



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 983 249**

⑮ Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2014** PCT/JP2014/077767

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015** WO15056808

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2014** E 14853737 (6)

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024** EP 3057992

④ Título: **Anticuerpo humano frente a especies de ADAMTS de tipo agrecanasa para agentes terapéuticos de enfermedades relacionadas con agrecanasa**

⑩ Prioridad:

15.10.2013 US 201361891087 P

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.10.2024

⑦ Titular/es:

GENEFONTIER CORPORATION (50.0%)
SHARP Kashiwa Building, 4F, 273-1 Kashiwa,
Kashiwa-shi
Chiba 277-0005, JP y
KEIO UNIVERSITY (50.0%)

⑦ Inventor/es:

MIYAKOSHI, AKIRA;
NAKAMURA, MIKIKO;
KOJOH, KANEHISA;
MOCHIZUKI, SATSUKI y
OKADA, YASUNORI

⑦ Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 983 249 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

Anticuerpo humano frente a especies de ADAMTS de tipo agrecanasa para agentes terapéuticos de enfermedades relacionadas con agrecanasa

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-agrecanasa humana y a su uso farmacéutico.

Antecedentes de la técnica

La degradación del agrecano y la posterior digestión de las fibrillas de colágeno son la ruta central para la destrucción del cartílago en enfermedades articulares humanas, que incluyen la osteoartritis (OA) y la artritis reumatoide (AR). La degradación del colágeno se lleva a cabo principalmente por metaloproteininas de matriz (MMPs) que degradan el colágeno, como MMP-1, MMP-8 y MMP-13 [1-3]. Por otro lado, se considera que las metaloproteininas que degradan el agrecano denominadas agrecanasas desempeñan un papel clave en la degradación del agrecano [4, 5]. Las agrecanasas pertenecen a la familia de genes de ADAMTS (una desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina), y se sabe que ADAMTS1, 4, 5, 8, 9 y 15 tienen actividad agrecanasa [4, 6]. Estudios recientes que usan ratones con inactivación (knockout) de ADAMTS4 y ADAMTS5 han indicado que ADAMTS5, pero no ADAMTS4, 10 desempeña un papel esencial en la degradación del agrecano en la artritis de ratón [7, 8]. Sin embargo, debido a que hay poca información acerca de carácter bioquímico, los patrones de expresión o las estructuras promotoras génicas de ADAMTS4 y ADAMTS5 de ratón, los datos de ratones knockout se deben interpretar cuidadosamente y no se deben extrapolar a la enfermedad OA y AR humanas [9, 10]. En condrocitos humanos, ADAMTS4 es inducible por tratamiento con citoquinas como interleuquina-1 (IL-1), aunque la expresión de ADAMTS5 es constitutiva [9, 11-13]. 15 Nuestro estudio reciente también mostró que entre las especies de ADAMTS de tipo agrecanasa, ADAMTS4 se sobre-expresa selectivamente en cartílago osteoartrítico humano con una correlación directa con el grado de destrucción del cartílago, mientras que ADAMTS5 se expresa constitutivamente tanto en cartílago normal como osteoartrítico [10]. Estos sugieren que ADAMTS4 es una agrecanasa principal en el cartílago osteoartrítico humano. ADAMTS4 también 20 se sobre-expresa en células sinoviales y condrocitos articulares en la AR, lo que sugiere la implicación de esta proteinasa en la destrucción del cartílago de las articulaciones de la AR. ADAMTS4 y ADAMTS5 pueden digerir no sólo el agrecano sino también otros miembros de la familia de proteoglicanos de lectina que incluyen versican y brevican. Dado que el versican es un proteoglicano principal en la piel y en la pared de los vasos sanguíneos, su 25 degradación por ADAMTS4 y ADAMTS5 también está implicada en la destrucción y reparación de tejidos de la piel y de los vasos sanguíneos en condiciones patológicas como la úlcera crónica y la fibrosis de la piel y diversas vasculitis, respectivamente. Además, se sabe que las células tumorales en el glioblastoma multiforme sobre-expresan ADAMTS5 30 y se sugiere que ADAMTS5 derivada de células tumorales desempeña un papel en la invasión por escisión del brevican [14].

El método de la librería de expresión en fagos es una de las técnicas de expresión que han realizado una selección in vitro a alta velocidad creando una correspondencia uno a uno en forma de partícula de fago entre un péptido o proteína funcional y un ADN que los codifica. Este método de librería de expresión en fagos se aplica a la selección de anticuerpos, y muchos anticuerpos obtenidos mediante este método se han desarrollado como productos farmacéuticos [15]. Además, se ha establecido un método para obtener un anticuerpo específico mediante una combinación de una librería de anticuerpos artificial humana y un método de librería de expresión en fagos, y tales métodos los han hecho prácticos múltiples compañías, como lo demuestran HuCAL (Librería de anticuerpos 35 combinatoria humana) de MorphoSys.

40 El documento WO 2013/109829 se refiere a proteínas de unión a antígeno aisladas que comprenden al menos un dominio variable de inmunoglobulina capaz de unirse a ADAMTS4 humana.

Listado de documentos

Documentos de no patente

- 45 [1] Dahlberg L, Billinghurst RC, Manner P, Nelson F, Webb G, Ionescu M, y cols. Selective enhancement of collagenase-mediated cleavage of resident type II collagen in cultured osteoarthritic cartilage and arrest with a synthetic inhibitor that spares collagenase 1 (matrix metalloproteinase 1). *Arthritis Rheum.* 2000; 43: 673-82.
- [2] Tortorella MD, Malfait AM, Deccico C, Arner E. The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001; 9: 539-52.
- 50 [3] Pratta MA, Yao W, Decicco C, Tortorella MD, Liu RQ, Copeland RA, y cols. Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. *J Biol Chem.* 2003; 278: 45539-45.
- [4] Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J.* 2005; 386: 15-27.

[5] Struglics A, Larsson S, Pratta MA, Kumar S, Lark MW, Lohmander LS. Human osteoarthritis synovial fluid and joint cartilage contain both aggrecanase- and matrix metalloproteinase-generated aggrecan fragments. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006; 14: 101-13.

5 [6] Okada Y. Proteinases and matrix degradation. En: JHarris ED, Budd RC, Genovese MC, Firestein GS y Sargent JS (ed) *Kelley's textbook of Rheumatology* Philadelphia: 8th edition, Elsevier Saunders 2008, en prensa.

[7] Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, y cols. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature*. 2005; 434: 644-8.

[8] Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, y cols. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature*. 2005; 434: 648-52.

10 [9] Song RH, Tortorella MD, Malfait AM, Alston JT, Yang Z, Arner EC, y cols. Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis Rheum*. 2007; 56: 575-85.

[10] Naito S, Shiomi T, Okada A, Kimura T, Chijiwa M, Fujita Y, y cols. Expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic cartilage. *Pathol Int*. 2007; 57: 703-11.

15 [11] Bau B, Gebhard PM, Haag J, Knorr T, Bartnik E, Aigner T. Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum*. 2002; 46: 2648-57.

[12] Moulharat N, Lesur C, Thomas M, Rolland-Valognes G, Pastourea P, Anract P, y cols. Effects of transforming growth factor-beta on aggrecanase production and proteoglycans degradation by human chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004; 12: 296-305.

20 [13] Hui W, Barksby E, Young DA, Cawston TE, McKie N, Rowan AD. Oncostatin M in combination with tumour necrosis factor alpha induces a chondrocyte membrane-associated aggrecanase that is distinct from ADAMTS aggrecanase-1 or -2. *Ann Rheum Dis*. 2005; 64: 1624-32.

[14] Nakada M, Miyamori H, Kita D, Takahashi T, Yamashita J, Sato H, Miura R, Yamaguchi Y, Okada Y. *Acta Neuropathol* 110: 239-246, 2005

[15] Rothe, C. y cols. *J. Mol. Biol.* 2008; 376: 1182-1200 [Documentos de patente]

25 [16] Documento WO 2013/109829

Compendio de la invención

Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo anti-agrecanasa humana (particularmente, anticuerpo anti-ADAMTS4 humana) útil para la profilaxis o el tratamiento de la progresión de diversas enfermedades representadas por artritis en donde se degrada la molécula de la familia de Lecticanos, que es un proteoglicano.

Solución al problema

Para resolver el problema mencionado anteriormente, los presentes inventores produjeron múltiples anticuerpos anti-agrecanasa humana que se unían a la agrecanasa humana. Como resultado, han encontrado que los anticuerpos anti-ADAMTS4 humana producidos inhiben la actividad enzimática de ADAMTS4 humana y pueden prevenir la degradación del agrecano por condrocitos articulares que se produce en la artritis. Además, han encontrado que un anticuerpo que reconoce un epítopo particular también muestra reactividad cruzada con agrecanasas distintas de la ADAMTS4 humana, y también puede inhibir su actividad. Basándose en los hallazgos mencionados anteriormente, han llevado a cabo estudios adicionales en un intento por desarrollar un fármaco terapéutico para las enfermedades representadas por la artritis, en donde la agrecanasa actúa sobre la destrucción tisular, lo que dio como resultado la finalización de la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a lo siguiente.

[1] Un anticuerpo que se une específicamente a ADAMTS4 humana en un epítopo que consiste en la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 9 e inhibe la actividad agrecanasa de ADAMTS4 humana y ADAMTS5 humana.

45 [2] El anticuerpo de acuerdo con [1], que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, en donde

la región variable de cadena ligera comprende CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 1, CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 2 y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 3, y

la región variable de cadena pesada comprende CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 4, CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 5 y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 6.

5 [3] El anticuerpo de acuerdo con [2], en donde la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 7 y la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 8.

[4] El anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], que es un anticuerpo humano.

[5] Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4].

[6] Un polinucleótido que codifica el anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4].

10 [7] Un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con [6].

[8] Un transformante que comprende el vector de acuerdo con [7].

[9] El anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4], para su uso en la profilaxis o el tratamiento de la artritis.

[10] La composición farmacéutica de acuerdo con [5], para su uso en la profilaxis o el tratamiento de la artritis.

Efecto ventajoso de la invención

15 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un anticuerpo anti-agrecanasa humana (particularmente, anticuerpo anti-ADAMTS4 humana) útil para la profilaxis o el tratamiento de la progresión de la artritis.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Inmuno-reactividad de Fabs candidatos con ADAMTS4 y ADAMTS5, y su inhibición de la actividad agrecanasa de ADAMTS4. (A) ADAMTS4 (izquierda) y ADAMTS5 (derecha) recombinantes (100 ng/carril cada una) transferidas a las membranas de PVDF se hicieron reaccionar con cada Fab candidato (clon 237-1, 237-5, 237-21, 237-43 o 237-53), seguido de inmuno-transferencia. (B) Inhibición de la actividad de ADAMTS4 por los Fab. Se hizo reaccionar ADAMTS4 recombinante (180 ng) con cada Fab (clon 237-1, 237-5, 237-21, 237-43 o 237-53) o Fab de control en una proporción molar 1:1, y luego se incubó con agrecano (100 µg) durante 16 h a 37 °C. Se evaluó la actividad agrecanasa de ADAMTS4 mediante inmuno-transferencia con anticuerpo anti-neo-epítopo de agrecano (NITEGE³⁹²). TS(-), tampón solo; Fab(-), ADAMTS4 incubado sin Fab; control, Fab de control.

Figura 2. Inmuno-reactividad del anticuerpo anti-ADAMTS (clon 237-53) con las especies ADAMTS, ADAM y MMP. (A) Geles teñidos con plata de ADAMTS4, 5 y 1, ADAM10, 12 y 17, y MMP1, 2, 3, 9 y 13. Las muestras (100 ng/carril) se sometieron a SDS-PAGE, y los geles se tiñeron con kit de tinción de plata. (B) Inmuno-reactividad del anticuerpo (clon 237-53) con las especies ADAMTS, ADAM y MMP. Las muestras transferidas sobre membranas de PVDF se inmuno-detectaron con el clon 237-53 del anticuerpo anti-ADAMTS. Obsérvese que el anticuerpo reacciona con ADAMTS4 y ADAMTS5, pero no con otras especies, ADAMTS, ADAM y MMP.

Figura 3. Análisis de mapeo de dominio del anticuerpo anti-ADAMTS (clon 237-53). (A y B) Inmuno-reactividad del anticuerpo con cada dominio de ADAMTS4. Las proteínas etiquetadas con FLAG/DHFR recombinantes correspondientes al dominio de metaloproteinasa (Met), dominios desintegrina y trombospondina (Dis/TSP), dominio desintegrina (Dis) o dominio de trombospondina (TSP) de ADAMTS4 se prepararon mediante PUREflex. Estas proteínas se inmuno-detectaron con anticuerpo anti-FLAG (controles positivos; izquierda) o con el clon de anticuerpo 237-53 (derecha).

Figura 4. Inhibición de la actividad agrecanasa de ADAMTS4 y ADAMTS5 por el anticuerpo anti-ADAMTS (clon 237-53), y efecto del anticuerpo sobre la expresión de las especie ADAMTS y la actividad agrecanasa en condrocitos estimulados con IL-1α. (A) Inhibición de la actividad agrecanasa de ADAMTS4 y ADAMTS5 por el anticuerpo anti-ADAMTS (clon 237-53). Se hicieron reaccionar proteínas ADAMTS recombinantes con anticuerpo anti-ADAMTS en proporciones molares de 1:0,2-5 (enzima: anticuerpo) o con IgG normal de control (control; proporción molar de 1: 5), y después se incubaron con agrecano. La digestión con agrecano se monitorizó mediante inmuno-detección con anticuerpo anti-neoepítopo de agrecano (parte superior). La inhibición se evaluó mediante análisis densitométrico de las inmuno-detecciones (inferior). (B) Efecto del anticuerpo (clon 237-53) sobre la expresión de ARNm de ADAMTS4 y ADAMTS5 y sobre la actividad agrecanasa en los condrocitos estimulados con IL-1α. Se cultivaron condrocitos osteoartríticos en presencia y ausencia de IL-1α y de anticuerpo anti-ADAMTS o de IgG normal de control (control). A continuación, se examinó la expresión de ARNm de estas especies de ADAMTS (izquierda) y la actividad agrecanasa en el medio condicionado (derecha) mediante RT-PCR e inmuno-detección con anticuerpo anti-neoepítopo de agrecano, respectivamente. GAPDH, un control para muestras cargadas.

Descripción de las realizaciones

La presente invención proporciona un anticuerpo que tiene una actividad de unión específica a la agrecanasa humana e inhibe la actividad agrecanasa de la agrecanasa.

5 La agrecanasa es una conocida proteasa que es un miembro de la familia de proteínas ADAMTS (una desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina), y actúa sobre y degrada un proteoglicano conocido como agrecano. La agrecanasa abarca ADAMTS4, ADAMTS5, ADAMTS1, ADAMTS8, ADAMTS9, ADAMTS15 y similares.

Una secuencia de aminoácidos representativa de ADAMTS4 humana se muestra en la SEQ ID N.º: 15,

una secuencia de ADNc representativa de ADAMTS4 humana se muestra en la SEQ ID N.º: 14,

una secuencia de aminoácidos representativa de ADAMTS5 humana se muestra en la SEQ ID N.º: 17, y

10 una secuencia de ADNc representativa de ADAMTS5 humana se muestra en la SEQ ID N.º: 16.

El anticuerpo de la presente invención tiene una actividad de unión específica a la agrecanasa humana.

La "agrecanasa humana" significa que la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de la agrecanasa tiene una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos que es la misma o sustancialmente la misma que la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de la agrecanasa expresada de forma natural en el ser humano.

15 La expresión "sustancialmente la misma" significa que la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de interés tiene una identidad del 70% o más (preferiblemente del 80% o más, más preferiblemente del 90% o más, más preferiblemente del 95% o más, lo más preferiblemente del 99% o más) con la secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de una agrecanasa particular expresada de manera natural en seres humanos, y tiene la función de la agrecanasa humana particular. Especies biológicas distintas de las humanas, proteínas distintas de la agrecanasa, el gen y fragmentos de estas también se interpretan de la misma manera.

20 La "unión específica" de un anticuerpo al antígeno X significa que la afinidad de unión de un anticuerpo al antígeno X en una reacción antígeno-anticuerpo es mayor que la afinidad de unión a un antígeno no específico (p. ej., albúmina de suero bovino (BSA)).

25 El anticuerpo de la presente invención tiene una actividad para inhibir la actividad enzimática de la agrecanasa humana. La actividad enzimática de la agrecanasa humana significa específicamente una actividad de la agrecanasa humana para escindir el agrecano (p. ej., agrecano humano o porcino). La actividad de la agrecanasa humana para escindir el agrecano se puede evaluar incubando agrecano porcino y agrecanasa humana a 37 °C durante 16 h, desglicosilándolos con condroitinasa ABC y queratanasa, y analizando el producto de reacción obtenido mediante inmuno-detección usando un anticuerpo anti-neoepítopo de agrecano anti-NITEGE³⁹² de acuerdo con, por ejemplo, los métodos descritos en Yatabe T, y cols. Ann Rheum Dis. 2009; 68: 1051-8 y Hashimoto G, y cols. J Biol Chem. 2004; 279: 32483-91.

30 El anticuerpo de la presente invención tiene una actividad de unión específica a ADAMTS4 humana e inhibe la actividad agrecanasa de ADAMTS4 humana.

35 El anticuerpo también inhibe, además de la actividad agrecanasa de ADAMTS4 humana, la actividad agrecanasa de ADAMTS5 humana.

40 En la presente memoria descriptiva, el "anticuerpo" se usa como aquel que abarca un anticuerpo de longitud completa y cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, "porción de unión al antígeno") de este o una cadena sencilla de este. El "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que contiene al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), que están unidas por un enlace disulfuro, o una porción de unión al antígeno de este. Cada cadena pesada está constituida por una región variable de cadena pesada (que se abreviará como V_H en la presente memoria) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está constituida por 3 dominios de C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Cada cadena ligera está constituida por una región variable de cadena ligera (que se abreviará como V_L en la presente memoria) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está constituida por un único dominio C_L. Las regiones V_H y V_L se subdividen adicionalmente en regiones con mayor variabilidad denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs), que contienen regiones más altamente conservadas denominadas regiones marco (FRs) dispersadas en las mismas. Cada V_H y V_L está constituida por 3 CDRs y 4 FRs, que están alineadas en el siguiente orden, es decir, FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 desde el extremo amino al extremo carboxilo. Las regiones variables de dicha cadena pesada y cadena ligera contienen dominios de unión que interaccionan con un antígeno. La región constante de un anticuerpo puede mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, que incluyen diversas células (p. ej., células efectoras) del sistema inmune y el primer componente del sistema del complemento convencional (C1q).

45 En la presente memoria descriptiva, la "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo se usa para referirse a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan una capacidad de unirse específicamente a un antígeno (p. ej., ADAMTS4 humana). Se ha aclarado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo se realiza mediante un

fragmento de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos del fragmento de unión incluido en el término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) fragmento Fab, un fragmento monovalente constituido por dominios V_L , V_H , C_L y C_H1 , (ii) fragmento $F(ab')_2$, un fragmento divalente que contiene dos fragmentos Fab unidos por enlace disulfuro en la región bisagra, (iii) fragmento Fab', un Fab inherente que tiene una porción de región bisagra (véase 5 FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, Paul ed., 3. sup. rd ed. 1993), (iv) fragmento Fd constituido por dominios V_H y C_H1 , (v) fragmento Fv constituido por dominios V_L y V_H en un solo brazo de un anticuerpo, (vi) fragmento dAb constituido 10 por el dominio V_H (Ward y cols., (1989) Nature 341: 544-546), (vii) región determinante de complementariedad (CDR) aislada y (viii) nanocuerpo que es una región variable de cadena pesada que contiene dominio variable único y dos regiones constantes. Aunque V_L y V_H , que son los dos dominios del fragmento Fv, están codificados por genes 15 diferentes, se pueden unir mediante un enlazador sintético para producir una única cadena proteica a partir de ellos mediante técnicas recombinantes, en donde, en esta cadena, las regiones V_L y V_H se emparejan entre sí para formar una molécula monovalente (conocida como Fv de única cadena (scFv); véase, por ejemplo, Bird y cols. (1988) Science 242: 423-426; y Huston y cols., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Dicho anticuerpo monocatenario también está incluido en la "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. Tales fragmentos de anticuerpo se obtienen por los expertos en la técnica a través de técnicas convencionales conocidas, y se seleccionan para su utilidad de la misma manera que con el anticuerpo sin modificar.

El anticuerpo de la presente invención es preferiblemente un anticuerpo monoclonal. El "anticuerpo monoclonal" se refiere a una preparación de una molécula de anticuerpo de una composición de una sola molécula. La composición de anticuerpo monoclonal muestra especificidad de unión y afinidad únicas por un epítopo particular.

20 El anticuerpo de la presente invención es preferiblemente un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado. El "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables derivadas de una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana tanto en las regiones marco como en las CDR. Además, cuando un anticuerpo contiene una región constante, la región constante también deriva de una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana. En la presente memoria descriptiva, el "anticuerpo humano" también abarca incluso una 25 realización que incluye un residuo de aminoácido no codificado por una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana (p. ej., mutación introducida por mutagénesis aleatoria o dirigida *in vitro* o mutación somática *in vivo*). En la presente memoria descriptiva, además, el "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo en donde una secuencia de CDR derivada de la línea germinal de una especie animal distinta de la humana, como ratón, se fusiona 30 en la secuencia armazón humana.

35 En la presente memoria descriptiva, el anticuerpo humano abarca un "anticuerpo humano reconstituido". El anticuerpo humano reconstituido se refiere a un anticuerpo modificado en donde al menos una CDR contenida en el primer anticuerpo donador humano se usa en el segundo anticuerpo aceptor humano, en lugar de la CDR del segundo anticuerpo aceptor humano. Preferiblemente, las 6 CDR están sustituidas. Más preferiblemente, se usa la región de 40 unión al antígeno completa (p. ej., Fv, Fab o $F(ab')_2$) del primer anticuerpo donador humano en lugar de la región correspondiente en el segundo anticuerpo aceptor humano. Más preferiblemente, la región Fab del primer anticuerpo donador humano está operativamente unida a una región constante apropiada del segundo anticuerpo aceptor humano para formar un anticuerpo de longitud completa.

45 El anticuerpo humano reconstituido se puede producir mediante técnicas recombinantes génicas convencionales descritas, por ejemplo, en los documentos EP125023, WO96/02576, el documento 15 mencionado anteriormente y similares. Para ser específicos, por ejemplo, se sintetiza una secuencia de ADN diseñada para unir una CDR deseada en un anticuerpo humano donador y una región marco deseada (FR) en un anticuerpo humano aceptor mediante el método de PCR usando, como cebadores, varios oligonucleótidos producidos para tener una región que se superpone con las regiones terminales tanto de CDR como de FR (véase el método descrito en el documento WO98/13388). El ADN obtenido se une a un ADN que codifica una región constante de anticuerpo humano o un mutante de región constante de anticuerpo humano, que se incorpora en un vector de expresión y el vector se introduce en un huésped para permitir la producción, mediante lo cual se puede obtener un anticuerpo humano reconstituido (véanse los 50 documentos EP125023, WO96/02576).

55 En la presente memoria descriptiva, además, el anticuerpo humano abarca un "anticuerpo humano artificial". El anticuerpo humano artificial se puede producir mediante técnicas recombinantes génicas convencionales descritas en, por ejemplo, el documento 15 mencionado anteriormente y similares.

60 El anticuerpo de la presente invención también puede incluir una proteína de fusión en donde el anticuerpo mencionado anteriormente y otro péptido o proteína están fusionados. El método de producción de una proteína de fusión incluye unir un polinucleótido que codifica el anticuerpo de la presente invención y un polinucleótido que codifica otro péptido o polipéptido para que coincida con el marco, introduciéndolo en un vector de expresión y permitiendo la expresión de este en un huésped, y se pueden usar técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Como otro péptido a fusionar con el anticuerpo de la presente invención, se conocen péptidos como FLAG (Hopp, T.P. y cols., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210), 6xHis que consiste en seis residuos de His (histidina), 10xHis, fragmento c-myc humano, fragmento VSV-GP, fragmento p18HIV, etiqueta T7, etiqueta HSV, etiqueta E, fragmento de antígeno SV40T, etiqueta Ick, fragmento de α -tubulina, etiqueta B, fragmento de proteína C y similares. Ejemplos de otro polipéptido a fusionar con el anticuerpo de la presente invención incluyen GST (glutatión-S-transferasa), HA (hemaglutinina de la gripe), región constante de inmunoglobulina, β -galactosidasa, MBP (proteína de unión a maltosa) y similares. Un polinucleótido

comercialmente disponible que codifica dicho péptido o polipéptido se fusiona con un polinucleótido que codifica el anticuerpo de la presente invención, y se expresa un polinucleótido de fusión preparado de ese modo, mediante lo cual se puede preparar un polipéptido de fusión.

- 5 El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo conjugado unido con diversas moléculas, por ejemplo, sustancias poliméricas como polietilenglicol (PEG), ácido hialurónico y similares, sustancia radiactiva, sustancia fluorescente, sustancia luminiscente, enzima, toxina y similares. Dicho anticuerpo conjugado se puede obtener modificando químicamente el anticuerpo obtenido. El método de modificación de anticuerpos ya se ha establecido en este campo (p. ej., los documentos US5057313, US5156840).
- 10 El anticuerpo de la presente invención preferiblemente se aísla o purifica. El hecho de "aislar o purificar" significa que se ha aplicado una operación para eliminar componentes distintos del componente de interés al estado de presencia natural. La pureza del anticuerpo aislado o purificado de la presente invención (proporción del peso del anticuerpo de la presente invención con el peso total de proteína) es generalmente del 50% o más, preferiblemente del 70% o más, más preferiblemente del 90% o más, lo más preferiblemente del 95% o más (por ejemplo, sustancialmente 1000).
- 15 El anticuerpo de la presente invención se une específicamente a ADAMTS4 humana en un epítopo que contiene la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 9 (YCEGRRTRF), e inhibe la actividad agrecanasa de ADAMTS4 y ADAMTS5 humanas.
- 20 El epítopo que contiene la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 9, es específicamente un epítopo que consiste en la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 9.
- 25 La secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 9 es una secuencia de aminoácidos parcial de ADAMTS4 humana, y no muestra una identidad muy alta con la secuencia parcial correspondiente de ADAMTS5 humana. Sorprendentemente, sin embargo, un anticuerpo que se une específicamente a ADAMTS4 humana en un epítopo que contiene la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 9 también puede inhibir la actividad agrecanasa de ADAMTS5 humana además de la actividad agrecanasa de ADAMTS4 humana.
- 30 Los ejemplos específicos del anticuerpo que se une específicamente a ADAMTS4 humana e inhibe la actividad agrecanasa de ADAMTS4 humana incluyen los anticuerpos descritos en (1) o (2) a continuación:
- (1) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, en donde la región variable de cadena ligera comprende CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 1, CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 2 y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 3, y
- 35 30 la región variable de cadena pesada comprende CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 4, CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 5 y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 6; y
- (2) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, en donde la región variable de cadena ligera comprende CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 1, CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 2 y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 3, y
- 40 40 la región variable de cadena pesada comprende CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 4, CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 5 y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 6, excepto que de 1 a 3 aminoácidos están sustituidos, suprimidos, insertados y/o añadidos en al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N.º: 1 a 3, y/o de 1 a 3 aminoácidos están sustituidos, suprimidos, insertados y/o añadidos en al menos una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N.º: 4 a 6.
- 45 En (2), de 1-3 (preferiblemente 1 o 2, más preferiblemente 1) aminoácidos están preferiblemente sustituidos, suprimidos, insertados y/o añadidos sólo en la secuencia de aminoácidos de CDR3 en la región variable de cadena ligera.
- 50 Los ejemplos del método para sustituir uno o varios residuos de aminoácidos por otro aminoácido deseado incluyen el método de mutagénesis dirigida al sitio (Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, y Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. Gene 152, 271-275; Zoller, MJ, y Smith, M. (1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. Methods Enzymol. 100, 468-500; Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, HW, Kramer, B, Pflugfelder, M y Fritz, HJ (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456; Kramer W, y Fritz HJ (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA Methods. Enzymol. 154, 350-367, Kunkel, TA (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. Proc Natl Acad Sci USA. 82, 488-492). Usando estos métodos, el aminoácido deseado en un anticuerpo se puede sustituir por otro

aminoácido de interés. También usando la técnica de librería como mezcla de marcos (Mol Immunol. 2007 Apr; 44(11): 3049-60) y reparación de CDR (US2006/0122377) y similares, se puede también sustituir un aminoácido en un marco o en una CDR por otro aminoácido apropiado.

Como región marco (FR) del anticuerpo a unir a una CDR, se selecciona un marco que permita que la CDR forme un buen sitio de unión al antígeno. Aunque la FR que se va a usar para el anticuerpo de la presente invención no está particularmente limitada y se puede usar cualquier FR, se usa preferiblemente la FR de un anticuerpo humano. Como FR de un anticuerpo humano, se puede usar una que tenga una secuencia natural, o se pueden sustituir, suprimir, añadir y/o insertar y similares uno o varios aminoácidos en la región armazón que tenga una secuencia natural según sea necesario, para que la CDR pueda formar un sitio de unión al antígeno apropiado. Por ejemplo, se puede seleccionar una secuencia de FR mutante que tenga propiedades deseadas midiendo y evaluando la actividad de unión de un anticuerpo que tiene una FR con aminoácido sustituido a un antígeno (Sato, K. y cols., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

En los anticuerpos de (1) y (2), se usa preferiblemente FR de Vk4 (base de datos Kabat) de anticuerpo humano para la cadena ligera, y se usa preferiblemente FR de VH1a (base de datos Kabat) de anticuerpo humano para la cadena pesada.

La región constante usada para el anticuerpo de la presente invención no está particularmente limitada y se puede usar cualquier región constante. Los ejemplos preferibles de la región constante usada para el anticuerpo de la presente invención incluyen regiones constantes de anticuerpo humano (regiones constantes derivadas de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM y similares). Por ejemplo, se pueden usar C γ 1, C γ 2, C γ 3, C γ 4, C μ , C δ , C α 1, C α 2, C ϵ en la cadena H, y se pueden usar C κ , C λ en la cadena L.

En los anticuerpos de (1) y (2), se usa preferiblemente la región constante de C κ del anticuerpo humano para la cadena ligera, y se usa preferiblemente la región constante de C γ 1 del anticuerpo humano para la cadena pesada.

El anticuerpo preferible de la presente invención incluye lo siguiente:

(1') Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, en donde la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 7 y la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 8.

El anticuerpo de (1') mencionado anteriormente corresponde a una realización preferible del anticuerpo del punto (1) mencionado anteriormente.

Los anticuerpos de (1) y (2) mencionados anteriormente también inhiben preferiblemente la actividad agrecanasa de ADAMTS5 humana además de la actividad agrecanasa de ADAMTS4 humana.

En una realización particular, los anticuerpos de (1) y (2) mencionados anteriormente se unen específicamente a ADAMTS4 humana en un epítopo que contiene la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 9 e inhiben la actividad agrecanasa de ADAMTS4 humana. Dichos anticuerpos también pueden inhibir la actividad agrecanasa de ADAMTS5 humana además de la actividad agrecanasa de ADAMTS4 humana.

La presente invención proporciona un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de la presente invención mencionado anteriormente. El polinucleótido puede ser un ADN o ARN, o una quimera de ADN/ARN. El polinucleótido puede ser bicatenario o monocatenario. Cuando el polinucleótido es bicatenario, puede ser un ADN bicatenario, un ARN bicatenario o un híbrido ADN: ARN.

El polinucleótido de la presente invención abarca un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica tanto la región variable de la cadena pesada como la región variable de la cadena ligera del anticuerpo de la presente invención, y una combinación de un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo de la presente invención y un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo de la presente invención.

El polinucleótido de la presente invención se puede producir fácilmente en función de la información de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la presente invención, información de secuencia conocida e información de secuencia descrita en el listado de secuencias en la presente memoria descriptiva, y utilizando técnicas de recombinación génica conocidas. Por ejemplo, se diseñan cebadores adecuados en función de la información de secuencia, se amplifica un ADN que codifica los elementos que constituyen el anticuerpo de la presente invención mediante la reacción de PCR, se ligan fragmentos de ADN mediante enzimas apropiadas como ligasa y similares, mediante lo cual se puede producir el polinucleótido de la presente invención. Alternativamente, se puede sintetizar un polinucleótido que codifica cada elemento mediante un sintetizador de polinucleótidos, en función de la información de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de la presente invención.

El polinucleótido obtenido que codifica el anticuerpo de la presente invención se puede usar directamente, dependiendo del objeto, o usarse después de la digestión con una enzima de restricción cuando se deseé, o añadir un conector. El polinucleótido puede tener ATG como codón de iniciación de la traducción en el lado 5' terminal, y

puede tener TAA, TGA o TAG como un codón de terminación de la traducción en el lado 3' terminal. Estos codones de iniciación de la traducción y codones de terminación de la traducción se pueden añadir usando un adaptador de ADN sintetizado adecuado.

5 El polinucleótido de la presente invención preferiblemente se aísla o purifica. El polinucleótido aislado o purificado de la presente invención tiene una pureza (proporción del peso del polinucleótido de la presente invención al peso total del polinucleótido) generalmente del 50% o más, preferiblemente del 70% o más, más preferiblemente del 90% o más, lo más preferiblemente del 95% o más (por ejemplo, sustancialmente 1000).

10 La presente invención proporciona un vector que comprende el polinucleótido mencionado anteriormente de la presente invención. El vector de la presente invención abarca un vector que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica tanto la región variable de la cadena pesada como la región variable de la cadena ligera del anticuerpo de la presente invención, y una combinación de un vector que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo de la presente invención y un vector que comprende un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo de la presente invención. El vector se aísla o purifica preferiblemente. Los ejemplos del vector incluyen vector de expresión, vector de clonación y similares, que se pueden seleccionar de acuerdo con el objeto. Preferiblemente, el vector es un vector de expresión. El vector de expresión puede expresar el anticuerpo de la presente invención. El vector de expresión se puede producir uniendo operativamente el polinucleótido de la presente invención a la secuencia corriente abajo de un promotor en un vector de expresión adecuado. El tipo de vector incluye, por ejemplo, vector plasmídico, vector vírico y similares, que se pueden seleccionar apropiadamente de acuerdo con el hospedador que se va a usar.

15 20 Como huésped, se usan el género *Escherichia* (*Escherichia coli*, etc.), el género *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, etc.), levadura (*Saccharomyces cerevisiae*, etc.), célula de insecto (línea celular establecida derivada de larva de *Mamestra brassicae* (célula de *Spodoptera frugiperda*; célula Sf, etc.)), de insecto (larva de *Bombyx mori*, etc.), células de mamífero (célula nerviosa de rata, célula de mono (COS-7, etc.)), célula de hámster chino (célula CHO, etc.) etc.) y similares.

25 Los ejemplos del mamífero incluyen, pero no se limitan a, animales de experimentación como roedores como ratón, rata, hámster y cobaya y similares, conejo y similares, animales domésticos como cerdos, bovinos, cabras, caballos, ovejas, visón y similares, animales de compañía como perros, gatos y similares, primates como humanos, monos, *Macaca fascicularis*, *Macaca mulatta*, tití, orangután, chimpancés y similares, y similares.

30 Los ejemplos del vector plasmídico incluyen vectores plasmídicos derivados de *Escherichia coli* (p. ej., pBR322, pBR325, pUC12, pUC13), vectores plasmídicos derivados de *Bacillus subtilis* (p. ej., pUB110, pTP5, pC194), vectores plasmídicos derivados de levadura (p. ej., pSH19, pSH15) y similares, que se pueden seleccionar apropiadamente de acuerdo con el tipo del huésped que se va a usar y el objeto de uso.

35 El tipo del vector vírico se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con el tipo del huésped que se va a usar y el objeto de uso. Por ejemplo, cuando se usa una célula de insecto como huésped, se puede usar un vector de baculovirus y similares. Cuando se usa una célula de mamífero como huésped, se pueden usar vectores de retrovirus como vector de virus de leucemia murina de Moloney, vector de lentivirus, vector de virus sindbis y similares, vector de adenovirus, vector de virus del herpes, vector de virus adeno-asociado, vector de parvovirus, vector de virus vaccinia, vector de virus sendai y similares.

40 45 El promotor se puede seleccionar de acuerdo con el tipo de huésped que se va a usar, y se puede seleccionar uno capaz de iniciar la transcripción en el huésped. Por ejemplo, cuando el huésped es del género *Escherichia*, son preferibles el promotor trp, el promotor lac, el promotor T7 y similares. Cuando el huésped es del género *Bacillus*, son preferibles el promotor SPO1, el promotor SPO2, el promotor penP y similares. Cuando el huésped es levadura, son preferibles el promotor PHOS, el promotor PGK y similares. Cuando el huésped es una célula de insecto, son preferibles el promotor de polihedrina, el promotor P10 y similares. Cuando el huésped es una célula de mamífero, son preferibles el promotor subgenomic(26S), el promotor CMV, el promotor SR α y similares.

50 El vector de la presente invención puede contener una secuencia señal para la secreción de anticuerpos. Como secuencia señal para la secreción de anticuerpos cuando se produce en el periplasma de *Escherichia coli*, se puede usar la secuencia señal pelB (Lei, S. P. y cols. J. Bacteriol. (1987) 169, 4379).

55 Cuando se desee, el vector de la presente invención puede contener potenciador, señal de corte y empalme, señal de adición de poliA, marcador de selección, origen de replicación de SV40 (en lo sucesivo en la presente memoria a veces abreviado como SV40ori) y similares, cada uno de un modo operable. Los ejemplos del marcador de selección incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (en lo sucesivo en la presente memoria a veces abreviado como dhfr) [resistencia a metotrexato (MTX)], el gen de resistencia a ampicilina (a veces abreviado como Amp r), gen de resistencia a neomicina (a veces abreviado como Neo r , resistencia a G418) y similares.

Introduciendo el vector de la presente invención mencionado anteriormente en el huésped mencionado anteriormente mediante métodos de transferencia génica conocidos per se (p. ej., método de lipofección, método de fosfato de calcio, método de microinyección, método de fusión de proplasto, método de electroporación, método de DEAE dextran,

método de transferencia génica mediante Gene Gun, etc.), se puede producir un transformante con el vector introducido en este (transformante de la presente invención). Cuando se usa un vector de expresión como vector que se va a introducir, el transformante puede expresar el anticuerpo de la presente invención. El transformante de la presente invención es útil para la producción del anticuerpo de la presente invención y similares.

- 5 El anticuerpo de la presente invención se puede producir cultivando el transformante de la presente invención mediante un método conocido por se de acuerdo con el tipo de huésped, y aislando el anticuerpo de la presente invención del cultivo. Cuando el huésped es el género *Escherichia*, el transformante se cultiva en un medio apropiado como medio LB, medio M9 y similares generalmente a aproximadamente 15-43 °C durante aproximadamente 3-24 horas. Cuando el huésped es el género *Bacillus*, el transformante se cultiva en un medio apropiado generalmente a aproximadamente 10 30-40 °C durante aproximadamente 6-24 horas. Cuando el huésped es levadura, el transformante se cultiva en un medio apropiado como medio de *Burkholder* y similares generalmente a aproximadamente 20 °C-35 °C durante aproximadamente 24-72 horas. Cuando el huésped es una célula de insecto o insecto, el transformante se cultiva en un medio apropiado como medio de insecto de Grace al que se le añade aproximadamente un 10 % de suero bovino y similares, generalmente a aproximadamente 27 °C durante aproximadamente 3-5 días. Cuando el huésped es una 15 célula animal, el transformante se cultiva en un medio apropiado como medio MEM al que se añade aproximadamente un 10% de suero bovino y similares generalmente a aproximadamente 30 °C-40 °C durante aproximadamente 15-60 h. En cualquier cultivo, la aireación y agitación se pueden realizar según sea necesario.

En cuanto al método de producción de anticuerpos mediante ingeniería genética se pueden citar, por ejemplo, Co, M. S. y cols., *J. Immunol.* (1994) 152, 2968-2976; Better, M. y Horwitz, A. H., *Methods Enzymol.* (1989) 178, 476-496; 20 Pluckthun, A. y Skerra, A., *Methods Enzymol.* (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., *Methods Enzymol.* (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. y cols., *Methods Enzymol.* (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. y Walker, B. W., *Trends Biotechnol.* (1991) 9, 132-137 y similares.

La separación y purificación del anticuerpo de la presente invención de un cultivo no está limitada de ninguna manera, y se pueden emplear los métodos de separación y purificación usados generalmente para la purificación de 25 anticuerpos. Por ejemplo, el anticuerpo se puede separar y purificar seleccionando y combinando apropiadamente columna de cromatografía, filtro, ultrafiltración, precipitación salina, precipitación con disolvente, extracción con disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, isoelectroenfoque, diálisis, recristalización y similares.

30 Los ejemplos de la cromatografía incluyen cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía de fase inversa, cromatografía de adsorción y similares (*Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*. Ed Daniel R. Marshak y cols., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Estas cromatografías se pueden realizar usando cromatografía en fase líquida, por ejemplo, cromatografía en fase líquida como HPLC, FPLC y similares. Los ejemplos de la columna que se 35 va a usar para la cromatografía de afinidad incluyen la columna de proteína A y la columna de proteína G. Por ejemplo, como columna que usa proteína A, se pueden mencionar Hyper D, POROS, Sepharose FF (fabricada por GE Amersham Biosciences) y similares. La presente invención también abarca un anticuerpo altamente purificado mediante estos métodos de purificación.

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo de la presente 40 invención mencionado anteriormente como principio activo. Las agrecanasas (particularmente, ADAMTS4 y 5) degradan el agrecano y contribuyen a la destrucción del cartílago en la artritis, como la osteoartritis, la artritis reumatoide y similares. Por lo tanto, la administración del anticuerpo de la presente invención inhibe la actividad agrecanasa, suprime la degradación del agrecano, suprime la destrucción del cartílago y, como resultado, puede 45 prevenir o tratar la progresión de la artritis. Por consiguiente, el anticuerpo de la presente invención y la composición farmacéutica de la presente invención son útiles como agentes profilácticos o terapéuticos para la progresión de la artritis y similares. Particularmente, el anticuerpo de la presente invención, en donde el anticuerpo inhibe no solo la actividad agrecanasa de ADAMTS4 humana sino también la actividad agrecanasa de ADAMTS5 humana, puede 50 inhibir simultáneamente múltiples tipos de agrecanasas. Por lo tanto, se puede esperar un efecto supresor de la desnaturalización o destrucción del cartílago superior, y un efecto profiláctico o terapéutico superior sobre la artritis. El tipo de artritis no está particularmente limitado siempre que se acompañe de la destrucción o desnaturalización del cartílago debido a la degradación del agrecano por la agrecanasa (particularmente, ADAMTS4 y 5), y el anticuerpo de la presente invención proporciona un efecto profiláctico o terapéutico. Los ejemplos de estas incluyen, pero no se limitan a, desnaturalización o destrucción del cartílago articular debido a la degradación del agrecano en, por ejemplo, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis anquilosante, artritis psoriásica y similares, desnaturalización y destrucción del disco intervertebral en la hernia de disco y similares.

55 Además, dado que se ha resaltado la implicación de ADAMTS4 y 5 en la infiltración de células tumorales cerebrales debido a la degradación del Brevicano en el tumor cerebral (glioblastoma multiforme), la destrucción vascular debida a la degradación del Versicano en la vasculitis intratable, la destrucción del tejido cutáneo, la acción de reparación en exceso y similares debido a la degradación del Versicano y el producto de este en la úlcera crónica cutánea, queolloide y similares, el anticuerpo de la presente invención y la composición farmacéutica de la presente invención también 60 son útiles como agentes profilácticos o terapéuticos para la progresión de estas enfermedades y similares.

Cuando el anticuerpo de la presente invención está "contenido como un ingrediente activo", significa que el anticuerpo de la presente invención está contenido como al menos uno de los ingredientes activos, y no limita el contenido de este. La composición farmacéutica de la presente invención puede contener otro(s) ingrediente(s) activo(s) junto con el anticuerpo de la presente invención.

- 5 El anticuerpo de la presente invención se puede formular de acuerdo con un método convencional (p. ej., Remington's Pharmaceutical Science, última edición, Mark Publishing Company, Easton, EE. UU.). Cuando sea necesario, además, puede contener un transportador y/o aditivo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, puede contener tensioactivo (PEG, Tween, etc.), excipiente, antioxidante (ácido ascórbico, etc.), colorante, sabor, conservante, estabilizante, agente tamponante (fosfato, citrato, otro ácido orgánico, etc.), agente quelante (EDTA, etc.), agente de suspensión, agente isotonizante, aglutinante, disgragante, lubricante, deslizante, corrector y similares. Sin limitarse a estos, la composición farmacéutica de la presente invención puede contener otros transportadores convencionales según sea apropiado. Los ejemplos específicos incluyen ácido silílico anhídrico ligero, lactosa, celulosa cristalina, manitol, almidón, carmelosa de calcio, carmelosa de sodio, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetylcelulosa, polivinil acetaldietilaminoacetato, polivinilpirrolidona, gelatina, triglicérido de ácido graso de cadena media, aceite de ricino hidrogenado polioxietileno 60, sacarosa, carboximetilcelulosa, almidón de maíz, sales inorgánicas y similares. También puede contener otro polipéptido de bajo peso molecular, albúmina sérica, gelatina y proteína como inmunoglobulina y similares, así como aminoácidos. Cuando se formula una solución acuosa para inyección, el anticuerpo de la presente invención se disuelve en, por ejemplo, solución isotónica que contiene solución salina, glucosa u otro agente auxiliar. Los ejemplos del agente auxiliar incluyen D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro de sodio, y se pueden usar en combinación con agentes solubilizantes adecuados, por ejemplo, alcohol (etanol, etc.), polialcohol (propilenglicol, PEG, etc.), tensioactivo no iónico (polisorbato80, HCO-50) y similares.

Cuando sea necesario, el polipéptido también se puede incluir en una microcápsula (microcápsulas hechas de hidroximetilcelulosa, gelatina, polimetacrilato de metilo y similares), o formularse como un sistema de suministro de fármacos coloidal (liposoma, microesfera de albúmina, microemulsión, nanopartículas y nanocápsulas, etc.) (véase Remington's Pharmaceutical Science 16^a edición &, Oslo Ed. (1980) etc.). Además, también se conoce un método para formular un fármaco como un medicamento de liberación sostenida, y es aplicable a un polipéptido (Langer y cols., J. Biomed. Material. (1981) 15: 167-277; Langer, Chem. Tech. (1982) 12: 98-105; Patente de EE.UU. N.º 3.773.919; EP-A-58,481; Sidman y cols., Biopolymers (1983) 22: 547-56; EP N.º 133.988). Además, también es posible aumentar la cantidad de líquido que se va a administrar por vía subcutánea añadiendo o combinando hialuronidasa a o con el presente agente (p. ej., documento WO 2004/078140 etc.).

El contenido del anticuerpo de la presente invención en una composición farmacéutica es, por ejemplo, aproximadamente del 0,01-100% en peso, preferiblemente del 0,1-99,9%, de la composición farmacéutica completa.

Aunque la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar tanto por vía oral como parenteral, se administra preferiblemente por vía parenteral. Específicamente, se administra a pacientes mediante inyección o administración transdérmica. Como ejemplo de la forma de dosificación de inyección, se puede administrar sistémica o tópicamente mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección subcutánea y similares. También se puede administrar en el sitio de tratamiento o en las proximidades de este mediante inyección tópica, particularmente inyección intramuscular. Los ejemplos de la forma de dosificación de administración transdérmica incluyen pomada, gel, crema, venda adhesiva, parche y similares, que se pueden administrar sistémica o tópicamente. Además, el método de administración se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con la edad y los síntomas de los pacientes. La dosis se puede seleccionar de, por ejemplo, el intervalo de 0,5 mg-10 mg/kg de peso corporal como el anticuerpo de la presente invención. Sin embargo, la composición farmacéutica de la presente invención no está limitada por estas dosis.

Ejemplos

45 La presente invención se explica con más detalle a continuación haciendo referencia a los Ejemplos, que no se deben interpretar como limitativos. Diversas manipulaciones génicas en los Ejemplos siguieron el método descrito en Molecular Cloning, tercera ed. (Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001).

Materiales y métodos

Cribado en librerías de expresión en fagos y generación de Fab.

50 Se generó la producción de anticuerpos Fab monoclonales específicos para ADAMTS4 y ADAMTS5 usando la Librería de anticuerpos combinatoria humana (HuCAL; MorphoSys AG, Martinried, Alemania). Se biotinilaron ADAMTS4 y ADAMTS5 recombinantes (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) y se incubaron con HuCAL. Los fagos que expresan Fab unidos se enriquecieron en tres rondas de cribado consecutivas. El conjunto de genes Fab se aisló a partir de los fagémidos y se insertó en vectores de expresión de *Escherichia coli* que dan lugar a la expresión periplásmica funcional del Fab equipado con Strep-tag II. Después de la transformación, se picaron colonias individuales y se cultivaron en placas de microtitulación. Después de la inducción de la expresión de los anticuerpos por incubación con isopropil-β-tiogalactopiranósido durante toda la noche, las células se lisaron enzimáticamente y los extractos brutos se ensayaron mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Se determinaron las secuencias de ADN de las regiones

CDR del VH del anticuerpo para los clones que dieron señales fuertes sobre los antígenos en el ELISA. Se eligieron colonias que contenían Fabs para la purificación posterior, y algunos de los Fabs se reformatearon en IgG1 humana completa para experimentos adicionales.

ADAMTS4 y ADAMTS5 humanas recombinantes.

- 5 Se transfecaron los vectores de expresión que contenían fragmentos de ADNc que codifican los residuos Phe²¹³-Cys³⁸⁵ de ADAMTS4 humana, que corresponde a los dominios de ADAMTS4 de metaloproteína, desintegrina, trombospondina y ricos en cisteína, con la etiqueta Strep-tag II en el extremo C terminal en células HEK293T usando Lipofectamina (Life Technologies, Rockville, MD). Los medios de cultivo se recogieron a los 2 días después de la transfección, y se purificó ADAMTS4 humana recombinante usando Strep-Tactin Sepharose de acuerdo con las 10 instrucciones del fabricante (IBA Biotechnica, Hanover, Alemania). Se adquirió la proteína ADAMTS5 recombinante que contiene los dominios de metaloproteína, desintegrina y trombospondina (residuos de Ser²⁶²-Pro⁶²² de ADAMTS5) de R&D Systems Inc.

Inmuno-detección de anticuerpos anti-ADAMTS humanos.

- 15 Las proteínas recombinantes ADAMTS1 humana (R&D Systems), ADAMTS4, ADAMTS5 (R&D Systems), ADAMTS15 (R&D Systems), ADAM10 (R&D Systems), ADAM12 (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd., Tokio, Japón), ADAM17 (R&D Systems) y MMP-13 (Millipore, Billerica, MA) y MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-9 humanas purificadas (Daiichi Fine Chemical, Co., Ltd., Toyama, Japón) se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras, y las muestras resueltas en los geles se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Las membranas se incubaron con Fabs candidatos frente a especies ADAMTS (5 20 μ g/ml; clones 237-1, 237-5, 237-21, 237-43 y 237-53) a 4 °C durante 16 h. Después de lavar con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 20 al 0,1 %, las membranas se hicieron reaccionar con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante frente a la IgG humana (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 1 25 h a temperatura ambiente. Se usó un reactivo de quimioluminiscencia (sustrato de detección de Western, Pierce ECL; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) para hacer visibles las bandas de las proteína marcadas. Todas las muestras también se examinaron en geles teñidos con plata, que se prepararon mediante un kit de tinción con plata (Cosmo Bio Co., Ltd, Carlsbad, CA).

Inhibición de la actividad agrecanasa de ADAMTS4 y 5 con anticuerpo anti-ADAMTS humano (clon 237-53).

- 30 Se incubaron ADAMTS4 recombinante (180 ng) y ADAMTS5 (180 ng) durante 30 min a 37 °C con anticuerpo anti-ADAMTS humano (IgG1; clon 237-53) en proporciones molares de 1:0,2-5 (enzima: anticuerpo) o con IgG1 normal de control humano (R&D Systems) y luego se hicieron reaccionar con agrecano porcino (100 μ g) durante 16 h a 37 °C. Despues de la desglicosilación del agrecano con condroitinasa ABC y queratanasa (Seikagaku Corporation, Tokio, Japón), se monitorizó la actividad agrecanasa mediante inmuno-detección usando el anticuerpo anti-NITEGE³⁹² neoepítopo de agrecano (1,2 μ g/ml) (Hashimoto G, y cols. J Biol Chem. 2004; 279: 32483-91). La densidad de la 35 banda de proteína se evaluó mediante densitometría usando el software de análisis Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD).

Mapeo del dominio del anticuerpo anti-ADAMTS (clon 237-53).

- 40 Se sintetizaron proteínas recombinantes marcadas con FLAG y ácido dihidrofólico reductasa (DHFR) de cada dominio de ADAMTS4 y del dominio de trombospondina con supresión NH2- o COOH-terminal usando un sistema de traducción libre de células (PUREflex) (Gene Frontier Corporation, Chiba, Japón). Estas muestras se sometieron a SDS-PAGE y después se inmuno-detectaron con anticuerpo anti-FLAG (Sigma-Aldrich, St Louis, MO; 2 μ g/ml) o anticuerpo anti-ADAMTS humano (clon 237-53; 2 μ g/ml).

Análisis de interacción mediante resonancia de plasmón superficial (BIAcore)

- 45 Las especies de ADAMTS recombinantes se inmovilizaron de forma covalente a través del acoplamiento de amina en cámaras de flujo de chip de sensor CM5 (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido). Se inyectó IgG1 del clon 237-53 en las cámaras usando BIAcore 3000 (GE Healthcare Life Sciences). Se calculó la K_D (la afinidad) a partir de los valores de K_a y K_d determinados.

Inhibición de la actividad agrecanasa en condrocitos cultivados con anticuerpo anti-ADAMTS (clon 237-53).

- 50 Se cultivaron condrocitos aislados por disociación enzimática de cartílago osteoartítico humano en medio Eagle modificado de Dulbecco/ medio F-12 de Ham (Sigma-Aldrich) complementado con suero bovino fetal al 10% y 25 μ g/ml de ácido ascórbico, y se trataron con o sin interleuquina-1 α (IL-1 α) (1 ng/ml; Dainippon Sumitomo Pharmaceutical Company Ltd., Okada, Japón) durante 24 h después de la privación de suero cultivando en el medio que contenía hidrolizado de lactoalbúmina al 0,2%. Se trataron con anticuerpo frente a ADAMTS (5 μ g/ml, clon 237-53) o con IgG de control humano (5 μ g/ml; Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 1 h, y después se incubaron en presencia de agrecano (100 μ g) durante 16 h. Los medios concentrados se sometieron a SDS-PAGE después de la desglicosilación y se transfirieron a membranas de PVDF. La actividad agrecanasa se evaluó mediante inmuno-detección con anticuerpo anti-NITEGE³⁹² neoepítopo (1,2 μ g/ml). Se obtuvo el consentimiento informado de los 55

pacientes con osteoartritis para el uso experimental de las muestras quirúrgicas de acuerdo con las directrices éticas hospitalarias.

Para examinar la expresión de ARNm de ADAMTS4 y 5, se preparó ARN total a partir de condrocitos tratados con o sin IL-1 α (1 ng/ml) y anticuerpo anti-ADAMTS humano (clon 237-53) durante 18 h, y se transcribió de manera inversa a ADNc usando transcriptasa inversa Superscript II (Life Technologies, Rockville, MD). Los ADNcs se amplificaron mediante PCR con cebadores específicos para ADAMTS4 y 5 y para el gen constitutivo de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como se ha descrito anteriormente (Naito S, y cols. Pathol Int. 2007; 57: 703-11).

Resultados

Cribado de anticuerpos humanos frente a ADAMTS4 y ADAMTS5

Mediante el cribado de la librería de anticuerpos humanos (HuCAL) usando el método de librería de expresión en fagos, se obtuvieron un total de 5 clones (237-1, 237-5, 237-21, 237-43 y 237-53) que eran reactivos tanto con ADAMTS4 como con ADAMTS5 mediante ELISA. El análisis de inmuno-detección indicó que todos los clones reconocían ADAMTS4 y ADAMTS5 recombinantes, aunque la reactividad con ADAMTS5 era diferente entre los clones (Figura 1A). Para examinar si los clones candidatos inhiben la actividad agrecanasa de ADAMTS4, se incubaron especies de Fab de los clones con ADAMTS4 en una proporción molar de 1: 1, y luego se monitorizó la actividad mediante inmuno-detección usando el anticuerpo específico para el neoepítopo (NITEGE³⁹²). Como se muestra en la Figura 1B, el clon 237-53 inhibió la actividad agrecanasa entre los cinco clones candidatos.

Inmuno-reactividad del clon 237-53 con ADAMTS4 y ADAMTS5

Dado que el clon 237-53 mostró actividad inhibidora de ADAMTS4, este anticuerpo fue el objetivo. Cuando se examinó la reactividad cruzada del anticuerpo con las especies de ADAMTS, ADAM y MMP mediante inmuno-detección, el clon 237-53 reaccionó con ADAMTS4 y ADAMTS5. Sin embargo, no se obtuvo inmuno-reactividad con ADAMTS1, ADAMTS15, ADAM10, ADAM12, ADAM17, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9 o MMP-13 (Figura 2). Los datos sugieren que el clon 237-53 reacciona con alguna región en común presente en ADAMTS4 y ADAMTS5.

Determinación del epítopo de ADAMTS4 reconocido por el clon 237-53

Para determinar el dominio inmunorreactivo de ADAMTS4 por el clon 237-53 de anticuerpo, se examinó en primer lugar la reactividad con las proteínas recombinantes del dominio de metaloproteinasa solo o de los dominios de desintegrina y trombospondina de ADAMTS4 generados mediante el PUREflex. Como se muestra en la Figura 3A, el anticuerpo reconocía sólo la proteína de los dominios de desintegrina y trombospondina. Por lo tanto, se examinó adicionalmente la inmuno-reactividad con el dominio de desintegrina o de trombospondina, y se encontró que el anticuerpo reconocía sólo el dominio de trombospondina (Figura 3B), lo que indicaba que el dominio de trombospondina de ADAMTS4 contiene el epítopo para el anticuerpo.

Para identificar el epítopo con más detalle, se usó una matriz de péptidos con péptidos parciales inmovilizados de ADAMTS4 humana para el mapeo de epítopos del clon 237-53 de anticuerpo. Para ser específicos, tal como se muestra en la siguiente Tabla, se produjo una matriz de péptidos que consistía en péptidos que tenían el número de restos de 12 restos de aminoácidos y un desplazamiento de 3 restos de aminoácidos en relación con una secuencia que cubría el dominio de trombospondina de ADAMTS4 humana. El clon 237-53 de anticuerpo marcado con HRP se hizo reaccionar con la matriz de péptidos.

Tabla 1

1	AGGWGPWGPWGD (SEQ ID N.º: 18)	16	TCGGGVQFSSRD (SEC ID N.º 33)	31	PVPRNGGKYCEG (SEQ ID N.º: 48)
2	GGWGPWGPWGDC (SEQ ID N.º: 19)	17	CGGGVQFSSRDC (SEC ID N.º 34)	32	VPRNNGGKYCEGR (SEQ ID N.º: 49)
3	GWGPWGPWGDCS (SEQ ID N.º: 20)	18	GGGVQFSSRDCT (SEC ID N.º 35)	33	PRNGGKYCEGRR (SEQ ID N.º: 50)
4	WGPWGPWGDCSR (SEQ ID N.º: 21)	19	GGVQFSSRDCTR (SEC ID N.º 36)	34	RNGGKYCEGRRT (SEQ ID N.º: 51)
5	GPWGPWGDCSRT (SEQ ID N.º: 22)	20	GVQFSSRDCTRP (SEC ID N.º 37)	35	NGGKYCEGRRTR (SEQ ID N.º: 52)

6	PWGPWGDCSRTC (SEQ ID N.º: 23)	21	VQFSSRDCTRPV (SEC ID N.º 38)	36	GGKYCEGRRTRF (SEQ ID N.º: 10)
7	WGPWGDCSRTCG (SEQ ID N.º: 24)	22	QFSSRDCTRPVP (SEC ID N.º 39)	37	GKYCEGRRTRFR (SEQ ID N.º: 11)
8	GPWGDCSRTCGG (SEQ ID N.º: 25)	23	FSSRDCTRPVPR (SEQ ID N.º: 40)	38	KYCEGRRTRFRS (SEQ ID N.º: 12)
9	PWGDCSRTCGGG (SEQ ID N.º: 26)	24	SSRDCTRPVPRN (SEQ ID N.º: 41)	39	YCEGRRTRFRSC (SEQ ID N.º: 13)
10	WGDCSRTCGGGV (SEQ ID N.º: 27)	25	SRDCTRPVPRNG (SEQ ID N.º: 42)	40	CEGRRTRFRSCN (SEQ ID N.º: 53)
11	GDCSRTCGGGVQ (SEQ ID N.º: 28)	26	RDCTRPVPRNGG (SEQ ID N.º: 43)	41	EGRRTRFRSCNT (SEQ ID N.º: 54)
12	DCSRTCGGGVQF (SEQ ID N.º: 29)	27	DCTRPVPRNGGK (SEQ ID N.º: 44)	42	GRRTRFRSCNT (SEQ ID N.º: 55)
13	CSRTCGGGVQFS (SEQ ID N.º: 30)	28	CTRPVPRNGGKY (SEQ ID N.º: 45)	43	RRTRFRSCNTED (SEQ ID N.º: 56)
14	SRTCGGGVQFSS (SEQ ID N.º: 31)	29	TRPVPRNGGKYC (SEQ ID N.º: 46)	44	RTRFRSCNTEDC (SEQ ID N.º: 57)
15	RTCGGGVQFSSR (SEQ ID N.º: 32)	30	RPVPRNGGKYCE (SEQ ID N.º: 47)	45	TRFRSCNTEDCP (SEQ ID N.º: 58)

Como resultado, 237-53 se unió específicamente a los péptidos #36-#39 mencionados anteriormente. Los resultados sugieren que el epítopo de 237-53 contiene la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 9 (YCEGRRTRF) que es común a los péptidos #36-#39.

- 5 Se cultivó *Escherichia coli* del clon 237-53 obtenido, y se recuperó el plásmido (kit QIAprep Spin MiniPrep: fabricado por QIAGEN) y se usó para el análisis de la secuencia de ADN. La Tabla 2 muestra las secuencias de aminoácidos de las CDRs (regiones determinantes de complementariedad) de la cadena H y de la cadena L 237-53.

Tabla 2

cadena ligera

	LCDR1	LCDR2	LCDR3
237-53	RSSQSILYSSNNYLA (SEC ID N.º: 1)	HTASARES (SEQ ID N.º: 2)	QQYYSVSI (SEQ ID N.º: 3)
cadena pesada			
	HCDR1	HCDR2	HCDR3
237-53	GTFSSFAIS (SEQ ID N.º: 4)	GIFPIFGQANYAQKFQG (SEC ID N.º: 5)	FSDWWWEWQMDY (SEC ID N.º: 6)

- 10 Las secuencias de aminoácidos de longitud completa de las regiones variables de la cadena H y la cadena L de 237-53 fueron las siguientes.

Cadena L VLk4

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSILYSSNNNYLAWYQQKPGQPPKLLIHTASARESGV
PDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQQYYSVSITFGQGTKVEIKRT (SEQ ID NO:
7)

Cadena H VH1a

QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGGTFSSFAISWVRQAPGQGLEWMGGIFPIFGQANYAQK
FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARFSDWWEWQMDYWGQGTLVTVSS (SEQ
5 ID NO: 8)

Inhibición de la actividad agrecanasa de ADAMTS4 y ADAMTS5 por el clon de anticuerpo 237-53

La actividad agrecanasa de ADAMTS4 y ADAMTS5 se ensayó mediante demostración por inmuno-detección de los fragmentos de agrecano de 65 kDa con la secuencia COOH-terminal de NITEGE³⁹² usando el anticuerpo específico del neoepítopo del agrecano. Como se muestra en la Figura 4A, el clon de anticuerpo 237-53 bloqueaba la actividad de ADAMTS4 a menos del 20% de la actividad original, mientras que la actividad de ADAMTS5 se inhibía ligeramente aproximadamente al 70% de la actividad original. No se observó inhibición con IgG control normal (Figura 4A). El análisis cinético usando BIACore demostró una unión de alta afinidad de este anticuerpo a especies de ADAMTS, que mostraba valores de K_D de $1,17 \times 10^{-8}$ M y $1,46 \times 10^{-9}$ M para ADAMTS4 y ADAMTS5, respectivamente.

10 Los condrocitos cultivados de cartílago osteoartrítico expresaron ADAMTS5, pero no ADAMTS4 (Figura 4B, izquierda).
15 Cuando los condrocitos se trataron con IL-1 α , se indujo ADAMTS4, pero la expresión de ADAMTS5 no cambió (Figura 4B, izquierda). La actividad agrecanasa de los condrocitos no tratados fue mínima, pero aumentó después de la estimulación con IL-1 α (Figura 4B, derecha). Cuando los condrocitos estimulados con IL-1 α se trataron con el clon de anticuerpo 237-53, la actividad de agrecanasa se redujo sustancialmente al nivel de control, pero no se observó inhibición por tratamiento con IgG de control normal (Figura 4B, derecha).

20 **Aplicabilidad industrial**

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un anticuerpo anti-agrecanasa humana útil para la profilaxis o tratamiento de la artritis.

Esta solicitud se basa en la solicitud de patente provisional de EE. UU. N.º de serie 61/891.087 (fecha de presentación: 15 de octubre, 2013).

25

[Tabla 3-1]

SEQ ID N.º: 1

237-53 LCDR1

RSSQSILYSSNNNYLA

SEQ ID N.º: 2

237-53 LCDR2

HTASARES

SEQ ID N.º: 3

237-53 LCDR3

QQYYSVSI

ES 2 983 249 T3

SEQ ID N.º: 4

237-53 HCDR1

GTFSSFAIS

SEQ ID N.º: 5

237-53 HCDR2

GIFPIFGQANYAQKFQG

SEQ ID N.º: 6

237-53 HCDR3

FSDWWWEWQMDY

SEQ ID N.º: 7

237-53 VL(kappa4)

DIVMTQSPINLAVLGERATINCRGSQSLILYSSNNNLYLAWTQKPGQYPPKLLINTASARESGVPRFSGSGG
GTDDEFTLITSSLQAEADVAVYYCQGIFTYVSITTFQGEGTRVVEIKRT

SEQ ID N.º: 8

237-53 VH (VH1a)

QVQLVQSGAIHVVKPGRSVKVSGCKASRGTFEGFAIKKVRQAPPGGLEWMEKTFPIIFGANYAQKFQGPVITIA
KESTSTAYMELOSLRSEDTAVYYCARYSPDNWEMQMDYWQGSTLVTYSS

[Tabla 3-2]

SEQ ID N.º: 9

237-53 epítopo

YCEGRRTRF

SEQ ID N.º: 10

237-53 epítopo

GGKYCEGRRTRF

ES 2 983 249 T3

SEQ ID N.º: 11

237-53 epítopo

GKYCEGRRTRFR

SEQ ID N.º: 12

237-53 epítopo

KYCEGRRTRFRS

SEQ ID N.º: 13

237-53 epítopo

YCEGRRTRFRSC

SEQ ID N.º: 14

Secuencia de ADNc de ADAMTS4 humana

[Tabla 3-3]

[Tabla 3-4]

SEQ ID N.º: 15

Secuencia de aminoácidos de ADAMTS4 humana

MÉGYGEHFGQLAGEBINGAQPCLLLPITVPLQWLVWLLLLASLLEKARLAKPLPHRRIVEPERLNGE
VLEPGACAPBLLCPLQAFGETLLELBDTCVQVECLTVQYLSQAPELLQCARFTGTYLTGTINCDEESEVA
SLAWDFTALIIGTQYRIGAEHLQPLKASSTPNSKNGMGAHTURPKRKAUGQGPNCNVKAPAKKSPRUSQKA
KREASLSEPVETLVVADKMAAFHAGIKRYLITVMAAAAKAFKHPSEPNPVSILVYTKENIICSDGMEGPG
VCPFSAQTLTSPCAWQNSLNTPELGUPDMFDTATLPTBONLQAYSTGDTLGMADWVTVGDPAPSCAJVAD
DGTUQANTAAHILGHTPMILNUNSKFCIISLNGPLTTSKINMAFVMAWVQPEEPWSTCBAKETTDPLUNQY
GRULLDKPEAPLNLPPVTFMHDUYLADPQXUTFGFDSRNCFCQLPFPCCAAELWCGHNGIUMCOTKNGPAA
DGTPOGSAACMCGRCIIMDOLQDNFIFOAGGNGEWSPWGDCSRTOGSGVQFSSRDCTPDVTPTNGCKTCE
QHCTPESCTNTSCPTGCAITFRECCAAAYNBTDLFKCGFGPMWVPRYTGVAPODQCKLICQACAGLY
YTIVLÉPRVYIGTPCGHDSSSYCQVOSGCTTNGGERTIGSKKKFDSCMVGCGDGRGCEKQSCSERKFBYGN
NWTIPTGATHILLVKAQNGCBESEYLAALKPDXSTALNGETTLMNPEPTDVVLFGAVZLJNSGATAEST
LSSGQPLAQPLTLQVQVAGNQFQSTRLKVFTFTVPRPFTSTSPFPTPQWLRRAQIHEILRPRWAKK

SEQ ID N.º: 16

Secuencia de ADNc de ADAMTS5 humana

ATAAATTCAATTGTTCCACCTCCTCGCATCTTCACAGGCTCGCGCTGCTCTCGGCCTCGCAGCTGCCGA

[Tabla 3-5]

[Tabla 3-6]

[Tabla 3-7]

[Tabla 3-8]

[Tabla 3-9]

SEQ ID N.º: 17

Secuencia de aminoácidos de ADAMTS5 humana

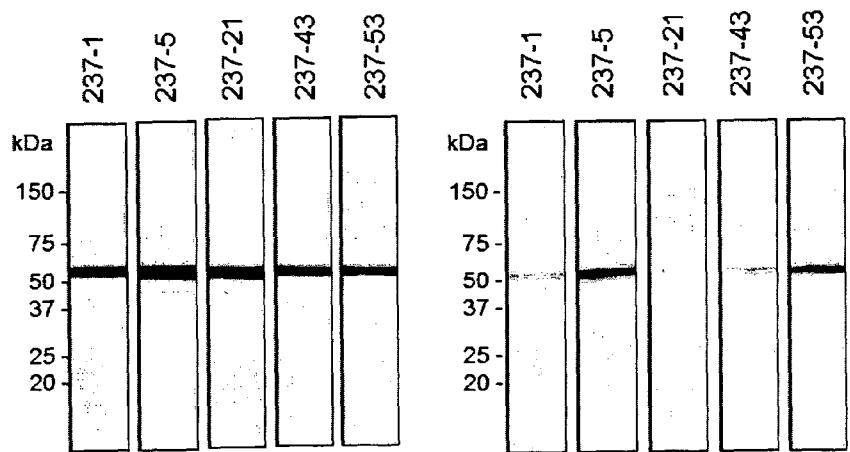
MIGCWASLLTCAFELPLAAVGPAAATPAQDKACQPPPTAAAAAQPFRRQGEEVQERAEPGPCHPHPLAQRRRS
 KGCVQNIQQLYSGGGKVGYLVYAGGRRLIILVNRNGSVGLAGKVPAAHGTSAFWRHRSHCNYRGTVDKESP
 RSLAVEDLCCGLDCFFFAVKHARYTLKFLRQDWAEEEKCRVYCDCSAIIIBVYDREGFSEALPFRASCE
 TPASTPAAHEHAPAHNSNPSKRAALASQLLDSALSPALCEGSPQTWWRKKKNGISGRANQVELLIVADASMA
 RLYGRGLQHLLTTLASIANRLYSHASIEHNIRLAVVKVVVLGDKDKSLEVETKNAATTLKNFCKWQHQHNQ
 LGDKEEHYDAILEFTREELCGHHSCTLGMADVGTCSPERSCAVIEDDGLHAAFTVNEIGHLLGSH
 DQSKFCEETIPGSTEELKRLMSSILTSIDASKPWSKCTISATITFEFLDDGHNCLLQLEPKQIILGPEELPSQT
 YGATQQCNLTHCPKYSVCKGMQVCAPIWCAVVBQHQRQMYCUTKKIPAVHETIPECKGRIQJQKCVOKTKKK
 YYSTSSRHNWGSNGSWGQCSRSCGGGVQHAYRBCNNPAPENNGRYCTGKFAIYPGCSIMPCCPNNGKSFRE
 EQCEAKNGYQSDAKGVKTFVEWVPKYAGVLPADVCKLTCAKGTGYYVVFSPKVDGTECRLY3NSVCVR
 GECVREGCISGIIIGSKLQYIKCGVQGGDNSSCTKIVGTINKKSKGYTUVVPIPEGATHIKVQPKAKDQTR
 FTAYLALKKNGEYLINGKYMISTSETIIDINGTVMNYSGWSHRDFIENGMGYSATREIILIVQILATDPT
 KPIIDVRYSEFTVFKKSTPKVMSVTSGGSNKVGSRITSPQOMVTGIVNLACSRITCDTCWHTKTVQCQEGNRKLA
 KKGCLPSQRFAFKQCLLKKC

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une específicamente a ADAMTS4 humana en un epítopo que consiste en la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 9 e inhibe la actividad agrecanasa de ADAMTS4 humana y ADAMTS5 humana.
- 5 2. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, en donde
la región variable de cadena ligera comprende CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 1, CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 2 y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 3, y
- 10 10. la región variable de cadena pesada comprende CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 4, CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 5 y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 6.
- 15 3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 7 y la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID N.º: 8.
4. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es un anticuerpo humano.
5. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4.
6. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4.
- 20 20. 7. Un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 6.
8. Un transformante que comprende el vector de acuerdo con la reivindicación 7.
9. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4, para su uso en la profilaxis o el tratamiento de la artritis.
- 25 10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, para su uso en la profilaxis o el tratamiento de la artritis.

Fig. 1

A



B

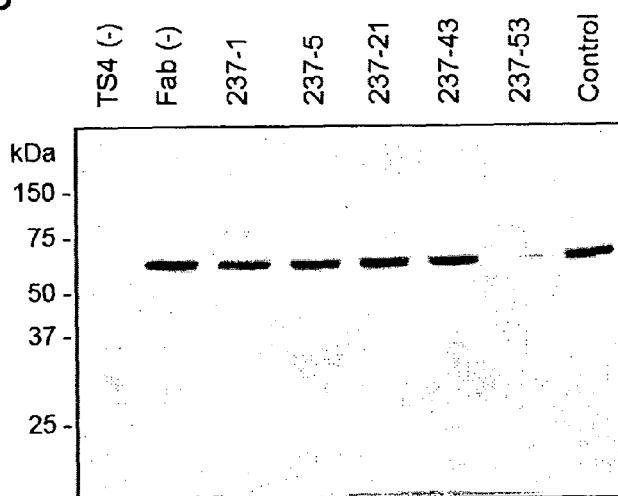


Fig. 2

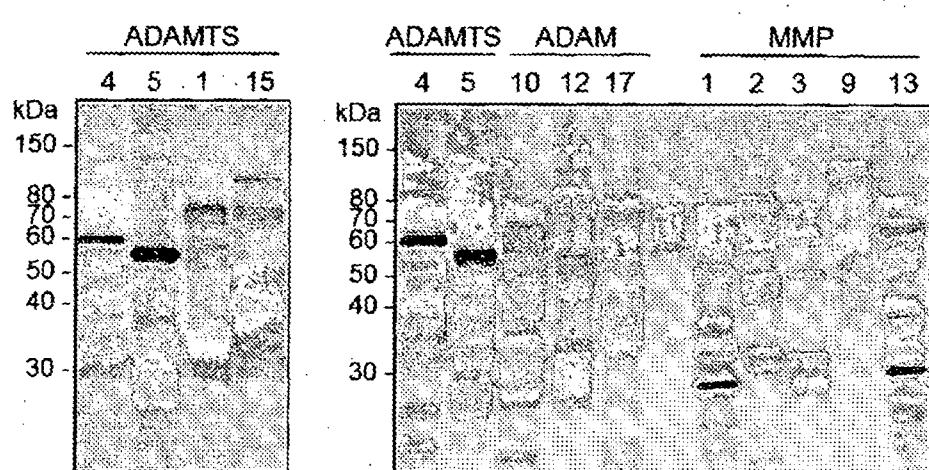
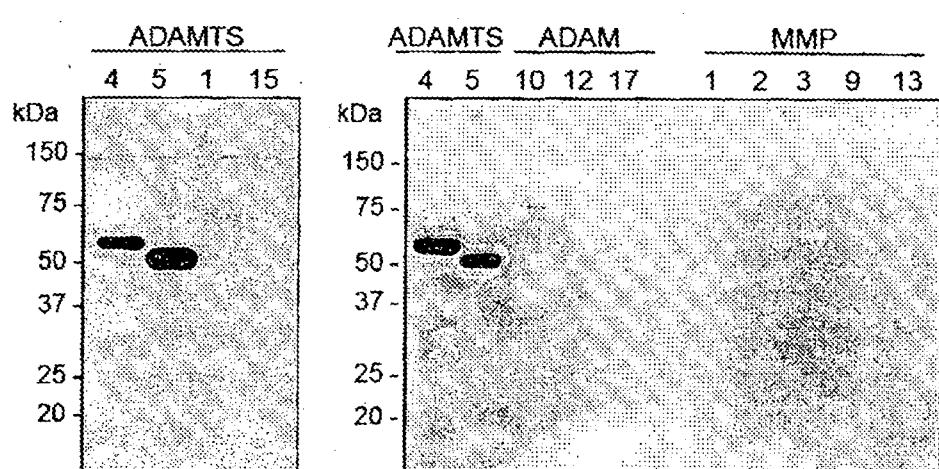
A**B**

Fig. 3

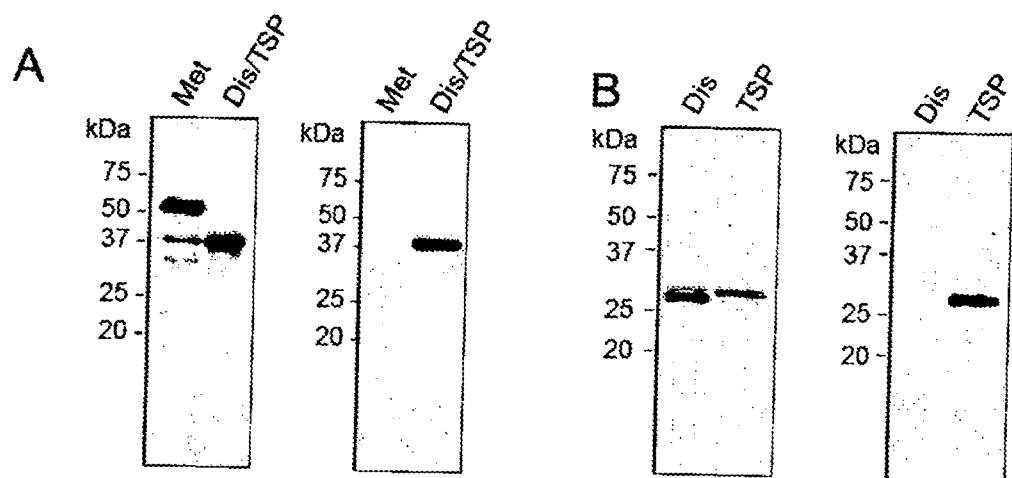


Fig. 4

