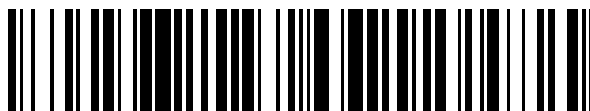


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 926**

51 Int. Cl.:
C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05733043 .3**
96 Fecha de presentación: **29.03.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1730191**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.12.2006**

54 Título: **HOSM DE UNIÓN A INMUNOGLOBULINA.**

30 Prioridad:
30.03.2004 GB 0407197
30.03.2004 GB 0407193

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.11.2011

73 Titular/es:
GLAXO GROUP LIMITED
GLAXO WELLCOME HOUSE, BERKELEY
AVENUE
GREENFORD, MIDDLESEX UB6 0NN, GB

72 Inventor/es:
ELLIS, Jonathan Henry;
EON-DUVAL, Alexandre;
GERMASCHESKI, Volker;
PLUMPTON, Christopher;
RAPSON, Nicholas Timothy y
WEST, Michael Robert

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

ES 2 368 926 T3

DESCRIPCIÓN

HOSM de unión a inmunoglobulina

Campo de la invención

La presente invención se refiere a inmunoglobulinas que se unen específicamente a la oncostatina M (OSM) y, en particular, a la OSM humana (hOMS). Más particularmente, la presente invención se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a hOSM. La presente invención también se refiere a procedimientos de tratar enfermedades o trastornos con dichas inmunoglobulinas, a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas inmunoglobulinas y a procedimientos de fabricación. Otros aspectos de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción.

Antecedentes de la invención

La oncostatina M es una glicoproteína de 28 kDa que pertenece a la familia de la interleucina 6 (IL-6) de las citocinas, que incluye IL-6, factor inhibidor de leucemia (LIF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), cardiotrofina-1 (CT-1) y citocina de tipo cardiotrofina-1 (véase Kishimoto T y col. (1995) Blood 86: 1243-1254), que comparten el receptor de señalización transmembrana gp130 (véase Taga T y Kishimoto T (1997) Annu. Rev. Immunol. 15: 797-819). La OSM se descubrió inicialmente por su capacidad para inhibir el crecimiento de la línea celular de melanoma A375 (véase Malik N (1989) y col. Mol Cell Biol 9: 2847-2853). Posteriormente se descubrieron más efectos y se encontró que era un mediador multifuncional como otros miembros de la familia de la IL-6. La OSM se produce en diversos tipos celulares, incluidos macrófagos, linfocitos T activados (véase Zarling JM (1986) PNAS (USA) 83: 9739-9743), neutrófilos polimorfonucleares (véase Grenier A y col. (1999) Blood 93:1413-1421), eosinófilos (véase Tamura S y col. (2002) Dev. Dyn. 225: 327-31), células dendríticas (véase Suda T y col. (2002) Cytokine 17:335-340). En páncreas, riñones testículos, bazo, estómago y cerebro (Véase Znoyko I y col. (2005) Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 283: 182-186), y médula ósea (véase Psenak O y col. (2003) Acta Haematol 109: 68-75) Sus efectos biológicos principales incluyen activación del endotelio (véase Brown TJ y col. (1993) Blood 82: 33-7), activación de la respuesta de fase aguda (véase Benigni F y col. (1996) Blood 87: 1851-1854), inducción de proliferación o diferenciación celular, modulación de la liberación de mediadores inflamatorios y hematopoyesis (véase Tanaka M y col. (2003) 102: 3154-3162), remodelación ósea (véase de Hooge ASK (2002) Am J Pathol 160: 1733-1743) y estimulación de la angiogénesis (véase Vasse M y col. (1999) Arterioscler Thromb Vasc Biol 19:1835-1842) y cicatrización de heridas.

Los receptores de la OSM (receptor β de la OSM, "OSMR β ") se expresan en un amplio abanico de células, incluidas células epiteliales, condrocitos, fibroblastos (véase Langdon C y col. (2003) J Immunol 170: 548-555), neuronas, células de músculo liso, ganglios linfáticos, huesos, corazón, intestino delgado, pulmones y riñones (véase Tamura S y col. (2002) Mech Dev 115: y células endoteliales vasculares. Varias pruebas sugieren que las células endoteliales son una diana principal de la OSM. Estas células expresan de 10 a 20 veces más los receptores tanto de alta como de baja afinidad y exhiben alteraciones profundas y prolongadas del fenotipo tras la estimulación con OSM (véase Modur V y col. (1997) J Clin Invest 100: 158-168). Además, la OSM es un factor de crecimiento autocrino fundamental para las células del sarcoma de Kaposi, que se piensa que tiene origen endotelial (véase Murakami-Mori K y col. (1995) J Clin Invest 96:1319-1327).

En común con otras citocinas de la familia de la IL-6, la OSM se une a la glicoproteína de transducción de señal transmembrana gp130. Una característica clave de las citocinas gp130 es la formación de complejos del receptor oligomérico que comprenden gp130 y uno o más coreceptores en función del ligando (Revisado en Heinrich PC y col. (2003) Biochem J. 374: 1-20). Como resultado, estas citocinas pueden mediar en las actividades biológicas tanto compartidas como únicas, *in vitro* e *in vivo*, dependiendo de la composición del complejo receptor formado. La OSM humana (hOMS) difiere de las otras citocinas de IL-6 en que pueden formar complejos con gp130 y uno de los dos coreceptores, LIFR o el receptor de la oncostatina (OSMR). La figura 1 ilustra la interacción entre hOMS y gp130, LIFR y OSMR. La estructura de cristal de la hOMS se ha resuelto y se ha demostrado que comprende un haz de 4 hélices α con dos potenciales sitios de glicosilación. Mediante mutagénesis dirigida a sitio se han identificado dos sitios de unión a ligando distintos sobre la molécula de hOMS (véase Deller MC y col. (2000) Structural Fold Des. 8:863-874). El primero, denominado Sitio II (en ocasiones "sitio 2") interacciona con gp130, y el segundo sitio, denominado Sitio III (en ocasiones "sitio 3") en el extremo opuesto de la molécula interacciona con LIFR u OSMR. Los experimentos de mutagénesis han demostrado que los sitios de unión para LIFR y OSMR son casi idénticos, pero que una mutación en un único aminoácido puede discriminar entre los dos.

La OSM se sintetiza como proproteína que contiene una secuencia señal hidrófoba de 25 aminoácidos (AA) en el extremo N y un polipéptido de 33 AA en el extremo C, ambos se escinden para generar OSM madura. La proproteína OSM no tiene actividad biológica, pero esto aumenta significativamente con la escisión del propéptido en el extremo C (véase Bruce A.G. y col. (1992) Prog.Growth Factor Res. 4: 157-170, Malik N y col. (1989) Mol.Cell Biol. 9: 2847-2853). La OSM se ha descrito como una "molécula compacta con forma de barril" con dimensiones de

aproximadamente 20Å x 27Å x 56Å. Hay cuatro regiones de hélice alfa (hélice A 10-37AA, hélice B 67-90AA, hélice C 105-131AA y hélice D 159-185AA, la numeración de AA comienza tras la eliminación de la secuencia señal). Las hélices A y C contienen "pliegues". Las hélices se unen mediante dos bucles en alto (bucle AB 38-66AA, bucle CD A 130-158) y están dispuestos en forma de dos pares antiparalelos (A-D y B-C). (Véase, Deller M.C y col. (2000) Structure 8; 863-874).

Parece que la unión de OSM mediante el Sitio II a gp130 permite la unión de otra molécula de OSM a gp130 mediante una interacción en el Sitio III. La OSM también se unirá a LIFR u OSMR mediante el Sitio III. Por tanto, la OSM forma un complejo con su receptor que consiste en una gp130, un LIFR u OSMR, y dos moléculas de OSM. (Véase Sporeno E (1994) J. Biol. Chem.269. 10991-10995, Staunton D y col. (1998) Prot. Engineer 11:1093-1102 y Gearing D.P (1992) Science 225:306-312).

Usando mutagénesis los residuos importantes para la unión en el Sitio II de OSM-gp130 son Gln20, Gly120, Gln16 y Asn124. Para la unión de OSM-OSMR en el Sitio III, los residuos importantes son Phe160 y Lys163. La interacción en el Sitio II de OSM es, por tanto, dependiente de Gln20, Gly120, Asn124 y, en menor grado, de Gln16 en hOSM. Se han identificado tres residuos complementarios en gp130 (Phe169, Tyr196 y Glu282) de particular interés en la interacción entre OSM y gp130. (Véase, Deller M y col. (2000) Structure 8:863-874, Aasland D y col. (2002) J. Mol. Biol.315: 637-646, Timmermann A y col. (2000) FEBS Lett.468: 120-124).

El documento WO99/48523 divulga antagonistas de la OSM y detalles de la producción de oncostatina M durante el embarazo por las células caducales que estimulan la liberación de HCG se puede encontrar en OGATA y col., Molecular human reproduction, AUG 2000, vol 6, n° 8, páginas 750-757.

La secuencia de aminoácidos desde la posición 1 para hOMS se expone en la SEC ID N° 13

MGVLLTQRTLLSLVLALLFPSMASMAAIGSCSKEYRVLLGQLQKQTDLMQD
TSRLDPYIRIQGLDVPKLRHCRERPGAFFPSEETLRGLGRRGFLOTLNAT
LGCVLHRLADLEQRLPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMARPNILGLRNNIYCM
AQLLDNSDTAEPTKAGRGASQPPTPTPASDAFQRKLEGCRFLHGYHFMHS

VGRVFSKWGESPNRSRRHSPHQALRKGVRRTRPSRKGKRLMTRGQLPR.

(SEQ.I.D.NO: 13).

Los residuos del sitio II de interés concreto se resaltan en negrita y subrayados. Un ADNc que codifica la hOMS se expone en la SEC ID N° 14.

ATGGGGGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTC
 CTGTTTCCAAGCATGGCGAGCATGGCGGCTATAGGCAGCTGCTCGAAAGAG
 TACCGCGTGCTCCTTGGCCAGCTCCAGAAGCAGACAGATCTCATGCAGGAC
 ACCAGCAGACTCCTGGACCCCTATATACGTATCCAAGGCCTGGATGTTCTT
 AAAGTGAGAGAGCACTGCAGGGAGCGCCCCGGGGCCTTCCCCAGTGAGGAG
 ACCCTGAGGGGGCTGGGCAGGCGGGGCTTCTGTCAGACCCTCAATGCCACA
 CTGGGCTGCGTCCTGCACAGACTGGCCGACTTAGAGCAGCGCCTCCCCAAG
 GCCCAGGATTTGGAGAGGTCTGGGCTGAACATCGAGGACTTGGAGAAGCTG
 CAGATGGCGAGGCCGAACATCCTCGGGCTCAGGAACAACATCTACTGCATG
 GCCCAGCTGCTGGACAACTCAGACACGGCTGAGCCCACGAAGGCTGGCCGG
 GGGGCCTCTCAGCCGCCACCCCCACCCCTGCCTCGGATGCTTTTCAGCGC
 AAGCTGGAGGGCTGCAGGTTCTGTCATGGCTACCATCGCTTCATGCACTCA
 GTGGGGCGGGTCTTCAGCAAGTGGGGGGAGAGCCCGAACCGGAGCCGGAGA
 CACAGCCCCCACCAGGCCCTGAGGAAGGGGGTGCAGGACCAGACCCTCC
 AGGAAAGGCAAGAGACTCATGACCAGGGGACAGCTGCCCCGGTAG

(SEQ.I.D.NO:14)

- La artritis reumatoide (AR) comprende un síndrome de procesos patogénicos distintos pero interconectados. Éstos son: Inflamación local y sistémica, proliferación de células sinoviales, angiogénesis y depósito en la matriz que conducen a la formación de tejido de granulación, que invade y destruye el cartílago y el hueso, lo que da como resultado deformidad y discapacidad. Subyacente a esta patología está la liberación crónica de citocinas y mediadores inflamatorios de las células, que entran y residen en la articulación inflamada y de las células de tejido articular endógeno (Véase Firestein G (2003) en Rheumatology. Eds Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt y Weisman. Pub. Mosby. 855-884). Los acontecimientos iniciadores de la AR no se conocen, pero abundantes pruebas sugieren que implican la activación de linfocitos T por un antígeno extraño o "auto" antígeno autólogo (véase Firestein G (2004) J Clin Invest 114: 471-4). La extensión a la cual se requiere que los linfocitos T mantengan los procesos de la enfermedad en curso una vez que se han iniciado también es incierta, aunque los agentes terapéuticos, tales como CTLA4lg, que específicamente están dirigidos a los linfocitos T, pueden ser eficaces en la enfermedad avanzada (véase Kremer JM y col. (2003) New Engl J Med 349: 1907-15, Moreland L y col. (2004) Annual meeting of the American College of Rheumatology Abstract 1475).
- Los primeros acontecimientos en el desarrollo de la sinovitis reumatoide implican el reclutamiento de células mononucleares y polimorfonucleares para que atraviesen el endotelio en los capilares en la capa de revestimiento sinovial. Aunque los polimorfos migran hacia el líquido sinovial (LS), los linfocitos permanecen cerca de los capilares y, después, pueden organizarse en folículos linfoides ectópicos. Este influjo de células inmunitarias es seguido por proliferación de sinoviocitos de tipo fibroblasto (FLS). Al contrario que sus homólogos normales, los FLS de la AR parecen haber escapado de los procesos reguladores que tienen como resultado el cese de la proliferación y apoptosis, que conduce a su acumulación continua (Véase Yamanishi Y y col. (2004) Arthritis Res Ther 7:12-18). Además, el tejido de granulación emergente ahora desarrolla nuevos vasos sanguíneos soportados por la matriz extracelular para permitir su expansión posterior. Este proceso que implica proliferación de fibroblastos, remodelado de la matriz y angiogénesis se asemeja estrechamente a un acontecimiento de cicatrización de heridas no controlado. Los monocitos migran hacia el tejido de granulación en desarrollo y sufren diferenciación en macrófagos con un fenotipo activado crónicamente. De forma similar, los linfocitos B sufren diferenciación terminal para formar células plasmáticas duraderas que secretan anticuerpos, incluidos factores reumatoides. La capacidad del sinovio inflamado para mantener diferenciación local de células mieloides y linfoides se basa, en parte, en la producción local de factores de crecimiento tales como GM-CSF e IL-6. Tanto los FLS como los leucocitos mononucleares residentes liberan factores solubles que estimulan el reclutamiento adicional de células inflamatorias de la sangre y, crucialmente, conducen a la siguiente etapa en el proceso de la enfermedad, la destrucción del cartílago articular y el

remodelado óseo. El tejido PANNUS es invasivo. Su borde principal secreta enzimas destructivas, tales como MMP y citocinas, que alteran el fenotipo de las células que mantienen la integridad estructural del cartílago y el hueso. Como resultado se pierden proteoglicanos y el colágeno de tipo II se escinde de forma irreversible, lo que conduce a la debilitación y pérdida de cartílago. El hueso también sufre una serie de cambios profundos, que incluyen erosiones focales, osteoporosis subcondrial. En última instancia, estos cambios tienen como resultado la deformidad característica y subluxación de las articulaciones observadas en la AR avanzada (véase Gordon D y Hastings D (2003) in Rheumatology. Eds Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt y Weisman. Pub. Mosby. 765-780).

La AR es una enfermedad sistémica resultado, probablemente, del paso de mediadores inflamatorios de la articulación a la sangre. Esto afecta a muchos sistemas orgánicos del cuerpo, incluidos la piel, los ojos, el hígado, los riñones, el cerebro y el revestimiento vascular, que conduce a un incremento de la morbilidad y la mortalidad (Véase Matteson EL (2003) en Rheumatology. Eds Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt y Weisman. Pub. Mosby. 781-792). Gran parte del exceso de mortalidad se debe a la enfermedad cardiovascular causada por aterosclerosis, ya que muchos de los procesos patogénicos implicados en el desarrollo de la sinovitis reumatoide son comunes a la formación de placas ateroscleróticas.

Los tratamientos para la AR están dirigidos a combatir el dolor, reducir la inflamación y detener los procesos que dan lugar a la destrucción de tejido. Tradicionalmente, la AR se ha tratado con fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), dosis bajas de esteroides y los denominados fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (FAME). El uso de estos tratamientos, que incluyen metotrexato (MTX), sulfasalazina, oro y leflunomida, está plagado de niveles bajos de eficacia, el inicio lento, la toxicidad y la mala tolerabilidad e incremento de la resistencia con el tiempo. Más recientemente, la introducción de fármacos biológicos, tales como Enbrel™, Remicade™ y Humira™, que inhiben la citocina factor de necrosis tumoral (TNF), han supuesto un significativo avance (véase Roberts L y McColl GJ (2004) Intern Med J 34:687-93).

Por tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un enfoque terapéutico del tratamiento de la AR y otras enfermedades y trastornos, particularmente enfermedades y trastornos inflamatorios crónicos, tales como osteoartritis y psoriasis. En particular, es un objeto de la presente invención proporcionar inmunoglobulinas, especialmente anticuerpos que se unan específicamente a la OSM (p. ej., hOSM, en particular al Sitio II de la misma) y modulen (es decir inhiban o bloqueen) la interacción entre OSM y gp130 en el tratamiento de enfermedades y trastornos respondedores a la modulación de dicha interacción.

Cada vez existen más pruebas que avalan la hipótesis de que modular la interacción OSM-gp130 puede ser beneficioso en el tratamiento de dichas enfermedades y trastornos.

Pruebas clínicas:

La OSM se encuentra en el LS de los pacientes humanos de AR (véase Hui W et al (1997) 56: 184-7). Estos niveles se correlacionan con el número de neutrófilos en el LS, los niveles de TNF alfa (en ocasiones "TNF") en el LS y los marcadores de destrucción de cartílago (Manicourt DH y col. (2000) Arthritis Rheum 43 281-288). Además, el tejido sinovial de los pacientes de AR secreta OSM de forma espontánea *ex vivo* (Véase Okamoto H y col. (1997) Arthritis and Rheumatism 40: 1096-1105). También se ha demostrado que la OSM está presente en los macrófagos sinoviales (Cawston TE y col. (1998) Arthritis Rheum 41: 1760-1771) y, como se ha comentado antes, los receptores de OSM y la gp130 se expresan en células endoteliales, fibroblastos sinoviales, condrocitos y osteoblastos. Además, las células que infiltran las placas ateroscleróticas y los aneurismas aórticos expresan OSM, lo que sugiere una asociación de esta citocina con la inflamación crónica (Véase Mirshahi F y col. (2001) Ann NY Acad Sci 936: 621-4).

Pruebas in vitro

Las células endoteliales expresan de diez a veinte veces el número de receptores de la OSM con respecto a otros tipos celulares (véase Brown TJ y col. (1991) J Immunol 147: 2175-2180, Linsley PS y col. (1989) J Biol Chem 264: 4282-4289). La OSM sola, o de forma sinérgica en combinación con otras citocinas, activa la liberación en el endotelio de citocinas y quimiocinas que se unen a los neutrófilos, monocitos y linfocitos que participan en su extravasación al tejido sinovial (Véase Modur V y col. (1997) J Clin Invest 100: 158-168). También se ha demostrado que la OSM es un potente estimulador de la angiogénesis (véase Vasse M y col. (1999) Atheroscler Thromb Vasc Biol 19: 1835-1842) y la activación y proliferación de células fibroblastos sinoviales (FLS) (de modo que se facilita la formación de tejido de granulación, la liberación de IL-6, MMP) y actúa sinérgicamente con el TNF y la IL-1 para inducir la liberación de este mediador (Véase Langdon C y col. (2000) Am J Pathol 157: 1187-1196). También se ha demostrado que la OSM induce (con la IL-1) la liberación de colágeno y proteoglicano en el cartílago (Véase Cawston T y col. (1995) Biochem Biophys Res Commun 215: 377-385). Además, la OSM induce la liberación de proteínas de fase aguda y la producción del receptor de IL-6 en los hepatocitos (véase Cichy J y col. (1997) J Immunol 159: 5648-5643, Kurash JK (2004) Exp Cell Res 292: 342-58) y, por tanto, puede contribuir a los efectos sistémicos de la inflamación reumatoide, incluida fatiga. Además, la OSM induce diferenciación y actividad de los osteoclastos *in vitro* (Véase Palmqvist P y col. (2002) J Immunol 169: 3353-3362).

Pruebas in vivo

La expresión adenoviral de la OSM murina (mOSM) en las articulaciones de los ratones normales tiene como resultado una artritis inflamatoria y erosiva grave (véase Langdon C y col. (2000) Am J Pathol 157: 1187-1196). De forma similar, la enfermedad agresiva se observa en ratones defectivos que carecen de TNF, IL-1, IL-6 y iNOS, tras la liberación adenoviral de mOSM (véase de Hooge ASK y col. (2003) Arthritis and Rheumatism 48:1750-1761), lo que demuestra que la OSM puede mediar en todos los aspectos de la patología artrítica. La expresión de OSM en ratón usando un vector adenoviral de expresión de mOSM daña el crecimiento de placas típico de la artritis idiopática juvenil (véase Hooge ASK y col. (2003) Arthritis and Rheumatism 48:1750-1761). En un modelo experimental de artritis inducida por colágeno, un anticuerpo anti-OSM administrado terapéuticamente en ratones impidió toda progresión adicional de la enfermedad. Se observaron resultados similares cuando se administró anti-OSM profilácticamente en ratones con artritis inducida por pristano, un modelo recidivante/remitente reminiscente de la enfermedad humana (véase Plater-Zyberk C y col. (2001) Arthritis and Rheumatism 44: 2697-2702). En monos, la OSM inyectada por vía subcutánea induce una respuesta de fase aguda e inflamación crónica local (véase Loy JK y col. (1999) Toxicol Pathol 27: 151-155). Se ha demostrado que la OSM induce infiltración de mononucleares y PMN y liberación de proteoglicanos cuando se inyecta en articulaciones de cabra (Véase Bell MC y col. (1999) Arthritis Rheum 42: 2543-2551). La sobreexpresión transgénica de mOSM en ganglios linfáticos de ratones tiene como resultado la maduración extratímica de los linfocitos T, la proliferación de linfocitos T de memoria y el fracaso en la depleción de linfocitos T autoinmunitarios (Véase Louis I y col. (2003) Blood 102: 1397-1404). La sobreexpresión transgénica de OSM en el páncreas produce una extensa fibrosis similar a la observada en el sinovio de ARN avanzada (véase Malik N y col. (1995) Mol Cell Biol 15: 2349-2358).

En el documento WO99/48523, los inventores divulgan el uso de antagonistas de OSM en el tratamiento de enfermedades y trastornos inflamatorios. Esta divulgación usó un anticuerpo anti OSM de ratón en un modelo murino de artritis.

Resumen de la invención

Los presentes inventores postulan que la modulación (en particular el bloqueo) de la interacción entre el sitio II de hOSM y gp130 con un anticuerpo que se une específicamente a hOSM modulará la señalización mediante todos los potenciales complejos del receptor de la OSM, de modo que se neutraliza eficazmente la actividad biológica de la citocina en un grado terapéuticamente significativa. No obstante, los presentes inventores han descubierto que el bloqueo de los sitios Sitio II y Sitio III de hSOM mejora sorprendentemente la neutralización de esta citocina. Además, los presentes inventores han encontrado que la glicosilación de hOSM desempeña un papel inesperado en el acontecimiento de unión entre hOSM y un anticuerpo que se une específicamente a Hosm.

Por tanto, la presente invención proporciona un anticuerpo terapéutico 15E10 (que puede ser quimérico, humano, humanizado, biespecífico o fragmentos de unión a antígeno del mismo) que se une específicamente a hOSM e interacciona con el sitio II de la hOSM. Véase la Tabla A, más adelante.

Más adelante se describen formas de realización preferidas de la invención o se definen en las reivindicaciones subordinadas.

En una forma de realización de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a hOSM y modula (es decir, inhibe o bloquea) la interacción entre el sitio II de hOSM y gp130. En algunas realizaciones, el anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente al Sitio II de hOSM.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a hOSM y comprende la siguientes CDRH3: SEC ID N° 3

En otra realización de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a hOSM y comprende las siguientes CDR:

CDRH1: SEC ID N° 1

CDRH2: SEC ID N° 2

CDRH3: SEC ID N° 3

CDRL1: SEC ID N° 4

CDRL2: SEC ID N° 5

CDRL3: SEC ID N° 6

También se describe un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a hOSM y comprende las siguientes CDR:

CDRH1: SEC ID N° 40

CDRH2: SEC ID N° 41

5 CDRH3: SEC ID N° 42

CDRL1: SEC ID N° 43

CDRL2: SEC ID N° 44

CDRL3: SEC ID N° 45

10 A lo largo de la presente memoria descriptiva, los términos "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3" siguen el sistema de numeración de Kabat como se indica en Kabat y col.; Sequences of proteins of Immunological Interest NIH, 1987. Por tanto, a continuación se definen las CDR de acuerdo con la invención:

CDR: Residuos

CDRH1: 31-35B

15 CDRH2: 50-65

CDRH3: 95-102

CDRL1: 24-34

CDRL2: 50-56

CDRL3: 89-97

20 En otra realización de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico murino o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia: SEC ID N° 7 y un dominio V_L que tiene la secuencia: SEC ID N° 8.

También se describe un anticuerpo terapéutico murino o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia: SEC ID N° 46 y un dominio V_L que tiene la secuencia: SEC ID N° 47.

25 En una realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una cadena V_H que tiene la secuencia indicada en la SEC ID N° 9 y un dominio V_L que tiene la secuencia indicada en la SEC ID N°

30 También se describe un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una cadena V_H que tiene la secuencia que se indica en la SEC ID N° 48 y un dominio V_L que tiene la secuencia indicada en la SEC ID N° 49.

En otra realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia indicada en la SEC ID N° 11 y una cadena ligera que tiene la secuencia indicada en la SEC ID N° 12.

35 También se describe un anticuerpo terapéutico humanizado, anticuerpo que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia que se indica en la SEC ID N° 50 y una cadena ligera que tiene la secuencia indicada en la SEC ID N° 51.

En otra forma de realización de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo que modula (es decir, inhibe o bloquea) la interacción entre hOSM y gp130.

40 En otra forma de realización de la invención se proporciona un dominio V_H aislado de un anticuerpo que comprende (o está constituido esencialmente por) la SEC ID N° 7 o la SEC ID N° 9.

En otra realización de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio V_H seleccionado del grupo constituido por: la SEC ID N° 7, la SEC ID N° 9.

También se describe un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a antígeno del mismo que inhibe de forma competitiva la unión del anticuerpo terapéutico que comprende una CDRH3 de la SEC ID N° 3.

5 También se describe un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a antígeno del mismo que inhibe de forma competitiva la unión del anticuerpo terapéutico que comprende las CDR de las SEC ID N° 3, 1,2,3,4, 5 y 6 con hOSM.

También se describe un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a antígeno del mismo que inhibe de forma competitiva a unión del anticuerpo terapéutico que comprende una cadena pesada de SEC ID N° 11 y una cadena ligera de SEC ID N° 12 con hOSM.

10 En otra forma de realización de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión antigénica del mismo de acuerdo con la invención que se describe en el presente documento, para uso en el tratamiento de un paciente humano afectado por una enfermedad o trastorno que responde a la modulación de la interacción entre hOSM y gp130.

15 En otra forma de realización de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión antigénica del mismo de acuerdo con la invención que se describe en el presente documento, para uso en el tratamiento de un paciente humano afectado por una enfermedad o trastorno inflamatorio.

20 En otra forma de realización de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión antigénica del mismo de acuerdo con la invención que se describe en el presente documento, para uso en el tratamiento de un paciente humano afectado por una enfermedad artrítica, particularmente artritis reumatoide, artritis de inicio juvenil u osteoartritis.

También se describe una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión antigénica del mismo de acuerdo con la invención que se describe en el presente documento para usar en reducir o prevenir la degradación de cartílago en un paciente humano afectado por la misma o susceptible a la misma.

25 También se describe una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión antigénica del mismo de acuerdo con la invención que se describe en el presente documento para usar en reducir la producción de TNF alfa en un paciente afectado por una enfermedad o trastorno que responde al TNF alfa.

También se describe una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión antigénica del mismo de acuerdo con la invención que se describe en el presente documento para usar en el tratamiento de las manifestaciones extraarticulares de una enfermedad o trastorno artrítico.

30 También se describe una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión antigénica del mismo de acuerdo con la invención que se describe en el presente documento para usar en el tratamiento de un paciente humano afectado por una enfermedad de origen en células endoteliales.

35 También se proporciona el uso del anticuerpo terapéutico o fragmento de unión antigénica del mismo tal como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y trastornos tal como se describen en el presente documento.

En otra realización de la invención se proporciona un procedimiento para la fabricación de un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en el presente documento.

40 También se describe un ensayo (particularmente un ensayo ELISA) para estudiar la interacción entre OSM (particularmente hOSM) y una pareja de interacción (tal como gp130, LIFR, OSMR), comprendiendo el ensayo la etapa de proporcionar para dicho estudio una muestra de OSM glicosilada (normalmente glicosilada por una célula huésped de vertebrados, tal como una célula huésped de mamífero, por ejemplo glicosilada por CHO).

En otra realización de la presente invención, los autores proporcionan un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a la hOSM glicosilada nativa y que modula (es decir inhibe o bloquea) la interacción entre la hOSM glicosilada nativa y una pareja de interacción seleccionada del grupo que consiste en gp130, LIFR, OSMR.

45 Adicionalmente, los autores proporcionan un procedimiento de producir una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a la hOSM y modula (es decir inhibe o bloquea) la interacción entre hOSM y gp130, en el que el procedimiento comprende las etapas de:

(a) proporcionar un anticuerpo candidato;

50 (b) proporcionar OSM glicosilada (particularmente hOSM producida por una célula huésped de mamífero transformada o transfectada de forma recombinante, tal como una célula CHO transformada de forma

recombinante y/o hOSM glicosilada nativa);

(c) poner en contacto el anticuerpo de la etapa (a) con la hOSM de la etapa (b) en condiciones que permiten la unión;

(d) determinar si el anticuerpo de la etapa (c) modula la interacción entre hOSM y gp130;

5 (e) humanizar opcionalmente dicho anticuerpo de la etapa (a) o (d);

(f) incorporar dicho anticuerpo de la etapa (d) o (e) en una composición farmacéutica.

Otros aspectos, objetos y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la descripción siguiente.

Breve descripción de las figuras

10 La figura 1 es una ilustración esquemática de la interacción entre OMS y gp130, LIFR y OSMRβ.

La Figura 2 ilustra el ELISA de inhibición de gp130 usando hOSM (panel superior) y cOSM (panel inferior) siguiendo el protocolo que se indica más adelante de los ejemplos usando los anticuerpos quiméricos 15E10 y 10D3. Véase en la descripción siguiente detalles adicionales.

15 La Figura 3 ilustra el ensayo de células KB usando hOSM (panel superior) y cOSM (panel inferior) siguiendo el protocolo que se indica más adelante de los ejemplos usando los anticuerpos quiméricos 15E10 y 10D3 de los ejemplos.

La Figura 4 ilustra el ELISA de inhibición de gp130 frente a hOSM (panel superior) y cOSM (panel inferior), en el que se representa gráficamente el % de inhibición como una función de la concentración de anticuerpo para cuatro anticuerpos humanizados (B1L1, B1L2, B4L1, B4L2) y el anticuerpo quimérico 15E10.

20 La Figura 5 ilustra el ELISA de inhibición de gp130 de los ejemplos en el que diversos anticuerpos humanizados (B2L2, B3L2, B4L2) se comparan con el anticuerpo quimérico 15E10 en la unión a hOSM producida en CHO.

La Figura 6 ilustra el ensayo de la figura 5 usando cOSM en lugar de hOSM.

La Figura 7 ilustra el ensayo de la figura 5 usando hOSM producida en CHO en el 25 % del suero AB humano.

La Figura 8 ilustra el ensayo de la figura 7 usando cOSM en lugar de hOSM.

25 La Figura 9 ilustra el ELISA de inhibición de gp130 de OSM de neutrófilos de cuatro muestras humanas diferentes usando los anticuerpos humanizados B2L2, B3L2, B4L2 y el anticuerpo quimérico 15E10.

La Figura 10 ilustra el ELISA de inhibición de gp130 usando tres anticuerpos humanizados (B2L2, B3L2 y B4L2) y el anticuerpo quimérico 15E10 contra hOSM aislada del líquido sinovial de pacientes humanos con AR.

30 Las Figuras 11 a 16 ilustran los resultados de las condiciones de las figuras 5 a 10 en el ensayo con células KB en lugar del ensayo de inhibición de gp130 con la excepción de que el ensayo de células KB de OSM de neutrófilos de la figura 15 usó una única muestra humana de OSM de neutrófilos. Así, la Figura 11 ilustra el ensayo de células KB de hOSM producida en CHO, la figura 12 de cOSM producida en CHO, la figura 13 de hOSM producida en CHO en 25 % de suero AB humano, la figura 14 de cOSM producida en CHO en 25 % de suero AB humano, la figura 15 de OSM de neutrófilos, la figura 16 de OSM aislada de células de LF de pacientes con AR.

35 La Figura 17 ilustra el ELISA de inhibición de gp130 del 15E10 murino parental, el 15E10 quimérico, una construcción de anticuerpo humanizado B3L2 y una Fc mutante lítica de B3L2 contra hOSM producida en CHO. Véanse detalles adicionales en la descripción.

La Figura 18 ilustra el ensayo de la figura 17 usando cOSM.

40 La Figura 19 ilustra el ensayo de células KB del 15E10 murino parental, el 15E10 quimérico, la construcción de anticuerpo humanizado B3L2 y una Fc mutante lítica de B3L2 contra hOSM producida en CHO.

La Figura 20 es una ilustración esquemática del ensayo de competición de los ejemplos.

La figura 21 ilustra la inhibición de 15E10 (construcción humanizada B3L2) por el anticuerpo competidor 10D3 murino de los ejemplos. El porcentaje de inhibición de 15E10 por el competidor 10D3 en equimolaridad (0,15 ug/ml):62,3%.

La Figura 22a ilustra una curva estándar típica en el ELISA gp130-OSM usando OSM no glicosilada y en la que la concentración de gp130 para revestir la placa de ELISA es 1 µg/ml.

La Figura 22b ilustra el incremento de sensibilidad del ELISA gp130-OSM cuando la concentración de gp130 usada para revestir la placa se incrementa a 4 µg/ml.

- 5 La Figura 22c ilustra que el ELISA gp130-OSM funciona tanto con la OSM glicosilada como la OSM no glicosilada. OSM no glicosilada; círculos oscuros, OSM glicosilada: triángulos vacíos. Obsérvese que la sensibilidad del ELISA es mayor para la OSM glicosilada, posiblemente como resultado del enmascaramiento por la glicosilación de los epítomos reconocidos por el anticuerpo de detección usado.

- 10 La Figura 23a ilustra el efecto del anticuerpo neutralizante de OSM, Mab295 (R&D Sytems), en el ELISA de gp130-OSM. OSM sola; círculos vacíos, OSM + Mab295; triángulos oscuros, OSM + Mab295 pero sin gp130 en la placa de ELISA; cuadrados oscuros.

La figura 23b es una ilustración esquemática de cómo el Mab295 podría potenciar la señal de OSM en el ELISA de gp130-OSM.

- 15 La Figura 24 ilustra los datos del ensayo de células KB que muestran la eficacia de la neutralización de la OSM por Mab 295. Las células fueron estimuladas con 1 ng/ml de OSM sólo, o esta concentración de OSM mezclada con varias concentraciones de Mab295 antes del ensayo. OSM sola; triángulos oscuros, OSM + Mab295; círculos vacíos, sin estimulación con OSM; cuadrados oscuros.

- 20 La Figura 25 ilustra el efecto de un anticuerpo específico del sitio III de la OSM OM4-11.31, en el ELISA de gp130-OSM. OSM sola; círculos vacíos, OSM + IgG control de isotipo; triángulos invertidos oscuros, OSM + anticuerpo específico del sitio II de la OSM; cuadrados vacíos, OSM + OM4-11.31; círculos oscuros.

La figura 26 ilustra la inhibición de la unión de un complejo de OSM con un anticuerpo específico del sitio III de la OSM (OM4-11.17) con gp130 por un anticuerpo específico del sitio II, OM4-5.3. 12,5 ng/ml OSM sola; barra oscura, OSM+OM4-11.17; barra con rayas en diagonal, OSM+OM4-11.17+ IgG control; barra a rayas; OSM+OM4-11.17+ OM4-5.3; barra punteada.

- 25 La Figura 27 ilustra la aparición de anticuerpos de OSM específicos del sitio II y no específicos del sitio II en sueros de ratones inmunizados con OSM humana, detectados usando el ELISA de gp130-OSM. Análisis de los sueros después de los refuerzos primero, segundo y tercero con OSM humana; a, b y c, respectivamente. OSM + suero preinmunitario; círculos vacíos, OSM + antisuero de ratones inmunizados; triángulos invertidos oscuros, OSM + antisuero de ratones inmunizados, pero sin gp130 en la placa de ELISA; triángulo invertido vacío.

- 30 La figura 28 ilustra la sinergia en la neutralización de OSM entre un anticuerpo específico del sitio II de la OSM ("15E10 hum", 15E10 humanizado) y un anticuerpo específico del sitio III de la OSM (17H10) medido en un ensayo de células KB. La neutralización de la OSM por 17H10 solo (a) o 15E10 hum solo (b); círculos oscuros, neutralización de la OSM por la combinación de anticuerpos; triángulos vacíos.

- 35 La figura 29 ilustra la eficacia del anticuerpo 15E10 humanizado en la inhibición de la secreción de IL-6 estimulada por OSM de fibroblastos sinoviales de AR. Cada símbolo se refiere a fibroblastos obtenidos de pacientes diferentes.

La figura 30 ilustra la inhibición de la unión de la OSM a gp130 por el anticuerpo anti-OSM OM4-5.3. La OSM (25 ng/ml) se preincubó con las concentraciones de OM4-5.3 indicadas antes de la adición a la placa de ELISA. OSM sola; círculos oscuros, OSM + OM4-5.3; círculos vacíos.

- 40 La figura 31 ilustra la diferencia en la potencia de OM4-41.5 en la inhibición de la unión de la OSM glicosilada y no glicosilada a gp130. OSM no glicosilada; círculos oscuros, OSM glicosilada: triángulos vacíos.

La figura 31b ilustra la diferencia en la potencia de OM4-5.3.1 en la inhibición de la unión de la OSM glicosilada y no glicosilada a gp130. OSM no glicosilada; círculos oscuros, OSM glicosilada: triángulos vacíos.

La figura 32 ilustra la actividad de dos anticuerpos específicos del sitio II de la OSM (a; 15E10, b; 5H2) contra la OSM glicosilada (círculos oscuros) y no glicosilada (triángulos vacíos) en el ELISA de gp130-OSM.

- 45 La figura 33 ilustra la correlación entre el suero y el líquido sinovial [OSM] en muestras apareadas de suero y de LS obtenidas de pacientes de AR.

Las figuras 34a, 34b and 35 ilustran las concentraciones de OSM medidas en el líquido sinovial de OA usando el ELISA de OSM de los ejemplos. La figura 34b ilustra que dos muestras tenían concentraciones de OSM en el líquido sinovial particularmente altas.

La figura 36 ilustra la concentración de OSM encintrada en suero de pacientes de OA en un periodo de ensayo clínico de 12 meses. # Número es la identificación del paciente.

La figura 37 ilustra una curva estándar típica de OSM en 25 % de suero AB humano.

Descripción detallada de la invención

1. Estructuras de los anticuerpos

1.1. Anticuerpos intactos

Normalmente, los anticuerpos intactos son glucoproteínas heteromultiméricas que comprenden al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Aparte de loas IgM, los anticuerpos intactos son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 kDa compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Normalmente, cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace covalente disulfuro, aunque el número de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina varía. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de una serie de regiones constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) y una región constante en su otro extremo; la región constante de la cadena ligera está alineada con la primera región constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Las cadenas ligeras de los anticuerpos de la mayoría de las especies de vertebrados se pueden asignar a uno de dos tipos denominados Kappa y Lambda en la secuencia de aminoácidos de la región constante. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos humanos se pueden asignar a cinco clases diferentes IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. La IgG y la IgA pueden además subdividirse en subclases, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; e IgA1 e IgA2. Existen variantes según la especie, el ratón y la rata tienen, al menos, IgG2a, IgG2b. El dominio variable del anticuerpo confiere especificidad de unión del anticuerpo con ciertas regiones que muestran una variabilidad concreta, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR). Las porciones más conservadas de la región variable se denominan regiones marcoconservadas (FR). Cada dominio variable de las cadenas pesadas y ligeras intactas comprende cuatro FR conectadas por tres CDR. Las CDR en cada cadena se mantienen conjuntamente en proximidad cercana por las FR y, con las otras CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos. Las regiones constantes no están directamente implicadas en la unión del anticuerpo al antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras tales como la participación en la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC), fagocitosis a través de la unión al receptor Fc γ , semivida/tasa de aclaramiento a través del receptor Fc neonatal (FcRn) y citotoxicidad dependiente del complemento a través del componente C1q de la cascada del complemento.

En una realización, los autores proporcionan un anticuerpo terapéutico intacto que se une específicamente a hOSM, en el que el anticuerpo modula la interacción entre hOSM y gp130. El anticuerpo puede unirse específicamente al Sitio II de hOSM e inhibir o bloquear la interacción entre hSOM y sus correspondientes residuos sobre gp130 implicados en la interacción con LA OSM. El protocolo de ELISA para los ejemplos se puede usar para determinar si algún antibiótico concreto o fragmento de unión al antígeno del mismo modula la interacción entre hOSM y gp30. El antibiótico terapéutico intacto puede comprender una región constante (pesada o ligera) de cualquier isotipo o subclase del mismo descrito anteriormente. En una forma de realización, el anticuerpo es del isotipo IgG, particularmente IgG1. El anticuerpo puede ser de rata, ratón, conejo, primate o ser humano. En una realización típica, el anticuerpo es de primate (tal como de mono cinomolgo, babuinos o grandes simios, véase, por ejemplo, los documentos WO99/55369, WO93/02108) o de ser humano.

En otra realización se proporciona un antibiótico terapéutico intacto que comprende una CDRH3 de la SEC ID N° 3. En otra realización se proporciona un antibiótico terapéutico intacto que comprende una región variable que tiene CDR de las SEC ID N° 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

En otra realización, se proporciona un anticuerpo terapéutico murino intacto o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de la SEC ID N° 7 y un dominio V_L de la secuencia de SEC ID N° 8.

También se describe un anticuerpo terapéutico murino intacto o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio V_H que tiene la secuencia de la SEC ID N° 46 y un dominio V_L de la secuencia de SEC ID N° 47.

1.1.2 Anticuerpos humanos

Los anticuerpos humanos se pueden producir mediante una serie de procedimientos conocidos para los expertos en la técnica. Los anticuerpos humanos se pueden producir mediante el procedimiento del hibridoma usando líneas celulares de mieloma humano o de heteromieloma humano-ratón, véase Kozbor J. Immunol 133, 3001, (1984) y

Brodeur, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker Inc, 1987). Procedimientos alternativos incluyen el uso de bibliotecas de fagos o ratones transgénicos, utilizando ambos los repertorios de regiones variables humanas (véase Winter G, (1994), Annu. Rev. Immunol 12,433-455, Green LL (1999), J. Immunol. methods 231, 11-23).

- 5 En la actualidad se dispone de varias cepas de ratones transgénicos en las que su loci de inmunoglobulina de ratón se ha sustituido con segmentos de genes de inmunoglobulina humana (véase Tomizuka K, (2000) PNAS 97.722:727; Fishwild D.M (1996) Nature Biotechnol. 14,845-851, Mendez MJ, 1997, NatureGenetics, 15,146-156). Después de la exposición al antígeno, dichos ratones son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos a partir de los cuales se pueden seleccionar los anticuerpos de interés.
- 10 De interés particular es el sistema TrimerTM (véase Eren R y col., (1998) Immunology 93:154-161) en el que se transplanta linfocitos humanos en ratones irradiados, el sistema de anticuerpos de linfocitos seleccionados (SLAM, véase Babcook et al, PNAS (1996) 93:7843-7848) en el que linfocitos humanos (o de otra especie) se pasan a través de un procedimiento de generación in vitro de anticuerpos agrupados masivos seguido de dilución límite y procedimiento de selección, y el Xenomouse IITM (Abgenix Inc). Se dispone de un enfoque alternativo en Morphotek Inc usando la tecnología MorphodomaTM.

15 Se puede usar tecnología de presentación en fagos para producir anticuerpos humanos (y fragmentos de los mismos), véase McCafferty; Nature, 348, 552-553 (1990) y Griffiths AD y col. (1994) EMBO 13:3245-3260. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan dentro del marco en un gen de proteína de la cubierta mayoritaria o minoritaria de un bacteriófago, tal como M13 o fd, y se expresa (normalmente con la ayuda de un fago colaborador) como fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula de fago. Las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo tienen como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe dichas propiedades. La técnica de presentación en fago se puede usar para seleccionar anticuerpos específicos de antígeno de bibliotecas formadas por linfocitos B humanos de individuos afectados por una enfermedad o trastorno descrito anteriormente o, como alternativa, de donantes humanos no inmunizados (Véase Marks; J.Mol.Bio. 222,581-597, 1991). Cuando se desea un anticuerpo humano intacto que comprenda un dominio Fc, es necesario volver a clonar el fragmento derivado presentado en el fago en vectores de expresión de mamífero que comprenden las regiones constantes deseadas y establecer líneas celulares de expresión estable.

20 La técnica de maduración por afinidad (Marks; Bio/technol 10,779-783 (1992)) se puede usar para mejorar la afinidad de unión, en la que la afinidad del anticuerpo humano primario mejora sustituyendo secuencialmente las regiones variables de las cadenas H y L con variantes naturales y seleccionando sobre la base de mejores afinidades de unión. Actualmente también se dispone de variantes de esta técnica tal como "impresión del epítipo", véase, por ejemplo, el documento WO 93/06213; véase también Waterhouse; Nucl.Acids Res 21, 2265-2266 (1993).

25 Por tanto, en otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humano intacto o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de forma específica a la hOSM y modula (es decir, inhibe o bloquea) la interacción entre hOSM y gp130. En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humano intacto o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de forma específica al Sitio II de la hOSM y modula (es decir, inhibe o bloquea) la interacción entre hOSM y gp130.

30 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo terapéutico humano intacto o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una CDRH3 de la SEC ID N° 3 que se une de forma específica a la hOSM y modula (es decir, inhibe o bloquea) la interacción entre hOSM y gp130. En otra realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humano intacto o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable que tiene CDR de las SEC ID N° 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

1.2 Anticuerpos quiméricos y humanizados

35 El uso de anticuerpos no humanos intactos en el tratamiento de enfermedades o trastornos humanos conlleva los bien establecidos problemas de la posible inmunogenicidad, especialmente tras la administración repetida del anticuerpo, es decir el sistema inmunitario del paciente puede reconocer el anticuerpo intacto no humano como propio y formar una respuesta neutralizante. Además de desarrollar anticuerpos completamente humanos (véase anteriormente), durante los años se han desarrollado varias técnicas para superar estos problemas y, en general, implican reducir la composición de secuencias de aminoácidos no humanos en el anticuerpo terapéutico intacto al tiempo que conservan la facilidad relativa en la obtención de anticuerpos no humanos de un animal inmunizado, por ejemplo ratón, rata o conejo. En general, para conseguirlo se han usado dos abordajes. El primero son anticuerpos quiméricos que, en general, comprenden un dominio variable no humano (p. ej., de roedor, tal como de ratón) condensado a una región constante humana. Dado que el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo se localiza dentro de las regiones variables, el anticuerpo quimérico conserva su afinidad de unión por el antígeno pero adquiere las funciones efectoras de la región constante humana y, por tanto, son capaces de realizar funciones efectoras

como las descritas anteriormente. Los anticuerpos quiméricos normalmente se producen mediante técnicas de ADN recombinante. El ADN que codifica los anticuerpos (p. ej., ADNc) se aísla y secuencía usando procedimientos convencionales (p. ej., usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas H y L del anticuerpo de la invención, por ejemplo ADN que codifica las SEC ID N° 1, 2, 3, 4, 5 y 6 descritas anteriormente). Las células de hibridoma sirven como fuente típica de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se introduce en los vectores de expresión que después de transfeccionan a células huésped tales como *E. coli*, células COS, células CHO o células de mieloma, que, de otro modo, no producen proteína inmunoglobulina para obtener la síntesis del anticuerpo. El ADN puede modificarse sustituyendo la secuencia codificadora de las cadenas L y H humanas para las correspondientes regiones constantes de H y L no humanas (p. ej., murinas), véase, por ejemplo, Morrison PNAS 81, 6851 (1984).

El segundo abordaje implica la generación de anticuerpos humanizados en los que el contenido no humano del anticuerpo se reduce humanizando las regiones variables. Dos técnicas de humanización se han convertido en muy populares. La primera es la humanización mediante injerto de CDR. Los CDR construyen bucles cerca del extremo N del anticuerpo, donde forman una superficie montada sobre un armazón proporcionado por las regiones estructurales. La especificidad de unión a antígeno del anticuerpo viene definida, principalmente, por la topografía y por las características químicas de su superficie CDR. Estas características se determinan, a su vez, por la conformación de las CDR individuales, por la disposición relativa de las CDR y por la naturaleza y la disposición de las cadenas laterales de los residuos que comprenden las CDR. Se puede conseguir una gran disminución de la inmunogenicidad injertando sólo las CDR de un anticuerpo no humano (p. ej., murino) (anticuerpos "donantes") sobre una estructura humana adecuada ("estructura aceptora") y las regiones constantes (véase Jones y col. (1986) Nature 321,522-525 and Verhoeven M y col. (1988) Science 239, 1534-1536). No obstante, el injerto de CDR *per se* puede no dar como resultado la retención completa de las propiedades de unión al antígeno y con frecuencia se encuentra que algunos residuos estructurales (en ocasiones denominadas "mutaciones inversas") del anticuerpo donante tienen que conservarse en la molécula humanizada si se tiene que recuperar una afinidad de unión al antígeno significativa (véase Queen y col. (1989) PNAS 86, 10,029-10,033, Co, M et al (1991) Nature 351, 501-502). En este caso, las regiones variables humanas que muestran la mayor homología de secuencia (normalmente 60 % o más) con el anticuerpo donante no humano pueden escogerse a partir de una base de datos con el fin de proporcionar el marco conservado (FR) humano. La selección de FR humanos se puede realizar por consenso humano o anticuerpos humanos individuales. Cuando es necesario, los residuos clave del anticuerpo donante se sustituyen en la estructura aceptora humana para conservar las conformaciones de las CDR. Se puede usar modelación informática del anticuerpo para ayudar a identificar dichos residuos estructuralmente importantes, véase el documento WO 99/48523.

Como alternativa, la humanización se puede conseguir mediante un procedimiento de "chapeado". Un análisis estadístico de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina humana y murina única reveló que los patrones precisos de los residuos expuestos son diferentes en los anticuerpos humanos y murinos, y la mayoría de las posiciones de superficie individuales tienen una fuerte preferencia por un número pequeño de residuos diferentes (véase Padlan E.A. y col.; (1991) Mol.Immunol.28, 489-498 y Pedersen J.T. y col. (1994) J. Mol. Biol. 235; 959-973). Por tanto, es posible reducir la inmunogenicidad de una Fv no humana reemplazando los residuos expuestos en sus regiones estructurales que difieren de las que normalmente se encuentran en los anticuerpos humanos. Dado que la antigenicidad proteica se puede correlacionar con la accesibilidad en la superficie, la sustitución de los residuos de superficie puede ser suficiente como para hacer de la región variable de ratón "invisible" para el sistema inmunitario humano (véase también Mark G.E. y col. (1994) en Handbook of Experimental Pharmacology vol.113: The pharmacology of monoclonal Antibodies, Springer-Verlag, pp105-134). Este procedimiento de humanización se denomina "barnizado" porque sólo se altera la superficie del anticuerpo, los residuos de soporte permanecen inalterados. Otro abordaje alternativo se establece en el documento WO04/006955.

Así, en otra forma de realización de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico quimérico que comprende un dominio variable no humano (p. ej., de roedor) condensado con una región constante humana (que puede ser de un isotipo IgG, por ejemplo IgG1), que se une específicamente a la hOSM y que modula la interacción entre el Sitio III de la hOSM y gp130.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico quimérico que comprende una región variable no humana (p. ej., de roedor) y una región constante humana (que puede ser de un isotipo IgG, por ejemplo IgG1), que se une específicamente a la hOSM, de modo que el anticuerpo comprende además una CDRH3 de la SEC ID N° 3. Dichos anticuerpos pueden además comprender una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo IgG1.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico quimérico que comprende una región variable no humana (p. ej., de roedor) y una región constante humana (que puede ser de un isotipo IgG, por ejemplo IgG1), que se une específicamente a la hOSM que tiene las CDR de la SEC ID N° 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de forma específica al Sitio II de la hOSM y modula (es decir, inhibe o bloquea) la interacción entre hOSM y gp130.

5 En otra forma de realización, se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a hOSM y comprende una CDRH3 de la SEC ID N° 3. Dichos anticuerpos pueden comprender una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo IgG1.

En otra forma de realización, se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a hOSM y comprende una CDR de la SEC ID N° 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Dichos anticuerpos pueden comprender una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo IgG1.

10 En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de forma específica al Sitio II de la hOSM y modula la interacción entre hOSM y gp130 y comprende (o consiste esencialmente en) la cadena pesada de la SEC ID N° 11 y una cadena ligera de la SEC ID N° 12.

15 También se describe un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de forma específica a la hOSM y modula la interacción entre hOSM y gp130, y comprende (o consiste esencialmente en) una cadena pesada de la SEC ID N° 50 y una cadena ligera de la SEC ID N° 51.

20 En otra forma de realización se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de forma específica a hOSM y modula la interacción entre hOSM y gp130 y en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende CDRH3 de la SEC ID N° 3, comprendiendo opcionalmente además CDR de las SEC ID N° 1, 2, 4, 5 y 6, en el que los residuos en las posiciones 28, 29, 30, 71 y 94 de la región estructural de la cadena pesada aceptora humana y las posiciones 49 y 71 de la estructura de la cadena ligera aceptora humana están sustituidos por los correspondientes residuos encontrados en la estructura del anticuerpo donante de la que deriva la CDRH3.

25 También se describe un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de forma específica a hOSM y modula la interacción entre hOSM y gp130 y en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende CDRH3 de la SEC ID N° 42, comprendiendo opcionalmente además CDR de las SEC ID N° 40, 41, 43, 44, 45, en el que los residuos en las posiciones 28 44 48, 67, 69, 71, 73 de la región estructural de la cadena pesada aceptora humana y las posiciones 36, 38, 46, 47, 71 de la estructura de la cadena ligera aceptora humana están sustituidos por los correspondientes residuos encontrados en la estructura del anticuerpo donante de la que deriva la CDRH3.

30 Será evidente para los expertos en la técnica que con el término “derivado” se pretende no sólo definir la fuente en sentido de ser de origen físico para el material, sino también definir el material que estructuralmente es idéntico al material pero que no se origina a partir de la fuente de referencia. Por tanto, los “residuos hallados en el anticuerpo donante del que deriva la CDRH3” no necesariamente se han purificado del anticuerpo donante.

35 En otra realización, se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a hOSM, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento del mismos CDRH3 de la SEC ID N° 3, comprendiendo opcionalmente además CDR de las SEC ID N° 1, 2, 4, 5 y 6, en el que el marco conservado de la cadena pesada humana comprende uno o más (p. ej., todos) de los residuos siguientes (o un sustituto conservador de los mismos):

Posición	Residuo
28	S
29	I
30	T
71	K
94	K

40

y la cadena ligera humana comprende uno o los dos residuos siguientes (o un sustituto conservador de los mismos);

Posición	Residuo
----------	---------

49	E
71	Y

- 5 En otra realización, se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a hOSM, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento del mismo CDR de la SEC ID N° 1, 2, 3, 4, 5 y 6, en el que el marco conservado de la cadena pesada humana comprende uno o más (p. ej., todos) de los residuos siguientes (o un sustituto conservador de los mismos):

Posición	Residuo
28	S
29	I
30	T
71	K
94	K

y la cadena ligera humana comprende uno o los dos residuos siguientes (o un sustituto conservador de los mismos);

Posición	Residuo
49	E
71	Y

- 10 También se describe un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a hOSM, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento de mismo CDRH3 de la SEC ID N° 42, opcionalmente comprendiendo además CDR de las SEC ID N° 40, 41, 43, 44, 45, en el que el marco conservado de la cadena pesada humana comprende uno o más (p. ej., todos) de los residuos siguientes (o un sustituto conservador de los mismos):

Posición	Residuo
28	I
48	I
44	K
67	A
69	I
71	V
73	K

- 15 y la cadena ligera humana comprende uno o más (p. ej., todos) de los residuos siguientes (o un sustituto conservador de los mismos);

Posición	Residuo
36	F
38	K
46	R
47	W
71	Y

También se describe un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a hOSM, comprendiendo dicho anticuerpo o fragmento del mismo CDR de la SEC ID N° 40, 41, 42, 43, 44, 45, en el que el marco conservado de la cadena pesada humana comprende uno o más (p. ej., todos) de los residuos siguientes (o un sustituto conservador de los mismos):

Posición	Residuo
28	I
48	I
44	K
67	A
69	I
71	V
73	K

- 5 y la cadena ligera humana comprende uno o más (p. ej., todos) de los residuos siguientes (o un sustituto conservador de los mismos);

Posición	Residuo
36	F
38	K
46	R
47	W
71	Y

10 Está bien reconocido en la técnica que ciertas sustituciones de aminoácidos se consideran "conservadoras". Los aminoácidos se dividen en grupos en función de las propiedades comunes de las cadenas laterales y las sustituciones dentro de los grupos que mantienen toda, o sustancialmente toda, la afinidad de unión del anticuerpo de la invención o fragmento de unión al antígeno del mismo se consideran sustituciones conservadoras, véase la tabla siguiente:

Cadena lateral	Miembros
Hidrófoba	met, ala, val, leu, ile
Hidrófila neutra	cys, ser, thr
Ácida	asp, glu
Básica	asn, gln, his, lys, arg

Residuos que influyen en la orientación de las cadenas	gly, pro
Aromática	trp, tyr, phe

1.3 Anticuerpos biespecíficos

Un anticuerpo biespecífico es un anticuerpo que tiene especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. En la técnica se conocen procedimientos para fabricar dichos anticuerpos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena H-cadena L de inmunoglobulina, en las que las dos cadenas H tienen diferentes especificidades de unión, véase Millstein y col., Nature 305 537-539 (1983), el documento WO93/08829 y Traunecker y col. EMBO, 10, 1991, 3655-3659. Un enfoque alternativo implica la condensación de los dominios variables con las deseadas especificidades de unión con la región constante de la cadena pesada que comprende, al menos, parte de la región bisagra, regiones CH2 y CH3. Se prefiere tener la región CH1 que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera presente en al menos una de las condensaciones. El ADN que codifica estas condensaciones y, si se desea, la cadena L, se insertan en vectores de expresión distintos y, después, se co-transfeccionan en un organismo huésped adecuado. No obstante, es posible insertar las secuencias de codificación para dos o las tres cadenas en un vector de expresión. En un enfoque preferido, el anticuerpo biespecífico está compuesto por una cadena H con una primera especificidad de unión en un grupo y un par de cadenas H-L, que proporcionan una segunda especificidad de unión en el otro grupo, véase el documento WO94/04690. Véase también Suresh y col. Methods in Enzymology 121, 210, 1986.

En una forma de realización de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico biespecífico en el que al menos una especificidad de unión de dicho anticuerpo es por hOSM y en el que dicho anticuerpo modula (es decir, inhibe o bloquea) la interacción entre el sitio II de hOSM y gp130. Dichos anticuerpos pueden comprender además una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo IgG1.

En una forma de realización de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico biespecífico en el que al menos una especificidad de unión de dicho anticuerpo es por hOSM y en el que dicho anticuerpo comprende al menos una CDRH3 de la SEC ID N° 3. Dichos anticuerpos pueden comprender además una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo IgG1.

En una forma de realización de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico biespecífico en el que al menos una especificidad de unión de dicho anticuerpo es por hOSM y en el que dicho anticuerpo comprende al menos CDRH3 de las SEC ID N° 1, 2, 3, 4, 5 y 5. Dichos anticuerpos pueden comprender además una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo IgG1.

1.4 Fragmentos de anticuerpos

En ciertas realizaciones de la invención se proporcionan fragmentos de anticuerpo terapéutico que modulan la interacción entre OSM (particularmente hOSM) y gp130. Dichos fragmentos pueden ser fragmentos funcionales de unión a antígeno de anticuerpos intactos y/o humanizados y/o quiméricos, tales como fragmentos Fab, Fd, Fab', F(ab')₂, Fv, ScFv de los anticuerpos descritos con anterioridad. Tradicionalmente, dichos fragmentos se producen mediante la digestión proteolítica de los anticuerpos intactos mediante, por ejemplo, digestión con papaína (véase, por ejemplo, el documento WO 94/29348) pero pueden producirse directamente a partir de células huésped transformadas de forma recombinante. Para la producción de ScFv, véase Bird y col.; (1988) Science, 242, 423-426. Además, se pueden producir fragmentos de anticuerpo usando una diversidad de técnicas de ingeniería tal como se describe más adelante.

Los fragmentos Fv parecen tener una menor energía de interacción de sus dos cadenas que los fragmentos Fab. Para estabilizar la asociación de los dominios V_H y V_L se han unido con péptidos (Bird y col., (1988) Science 242, 423-426, Huston et al, PNAS, 85, 5879-5883), puentes disulfuro (Glockshuber y col., (1990) Biochemistry, 29, 1362-1367) y mutaciones "de botón en ojal" (Zhu y col. (1997), Protein Sci., 6, 781-788). Los fragmentos ScFv se pueden producir mediante procedimientos bien conocidos para los expertos en la técnica, véase Whitlow et al (1991) Methods companion Methods Enzymol, 2, 97-105 y Huston y col. (1993) Int. Rev. Immunol 10, 195-217. Los ScFv se pueden producir en células bacterianas, tales como *E. Coli*, pero normalmente se producen en células eucarióticas. Una desventaja de ScFv es la monovalencia del producto, que excluye un incremento de la avidéz debido a la unión polivalente y su corta semivida. Los intentos de superar estos problemas incluyen (ScFv)₂ bivalentes producidos a partir de ScFv que contiene una cisteína adicional en el extremo C mediante acoplamiento químico (Adams y col.

(1993) Can. Res 53, 4026-4034 and McCartney et al (1995) Protein Eng. 8, 301-314) o mediante dimerización espontánea específica de sitio de ScFv que contiene un residuo de cisteína no apareado en el extremo C (véase Kipriyanov y col. (1995) Cell. Biophys 26, 187-204). Como alternativa, los ScFv se pueden forzar para que formen multímeros mediante acortamiento del ligador peptídico a de 3 a 12 residuos para formar "diacuerpos", véase Holliger y col. PNAS (1993), 90, 6444-6448. La reducción del ligador todavía más puede tener como resultado cortes en ScFv ("triacuerpos", véase Kortt y col. (1997) Protein Eng, 10, 423-433) y tetrámeros ("tetracuerpos", véase Le Gall y col. (1999) FEBS Lett, 453, 164-168). La construcción de moléculas de ScFv bivalentes también se puede conseguir mediante fusión genética con motivos de dimerización proteica para formar "mininaticuerpos" (véase Pack y col. (1992) Biochemistry 31, 1579-1584) y "minicuerpos" (véase Hu y col. (1996), Cancer Res. 56, 3055-3061).

También se pueden producir tándem de ScFv-Sc-Fv ((ScFv)₂) uniendo dos unidades de ScFv mediante un tercer ligador peptídico, véase Kurucz y col. (1995) J. Immunol. 154: 4576-4582. Los diacuerpos biespecíficos se pueden producir mediante la asociación no covalente de dos productos de fusión de cadena sencilla que consiste en el dominio V_H de un anticuerpo conectado por un ligador corto al dominio V_L de otro anticuerpo, véase Kipriyanov y col. (1998) Int. J. Can 77: 763-772. La estabilidad de dichos diacuerpos biespecíficos se puede potenciar mediante la introducción de puentes disulfuro o mutaciones de "botón en ojal" como se ha descrito con anterioridad o mediante la formación de diacuerpos de cadena sencilla (ScDb) en los que dos fragmentos ScFv híbridos están conectados a través de un ligador peptídico, véase Kontermann y col. (1999) J. Immunol. Methods 226:179-188. Las moléculas biespecíficas tetravalentes están disponibles mediante, por ejemplo, fusión de un fragmento scFv al dominio CH3 de una molécula IgG o a un fragmento Fab a través de la región bisagra, véase Coloma y col. (1997) Nature Biotechnol. 15, 159-163. Como alternativa, las moléculas biespecíficas tetravalentes se han creado mediante la fusión de diacuerpos biespecíficos de cadena sencilla (véase Alt, y col. (1999) FEBS Lett 454:90-94. También se pueden formar moléculas biespecíficas tetravalentes más pequeñas mediante la dimerización de los tándem ScFv-ScFv con un ligador que contiene un motivo hélice-bucle-hélice (minianticuerpos DiBi, véase Muller y col. (1998) FEBS Lett 432: 45-49) o una molécula de cadena sencilla que comprende cuatro dominios variables de anticuerpo (V_H y V_L) en una orientación que impide el apareamiento intramolecular (diacuerpo en tándem, véase Kipriyanov y col. (1999) J. Mol. Biol. 293: 41-56). Los fragmentos biespecíficos F(ab')₂ se pueden crear mediante acoplamiento químico de los fragmentos Fab' o mediante heterodimerización mediante cremalleras de leucina (véase Shalaby y col., (1992) J.Exp.Med. 175, 217-225 y Kostelny y col. (1992), J.Immunol. 148, 1547-1553). También se dispone de dominios V_H y V_L aislados (Domantis plc), véanse los documentos US 6.248.516; US 6.291.158 y US 6.172.197,

En una forma de realización se proporciona un fragmento de anticuerpo terapéutico (p. ej., . ScFv, Fab, Fd, Fab', F(ab')₂) o un fragmento de anticuerpo modificado tal como se ha descrito anteriormente que se une de forma específica al Sitio II de la hOSM y modula (es decir, inhibe o bloquea) la interacción entre hOSM y gp130. El fragmento de anticuerpo terapéutico puede comprender una CDRH3 que tiene la secuencia de la SEC ID N° 3, opcionalmente junto con CDR que tienen la secuencia indicada en las SEC ID N° 1, 2, 4, 5 y 6. También se describe un fragmento de anticuerpo terapéutico que comprende una CDRH3 de la SEC ID N° 42, opcionalmente junto con CDR que tienen la secuencia que se indica en la SEC ID N° 40, 41, 43, 44 y 45.

1.5 Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados también forman una realización de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos unidos de forma covalente formados usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Véase el documento US 4.676.980.

1.6 Otras modificaciones.

Se cree que la interacción entre la región Fc de un anticuerpo y diversos receptores de Fc (FcγR) media en las funciones efectoras del anticuerpo, que incluyen citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA), fijación del complemento, fagocitosis y semivida/aclaramiento del anticuerpo. Se pueden llevar a cabo varias modificaciones de la región Fc de los anticuerpos de la invención dependiendo de la propiedad efectora. Por ejemplo, las mutaciones específicas en la región Fc para dar un anticuerpo de otro modo lítico, no lítico se detalla en los documentos EP 0629240B1 y EP 0307434B2 o se puede incorporar un epítipo de unión al receptor de rescate en el anticuerpo para incrementar la semivida en suero, véase el documento US 5.739.277. En la actualidad hay cinco receptores Fcγ reconocidos, FcγR (I), FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcRn neonatal. Shields y col., (2001) J.Biol. Chem 276, 6591-6604 demostraron que un conjunto habitual de residuos de IgG1 está implicado en la unión de todos los FcγRs, mientras que FcγRII y FcγRIII utilizan distintos sitios fuera de este conjunto habitual. Un grupo de residuos de IgG1 redujo la unión a todos los FcγRs cuando se han alterado a alanina: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 y Pro-239. Todos están en el dominio CH2 de IgG y agrupados cerca de la bisagra uniendo CH1 y CH2. Aunque FcγRI utiliza sólo el conjunto habitual de residuos de IgG1 para la unión, FcγRII y FcγRIII interaccionan con distintos residuos además del conjunto habitual. La alteración de algunos residuos redujo la unión solo a FcγRII (p. ej., Arg-292) o FcγRIII (p. ej., Glu-293). Algunas variantes mostraron mejor unión a FcγRII o FcγRIII, pero no afectó a la unión al otro receptor (p. ej., mejor unión de Ser-267Ala a FcγRII, pero la unión a FcγRIII no se vio afectada). Otras variantes mostraron mejor unión a FcγRII o FcγRIII con reducción de la unión al otro receptor (p. ej., mejor unión de Ser-267Ala a FcγRII y

reducción de la unión a FcγRIII). Para FcγRIIIa, las mejores variantes de IgG1 de unión tenían sustituciones combinadas de alanina en Ser-298, Glu-333 and Lys-334. El receptor FcRn neonatal se cree que está implicado en el aclaramiento de anticuerpos y la transcitosis a través de los tejidos (véase Junghans (1997) Immunol. Res 16: 29-57 and Ghetie et al (2000) Annu. Rev. Immunol. 18, 739-766). Los residuos de IgG1 humana que se ha determinado que interaccionan directamente con los FcRn humanos incluyen Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 y His435. Por tanto, la presente invención se refiere a anticuerpos de la invención que tienen uno cualquiera (o más) de los cambios de residuos detallados con anterioridad para modificar la semivida/aclaramiento y/o las funciones efectoras, tales como ADCC y/o lisis complementaria. En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que se une específicamente a hOSM y modula la interacción entre hOSM y gp130 que tiene sustituciones de alanina (u otras de rotura) en las posiciones 235 (p. ej., L235A) y 237 (p. ej., G237A). En una realización adicional de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que se une específicamente a hOSM y que comprende una cadena pesada de la SEC ID N° 61 y una cadena ligera de la SEC ID 12.

Otras modificaciones incluyen variantes de glicosilación de los anticuerpos de la invención. La glicosilación de los anticuerpos en posiciones conservadas en sus regiones constantes se sabe que tiene un efecto profundo sobre la función del anticuerpo, particularmente la función efectora tal como se ha descrito con anterioridad, véase, por ejemplo, Boyd y col. (1996), Mol.Immunol. 32, 1311-1318. Se contemplan las variantes de glicosilación de los anticuerpos terapéuticos o los fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la presente invención, en los que se añade, sustituye, deleta o modifica uno o más restos carbohidratos. La introducción de un motivo de asparagina-X-serina o asparagina-X-treonina crea un posible sitio de unión enzimática de los restos carbohidratos y, por tanto, pueden usarse para manipular la glicosilación de un anticuerpo. En Raju y col. (2001) Biochemistry 40, 8868-8876 la sialilación terminal de una inmunoadhesina TNFR-IgG se incrementó mediante un procedimiento de regalactosilación y/o resialilación usando beta-1, 4-galactosiltransferasa y/o alfa-2,3 sialiltransferasa. Se cree que el incremento de la sialilación terminal para incrementar la semivida de la inmunoglobulina. Los anticuerpos, en común con la mayoría de las glicoproteínas, normalmente se producen en la naturaleza como una mezcla de glicoformas. Esta mezcla es particularmente evidente cuando los anticuerpos se producen en células eucariotas, particularmente de mamífero. Se han desarrollado diversos procedimientos para fabricar glicoformas definidas, véase Zhang y col. Science (2004), 303: 371; Sears y col. Science (2001) 291: 2344; Wacker y col. Science (2002) 298:1790; Davis y col. Chem. Rev. 102: 579; Hang y col. (2001) Acc. Chem. Res 34: 727. Por tanto, la invención se refiere a una pluralidad de anticuerpos terapéuticos (normalmente monoclonales) (que pueden ser del isotipo IgG, p. ej. IgG1) como se describe en el presente documento, que comprende un número definido (p. ej., 7 o menos, por ejemplo 5 o menos, tal como dos o uno) de glicoforma(s) de dichos anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

Otras formas de realización de la invención incluyen anticuerpos terapéuticos de la invención o fragmentos de unión a antígeno de los mismos acoplados a un polímero no proteináceo, tal como polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxiálquileo. La conjugación de proteínas a PEG es una técnica establecida para incrementar la semivida de las proteínas, así como reducir la antigenicidad e inmunogenicidad de las proteínas. El uso de PEGilación con diferentes pesos moleculares y estilos (lineal o ramificado) se ha investigado con anticuerpos intactos, así como fragmentos Fab', véase Koumenis I.L. y col. (2000) Int. J. Pharmaceut. 198:83-95.

La liberación de proteínas terapéuticas en el cerebro es difícil por la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE). Cuando se desea liberar un anticuerpo de la invención o fragmento de anticuerpo de la invención a través de la BHE se han propuesto varias estrategias para potenciar dicha liberación cuando sea necesario.

Con el fin de obtener nutrientes y factores requeridos de la sangre, la BHE posee algunos receptores específicos que transportan los compuestos desde la sangre en circulación al cerebro. Los estudios han indicado que algunos compuestos, como la insulina (véase Duffy KR y col. (1989) Brain Res. 420:32-38), transferrina (véase Fishman JB y col. (1987) J. Neurosci 18:299-304) y los factores de crecimiento similares a la insulina 1 y 2 (véase Pardridge WM (1986) Endocrine Rev.7:314-330 y Duffy KR y col. (1986) Metabolism 37:136-140) atraviesan la BHE mediante transcitosis mediada por receptor. Por tanto, los receptores de estas moléculas proporcionan un potencial medio para que los anticuerpos de la invención y/o fragmentos de anticuerpo de la invención accedan al cerebro usando los denominados anticuerpos "en vectores" (véase Pardridge WM (1999) Advanced Drug Delivery Review 36:299-321). Por ejemplo, se ha demostrado que un anticuerpo frente al receptor de la transferrina se transporta dinámicamente al parénquima cerebral (Véase PM y col. (1991) PNAS 88:4771-4775 y Friden PM y col. (1993) Science 259:373-377). Por tanto, un posible abordaje es producir un anticuerpo biespecífico o fragmento biespecífico, tal como se ha descrito anteriormente, en el que una primera especificidad es hacia el sitio II de la hOSM (p. ej., la primera especificidad comprende CDRH3 de la SEC ID N° 3, opcionalmente junto con CDR de las SEC ID N° 1,2,4,5 y 6) y una segunda especificidad hacia un receptor de transporte localizado en la BHE, por ejemplo una segunda especificidad hacia el receptor de transporte de la transferrina.

2. Inmunoglobulinas competitivas

La presente invención también proporciona inmunoglobulinas, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos y otras entidades proteicas, tales como inmunoadhesinas que se unen específicamente a hOSM e inhiben de forma competitiva la unión entre hOSM y el anticuerpo terapéutico de la invención o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una cadena pesada de SEC ID N° 11 y una cadena ligera de la SEC ID N° 12.

5 La inmunoglobulina competitiva, el anticuerpo y fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos y otra entidad proteica, tal como inmunoadhesina, desempeña, a concentraciones equimolares, una inhibición de al menos 25 %, normalmente 35 % o mayor, más normalmente una inhibición de al menos 50 %.

10 Por tanto, también se describe un procedimiento de detección selectiva de un anticuerpo candidato o fragmento de anticuerpo para determinar si el anticuerpo candidato o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo competitivo como se ha descrito en el presente documento, en el que el procedimiento comprende las etapas de:

(a) incubar el anticuerpo candidato o fragmento de anticuerpo con un anticuerpo terapéutico que comprende una cadena pesada de SEC ID N° 11 y una cadena ligera de SEC ID N° 12 o un fragmento de unión a antígeno del mismo;

15 (b) determinar si el anticuerpo candidato o fragmento de anticuerpo del mismo de la etapa (a) inhibe de forma competitiva la unión entre el anticuerpo terapéutico o un fragmento de unión a antígeno del mismo y la OSM y, en particular, hOSM. Normalmente se emplea un ensayo basado en ELISA tal como el EILSA se indica en los ejemplos. Normalmente, la OSM y/o hOSM están glicosiladas. Normalmente, la OSM y/o hOSM se ha glicosilado mediante una célula de mamífero, tal como una CHO, célula NSO o célula humana transformadas de forma recombinante. En otras realizaciones, la OSM y la hOSM se han glicosilado en una célula nativa de la que derivan, es decir la hOSM se ha glicosilado en una célula humana (por ejemplo, la hOSM se puede aislar del cuerpo humano).

25 Así, también se proporciona un anticuerpo terapéutico competitivo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe de forma competitiva la unión de un anticuerpo terapéutico competitivo o fragmento de unión a antígeno, en el que el anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende CDR que tiene las secuencias indicadas en las SEC ID N° 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

También se proporciona un anticuerpo terapéutico competitivo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que inhibe de forma competitiva la unión de un anticuerpo terapéutico competitivo o fragmento de unión a antígeno, en el que el anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de la SEC ID N° 11 y una cadena ligera de la SEC ID N° 12.

30 Un anticuerpo terapéutico de competición o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser cualquiera de las anteriores estructuras de anticuerpo. Por ejemplo, el anticuerpo terapéutico de competición puede ser un anticuerpo intacto de primate o de humano o un anticuerpo humanizado normalmente de un isotipo IgG, por ejemplo IgG1 o IgG4. Los fragmentos de anticuerpo terapéutico competitivo pueden ser Fab, Fab', Fd, F(ab')₂ScFv y similares. Un anticuerpo terapéutico competitivo puede producirse de acuerdo con los procedimientos divulgados en la presente memoria descriptiva.

Un protocolo típico para el procedimiento de detección selectiva descrito con anterioridad se establece en uno de los ejemplos siguientes.

10D3 es un ejemplo de un anticuerpo competitivo de la invención. Véase la Tabla A, más adelante.

2.1 Otros procedimientos de detección selectiva

40 En el presente documento también se describe el hallazgo de que la glicosilación de hOSM desempeña un papel inesperado en el acontecimiento de unión entre un anticuerpo anti-hOSM y hOSM. Se describe un procedimiento de detección selectiva de un anticuerpo que se une específicamente a hOSM, procedimiento que comprende incubar dicho anticuerpo con OSM glicosilada, particularmente hOSM, en condiciones que permite unir y medir la afinidad de unión del anticuerpo. El protocolo ELISA que se detalla más adelante permite dicho procedimiento. Los anticuerpos (que pueden ser cualquiera de las estructuras detalladas anteriormente) se pueden seleccionar en base a una afinidad de unión (Kd) superior a 1 uM, normalmente superior a 100 nM, más normalmente superior a 1nM, por ejemplo 100 pM o mayor. Los anticuerpos se pueden seleccionar además en base a su capacidad para unirse a OSM no glicosilada, por ejemplo hOSM. Por tanto, normalmente los anticuerpos se seleccionan en base a que son capaces de unirse a OSM glicosilada, por ejemplo hOSM, y además también son capaces de unirse a OSM no glicosilada, por ejemplo hOSM, en el mismo grado o un grado similar (p. ej., tienen la misma o similar afinidad de unión medida en un ensayo Biacore™).

Los anticuerpos seleccionados de acuerdo con el presente procedimiento pueden además modificarse (p. ej., humanizarse en caso necesario mediante, por ejemplo, manipulación de polinucleótidos que codifican el anticuerpo) e incorporarse en la composición farmacéutica. Los anticuerpos seleccionados mediante el presente procedimiento y

los polinucleótidos que codifican dichos anticuerpos forman una realización de la presente invención. Por tanto, también se proporciona un procedimiento de detección selectiva de un anticuerpo que se une de forma putativa a OSM, particularmente a hOSM (p. ej., un anticuerpo que se ha producido frente a OSM/hOSM), en el que el procedimiento comprende:

- 5 (a) incubar dicho anticuerpo con OSM glicosilada, particularmente hOSM glicosilada, en condiciones que permiten la unión;
- (b) medir la afinidad de unión de dicho anticuerpo;
- (c) seleccionar dicho anticuerpo si dicho anticuerpo tiene una afinidad de unión superior a 1 μ M, normalmente superior a 100 nM;
- 10 (d) proporcionar un polinucleótido que codifica dicho anticuerpo de la etapa (c) y transformar o transfeccionar una célula huésped de mamífero con un vector que comprende dicho polinucleótido;
- (e) cultivar dicha célula huésped de la etapa (d) en condiciones que permiten la secreción de dicho anticuerpo en el medio de cultivo;
- (f) purificar opcionalmente el medio de cultivo de la etapa (e);
- 15 (g) incorporar el anticuerpo de la etapa (e) o (f) en una composición farmacéutica.

También se proporciona el uso de un anticuerpo identificado mediante este procedimiento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o trastornos detallados a continuación.

- 20 También se proporciona el uso de un anticuerpo (p. ej., intacto, humano, humanizado, quimérico), que se une específicamente a la hOSM glicosilada nativa (en particular se une al epítipo del Sitio II de la hOSM glicosilada nativa) y modula la interacción entre dicha hOSM glicosilada nativa y gp130 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno detallado más adelante. Además se proporcionan anticuerpos que se unen específicamente a la hOSM glicosilada nativa con la misma o similar afinidad de unión que la hOSM no glicosilada en las mismas condiciones experimentales. Una realización de la invención la constituyen los anticuerpos que se unen específicamente a la OSM glicosilada, particularmente aquéllos que se unen a la hOSM glicosilada nativa. El anticuerpo 15E10 es un ejemplo de un anticuerpo que se une específicamente a la hOSM glicosilada.
- 25

- 30 En algunas realizaciones, el procedimiento usa la hOSM glicosilada por una célula huésped de mamífero, tal como CHO o NS0. En otras realizaciones, el procedimiento usa la hOSM glicosilada por una célula humana, por ejemplo una célula huésped humana transformada o transfectada de forma recombinante, o la hOSM nativa que se ha aislado del cuerpo humano (por ejemplo hOSM fabricada por las células que se encuentran en el líquido sinovial de un paciente humano artrítico (p. ej., con AR).

3. Procedimientos de producción

- 35 Los anticuerpos de la invención se pueden producir como una población policlonal, pero más normalmente se producen como una población monoclonal (que es una población sustancialmente homogénea de anticuerpos idénticos dirigidos contra un sitio de unión antigénico específico). Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir en organismos transgénicos tales como cabras (véase Pollock y col. (1999) J. Immunol. Methods 231: 147-157), pollos (véase Morrow (2000) Genet. Eng. News 20: 1-55), ratones (véase Pollock y col.) o plantas (véase Doran (2000) Curr. Opin. Biotechnol. 11, 199-204, Ma JK-C (1998), Nat. Med. 4: 601-606, Baez J y col., BioPharm (2000) 13: 50-54, Stoger E y col.; (2000) Plant Mol. Biol. 42:583-590). Los anticuerpos también se pueden producir mediante síntesis química. No obstante, los anticuerpos de la invención normalmente se producen usando
- 40 tecnología de cultivo celular recombinante bien conocida para los expertos en la técnica. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo se aísla e inserta en un vector replicable, tal como un plásmido para la posterior clonación (amplificación) o expresión. Un sistema de expresión útil es un sistema de glutamato sintetasa (tal como la comercializada por Lonza Biologics), particularmente cuando la célula huésped es CHO o NSO (véase más adelante). El polinucleótido que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuenciar usando procedimientos
- 45 convencionales (p. ej., sondas oligonucleotídicas). Los vectores que se pueden usar incluyen plásmidos, virus, fagos, transposones, minicromosomas, de los cuales los plásmidos constituyen una realización típica. Generalmente, dichos vectores incluyen también una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y secuencias de terminación de la transcripción unidas operablemente al polinucleótido de la cadena ligera y/o pesada para facilitar la expresión. El polinucleótido que codifica las cadenas
- 50 ligera y pesada puede insertarse en vectores distintos e introducirse (mediante, por ejemplo, electroporación) en la misma célula huésped o, si se desea, la cadena ligera y la cadena pesada se pueden insertar en el mismo vector para transfección en la célula huésped. Por tanto, de acuerdo con una realización de la presente invención se proporciona un procedimiento de construir un vector que codifica las cadenas ligera y/o pesada de un anticuerpo

terapéutico o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, en el que el procedimiento comprende insertar en un vector un polinucleótido que codifica la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo terapéutico de la invención. Véase la Tabla A, más adelante.

5 En otra forma de realización de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica un dominio V_H murino que tiene la secuencia indicada en la SEC ID N° 15.

En otra forma de realización de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica un dominio V_L murino que tiene la secuencia indicada en la SEC ID N° 16.

En otra forma de realización de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica un dominio V_H humanizado que tiene la secuencia indicada como SEC ID N° 17.

10 En otra forma de realización de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica un dominio V_L humanizado que tiene la secuencia indicada como SEC ID N° 18.

En otra forma de realización de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena pesada humanizada que tiene la secuencia indicada como SEC ID N° 19.

15 En otra forma de realización de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena ligera humanizada que tiene la secuencia indicada como SEC ID N° 20.

Será inmediatamente evidente para los expertos en la técnica que, debido a la redundancia del código genético, también se dispone de polinucleótidos alternativos a los divulgados en el presente documento que codificarán los polipéptidos de la invención.

3.1 Secuencias señal

20 Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir como proteínas de fusión con una secuencia señal heteróloga que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura. La secuencia señal debe ser reconocida y procesada por la célula huésped. Para las células huésped procariotas, la secuencia señal puede ser una fosfatasa alcalina, penicilasa o líderes de la enterotoxina termoestable II. Para la secreción en levaduras, las secuencias señal pueden ser, por ejemplo, una líder de invertasa de levaduras, líder del factor α o líderes de fosfatasa ácida, véase, por ejemplo, el documento WO90/13646. En sistemas de células de mamífero, pueden ser adecuados los líderes de secreción viral tales como la señal gD del herpes simple y la secuencia señal de la inmunoglobulina nativa (tal como la cadena pesada de Ig humana). Normalmente, la secuencia señal está unida en el marco de lectura al ADN que codifica el anticuerpo de la invención.

3.2 Origen de replicación

30 Los orígenes de replicación son bien conocidos en la técnica con pBR322, adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas, plásmido 2 μ g de para la mayoría de las levaduras y varios orígenes virales tales como SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV para la mayoría de las células de mamífero. En general, el componente origen de replicación no es necesario para los vectores de expresión en mamífero pero se puede usar el SV40 ya que contiene el promotor temprano.

3.3. Marcador de selección

35 Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, o (b) complementan deficiencias auxótrofas o suministran nutrientes cruciales no disponibles en el medio complejo. El esquema de selección puede implicar detener el crecimiento de la célula huésped. Las células, transformadas con éxito con los genes que codifican el anticuerpo terapéutico de la presente invención, sobreviven debido a, por ejemplo, la resistencia al fármaco conferida por el marcador de selección. Otro ejemplo es el denominado marcador de selección DHFR en el que los transformantes se cultivan en presencia de metotrexato. Las células CHO son una línea celular particularmente útil para la selección con DHFR. Los procedimientos de amplificar y seleccionar las células huésped usando el sistema de DHFR están bien establecidos en la técnica, véase Kaufman R.J. y col. J.Mol.Biol. (1982) 159, 601-621, para una revisión véase Werner RG, Noe W, Kopp K, Schluter M, "Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals", Arzneimittel-Forschung. 48(8):870-80, 1998 Aug. Otro ejemplo es el sistema de expresión de glutamato sintetasa (Lonza Biologics). Un gen de selección adecuado para usar en levaduras es el gen trp1, véase Stinchcomb y col. Nature 282, 38, 1979.

3.4 Promotores

50 Los promotores adecuados para expresar anticuerpos de la invención están operablemente unidos al ADN/polinucleótido que codifica el anticuerpo. Promotores para huéspedes procariotas incluyen el promotor phoA,

los sistemas promotores de beta-lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, el sistema promotor de fosfatasa alcalina, triptófano y promotores híbridos tales como el promotor tac. Promotores adecuados para la expresión en células de levadura incluyen la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, por ejemplo enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa y glucoquinasa. Promotores inducibles de levaduras incluyen alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, metalotioneína y enzimas responsables del metabolismo del nitrógeno o utilización de maltosa/galactosa.

Promotores para expresión en sistemas de células de mamífero incluyen promotores virales tales como de poliovirus, virus de la gripe y adenovirus (p. ej., adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (en particular, el promotor del gen temprano inmediato), retrovirus, virus de la hepatitis B, actina, del virus del sarcoma de Rous (RSV) y el promotor temprano o tardío del virus de simio 40. Por supuesto, la elección del promotor se basa en la compatibilidad adecuada con la célula huésped usada para la expresión.

3.5 Elemento potenciador

Cuando sea adecuado, por ejemplo para la expresión en eucariotas superiores, se puede usar un elemento potenciador unido operativamente al elemento promotor en un vector. Secuencias potenciadoras en mamíferos adecuados incluyen elementos potenciadores de globina, elastasa, albúmina, fetoproteína e insulina. Como alternativa, se puede usar un elemento potenciador de un virus de células eucariotas, tal como potenciador de SV40 (en los pb 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del poliovirus, el potenciador de baculovirus o el locus de IgG2 murina (véase el documento WO04/009823). El potenciador normalmente se localiza en el vector en un sitio anterior al promotor.

3.6 Células Huésped

Entre las células huésped adecuadas para clonación o expresión en vectores que codifican anticuerpos de la invención se incluyen células procariotas, de levaduras o eucarióticas superiores. Células procariotas adecuadas incluyen eubacterias, por ejemplo, enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo *E. coli* (p. ej., ATCC 31,446; 31,537; 27,325), *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo *Salmonella typhimurium*, *Serratia* por ejemplo *Serratia marcescens* y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (véase DD 266 710), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. De las células huésped levaduras, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* (e.g. ATCC 16,045; 12,424; 24178; 56,500), *Yarrowia* (EP402, 226), *Pichia pastoris* (EP 183 070, véase también Peng y col. *Biotechnol.* 108 (2004) 185-192), *Candida*, *Trichoderma reesei* (EP244, 234), Penicilina, *Tolypocladium* y *Aspergillus*, también se contemplan huéspedes como *A. nidulans* y *A. niger*.

Aunque en la invención se contemplan específicamente células huésped procariotas y de levaduras, normalmente las células huésped de la presente invención son células de vertebrados. Células huésped de vertebrados adecuadas incluyen células de mamífero tales como COS-1 (ATCC N° CRL 1650) COS-7 (ATCC CRL 1651), la línea de células renales embrionarias humanas, células renales de hámster neonato (BHK), ATCC CRL.1632, BHK570 (ATCC N° CRL 10314), 293 (ATCC N° CRL 1573), células de ovario de hámster chino CHO (p. ej., CHO-K1, ATCC N° CCL 61, línea celular DHFR-CHO, tal como DG44 (véase Urlaub y col. (1986) *Somatic Cell Mol.Genet.* 12, 555-556)), particularmente las líneas celulares CHO adaptadas para cultivo en suspensión, células de sertoli de ratón, células de riñón de mono, células de riñón de mono verde africano (ATCC CRL-1587), células HELA, células renales caninas (ATCC CCL 34), células de pulmón humano (ATCC CCL 75), Hep G2 y células de mieloma o linfoma, por ejemplo NS0 (véase el documento US 5.807.715), Sp2/0, Y0.

Así, en una forma de realización de la invención se proporciona una célula huésped transformada de forma estable que comprende un vector que codifica una cadena pesada y/o cadena ligera del anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a antígeno del mismo tal como se describe en el presente documento. Normalmente, dichas células huésped pueden comprender un primer vector que codifica la cadena ligera y un segundo vector que codifica dicha cadena pesada.

Fermentación bacteriana

Los sistemas bacterianos son particularmente adecuados para la expresión de fragmentos de anticuerpo. Dichos fragmentos se localizan intracelularmente o dentro del periplasma. Las proteínas periplásmicas insolubles se pueden extraer u volver a plegar para formar proteínas activas de acuerdo con procedimientos conocidos para los expertos en la técnica, véase Sánchez y col. (1999) *J.Biotechnol.* 72, 13-20 and Cupit PM et al (1999) *Lett Appl Microbiol.* 29, 273-277.

3.7 Procedimientos de cultivo celular

Las células huésped transformadas con vectores que codifican los anticuerpos terapéuticos de la invención o

fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden cultivarse mediante cualquier procedimiento conocido para los expertos en la técnica. Las células huésped pueden cultivarse en matraces de centrifuga, tubos giratorios o sistemas de fibra hueca, pero la producción a gran escala se usan reactores en tanques en agitación, particularmente para los cultivos en suspensión. Normalmente, los tanques en agitación están adaptados para aireación usando, por ejemplo, rociadores, deflectores o propulsores de baja cizalladura. Para las columnas en burbuja y los reactores aéreos se pueden usar aireación directa con burbujas de aire u oxígeno. Cuando las células huésped se cultivan en un medio de cultivo sin suero, se prefiere suplementar el medio con un agente protector celular, tal como Pluronic F-68, para ayudar a prevenir los daños celulares como resultado del proceso de aireación. En función de las características de la célula huésped se puede usar cualquier microvehículo, como sustratos de crecimiento para las líneas celulares dependientes de anclaje, o las células pueden adaptarse al cultivo en suspensión (que es típico). El cultivo de las células huésped, en particular de las células huésped de vertebrados, puede usar varios modos de operación, tales como de alimentación discontinua, procesamiento repetido discontinuo (véase Drapeau y col. (1994) *cytotechnology* 15: 103-109), proceso discontinuo extendido o cultivo en perfusión. Aunque las células huésped de mamífero transformadas de forma recombinante se pueden cultivar en medio con suero, tal como suero bovino fetal (FCS), se prefiere que dichas células huésped se cultiven en medio sin suero sintético, tal como se divulga en Keen y col. (1995) *Cytotechnology* 17: 153-163, o medio comercialmente disponible tal como ProCHO-CDM o UltraCHO™ (Cambrex NJ, EE.UU.), suplementado cuando sea necesario con una fuente de energía tal como glucosa y factores de crecimiento sintéticos, tales como insulina recombinante. El cultivo sin suero de células huésped puede requerir que esas células estén adaptadas a crecer en condiciones de ausencia de suero. Un enfoque adaptativo es cultivar dichas células huésped en medio con suero y cambiar repetidamente el 80% del medio de cultivo por medio sin suero, de modo que las células huésped aprendan a adaptarse en condiciones sin suero (p. ej., Scharfenberg y col. (1995) in *Animal Cell technology: Developments towards the 21st century* (Beuvery y col. eds, 619-623, Kluwer Academic publishers).

Los anticuerpos de la invención secretados en el medio se pueden recuperar del medio y purificar usando varias técnicas para proporcionar un grado de purificación adecuado para el uso previsto. Por ejemplo, el uso de anticuerpos terapéuticos de la invención para el tratamiento de pacientes humanos normalmente exige una pureza del al menos un 95%, más habitualmente de una pureza del 98% o 99% en comparación con el medio de cultivo que comprende los anticuerpos terapéuticos. En el primer caso, los residuos celulares de los medios de cultivo normalmente se eliminan usando centrifugación, seguida de una etapa de aclarado del sobrenadante usando, por ejemplo, microfiltración, ultrafiltración y/o filtración profunda. Se dispone de varias otras técnicas tales como diálisis y electroforesis en gel y técnicas cromatográficas tales como hidroxipatito (HA), cromatografía de afinidad (opcionalmente implica un sistema de marcaje de afinidad tal como polihistidina) y/o cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, véase el documento US 5.429.746). En una realización, los anticuerpos de la invención, después de varias etapas de aclarado, se capturan usando cromatografía de afinidad por proteína A o G, seguido de etapas adicionales de cromatografía tales como cromatografía de intercambio iónico y/o HA, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de exclusión por tamaño y precipitación en sulfato amónico. Normalmente también se emplean varias etapas de eliminación de virus (p. ej., nanofiltración usando, por ejemplo, un filtro DV-20). Después de estas diversas etapas, se proporciona una preparación purificada (normalmente monoclonal) que comprende al menos 75 mg/ml o más, por ejemplo 100 mg/ml o más, del anticuerpo de la invención o fragmento de unión a antígeno. Adecuadamente, dichas preparaciones carecen sustancialmente de formas agregadas de los anticuerpos de la invención.

4. Composiciones Farmacéuticas

Las preparaciones purificadas de los anticuerpos de la invención (particularmente preparaciones monoclonales) como se ha descrito anteriormente pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas para usar en el tratamiento de las enfermedades y trastornos humanos tales como los descritos anteriormente. Normalmente, dichas composiciones comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable (es decir, inerte) tal como se conoce y considera aceptable en la práctica farmacéutica, véase, por ejemplo, Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16th edition (1980) Mack Publishing Co. Ejemplos de dichos vehículos incluyen vehículos esterilizados tales como solución salina, solución de Ringer o solución de dextrosa, opcionalmente tamponadas con tampones adecuados hasta un pH dentro de un intervalo de 5 a 8. Las composiciones farmacéuticas para inyección (p. ej., por vía intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intramuscular o intraportal) o infusión continua están adecuadamente libres de materia particulada y pueden comprender entre 0,1 ng a 100 mg del anticuerpo, normalmente entre 5 mg y 25 mg de anticuerpo. Procedimientos para la preparación de dichas composiciones farmacéuticas es bien conocida para los expertos en la técnica. En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden entre 0,1 ng a 100mg de anticuerpos terapéuticos de la invención en forma de monodosis, opcionalmente junto con las instrucciones de uso. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden liofilizarse (secarse por congelación) para reconstituir antes de la administración de acuerdo con procedimientos bien conocidos o evidentes para los expertos en la técnica. Cuando las realizaciones de la invención comprende anticuerpos de la invención con un isotipo IgG1, se puede añadir a la composición farmacéutica un quelante de cobre, tal como citrato (p. ej., citrato sódico) o EDTA o histidina para reducir el grado de degradación mediada por

cobre de los anticuerpos de este isotipo, véase el documento EP0612251.

Las dosis y las pautas terapéuticas eficaces para administrar el anticuerpo de la invención generalmente se determinan empíricamente y dependen de factores tales como la edad, el peso y el estado de salud del paciente y la enfermedad o trastorno que se va a tratar. Dichos factores están dentro del ámbito del médico encargado de la atención. Guías para seleccionar las dosis adecuadas se pueden encontrar en, por ejemplo, Smith y col. (1977) Antibodies in human diagnosis and therapy, Raven Press, New York., pero generalmente estará entre 1 mg y 1000 mg. En una realización, la pauta posológica para tratar a un paciente humano afectado por AR es 100 mg o aproximadamente (es decir entre 50 mg a 200 mg) de anticuerpo de la invención (o fragmento de unión a antígeno del mismo) administrado por vía subcutánea a la semana o cada dos semanas. Las composiciones de la presente invención también pueden usarse de forma profiláctica.

Dependiendo de la enfermedad o trastorno que se va a tratar, las composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención se pueden usar de forma simultánea, por separado o secuencialmente con una cantidad eficaz de otro medicamento, tal como un agente antiinflamatorio, por ejemplo, un AINE, metotrexato, bucilamina, tiomalato sódico o uno o más de un tratamiento anti-TNF-alfa tal como Enbrel™ (etanercept), Remicade™ (infliximab), Humira™ (adalimumab) y/o CDP870. Los anticuerpos de la invención se pueden usar en combinación con una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-receptor de TNF-alfa, véase Davis MW y col. (2000) Ann Rheum Dis 59(Suppl 1): 41-43. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención se pueden usar en combinación con una cantidad eficaz de un agente dirigido contra IL-1/IL-1R (p. ej., Kineret™), CTLA4-Ig, IL-6 (véase Choy y col., (2002) Ann.Rheum.Dis 61 (supl 1): 54), IL-8, IL-15, VEGF, IL-17, IL-18 (véase Taylor y col. (2001) Curr.Opin.Immunol.13: 611-616), anticuerpos anti-ICAM y/o anti-CD4, agentes dirigidos contra un miembro de la familia de MMP, por ejemplo MMP-1, 2, 3 y/o 13. Los anticuerpos de la invención también se pueden usar en combinación con un agente que elimina células que se sabe que están implicadas en el proceso, por ejemplo linfocitos B CD20 positivos, usando, por ejemplo, Mabthera™. En la presente invención también se contemplan otras terapias en combinación con anticuerpos de la invención incluyen terapias anti-angiogénicas, tales como antagonistas de la integrina $\alpha V\beta 3$ Kringles 1-5 (véase Sumariwalla P y col. (2003), Arthritis Res Ther 5:R32-R39.), Flt-1 soluble (véase Miotla et al, (2000) Lab.Invest. 80:1195-1205) o un agente anti-COX-2. convenientemente, una composición farmacéutica que comprende un kit de partes del anticuerpo de la invención o fragmento de unión a antígeno del mismo junto con otros medicamentos opcionalmente junto con instrucciones de uso.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo terapéutico monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como se describe en el presente documento para usar en el tratamiento de enfermedades que responden a la modulación de la interacción entre el Sitio II de la OSM y la gp130. También se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico monoclonal, comprendiendo el anticuerpo una cadena pesada que tiene la secuencia que se indica en la SEC ID N° 11 y una cadena ligera que tiene la secuencia indicada en la SEC ID N° 12.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico monoclonal en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia que se indica en la SEC ID N° 50 y una cadena ligera que tiene la secuencia indicada en la SEC ID N° 51.

4.1 Composiciones farmacéuticas para la modulación de la interacción con el Sitio II y el Sitio III

Un aspecto de la presente invención se basa, al menos en parte, en el hallazgo inesperado de que la modulación de la interacción tanto del Sitio II como del Sitio III de la hOSM con sus respectivas parejas de interacción (es decir, para el Sitio II, gp130, para el Sitio III, OSMR β y/o LIFR, y/o gp130 para la unión de una segunda molécula de OSM) muestra sinergia en comparación con la modulación de la interacción de cualquiera de estos dos sitios solos.

Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento de modular la interacción entre hOSM y gp130 y LIFR y/o OSMR β , en el que el procedimiento comprende proporcionar un antagonista del Sitio II capaz de modular (es decir, inhibir o bloquear) la interacción entre el Sitio II de hOSM con gp130 y proporcionar un antagonista del Sitio III capaz de modular (es decir, inhibir o bloquear) la interacción entre el Sitio III de hOSM y OSMR y/o LIFR, y gp130 (para la unión de una segunda molécula de OMS) muestra sinergia en comparación con la modulación de la interacción de cualquiera de estos dos sitios solos.

Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento de modular la interacción entre hOSM y gp130 y LIFR y/o OSMR β , comprendiendo el procedimiento proporcionar un antagonista del Sitio II capaz de modular (es decir, inhibir o bloquear) la interacción entre el Sitio II de hOSM con gp130 y proporcionar un antagonista del Sitio III capaz de modular (es decir, inhibir o bloquear) la interacción entre el Sitio III de hOSM y OSMR y/o LIFR.

En una forma de realización se proporciona una composición farmacéutica que comprende un primer anticuerpo terapéutico que se une específicamente a hOSM y modula la interacción entre hOSM y gp130 (un anticuerpo del

Sitio II, ejemplos de los cuales se proporcionan en la presente memoria descriptiva) y un segundo anticuerpo terapéutico que se une específicamente a hOSM y modula la interacción entre hOSM y OSMR y/o LIFR (un anticuerpo del Sitio III, un ejemplo del cual está disponible comercialmente como MAB295, R&D systems). El segundo anticuerpo terapéutico se puede reconocer por su capacidad para modular (es decir, inhibir o bloquear) la interacción entre hOSM y OSMR β y/o LIFR en un ensayo a base de ELISA o como se indica en los ejemplos, es decir por su capacidad para neutralizar OSM en el ensayo KB de los ejemplos y no inhibir la unión de OSM y gp130 en el ensayo ELISA de los ejemplos. Un anticuerpo del Sitio II se puede reconocer por su capacidad para inhibir la unión de OSM en el ensayo ELISA de los ejemplos. Normalmente, tanto el primero como el segundo anticuerpo terapéutico son monoclonales. Por supuesto, será evidente para los expertos en la técnica que no es necesario que la composición farmacéutica comprenda dos entidades antagonistas (p. ej., dos entidades de anticuerpo terapéutico), ya que es posible proporcionar, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a hOSM y modula la interacción del Sitio II y el Sitio III con sus parejas de interacción respectiva.

En otra forma de realización se proporciona un kit de partes que comprende una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a hOSM y modula la interacción entre el Sitio II de hOSM y gp130 y una segunda composición farmacéutica que comprende un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a hOSM y modula la interacción entre el Sitio III de hOSM y OSMR β y/o LIFR opcionalmente junto con instrucciones de uso.

En otra forma de realización se proporciona un procedimiento para tratar a un paciente humano afectado por una enfermedad o trastorno que responde a la modulación de la interacción entre hOSM y sus asociados de interacción (p. ej., gp130 y OSMR β y/o LIFR), tal como una enfermedad o trastorno inflamatorio (p. ej., enfermedades artríticas tales como artritis reumatoide u osteoartritis), en el que el procedimiento comprende administrar simultánea, secuencialmente o por separado una cantidad terapéuticamente eficaz de un primer antagonista terapéutico (p. ej., anticuerpo) que se une específicamente a hOSM y modula la interacción entre el Sitio II de hOSM y gp130 y una cantidad terapéuticamente eficaz de un segundo antagonista (p. ej., anticuerpo) que se une específicamente a hOSM y modula la interacción entre el Sitio III de hOSM y OSMR β y/o LIFR.

Por supuesto, será evidente para los expertos en la técnica que al menos un primer antagonista (tal como un anticuerpo) que se une a gp130 y modula (p. ej., bloquea) la interacción entre (a) gp130 y hOSM y también (b) OSMR β y/o LIFR y hOSM puede alcanzar el mismo objetivo que se ha indicado anteriormente.

5. Usos clínicos

Los anticuerpos de la invención se pueden usar para tratar varias enfermedades o trastornos que responden al tratamiento que modulan la interacción entre el Sitio II de hOSM y gp130. Cabe mencionar enfermedades o trastornos que implican la producción de niveles patológicos de TNF alfa (es decir, una enfermedad o trastorno mediada por TNF alfa) y las enfermedades o trastornos caracterizadas por la degradación o destrucción de cartílago, en particular cartílago articular. Como se ha descrito con detalle anteriormente, los anticuerpos de la invención se pueden usar en el tratamiento de artropatías inflamatorias, tales como AR, bien en monoterapia o en combinación con otro tratamiento para dicha artropatía. Los anticuerpos de la invención se pueden usar para tratar una forma clínicamente establecida de la enfermedad en cuestión o para prevenir el inicio en pacientes susceptibles o ralentizar o detener la progresión de la enfermedad hacia significado clínico. Para el tratamiento de la AR, los anticuerpos de la invención se pueden usar para prevenir la recaída una vez que se ha producido la remisión de la enfermedad. Cuando el paciente está afectado con una forma intermitente de la enfermedad, los anticuerpos de la invención se pueden usar para prolongar el intervalo de tiempo entre fases agudas de la enfermedad. Los anticuerpos de la invención también se pueden usar para tratar manifestaciones extraarticulares de la AR, por ejemplo el síndrome de Felty, y/o tratar la formación de placas ateroscleróticas. Para el tratamiento de la AR se pueden usar combinaciones de anticuerpos de la invención junto con medicamentos descritos anteriormente. Otras enfermedades artríticas que se pueden beneficiar de la administración de un anticuerpo de la invención incluyen artritis de inicio juvenil, artritis psoriásica y espondilitis anquilosante.

La osteoartritis (OA) es una enfermedad degenerativa crónica de origen desconocido que se caracteriza por la pérdida gradual de cartílago articular y función articular. Actualmente está clasificada en dos grupos. La OA primaria puede ser localizada o generalizada, siendo esta última más habitual en mujeres posmenopáusicas, con el desarrollo de nódulos de Heberdens. La OA secundaria tiene una causa subyacente, tal como traumatismo, obesidad, enfermedad de Pager o artritis inflamatoria. La pérdida de cartílago articular a menudo se acompaña de cambios óseos hipertróficos con formación de osteofitos, engrosamiento óseo subcondral e inflamación de la membrana sinovial. De interés particular es la discapacidad que afecta a las articulaciones que soportan peso, tales como la rodilla, las manos y la cadera. La OA es una enfermedad extremadamente debilitante que, en su forma más grave, requiere sustitución de la articulación para restablecer la movilidad y detener el dolor articular. La osteoartritis de la cadera se ha dividido en las formas hipertrófica y atrófica (véase Solomon L (1976) J Bone Joint Surg 58, 176) en base a la tendencia de un paciente a desarrollar osteofitos grandes; otras articulaciones pueden responder de forma

similar a la presencia de la enfermedad. La OA hipertrófica se puede asociar con el depósito de cristales de pirofosfato e hiperostosis esquelética idiopática difusa. Los tratamientos actuales incluyen el uso de analgésicos no opioides, tales como acetaminógeno, y tramado, AINE tales como un inhibidor específico de Cox-2, por ejemplo celecoxib, rofecoxib, analgésicos opioides y glucosamina y condroitín sulfato. Por tanto, en una realización de la invención se proporciona un procedimiento de tratar la osteoartritis (p. ej., primaria o secundaria) en un paciente humano afectado por tal enfermedad, en el que el procedimiento comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo terapéutico o fragmento del mismo de la invención, como se describe en el presente documento. La invención también se refiere a una combinación del anticuerpo terapéutico de la invención junto con otro tratamiento, particularmente uno o más de los tratamientos de la OA descritos anteriormente.

La psoriasis es una enfermedad crónica de la piel con una morbilidad significativa que afecta a aproximadamente el 2 % de la población de raza caucásica. Aunque para muchos puede ser una enfermedad relativamente leve, puede tener efectos profundos en los afectados. La discapacidad de los pacientes con psoriasis tratados en hospitales se ha demostrado que es similar a la de los pacientes con angina y se acerca a la de los pacientes con insuficiencia cardíaca (Finlay y col., (1990); Br.J.Dermatol, 123, 751). La forma más habitual de psoriasis es la enfermedad crónica de tipo placas. Esta se presenta en forma de placas escamosas rojas bien definidas, normalmente distribuidas en el cuero cabelludo, la zona lumbar y las partes extensoras de las extremidades. Las variantes clínicas incluyen psoriasis gítana, sebopsoriasis y formas postulares de la enfermedad. Una minoría de los pacientes también desarrolla artritis inflamatoria seronegativa. Microscópicamente, la piel con lesiones muestra un incremento de la proliferación y una diferenciación anormal de los queratinocitos, infiltración por linfocitos T colaboradores y neutrófilos activados, y activación de la vasculatura cutánea. Estos cambios corresponden a la sobreexpresión de factores de crecimiento y sus receptores, citoquinas proinflamatorias y péptidos angiogénicos. No obstante, a pesar de la intensa investigación, la etiología y patogenia de esta enfermedad sigue siendo oscura, aunque en un modelo animal se ha demostrado un papel fundamental desempeñado por los linfocitos T activados (véase Nickoloff y col. (1999) Arch. Dermatol.135, 546-552). Los tratamientos actuales incluyen tratamientos tópicos, tales como análogos de vitamina D, corticosteroides, ditanol y retinoides, tales como gel de tazaroteno. La fototerapia incluye el uso de ultravioleta B o psoraleno y ultravioleta A y láser excimer. Los tratamientos con retinoides sistémicos incluyen etretinato y acitretina, isotretinoína, liarazol. Otros tratamientos incluyen metotrexato, hidroxiurea, ciclosporina y antagonistas de la calcineurina, 6-tioguanina, azatioprina, sulfasalazina y ésteres de ácido fumárico. Más recientemente, se ha demostrado o propuesto que los tratamientos biológicos, tales como Ontak™ (Denileukin Diftitox), Zenapax™ (Daclizumab), Basiliximab, anticuerpos anti-CD4, Efalizumab, Alefacept™, Siplizumab, IDEC-114 y BMS 188667 (CTLA4Ig) son útiles en el tratamiento de la enfermedad. Además, los tratamientos anti-TNF alfa, tales como Enbrel™ (etanercept), Remicade™ (infliximab), Humira™ (adalimumab) y/o CDP870 se pueden usar en combinación con anticuerpos de la invención para el Tratamiento de la psoriasis (incluidas variantes clínicas de los mismos).

Las pruebas del papel de la OSM en las lesiones psoriásicas se encuentran en Boifat et al (1998) Arch.Dermatol. Res 290:9, 13. La oncostatina M se secreta de forma espontánea en cultivos orgánicos cortos de piel con lesiones psoriásicas (véase Bonifati C y col.). Además, la activación constitutiva de STAT3, la principal molécula de señalización posterior al receptor de la OSM en queratinocitos de ratón tiene como resultado el desarrollo espontáneo de lesiones psoriásicas. (véase Sano S y col. (2005) Nature Medicine 11: 43-49).

Por tanto, los anticuerpos de la presente invención se pueden usar en el tratamiento de la psoriasis (en placas crónica, gutata, sebopsoriasis, pustular, psoriasis asociada con la artritis inflamatoria seronegativa), la dermatitis atópica/eccema, el acné, la ictiosis, el pénfigo, las verrugas virales bien en monoterapia o en combinación con estos tratamientos descritos anteriormente.

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmunitaria sistémica que se caracteriza por la producción de autoanticuerpos, formación de complejo inmunitario y daños tisulares mediados inmunológicamente (revisado en Rheumatology (2003). Eds Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt and Weisman. Pub. Mosby.1291-1430). Las manifestaciones patológicas incluyen necrosis fibrinoide, cuerpos de hemotoxina, lesión vascular y rotura de la unión dermis-epidermis de la piel, artritis inflamatoria y glomerulonefritis. El LES se puede presentar a cualquier edad, incluido en neonatos. Es uno de los trastornos más habituales que afectan a mujeres en edad fértil, es significativamente más frecuente en mujeres que en varones y afecta a personas de origen africano con una frecuencia significativamente mayor que a los caucásicos. Se ha estimado que su incidencia es de entre 1,8 y 7,6 casos por 100.000 persona-años en EE.UU. El LES está asociado con un incremento de la mortalidad, principalmente por infección y complicaciones renales y del SNC. El tratamiento del lupus y sus complicaciones viene determinado por las necesidades de cada paciente individual. Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos son una importante terapia de primera línea para los síntomas musculoesqueléticos, signos constitucionales y serositis leve. Los antipalúdicos (p. ej., hidroxicloquina, cloroquina y quinacrina) se usan para tratar los síntomas musculoesqueléticos y los signos constitucionales que son resistentes a los no esteroideos y a dosis bajas de esteroideos. La mayoría de las manifestaciones clínicas de LES responde al tratamiento con esteroideos, pero los efectos secundarios de estos fármacos pueden limitar tanto la dosis como la duración del tratamiento. Los fármacos

inmunosupresores, principalmente azatioprina, se pueden usar para la enfermedad más grave. Recientemente, se ha demostrado que el tratamiento con el anticuerpo de depleción de linfocitos B, Rituxan, posee resultados prometedores en el LES (Revisado en Looney RJ y col. (2005) *Curr Dir Autoimmune* 8:193-205). Se ha encontrado oncostatina M a niveles elevados en el suero de pacientes con LES y los niveles se correlacionan con la actividad de la enfermedad (véase Robak E y col. (1997) *Eur Cytokine Netw* 8: 281-286). Por tanto, la invención se refiere al uso de anticuerpos de la invención en el tratamiento (bien en monoterapia o en combinación con uno o más de los tratamientos actuales para el LES detallado anteriormente) de LES.

La esclerosis sistémica (ES) que incluye variantes de esclerodermia y fenómeno de Raynaud es un trastorno generalizado de la piel y los órganos internos. Se caracteriza por la acumulación de matriz extracelular en la piel y las vísceras. La oncostatina M puede estimular la acumulación excesiva de la matriz extracelular (véase Bamber B y col. (1997) *J Mol Med Abstract Vol* 76: 61-69). La oncostatina M se produce de forma espontánea en células mononucleares cultivadas de pacientes con esclerosis sistémica (véase Hasegawa M y col. (1999) *Rheumatology (Oxford)* 38: 612-617) y se encuentra en el fluido del lavado broncoalveolar de fibrosis pulmonar en la esclerodermia (Revisado en Atama SP y White B (2003) *Cytokine growth Factor Rev* 14: 537-550). Por tanto, la invención se refiere al uso de anticuerpos de la invención en el tratamiento de la ES y variantes de la misma bien en monoterapia o en combinación con otro medicamento.

Se ha detectado OSM en el fluido de lavado broncoalveolar de pacientes durante la lesión pulmonar aguda, particularmente en los casos de neumonía (Tamura S y col. (2002) *Develop Dyman* 225:327-331). Parece que en estos pacientes, la fuente celular de OSM son los neutrófilos y las concentraciones de OSM en el líquido de LBA se correlaciona con el número de PMN. Dado que los neutrófilos son una fuente de OSM y, tras su activación secretan OSM, es probable que la OSM aparezca en los pulmones de cualquier paciente en el que los neutrófilos sean un componente significativo de la inflamación de las vías aéreas, incluidas EPOC y asma grave. Además, la OSM también es expresada por los eosinófilos tisulares (de ratón) y podrían ser una fuente significativa de OSM durante la inflamación (véase Tamura *ibid*).

La sobreexpresión de OSM en las vías aéreas de ratones usando un vector adenoviral indujo una profunda inflamación eosinofílica y depósito de matriz (véase Langdon C y col. (2003) *J.Immunol.* 170:548-555 y, también, la expresión de TIMP-1 (véase Kerr C y col. (1999) *J. Interfer. Cytokine Res.*, 19:1195-1205. La exposición de fibroblastos de pulmón de ratón a la OSM estimuló la liberación de eotaxina, un potente agente de quimioatracción de eosinófilos. Además, la OSM estimula la proliferación, induce la producción de colágeno y evita la apoptosis de fibroblastos de pulmón humano (véase Scaffidi, A.K. y col. (2002) *Brit. J. Pharamcol* 136: 793-801). Aunque los mecanismos tras estas observaciones no se conocen, el depósito de matriz podría, en parte, ser el resultado de una fuerte y específica regulación por aumento de la síntesis del inhibidor de la α_1 proteasa (véase Cichy, J. y col. (1998) *Biochem.J* 329: 335-339). También se ha descubierto que la OSM estimula la proliferación de mastocitos dependiente de fibroblastos y un marcado incremento del contenido de histamina (véase Gytoku E y col. (2001) *Arch.Dermatol.Res* 293:508-514). La instilación directa de OSM en pulmones de rata aislados indujo una rápida y sostenida secreción de IL-6 (véase, Li, H.L. (2002) *J.Drug Targ* 10:55-62). Por tanto, la presente invención se refiere al uso de anticuerpos de la invención en el tratamiento (bien en monoterapia o en combinación con otro medicamento) en el tratamiento de enfermedades pulmonares inflamatorias, tales como asma y EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica).

Se ha detectado OSM en los cerebros de pacientes de esclerosis múltiple (EM), donde se localiza en la microglía, los astrocitos y leucocitos infiltrantes (Véase Ruprecht K y col. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 60(11): 1087-98, 2001 Nov). La OSM induce la secreción de IL-6 y MCP-1 de células endoteliales cerebrales y la adición de TNFa con OSM produce una respuesta sinérgica. La OSM también induce la expresión de ICAM1 en las células endoteliales microvasculares cerebrales, que podría potenciar la infiltración de leucocitos en el tejido cerebral (Ruprecht K y col. *ibid*). Además de estimular la inflamación en el cerebro, la OSM puede contribuir directamente a la pérdida de neuronas. Los sobrenadantes de monocitos de pacientes con HIC producen una profunda inhibición del crecimiento de los neuroblastos, así como la muerte de neuronas, y se ha demostrado que el mediador de estos efectos era la oncostatina M. Ya que muchos pacientes de VIH sufren atrofia cerebral causada por la pérdida de células neuronales, la OSM puede ser un mediador de esta patología. Claramente, la OSM podría también desempeñar un papel en otras enfermedades del SNC en las que se produce pérdida neuronal. Es interesante el hecho de que, en la enfermedad de Alzheimer (EA), la antiquimotripsina α (ACT) es una de las proteínas asociadas con amiloide y su expresión se incrementa espectacularmente en las áreas de enfermedad, quizá facilitando el depósito de proteínas anormales en placas amiloides y marañas de neurofibrillas. La OSM, que se sabe que es secretada por linfocitos T y monocitos activados infiltrantes y microglía, es un potente inductor de ACT y, por tanto, podría contribuir a la patología de la EA (véase Kordula T y col. (1998) *J Biol.Chem.* 273:4112-4118 and Kordula T *Journal of Neuroscience*. 20(20): 7510-6, 2000).

Los trabajos de Tamura y col. sugieren que la OSM puede estar implicada en el desarrollo y mantenimiento del dolor neuropático (véase Tamura S. y col. (2003) *Eur.J.Neurosci.* 17:2287-2298). Sus estudios revelaron una supoblación

de neuronas sensoriales nociceptivas que expresan el receptor de OSM β . Todas las neuronas OSM β R +ve también expresaban los receptores VR1 y P2X3, que se ha demostrado que son cruciales para el desarrollo del dolor tanto neuropático como inflamatorio (véase Jarvis M.F. y col. (2002) PNAS 99:179-184 and Walker K.M y col. (2003) J. Pharmacol. Exp. Ther 304, 56-62). Además, los ratones OSM β -/- tienen reducidas las respuestas nocivas al dolor químico, térmico, visceral y mecánico, que se correlaciona con una reducción de las neuronas pequeñas VR1+ve P2X3+ (véase Morikawa, Y. y col. (2004): J Neurosci 24, 1941-1947).

Así, la presente invención también se refiere al uso de anticuerpos de la invención en el tratamiento (bien en monoterapia o en combinación con otro medicamento) en el tratamiento de enfermedades o trastornos del sistema nervioso central tales como los descritos anteriormente, tales como esclerosis múltiple (EM), enfermedad de Alzheimer (EA) y otras demencias, y además se refiere al uso en el tratamiento del dolor, particularmente el dolor neuropático y/o inflamatorio.

La OSM se encuentra en macrófagos tisulares en lesiones ateroscleróticas (Véase Modur V. y col. J.Clin Invest. 100, 158-168) y como factor angiogénico puede estimular la neovascularización característica de las placas ateroscleróticas que se piensa que contribuyen a la fragilidad de la pared de los vasos. Así como la respuesta angiogénica, la OSM produce inducción de la secreción de IL-6 en células endoteliales, donde sus efectos son aditivos o sinérgicos con la IL-1 y el TNF α , respectivamente, y la expresión de COX-1 (véase Brown J.T y col. (1991) J.Immunol.147: 2175-2180). La inducción en las células endoteliales de la COX2 es necesaria para las propiedades angiogénicas de la OSM (véase Brown J.T y col., *ibid*). No obstante, la OSM también induce expresión de otros factores angiogénicos en células endoteliales; VEGF (Vasse, M y col. (1999) Arterioscler Thromb Vasc Biol. 19:1835-1842) y bFGF (Wijelath E.S. y col. (1997) J.Cell Sci 110:871-879) Es interesante el hecho de que las células endoteliales tienen una densidad del receptor de la OSM de 10 a 20 veces mayor que otras células (véase Modur V. y col. *ibid*).

Además de los efectos sobre el endotelio, la OSM también induce la expresión de IL-6 y COX-2 en las células de músculo liso vascular (VSMC), además de producir cambios sorprendentes en la morfología celular (Bernard C. y col. (1999) Circ.Res. 85:1124-1131). Normalmente se encuentran depósitos de calcio en las lesiones ateroscleróticas avanzadas, en las que los macrófagos son la célula inflamatoria predominante. Los macrófagos son una fuente principal de OSM y, como hecho interesante, esta citoquina puede inducir la fosfatasa alcalina de tipo óseo y depósito de calcio en cultivos de VSMC (Shioi A. y col. (2002) Circ.Res. 91:9-16). Asimismo, la OSM induce y deprime, respectivamente, la secreción de factor tisular (TF) y del inhibidor de la ruta del TF /TFPI de VSMC, lo que tiene como resultado una potente actividad procoagulante en sobrenadantes de cultivos de VSMC (Mirshahi F. y col. (2002) Blood Coag.Fibrinol. 13:449-455). Además, la OSM afecta a la secreción del factor de von-Willebrand, el activador del plasminógeno de tipo tisular y PAI-1 en las células endoteliales de un modo que sugiere que la "OSM podría desempeñar un papel crucial en las lesiones ateroscleróticas" (Portau J y col. (1998) Blood Coag.Fibrinol. 9,609-615).

Los niveles plasmáticos de fibrinógeno son un importante factor de riesgo vascular y la OSM es un potente inductor de la secreción de fibrinógeno en los estudios con una línea de células de hepatoma (Vasse. M y col. (1996) Haemostasis 26, Suppl 4, 331-339). No obstante, a concentraciones altas (50 ng/ml), la OSM también aumentó la expresión del receptor de LDL humana (Liu y col. (2003) Ater-io.Thromb.Vasc.Biol.23: 90-96). Por último, la OSM estimula la esterificación del colesterol en macrófagos-monocitos J774 y, por tanto, puede contribuir a este proceso durante el desarrollo de células espumosas en lesiones ateroscleróticas (Maziere C y col. (1996) Biochem. Biophys Acta 1300, 30-34).

Así, la presente invención se refiere al uso de anticuerpos de la invención en el tratamiento de enfermedades o trastornos del sistema cardiovascular. También se contempla el uso de anticuerpos de la invención en el tratamiento de la aterosclerosis y enfermedades o de origen de células endoteliales. También se contempla el uso de anticuerpos de la invención en el tratamiento de pacientes afectados por el VIH, en particular para tratar afecciones resultantes de la infección con el virus, tal como el sarcoma de Kaposi.

Los anticuerpos de la invención también se pueden usar en enfermedades de la regulación del ciclo celular, por ejemplo cáncer (tal como cáncer de próstata), mieloma.

Aunque la presente invención se ha descrito principalmente en relación con el tratamiento de enfermedades o trastornos humanos, la presente invención puede también tener aplicaciones en el tratamiento de enfermedades o trastornos similares en mamíferos no humanos.

Tabla A

Proteína o polinucleótido (PN)	Anticuerpo 15E10	Anticuerpo 10D3
CDRH1:	SEC ID N° 1	SEC ID N° 40
CDRH2	SEC ID N° 2	SEC ID N° 41
CDRH3	SEC ID N° 3	SEC ID N° 42
CDRL1	SEC ID N° 4	SEC ID N° 43
CDRL2	SEC ID N° 5	SEC ID N° 44
CDRL3	SEC ID N° 6	SEC ID N° 45
Dominio V _H (murino)	SEC ID N° 7	SEC ID N° 46
Dominio V _L (murino)	SEC ID N° 8	SEC ID N° 47
Dominio V _H (humanizado, B3)	SEC ID N° 9	SEC ID N° 48
Dominio V _L (humanizado, L2)	SEC ID N° 10	SEC ID N° 49
Cadena pesada (humanizada)	SEC ID N° 11	SEC ID N° 50
Cadena ligera (humanizada)	SEC ID N° 12	SEC ID N° 51
Dominio V _H (murino, PN)	SEC ID N° 15	SEC ID N° 52
Dominio V _L (murino, PN)	SEC ID N° 16	SEC ID N° 53
Dominio V _H (humanizado, PN, B3)	SEC ID N° 17	SEC ID N° 54
Dominio V _L (humanizado, PN, L2)	SEC ID N° 18	SEC ID N° 55
Cadena pesada (humanizada, PN)	SEC ID N° 19	SEC ID N° 56
Cadena ligera (humanizada, PN)	SEC ID N° 20	SEC ID N° 57
Dominio V _H (B4, humanizado)	SEC ID N° 21	N/A
Cadena pesada (humanizada, Fc mutada)	SEC ID N° 61	N/A
Cadena pesada (humanizada, Fc mutada, PN)	SEC ID N° 62	N/A

La presente invención se describe a continuación únicamente mediante los ejemplos.

Ejemplos

- 5 Los Ejemplos 1 a 6 se refieren a la producción y modificación del anticuerpo 15E10. El ejemplo 7 se refiere a la producción y modificación del anticuerpo 10D3.

1. Generación de anticuerpos monoclonales

- 10 Los anticuerpos monoclonales se producen mediante células de hibridoma, en general de acuerdo con el procedimiento indicado en E Harlow and D Lane, Antibodies a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. El resultado de la fusión de células de mieloma de ratón con linfocitos B de ratones inmunizados con el antígeno diana. La célula de hibridoma se inmortaliza mediante la pareja de fusión del mieloma, mientras que la capacidad para producir anticuerpos es proporcionada por los linfocitos B.

- 15 Cuatro ratones SJL fueron inmunizados mediante inyección intraperitoneal cada uno con OSM humana glicosilada (hOSM) producida en células CHO suspendidas en adyuvante RIBI (Sigma). Los ratones recibieron refuerzo con hOSM únicamente tras 2 semanas, después con hOSM neutralizada con el anticuerpo monoclonal anti-Sitio III

(OM4/11.17; OSM: Mab 1:1.5 p: p) para dirigir la respuesta inmunitaria hacia el Sitio II tras 2 semanas más, después, de nuevo, con el complejo OSM-Mab tras otras 2,5 semanas y, por último, con OSM únicamente tras 5 semanas. Tres meses después de la inmunización inicial se extrajeron los bazo y los linfocitos B se condensaron con las células de mieloma de ratón derivadas de células P3X usando PEG1500 (Boehringer) para generar hibridomas. Las líneas celulares de hibridoma individuales se clonaron mediante dilución límite (E Harlow and D Lane). Los pocillos que contenían colonias únicas se identificaron microscópicamente y se analizaron los sobrenadantes para determinar la actividad. Las células de los clones más activos se expandieron para crioconservación, producción de anticuerpo etc.

La selección inicial de anticuerpo de OSM se realizó sobre la base de la especificidad y la potencia en la neutralización de la OSM glicosilada humana evaluada en el ensayo de ELISA de inhibición de gp130 y el ensayo de células KB (véase más adelante), proporcionando este último una comprobación de la especificidad de OSM. Tras la identificación de los anticuerpos de suficiente potencia y especificidad correcta se aplicaron otros criterios de selección.

1/ reactividad cruzada contra la OSM de macaco

2/ mantenimiento de la actividad contra OSM humana en presencia de suero combinado de AB humano

3/ mantenimiento de la actividad contra una biblioteca de OSM de neutrófilos humanos y contra OSM derivada de células de líquido sinovial en la AR. Se sometió a detección selectiva a 1920 hibridomas en el ELISA de inhibición de gp130, 43 dieron más del 50 % de inhibición y se realizaron experimentos de respuesta a dosis limitada en 15, de los que 6 se seleccionaron para su estudio adicional. Éstas se subclonaron y se seleccionaron los clones maestros.

Se seleccionaron dos anticuerpos, el clon 15E10 y el clon 10D3 (véase el ejemplo 7) sobre la base de la potencia. El anticuerpo 15E10 murino fue consistentemente más potente en el ELISA de inhibición de gp130, pero tenía una potencia similar a la del 10D3 en el ensayo con células KB cuando la OSM humana era el antígeno diana. No obstante, el anticuerpo 15E10 murino era mucho más potente que el 10D3 contra la OSM de macaco en ambos ensayos.

2. CLONACIÓN DE LAS REGIONES VARIABLES DEL CLON 15E10

Se extrajo el ARN total de las células de hibridoma 15E10 y el ADNc de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera se produjo mediante transcripción inversa usando cebadores específicos de la secuencia líder murina y las regiones constantes del anticuerpo de acuerdo con el isotipo previamente determinado (IgG2a/κ). El ADNc de los dominios de las cadenas pesada y ligera se clonó después en un vector para pCR2.1 su secuenciación.

2.1 Extracción de ARN

El ARN total se extrajo de los sedimentos de 106 células del clon de hibridoma 15E10 usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2.2 Transcripción inversa

El ARN se sometió a transcripción inversa para producir ADNc de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera usando cebadores específicos de las secuencias líder murina y las regiones constantes del anticuerpo IgG2a/κ. La mezcla de cebadores usada se indica en Jones ST and Bendig MM Bio/technology 9:88-89 (1991)

Las combinaciones de cebadores directos de la secuencia líder de V_H y V_L se prepararon a 50 μM. Las soluciones de los cebadores inversos de la región constante γ2a y κ también se prepararon a 50 μM.

2.3 Transcripción inversa PCR (RT-PCR)

La transcripción inversa del ARN que codifica las regiones variables pesadas y ligeras se llevó a cabo por duplicado usando el sistema Access RT-PCR System de Promega de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores directos e inversos para V_H y V_L fueron como se ha descrito anteriormente.

3. Clonación del producto de PCR de 2.3

3.1 Purificación en gel

Los productos de la RT-PCR (2xV_H y 2xV_L) se cargaron en solución de carga de gel en un gel de agarosa al 1 % preparativa que contiene 0,01 % de bromuro de etidio y se pasó en un tampón TAE a 100 V durante 1 hora y se escindieron las bandas de la región V. También se pasó por el gel un marcador de ADN de 100 pb para permitir la identificación de las bandas V_H y V_L.

Los fragmentos de ADN se extrajeron y purificaron del gel usando el kit de extracción QIAquick TM Gel de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.2 Unión

5 Los fragmentos de la RT-PCR purificados (2xV_H y 2xV_L) se clonaron en el vector pCR2.1 usando el kit de clonación TA de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.3 Transformación

10 Los plásmidos ligados se transformaron en células TOP10F' de acuerdo con las instrucciones del kit de clonación de TA. 50 µl y 200 µl de células transformadas se extendieron en placas de L-agar que contenían 100 µg/ml de ampicilina y se revistieron con 8 µl de solución de IPTG 500 mM y 16 µl de una solución de x-Gal de 50 mg/ml en DMF. Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C.

3.4 Secuenciación

5 colonias blancas se cultivaron durante la noche a 37 °C en 5 ml de medio LB suplementado con 100 µg de ampicilina. Los plásmidos pCR2.1 que contenían los dominios V_H y V_L de 15E10 se extrajeron y purificaron usando el kit Qiagen QIAprep Spin Miniprep de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 Los dominios V_H y V_L se secuenciaron usando los cebadores T7, M13 para y M13 rev.

La secuencia de aminoácidos del dominio V_H de 15E10 (consenso de 10 clones de 2 reacciones de RT-PCR): SEC ID N° 7

La secuencia de aminoácidos del dominio V_L de 15E10 (consenso de 10 clones de 2 reacciones de RT-PCR): SEC ID N° 8

4. Anticuerpo quimérico

25 Se diseñó un anticuerpo quimérico compuesto por las regiones V murinas parentales de, 3.4 injertados sobre las regiones C silvestres de IgG1/k para confirmar la clonación de las regiones V murinas correctas y también para usar como referencia a la hora de analizar las construcciones humanizadas. El anticuerpo quimérico se expresó en células CHO, se purificó y se analizó la afinidad por el Sitio II de la OSM en el ensayo ELISA de inhibición de gp130 y el ensayo de células KB (véase más adelante).

30 Las regiones variables murinas clonadas se amplificaron mediante OCR para introducir sitios de restricción requeridos para clonar en vectores de expresión de mamífero Rld y Rln. Se diseñaron sitios para Hind III y Spe I para enmarcar el dominio V_H y permitir la clonación en un vector Rld modificado que contiene la región constante humana γ1 natural. Se diseñaron los sitios para HindIII y BsiW I para enmarcar el dominio V_L y permitir la clonación en un vector Rin modificado que contiene la región constante κ humana

4.1 Amplificación por PCR

Cebador directo para V_H:

5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GGC TGT CCT AGG GCT ACT C-3' (SEC ID N° 22)

El sitio de restricción Hind III está subrayado y la secuencia Kozak en negrita.

35 Cebador inverso para V_H:

5'-GAT GGA CTA GTG TCC CTG TGC CCC AGA C-3' (SEQ.I.D.NO:23)

El sitio de restricción Spe I está subrayado.

Cebador directo para V_L:

5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GGA TTT TCA GGT GCA GAT T-3' (SEC ID N° 24)

40 El sitio de restricción Hind III está subrayado y la secuencia Kozak en negrita. Cebador inverso para V_L:

5'-GAT GCG TAC GTT TGA TTT CCA ACT TTG TCC C-3' (SEC ID N° 25)

El sitio de restricción BsiW I está subrayado

Reacción de PCR	Agua	66 µl
	10 x tampón de PCR	10 µl
	dNTP (2mM)	10 µl
	cebador 1 (5 µM)	4 µl
	cebador 2 (5 µM)	4 µl
	AmpliTaQ polimerasa	2 µl
	Plásmido purificado	4 µl
	Volumen total	100 µl

Cebador 1: Cebador directo para V_H o V_L

Cebador 2: Cebador inverso para V_H o V_L

Plásmido purificado: Plásmido pCR2.1 V_H o V_L purificado mediante Qiagen Minipreps (diluido 200x)

5

Ciclo de PCR:	1 - 95°C durante 4 minutos
	2 - 95°C durante 1 minuto
	3 - 55°C durante 1 minuto
	4 - 72°C durante 1 minuto
	5 - 72°C durante 7 minutos

10

etapas 2 a 4: se repitieron 30 veces **4.2 Clonación en vectores de expresión de mamífero**

Los productos de PCR se purificaron usando el kit de purificación MinElute PCR Purification de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15

4.2.1 Digestos de restricción

El producto de la PCR de la V_H y el vector de expresión de mamífero Rld hC γ 1wt se digirieron con Hind III-Spe I:

10x Tampón (NEBuffer2)	5 µl
BSA 100x (NEB)	0,5 µl
ADN	5 µl
Hind III (Promega)	2 µl
Spe I (NEB)	2 µl
Agua	35,5 µl
Volumen total	50 µl

ADN: Purificado del producto de la PCR de V_H o vector Rld hC γ 1wt (a 0,25 mg/ml) Incubado a 2 horas a 37 °C.

El producto de la PCR de la V_L y el vector de expresión de mamífero Rln hC κ se digirieron con Hind III-BsiW I:

20

10x Tampón (NEBuffer2)	5 µl
ADN	5 µl
Hind III (Promega)	2 µl
Agua	38 µl
Volumen total	50 µl

ADN: Purificado del producto de la PCR de V_L o vector Rln hCκ (a 0,25 mg/ml) Incubado a 2 horas a 37 °C. Se añadieron 2 µl de BsiW I (NEB) y se incubaron 2 horas a 55 °C.

4.2.2 Purificación en gel

- 5 Los productos de la digestión con enzimas de restricción se cargaron en solución de carga de gel en un gel de agarosa al 1 % preparativa que contiene 0,01 % de bromuro de etidio y se pasó en un tampón TAE a 100 V durante 1 hora y se escindieron el vector Rld y Rln así como las bandas del fragmento de la PCR de V_H y V_L . También se pasó por el gel un marcador de ADN de 100 pb para permitir la identificación de las bandas V_H y V_L y del vector. El ADN se extrajo y purificó del gel usando el kit de extracción QIAquick TM Gel de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 10

4.2.3 Unión

El fragmento de la PCR de V_H digerido con Hind III-Spe I se ligó en el vector Rld hCγ1wt digerido con Hind III-Spe I.

El fragmento de la PCR de V_L digerido con Hind III-BsiW I se ligó en el vector Rld hCκ digerido con Hind III-BsiW I.

- 15 La unión se llevó a cabo usando el LigaFast Rapid DNA Ligation System de Promega acuerdo con las instrucciones del fabricante:

V_H : vector: Inserto Rld hCγ1wt digerido con Hind III-Spe I: Fragmento de PCR de V_H digerido con HindIII-Spe I

V_L : vector: Inserto Rln hock digerido con Hind III-BsiW I: Fragmento de PCR de V_L digerido con Hind III-BsiW I

4.2.4 Transformación

Los productos ligados se transformaron en células DH5α competentes:

- 20 Viales de 200 µl de DH5α se descongelaron en hielo.
- Se prepararon alícuotas de 50 µl en tubos de transformación
2. Se añadieron 2 µl de la mezcla de unión y se mezclaron suavemente con una punta de pipeta, seguido de incubación durante 30 minutos en hielo.
- La mezcla se incubó durante 45 segundos a 42°C sin agitación.
- 25 Después, se transfirió a hielo durante 2 minutos. . Se añadieron 450 µl de medio SOC y los tubos se incubaron durante 1 hora a 37 °C en incubador con agitación.
- 100 µl del cultivo se extendieron en placas de L-agar suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron durante la noche a 37 °C.

4.2.5 Secuenciación

- 30 Los clones de V_H y V_L se cultivaron durante la noche a 37 °C en 5 ml de medio LB suplementado con 100 /ml de ampicilina.
- Los plásmidos Rld y Rln que contenían los dominios V_H y V_L respectivamente se extrajeron y purificaron usando el kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen de acuerdo con las isnrucciones del fabricante.
- 35 La refión V_H se secuenció usando cebadores directos en el vector Rld y la secuencia señal y el cebador inverso en la región Cγ1 humana.

La región V_L se secuenció usando cebadores directos en el vector Rln y la secuencia señal y el cebador inverso en la región C κ humana.

Los clones con las correctas secuencias de V_H y V_L se identificaron y se prepararon los plásmidos para la expresión en células CHO.

5 **4.3 Expresión de anticuerpo quimérico en células CHO**

Los plásmidos Rld y Rln que contenían los dominios V_H y V_L de 15E10, respectivamente, se co-transfeccionaron transitoriamente en células CHO y se expresaron. El anticuerpo quimérico producido se purificó del sobrenadante del cultivo celular mediante cromatografía pro afinidad en expreso en rProtein A Sepharose y se evaluó su afinidad por OSM en el ensayo ELISA de inhibición de gp130 y el ensayo de células KB (véase más adelante).

10 **4.3.1 Purificación del plásmido**

Las células DH5 α que contenían los plásmidos Rld-15E10 V_H y Rln-15E10 V_L se cultivaron en 5 ml de medio LB suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina durante 8 horas a 37 °C en un incubador con agitación.

En 200 ml de medio LB suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina se inoculó 1 ml del cultivo de día y se incubó durante la noche a 37 °C en un incubador con agitación.

15 Los plásmidos se extrajeron y purificaron usando el kit QIAfilter Plasmid Maxi de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El sedimento en etanol se resuspendió en 200 μ l de tampón TE y la concentración del plásmido se midió mediante la absorbancia a 260 nm tras una dilución 100 de la solución madre.

4.3.2 Transfección

20 Células CHO se cultivaron hasta la confluencia en MEM de Dulbecco con medio Glutamax-1 (DMEM) suplementado con suero bovino fetal ultrabajo y 1% de penicilina-estreptomycin en matraces de cultivo tisular de tipo BD Falcon de 4 x 175 cm² a 37 °C.

Para cada matraz, en un tubo Falcon de 50 ml, se añadieron y mezclaron los siguientes:

8 ml de Optimem 1 con Glutamax-1

20 μ g de Rld-15E10 V_H plásmido purificado

25 20. 20 μ g de Rln-15E10 V_L plásmido purificado

240. 240 μ l de reactivo de transfección TransFast en vórtex

La mezcla se incubó durante 10-15 minutos a temperatura ambiente (TA). El medio DMEM se eliminó del matraz, después la mezcla se agitó en vórtex y se añadió al matraz.

30 La mezcla se incubó a 37 °C durante 1 hora. Al matraz se añadieron 32 ml de Optimem y se incubó a 37 °C durante 48-72 horas.

4.3.3 Purificación del anticuerpo quimérico

Los medios de todos los matraces de 175 cm² se combinaron y centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos en un MSE Mistral 2000 y el sobrenadante se pasó a través de un sistema de filtros de 500 ml de 0,22 μ k CA.

35 El anticuerpo se purificó del sobrenadante aclarado en un Amersham Biosciences Akta Explorer usando el software Unicorn.

La columna usada fue una HiTrap rProtein A Sepharose FF de 1 ml.

El caudal fue de 1 ml/min.

La columna se equilibró con 10VC de PBS de Dulbecco, después se cargó con el sobrenadante aclarado mediante la bomba A.

40 La columna se lavó con 20 VC de PBS de Dulbecco, la bomba A se lavó para eliminar los residuos y otros 10VC de PBS de Dulbecco se pasaron a través de la columna para asegurar el completo aclaramiento del sobrenadante.

El anticuerpo se eluyó con 10 VC de tampón de elución ImmunoPure IgG (Pierce) y se recogió en fracciones de 1 ml que contenían 100 μ l de tampón de neutralización Trizma-HCl 1M a pH 8,0. La columna se reequilibró con 5VC de PBS de Dulbecco.

El anticuerpo en las fracciones del eluato se cuantificó leyendo la absorbancia a 280 nm frente a una solución blanco que contenía 10 volúmenes de tampón de elución ImmunoPure IgG Elution Buffer + 1 volumen de Trizma-HCl 1M a pH 8,0 y las fracciones con cantidades suficientes de anticuerpo puro se combinaron y almacenaron en alícuotas de 100 µl a -20 °C.

5 **4.4 Análisis del anticuerpo quimérico**

Los anticuerpos quiméricos 15E10 y 10D3 purificados (véase más adelante) se analizaron en el ELISA de inhibición de gp130 y el ensayo de células KB para determinar la potencia en la neutralización de OSM tanto humana como de monos cinomolgos (hOSM y Cosm). Los protocolos para el ELISA de inhibición de gp130 y el ensayo de células KB se indican más adelante.

10 **Tabla 1: Valores de CI50 (µg/ml) para los anticuerpos 15E10 y 10D3 murinos y quiméricos**

	ELISA de gp130	Ensayo de células KB
15E10 murino	0,059	0,195
15E10 quimérico	0,036	0,11
10D3 murino	0,107	0,114
10D3 quimérico	0,057	0,107

Los anticuerpos quiméricos 15E10 and 10D3 neutralizan la hOSM y la cOSM en el ELISA de inhibición de gp130 (Fig.2 y el ensayo de células KB (Fig. 3). El anticuerpo quimérico 15E10 tiene una afinidad mayor por la OSM de monos cinomolgos que el anticuerpo quimérico 10D3, observado con el anticuerpo murino parental. Ambos anticuerpos quiméricos tienen perfiles de la curva y valores de CI50 similares a los de los anticuerpos murinos parentales (Tabla 1). La secuencia de aminoácidos y una secuencia de ADNc para la OSM de macaco (cOSM) se indica como SEC ID N° 63 Y 64, respectivamente;

SEC ID N° 63:

MGVPLTRRTLLSLILALLFPSMASMAAMGSCSKEYRMLLGQLQKQTDLMQDTSR
 LLDPIYIRIQGLDIPKLREHCRESFGAFPSEETLRGLGRRGFLQTLNATLGCVLH
 RLADLEQHLPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMARPNVLGLRNNVYCMAQLLDNSDM
 TEPTKAGRGTPQPPTPTPTSDVFQKLEGCSFLRGYHFRFMHSVGRIFFSKWGESP
 NRSRRHSPHQALRKGVRRTRPSRKGNRLMPRGQLPR

SEC ID N° 64:

ATGGGGGTACCGCTCACACGGAGGACGCTGCTCAGTCTGATCCTTGCACTCCTG
 TTTCCAAGCATGGCAAGCATGGCGGCTATGGGCAGCTGCTCGAAAGAGTACCGC
 ATGCTCCTTGGCCAGCTCCAGAAGCAGACAGATCTCATGCAGGACACCAGCAGG
 CTCCTGGACCCCTATATACGTATCCAAGGCCTGGATATTCTTAAACTGAGAGAG
 CACTGCAGAGAGAGCCCTGGGGCCTTCCCCAGCGAGGAGACCCTGAGGGGGCTG
 GGCAGGCGGGGCTTCCTACAGACGCTCAATGCCACACTGGGCTGCGTCCTGCAC
 AGACTGGCCGACTTAGAGCAGCATCTCCCAAGGCCAGGACTTGGAGAGGTCT
 GGGCTGAACATAGAGGACTTAGAGAAGCTGCAGATGGCGAGGCCGAATGTCCTC
 GGGCTCAGGAACAACGTCTACTGCATGGCCCAGCTGCTGGACAACCTCAGACATG
 ACTGAGCCCAACGAAGGCCGGCCGGGGACCCCTCAGCCGCCACCCCCACCCCT
 ACCTCAGATGTTTTTTCAGCGCAAGCTGGAGGGCTGCAGTTTCTGCGTGGCTAC
 CATCGCTTCATGCACTCAGTGGGGCGGATCTTCAGCAAGTGGGGGGAGAGCCCG
 AACCGGAGCCGGAGACACAGCCCCCACCAGGCCCTGCGGAAGGGGGTGCAGG
 ACCGAGACCCTCCAGGAAAGGCAATAGACTCATGCCAGGGGACAGCTGCCCCGG
 TAG

Estos resultados confirman que las regiones variables de 15E10 correctas se han clonado con éxito para producir un anticuerpo quimérico de unión a antígeno capaz de unirse al sitio II de la OSM tanto humana como de monos cinomolgos.

- 5 A continuación se pueden humanizar los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de 15E10.

5.1.1 Búsqueda de la base de datos de ratón

Buscando en una base de datos de péptidos se identificaron 15 secuencias de ratón con la homología más alta para la secuencia de aminoácidos de V_H de 15E10 y 10 secuencias de ratón con la homología más alta para la secuencia de aminoácidos de V_L.

- 10 La secuencia de aminoácidos de V_H de 15E10 se comparó con las 15 secuencias de ratón de la búsqueda de la base de datos y los siguientes residuos estructurales se identificaron como significativos:

Posición	V _H de 15E10	de ratón	aparición
75	R	K	15/15
105	T	Q	14/15

- 15 La posición sigue el sistema de numeración de Kabat y col., ant. La secuencia de aminoácidos de V_L de 15E10 se comparó con las 10 secuencias de ratón de la búsqueda de la base de datos y los siguientes residuos estructurales se identificaron como significativos:

Posición	V _L de 15E10	de ratón	aparición
9	T	A	8/10
38	E	Q	10/10
49	E	Y	10/10
60	A	V	10/10

5.1.2. Búsqueda de la base de datos humana

Las secuencias estructurales humanas con la homología más elevada con las estructuras de V_H y V_L de 15E10 se identificaron usando EasyBlast en una base de datos de péptidos.

- 5 Para la V_H de 15E10 se identificaron dos grupos de secuencias humanas:

El Grupo A, del que se seleccionó la siguiente estructura para humanización:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYY
GSTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSPSSGSYYYY
YGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ.I.D.NO:26)

- 10 Las CDR están subrayadas

y

El Grupo B, del que se seleccionó la siguiente estructura para humanización:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVIWYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDLGGPLYWYF
DLWGRGTLVTVSS (SEQ.I.D.NO:27)

- 15

Las CDR están subrayadas

Los siguientes residuos estructurales se identificaron como potencialmente importantes en la recuperación de la afinidad y pueden necesitar retromutaciones.

Posición (nº de Kabat)	V _H de 15E10	Grupo A	Grupo B
27	F	G	F
28	S	S	T
29	L	I	F
30	T	S	S

Posición (nº de Kabat)	V _H de 15E10	Grupo A	Grupo B
48	L	I	V
49	G	G	A
67	L	V	F
71	K	V	R
73	N	T	N
78	V	F	L
94	K	R	R

Se diseñaron 8 construcciones de V_H humanizadas con diferentes retromutaciones, 4 basadas en las estructuras humanas del grupo A (A1, A2, A3 y A4) y 4 basadas en las estructuras humanas del grupo B (B1, B2, B3 y B4).

- 5 Se identificó un grupo de secuencias humanas para V_L de 15E10 de las cuales se seleccionó la siguiente para humanización:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSKYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNR
ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISNLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKLEI
 (SEQ.I.D.NO:28)

Las CDR están subrayadas

- 10 Los siguientes residuos se identificaron como potencialmente importantes en la recuperación de la afinidad y pueden necesitar retromutaciones.

Posición (nº de Kabat)	V _L de 15E10	V _L humana
49	E	Y
71	Y	F

Se diseñaron dos construcciones, una como injerto lineal (L1) y otra con retromutaciones en ambos residuos (L2).

- 15 **Construcción de V_H humanizada A1:**

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRG
GSTDYNAAFMSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
VWGQGTTS (SEQ.I.D.NO:30)

Construcción de V_H humanizada A2:

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRG
GSTDYNAAFMSRVTISVDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
VWGQGTTS (SEQ.I.D.NO:29)

Construcción de V_H humanizada A3:

5

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRG
GSTDYNAAFMSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
VWGQGTTS (SEQ.I.D.NO:31)

Construcción de V_H humanizada A4:

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIWRG
GSTDYNAAFMSRSLTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
VWGQGTTS (SEQ.I.D.NO:32)

10 **Construcción de V_H humanizada B1:**

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRG
GSTDYNAAFMSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSPNSNFYWFYFD
VWGRGTLV (SEQ.I.D.NO:33)

Construcción de V_H humanizada B2:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRG
GSTDYNAAFMSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
VWGRGTLV (SEQ.I.D.NO:34)

15

Construcción de V_H humanizada B3:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRG
GSTDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
VWGRGTLV (SEQ.I.D.NO:35)

Construcción de V_H humanizada B4:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRG
 GSTDYNAAFMSRLTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
 VWGRGTLV (SEQ.I.D.NO:36)

Construcción de V_L humanizada L1:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIYDTSNLA
 SGIPARFSGSGSGTDFTLTISNLEPEDFAVYYCQQWSSYPPTFGQGTKLEIK
 (SEQ.I.D.NO:37)

Construcción de V_L humanizada L2:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIEDTSNLA
 SGIPARFSGSGSGTDYTLTISNLEPEDFAVYYCQQWSSYPPTFGQGTKLEIK
 (SEQ.I.D.NO:38)

5

5.2 Humanización de 15E10

Las construcciones de V_H y V_L humanizadas se prepararon mediante la formación *de novo* de oligonucleótidos solapantes que incluyen sitios de restricción para la clonación en los vectores de expresión de mamíferos Rld y Rln, así como una secuencia señal humana. Se introdujeron los sitios de restricción Hind III y Spe I para enmarcar el dominio V_H que contiene la secuencia señal para la clonación el vector red que contiene la región constante silvestre γ 1 humana. Se introdujeron los sitios de restricción Hind III y BsiW I para enmarcar el dominio V_L que contiene la secuencia señal para la clonación el vector Rln que contiene la región constante kappa humana.

Secuencia señal humana: MGWSCILFLVATATGVHS (SEC ID N° 39). Se diseñaron ocho construcciones de V_H humanizadas y dos construcciones de V_L humanizadas. Esto daría como resultado 16 combinaciones diferentes de cadenas. Dado que la formación oligo de regiones variables requiere tiempo, se decidió inicialmente preparar únicamente las construcciones con menos y con más retromutaciones para el dominio V_H (A1, A4, B1 and B4) y producir anticuerpos humanizados en combinación con las dos construcciones de V_L humanizadas. Para la formación se diseñaron 10 oligonucleótidos de 60 bases de longitud con un mínimo de 18 bases solapantes.

5.2.1 Formación de oligonucleótidos

Se prepararon soluciones agrupadas de oligonucleótidos a partir de 5 μ l de cada solución madre de oligo a 100 μ M. La síntesis de los genes de V_H y V_L humanizados mediante formación de oligonucleótidos solapantes se llevó a cabo, en general, de acuerdo con Stemmer WP y col. (1995) Gene 164(1):49-53 usando el software descrito en Ertl PF y col. (2003) Methods 31:199-206.

5.2.1.1 Ensamblaje de la reacción de PCR

Agua	41,5 μ l
10 x tampón de PCR ProofStart	5 μ l
dNTP (10mM)	1,5 μ l
Grupo de oligo	1 μ l
ADN Polimerasa ProofStart	1 μ l
Volumen total	50 μ l

25

Ensamblaje del ciclo de
PCR:

- 1 - 94°C durante 2 minutos
- 2 - 94°C durante 30 segundos
- 3 - 40°C durante 2 minutos
- 4 - 72°C durante 10 segundos
- 5 - 94°C durante 15 segundos
- 6 - 40°C durante 30 segundos
- 7 - 72°C durante 20 segundos
+ 3 segundos/ciclo

Las etapas 4 a 7 se repitieron 25 veces

5.2.1.2 PCR de recuperación

Los cebadores 1 y 2 fueron los primeros oligonucleótidos superior e inferior usados en la PCR de ensamblaje- La PCR de recuperación permite la amplificación de todo el gen V.

5 Reacción de PCR de recuperación:

Agua	42 µl
10 x tampón de PCR ProofStart	4 µl
dNTP (10mM)	1,5 µl
cebador 1 (100 µM)	0,5 µl
cebador 2 (100 µM)	0,5 µl
Reacción de PCR de ensamblaje	1 µl
ADN Polimerasa ProofStart	0,5 µl
Volumen total	50 µl

	Cebador 1	Cebador 2
15E10-A1/A4	15E10-A4-U1	15E10-A4-L1
15E10-B1	15E10-B1-U1	15E10-B1-L1
15E10-B4	15E10-B1-U1	15E10-B4-L1
15E10-L1/L2	15E10-L1-U1	15E10-L1-L1

Ciclo de PCR de recuperación:	1 - 94°C durante 2 minutos
	2 - 94°C durante 45 segundos
	3 - 60°C durante 30 segundos
	4 - 72°C durante 2 minutos
	5 - 72°C durante 4 minutos

Las etapas 2 a 4 se repitieron 25 veces

Los productos de PCR de recuperación se purificaron usando el kit de purificación MinElute PCR Purification de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.2.2 Digestos de restricción

- 5 Las construcciones de V_H de 15E10 humanizadas A1, A4, B1 se digirieron con Hind III-Spe I y dos V_L de 15E10 humanizadas se digirieron con Hind-III-BsiW I tal como se ha descrito en 4.2.1.

5.2.3 Purificación en gel

Los productos de los digestos de restricción se purificaron como en 4.2.2.

5.2.4 Unión

- 10 Los fragmentos de V_H de 15E10 humanizados digeridos con Hind III-Spe I se ligaron en el vector Rld hC_γ1wt digerido con Hind III-Spe I.

El fragmento de V_L de 15E10 digerido con Hind III-BsiW I se ligó en el vector RlnhC_κ digerido con Hind III-BsiW I.

La unión se llevó a cabo usando el LigaFast Rapid DNA Ligation System de Promega acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 15 **5.2.5 Transformación**

Como en 4.2.5.

5.2.6 Secuenciación

Las colonias de cada placa de reacción se cultivaron durante la noche a 37 °C en 5 ml de medio LB suplementado con 100 /ml de ampicilina.

- 20 Los plásmidos se extrajeron y purificaron usando el kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se secuenciaron usando los cebadores descritos en 4.2.5.

Los clones con las correctas secuencias de V_H y V_L humanizadas se identificaron y se prepararon los plásmidos para la expresión en células CHO.

6. Expresión de los anticuerpos humanizados en células CHO

- 25 Se prepararon cuatro construcciones humanizadas de V_H (A1, A4, B1 y B4) y dos construcciones humanizadas de V_L (L1 y L2) en vectores de expresión en mamíferos Rld hC_γ1wt y RlnhC_κ. Ocho combinaciones de cadena ligera-cadena pesada de plásmidos (A1L1, A1L2, A4L2, B1L2, B4L1 y B4L2) se cotransfeccionaron transitoriamente en células CHO y se expresaron a pequeña escala, para dar 8 anticuerpos humanizados diferentes. Los anticuerpos producidos en el sobrenadante se analizaron en el ELISA de inhibición de gp130 (más adelante).

6.1 Purificación del plásmido

Las células DH5 α que contenían uno de los plásmidos de la sección 6 se cultivaron en 5 ml de medio LB suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina durante 8 horas a 37 °C en un incubador con agitación.

En 200 ml de medio LB suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina se inoculó 1 ml del cultivo de día y se incubó durante la noche a 37 °C en un incubador con agitación.

- 5 Los plásmidos se extrajeron y purificaron usando el kit QIAfilter Plasmid Maxi de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El sedimento en etanol se resuspendió en 200 μ l de tampón TE y la concentración del plásmido se midió mediante la absorbancia a 260 nm tras una dilución 100 de la solución madre.

6.2 Transfección

- 10 9 pocillos de placas de 6 pocillos Corning Costar 3506 se sembraron con 10⁶ células CHO y se cultivaron durante la noche en MEM de Dulbecco con medio Glutamax-1 (DMEM) suplementado con suero bovino fetal ultrabajo y 1% de penicilina-estreptomina a 37 °C.

Para cada pocillo se añadieron los siguientes en un Bijou de 5 ml:

- 1ml de Optimem 1 con Glutamax-1
5 μ g de plásmido portador del V_H humanizado
15 5 μ g de plásmido portador del V_L humanizado
30 μ l de reactivo de transfección TransFast en vórtex

de modo que cada transfección contenía una combinación diferente de cadenas ligeras y pesadas. La incubación tuvo lugar durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. El medio DMEM se eliminó de los pocillos, después la mezcla se agitó en vórtex y se añadió al pocillo adecuado.

- 20 La incubación tuvo lugar a 37 °C durante 1 hora.

Se añadieron 2 ml de Optimem por pocillo y se incubaron a 37 °C durante 48-72 horas.

6.3 Análisis de los anticuerpos humanizados

- 25 Los medios de cada pocillo se recuperaron y centrifugaron a 13000 rpm durante 1 minuto en una centrífuga de mesa Eppendorf 5415R y el sobrenadante se paso a través de un filtro de jeringa de 0,2 μ g Pall Acrodisc 25mm. 8 anticuerpos humanizados (4 basados en los marcos conservados humanos del grupo A, 4 basados en los marcos conservados humanos del grupo B) y los anticuerpos quiméricos 15E10 se analizaron en el ELISA de inhibición de gp130 según su potencia en la neutralización de hOSM y cOSM (véase la figura 4).

Tabla 2: Valores de CI50 para anticuerpos humanizados B1L1, B1L2, B4L1 y B4L2 en el ELISA de inhibición de gp130

30

	OSM humana	OSM de marco
B1L1	NA	NA
B1 L2	0,334	0,110
B4L1	NA	0,167
B4L2	0,048	0,040
15E10 quimérico	0,070	0,060
Los valores de CI50 se expresan en μ g/ml		
NA: La inhibición es inferior al 50%		

El nivel de retromutaciones en los anticuerpos humanizados expresados tenía un efecto directo sobre la afinidad por

OSM humana y de cinomolgos en el ELISA de inhibición de gp130. El anticuerpo con menos retromutaciones (B1L1) no tenía una afinidad detectable por la OSM de cinomolgos y justo por encima de la inicial por la OSM humana. Por otro lado, el anticuerpo con más retromutaciones (B4L2) tenía una afinidad por la OSM humana y de cinomolgos al menos equivalente a la del anticuerpo 15E10 quimérico. Los 2 anticuerpos humanizados que contienen la cadena ligera retromutada tenían mayor afinidad que los 2 anticuerpos humanizados que contienen la cadena ligera injertada lineal.

Ninguno de los cuatro anticuerpos humanizados basados en las estructuras del grupo A humano dio una señal inhibidora en el ensayo ELISA de gp130- De hecho, ninguno de estos anticuerpos se pudo detectar en un ELISA para el anticuerpo IgG1 humano completo (en el que el anticuerpo de captura es uno policlonal producido contra cadenas pesadas γ humanas en cabras y el anticuerpo de detección es uno policlonal producido contra cadenas ligeras κ humanas en cabras

Análisis adicionales del sobrenadante que contiene estos cuatro anticuerpos en los ELISA específicos de la cadena pesada y la cadena ligera de IgG humana fueron una señal positiva en ambos ensayos. Ambos ELISA usaron un anticuerpo de captura producido contra las cadenas pesada y ligera de IgG humana en cabras, mientras que el anticuerpo de detección se produjo contra la cadena γ de IgG humana para el ELISA específico de la cadena pesada y contra la cadena κ de IgG humana en el ELISA específico de la cadena ligera.

Estos resultados sugieren que los anticuerpos humanizados en los que la cadena pesada estaba diseñada a partir de las estructuras humanas del grupo A expresan tanto la cadena pesada como la ligera, pero las dos cadenas no se combinan para producir un anticuerpo viable.

Se demostró que la construcción de V_H con más retromutaciones en base a las estructuras del grupo B humanas (B4) en combinación con la cadena ligera con retromutaciones (L2) era el anticuerpo humanizado más potente. Se produjeron tres anticuerpos humanizados que comprenden V_H del grupo B (B2L2, B3L2 y B4L2), se purificaron y se analizaron para determinar el anticuerpo humanizado más adecuado para la selección del candidato.

6.4: Preparación de construcciones de V_H humanizadas de 6.3

Se prepararon dos construcciones humanizadas B2 y B3 como en 5.2.1 a 5.2.6.

6.5 Expresión de los anticuerpos humanizados en células CHO

Tres plásmidos que contienen V_H humanizada (B2, B3 y B4) en combinación con el plásmido que contiene V_L humanizada con más retromutaciones (L2) de la sección 6 se cotransfeccionaron de forma transitoria en células CHO y se expresaron. Los 3 anticuerpos humanizados producidos se purificaron del sobrenadante del cultivo celular mediante cromatografía pro afinidad en expresó en rProtein A Sepharose y se evaluó su afinidad por OSM en el ensayo ELISA de inhibición de gp130 y el ensayo de células KB (véase más adelante).

La purificación del plásmido se llevó a cabo como en 4.3.1. La transfección se llevó a cabo como en 4.3.2. La purificación de los anticuerpos humanizados se llevó a cabo como en 4.3.3.

6.6 Análisis de los anticuerpos humanizados de la sección 6.5

Los anticuerpos humanizados de la sección 6.5 se analizaron en el ELISA de inhibición de gp130 y el ensayo de células KB (véase más adelante) para determinar la potencia en la neutralización de OSM tanto. Los ensayos se realizaron con OSM humana de varias fuentes, incluyendo la producida en CHO, producida en CHO + 25 % de suero AB humano, neutrófilos y líquido sinovial de pacientes de AR.

ELISA de inhibición de gp130: Los datos de los experimentos se ilustran en las Fig. 5 a 10.

Ensayo de células KB: Los datos de los experimentos se ilustran en las Fig. 11 a 16. Estos resultados muestran que los anticuerpos humanizados (B3L2 y B4L2) tienen una potencia equivalente al anticuerpo quimérico 15E10 pero superior a la del anticuerpo humanizado B2L2. Esto indica que la estrategia de humanización, especialmente la elección de retromutaciones tuvo como resultado la recuperación completa de la afinidad por el antígeno.

La secuencia de aminoácidos de la cadena V_H de B4 es

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRG

GSTDYNAAFMSRLTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD

VWGRGTLVTVSS

(SEQ.I.D.NO: 21)

5 y la cadena V_L es la SEC ID N° 12.

Un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una cadena V_H de la SEC ID N° 21 y una cadena V_L de la SEC ID N° 12 se puede considerar un anticuerpo competitivo de la invención y, por tanto, forma una realización de la invención.

6.7 Comparación del anticuerpo humanizado B3L2 con anticuerpos murinos quiméricos y parentales

10 El anticuerpo humanizado B3L2 se comparó con los anticuerpos murinos quiméricos y parentales 15E10 en el ELISA de inhibición de gp130 y el ensayo de células KB (véase más adelante) usando OSM humana y de macacos como antígeno diana.

15 Se diseñó un anticuerpo B3L2 humanizado portador de 2 mutaciones puntuales en la cadena pesada constante (Ala sustituye a Leu en la posición 235 y Gly en la posición 237), se expresó en células CHO y se purificó. Las mutaciones reducen la capacidad del anticuerpo para unir funciones efectoras, especialmente el reclutamiento de factores del complemento. El anticuerpo humanizado candidato B3L2 con cadenas pesadas intactas se denomina B3L2 wt (silvestre), mientras que el anticuerpo B3L2 se denomina B3L2 mut en las figuras 17 a 19.

Tabla 4: Valores de CI50 para B3L2 humanizado silvestre comparados con los anticuerpos quiméricos y murinos parentales en el ELISA de inhibición de gp130 y ensayo de células KB

20

	ELISA de gp130	Ensayo de células KB
15E10 murino	0,009	0,053
15E10 quimérico	0,019	0,079
B3L2 wt	0,035	0,123

Los valores de CI50 se expresan en µg/ml

Estos resultados confirman que el anticuerpo B3L2 humanizado tiene una potencia equivalente a la del anticuerpo 15E10 murino parental.

25 La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de B3L2 humanizada se indica en la SEC ID N° 11 y la cadena ligera de B3L2 humanizada se indica en la SEC ID N° 12.

Ejemplo 7- Anticuerpo 10D3

7.1. Generación de anticuerpos monoclonales

Se generó el hibridoma 10D3 como se detalla en el ejemplo 1 anterior.

7.2. CLONACIÓN DE LAS REGIONES VARIABLES DEL CLON 15D3

30

Se extrajo el ARN total de las células de hibridoma 10D3 y el ADNc de los dominios variables de las cadenas pesad

y ligera se produjo mediante transcripción inversa usando cebadores específicos de la secuencia líder murina y las regiones constantes del anticuerpo de acuerdo con el isotipo previamente determinado (IgG1/ κ). El ADNc de los dominios de las cadenas pesada y ligera se clonó después en un vector para pCR2.1 su secuenciación.

7.2.1 Extracción de ARN

- 5 El ARN total se extrajo de los sedimentos de 10^6 células del clon de hibridoma 10D3 usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

7.2.2 Transcripción inversa

- 10 El ARN se sometió a transcripción inversa para producir ADNc de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera usando cebadores específicos de las secuencias líder murina y las regiones constantes del anticuerpo IgG2a/ κ . La mezcla de cebadores usada se indica en Jones ST and Bendig MM Bio/technology 9:88-89 (1991)

Las combinaciones de cebadores directos de la secuencia líder de V_H y V_L se prepararon a 50 μ M. Las soluciones de los cebadores inversos de la región constante $\gamma 2a$ y κ también se prepararon a 50 μ M.

7.2.3 Transcripción inversa PCR (RT-PCR)

- 15 La transcripción inversa del ARN que codifica las regiones variables pesadas y ligeras se llevó a cabo por duplicado usando el sistema Access RT-PCR System de Promega de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores directos e inversos para V_H y V_L fueron como se ha descrito anteriormente.

7.3. Clonación del producto de PCR de 7.2.3

7.3.1 Purificación en gel

- 20 Los productos de la RT-PCR ($2 \times V_H$ y $2 \times V_L$) se cargaron en solución de carga de gel en un gel de agarosa al 1 % preparativa que contiene 0,01 % de bromuro de etidio y se pasó en un tampón TAE a 100 V durante 1 hora y se escindieron las bandas de la región V. También se pasó por el gel un marcador de ADN de 100 pb para permitir la identificación de las bandas V_H y V_L .

Los fragmentos de ADN se extrajeron y purificaron del gel usando el kit de extracción QIAquick TMGel de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

7.3.2 Unión

Los fragmentos de la RT-PCR purificados ($2 \times V_H$ y $2 \times V_L$) se clonaron en el vector pCR2.1 usando el kit de clonación TA de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

7.3.3 Transformación

- 30 Los plásmidos ligados se transformaron en células TOP10F' de acuerdo con las instrucciones del kit de clonación de TA. 50 μ l y 200 μ l de células transformadas se extendieron en placas de L-agar que contenían 100 μ g/ml de ampicilina y se revistieron con 8 μ l de solución de IPTG 500 mM y 16 μ l de una solución de x-Gal de 50 mg/ml en DMF. Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C.

7.3.4 Secuenciación

- 35 5 colonias blancas se cultivaron durante la noche a 37 °C en 5 ml de medio LB suplementado con 100 /ml de ampicilina.

Los plásmidos pCR2.1 que contenían los dominios V_H y V_L de 10D3 se extrajeron y purificaron usando el kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los dominios V_H y V_L se secuenciaron usando los cebadores T7, M13 para y M13 rev.

- 40 La secuencia de aminoácidos del dominio V_H de 10D3 (consenso de 10 clones de 2 reacciones de RT-PCR): SEC ID N° 46

La secuencia de aminoácidos del dominio V_L de 10D3 (consenso de 10 clones de 2 reacciones de RT-PCR): SEC ID N° 47

7.4. Anticuerpo quimérico

Se diseñó un anticuerpo quimérico compuesto por las regiones V murinas parentales de 7.3.4 injertados sobre las

regiones C silvestres de IgG1/k para confirmar la clonación de las regiones V murinas correctas y también para usar como referencia a la hora de analizar las construcciones humanizadas. El anticuerpo quimérico se expresó en células CHO, se purificó y se analizó la afinidad por el Sitio II de la OSM en el ensato ELISA de inhibición de gp130 y el ensayo de células KB.

- 5 Las regiones variables murinas clonadas se amplificaron mediante OCR para introducir sitios de restricción requeridos para clonar en vectores de expresión de mamífero Rld y Rln. Se diseñaron sitios para Hind III y Spe I para enmarcar el dominio V_H y permitir la clonación en un vector Rld modificado que contiene la región constante humana $\gamma 1$ natural. Se diseñaron los sitios para HindIII y BsiW I para enmarcar el dominio V_L y permitir la clonación en un vector Rin modificado que contiene la región constante κ humana.

10 **7.4.1 Amplificación por PCR**

Cebador directo para V_H :

El sitio de restricción Hind III está subrayado y la secuencia Kozak en negrita. Cebador directo para V_H : 5'-GAT GAA GCT TGC CAC

CAT GGG ATG GAG CTG GGT CTT T-3' (SEC ID N° 58)

- 15 Cebador inverso para V_H : 5'-GAT GGA CTA GTG TGC CTT GGC CCC AAT A-3' (SEC ID N° 65)

El sitio de restricción Spe I está subrayado.

Cebador directo para V_L :

Cebador directo para V_L : 5'-GAT GAA GCT TGC CAC CAT GGA TTT ACA GGT GCA GAT T-3' (SEC ID N° 59)

El sitio de restricción Hind III está subrayado y la secuencia Kozak en negrita.

- 20 Cebador inverso para V_L : 5'-GAT GCG TAC GTT TCA GCT CCA GCT TGG TCC C-3' (SEC ID N° 60)

El sitio de restricción BsiW I está subrayado

Reacción de PCR		
Agua		66 μ l
10 x tampón de PCR		10 μ l
dNTP (2mM)		10 μ l
Cebador 1 (5 μ M)		4 μ l
Cebador 2 (5 μ M)		4 μ l
AmpliTaQ polimerasa		2 μ l
Plásmido purificado		4 μ l
Volumen total		100 μ l

Cebador 1: Cebador directo para V_H o V_L

Cebador 2: Cebador inverso para V_H o V_L

- 25 Plásmido purificado: Plásmido pCR2.1 V_H o V_L oral purificado mediante Qiagen Minipreps (diluido 200x)

Ciclo de PCR:	1 - 95°C durante 4 minutos
	2 - 95°C durante 1 minuto
	3 - 55°C durante 1 minuto
	5 - 72°C durante 7 minutos

etapas 2 a 4: se repitieron 30 veces **7.4.2 Clonación en vectores de expresión de mamífero**

Los productos de PCR se purificaron usando el kit de purificación MinElute PCR Purification de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 **7.4.2.1 Digestos de restricción**

El producto de la PCR de la V_H y el vector de expresión de mamífero Rld hC_γ1wt se digirieron con Hind III-Spe I:

10x Tampón (NEBuffer2)	5 µl
BSA 100x (NEB)	0,5 µl
ADN	5 µl
Hind III (Promega)	2 µl
Spe I (NEB)	2 µl
Agua	35,5 µl
Volumen total	50 µl

ADN: purificado del producto de la PCR de V_H o vector Rld hC_γ1wt (a 0,25 mg/ml) Incubado a 2 horas a 37 °C.

El producto de la PCR de la V_L y el vector de expresión de mamífero Rln hC_κ se digirieron con Hind III-BsiW I:

10

10x Tampón (NEBuffer2)	5 µl
ADN	5 µl
Hind III (Promega)	2 µl
Agua	38 µl
Volumen total	50 µl

ADN: purificado del producto de la PCR de V_L o vector Rld hC_γ1wt (a 0,25 mg/ml) Incubado a 2 horas a 37 °C.

Se añadieron 2 µl de BsiW I (NEB) y se incubaron 2 horas a 55°C.

7.4.2.2 Purificación en gel

Los productos de la digestión con enzimas de restricción se cargaron en solución de carga de gel en un gel de agarosa al 1 % preparativa que contiene 0,01 % de bromuro de etidio y se pasó en un tampón TAE a 100 V durante 1 hora y se escindieron el vector RId y RIn así como las bandas del fragmento de la PCR de V_H y V_L. También se pasó por el gel un marcador de ADN de 100 pb para permitir la identificación de las bandas V_H y V_L y del vector.

- 5 El ADN se extrajo y purificó del gel usando el kit de extracción QIAquick TMGel de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

7.4.2.3 Unión

El fragmento de la PCR de V_H digerido con Hind III-Spe I se ligó en el vector RId hC_γ1wt digerido con Hind III-Spe I.

El fragmento de la PCR de V_L digerido con Hind III-BsiW I se ligó en el vector RId hC_κ digerido con Hind III-BsiW I.

- 10 La unión se llevó a cabo usando el LigaFast Rapid DNA Ligation System de Promega acuerdo con las instrucciones del fabricante:

V_H: vector: Inserto RId hC_γwt digerido con Hind III-Spe I: Fragmento de PCR de V_H digerido con HindIII-Spe I

V_L: vector: Inserto RIn hC_κ digerido con Hind III-BsiW I: Fragmento de PCR de V_L digerido con Hind III-BsiW I

7.4.2.4 Transformación

- 15 Los productos ligados se transformaron en células DH5 α competentes: Viales de 200 μ l de DH5 α se descongelaron en hielo. Se prepararon alícuotas de 50 μ l en tubos de transformación. Se añadieron 2 μ l de la mezcla de unión y se mezclaron suavemente con una punta de pipeta, seguido de incubación durante 30 minutos en hielo.

La mezcla se incubó durante 45 segundos a 42°C sin agitación.

Después, se transfirió a hielo durante 2 minutos.

- 20 Se añadieron 450 μ l de medio SOC y los tubos se incubaron durante 1 hora a 37 °C en incubador con agitación.
100 μ l del cultivo se extendieron en placas de L-agar suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina y se incubaron durante la noche a 37 °C.

7.4.2.5 Secuenciación

- 25 Los clones de V_H y V_L se cultivaron durante la noche a 37 °C en 5 ml de medio LB suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina.

Los plásmidos RId y RIn que contenían los dominios V_H y V_L respectivamente se extrajeron y purificaron usando el kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La región V_H se secuenció usando cebadores directos en el vector RId y la secuencia señal y el cebador inverso en la región C_γ1 humana.

- 30 La región V_L se secuenció usando cebadores directos en el vector RIn y la secuencia señal y el cebador inverso en la región C_κ humana.

Los clones con las correctas secuencias de V_H y V_L se identificaron y se prepararon los plásmidos para la expresión en células CHO.

7.4.3 Expresión de anticuerpo quimérico en células CHO

- 35 Los plásmidos RId y RIn que contenían los dominios V_H y V_L de 10D3, respectivamente, se co-transfeccionaron transitoriamente en células CHO y se expresaron. El anticuerpo quimérico producido se purificó del sobrenadante del cultivo celular mediante cromatografía pro afinidad en expreso en rProtein A Sepharose y se evaluó su afinidad por OSM en el ensayo ELISA de inhibición de gp130 y el ensayo de células KB (véase más adelante).

7.4.3.1 Purificación del plásmido

- 40 Las células DH5 α que contenían los plásmidos RId-15E10V_H y RIn-15E10V_L se cultivaron en 5 ml de medio LB suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina durante 8 horas a 37 °C en un incubador con agitación.

En 200 ml de medio LB suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina se inoculó 1 ml del cultivo de día y se incubó

durante la noche a 37 °C en un incubador con agitación.

Los plásmidos se extrajeron y purificaron usando el kit QIAfilter Plasmid Maxi de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El sedimento en etanol se resuspendió en 200 µl de tampón TE y la concentración del plásmido se midió mediante la absorbancia a 260 nm tras una dilución 100 de la solución madre.

5 **7.4.3.2 Transfección**

Células CHO se cultivaron hasta la confluencia en MEM de Dulbecco con medio Glutamax-1 (DMEM) suplementado con suero bovino fetal ultrabajo y 1% de penicilina-estreptomicina en matraces de cultivo tisular de tipo BD Falcon de 4 x 175 cm² a 37 °C.

Para cada matraz, en un tubo Falcon de 50 ml, se añadieron y mezclaron los siguientes:

- 10 8 ml de Optimem 1 con Glutamax-1
- 20 µg de RId-10D3V_H plásmido purificado
- 20 µg de RIn-10D3V_L plásmido purificado
- 240 µl de reactivo de transfección TransFast en vórtex

La mezcla se incubó durante 10-15 minutos a TA.

- 15 El medio DMEM se eliminó del matraz, después la mezcla se agitó en vórtex y se añadió al matraz.

La mezcla se incubó a 37 ° C durante 1 hora.

Se añadieron al matraz 32 ml de Optimem y se incubaron a 37 °C durante 48-72 horas.

7.4.3.3 Purificación del anticuerpo quimérico

- 20 Los medios de todos los matraces de 175 cm² se combinaron y centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos en un MSE Mistral 2000 y el sobrenadante se pasó a través de un sistema de filtros de 500 ml de 0,22 µm CA.

El anticuerpo se purificó del sobrenadante aclarado en un Amersham Biosciences Akta Explorer usando el software Unicorn.

La columna usada fue una HiTrap rProtein A Sepharose FF de 1 ml.

El caudal fue de 1ml/min.

- 25 La columna se equilibró con 10VC de PBS de Dulbecco, después se cargó con el sobrenadante aclarado mediante la bomba A.

La columna se lavó con 20 VC de PBS de Dulbecco, la bomba A se lavó para eliminar los residuos y otros 10VC de PBS de Dulbecco se pasaron a través de la columna para asegurar el completo aclaramiento del sobrenadante.

- 30 El anticuerpo se eluyó con 10 VC de tampón de elución ImmunoPure IgG (Pierce) y se recogió en fracciones de 1 ml que contiene 100 µl de Trizma-HCl 1M a pH 8,0 como tampón de neutralización.

La columna se reequilibró con 5VC de PBS de Dulbecco.

- 35 El anticuerpo en las fracciones del eluato se cuantificó leyendo la absorbancia a 280 nm frente a una solución blanco que contenía 10 volúmenes de tampón de elución ImmunoPure IgG Elution Buffer + 1 volumen de Trizma-HCl 1M a pH 8,0 y las fracciones con cantidades suficientes de anticuerpo puro se combinaron y almacenaron en alícuotas de 100 µl a -20 °C.

7.4.4 Análisis del anticuerpo quimérico

El anticuerpo quimérico 10D3 se analizó en el ELISA de inhibición de gp130 y el ensayo de células KB (véase más adelante) para determinar la potencia en la neutralización de OSM tanto.

Los protocolos para el ELISA de inhibición de gp130 y el ensayo de células KB se indican más adelante.

- 40 Los anticuerpos quiméricos 10D3 neutralizan la OSM en el ELISA de inhibición de gp130 y el ensayo de células KB.

Estos resultados confirman que las regiones variables de correctas se han clonado con éxito para producir un

anticuerpo quimérico de unión a antígeno capaz de unirse al sitio II de la OSM tanto humana como de monos cinomolgos.

A continuación se pueden humanizar los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de 10D3.

- 5 Las regiones variables murinas se clonaron y secuenciaron, después se injertaron en las regiones constantes γ/k humanas para producir un anticuerpo quimérico. El anticuerpo quimérico 10D3 mostró una potencia contra la OSM humana y de monos cinomolgos equivalente a la del anticuerpo murino parental en el ensayo ELISA de gp130 y el ensayo de células KB (véase más adelante).

El anticuerpo murino se humanizó usando la estrategia del “mejor ajuste”.

- 10 Para el dominio variable de la región pesada se seleccionó una secuencia con una identidad del 65 % t las CDR murinas se injertaron sobre las estructuras humanas. Se diseñó una serie de construcciones con varias retromutaciones en las estructuras para recuperar la afinidad. Estas construcciones son:

Construcción	Retromutaciones
A	T281
B	T28I, R71V, T73K
C	T28I, V67A, M69L, R71V, T73K
D	T28I, M48I, G44K, V67A, M69L, R71V, T73K

Para el dominio variable de la región ligera se seleccionó una secuencia con una identidad del 60,0% y las CDR murinas se injertaron sobre las estructuras humanas. Se diseñó una serie de construcciones con varias retromutaciones en las estructuras para recuperar la afinidad. Éstas construcciones son:

Construcción	Retromutaciones
LA	ninguna (injerto lineal)
LB	L46R, L47W
LC	Y36F, Q38K
LD	Y36F, Q38K, L46R, L47W
LE	Y36F, Q38K, L46R, L47W, F71Y

- 15 Solo las construcciones con menos y con más retromutaciones (A, D, LA, LE) se sintetizaron mediante acumulación de los oligos solapantes. Cuatro combinaciones de anticuerpos humanizados (ALA, ALE, DLA, DLE) se expresaron a pequeña escala en células CHO y el sobrenadante se analizó para determinar la afinidad por el anticuerpo en el ELISA de gp130.

- 20 Sólo los anticuerpos humanizados ALE y DEL mostraron inhibición en el ELISA de gp130, pero la inhibición con ALE no fue suficiente por la baja concentración del anticuerpo en el sobrenadante, de modo que se seleccionó DEL. La producción del anticuerpo humanizado DEL se esclafó en las células CHO y el anticuerpo se purificó y se analizó en el ELISA de gp130 y el ensayo de células KB usando el anticuerpo quimérico 10D3 como control.

Valores de CI50 (ELISA de gp130) ($\mu\text{g/ml}$):

	hOSM	cOSM
quimera	0,032	0,246
DLE	0,021	0,059

- 25 El anticuerpo humanizado 10D3 DEL es al menos tan potente si no más que el anticuerpo quimérico contra la OSM humana y la OSM de monos cinomolgos en el ELISA de gp130.

Los anticuerpos quiméricos 10D3 DLE and 10D3 humanizados se analizaron en el ensayo de células KB. El 10D3 DLE dio valores de CI50 de 0,205 $\mu\text{g/ml}$ contra la OSM humana y 0,07 g/ml contra la OSM de los monos cinomolgos.

En conclusión, el anticuerpo 10D3 contra el sitio II de la OSM anti-humano se ha humanizado con éxito y muestra una potencia equivalente a la del anticuerpo murino parental.

Materiales

- Sistema de Aislamiento de ARN total SV: Promega Z3100
- 5 Sistema Access RT-PCR: Promega A1250
- Kit de extracción QIAquick Gel: Qiagen 28704
- Solución de carga en gel: Sigma G7654
- Agarosa: Invitrogen 15510-019
- Bromuro de etidio: Sigma E1510
- 10 Tampón TAE: interno.
- Marcador de ADN de 100 pb: New England BioLabs N3231 S
- Kit de clonación de TA: Invitrogen 45-0046
- Células TOP10F' Invitrogen 44-0300
- Agar-L + 100 µg/ml ampicilina interno.
- 15 X-Gal, 50mg/ml en DMF: Promega V394A
- ADN Polimerasa AmpliTaq: Applied Biosystems
- 10 x tampón de PCR: Applied Biosystems
- E-Gel 1,2% agarosa: Invitrogen G501801
- Medio LB + 100 µg/ml ampicilina interno.
- 20 QIAprep Spin Miniprep kit: Qiagen 27106
- Kit de purificación MinElute PCR: Qiagen 28004
- NEBuffer2 10x conc: New England Biolabs B7002S
- BSA purificado 100x conc.: New England Biolabs B9001S
- BsiW I: New England Biolabs R0553L
- 25 Hind III: Promega R604A
- Spe I: New England Biolabs R0133S
- LigaFast Rapid DNA Ligation System: Promega M8225
- Células DH5α químicamente competentes de máxima eficiencia: Medio SOC Invitrogen 18258-012: interno.
- QIAfilter Plasmid Maxi kit: Qiagen 12263
- 30 MEM de Dulbecco con Glutamax-1: Invitrogen 31966-021
- Optimem 1 con Glutamax-1: Invitrogen 51985-026
- Reactivo de transfección TransFast: Promega E2431
- 1 ml HiTrap rProtein A Sepharose FF: Amersham Biosciences 17-5079-01 PBS de Dulbecco: Sigma D8537
- Tampón de elución ImmunoPure IgG: Pierce 21009
- 35 Tris HCl 1 M, pH 8,0 Sigma T2694
- ADN Polimerasa ProofStart: Qiagen 1016816

Tampón de PCR ProofStart: Qiagen 1016961

Ejemplo 8. ELISA de inhibición de gp130

La OSM se une secuencialmente a gp130 en el receptor de OSM o el receptor de LIF. El ensayo que se describe permite la medición de la OSM (por ejemplo hOSM) unida a gp130 en una placa de ELISA. Además, el ensayo permite la medición de la inhibición de la unión de OSM al receptor de gp130 por los anticuerpos producidos contra el sitio II de la OSM.

8.1 Materiales

1. Inmunoplaaca Nunc 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. gp130-Fc humana 100 µg/ml (R&D Systems, 671-GP-100)
3. PBS
4. BSA (Sigma A7030)
5. OSM recombinante humana 10 µg/ml (R&D Systems, no glicosilada)
6. OSM biotinilada anti-humana 50 µg/ml (R&D Systems, BAF295)
7. Estreptavidina HRP (Amersham RPN4401)
8. 3,3',5,5'-tetrametilen benzidina (TMB) (Sigma)
9. Ácido sulfúrico
10. Tween 20 (Sigma P7949)

8.2 Preparación de reactivos

1. **Preparación de las placas:** Diluir gp130-Fc humana a 1 µg/ml en PBS. Añadir 50 µl/pocillo, cubrir e incubar durante la noche a 4 °C.
2. Tampón de lavado: hasta 1 l de PBS, añadir 500 µl de Tween 20 (0,05 %).
3. Tampón de bloqueo: Hasta 500 ml de PBS añadir 5 g de BSA (1 %)

8.3 Procedimiento

1. Lavar la placa usando un protocolo de lavado de placas estándar y secar.
2. Añadir 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo e incubar durante 1 hora a TA.
3. Lavar como en la etapa 1.
4. Añadir 50 µl/pocillo de OSM estándar o de muestra. Cubrir y agitar durante 2 horas a TA. (OSM se diluye hasta 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,563 y 0 ng/ml en tampón de bloqueo o medio de cultivo tisular dependiendo de la muestra)
5. Lavar como en la etapa 1.
6. Añadir 50 µl/pocillo de OSM biotinilada antihumana hasta 30 ng/ml de tampón de bloqueo. Cubrir y agitar durante 1 hora a TA.
7. Lavar como en la etapa 1.
8. Añadir 50 µl/pocillo de estreptavidina-HRP diluida a 1/4000 en tampón de bloqueo. Cubrir y agitar durante 30 minutos a TA.
9. Lavar como en la etapa 1.
10. Añadir 100 µl/pocillo de sustrato TMB. Cubrir y agitar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Añadir 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 1M.
12. Leer la DO a 450 nm.

8.4 Uso del ensayo para análisis de la inhibición mediada por anticuerpos de la unión gp130-OSM

- 1) Mezclar 25 ng/ml de OSM con varias concentraciones de anticuerpo anti-OSM o varias diluciones de antisuero que contiene anticuerpos frente a OSM. Incubar durante 1 hora a TA.
- 2) Añadir 50 µl/pocillo de la mezcla anticuerpo-OSM a una placa de 96 pocillos que contiene gp130 unida, preparado como se ha indicado anteriormente.
- 3) Proceder con el ensayo como se ha descrito en lo que antecede.

9. Ensayo de células KB

Introducción

Las células KB (una línea de células epiteliales humanas) expresan ARNm para gp130 junto con los receptores de LIF y OSM (Mosley, J. Biol Chem., 271 (50) 32635-32643). Tanto OSM como LIF inducen la liberación de IL-6 de las células KB. Esta línea celular se ha usado para identificar anticuerpos monoclonales que modulan la interacción entre OSM y gp130.

9.1 Procedimiento

Las células KB se obtuvieron de ECACC (número de registro 94050408) y se mantuvieron en DMEM + 10 % de FCS inactivada con calor, suplementado con glutamina ("medio KB"). Las células crecen en monocapa y se dividieron dos veces a la semana. Para desprender las células se usó medio de disociación celular no enzimático sigma o Versene.

1. Añadir 2×10^4 células/µl/pocillo/laca de 96 pocillos e incubar (37 °C, 5 % CO₂).
2. Preparar los patrones de OSM en medio de cultivo.
3. Preparar hasta 1 ng/ml de OSM + anticuerpo/diluciones de sueros. Incubar durante 1 hora a TA.
4. Cuidadosamente retirar el medio de la placa de células KB y añadir patrones de OSM y mezclas de OSM-anticuerpo.
5. Incubar durante ~16-18h a 37°C
6. Retirar el medio de cultivo y analizar la IL-6.

Nota:

- El medio de cultivo se guardó congelado hasta que estuvo listo para el análisis.
- El medio de cultivo se diluirá ~20 veces para el ensayo.
- En la detección selectiva de hibridomas, la proporción del medio de clonación y el medio KB debería ser constante y los patrones de OSM se formarán en esta mezcla.
- La estimulación de las células KB con ~100 ng/ml de OSM da un rendimiento máximo de IL-6, pero 1 ng/ml es suficiente para buscar actividad neutralizante del anticuerpo.

10. Ensayo de competición:

Este ensayo permite la medición de la inhibición de la unión del anticuerpo humanizado que tiene una cadena pesada de SEC ID N° 11 y una cadena ligera que tiene la SEC ID N° 12 (para el fin de este ejemplo indicado como 15E10-B3L2) frente a hOSM glicosilada soluble por un anticuerpo no humano candidato que se une específicamente al sitio II de Hosm.

Una ilustración esquemática del ensayo de este ejemplo se indica en la Fig. 20.

La placa se reviste con el anticuerpo monoclonal anti-sitio III (denominado en el presente documento OM4-11.31).

Para la curva estándar: 15E10-B3L2 purificado estándar diluido de 1 µg/ml se incuba con OSM humana glicosilada soluble a 50ng/ml. El anticuerpo se une a OSM a través del sitio II y el complejo se captura después sobre la placa mediante el anticuerpo primario contra el Sitio III.

Para el ensayo de competición: El anticuerpo candidato sometido a dilución en serie de 1 µg/ml se incuba con OSM humana glicosilada soluble a 50 ng/ml.

La presencia del complejo 15E10-B3L2 se detecta mediante un anticuerpo secundario de cadena gamma anti-humano.

Procedimiento:

1/ Recubrimiento

- 5 Una inmunoplaaca Nunc Maxisorp re revistió con 50 µl por pocillo del anticuerpo anti-humano frente al sitio III de OSM (OM4-11.31, interno) a 4 µg/ml en PBS. La placa se incubó durante la noche a 4 °C.

2/ Bloqueo

La placa se lavó 3 veces con PBS + 0,05% Tween (PBST). A cada pocillo se añadió 100 µl de BSA al 1 % (Sigma A7030) en PBS.

- 10 La placa se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación.

3/ Preincubación

Patrón 15E10B3L2:

- 15 Sepreparó una solución del anticuerpo 15E10-B3L2 a 1 µg/ml en OSM humana a 50 ng/ml en tampon de bloqueo y a 2 pocillos de la fila A de una placa de 96 pocillos no absorbente se añadieron 67 µl. El anticuerpo se diluyó en serie a 1:3 en 50 µl de OSM humana a 50 ng/ml en tampón de bloqueo desde la fila B a la G.

Anticuerpo competitivo:

- 20 Se preparó una solución del anticuerpo competitivo a 1 µg/ml en 15E10-B3L2 150 ng/ml + hOSM 50 ng/ml en tampón de bloqueo y a 2 pocillos de la fila A de una placa de 96 pocillos no absorbente se añadieron 100 µl. El anticuerpo se diluyó en serie a 1:1 en 50 µl de 15E10-B3L2 a 150 ng/ml + OSM humana a 50 ng/ml en tampon de bloqueo desde la fila B a la G. Dos pocillos se incubaron con diluyente sin anticuerpo competitivo.

La placa de preincubación se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora en condiciones estáticas.

4/ Incubación

La placa revestida se lavó con agua 3 veces con PBST.

- 25 45 µl de cada patrón y muestra se transfirieron de la placa de preincubación a pocillos equivalentes sobre la placa revestida. Se añadió PBS a los pocillos blanco.

La placa se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación.

5/ Anticuerpo secundario

La placa se lavó 3 veces con PBST.

- 30 A cada pocillo se añadieron 50 µl de peroxidasa de cadena γ anti-humana de cabra (Sigma A6029) diluida 2000 veces en tampón de bloqueo.

La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación.

6/ Sustrato

La placa se lavó 3 veces con PBST.

El sustrato OPD (Sigma P9187) se preparó en agua de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 35 A cada pocillo se añadieron 50 µl.

La placa se incubó a temperatura ambiente

7/ Detención

Una vez que se desarrolló suficiente coloración, la reacción cromogénica se detuvo mediante la adición de 10 µl de H₂SO₄ 3M por pocillo.

- 40 La placa se leyó a 490 nm en un lector de placas usando pocillos blancos como absorbancia 0.

Se representó la curva estándar de la absorbancia a 490 nm frente a la concentración de 15E10.

La concentración de 15E10 en complejo en las muestras que contienen el anticuerpo competitivo se leyó a partir de la curva estándar. El % de inhibición se calculó como:

$$100 - [(conc. \text{ de } 15E10 \text{ en la muestra en ng/ml} / 150 \text{ ng/ml}) \times 100]$$

- 5 Se representó la curva del % de inhibición frente a concentración del anticuerpo competitivo y el % de inhibición de 15E10 en equimolaridad del anticuerpo competitivo (150 ng/ml del anticuerpo competitivo) se leyó a partir de la curva.

Ejemplo 10.1: 10D3 como anticuerpo competitivo

- 10 El anticuerpo del clon E9 del 10D3 murino a 267 µg/ml (madre) se usó como competidor de 15E10. 10D3 tiene las CDR de las cadenas ligera y pesada tal como se establece en la Tabla A anterior.

Resultados:

10D3 (µg/ml)	15E10 en complejo (µg /ml)	% de inhibición
1	0,019	87,3
0,5	0,029	80,7
0,25	0,044	70,7
0,125	0,062	58,7
0,062	0,092	38,7
0,031	0,132	12
0,016	0,146	2,7
El porcentaje de inhibición de 15E10 por el competidor 10D3 en equimolaridad (0,15 ug/ml): 62,3%. Véase la Fig. 21.		

Ejemplo 11. Identificación de los anticuerpos que se unen a OSM y son específicos del sitio II o del sitio III de OSM

- 15 Para la función biológica, la OSM tiene que interaccionar con gp130 y LIFR o OSMRβ. La interacción inicial de OSM con gp130 implica el sitio II de OSM, mientras que la interacción de OSM con OSMRβ o LIFR se produce a través del sitio III. Se deduce que los anticuerpos dirigidos al sitio II o al sitio III de las secuencias de OSM, o epítopos suficientemente cerca de estos sitios de modo que la unión del anticuerpo obstruya estos sitios, neutralizaría la actividad de OSM.

- 20 Un ensayo para medir la unión de OSM-gp130 se indica en el Ejemplo 8. Una curva estándar típica (a 1 µg/ml, gp130) se indica en la Fig.22.

Cambiando las condiciones del ensayo (a 4 µg/ml), la sensibilidad se podría mejorar considerablemente, como se ilustra en la fig 22b.

- 25 Además, aunque los datos anteriores se generaron usando OSM no glicosilada, la OSM glicosilada también se une a gp130 en este ensayo. Véase la fig.22c.

Un anticuerpo neutralizante anti-OSM comercialmente disponible (Mab 295, R&D Systems) se usó en este ensayo para aver si bloquea la interacción OSM-gp130. Sorprendentemente potenció la señal de OSM, como se ilustra en la fig 23.

- 30 Cuando se añade Mab 295 (30 µg/ml) a OSM, aproximadamente duplica la lectura de DO del ELISA en comparación con la OSM sola o para concentraciones de OSM > 10 ng/ml. Si no se introduce gp130 en la placa, la señal generada por OSM + Mab295 se reduce a la inicial. Los inventores han postulado la interpretación siguiente: Mab295 no inhibe ni bloquea el sitio II de OSM. A concentraciones bajas de OSM, las moléculas de anticuerpo de MAB295 sólo se unen a una OSM que, sin embargo, está libre también para unirse a gp130, ya que el sitio II está disponible. A concentraciones mayores, las moléculas de anticuerpo se unen a dos moléculas de OSM, cualquiera de las cuales

está disponible para unirse a gp130, dando 2 posibles moléculas de OSM unidas para cada molécula de gp130, una se une directamente a gp130 y la otra unida como consecuencia de la naturaleza bivalente del anticuerpo. Se ha previsto que ningún anticuerpo no dirigido al sitio II de la OSM tendrá este efecto, pero ya que Mab 295 es un anticuerpo neutralizante (véase la fig. 24), debe unirse al sitio II de la OSM o bloquearlo. Por tanto, el uso del ensayo ELISA para gp130-OSM del Ejemplo 8 y el ensayo de células KB del ejemplo 9 permiten la identificación de los anticuerpos neutralizantes de OSM específicos del sitio II o sitio III. Más particularmente, un anticuerpo del sitio III neutralizará la OSM en el ensayo KB, pero no neutralizará la unión de OSM-gp130 en el ensayo de ELISA. Un anticuerpo del sitio II neutralizará la OSM en los ensayos ELISA y KB.

El ensayo ELISA con OSM-gp130 se usó como hibridoma primario para detectar los anticuerpos generados en el Ejemplo 1 que inhibieron la interacción OSM-gp130. Además, los hibridomas también se sometieron a detección selectiva de la actividad de unión a OSM. Los sobrenadantes del hibridoma que muestran una unión elevada a OSM, pero que no inhibieron la unión OSM-gp130 en el ensayo ELISA del Ejemplo 8 se analizaron en el ensayo de células KB del ejemplo 9 para la neutralización de OSM. Esto identificó una serie de anticuerpos específicos del sitio II de OSM. Uno de estos anticuerpos se denomina OM4-11.31.

Cuando se usaron anticuerpos específicos del sitio II de OSM en el ELISA gp130-OSM, aumentaron considerablemente la señal de OSM como se muestra en la fig 25.

El anticuerpo del sitio II, 1 B5 (1µg/ml) inhibe completamente la unión OSM-gp130. No obstante, el anticuerpo del sitio III de OSM, OM4-11.3.1 causa una potenciación bifásica dependiente de la dosis de la unión de OSM. A la concentración de OM4-11.3.1 más elevada usada, la señal es aproximadamente el doble de la señal con OSM sola, pero a medida que disminuyan las concentraciones, la señal aumenta, probablemente como resultado de la formación de complejos anticuerpo-OSM que se pueden unir a gp130, hasta alcanzar un valor pico. La IgG control isotipo para OM4-11.31 no tuvo ningún efecto sobre la unión OSM-gp130. La Fig 25 demuestra la gran sensibilidad de este ELISA en la discriminación de anticuerpos específicos del sitio II frente a no específicos de este sitio, ya que el primero inhibe pero el último potencia la unión de OSM.

Ejemplo 11.1. Efecto de los anticuerpos anti-OSM específicos del sitio II y del sitio III en el ensayo ELISA OSM-gp130

Cuando los anticuerpos específicos del sitio II y del sitio III de la OSM se mezclan, los anticuerpos específicos del sitio II tienen un efecto dominante en el ELISA gp130-OSM del ejemplo 8, como se muestra en la fig. 26.

La señal de OSM solo se ve considerablemente aumentada por el anticuerpo específicos del sitio III OM4-11.17. Mientras que esta potenciación no se ve afectada por la adición de una IgG control, la adición del anticuerpo específico del sitio II de la OSM, OM4-5.3, reduce considerablemente la señal. Se cree que la pequeña señal detectable en la columna de la derecha de la Fig.26 se debe a una incubación subóptima del AcMo del sitio II y el complejo sitio OOO-OSM antes de la adición a la placa con gp130.

El ELISA gp130-OSM permite el control de la aparición de anticuerpos anti-OSM específicos del sitio II en antisero de ratones inmunizados con OSM humana (véase el ejemplo 1), como se ilustra en las fig. 27a, 27b y 27c.

Después del primer refuerzo, se generaron principalmente anticuerpos no dirigidos al sitio II, pero los anticuerpos específicos del sitio II comenzaron a aparecer después del segundo refuerzo y, tras el tercer refuerzo, la dominancia de los anticuerpos específicos del sitio II se ve claramente a las concentraciones séricas más elevadas,

Ejemplo 11.2 –Sinergia entre los anticuerpos específicos del sitio II y del sitio III de la OSM para la neutralización de la OSM

Dado que el sitio II y el sitio III de la OSM son esenciales para la función de la OSM, una combinación de anticuerpos dirigidos a ambos sitios pueden funcionar de forma sinérgica en la neutralización de la OSM. El sitio III de la OSM no sólo se usa para la interacción con OSMR β y LIFR sino también en la unión de una segunda molécula de OSM a gp130, lo que podría contribuir al incremento de la potencia de los anticuerpos específicos del sitio III en comparación con aquéllos contra el sitio II.

Las Figuras 28a y 28b ilustran el ensayo de KB en el que la combinación de un anticuerpo específico del sitio II y específico del sitio III incrementa considerablemente la potencia de la neutralización de OSM cuando se compara con cualquiera de los anticuerpos solos.

Las concentraciones de anticuerpos usadas en las combinaciones se muestran en la tabla siguiente.

[17H100]	[hum 15E10]
ng/ml	ng/ml
201	120
7	40
2,2	13,3
0,7	4,4
0,3	1,5
0,082	0,5
0,027	0,165
0,0091	0,55

Una comparación de los anticuerpos específicos del sitio II y del sitio III más activos mostró que los últimos eran más potentes en la neutralización de OSM. No obstante, se encontró que la reactividad cruzada de los anticuerpos específicos del sitio II y del sitio III con OSM de otras especies, ya que todos los anticuerpos del sitio II potentes neutralizaron la OSM de monos cinomolgos (en el ELISA gp130-OSM y el ensayo de células KB), mientras que los anticuerpos del sitio III no lo hicieron (sólo en el ensayo de células KB).

Probablemente el bloqueo de la interacción de OSM con gp130 y OSMR o LIFR subyace a los efectos sinérgicos de los anticuerpos del sitio II y del sitio III en la neutralización de OSM. No obstante, también es posible que la unión de un anticuerpo pueda facilitar la unión de otro anticuerpo dirigido a un sitio diferente.

Ejemplo 11.3 –Optimización de la neutralización de OSM mediante la combinación de los anticuerpos específicos del sitio II y del sitio III de la OMS

Dado que la combinación de los anticuerpos del sitio II y del sitio III de la OMS aumentó considerablemente la potencia de la neutralización, se puede concebir una estrategia para el desarrollo de concentraciones óptimas en base a las afinidades de unión de los diferentes anticuerpos. El Ejemplo 11.3 es teórico.

Inicialmente, la afinidad de los anticuerpos específicos del sitio II o del sitio III por la OSM, previamente unida mediante anticuerpos específicos del sitio II o del sitio III, se mediría usando la tecnología de plasmón superficial. Si las constantes de unión (Kd) son significativamente diferentes de la unión de anticuerpos sencillos a la OSM, se está produciendo una interacción colaboradora en la unión de los anticuerpos del sitio II o del sitio III.

En base a los datos de estos estudios de unión de anticuerpo, las concentraciones de los anticuerpos del sitio II y del sitio III se prepararían de modo que variaran desde 10 veces mayor que los valores de Kd a 10 veces mejor que la Kd, usando diluciones dobles. Además, se prepararían combinaciones de ambos anticuerpos de modo que cada concentración del anticuerpo del sitio II se combina con cada concentración del anticuerpo del sitio III, lo que permite la exploración de una unión igual de los anticuerpos al sitio II o al sitio III a la OSM, y la dominancia en la unión de los anticuerpos al sitio II o al sitio III. En todas las diluciones y combinaciones de anticuerpos se analizaría la neutralización de la OSM en un ensayo de células KB. Los datos en este ensayo permitirían la selección de la combinación de anticuerpos que fuera más potente en la neutralización de la OSM.

Ejemplo 12. Capacidad del anticuerpo anti-OSM específico del sitio II para inhibir la estimulación con OSM de los fibroblastos sinoviales en la AR.

Anteriormente los inventores han mostrado que los anticuerpos específicos del sitio II y del sitio III de la OSM pueden inhibir la estimulación por OSM de células KB. No obstante, estas células son epiteliales, se transforman y pueden no ser representativas de las células halladas en el sinovio reumatoide. Por tanto, los inventores han investigado la eficacia de los anticuerpos anti-OSM específicos del sitio II para inhibir la estimulación con OSM de los fibroblastos sinoviales en la AR.

Los fibroblastos se sembraron en placas de 96 pocillos a 2×10^4 células/pocillo y se cultivaron en DMEM con 10 % de FCS hasta llegar casi a la confluencia, sustituyendo el medio 3 veces a la semana. Después, el medio de cultivo se cambió a medio de cultivo recién preparado sin OSM, con 1 ng/ml de OSM o 1 ng/ml de OSM preincubada durante 1 hora con varias concentraciones del anticuerpo anti-OSM en el medio. Tras 48 horas se retiraron los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C hasta el análisis de las concentraciones de IL-6 con ELISA.

La Figura 29 ilustra datos representativos de 4 cepas de fibroblastos sinoviales con AR. El anticuerpo de OSM produjo una inhibición completa de la secreción de IL-6 estimulada con OSM, aunque la potencia del anticuerpo mostró alguna variación entre las diferentes cepas.

Ejemplo 13. Efecto de la glicosilación de OSM sobre la potencia de la neutralización por anticuerpos anti-OSM.

Se produjeron anticuerpos anti-OSM inmunizando ratones con OSM no glicosilada usando procedimientos previamente descritos. La detección selectiva de estos anticuerpos condujo a la identificación de un potente anticuerpo neutralizante (OM4-5.3) que interfirió en la unión de OSM a gp130, como se muestra en la fig.30.

Se ha previsto que OM5-5.3 podría tener una potencia similar contra la OSM glicosilada (glicosilada en células CHO). Ni obstante, cuando se midió la capacidad de un subclon de este anticuerpo (OM4-5.3.1) para inhibir la unión de OSM glicosilada (hOSM glicosilada por una célula CHO) a gp130 se observó una marcada pérdida de potencia, como se muestra en la Fig. 31a. Además, esta pérdida de potencia frente a la OSM glicosilada comparada con la OSM no glicosilada también se observó en otros anticuerpos específicos del sitio II derivados de la inmunización de un ratón con OSM glicosilada, como se muestra en la Fig. 31b.

Adicionalmente, los anticuerpos del sitio III derivados de la inmunización con OSM no glicosilada también mostraron una reducción de la potencia de aproximadamente 10 veces frente a la OSM glicosilada en comparación con la OSM no glicosilada en un ensayo de células KB, véase la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Anticuerpo	OSM no glicosilada	OSM glicosilada
	CI50 ng/ml	CI50 ng/ml
OM4-11.17	4,1	45,5
OM4-11.31	7,7	89,6

Dado que la inmunización con OSM no glicosilada tuvo como resultado anticuerpos que eran más potentes frente a la OSM no glicosilada en lugar de la forma glicosilada, los inventores han pensado que la inmunización con OSM glicosilada puede proporcionar anticuerpos de mayor potencia contra esta forma de OSM. De hecho, este fue el caso. Las Figuras 32a y 32b ilustran la actividad contra OSM glicosilada y no glicosilada en el ELISA gp130-OSM de dos anticuerpos frente a OSM específicos del sitio II (15E1 O and 5H2) derivada de la inmunización con OSM glicosilada.

Ejemplo 14 – Correlación entre los niveles de OSM en suero y en líquido sinovial en pacientes de AR

Uno de los principales sitios de producción de OSM en pacientes de AR está en las articulaciones artríticas, ya que se pueden medir niveles altos de OSM en el líquido sinovial. En contraste, los niveles de OSM en suero en pacientes de AR son muy bajos y sólo ha sido posible medirlos con precisión con el desarrollo de un ELISA de alta sensibilidad tal como se divulga más adelante en el ejemplo 16. Los autores han investigado la posible relación entre las concentraciones de OSM en articulaciones artríticas y la circulación midiendo muestras pareadas de líquido sinovial y de suero de pacientes de AR.

Los niveles de OSM en suero y líquidos sinoviales se miden mediante el ensayo de ELISA que se indica más adelante (OM4-11.31, anticuerpo de captura de OSM) se muestran en la siguiente tabla y en la figura 33 se ilustra la relación entre las dos medidas. Las muestras se congelaron después de obtener y se descongelaron justo antes de estas determinaciones. El coeficiente de correlación para estos dos parámetros, determinado mediante regresión lineal, es 0,9447.

Paciente	suero [OSM]	LS [OSM]
	pg/ml	Pg/ml
1	9,8	43,24
2	13,7	101,445
3	0	0
4	88,56	397
5	22,64	142,12
6	18	147,4
7	13	9,2
8	13,8	29,88
9	10,68	14,76
10	13,8	15,96

La buena correlación entre los niveles de OSM en suero y el LS sugiere que los sitios de producción de OSM aparte de las articulaciones artríticas tienen relativamente poca influencia sobre los niveles de OSM circulantes o que estos sitios modulan la producción de OSM de un modo que se correlaciona con la producción en las articulaciones. En cualquier caso, los inventores especulan con que la correlación puede permitir la predicción de los niveles de OSM en las articulaciones a partir de las mediciones de los niveles de OSM en suero y podrían ser útiles en el contexto de la dosis de un anticuerpo neutralizante de OMS para el tratamiento de pacientes con AR.

Ejemplo 15 Medición de los niveles de OSM en líquido sinovial (LS) y suero de pacientes de OA

Dado que la degradación del cartílago es una característica de la osteoartritis y los niveles de OSM, particularmente en sinergia con la IL-1 y otras citocinas, pueden inducir degradación del cartílago, los autores han medido los niveles de OSM en líquidos sinoviales y suero de pacientes de OA.

Se eliminaron las células de las muestras de LS mediante centrifugación. Los sobrenadantes se trataron durante 1 hora con 0,1 U/ml de hialuronidasa (Fluka, 53725) for durante 1 hora a temperatura ambiente, tras lo cual se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes se extrajeron, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

Las concentraciones de OMS en los LS de OA se analizaron usando en el ensayo de ELISA del ejemplo 16 en dos experimentos que se muestran en las figuras 34a y b y 35.

Aunque 13 de los 46 LS de OA no tenían OSM detectable, muchos contenían OSM a niveles relativamente altos (> 200 pg/ml) y en tres muestras se detectaron concentraciones de OSM > 1000 pg/ml .

Ejemplo 15.1. Concentraciones de OSM en suero de OA

Las altas concentraciones de OSM en el líquido sinovial de OA fueron sorprendentes, ya que en informes anteriores se había sugerido que los niveles de OSM en el líquido sinovial de OA tendían a ser menores que en el LS de AR (véase Manicourt DH y col. (2000) Arthritis Rheum. 43(2): 281-88). También midieron los niveles de OSM en sueros de pacientes con OA en un estudio clínica a diferentes puntos de tiempo en un periodo de 12 meses usando el ensayo ELISA del ejemplo 16, más adelante. La Figura 36 ilustra que las concentraciones de suero eran bajas o no detectables en estos pacientes. No obstante, no se estableció correlación alguna entre los niveles de OSM en sueros y en líquido sinovial en pacientes de OA, ya que las muestras no eran pareadas.

Ejemplo 16-ELISA sensible para detectar OSM en muestras biológicas a concentraciones bajas.

Los autores han desarrollado un ELISA sensible para la medición de OSM en muestras biológicas usando el anticuerpo de captura específico del sitio III de la OSM OM4-11.31. Este ELISA permite la detección de niveles de OSM tan bajos como < 2 pg/ml, como se muestra en la figura 37y se ha usado para el análisis de muestras de suero y de líquido sinovial.

El protocolo para usar este ELISA con muestras de suero y de líquidos sinoviales se proporciona a continuación.

Protocolo de ELISA para OSM

MATERIALES Y REACTIVOS

- 5 11. Inmunoplaaca Nunc 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
12. Anticuerpo monoclonal anti OSM humana (OM4-11.31 GSK)
13. hOSM glicosilada a 420 ug/ml (glicosilada en células CHO)
14. OSM biotinilada anti-humana de cabra 50 µg/ml (R&D Systems, BAF295)
15. Estreptavidina HRP (Amersham RPN4401)
- 10 16. PBS (SIGMA D8537 1 L)
17. BSA (SIGMA A7888 500g)
18. Solución de rojo fenol al 0,5 % (SIGMA P0290 100ml)
19. TMB (SIGMA T-8665 1 L)
20. Acumulación de suero control AB normal masculino (SIGMA H4522) N° de lote 043K0500
- 15 21. Ácido sulfúrico 1M
22. Pastillas de PBS (SIGMA P4417 100 pastillas)
23. Tween 20 (Sigma P7949)
24. Selladores de placas

20 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Preparación de placas- Diluir el anticuerpo monoclonal anti-OSM humana a 4 µg/ml en PBS

Añadir 50 µl/pocillo, cubrir con una tira selladora e incubar durante la noche a 4 °C.

Tampón de lavado- Hasta 5 l de agua desionizada, añadir 25 pastillas de PBS + 2,5 ml de Tween 20 (0,05 %)

Tampón de bloqueo- Hasta 500 ml de PBS añadir 10 g de BSA (2%)

- 25 (añadir 800 µl de rojo fenol y NaOH 5M hasta que el pH está neutro)

Control de suero sanguíneo AB

Centrifugar los 100 ml en centrífuga Sorvall a 16K, 30 minutos (usando 4 tubos Oakridge equilibrados a 0,02 g).

Pasar el sobrenadante a través de una gasa estéril (seguirá turbio, pero sin partículas), alicuotar y congelar.

El día del ensayo, descongelar el suero AB, microfigar 13K durante 5 minutos y diluir 1-4 en PBS.

- 30 (El suero estará opaco, pero se puede usar).

Preparación de patrones

Para el análisis de suero, preparar patrones en suero AB diluido a 1→4 de PBS. Para el análisis de los LS preparar patrones en de BSA al 1% en PBS.

Si se desea una sensibilidad máxima:

- 35 Use patrones a 112, 56, 28, 14, 7, 3.5 1.75 y 0 pg/ml OSM

PROCEDIMIENTO

5. Lavar la placa 4 veces con tampón de lavado y secar.
6. Añadir 200 µl/pocillo, sellar la placa y agitar durante 2 horas a TA o durante la noche en reposo.
7. Lavar como en la etapa 1.
8. Añadir 50 µl/pocillo de OSM estándar o de muestra. Cubrir y agitar durante 2 horas a temperatura ambiente. (el patrón se diluye en 25 % de suero AB combinado si se van a analizar muestras de suero).
- 5 5. Lavar como en la etapa 1.
6. Añadir 50 µl/pocillo de OSM biotinilada antihumana hasta 50 ng/ml de tampón de bloqueo con 1 % de suero de cabra. Cubrir y agitar durante 1 hora a temperatura ambiente.
7. Lavar como en la etapa 1.
- 10 8. Añadir 50 µl/pocillo de estreptavidina-HRP diluida a 1/4000 en tampón de bloqueo. Cubrir y agitar durante 30 minutos a TA.
9. Lavar como en la etapa 1.
10. Añadir 100 µm de sustrato TMB. Cubrir y agitar durante 40 minutos a TA.
11. Para detener el ensayo, añadir 50 µl/pocillo de H₂SO₄ 1M.
- 15 12. Leer inmediatamente a 450 nm tras agitar la placa.

SEC ID Nº 1

NYGVH

20 SEC ID Nº 2

VIWRGGSTDYNAAFMS

SEC ID Nº 3

SPNSNFYWYFDV

25

SEC ID Nº 4

SGSSSVSYMY

SEC ID Nº 5

30

DTSNLAS

SEC ID Nº 6

QQWSSYPPT

SEC ID N° 7

QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVWRGG
STDYNAAFMSRLSITKDNSRSQVFFKMNSLQADDTAIYYCAKSPNSNFYWFVDW
GTGTTVTVSS

5 SEC ID N° 8

QIVLTQSPTIMSASPGEKVTMTCSGSSSVSYMYWYQEKPGSSPRLLIEDTSNLA
GVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQWSSYPPTFGSGTKLEIK

SEC ID N° 9

10

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRGG
STDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFVDW
GRGTLVTVSS

SEC ID N° 10

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQKPGQAPRLLIEDTSNLA
GIPARFSGSGSGTDYTLTISNLEPEDFAVYYCQWSSYPPTFGQGTKLEIK

15

SEC ID N° 11

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRGG
STDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFVDW
GRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEP
KSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT
QKSLSLSPGK

SEC ID N° 12

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIEDTSNLA
GIPARFSGSGSGTDYTLTIISNLEPEDFAVYYCQQWSSYPPTFGQGTKLEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC

SEC ID N° 15

CAGGTGCAACTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGT
CCATAACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAATAATTATGGTGTACACTGGGT
TCGCCAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTGATATGGAGAGGTGGA
AGCACAGACTACAATGCAGCTTTCATGTCCAGACTGAGCATCACCAAGGACAACT
CCAGGAGCCAAGTTTTCTTTAAATGAACAGTCTACAAGCTGATGACACTGCCAT
ATACTACTGTGCCAAAAGTCCGAATAGTAACTTTTACTGGTATTTTCGATGTCTGG
GGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

5 SEC ID N° 16

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAACAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGG
TCACCATGACCTGCAGTGGCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTATTGGTACCAGGA
GAAGCCAGGATCCTCCCCCAGACTCCTGATTGAAGACACATCCAACCTGGCTTCT
GGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACA
TCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAG
TTATCCACCCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATCAAA

SEC ID N° 17

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCTCATTAATAATTATGGTGTACACTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGATATGGAGAGGTGGA
AGCACAGACTACAATGCAGCTTTCATGTCCCGATTACCATCTCCAAGGACAATT
CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGT
GTATTACTGTGCGAAAAGTCCGAATAGTAACTTTTACTGGTATTTTCGATGTCTGG
GGCGTGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCA

SEC ID N° 18

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCTCTCCTGCAGTGGCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTATTGGTACCAACA
GAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCGAAGACACATCCAACCTGGCTTCT
GGCATCCCAGCCAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTACACTCTCACA
TCAGCAACCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAG
TTATCCACCCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

SEC ID N° 19

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
 GACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCTCATTAACTAATTATGGTGTACACTGGGT
 CCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGATATGGAGAGGTGGA
 AGCACAGACTACAATGCAGCTTTCATGTCCCGATTACCATCTCCAAGGACAATT
 CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGT
 GTATTACTGTGCGAAAAGTCCGAATAGTAACTTTTACTGGTATTTTCGATGTCTGG
 GGCCGTGGCACACTAGTACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT
 TCCCCCTGGCACCcTCctCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
 CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCC
 CTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACT
 CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT
 CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC
 AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGG
 GGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC
 CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG
 GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
 CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCT
 GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
 CTCCCAGCCCCCAtCGAGAAAACCaTCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC
 CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGaACCAGGTCTAG
 CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG
 AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCG
 ACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
 GGGGAACGTcTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
 CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEC ID N° 20

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
 CCACCCTCTCCTGCAGTGGCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTATTGGTACCAACA

GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCGAAGACACATCCAACCTGGCTTCT
GGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTACACTCTCACCA
TCAGCAACCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAG
TTATCCACCCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCT
GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGT
CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTG
GAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAG
GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAG
ACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC
GCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEC ID N° 21

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRG
GSTDYNAAFMSRLTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
VWGRGTLTVSS

5

SEC ID N° 40

DYNMD

SEC ID N° 41

DINPNNGGTIDNQKFKD

10

SEC ID N° 42

GIYYYGSHYFDY

SEC ID N° 43

SATSSVSVMH

SEC ID N° 44

15

DTSKLAS

SEC ID N° 45

QQWSSNPLT

SEC ID N° 46

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYIFTDYNMDWVKQSHGKKLEWIGDINPNN
GGTIDNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSED TAVYYCARGIYYYGSHYFDY
WGQGTTLTVSS

20

SEC ID N° 47

QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSATSSVSVMHWFQKKSGTSPKRWIYDTSKLAS
GVPTRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDTATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLELK

5 SEC ID N° 48

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYNMDWVRQAPGQKLEWIGDINPNN
GGTIDNQKFKDRATLTVDKSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGIYYYGSHYFDY
WGQGTLVTVSS

SEC ID N° 49

10

EIVLTQSPSSLSASVGDRVITITCSATSSVSVMHWFQKKPGKAPKRWIYDTSKLAS
GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVDIK

SEC ID N° 50

15

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYNMDWVRQAPGQKLEWIGDINPNN
GGTIDNQKFKDRATLTVDKSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGIYYYGSHYFDY
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNY
TQKSLSLSPGK

SEC ID N° 51

EIVLTQSPSSLSASVGDRVITITCSATSSVSVMHWFQKKPGKAPKRWIYDTSKLAS
GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVDIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEC ID N° 52

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGA
AGATATCCTGCAAGGCCTCTGGATACATATTCAGTGAACAACATGGACTGGGT
GAAGCAGAGCCATGGAAAGAACTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTAATAAT
GGTGGTACTATCGACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACA
AGTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGC
AGTCTATTACTGTGCAAGAGGGATTTATTACTACGGTAGTCACTACTTTGACTAT
TGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

5 SEC ID N° 53

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCAC
CATGACCTGCAGTGCCACCTCAAGTGTAAGTGTATGCACTGGTTCCAGAAGAAGTCAG
GTACCTCCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTACT
CGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTACAATCAGTAGCATGGAGGC
TGAAGATACTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCACTCACGTTTCGGTT
CTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

SEC ID N° 54

10

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
TTCCTGCAAGGCATCTGGATACATATTCACCGACTACAACATGGACTGGGTGCGACAGG
CCCCTGGACAAAACTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTAATAATGGTGGTACTATC
GACAACCAGAAGTTCAAGGACAGAGCCACCTTGACCGTAGACAAGTCCACGAGCACAGT
CTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAG
GGATTTATTACTACGGTAGTCACTACTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACACTAGTCACA
GTCTCCTCA

SEC ID N° 55

15

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCAC
CATCACTTGCAAGTGCCACCTCAAGTGTAAGTGTATGCACTGGTTCCAGAAGAAACCAG
GGAAAGCCCCAAGAGATGGATCTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGGGTCCCATCA
AGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTACACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACC
TGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCACTCACGTTTCGGCG
GAGGGACCAAGTGATATCAAA

SEC ID N° 56

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
TTCCTGCAAGGCATCTGGATACATATTCACCGACTACAACATGGACTGGGTGCGACAGG

CCCCTGGACAAAACTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTAATAATGGTGGTACTATC
 GACAACCAGAAGTTCAAGGACAGAGCCACCTTGACCGTAGACAAGTCCACGAGCACAGT
 CTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAG
 GGATTTATTACTACGGTAGTCACTACTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACACTAGTCACA
 GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCcTCTCCAAGAG
 CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG
 TGACGGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTC
 CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT
 GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA
 AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCT
 GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCAT
 GATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTG
 AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
 CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTTGACCA
 GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCC
 CCAcCGAGAAAACCaTCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC
 CTGCCCCCaTCCCGGGATGAGCTGACCAAGaACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
 AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA
 ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAG
 CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTcTTCTCATGCTCCGTGATGCA
 TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEC ID N° 57

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCAC
 CATCACTTGCACTGCCACCTCAAGTGTAAGTGTGATGCACTGGTTCCAGAAGAAACCAG
 GGAAAGCCCCTAAGAGATGGATCTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGGGTCCCATCA
 AGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTACACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACC
 TGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACTCACGTTCCGGCG
 GAGGGACCAAAGTGATATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCC
 CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT
 CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACCT
 CCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC
 CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCA
 TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

5

SEC ID N° 61

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRG
 GSTDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWFYFD
 VWGRGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDK
 KVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELAGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
 KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMH
 EALHNHYTQKSLSLSPGK

SEC ID N° 62

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCTCATTAAC TAATTATGGTGTACACTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGATATGGAGAGGT
GGAAGCACAGACTACAATGCAGCTTTTCATGTCCCGATTACCATCTCCAAGGAC
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG
GCTGTGTATTACTGTGCGAAAAGTCCGAATAGTAAC TTTTACTGGTATTTTCGAT
GTCTGGGGCCGTGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCA
TCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAC
TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC
CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG
AAAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAAC TCACACATGCCCACCGTGCCCAGCA
CCTGAACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGAC
ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
AGCGTCTTCACCGTCTTGACACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC
AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAG
CTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACC
ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une de forma específica a hOSM y comprende las siguientes CDR:

CDRH1 de SEC ID N° 1

5 CDRH2 de SEC ID N° 2

CDRH3 de SEC ID N° 3

CDRL1 de SEC ID N° 4

CDRL2 de SEC ID N° 5

CDRL3 de SEC ID N° 6

10 2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo modula la interacción entre OSM y gp130.

3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, seleccionándose el anticuerpo del grupo constituido por intactos, quiméricos, humanizados, biespecíficos, heteroconjugados.

15 4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, siendo el anticuerpo un anticuerpo intacto.

5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4, siendo el anticuerpo intacto murino, de rata, de conejo, de primate o de ser humano.

6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, siendo el anticuerpo intacto de ser humano.

7. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, siendo el anticuerpo quimérico o humanizado.

20 8. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7, siendo el anticuerpo humanizado.

9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8, en el que los residuos en las posiciones 28, 29, 30, 71 y 94 de la región marco conservada de la cadena pesada variable aceptora humana y las posiciones 49 y 71 del marco conservada de la cadena ligera variable aceptora humana están sustituidos por los correspondientes residuos en el marco conservado del anticuerpo donante del que deriva la CDRH3.

25 10. El anticuerpo de la reivindicación 9, en el que la estructura de la cadena pesada humana comprende los residuos siguientes:

Posición	Residuos
28	S
29	L
30	T
71	K
94	K

y la cadena ligera humana comprende los residuos siguientes:

30

Posición	Residuos
49	E
71	Y

11. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende un dominio V_H de la SEC ID N° 9 y un dominio V_L de la SEC ID N° 10.
12. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende una cadena pesada de la SEC ID N° 11 y una cadena ligera de la SEC ID N° 12.
- 5 13. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una región constante de la cadena pesada humana seleccionada del grupo constituido por; IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM.
14. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 13 en el que la región constante es de un isotipo IgG, por ejemplo IgG1 o IgG4.
- 10 15. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 14 en el que la región constante es IgG1:
16. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 15 en el que la región constante está mutada para dar el anticuerpo no lítico.
17. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo modula la interacción entre el sitio II de hOSM y gp130.
- 15 18. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 17, inhibiendo dicho anticuerpo dicha interacción.
19. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 18, bloqueando dicho anticuerpo dicha interacción.
- 20 20. Un fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de reivindicaciones precedentes, seleccionando dicho fragmento del grupo constituido por Fab, Fab', Fd, F(ab)2, ScFv.
21. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de reivindicaciones precedentes.
- 25 22. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, para usar en el tratamiento de la artritis reumatoide y/o osteoartritis.
23. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, para usar en el tratamiento de la EPOC.
24. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, para usar en el tratamiento de la psoriasis.
25. La composición farmacéutica de la reivindicación 21, para usar en el tratamiento de la aterosclerosis.
- 30 26. Uso un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 20 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la artritis reumatoide, osteoartritis, psoriasis, asma o EPOC.
27. Un vector (p. ej., plásmido) que codifica la cadena pesada y/o cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, comprendiendo dicho vector un polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 31.
- 35 28. Un polinucleótido que codifica el dominio V_H de la SEC ID N° 9, comprendiendo dicho polinucleótido la SEC ID N° 17.
29. Un polinucleótido que codifica el dominio V_L de la SEC ID N° 10, comprendiendo dicho polinucleótido la SEC ID N° 18.
30. Un polinucleótido que codifica la cadena pesada de la SEC ID N° 11, comprendiendo dicho polinucleótido la SEC ID N° 19.
- 40 31. Un polinucleótido que codifica la cadena ligera de la SEC ID N° 12, comprendiendo dicho polinucleótido la SEC ID N° 20.
32. Una célula huésped recombinante establemente transformada o transfectada que comprende el vector de la reivindicación 27.
- 45 33. Una célula huésped recombinante establemente transformada o transfectada que comprende un primer vector que comprende un polinucleótido de la SEC ID N° 17 y un segundo vector que comprende un polinucleótido de la

SEC ID N° 18.

34. Una célula huésped recombinante establemente transformada o transfectada que comprende un primer vector que comprende un polinucleótido de la SEC ID N° 19 y un segundo vector que comprende un polinucleótido de la SEC ID N° 20.

5 35. La célula huésped de una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 34, siendo dicha célula huésped una célula de vertebrado.

36. La célula huésped de la reivindicación 35, siendo dicha célula de mamífero..

37. La célula huésped de la reivindicación 36, siendo dicha célula CHO o NSO.

10 38. Un procedimiento para fabricar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende la etapa de cultivar una célula huésped de una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 34.

39. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, además de ser capaz de unirse a hOSM también es capaz de unirse a la OSM de macacos (cOSM).

Fig. 1

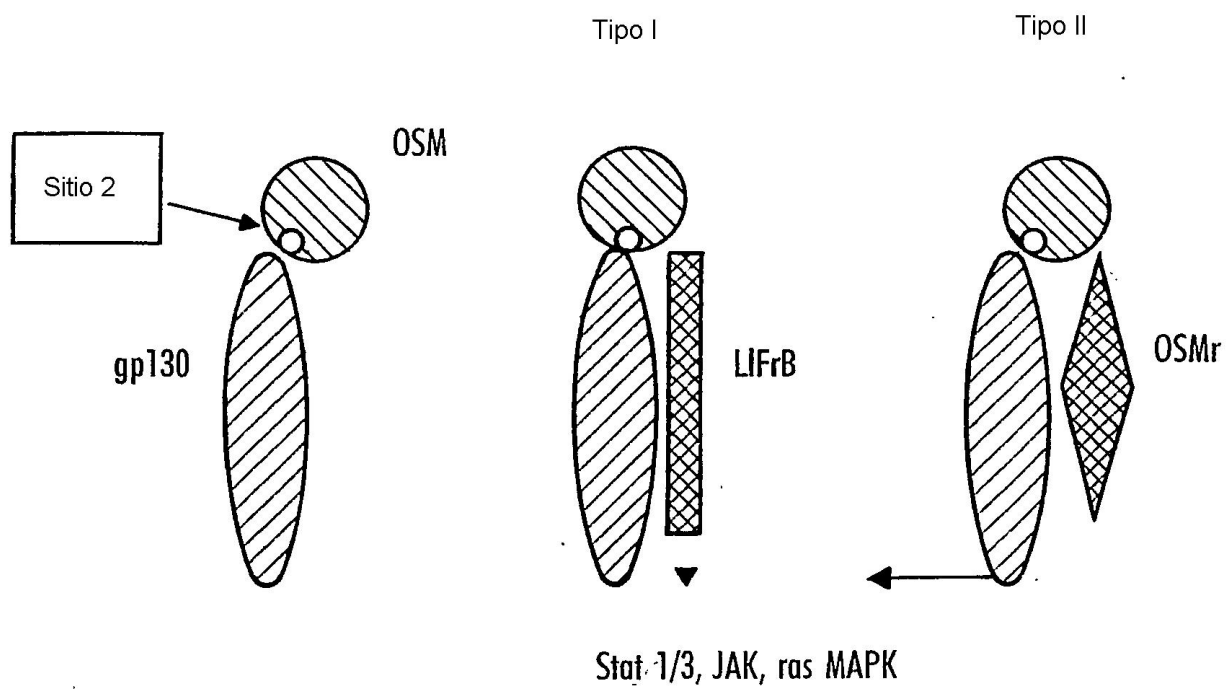


Fig. 2

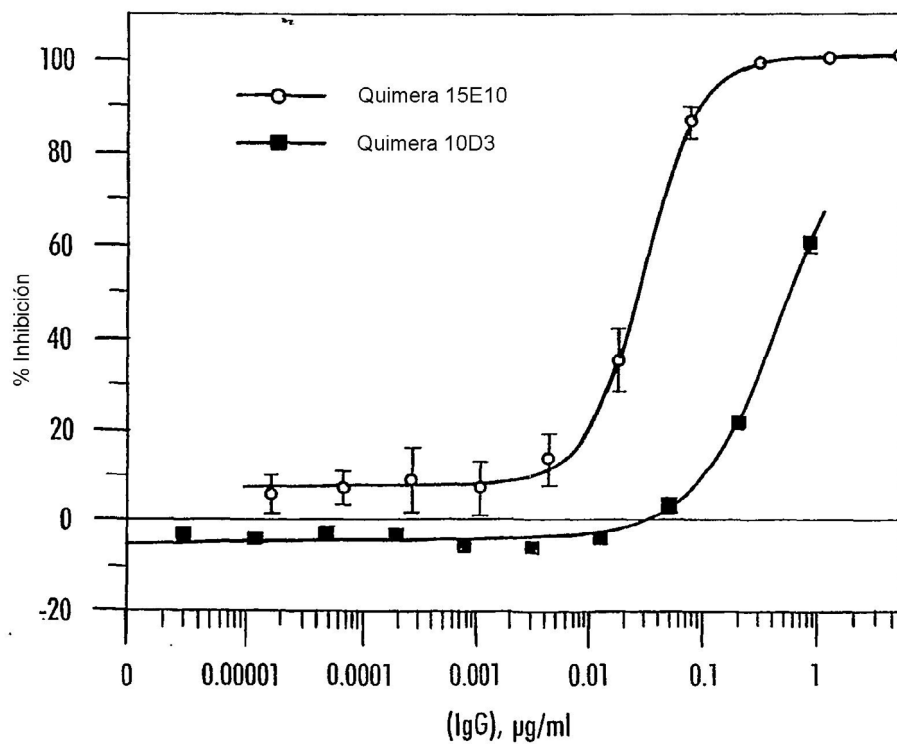
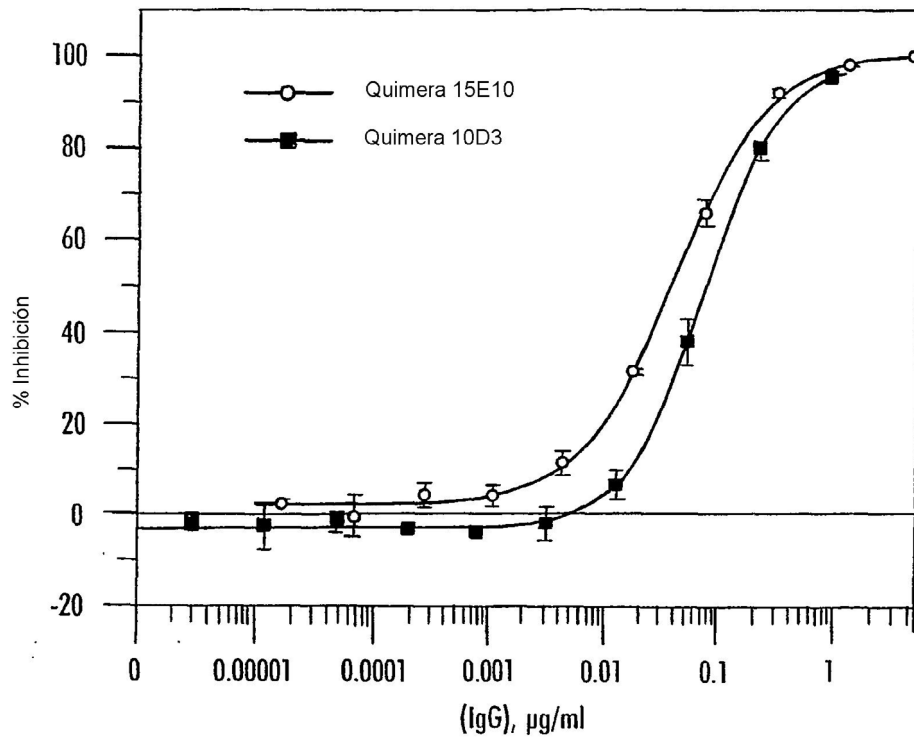


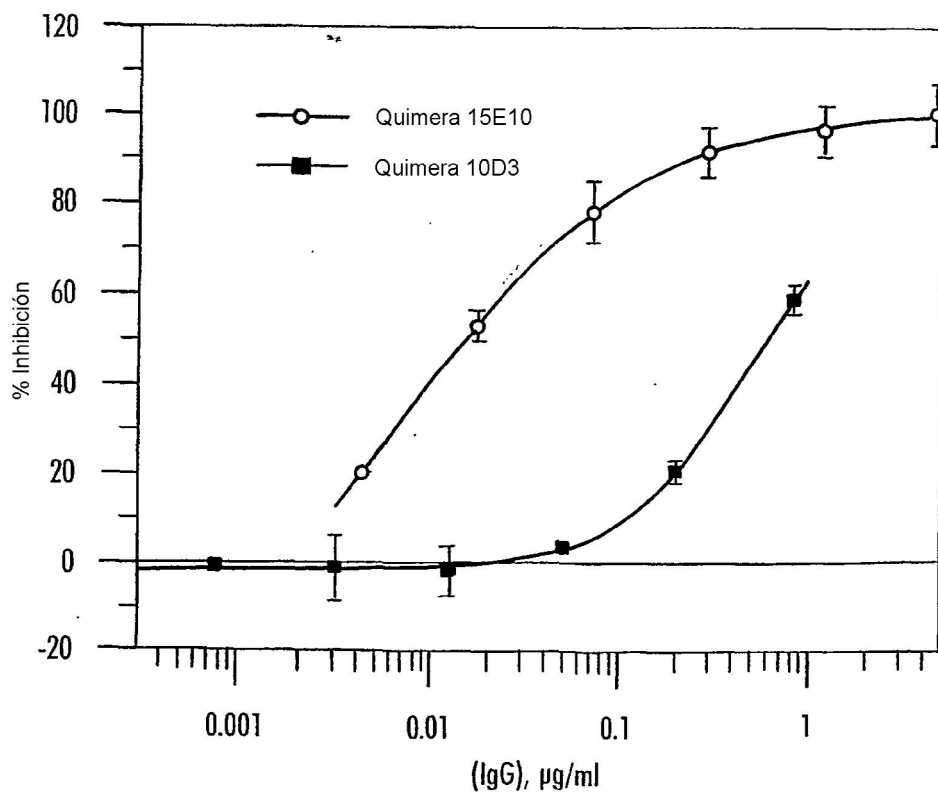
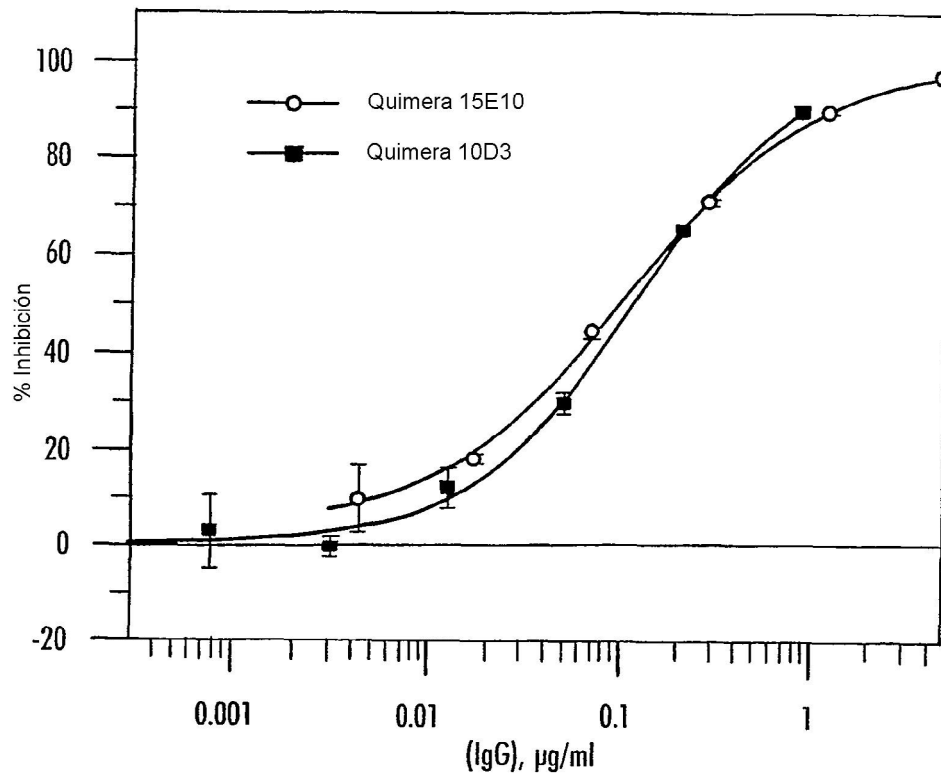
Fig. 3

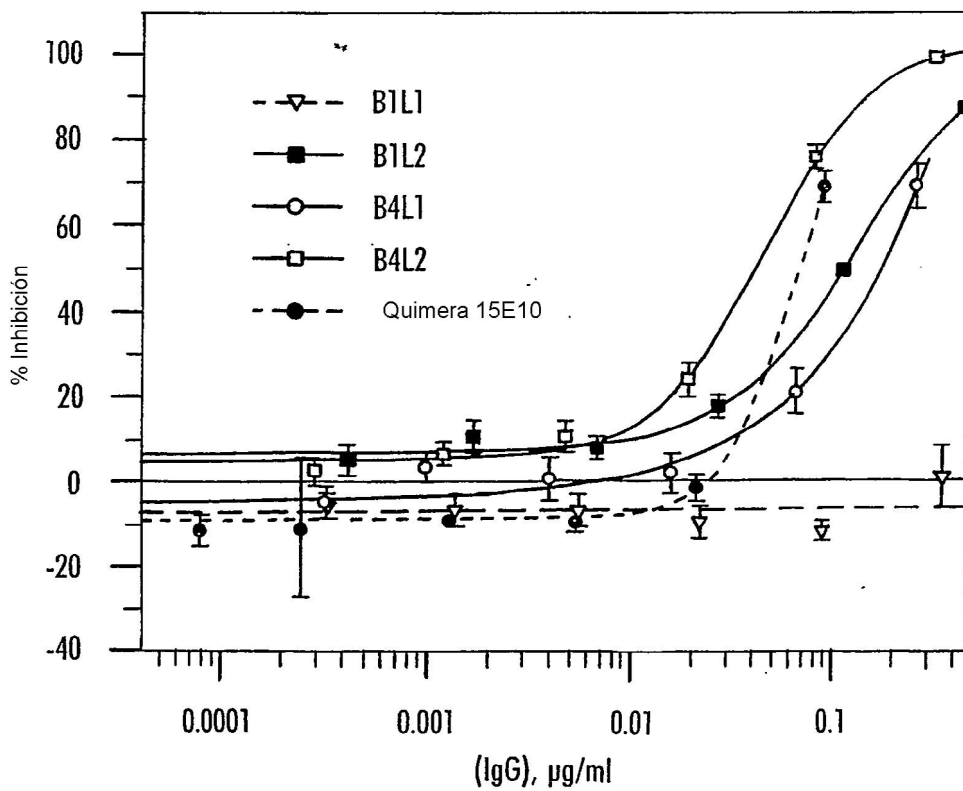
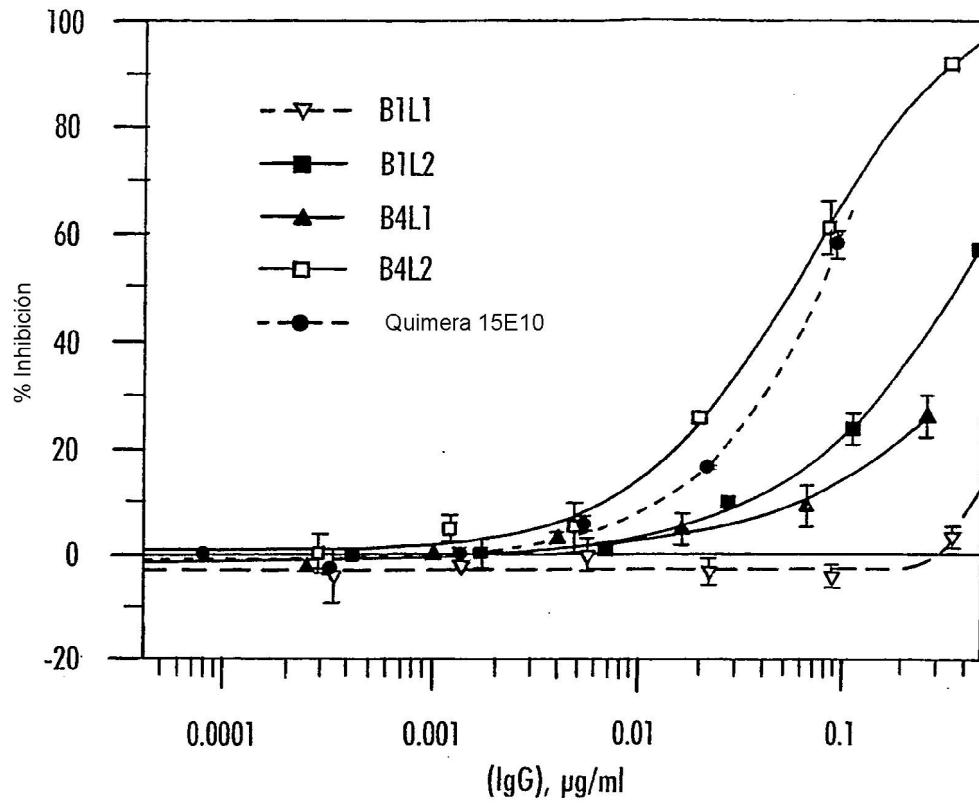
Fig. 4

Fig. 5

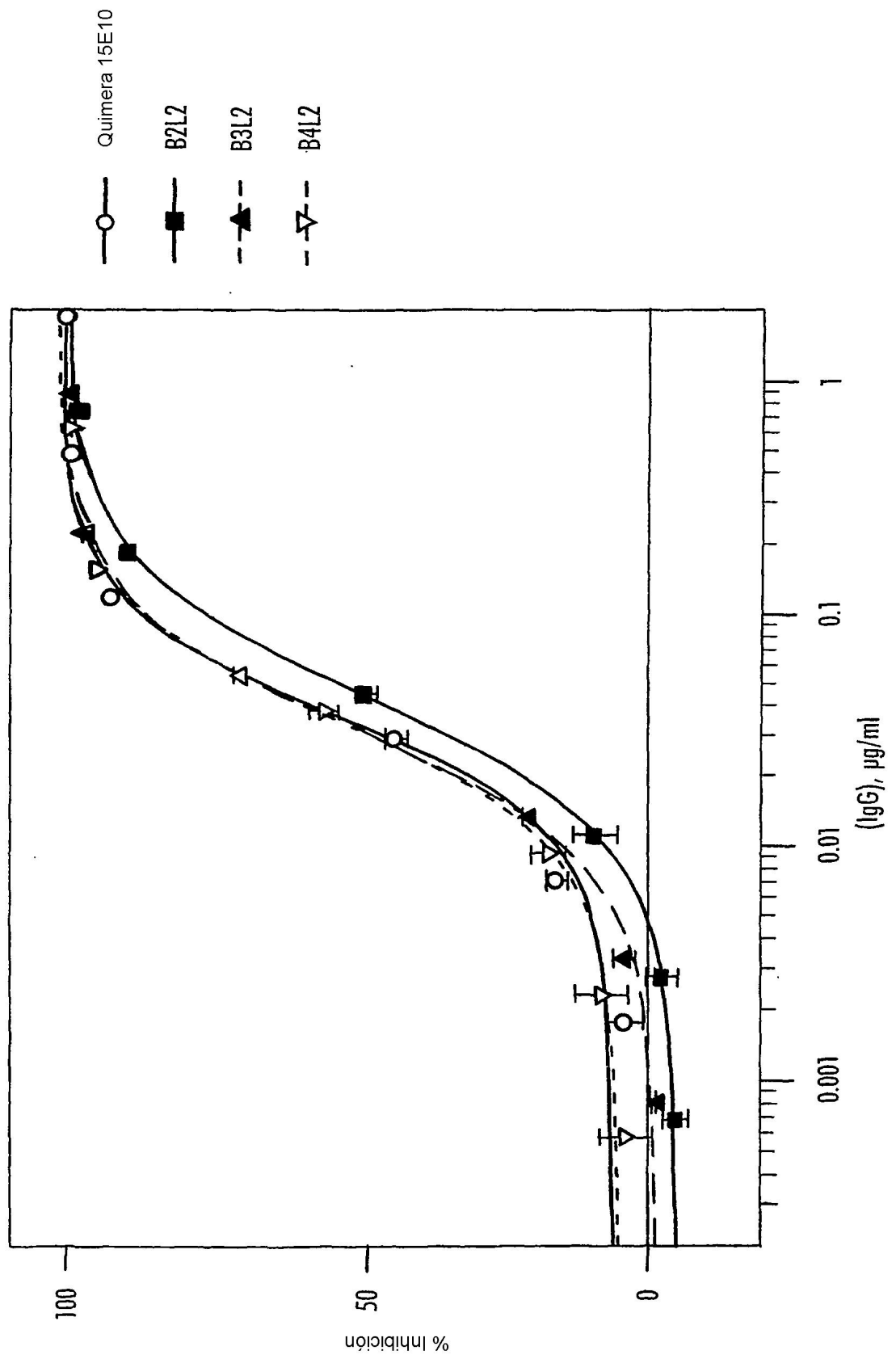


Fig. 6

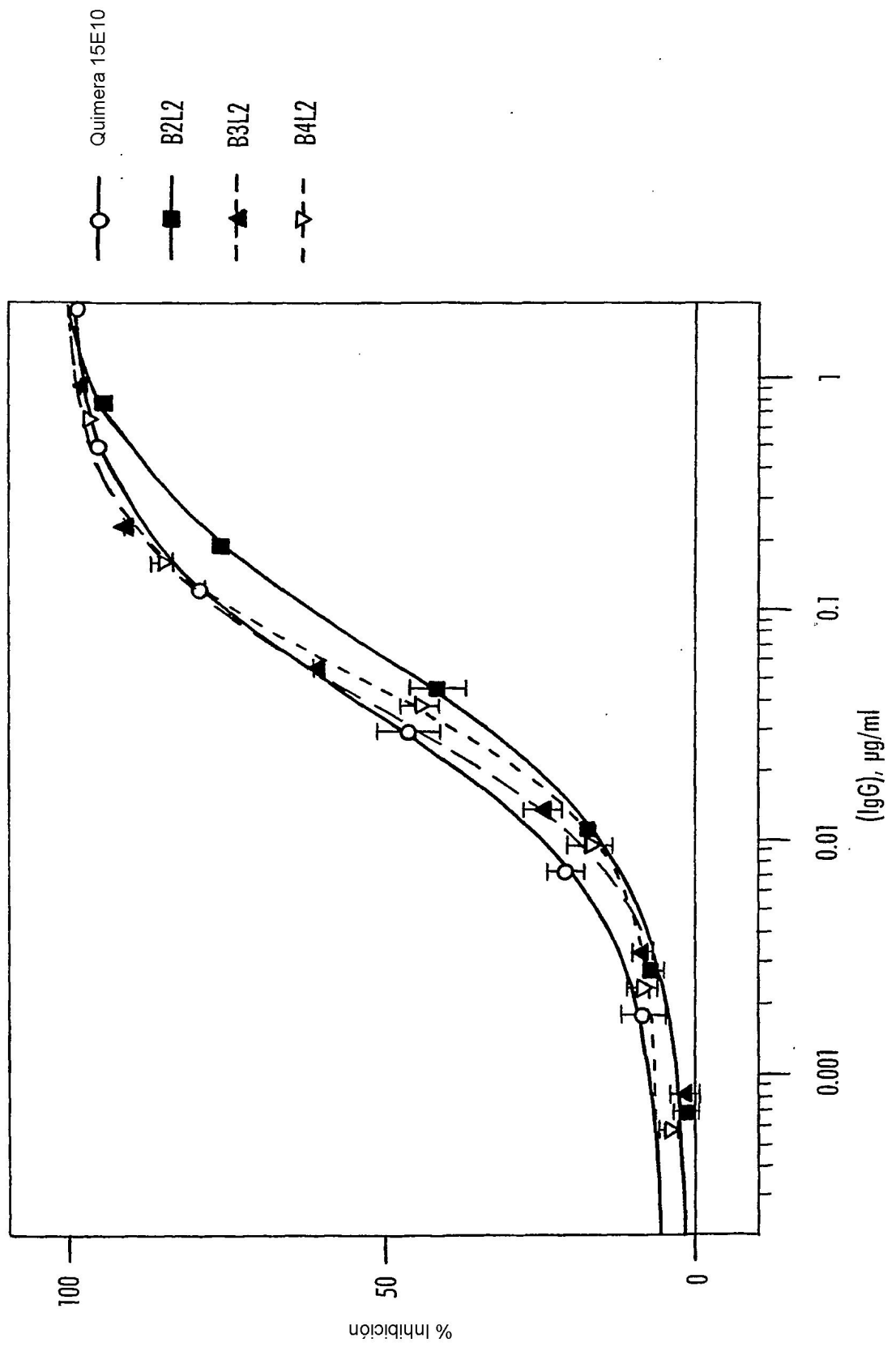


Fig. 7

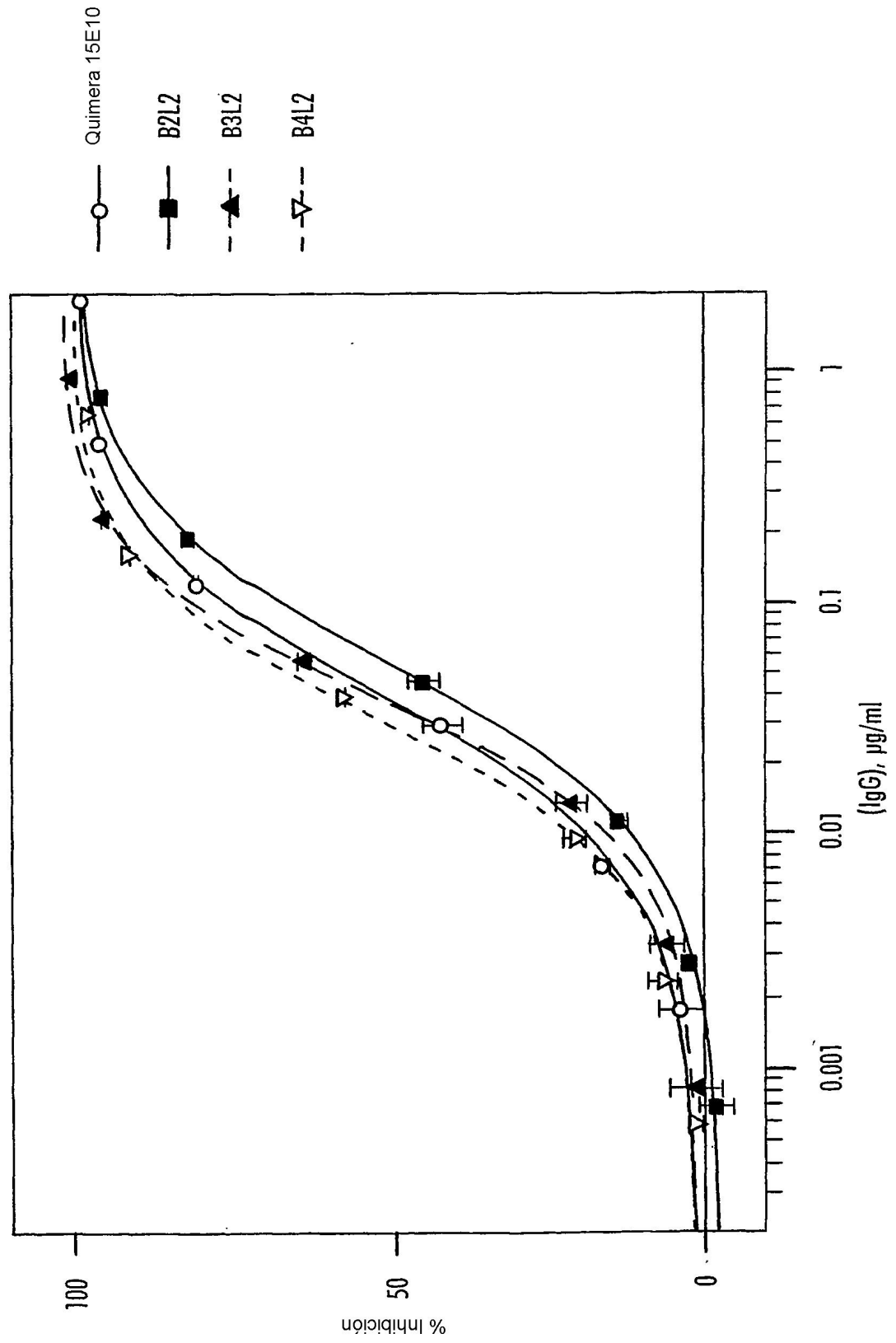
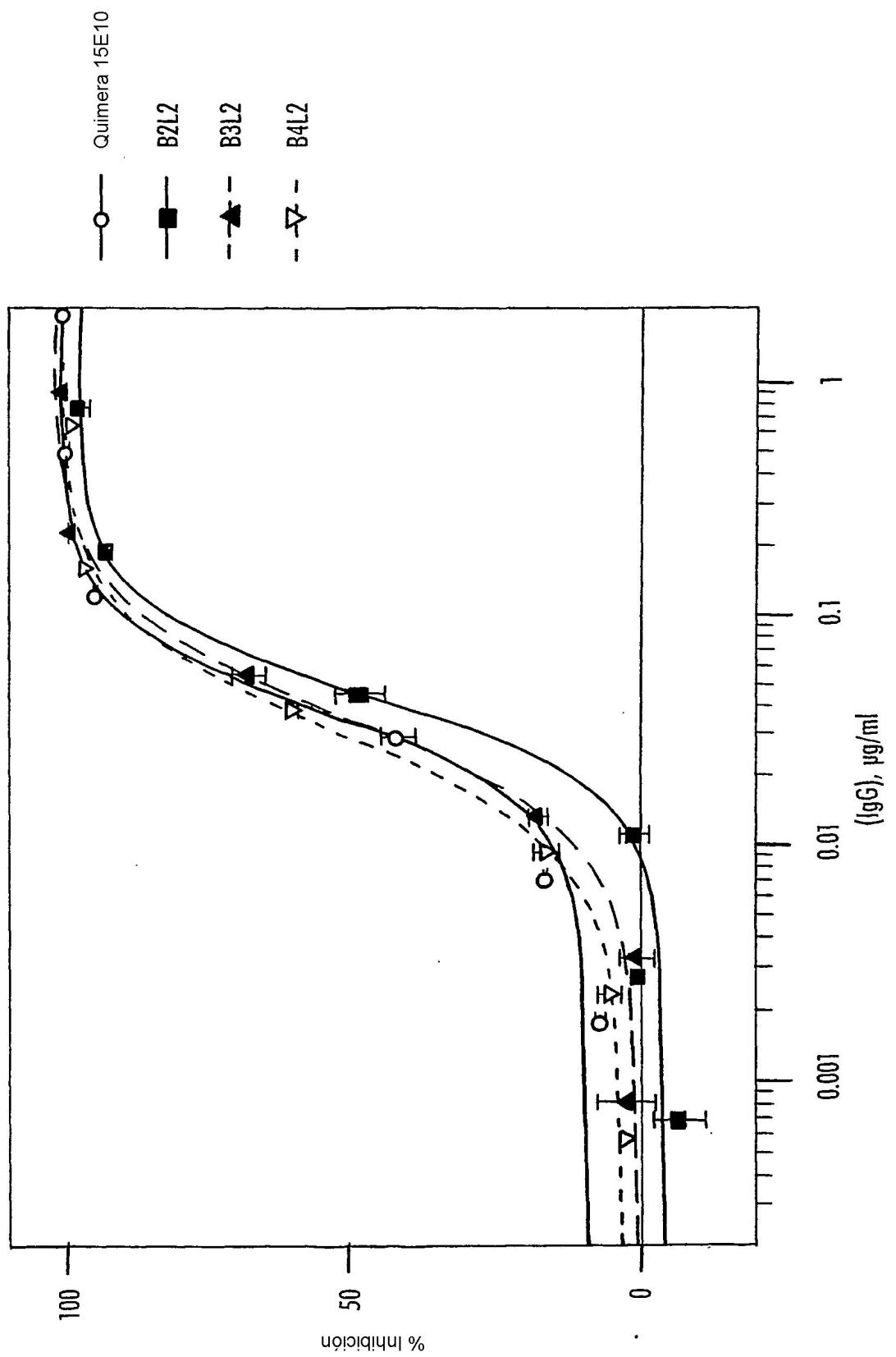


Fig. 8



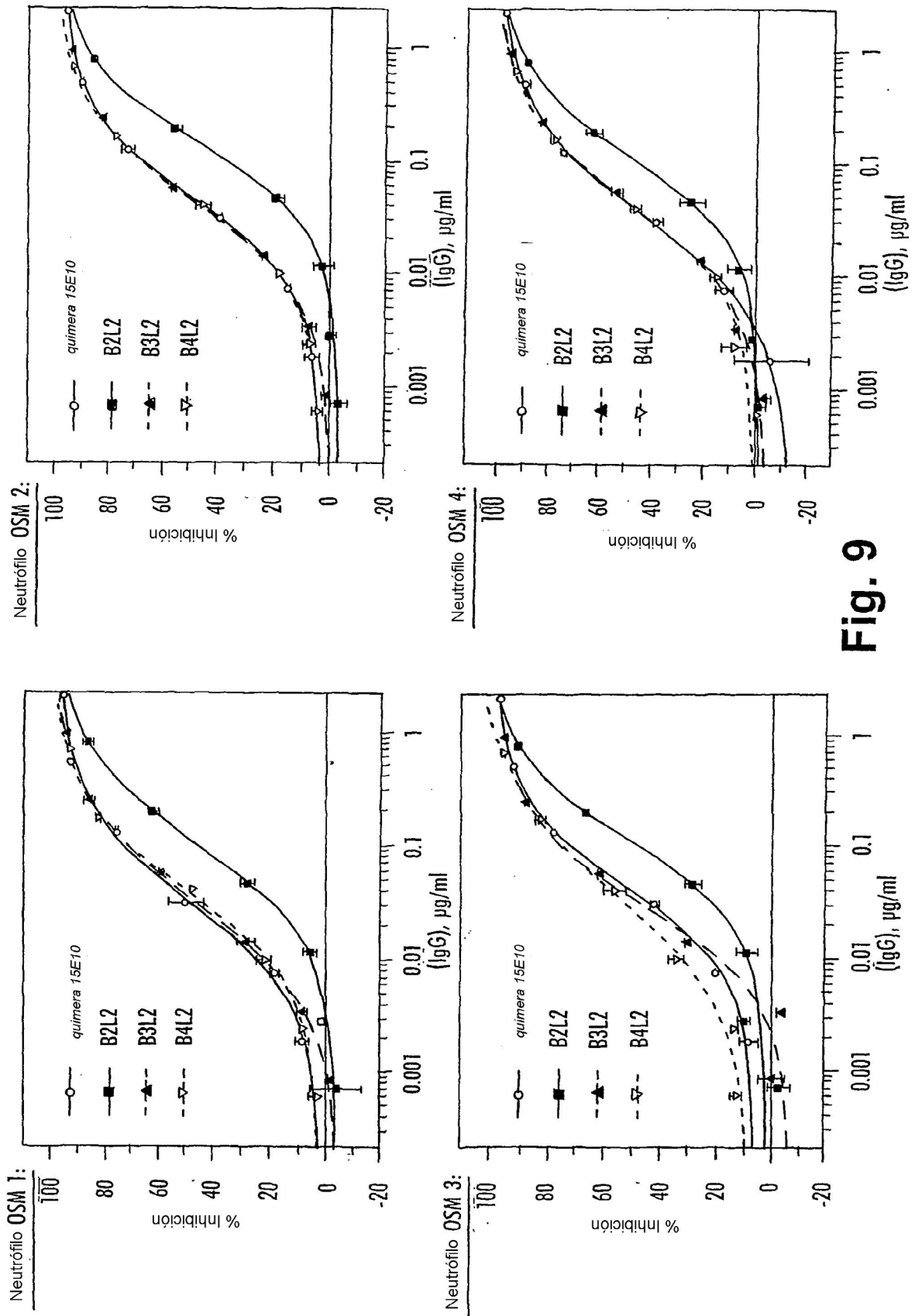


Fig. 9

Fig. 10

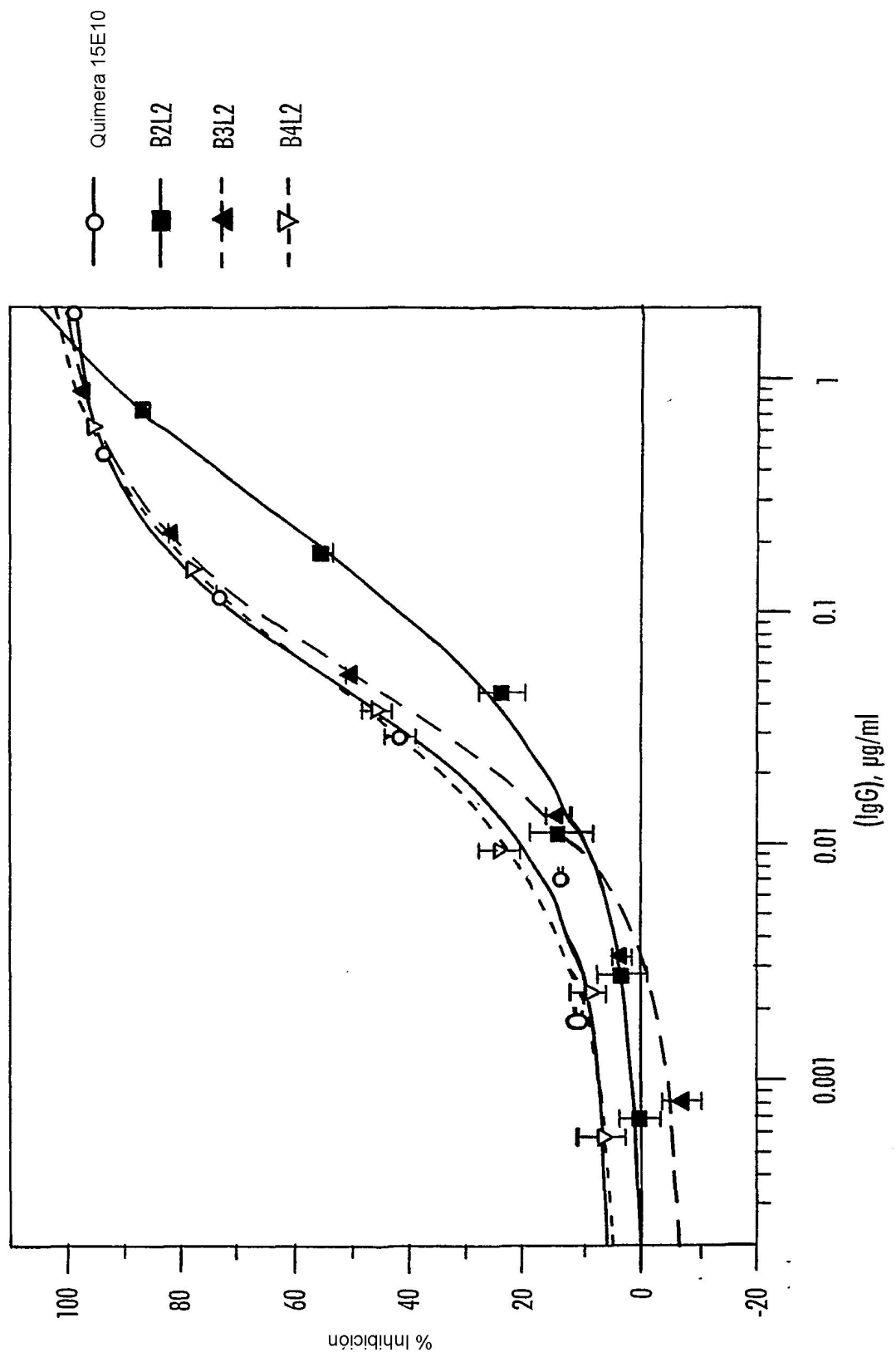


Fig. 11

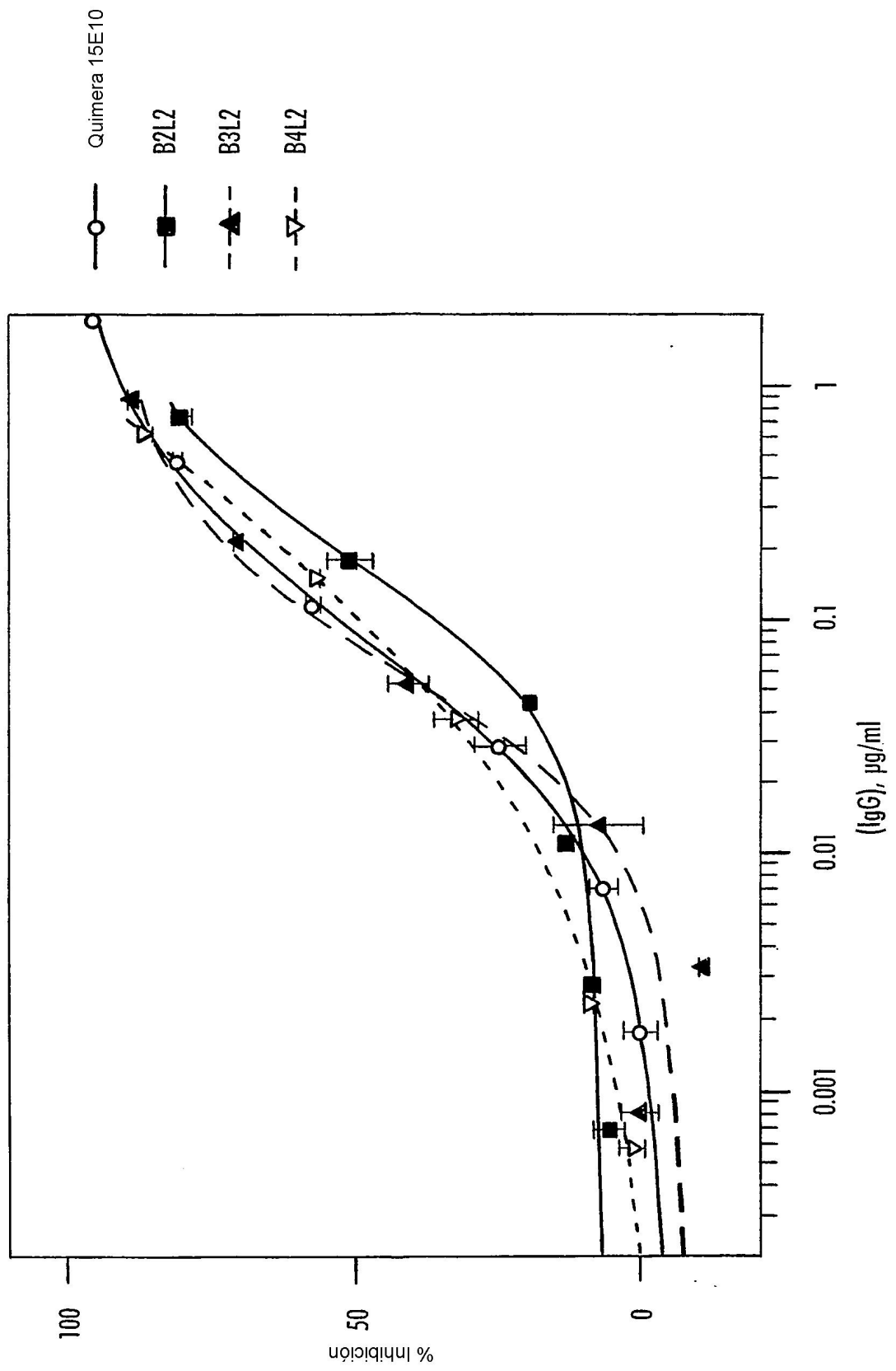


Fig. 12

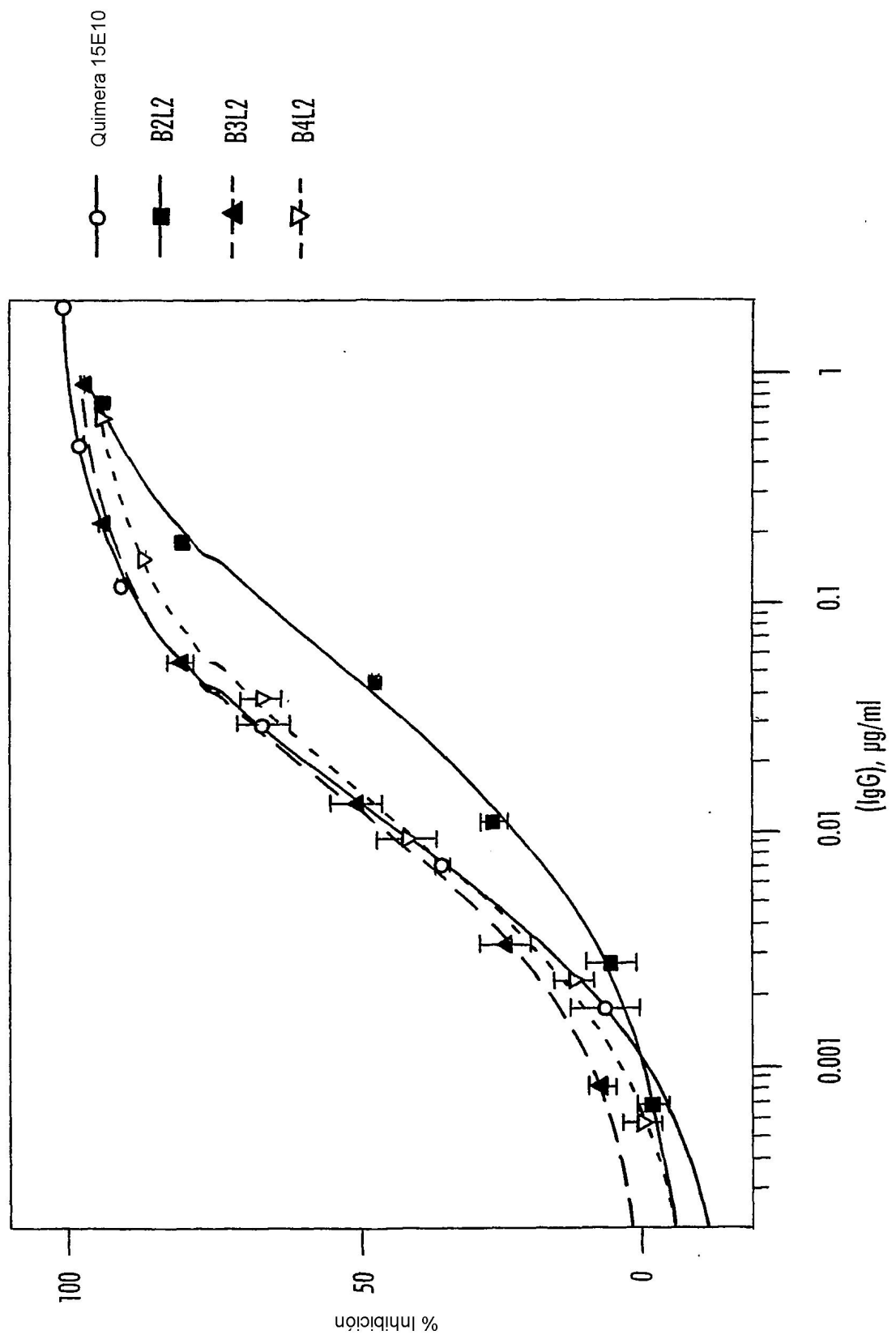


Fig. 13

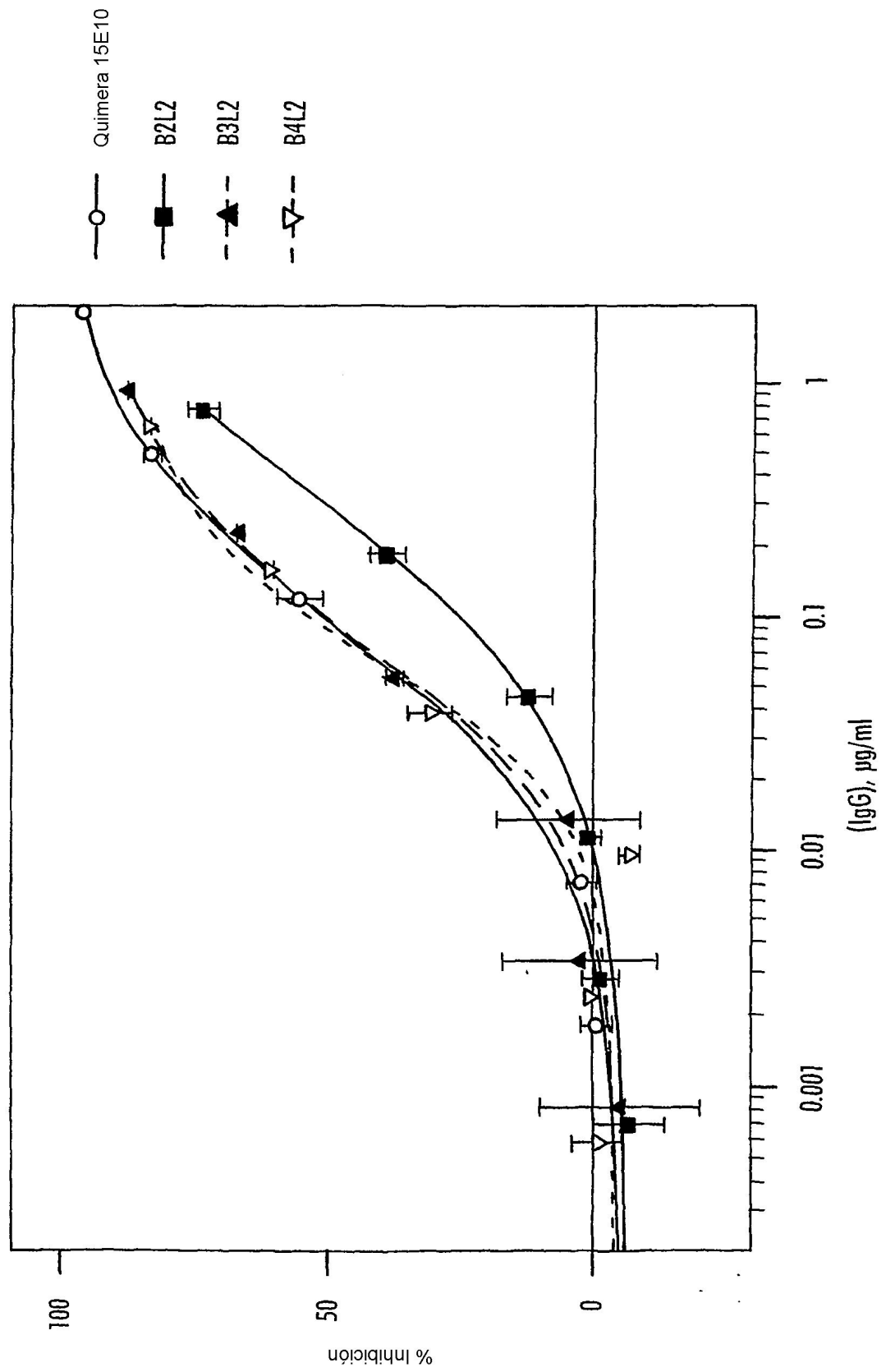


Fig. 14

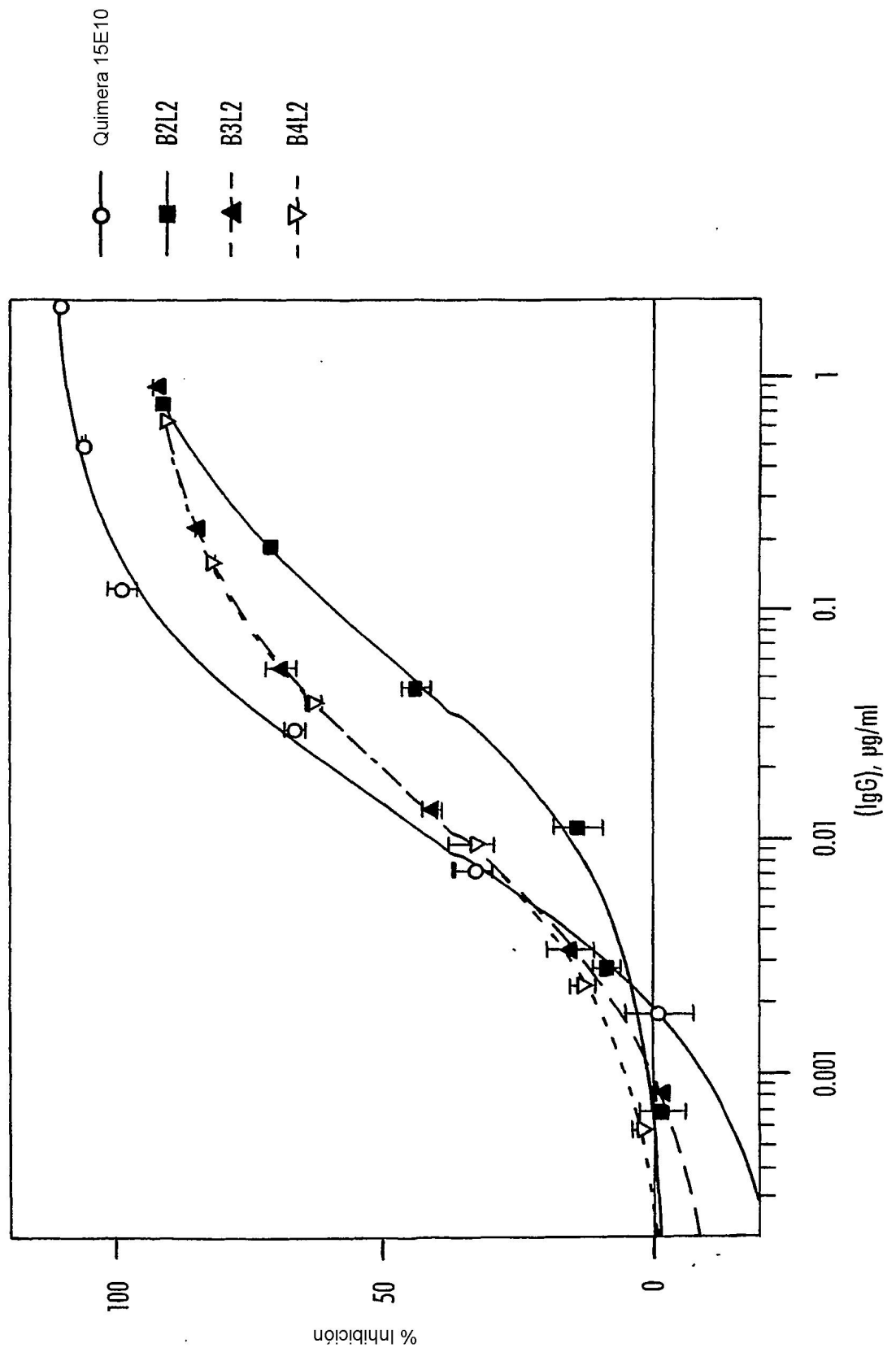


Fig. 15

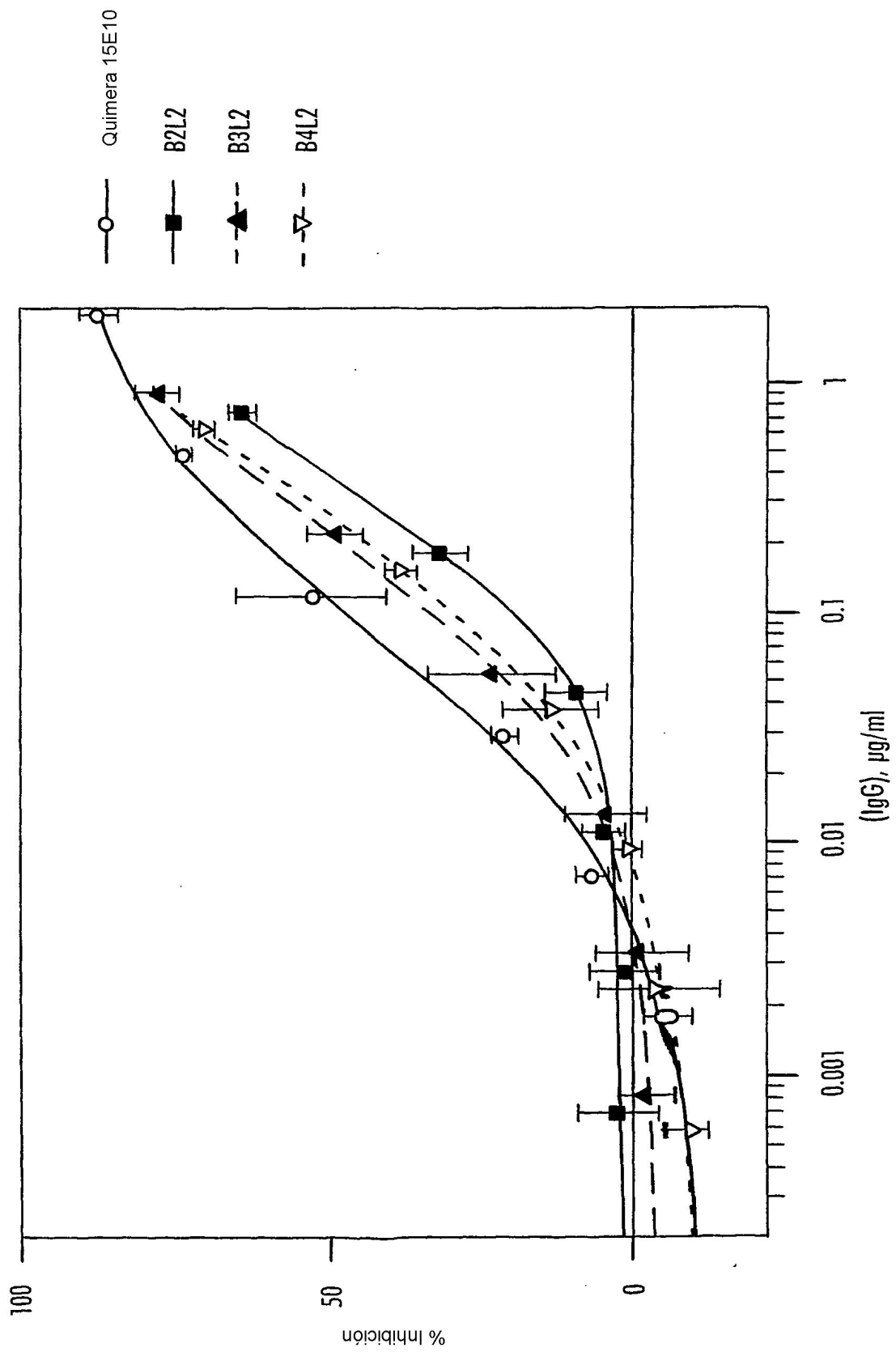


Fig. 16

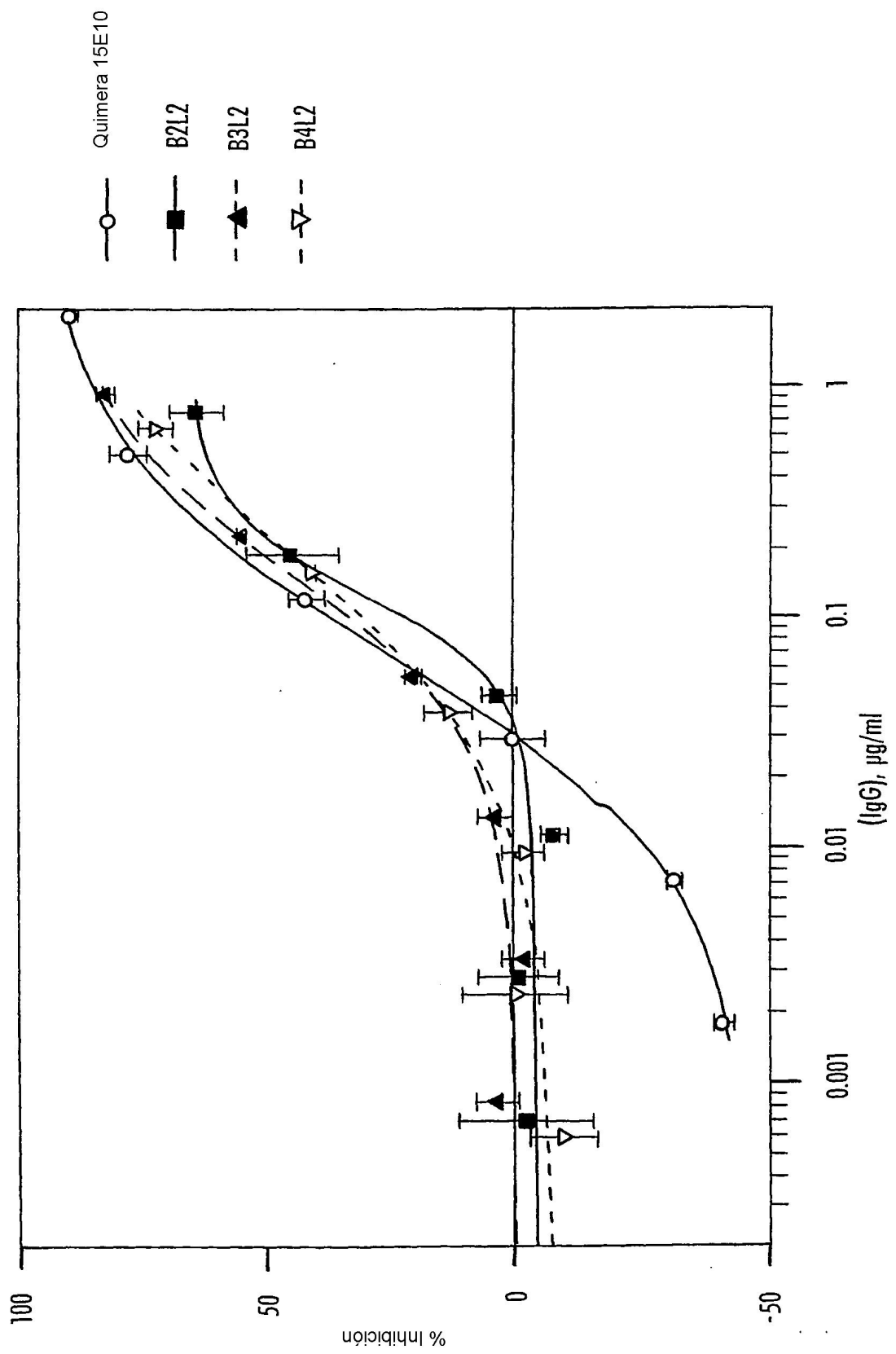


Fig. 17

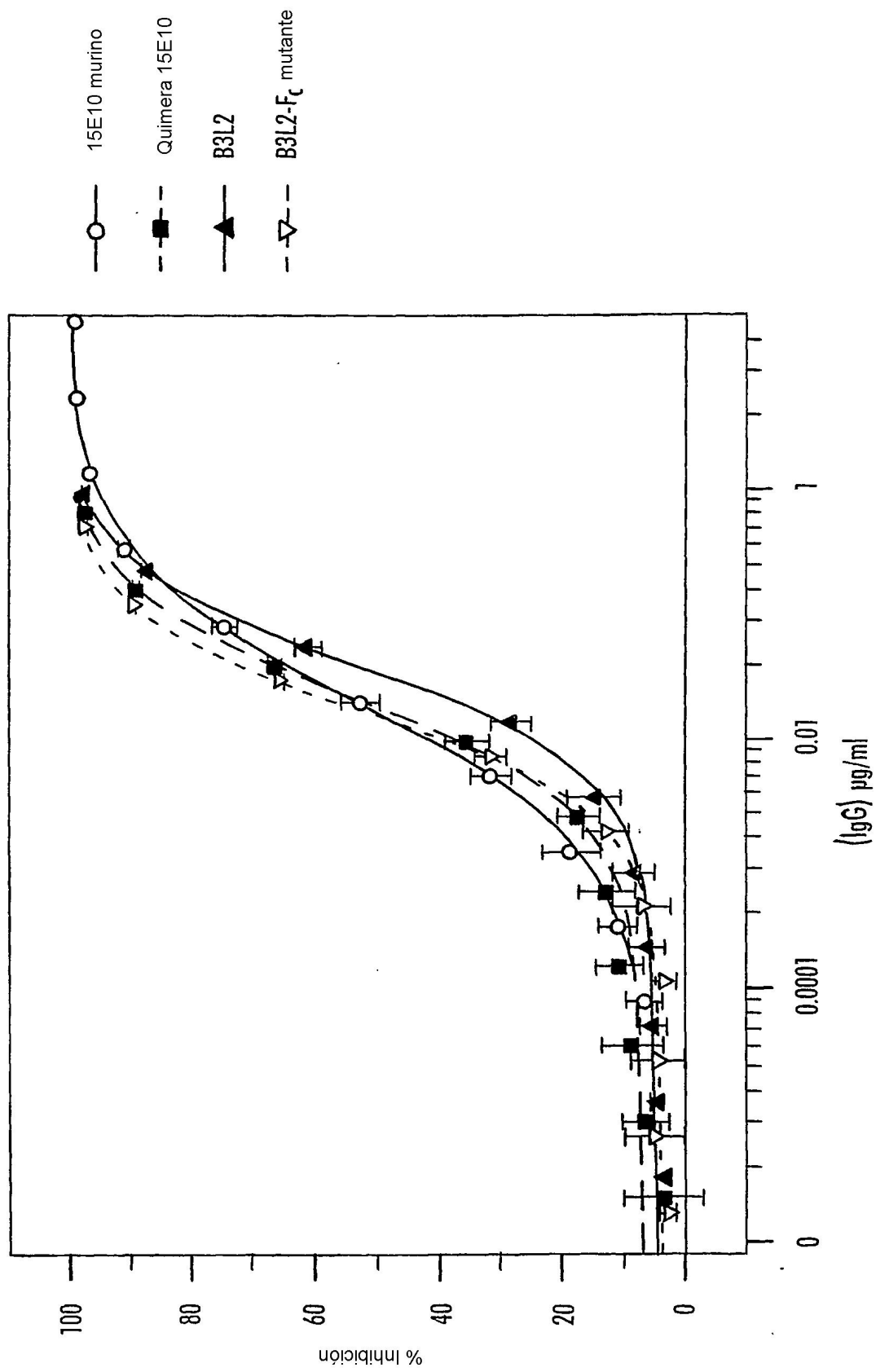


Fig. 18

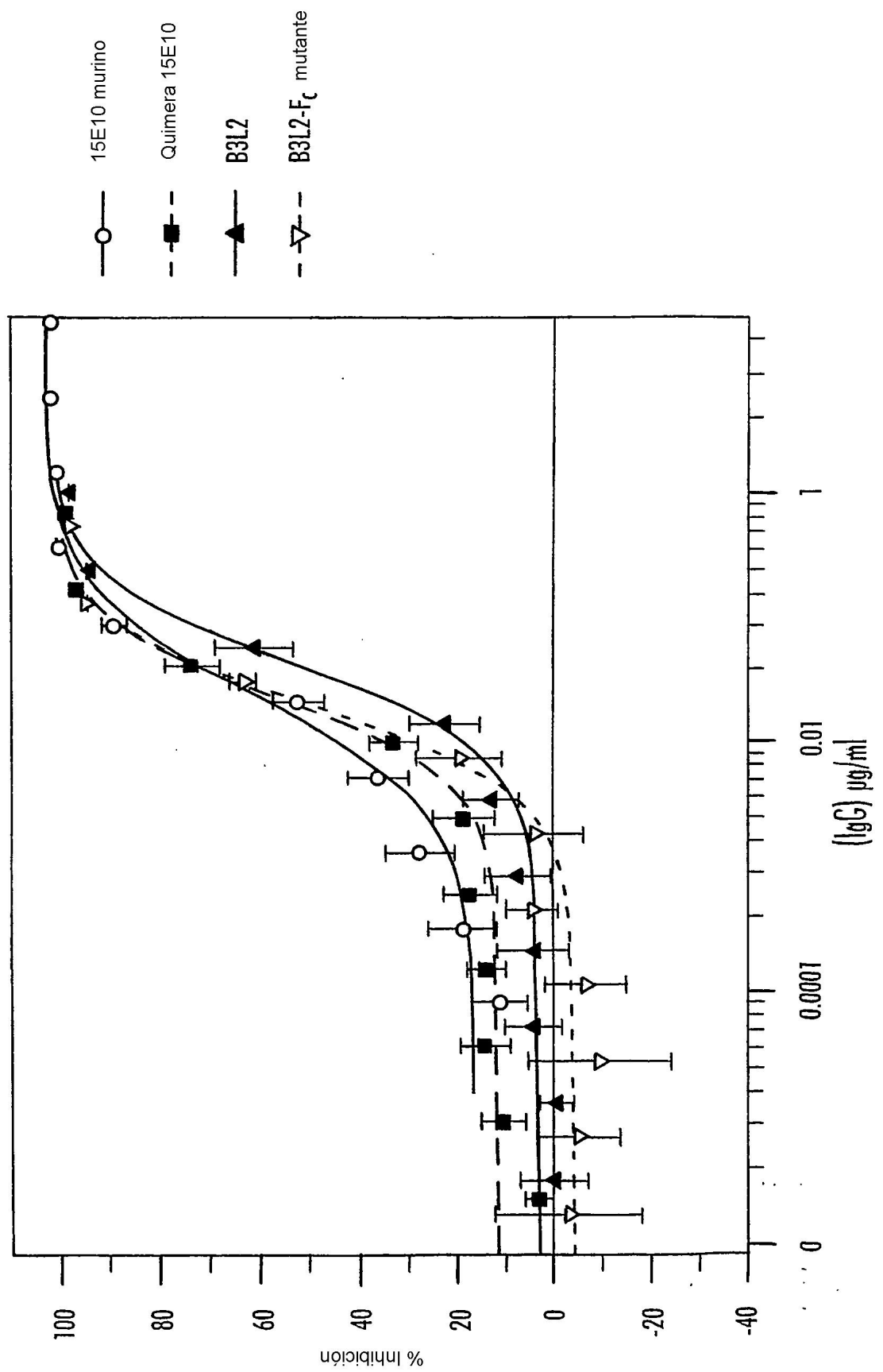


Fig. 19

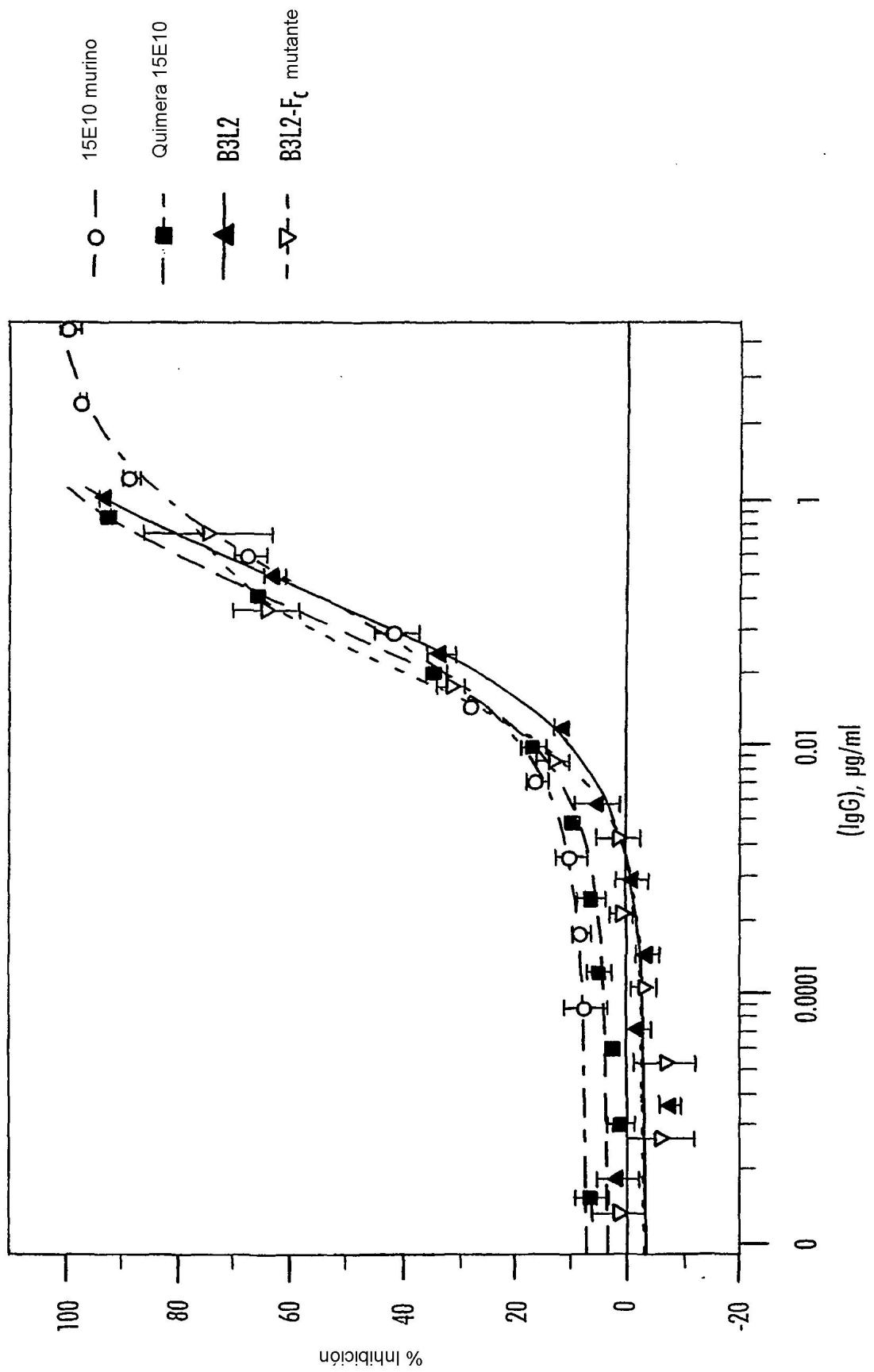


Fig. 20

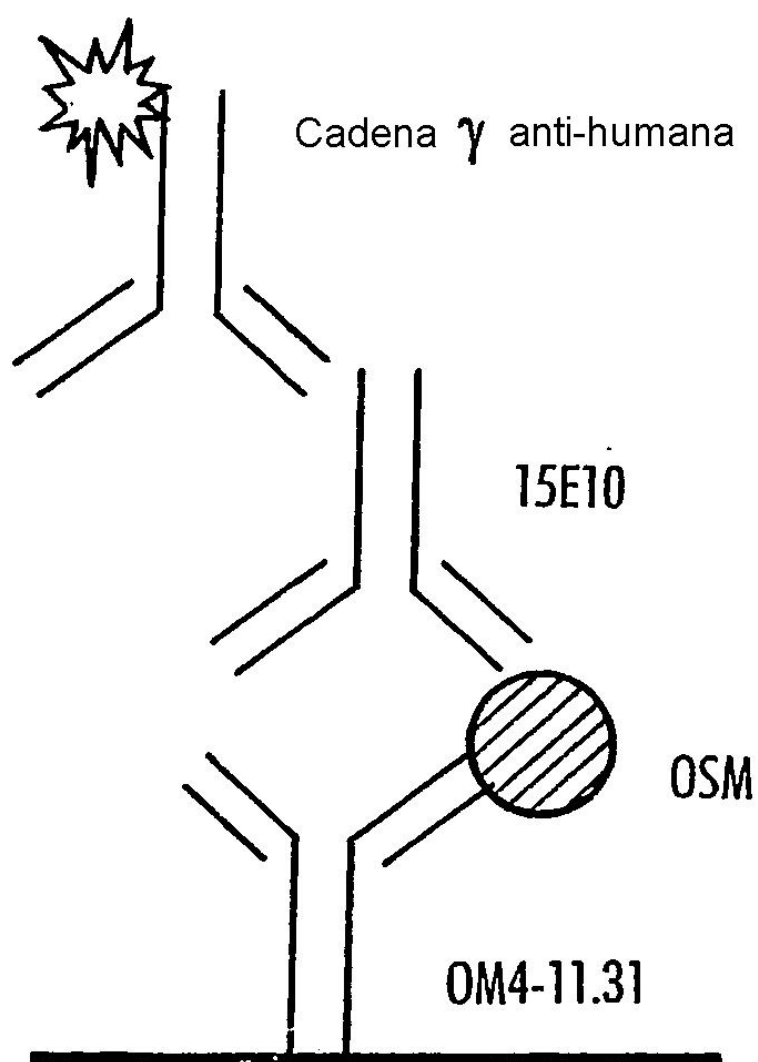
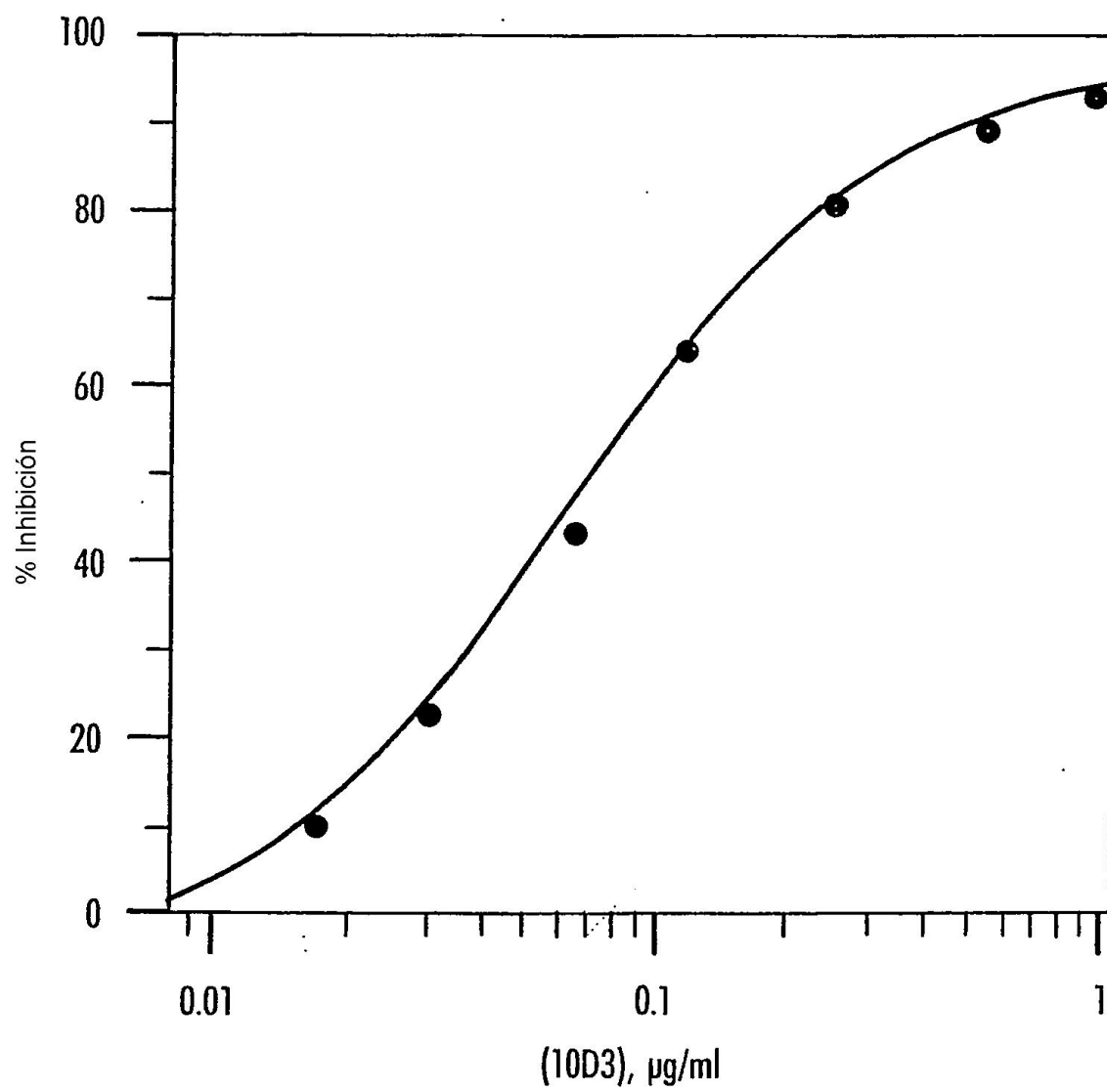


Fig. 21

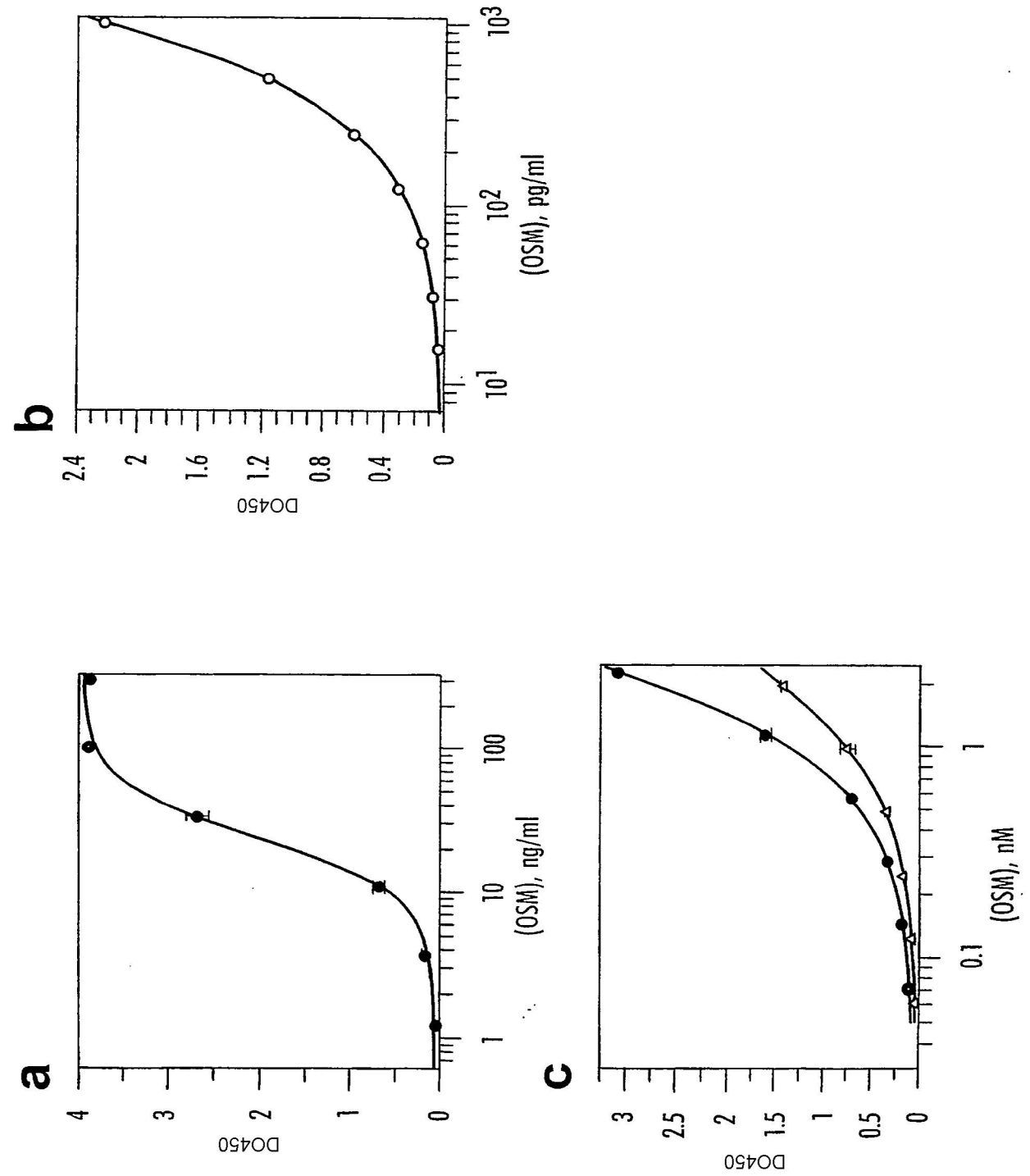


Fig. 23

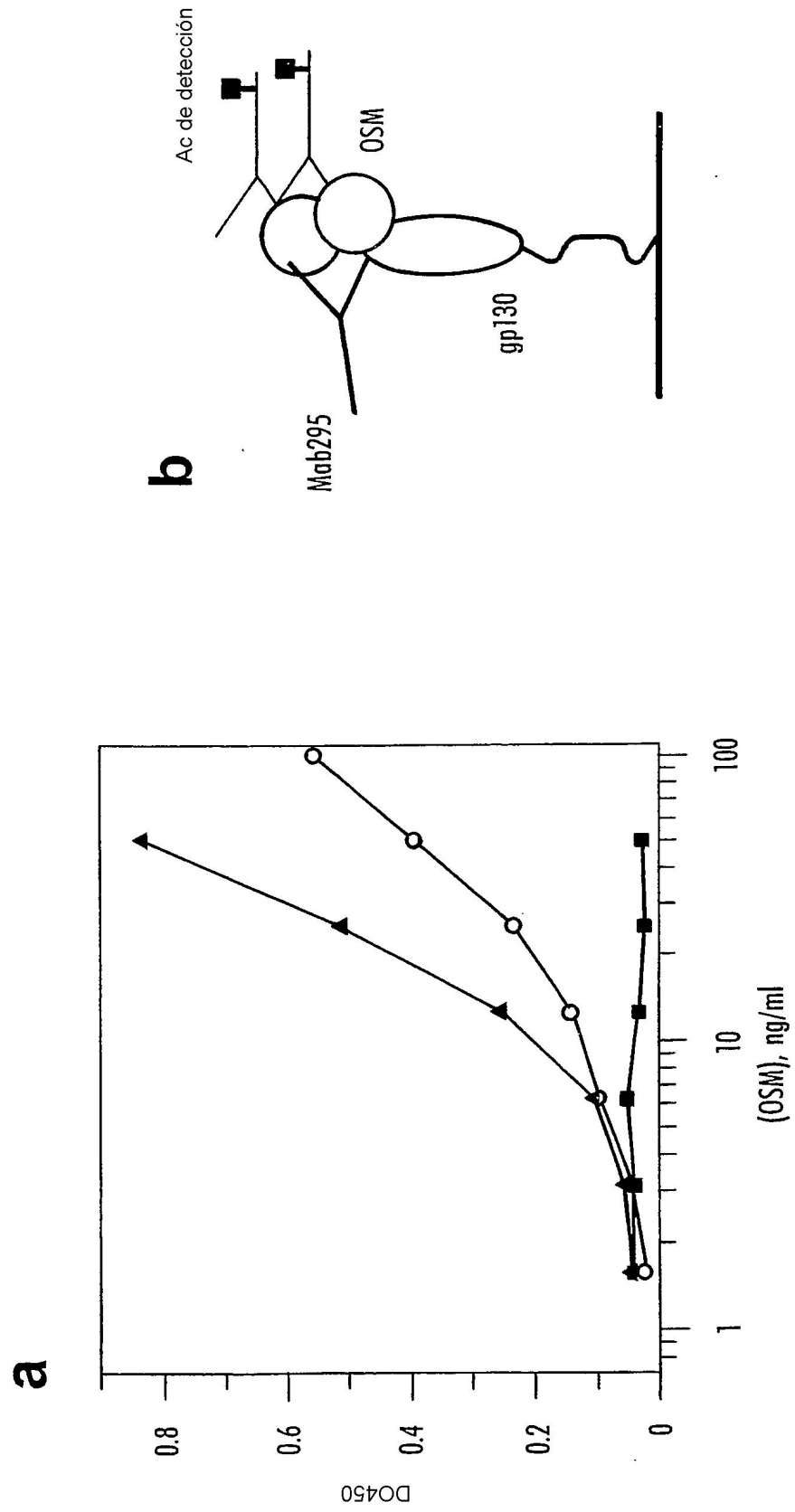


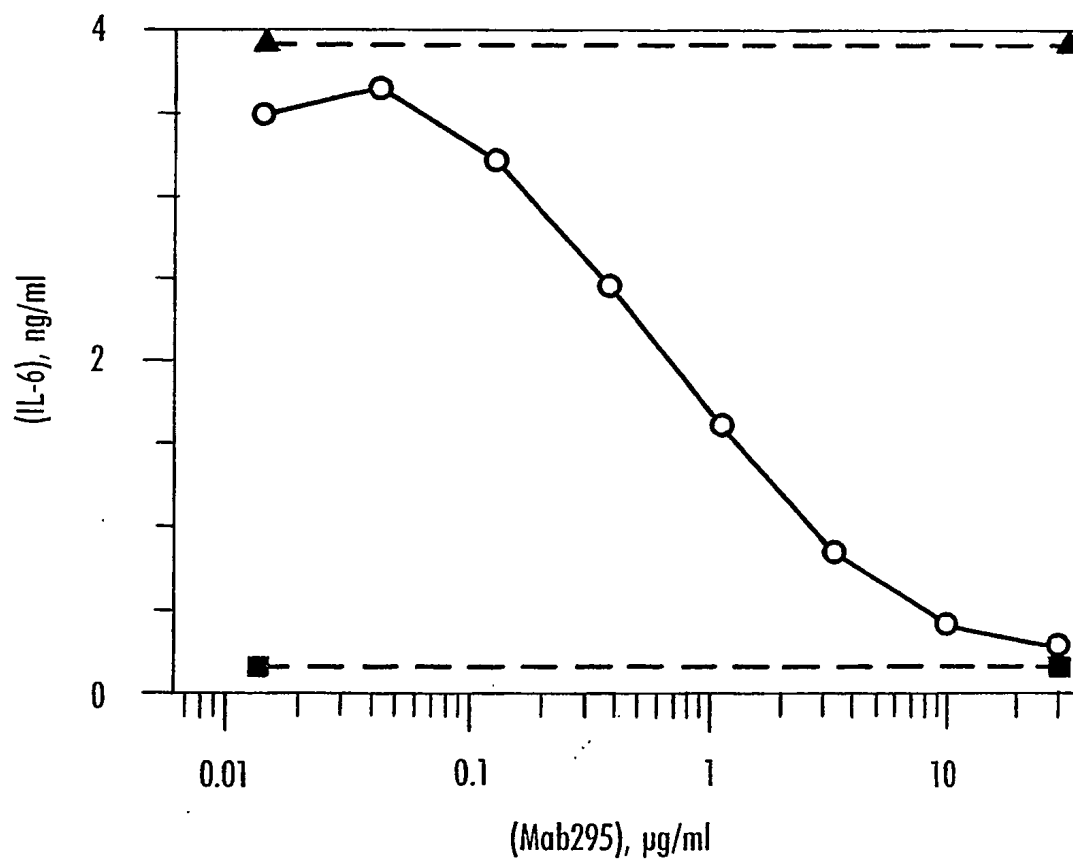
Fig. 24

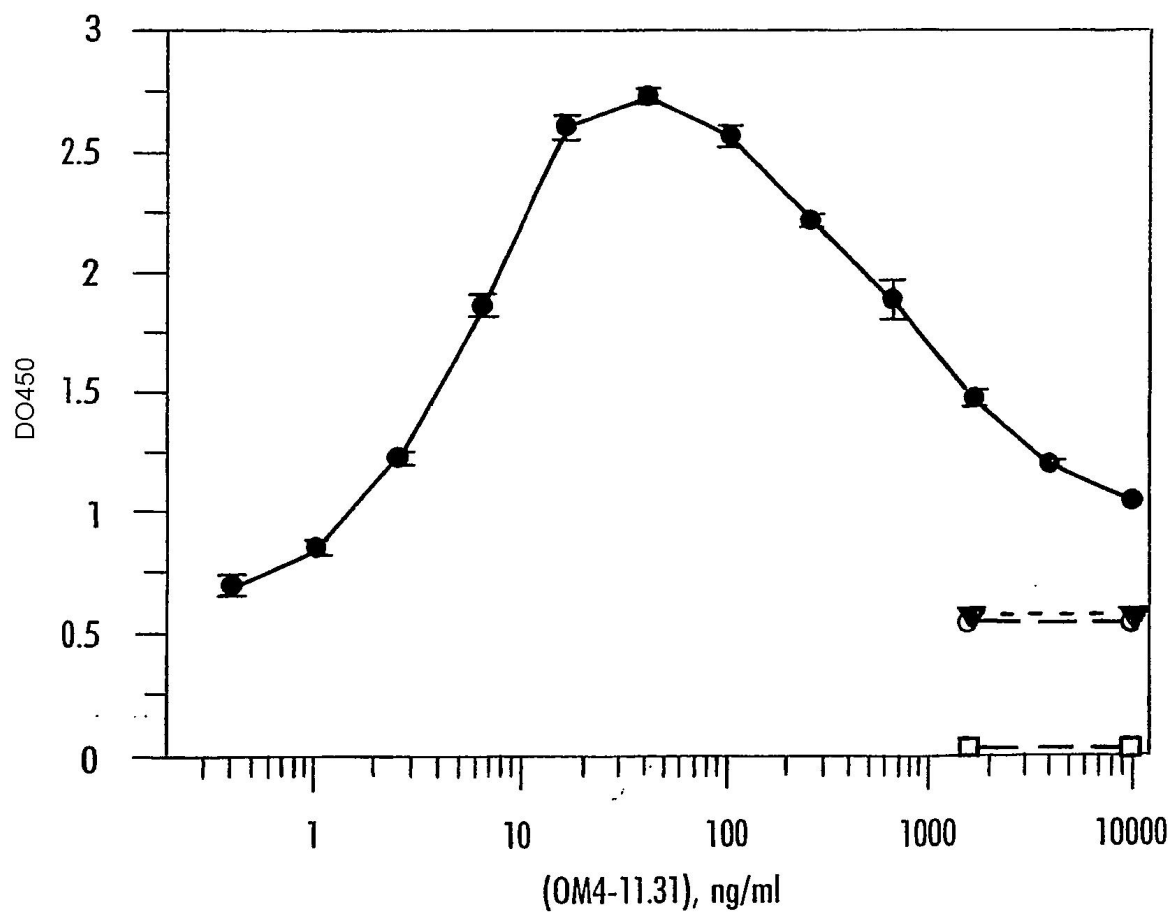
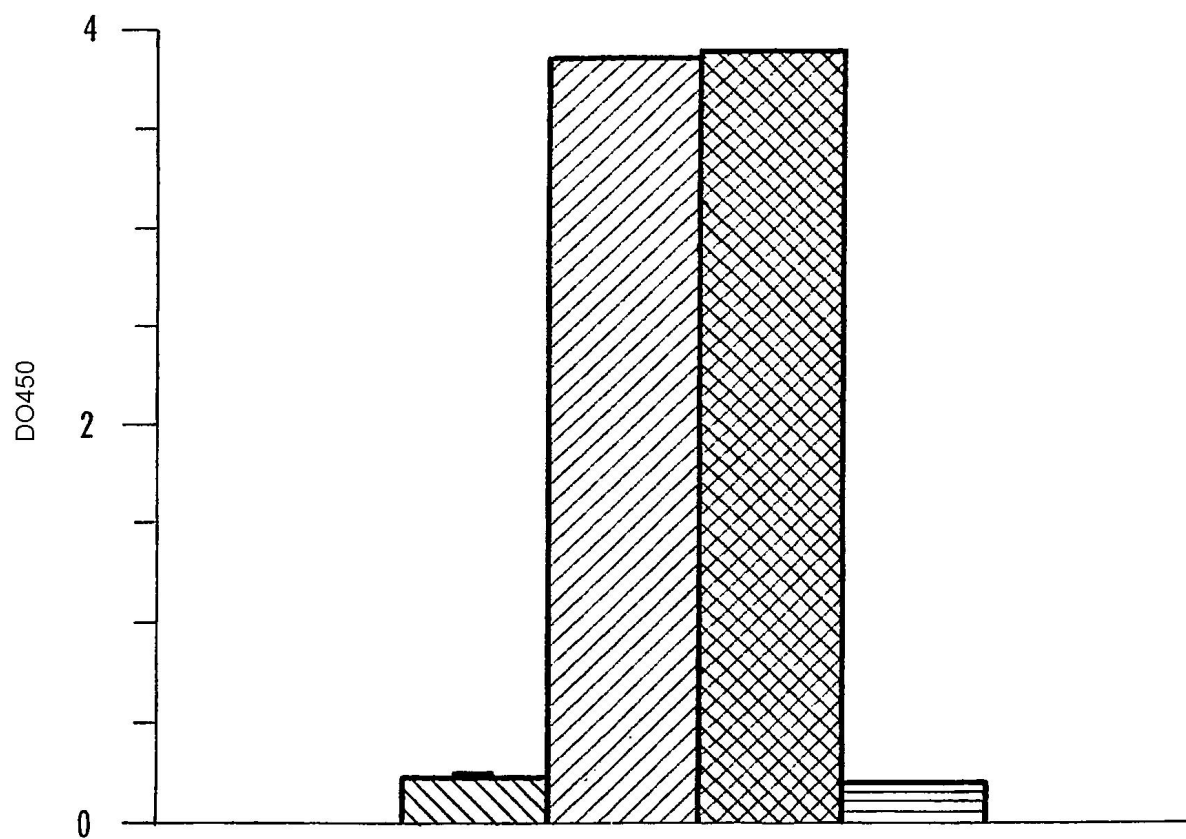
Fig. 25

Fig. 26



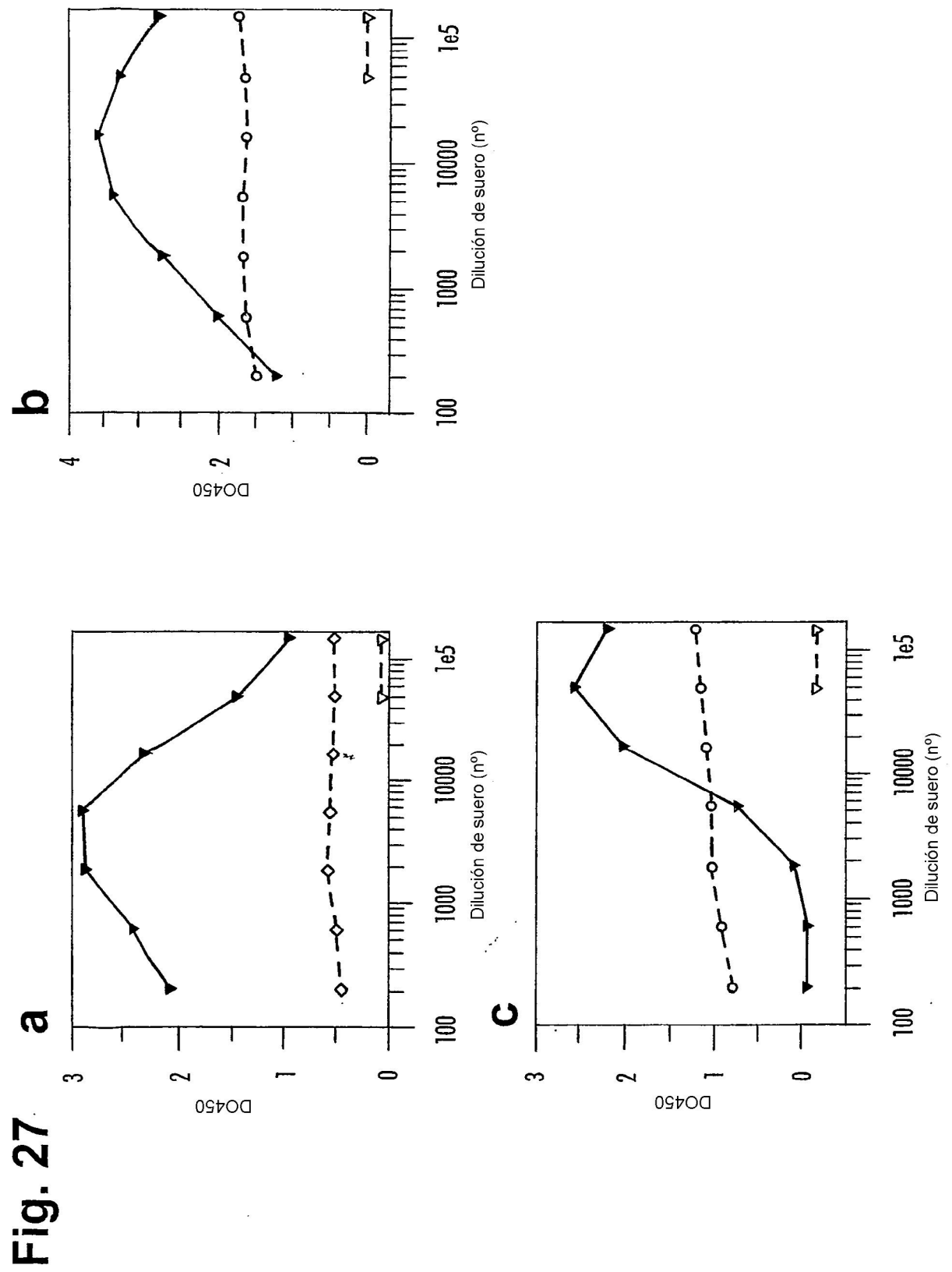


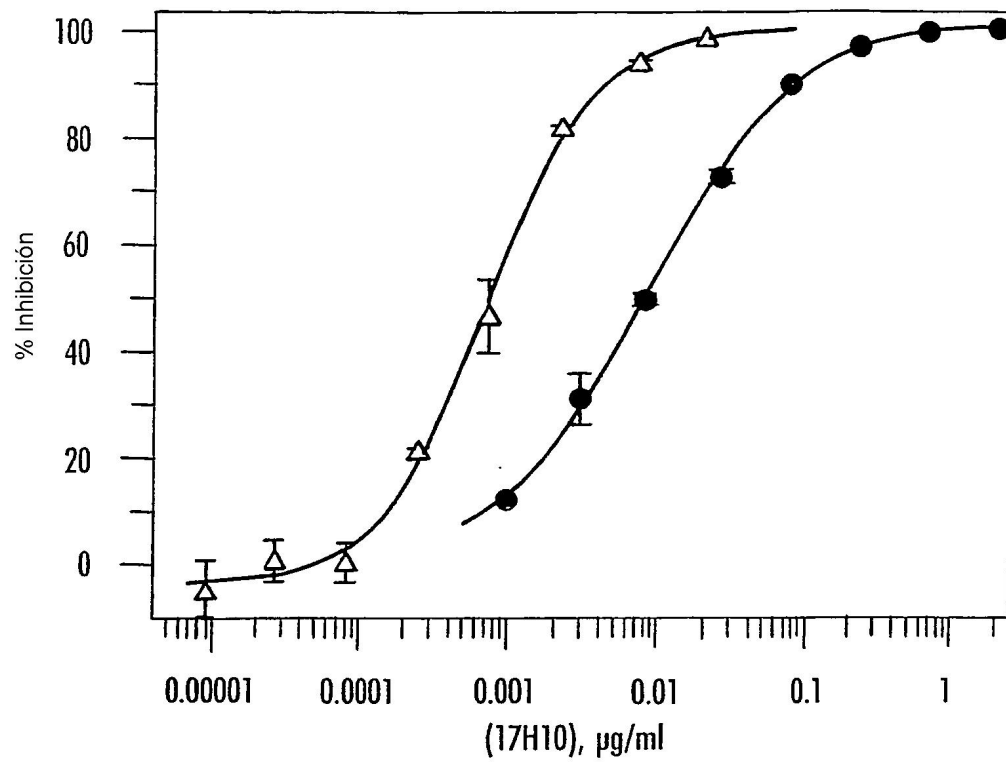
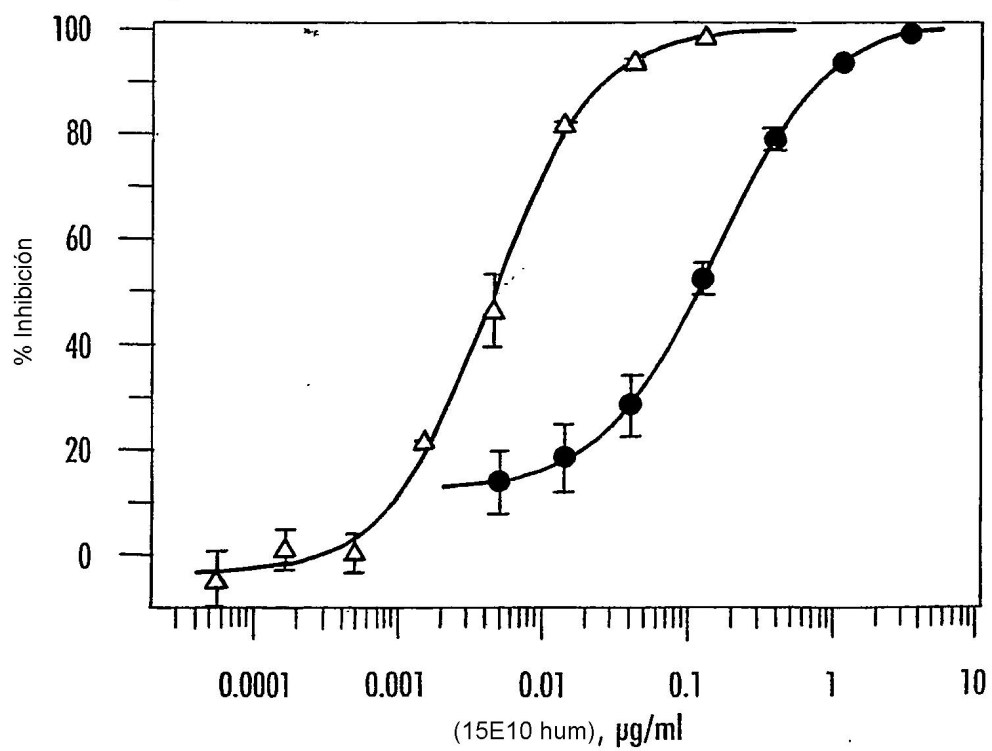
Fig. 28**a****b**

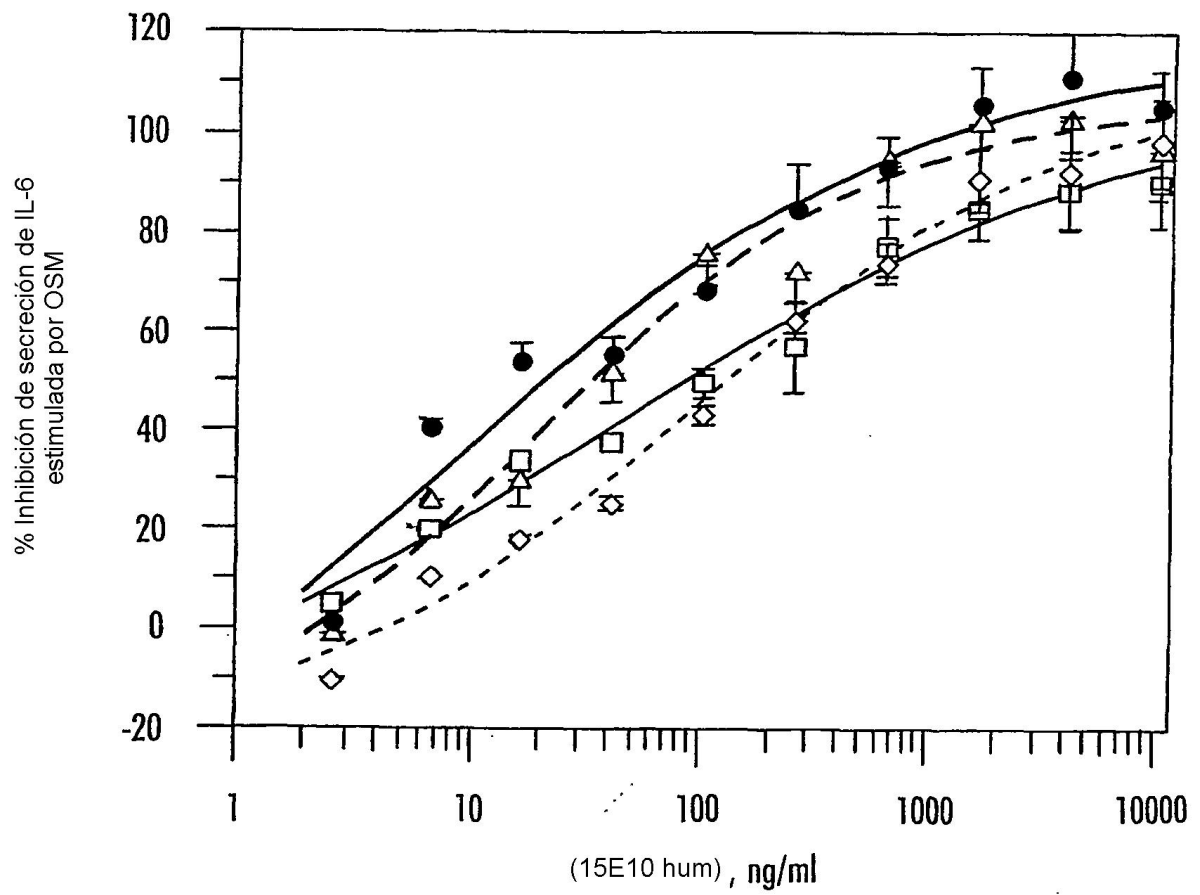
Fig. 29

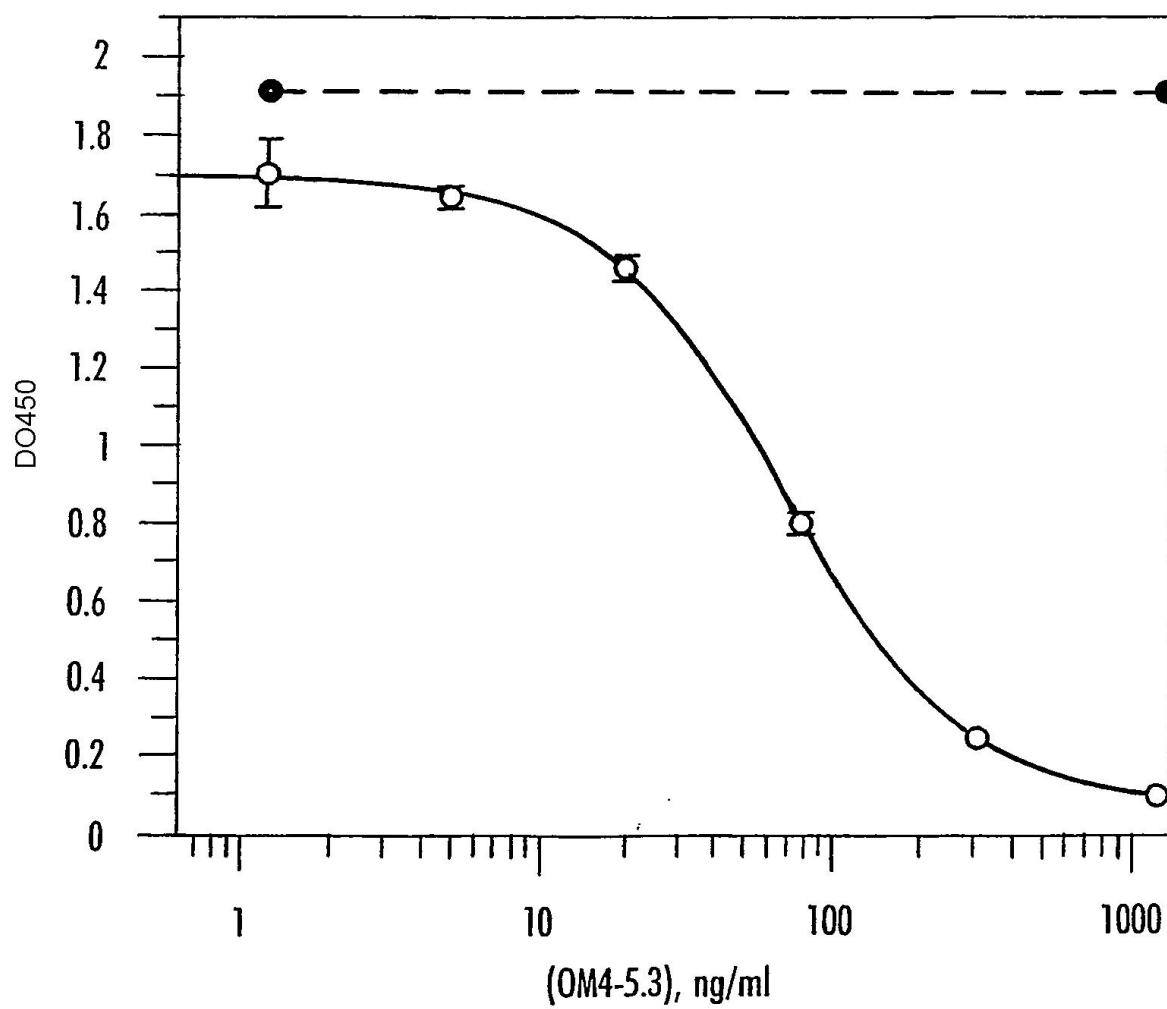
Fig. 30

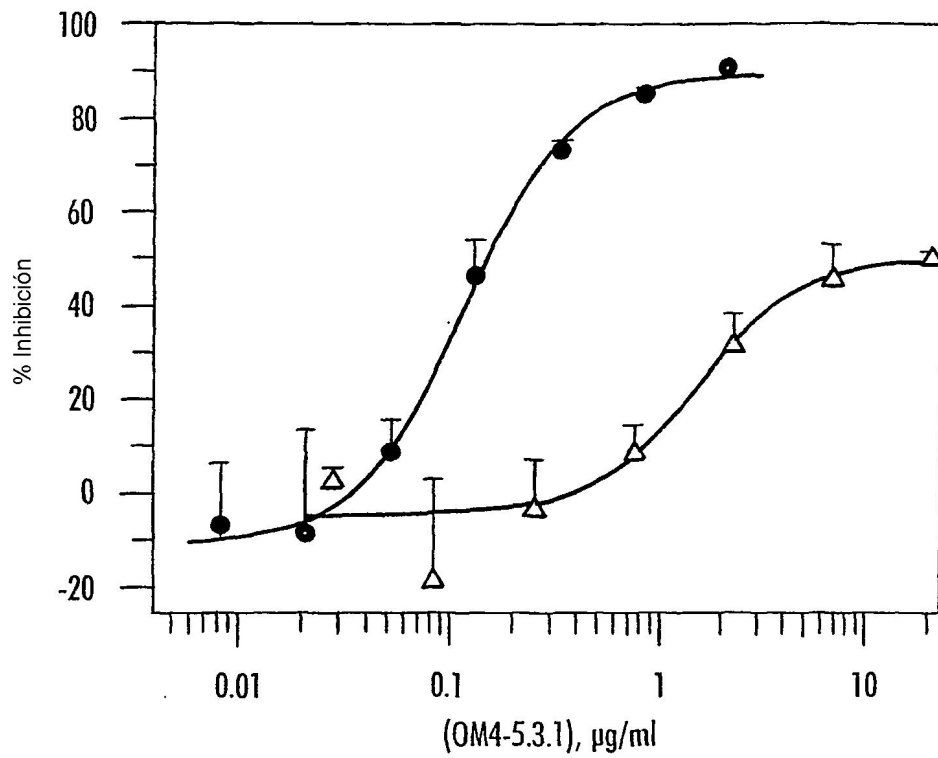
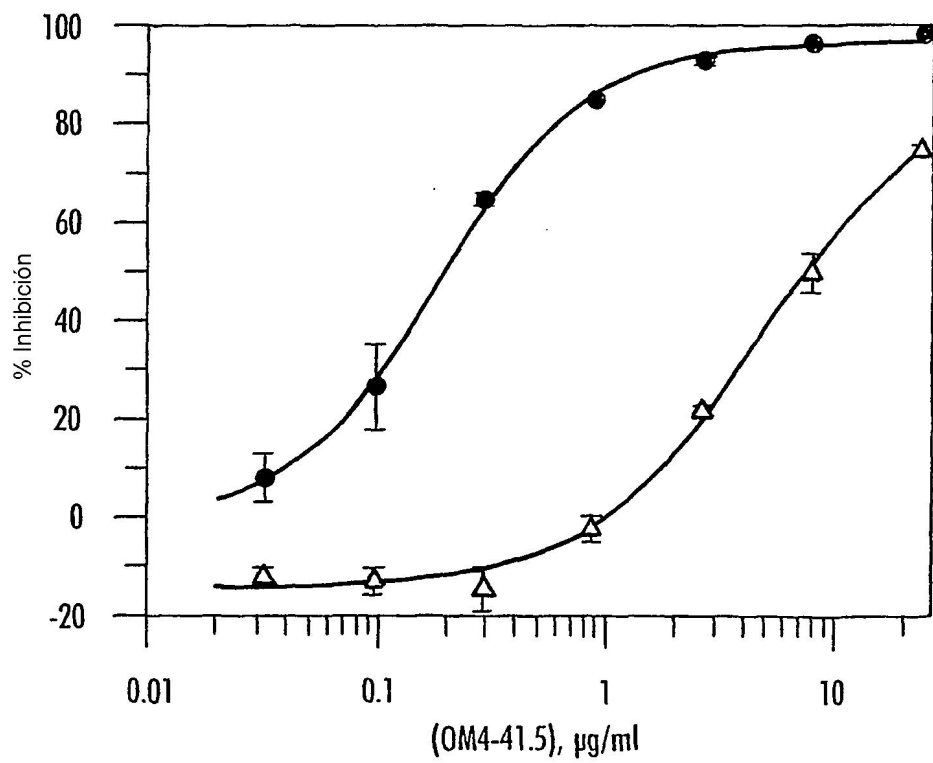
Fig. 31**a****b**

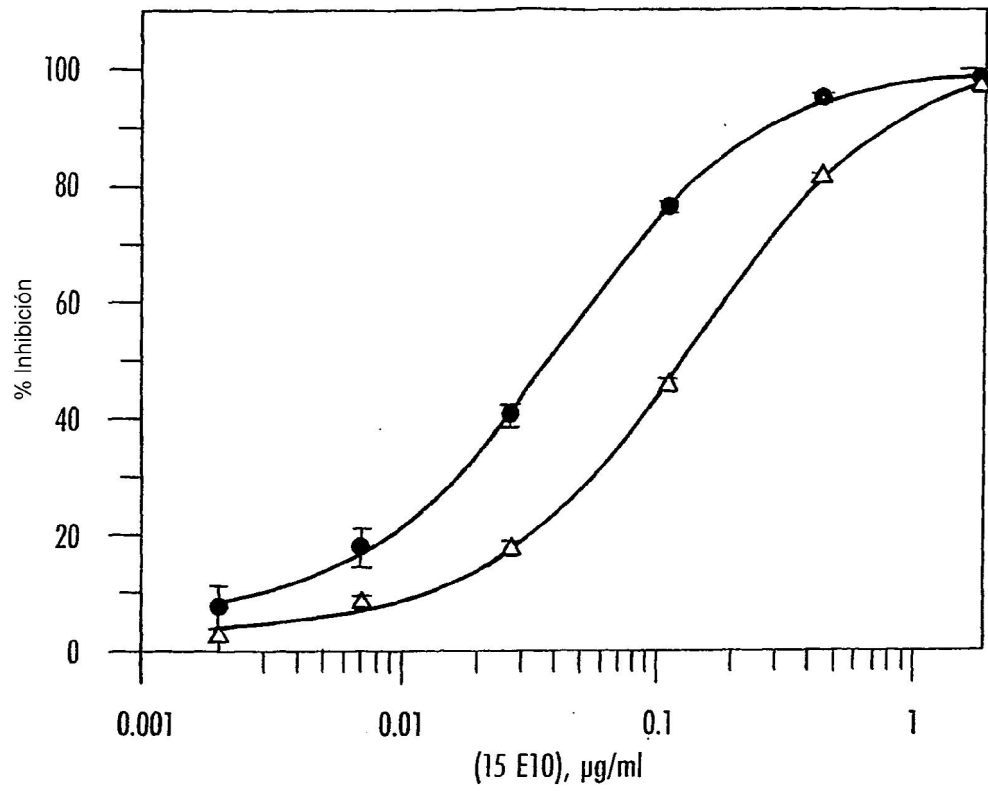
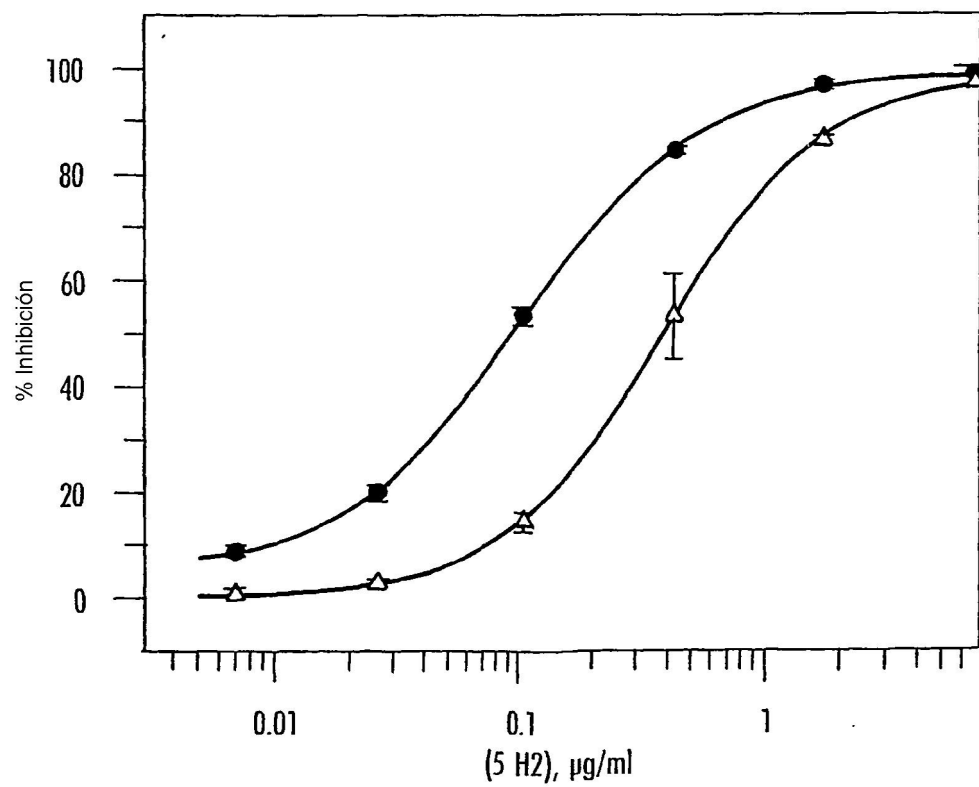
Fig. 32 a**b**

Fig. 33

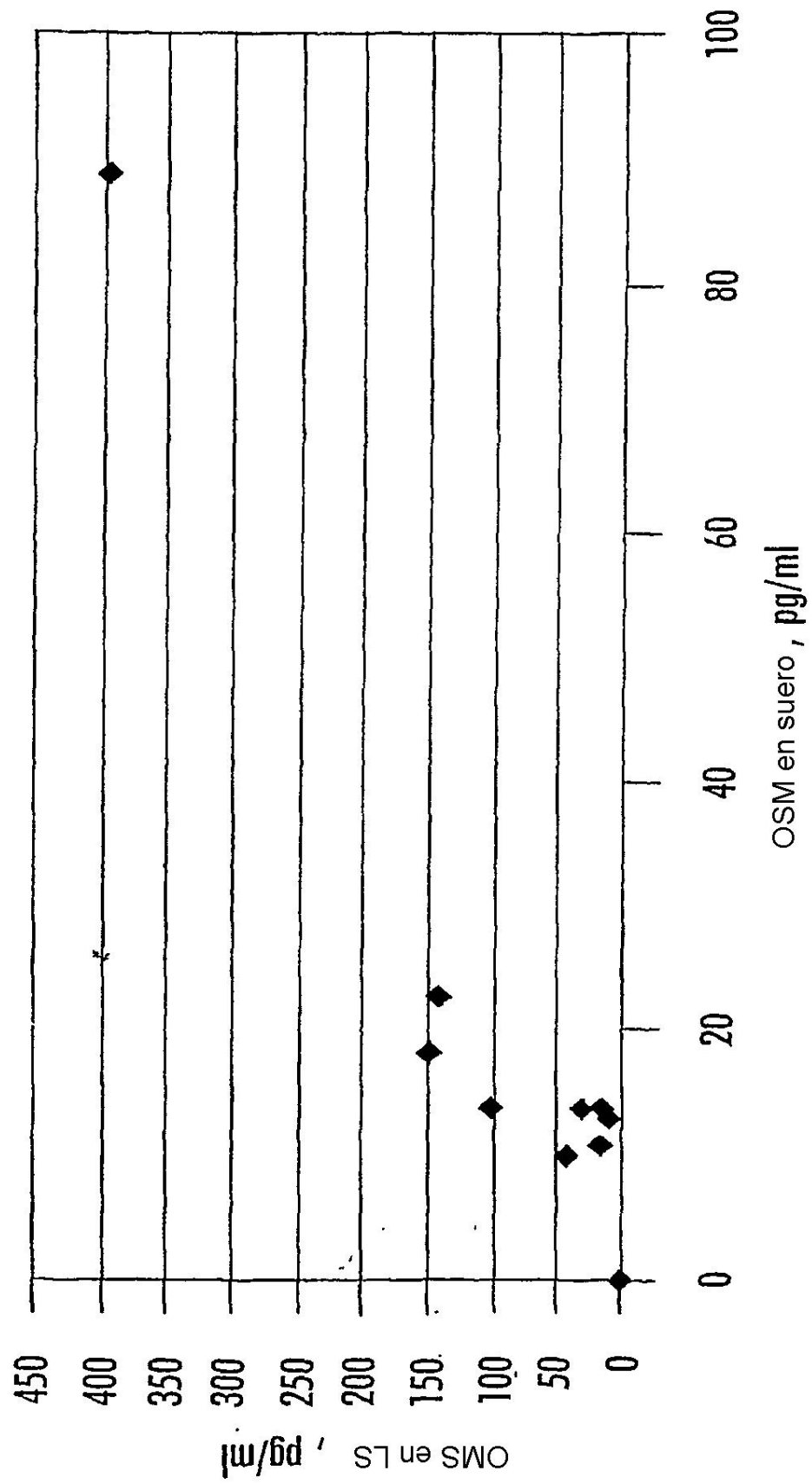


Fig. 34

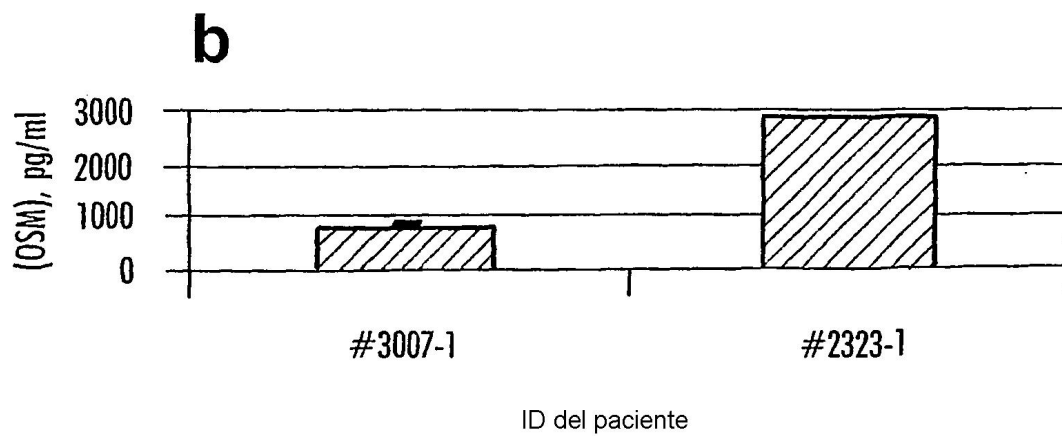
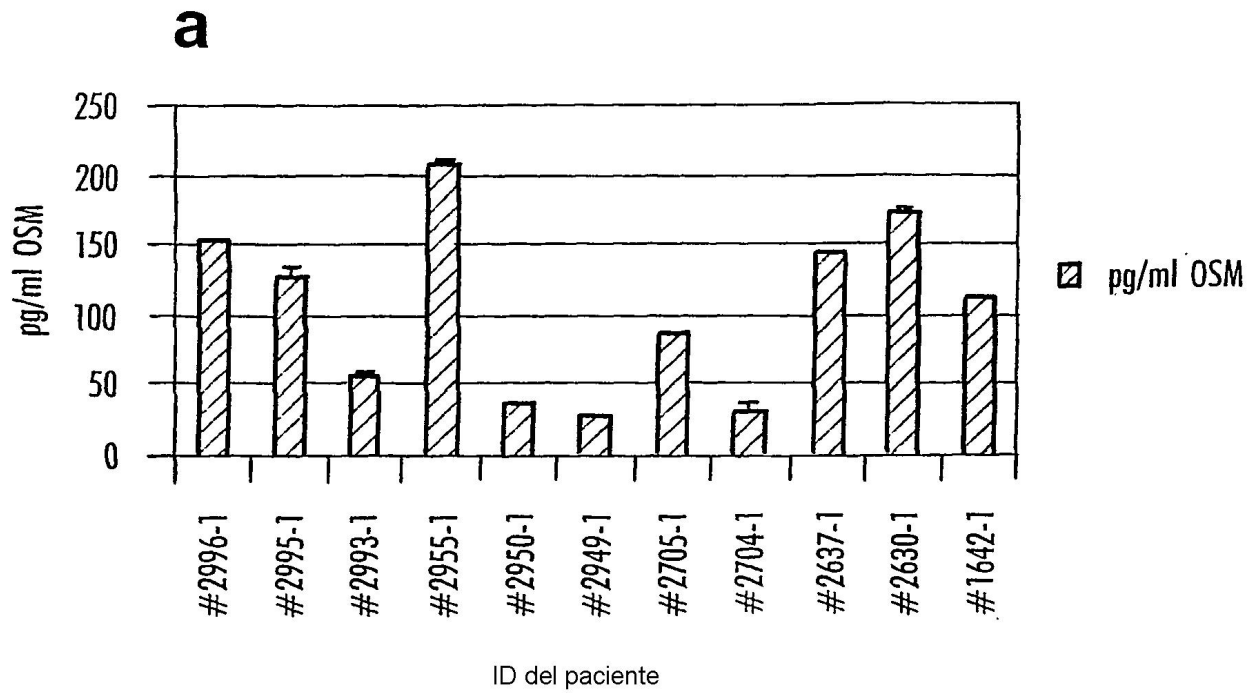


Fig. 35

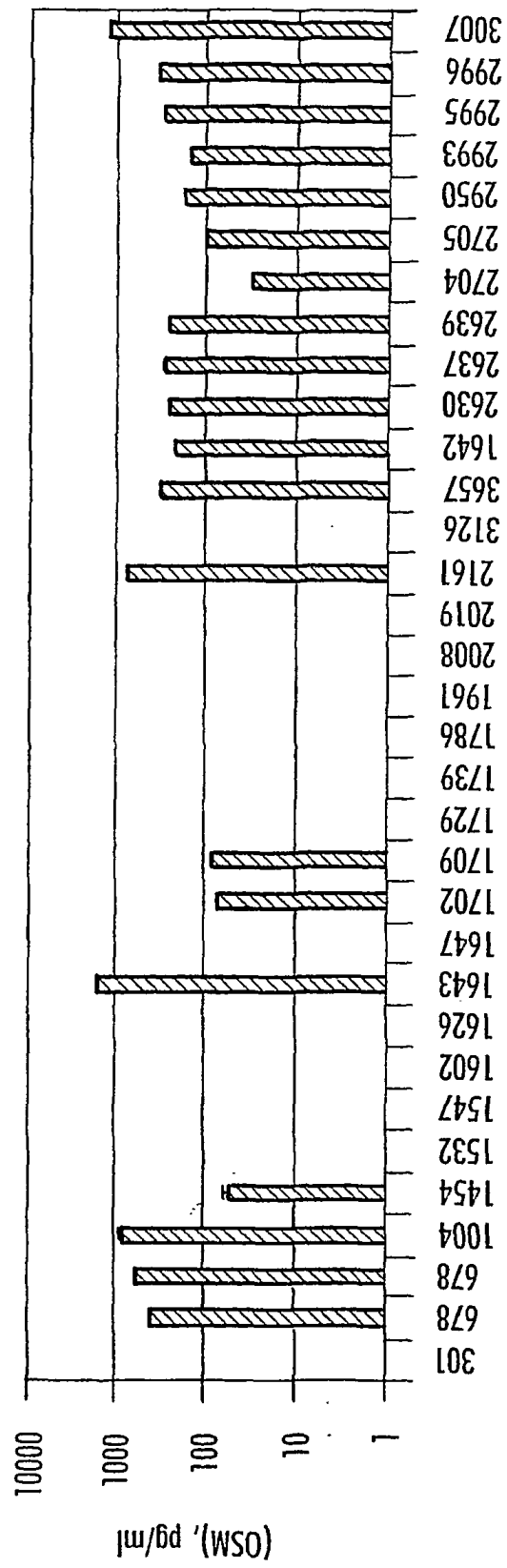


Fig. 36

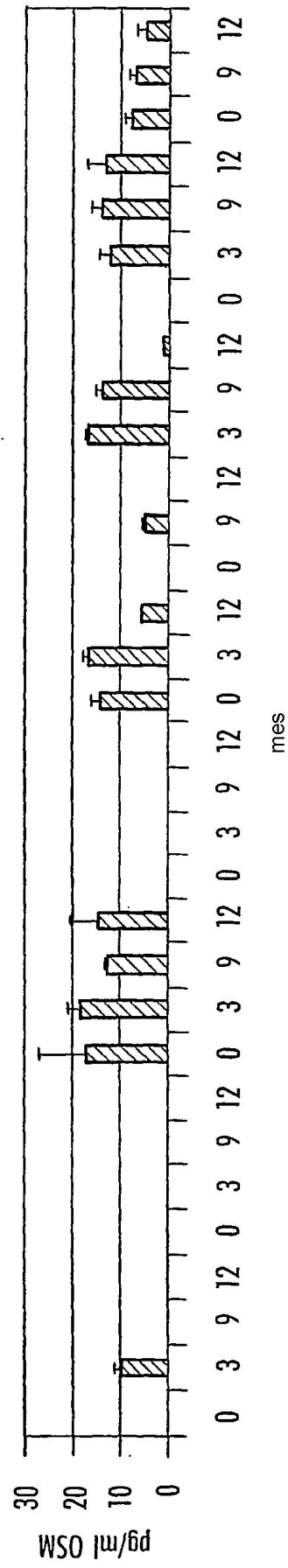


Fig. 37