.

Monos Rhesus adultos machos fueron inyectados con 30 µg/kg IL-3 por 13 días (dos veces al día, i.v.) para estimular las cuentas de leucocitos y preparar las células endoteliales para un reclutamiento de leucocitos óptimo. En el día 13 los monos fueron anestesiados y se inyectó MCP-1 (10 µg) en triplicados intradérmicos en el lado derecho del pecho y abdomen. Cuatro horas más tarde, los monos fueron nuevamente anestesiados y se tomaron biopsias perforadoras del sitio de inyección de MCP-1. Después un NVP-ABN912 o un isotipo que correspondía al anticuerpo control negativo humanizado (CGP44290) dirigido contra el antígeno carcinoembriónico humano fue administrado como bolo inyectable i.v. para alcanzar una dosis de 5 mg/kg. Finalmente, MCP-1 (10 µg) fueron inyectados nuevamente en triplicados intradérmicamente en el lado izquierdo del pecho y abdomen. Estos sitios de inyección fueron posicionados simétricamente relativos a la serie de inyecciones previas. Cuatro horas después, los monos fueron anestesiados y se tomaron biopsias perforadoras de los sitios de inyección de MCP-1. Todas las biopsias perforadoras fueron entonces cortadas por mitad y una mitad fue congelada en nitrógeno líquido para análisis enzimático. La segunda mitad fue preservada en formalina para posterior histología. Ensayos enzimáticos para eosinófilos y neutrófilos fueron actividad eosinofilperoxidasa (EPO) y actividad mieloperoxidasa (MPO), respectivamente. Controles con inyecciones PBS y no inyecciones para estimular infiltración celular fueron corridos en paralelo sobre cada mono. No se observaron efectos anticuerpo mediados significativos con ninguno de los controles.

Las actividades enzimáticas en los sitios de inyección de MCP-1 antes y después de tratamiento con NVP-ABN912 y CGP44290 (IgG4, control negativo ajustado a isotipo), respectivamente, son mostrados como media ± DS. Sitios de inyección múltiple (3) fueron usados en todos los monos para cada condición. Datos combinados de dos experimentos realizados independientemente son mostrados en la Figura 1.A Emigración de eosinófilos y Figura 1B emigración de neutrófilos.

Actividades normalizadas EPO (A) o MPO (B) en biopsias perforadoras antes (MCP-1 no tratado, 100%) y después de tratamiento con anticuerpos son mostrados como media ± DS.

Cuando la emigración de leucocitos fue inducida en la piel de monos Rhesus por 10 µg MCP-1, una inhibición de 85.5% de eosinófilo y 81.4% de emigración de neutrófilos fue observada en presencia de NVP-ABN912 comparado con la emigración de leucocitos previa al tratamiento con anticuerpos. Solo aproximadamente 20% de inhibición para ambos tipos de células fue medido cuando CGP44290 fue aplicado. Tomando en consideración que una sola inyección PBS resultó en un reclutamiento de 13.0% (eosinófilos) y 22.7% (neutrófilos) de la respuesta vista con 10 µg de MCP-1, la administración de NVP-ABN912 redujo la cantidad de emigración de leucocitos al nivel de fondo observado con la estimulación PBS. Las diferencias observadas entre NVP-ABN912 y el anticuerpo control son estadísticamente

ES 2 322 643 T3

altamente significativas ($p<0.01$) y considerando la magnitud del efecto, también parece tener relevancia biológica. Histología representativa de emigración de eosinófilos es mostrada en la Figura 2.

Histología de las biopsias perforadoras del experimento de emigración de eosinófilos MCP-1-inducido es mostrado para cuatro monos (2279, 2280, 2281 y 2282).

(A), (B), (E), (F) tinción de eosinófilos antes del tratamiento con anticuerpos de monos 2279, 2280, 2281 y 2282, respectivamente. (C), (D), (G), (H), tinción de eosinófilos después de tratamiento con anticuerpos para monos 2279, 2280, 2281 y 2282, respectivamente. Monos 2279 y 2280 fueron tratados con el anticuerpo control negativo CGP44290 (5 mg/kg) ajustado al isotypio y monos 2281 y 2282 fueron tratados con NVP-ABN912 (5 mg/kg). Los eosinófilos tienen tinción roja (visto como manchas oscuras en blanco y negro) y flechas en paneles (G) y (H) destacan los pocos eosinófilos presentes en los dos monos tratados con NVP-ABN912.

No se observó diferencia entre antes y después del tratamiento con CGP 44290 mientras que se observó casi completa inhibición de emigración de eosinófilos en monos tratados con NVP-ABN912.

2.7 Inhibición de infiltración de célula T en ratones SCID-hu

Este modelo mecánico fue usado para probar si la infiltración MCP-1-inducida de células Th en la piel de ratones Piel SCID-hu puede ser inhibida por inyección i.p. de NVP-ABN912.

Ratones SCID fueron trasplantados con dos pequeñas piezas de piel humana de adulto (Piel SCID-hu). La calidad de los injertos fue monitoreada durante las 5-6 semanas después del trasplante y entonces, ratones con trasplantes exitosos (generalmente >85%) fueron seleccionados para los experimentos de migración *in vivo*. Para la migración quimioquina-inducida, PBMC fueron aislados por separación de gradiente de densidad estándar de muestras de capas leuco-plaquetarias y fueron transferidas adoptivamente (i.p. 1×10^8 células/ratón, 500 μ l volumen) en ratones Piel SCID-hu que fueron previamente transplantados (5-8 semanas) con dos trozos de piel humana (en los lados derecho e izquierdo de la espalda superior). La transferencia de células fue realizada en el día 0. MCP-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN) y PBS fueron administrados intercutáneamente en los injertos humanos en los días experimentales 1, 2, 4 y 6. Ratones control (tratados con CGP44290) recibieron 500 ng de MCP-1 en el injerto de piel de la derecha y un volumen igual (30- μ l) de PBS en el injerto izquierdo. Ratones tratados con NVP-ABN912 fueron inyectados con 500 ng de MCP-1 en ambos, los injertos derecho e izquierdo. NVP-ABN912 y el isotypio control CGP44290 fueron administrados i.p. (100 μ g/ratón, 4 mg/kg, 500 μ l volumen) en el día 0 (5h antes de la transferencia celular) y en los días experimentales 2 y 5. En el día 8, todos los ratones fueron sacrificados y los injertos de piel humana fueron recolectados para análisis posteriores. Suspensiones de una célula de cada injerto de piel humana fueron preparadas usando una DAKO Medimachine® siguiendo las instrucciones del fabricante. Éstas suspensiones celulares fueron teñidas con anti-CD3 y anti-CD4 mAb humanos conjugados para FITC y PE y analizado en un Citómetro de Flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA). Los resultados son dados en la Figura 3. $0.73 \pm 0.15\%$ de células Th humanas infundidas infiltradas en el injerto de piel en el grupo tratado con ABN912 (5 ratones, n= 10) comparado con $3.73 \pm 1.03\%$ encontrado en el correspondiente grupo tratado con CPG44290 (3 ratones, n= 3). En ratones donde la migración celular fue inducida por PBS, $0.34 \pm 0.17\%$ de las células Th infiltraron el injerto de piel humano (3 ratones, n = 3). Análisis estadístico fue realizado con un análisis de una-vía de varianza seguido por comparaciones Dunnett múltiples prueba *post hoc*. La reducción de la infiltración de células Th en ABN912 versus animales tratados con CGP44290, respectivamente, fue altamente significativa ($p<0.01$, **).

2.8 Caracterización del epitopo de enlace ABN912 en MCP-1 humano y modo de acción

La estructura tri-dimensional del complejo de MCP-1 con el fragmento Fab de NVP-ABN912 fue determinado por cristalográfia de rayos X.

El fragmento Fab de NVP-ABN912 fue producido por segmentación proteolítica de todo el anticuerpo y purificado por cromatografía de proteína A seguido de cromatografía por exclusión de tamaño. El complejo entre el Fab y MCP-1 recombinante humano fue purificado por la proteína G y cromatografía por exclusión de tamaño, y concentrado por ultrafiltración a 26 mg/ml en 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1M NaCl. Se cultivaron cristales a temperatura ambiente con la técnica de difusión de vapor en gotas colgantes, en 20% (w/v) PEG 4,000, 10% (v/v) isopropanol, 0.1M Na Hepes pH 7.5. Estaban en el grupo del espacio P2₁2₁2₁ con dimensiones de unidad celular a=63.90 Å, b=86.08 Å, c=321.64 Å y tres complejos por unidad asimétrica. Antes de la recolección de datos, uno de los cristales fue empapado en 17% (w/v) PEG 4,000, 8.5% (v/v) isopropanol, 15% glicerol, 85 mM Na Hepes pH 7.5 por aproximadamente 3 minutos. El cristal después fue montado en un CryoLoop de nylon y fue directamente congelado en una corriente de nitrógeno a 120K. Los datos de difracción fueron medidos con un sistema de imagen de placa MAR 345 en el haz de línea SNBL de el European Synchrotron Radiation Facility ($\lambda = 0.90$ Å). En total 242,617 observaciones, correspondientes a 68,948 reflejos únicos (Rsym = 0.050), fueron recolectados entre 20.0 y 2.33 Å de resolución (89.3% finalización). La estructura fue determinada por reemplazo molecular, usando las estructuras de rayos X del fragmento Fab del anticuerpo monoclonal 3D6 (entrada RCSB 1DFB; He *et al.*, 1992) y de MCP-1 humano (entrada RCSB IDOL; Lubkowski *et al.*, 1997) como modelos iniciales. La estructura fue refinada por dinámicas de ángulo de torsión y minimización de energía usando el programa CNX, a un factor R final de 0.224 (Rlibre = 0.261) para todas las

ES 2 322 643 T3

reflexiones entre 20 y 2.33 Å. El modelo final incluye L1 a L214 y H1 a H222 de ABN912 y residuos 10 a 71 de MCP-1 humano. Tiene buena geometría, con una desviación rms de 0.006 Å en longitud de enlaces y 1.36° en ángulos de enlace.

5 El complejo NVP-ABN912 Fab/humano MCP-1 muestra un gran interfaz de enlace (1,590 Å² de superficie enterrada combinada) involucrando varias interacciones hidrofóbicas y polares como también varias interacciones electrostáticas clave. Los contactos principales al antígeno son mediados por el largo bucle de H-CDR3 de NVP-ABN912 que se dobla sobre el centro del sitio del antígeno combinado y se torna en gran parte enterrado en el complejo. El epitopo de enlace en el MCP-1 humano comprende los residuos de aminoácido Asn 14, Thr 16, Asn 17, Arg 18, Lys 19, Ile 20, Ser 21, Gln 23, Arg 24, Lys 49, Glu 50, Ile 51 y Cys 52. Arg 18, Arg 24 y Lys 49 están involucrados en interacciones electrostáticas con los residuos de anticuerpo Glu L55, Asp H99 y Glu H101, y en interacciones de enlace H con Tyr L94, Trp H33, Asn H50, Gln H53, Asp H99 and Tyr H108. Adicionalmente, la fracción guanidinium de Arg 18 y Arg 24 de MCP-1 están π-apilados contra los anillos aromáticos de Trp H33 y Tyr H32, respectivamente. Interacciones adicionales entre NVP-ABN912 y Tyr 13, Gln 17, Ser 21, Lys 19, Arg 24, y Glu 50 del antígeno son mediadas por ocho moléculas de agua enterradas en el interface de proteína. Ya que Tyr 13 y Arg 24 de MCP-1 han sido implicados en el enlace al receptor quimioquina CCR2B (Hemmerich *et al.*, 1999, Biochemistry, 38; 13013-13025), parece que NVP-ABN912 compite directamente con el receptor para enlace antagonista.

20 2.9 Mapeo de epitopo ABN912 en MCP-1 por mutagénesis sitio-dirigida

Para lograr determinar residuos funcionalmente importantes en MCP-1 para reconocimiento por NVP-ABN912, fue realizado un estudio de mutagénesis escaneo de alanina (Cunningham, B.C. y Wells, J.A. (1989) Science 244, 1081-1085). Primero, la estructura tri-dimensional de MCP-1 (Handel, T.M. y Domaille, P.J. (1996) Biochemistry 35, 6569-6584; Lubkowski, J., Bujacz, G., Boqué, L., Domaille, P.J., Handel, T.M. y Wlodawer, A. (1997) Nature Struct. Biol. 4, 64-69) fue visualmente inspeccionada para identificar residuos expuestos a la superficie usando el software WebLab Viewer. Un total de 39 residuos que podrían potencialmente interactuar con ABN912 fueron mutados individualmente a alanina o lisina (D3K, A48K) con el juego de QuikChange Site-Directed Mutagénesis (Papworth, C., Bauer, J.C., Braman, J. y Wright, D.A. (1996) Strategies 9 (3), 3-4). Los genes mutantes resultantes fueron expresados en células HEK.EBNA primero transfectando las células con dos microgramos de plásmidos de expresión que cargan las secuencias mutantes MCP-1 con el reagente de transfección Geneporter (Gene Therapy Systems). Después de la transfección, las células son incubadas por tres días a 37°C y los sobrenadantes fueron recolectados, centrifugados por 5' y sometidos a purificación por cromatografía de afinidad. Concentraciones de MCP-1 mutante fueron determinadas usando el Ensayo de Proteína (Biorad) con MCP-1 purificado como estándar. Típicamente 40 µg de MCP-1 humano purificado o MCP-1 mutantes fueron obtenidos de 3 ml de cultivo.

35 La afinidad para NVP-ABN912 de MCP-1 y MCP-1 mutante fue medida por resonancia de superficie plasmón con el instrumento BIAcore (BIAcore). Primero, la superficie de sensores del instrumento fue activada y una solución de 30 µg/ml anti-Fcy fue inyectado para enlazarse covalentemente al chip. El anticuerpo NVP-ABN912 fue acumulado sobre la superficie modificada anti-Fcy inyectando una solución de 5 µg/ml. Diluciones de MCP-1 o MCP-1 mutantes fueron preparadas para producir concentraciones finales de 0.75 a 4 nM e inyectadas para enlazarse al NVP-ABN912 inmovilizado sobre estas superficies de sensores. Se continuó con asociación y disociación por 5 min durante los cuales la señal de resonancia de superficie plasmón fue grabada. Las series de titulación fueron después analizadas usando el software de BIAevaluation 3.0 (Software parte de la instalación del instrumento; Handbook Cat.No. BR-1002-29; edition 7-97). Los resultados son dados en la Figura 3 que muestra el enlace de MCP-1 y MCP-1 mutantes a NVP-ABN912.

40 Los principales determinantes de MCP-1 para reconocimiento de NVP-ABN912, identificado como fue descrito arriba, son los residuos T16, R18, R24 y K49. La mutación de T16, R18 y R24 a alanina suprimieron completamente el enlace a NVP-ABN912, mientras que la mutación de K49 a alanina resultó en una disminución de afinidad de 133 veces.

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de enlace proteína quimioatrayente de monocito humano (MCP-1) compuesta de dominios variables de cadena pesada (V_H) y cadena ligera (V_L) en los cuales dicha molécula de enlace MCP-1 comprende por lo menos un sitio de enlace de antígeno que comprende:
- 10 a) un dominio variable de cadena pesada (V_H) de inmunoglobulina que comprende en secuencia regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, teniendo dicho CDR1 la secuencia de aminoácido His-Tyr-Trp-Met-Ser, teniendo dicho CDR2 la secuencia de aminoácido Asn-Ile-Glu-Gln-Asp-Gly-Ser-Glu-Lys-Tyr-Tyr-Val-Asp-Ser-Val-Lys-Gly, y dicho CDR3 teniendo la secuencia de aminoácido Asp-Leu-Glu-Gly-Leu-His-Gly-Asp-Gly-Tyr-Phe-Asp-Leu, y
- 15 b) una cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que comprende en secuencia regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3', dicho CDR1' teniendo la secuencia de aminoácido Arg-Ala-Ser-Gln-Gly-Val-Ser-Ser-Ala-Leu-Ala, teniendo dicho CDR2' la secuencia de aminoácido Asp-Ala-Ser-Ser-Leu-Glu-Ser, y teniendo dicho CDR3' la secuencia de aminoácido Gln-Gln-Phe-Asn-Ser-Tyr-Pro;
- 20 2. Una molécula de enlace MCP-1 de acuerdo a la reivindicación 1, que es un anticuerpo humano.
- 25 3. Una molécula de enlace MCP-1 que comprende por lo menos un sitio de enlace a antígeno que comprende un primer dominio que tiene una secuencia de aminoácido idéntica a aquella mostrada en Seq. Id. No. 1 comenzando con el aminoácido en posición 1 y terminando con el aminoácido en posición 122 y un segundo dominio que tiene una secuencia de aminoácido substancialmente idéntica a aquella mostrada en Seq. Id. No. 2, comenzando con el aminoácido en la posición 1 y terminando con el aminoácido en la posición 109.
- 30 4. Una primera construcción de ADN que codifica una cadena pesada o fragmento del mismo que comprende
- 35 a) una primera parte que codifica un dominio variable que comprende alternativamente regiones esquema e hipervariables, siendo dichas regiones hipervariables en secuencia CDR1, CDR2 y CDR3 cuyas secuencias de aminoácidos son mostradas en Seq. Id. No. 1; comenzando esta primera parte con un codón que codifica el primer aminoácido del dominio variable y terminando con un codón que codifica el último aminoácido del dominio variable, y
- 40 b) una segunda parte que codifica una parte constante de cadena pesada o fragmento del mismo el cual inicia con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de la cadena pesada y termina con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante o fragmento del mismo, seguido por un codón de parada.
- 45 5. Una segunda construcción de ADN que codifica una cadena ligera o fragmento del mismo que comprende
- 50 a) una primera parte la cual codifica un dominio variable que comprende alternativamente regiones esquema e hipervariables; siendo dichas regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3', cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en Seq. Id. No. 2; comenzando esta parte con un codón que codifica el primer aminoácido del dominio variable y terminando con un codón que codifica el último aminoácido del dominio variable, y
- 55 b) una segunda parte que codifica una parte constante de cadena ligera o fragmento del mismo que inicia con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de la cadena ligera y termina con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante o fragmento del mismo seguido por un codón de parada.
- 60 6. Un vector de expresión capaz de replicar en una línea celular procariótica o eucariótica que comprende por lo menos una construcción de ADN de acuerdo a la reivindicación 4 o reivindicación 5.
- 65 7. Un proceso para la producción de una molécula de enlace MCP-1 que comprende (i) cultivar un organismo que es co-transformado con vectores de expresión de acuerdo a la reivindicación 6 y (ii) recuperar la molécula de enlace MCP-1 del cultivo.
- 60 8. Un anticuerpo para MCP-1 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que reacciona entrecruzadamente con eotaxina.
- 65 9. El uso de un anticuerpo para MCP-1 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que reacciona entrecruzadamente con eotaxina la cual es capaz de inhibir el enlace de MCP-1 y eotaxina a sus receptores, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o problema mediado por MCP-1 o eotaxina.

ES 2 322 643 T3

10. Una composición farmacéutica compuesta de anticuerpo para MCP-1 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que reacciona entrecruzadamente con eotaxina y la cual es capaz de inhibir el enlace de MCP-1 y eotaxina a sus receptores, en combinación con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable; y
- 5 11. Un anticuerpo para MCP-1 de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que tiene un K_D para enlazarse a MCP-1 de aproximadamente 50 pM o menos.

10

15

20

25

30

35

40

45

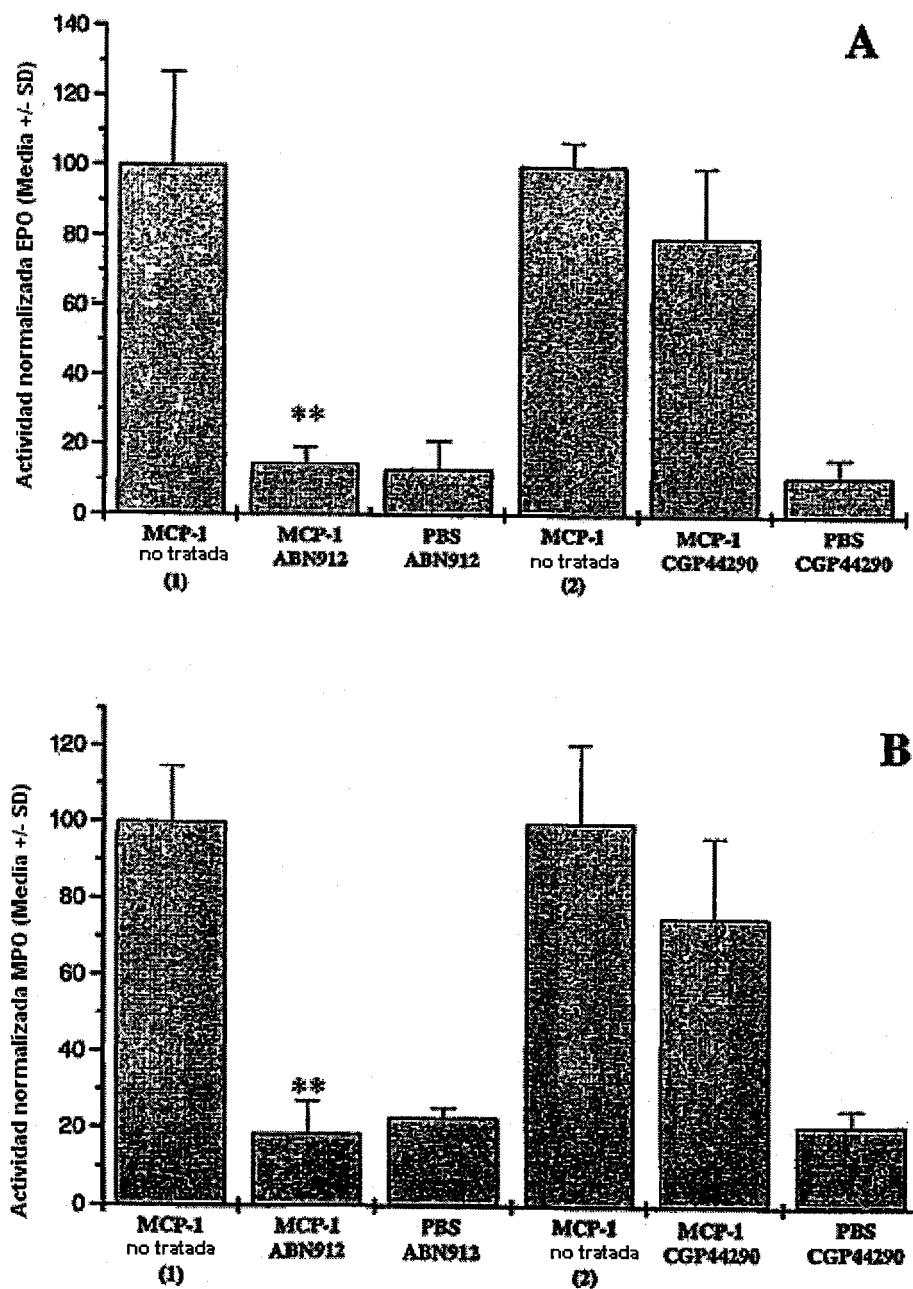
50

55

60

65

FIGURA 1:



ES 2 322 643 T3

FIGURA 2:

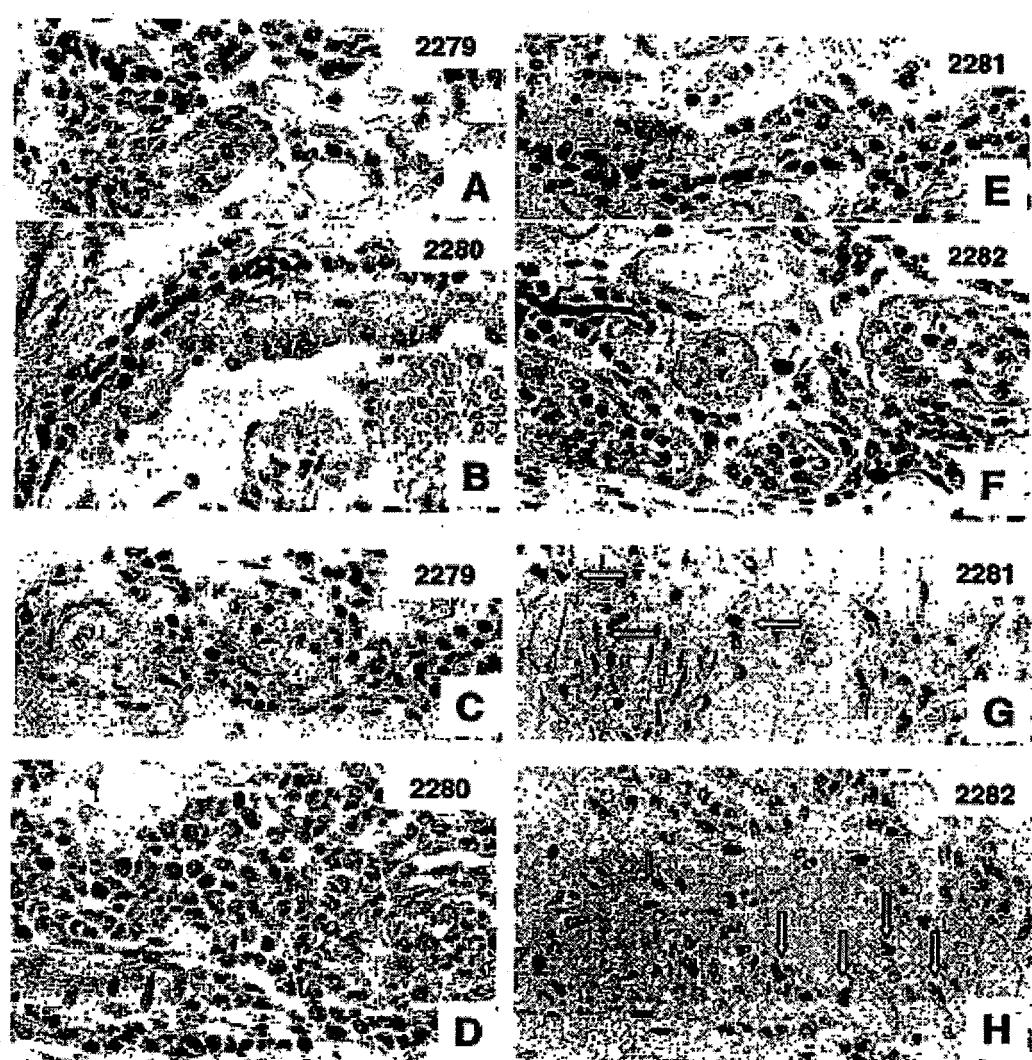
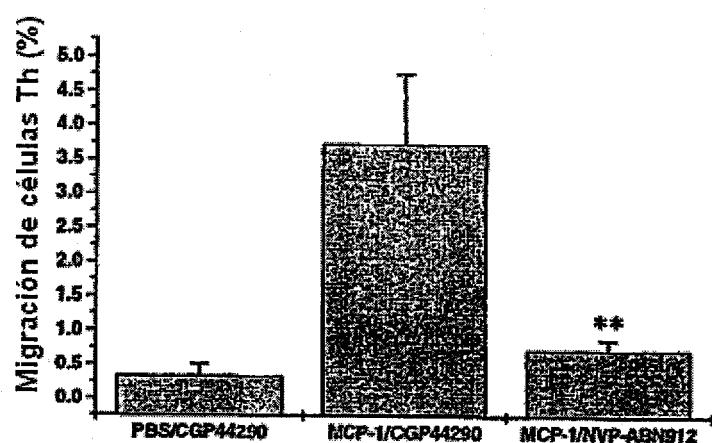


FIGURA 3:



ES 2 322 643 T3

FIGURA 4:

