

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 662**

51 Int. Cl.:
C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04753822 .8**
96 Fecha de presentación: **02.06.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1631591**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.03.2006**

54 Título: **Anticuerpos contra factor de crecimiento de tejido conjuntivo**

30 Prioridad:
04.06.2003 US 475598 P
01.06.2004 US 858186

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.04.2012

73 Titular/es:
FIBROGEN, INC.
409 Illinois Street
San Francisco, CA 94158 , US

72 Inventor/es:
LIN, Ai, Y.;
NEFF, Thomas, B.;
OLIVER, Noelynn, A.;
USINGER, William, R.;
WANG, Qingjian y
YEOWELL, David, A.

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 379 662 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra factor de crecimiento de tejido conjuntivo

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF). Los anticuerpos están particularmente dirigidos a regiones de CTGF que participan en actividades biológicas asociadas a diversos trastornos.

Antecedentes**Factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF)**

10 El CTGF es una glicoproteína secretada de unión a heparina rica en cisteína de 36 kD originalmente aislada de medios de cultivo de células endoteliales de la vena umbilical humana (véanse, por ejemplo, Bradham y col. (1991) J Cell Biol 114:1285-1294; Grotendorst y Bradham, patente de EE.UU. nº 5.408.040). El CTGF pertenece a la familia CCN (CTGF, Cyr61, Nov) de proteínas (glicoproteínas secretadas) que incluye el producto génico temprano inmediato inducido por suero Cyr61, el oncogén putativo Nov, la proteína asociada a ECM FISP-12, el gen inducible por src CEF-10, la proteína secretada inducible por Wnt WISP-3 y la proteína antiproliferativa HICP/rCOP (Brigstock (1999) Endocr Rev 20:189-206; O'Brian y col. (1990) Mol Cell Biol 10:3569-3577; Joliot y col. (1992) Mol Cell Biol 12:10-21; Rysecky col. (1990) Cell Growth and Diff 2:225-233; Simmons y col. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:1178-1182; Pennica y col. (1998) Proc Natl Acad Sci U S A, 95:14717-14722; y Zhang y col. (1998) Mol Cell Bio 18:6131-6141). Las proteínas CCN se caracterizan por la conservación de 38 residuos de cisteína que constituyen más del 10% del contenido de aminoácidos totales y dan lugar a una estructura modular con dominios del extremo N y C. La estructura modular de CTGF incluye motivos conservados para la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-BP) y factor von Willebrand (VWC) en el dominio del extremo N, y trombospondina (TSP1) y un motivo de nudo de cisteína en el dominio del extremo C.

15 La expresión de CTGF se induce por miembros de la superfamilia de los factores de crecimiento transformantes beta (TGFβ) que incluye TGFβ-1, -2 y -3, proteína morfogenética ósea (BMP)-2 y activina, además de una variedad de otros moduladores reguladores que incluyen dexametasona, trombina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y angiotensina 11; y estímulos medioambientales que incluyen hiperglucemia e hipertensión (véanse, por ejemplo, Franklin (1997) Int J Biochem Cell Biol 29:79-89; Wunderlich (2000) Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 238:910-915; Denton y Abraham (2001) Curr Opin Rheumatol 13:505-511; y Riewald (2001) Blood 97:3109-3116; Riser y col. (2000) J Am Soc Nephrol 11:25-38; y la publicación internacional nº WO 00/13706). La estimulación por TGFβ de la expresión de CTGF es rápida y prolongada y no requiere aplicación persistente (Igarashi y col. (1993) Mol Biol Cell 4: 637-645). La expresión potenciada de CTGF por TGFβ implica la activación transcripcional por elementos reguladores del ADN presentes en el promotor de CTGF (Grotendorst y col. (1996) Cell Growth Differ 7: 469-480; Grotendorst y Bradham, patente de EE.UU. nº 6.069.006; Holmes y col. (2001) J Biol Chem 276:10594-10601).

20 Se ha mostrado que el CTGF aumenta la transcripción en estado estacionario de ARNm de α1(I) colágeno, α5 integrina y fibronectina, además de promover los procesos celulares que incluyen proliferación y quimiotaxia de diversos tipos de células en cultivo (véanse, por ejemplo, Frazier y col. (1996) J Invest Dermatol 107:406-411; Shiwen y col. (2000) Exp Cell Res 259:213-224; Klagsbom (1977) Exp Cell Res 105:99-108; Gupta y col. (2000) Kidney Int 58:1389-1399; Wahab y col. (2001) Biochem J 359(Pt 1):77-87; Uzel y col. (2001) J Periyodontol 72:921-931; y Riser y Cortes (2001) Ren Fail 23:4599470). La inyección subcutánea de CTGF en ratones neonatales produce la deposición local de tejido de granulación. Similarmente, la inyección subcutánea de TGFβ genera la formación de tejido de granulación e induce altos niveles de ARNm de CTGF en fibroblastos locales. Además, la combinación o el tratamiento secuencial con TGFβ y CTGF produce el desarrollo de un granuloma más persistente (Mori y col. (1999) J Cell Physiol 181:153-159). Por tanto, parece que el CTGF media en un subconjunto de efectos provocados por TGFβ, en particular la producción y deposición de matriz extracelular (ECM). Además, la capacidad de responder a CTGF, o el grado de respuesta de CTGF, puede basarse en un estímulo de sensibilización proporcionado por el tratamiento con TGFβ que permite "competencia" celular (publicación internacional nº WO 96/08140).

25 Aunque se ha caracterizado una plétora de factores interactuantes que modulan la organización de tejido, ahora está emergiendo un consenso para la función de CTGF en la regulación del desarrollo esquelético, cicatrización y remodelación de la matriz extracelular (ECM), fibrosis, tumorigénesis y angiogénesis. Por ejemplo, se ha observado elevada expresión de CTGF en hígado cirrótico, fibrosis pulmonar, enfermedad inflamatoria del intestino, piel esclerótica y queloides, desmoplasia y placas ateroscleróticas (Abraham y col. (2000) J Biol Chem 275:15220-15225; Dammeier y col. (1998) Int J Biochem Cell Biol 30:909-922; diMola y col. (1999) Ann Surg 230(1):63-71; Igarashi y col. (1996) J Invest Dermatol 106:729-733; Ito y col. (1998) Kidney Int 53:853-861; Williams y col. (2000) J Hepatol 32:754-761; Clarkson y col. (1999) Curr Opin Nephrol Hypertens 8:543-548; Hinton y col. (2002) Eye 16:422428; Gupta y col. (2000) Kidney Int 58:1389-1399; Riser y col. (2000) J Am Soc Nephrol 11:25-38).

30 El CTGF también está regulado por incremento en glomerulonefritis, nefropatía por IgA, glomeruloesclerosis focal y segmental y nefropatía diabética (véase, por ejemplo, Riser y col. (2000) J Am Soc Nephrol 11:25-38). Un aumento

en el número de células que expresa CTGF también se observa en sitios de lesión tubulointersticial crónica, y los niveles de CTGF guardan relación con el grado de lesión (Ito y col. (1998) *Kidney Int* 53:853-861). Además, la expresión de CTGF es elevada en los glomérulos y el tubulointersticio en una variedad de enfermedades renales en asociación con cicatrización y esclerosis del parénquima renal. Niveles elevados de CTGF también se han asociado a fibrosis hepática, infarto de miocardio y fibrosis pulmonar. Por ejemplo, en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (FPI), el CTGF está fuertemente regulado por incremento en biopsias y células de lavado broncoalveolar (Ujike y col. (2000) *Biochem Biophys Res Commun* 277:448-454; Abou-Shady y col. (2000) *Liver* 20:296-304; Williams y col. (2000) *J Hepatol* 32:754-761; Ohnishi y col. (1998) *J Mol Cell Cardiol* 30:2411-22; Lasky y col. (1998) *Am J Physiol* 275: L365-371; Pan y col. (2001) *Eur Respir J* 17:1220-1227; y Allen y col. (1999) *Am J Respir Cell Mol Biol* 21:693-700). Por tanto, el CTGF representa una diana terapéutica válida en trastornos tales como aquellos descritos anteriormente.

Se ha establecido la asociación de CTGF con diversos aspectos de estos trastornos; y se han descrito procedimientos para tratar trastornos mediante la modulación de CTGF (véanse, por ejemplo, Grotendorst y Bradham, patente de EE.UU. nº 5.783.187; publicación internacional nº WO 00/13706; y publicación internacional nº WO 03/049773). La modulación de factores de crecimiento, citocinas y receptores de la superficie celular puede llevarse a cabo usando anticuerpos monoclonales, y se han autorizado varios anticuerpos monoclonales terapéuticos o están en desarrollo (véanse, por ejemplo, infliximab (Remicade; Maini y col. (1998) *Arthritis Rheum* 41:1552-1563; Targan y col. (1997) *N Engl J Med* 337:1029-1035); basiliximab (Simulect) y daclizumab (Zenapax) (Bumgardner y col. (2001) *Transplantation* 72:839-845; Kovarik y col. (1999) *Transplantation* 68:1288-1294); y trastuzumab (Herceptin; Baselga (2001) *Ann Oncol* 12 Suppl 1:S49-55).)

Se han generado anticuerpos contra CTGF y han demostrado ser eficaces *in vivo* en, por ejemplo, la inhibición de angiogénesis (véanse, por ejemplo, Grotendorst y Bradham, patente de EE.UU. nº 5.408.040; publicación internacional nº WO 99/07407; y Shimo y col (2001) *Oncology* 61:315-322). Además, la naturaleza moduladora de CTGF parece distinguir dominios que participan en actividades biológicas específicas. Por ejemplo, se ha mostrado que la mitad del extremo N de CTGF estimula la diferenciación celular y la producción de ECM, mientras que la mitad del extremo C estimula la proliferación celular (véanse, por ejemplo, las publicaciones internacionales nº WO 00/35936 y WO 00/35939; y Brigstock y Harding, patente de EE.UU. nº 5.876.70). Esto demuestra que los anticuerpos dirigidos contra regiones diferentes de la molécula de CTGF presentan diferentes efectos con respecto a la modulación de actividades biológicas de CTGF (véanse, por ejemplo, las publicaciones internacionales nº WO 00/35936 y WO 00/35939). Actualmente, no se ha hecho una clara distinción entre anticuerpos anti-CTGF que producen un efecto deseado y aquellos que tanto producen efectos múltiples como son no neutralizantes (véase, por ejemplo, la publicación internacional nº WO 99/33878).

Hay claramente una necesidad en la materia de agentes que neutralicen eficazmente la actividad de CTGF en enfermedad. Los anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, proporcionan la especificidad y los perfiles farmacocinéticos apropiados para un agente terapéutico, y los anticuerpos neutralizantes elegidos como diana para actividades de CTGF específicas satisfarían una necesidad en la materia y se usarían en el tratamiento terapéutico de trastornos asociados a CTGF que incluyen trastornos pulmonares tales como fibrosis pulmonar idiopática (FPI), etc.; trastornos renales tales como nefropatía diabética, glomeruloesclerosis, etc.; y trastornos oculares tales como retinopatía, degeneración macular, etc.

Sunario de la invención

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no se encuentre dentro de las reivindicaciones se proporciona sólo para información.

La presente invención se refiere a anticuerpos, particularmente a anticuerpos monoclonales, y porciones de los mismos que se unen específicamente a una región sobre el fragmento del extremo N de un polipéptido de CTGF. En particular, la presente invención proporciona un anticuerpo o porción del mismo que se une específicamente a al menos una parte de una región sobre el CTGF humano definido como los aminoácidos 143 a 154 de SEC ID N°: 2 o a una región ortóloga sobre CTGF derivada de otras especies.

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se une específicamente a una región sobre CTGF humano (SEC ID N°: 2) como se define a partir de aproximadamente el aminoácido 143 al aminoácido 154 (SEC ID N°: 21); o una región ortóloga sobre CTGF derivada de otras especies. En realizaciones particulares, el anticuerpo tiene la misma especificidad que un anticuerpo producido por la línea celular identificada por el nº de acceso de ATCC PTA-6006. En realizaciones específicas, el anticuerpo es sustancialmente idéntico a un mAb1, como se describe más adelante. Más preferentemente, el anticuerpo es sustancialmente similar a CLN1, como se describe más adelante. En otra realización más, un anticuerpo de la invención se une competitivamente con cualquiera de los anticuerpos anteriores a un polipéptido de CTGF.

La presente invención también proporciona un anticuerpo, que se une específicamente a al menos una parte de una región sobre CTGF humano definida como los aminoácidos 143 a 154 de SEC ID N°: 2 o a una región ortóloga sobre CTGF derivada de otras especies, que comprende un primer polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) una secuencia de la cadena pesada de la inmunoglobulina que comprende SEC ID N°: 14;
 (b) una secuencia de la cadena pesada de la inmunoglobulina que comprende el dominio variable de SEC ID N°: 14; o
 (c) una variante conservativa de (a) o (b);
 y un segundo polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:
 (d) una secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina que comprende SEC ID N°: 20;
 (e) una secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina que comprende el dominio variable de SEC ID N°: 20; o
 (f) una variante conservativa de (d) o (e).

5
 10 Por tanto, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal o porción del mismo que comprende una secuencia de la cadena pesada de la inmunoglobulina que comprende SEC ID N°: 14, una secuencia de la cadena pesada de la inmunoglobulina que comprende el dominio variable de SEC ID N°: 14 o variantes conservativas de las mismas; y una secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina que comprende SEC ID N°: 20, una secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina que comprende el dominio variable de SEC ID N°: 20 o variantes conservativas de las mismas. En una realización específica, el anticuerpo comprende el dominio variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina del residuo de aminoácido 1 al residuo de aminoácido 167 de SEC ID N°: 14. En otra realización específica, el anticuerpo comprende el dominio variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina del residuo de aminoácido 1 al residuo de aminoácido 136 de SEC ID N°: 20. En una realización particular, el anticuerpo comprende la secuencia de la cadena pesada de la inmunoglobulina de SEC ID N°: 14 y la secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina de SEC ID N°: 20. Dentro de esta realización, la presente invención proporciona específicamente el anticuerpo de CLN1 o una parte del mismo que comprende al menos los residuos de la región de unión a antígeno de CLN1.

25 En ciertos aspectos, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo policlonal. En otros aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado; más preferentemente un anticuerpo monoclonal humano. Cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados puede contener adicionalmente diversas cantidades de glicosilación incorporadas por la célula que produce el anticuerpo o aplicadas y/o modificadas sintéticamente; o el anticuerpo puede estar libre de glicosilación. El anticuerpo puede estar opcionalmente pegilado y/o similarmente modificado para aumentar la semivida en plasma, etc. En diversas realizaciones, la invención proporciona porciones del anticuerpo, particularmente cuando la porción es un fragmento Fab, F(ab)₂ o Fv.

30 En ciertos aspectos, el anticuerpo o porción del mismo se produce por una línea celular clonada. La línea celular puede derivarse de cualquier modelo animal usado para la producción de anticuerpos monoclonales que incluye, pero no se limita a, ratones, cabra, pollo, etc. En particular, la línea celular puede derivarse de ratones. Los ratones puede ser ratones estándar usados para la producción de anticuerpos, por ejemplo, BALB/C, o una cepa de ratones modificados, por ejemplo, transgénicos, optimizada o desarrollada para la producción de anticuerpos monoclonales de isotipo específico, idiotipo o específico de especies. En una realización, la línea celular es una línea celular de hibridoma que produce y secreta mAb1. En otras realizaciones, la línea celular produce y secreta un anticuerpo o porción del mismo que tiene una propiedad sustancialmente equivalente a mAb1. En todavía otras realizaciones, la línea celular produce y secreta un anticuerpo o porción del mismo que tiene una propiedad sustancialmente equivalente a CLN1. En una realización particular, la invención proporciona una línea celular identificada por el n° de acceso de ATCC PTA - 6006.

35 En otro aspecto, el anticuerpo o porción del mismo se deriva de un animal transgénico no humano, particularmente un mamífero transgénico no humano, que puede producir un anticuerpo humano. El animal puede ser de cualquier especie que incluye, pero no se limita a, ratón, pollo, vaca, cabra, etc. En particular, el animal puede ser ratón. Tales anticuerpos pueden obtenerse inmunizando un mamífero transgénico no humano con un fragmento de CTGF humano, por ejemplo, SEC ID N°: 21 o, más específicamente, SEC ID N°: 22, o una región ortóloga sobre CTGF derivada de una especie no humana. En ciertas realizaciones, los anticuerpos se obtienen inmunizando el mamífero transgénico no humano con un fragmento de CTGF seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 23 a 26 o una región ortóloga sobre CTGF derivada de una especie no humana. En realizaciones específicas, los anticuerpos se obtienen inmunizando un ratón transgénico con cualquiera de los fragmentos de CTGF anteriormente mencionados. En otras realizaciones, los anticuerpos se obtienen inmunizando un ratón transgénico con equivalentes funcionales de cualquiera de los fragmentos de CTGF anteriormente mencionados.

40 Por "se une específicamente a una región sobre CTGF" se indica que los anticuerpos tienen especificidad de unión por una región particular sobre CTGF, que puede definirse por una secuencia de aminoácidos lineal, o por una conformación terciaria, es decir, tridimensional, sobre parte del polipéptido de CTGF. Especificidad de unión significa que la afinidad de los anticuerpos por la porción de CTGF es sustancialmente mayor que su afinidad por otros polipéptidos relacionados. Por "afinidad sustancialmente mayor" los inventores indican que hay un aumento medible en la afinidad por la porción de CTGF en comparación con la afinidad por otros polipéptidos relacionados. Preferentemente, la afinidad es al menos 1,5 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 100 veces, 10³ veces, 10⁴ veces, 10⁵ veces, 10⁶ veces o mayor por la porción particular de CTGF que por otras proteínas. Preferentemente, la especificidad de unión se determina por cromatografía de afinidad, inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro* tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), o por análisis de citometría

de flujo activada por fluorescencia (FACS). Más preferentemente, la especificidad de unión se obtiene por RIA o cromatografía de afinidad, como se describen más adelante.

5 En realizaciones preferidas de la invención, los anticuerpos tienen una afinidad que es igual a o superior a la de mAb1, descrita más adelante, como se determina, por ejemplo, por el análisis de Scatchard de Munson y Pollard (1980, Anal Biochem 107:220). La afinidad por anticuerpo se define como la fuerza de las interacciones no covalentes totales entre un único sitio de unión a antígeno sobre un anticuerpo y un único epítipo sobre un antígeno. La afinidad se calcula midiendo la constante de asociación (K_a), de forma que

$$\text{Afinidad} = K_a = \frac{[Ab \cdot Ag]}{[Ab][Ag]} = \frac{1}{K_d}$$

10 en la que $[Ab]$ es la concentración de sitio de unión a antígeno libre sobre el anticuerpo, $[Ag]$ es la concentración de antígeno libre, $[Ab \cdot Ag]$ es la concentración de sitio de unión a antígeno sobre el anticuerpo ocupado por el antígeno y K_d es la constante de disociación del inmunocomplejo. Preferentemente, los anticuerpos de la invención tienen una afinidad por CTGF que es superior a $K_d = 10^{-8}$, preferentemente superior a 10^{-9} , preferentemente superior a 10^{-10} , particularmente para uso terapéutico. Ventajosamente, un anticuerpo según la invención tiene una afinidad similar a o superior a la de mAb1 (es decir, una $K_d \leq 10^{-9}$). Sin embargo, los anticuerpos que comparten unión a epítipo con mAb1, pero que tienen menor afinidad (es decir, K_d superior) que mAb1, también están incorporados dentro de la presente invención y son potencialmente útiles en diversos ensayos y aplicaciones de diagnóstico como se describe en este documento. Tales anticuerpos pueden ser adicionalmente útiles en aplicaciones terapéuticas, especialmente si tienen una alta afinidad por el antígeno, como se describe más adelante.

15 Los anticuerpos según la invención pueden ser monovalentes, bivalentes o pueden ser multivalentes. En ciertas realizaciones de la invención se prefiere que los anticuerpos de la invención sean bivalentes o multivalentes. Cualquiera de los anticuerpos de la invención puede manipularse para mejorar la afinidad, por ejemplo, combinando sitios de unión a epítipo en una construcción de un único anticuerpo, por ejemplo, un tricuerpo, etc. Los anticuerpos según la invención pueden ser anticuerpos monocatenarios.

20 Puede ser útil en algunas circunstancias que los anticuerpos de la invención muestren afinidad adecuada por CTGF de otras especies, por ejemplo, para el tratamiento y la prevención de trastornos en aquellas especies. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención que muestra una K_d adecuada por CTGF canino podría usarse para tratar un trastorno asociado a CTGF en perros. Anticuerpos de la invención que muestran afinidad por especies cruzadas tales como mAb1 también son útiles como herramientas de investigación para estudiar trastornos asociados a CTGF en diversos modelos animales. En otro aspecto, el anticuerpo o porción del mismo está codificado por material genético originalmente derivado de un ser humano. El anticuerpo puede generarse por células en cultivo, por ejemplo, usando técnicas de expresión en fago, o puede producirse dentro de un animal, por ejemplo, un animal transgénico no humano que contiene genes de inmunoglobulina derivados de un ser humano.

25 Adicionalmente, la invención proporciona construcciones recombinantes que comprenden porciones de cualquiera de los anticuerpos de la invención, como se ha descrito anteriormente, y una proteína derivada de otra fuente. Específicamente se contemplan realizaciones que engloban anticuerpos quiméricos según la reivindicación 1 que comprenden una región variable derivada de un anticuerpo como se ha descrito anteriormente y una región constante derivada de otra fuente. La región variable puede derivarse de cualquier anticuerpo definido por la invención, y específicamente produce anticuerpos que se unen a una región sobre CTGF humano de aproximadamente el aminoácido 143 a aproximadamente el aminoácido 154 de SEC ID N°: 2, o a una región ortóloga sobre CTGF derivada de otras especies. La región constante puede derivarse de cualquier fuente. En algunas realizaciones, la región constante se deriva de una región constante de una inmunoglobulina humana.

30 La presente invención también proporciona cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente en los que el anticuerpo comprende adicionalmente un agente de marcado que puede proporcionar una señal por sí misma o junto con otras sustancias. Tales agentes de marcado pueden seleccionarse de, pero no se limitan a, el grupo que consiste en una enzima, sustancia fluorescente, sustancia quimioluminiscente, biotina, avidina y radioisótopo. La presente invención también proporciona cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente en los que el anticuerpo comprende adicionalmente un agente citotóxico o enzima.

35 En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención, como se ha descrito anteriormente, neutralizan adicionalmente al menos una actividad asociada a CTGF. Tales actividades asociadas a CTGF incluyen, pero no se limitan a, estimulación de la migración celular, producción de matriz extracelular por una célula *in vivo* o *ex vivo* y/o reducción en la fibrosis en un sujeto. En realizaciones particulares, la actividad biológica se selecciona del grupo que consiste en crecimiento celular, diferenciación de fibroblastos y/o células endoteliales e inducción de la expresión de proteínas que participan en la formación y remodelación de la matriz extracelular que incluyen, por ejemplo, colágenos que incluyen, pero no se limitan a, los tipos I, II, III y IV; y fibronectina.

40 En ciertas realizaciones, los anticuerpos inhiben específicamente la migración celular en ensayos *ex vivo*. Preferentemente, los anticuerpos inhiben la migración quimiotáctica estimulada por CTGF de células de músculo liso

- en un ensayo en cámara de Boyden. Por ejemplo, en un ensayo de migración celular descrito más adelante, los anticuerpos de la invención inhiben repetidamente y reproduciblemente la migración inducida por CTGF. En diversas realizaciones, los anticuerpos reducen específicamente la fibrosis en modelos animales. Preferentemente, los anticuerpos inhiben el desarrollo de fibrosis en modelos animales de fibrosis pulmonar y renal. Por ejemplo, los anticuerpos atenúan el 60-70% de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones, como se ha determinado por la inhibición de la acumulación de hidroxiprolina pulmonar (colágeno) y/o examen histológico de preparaciones de tejido, descrito más adelante. Además, los anticuerpos reducen la acumulación de colágeno en un modelo de riñón remanente de rata (es decir, nefrectomía de 5/6) y en ratones tras la obstrucción ureteral unilateral (OUU), como se describe más adelante.
- 5 En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención modulan la interacción entre un polipéptido de CTGF y un receptor celular, y/o entre un polipéptido de CTGF y un cofactor asociado a membrana secretado, neutralizándose así una actividad biológica de CTGF. El cofactor puede ser cualquier proteína, hidrato de carbono y/o lípido; en realizaciones particulares, el cofactor es un miembro de la familia TGF- β de los factores de crecimiento, por ejemplo, TGF- β , BMP-4, etc.
- 10 En otro aspecto, el anticuerpo reduce la fibrosis en un sujeto. En diversas realizaciones, el sujeto es un tejido u órgano. En otras realizaciones, el sujeto es un animal, preferentemente un mamífero, lo más preferentemente un ser humano. Si el sujeto es un tejido, la invención contempla específicamente tanto tejidos endógenos como tejidos *ex vivo*, por ejemplo, tejidos de trasplante, tejidos cultivados en cultivo, etc. En diversas realizaciones, el tejido se selecciona del grupo que consiste en tejido epitelial, endotelial y conjuntivo. Si el sujeto es un órgano, la invención contempla específicamente órganos seleccionados del grupo que consiste en riñón, pulmón, hígado, ojo, corazón y piel. En realizaciones preferidas, el sujeto es un animal, particularmente un animal de especies de mamífero que incluyen especies de rata, conejo, bovina, ovina, porcina, murina, equina y primate. En una realización muy preferida, el sujeto es un ser humano.
- 15 En realizaciones específicas, el anticuerpo es para su uso en medicina, en particular para dirigir o prevenir trastorno asociado a CTGF en un sujeto que tiene o está en riesgo de tener un trastorno asociado a CTGF. Tales trastornos incluyen, pero no se limitan a, diversos cánceres que incluyen leucemia linfoblástica aguda, dermatofibromas, cáncer de mama, carcinoma, glioma y glioblastoma de mama, rhabdomyosarcoma y fibrosarcoma, desmoplasia, angioliopoma, angioliomioma, cánceres desmoplásicos y cáncer de próstata, ovario, colorrectal, pancreático, gastrointestinal y de hígado, y otro crecimiento tumoral y metástasis. Los trastornos asociados a CTGF también incluyen diversos trastornos fibróticos que incluyen, pero no se limitan a, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis renal, glomeruloesclerosis, fibrosis ocular, osteoartritis, esclerodermia, fibrosis cardíaca y fibrosis hepática. La fibrosis puede producirse en cualquier órgano o tejido que incluye un órgano seleccionado de, pero no se limita a, riñón, pulmón, hígado, corazón y piel; o un tejido seleccionado de, pero no se limita a, tejido epitelial, endotelial y conjuntivo. En otras realizaciones, el trastorno asociado a CTGF puede producirse por cualquier factor iniciador que incluye, pero no se limita a, exposición a agentes químicos o biológicos, respuesta inflamatoria, reacción autoinmunitaria, traumatismo, procedimientos quirúrgicos, etc. Los trastornos asociados a CTGF también incluyen, pero no se limitan a, trastornos debidos a hiperglucemia e hipertensión. Tales trastornos pueden producirse, por ejemplo, debido a diabetes, obesidad, etc., e incluyen nefropatía diabética, retinopatía y enfermedad cardiovascular.
- 20 Por tanto, en diversas realizaciones, la invención proporciona anticuerpos que pueden usarse para tratar o prevenir trastornos asociados a CTGF en un sujeto. La presente invención también proporciona el uso de tales anticuerpos en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos asociados a CTGF.
- 25 En este documento se desvela un procedimiento de neutralización de una actividad asociada a CTGF que comprende poner en contacto un anticuerpo de la invención y un polipéptido de CTGF, neutralizándose así una actividad biológica de CTGF, tal como aquellas descritas anteriormente. La actividad biológica puede ser cualquier actividad de CTGF que incluye, pero no se limita a, estimulación de la migración celular y producción de matriz extracelular. En diversas realizaciones, la neutralización se produce *in vitro*. En otras realizaciones, la neutralización se produce en un sujeto *in vivo*.
- 30 En otro aspecto más, la invención proporciona un anticuerpo como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado a CTGF en un paciente en necesidad administrando el anticuerpo o una formulación farmacéutica del mismo al paciente, tratándose así el trastorno. El sujeto puede ser un paciente diagnosticado con o del que se sospecha que tiene un trastorno asociado a CTGF que incluye, por ejemplo, un trastorno que produce producción en exceso de matriz extracelular. En aspectos particulares, el trastorno asociado a CTGF se selecciona de un cáncer o trastorno fibrótico. Los cánceres incluyen, pero no se limitan a, leucemia linfoblástica aguda, dermatofibromas, cáncer de mama, carcinoma, glioma y glioblastoma de mama, rhabdomyosarcoma y fibrosarcoma, desmoplasia, angioliopoma, angioliomioma, cánceres desmoplásicos y cáncer de próstata, ovario, colorrectal, pancreático, gastrointestinal y de hígado, y los trastornos fibróticos incluyen, pero no se limitan a, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis renal, glomeruloesclerosis, fibrosis ocular, degeneración macular, osteoartritis, esclerodermia, insuficiencia cardíaca crónica, fibrosis cardíaca y fibrosis hepática. En otras realizaciones, el trastorno asociado a CTGF puede producirse por cualquier factor iniciador que incluye, pero no se limita a, exposición a agentes químicos o biológicos, respuesta inflamatoria, reacción autoinmunitaria, traumatismo, procedimientos quirúrgicos, etc. Los trastornos asociados a CTGF también incluyen, pero no se limitan a, trastornos
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

debidos a hiperglucemia e hipertensión. Tales trastornos pueden producirse, por ejemplo, debido a diabetes, obesidad, etc., e incluyen nefropatía diabética, retinopatía y enfermedad cardiovascular.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo como se ha descrito anteriormente y al menos otro componente. Los componentes pueden incluir cualquier compuesto, molécula o agente que incluye, por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, etc. Adicionalmente, los componentes pueden incluir diversos disolventes, sales y otros vehículos y/o excipientes. En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo como se ha descrito anteriormente y al menos un componente adicional seleccionado de un disolvente, un estabilizador o un excipiente. En una realización particular, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede contener adicionalmente un segundo agente terapéutico, por ejemplo, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), un agente de escisión o inhibidor de productos finales de la glicación avanzada, etc. La invención proporciona adicionalmente medicamentos que comprenden un anticuerpo como se define anteriormente para tratar un sujeto que tiene un trastorno asociado a CTGF. Tales trastornos incluyen, pero no se limitan a, diversos cánceres y trastornos fibróticos; trastornos resultantes de afecciones tales como infarto de miocardio, artritis e inflamación; y trastornos debidos a diabetes, obesidad y similares, que pueden incluir nefropatía diabética, retinopatía y enfermedad cardiovascular.

20 En este documento se desvela una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 14, aminoácido 1 a aminoácido 167 de SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 20, y aminoácido 1 a aminoácido 136 de SEC ID N°: 20. También se desvelan variantes conservativas de los polipéptidos y fragmentos específicos de CTGF humano seleccionados del grupo que consiste en SEC ID N°: 21 a 26, y fragmentos de CTGF ortólogos obtenidos de una especie no humana.

Los polipéptidos citados anteriormente puede ser polipéptidos "alterados", como se define más adelante.

25 En otra realización, la invención proporciona secuencias de polinucleótidos que codifican un anticuerpo de la invención o una parte del mismo. Por tanto, una invención proporciona un par de secuencias de polinucleótidos que comprende una primera secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) una secuencia de polinucleótidos que codifica SEC ID N°: 14;
- (b) una secuencia de polinucleótidos que codifica del aminoácido 1 al aminoácido 167 de SEC ID N°: 14;
- (c) SEC ID N°: 13; y
- (d) el nucleótido 1 al nucleótido 501 de SEQ ID: 13;

30 y una segunda secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- (a') una secuencia de polinucleótidos que codifica SEC ID N°: 20;
- (b') una secuencia de polinucleótidos que codifica del aminoácido 1 al aminoácido 136 de SEC ID N°: 20;
- (c') SEC ID N°: 19; y
- (d') el nucleótido 1 al nucleótido 408 de SEC ID N°: 19.

40 La primera secuencia de polinucleótidos se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de polinucleótidos que codifica SEC ID N°: 14, una secuencia de polinucleótidos que codifica del aminoácido 1 al aminoácido 167 de SEC ID N°: 14, la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N°: 13 y un polinucleótido que comprende del nucleótido 1 al nucleótido 501 de SEC ID N°: 13. La segunda secuencia de polinucleótidos se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de polinucleótidos que codifica SEC ID N°: 20, una secuencia de polinucleótidos que codifica del aminoácido 1 al aminoácido 136 de SEC ID N°: 20, el polinucleótido de SEC ID N°: 19 y un polinucleótido que comprende del nucleótido 1 al nucleótido 408 de SEC ID N°: 19.

Los polinucleótidos citados anteriormente pueden ser polinucleótidos "alterados", como se define más adelante.

45 La invención proporciona adicionalmente un par de polinucleótidos recombinantes según la reivindicación 38. En un aspecto, el primer polinucleótido recombinante codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14 o el dominio variable en su interior. En otro aspecto, el primer polinucleótido recombinante comprende SEC ID N°: 13. En otro aspecto más, el segundo polinucleótido recombinante codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 20 o el dominio variable en su interior. En otro aspecto adicional, el segundo polinucleótido recombinante comprende SEC ID N°: 19.

50 La invención también proporciona células huésped transfectadas con los polinucleótidos recombinantes descritos anteriormente. Las células huésped incluyen cualquier célula huésped procarionta y eucariota que incluye, por ejemplo, líneas celulares clonadas mantenidas por procedimientos de cultivo conocidos para aquellos expertos en la materia. Las células huésped también incluyen plantas y animales transgénicos derivados de células transformadas, por ejemplo, citoblastos. En una realización, la célula huésped comprende una célula cotransfectada con un polinucleótido que codifica SEC ID N°: 14 y un polinucleótido que codifica SEC ID N°: 20, y que produce un anticuerpo funcional con características sustancialmente iguales a las de mAb1. En realizaciones particulares, el anticuerpo es CLN 1. En otra realización particular, la célula huésped se identifica por el n° de acceso de ATCC

PTA-6006.

Estas y otras realizaciones de la invención objeto serán fácilmente producidas por aquellos expertos en la materia en vista de la divulgación en este documento, y todas estas realizaciones están específicamente contempladas.

Breve descripción de los dibujos

5 Las Figuras 1A y 1H muestran la estructura y conservación de secuencias del factor de crecimiento de tejido conjuntivo. La Figura 1A muestra la estructura de dominio modular de CTGF, que incluye motivos conservados para la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-BP) y factor von Willebrand (VWC) en el fragmento del extremo N, y trombospondina (TSP1) y el motivo de nudo de cisteína (CT) en el fragmento del extremo C. La Figura 1B muestra un alineamiento de múltiples secuencias entre los fragmentos del extremo N de ortólogos de CTGF humano (hCTGF), bovino (bCrGF), porcino (pCTGF), de rata (rCTGF) y murino (FISP12). El
10 alineamiento fue creado usando el programa CLUSTAL W (v. 1.74; Thompson y col (1994) Nucleic Acids Res 22:4673-4680) usando parámetros por defecto. En la figura, un asterisco (*) indica conservación completa del residuo de aminoácido entre las especies representadas.

15 Las Figuras 2A y 2B muestran representaciones de Scatchard de unión competitiva entre CTGF humano marcado y sin marcar a anticuerpos anti-CTGF, mAb2 y mAb1, respectivamente. mAb1 es un anticuerpo a modo de ejemplo de la presente invención.

20 La Figura 3A muestra un fragmento de anticuerpo Fab (M_r 45kD) obtenido tras la digestión con papaína del anticuerpo IgG correspondiente mAb1 y posterior cromatografía de afinidad en proteína A-Sepharose (carril 2), como se demuestra por SDS-PAGE. La Figura 3B muestra la unión de un fragmento Fab e IgG correspondiente a CTGF con respecto al aumento de la concentración de agente caotrópico (tiocianato).

Las Figuras 4A y 4B muestran representaciones de Scatchard de unión competitiva entre CTGF humano recombinante marcado y CTGF de rata sin marcar para anticuerpos anti-CrGF, mAb2 y mAb1, respectivamente.

25 Las Figuras 5A, 5B y 5C muestran el beneficio terapéutico de un anticuerpo de la invención en un modelo de fibrosis intersticial en el pulmón. La Figura 5A muestra el efecto del tratamiento con anticuerpos sobre el aumento inducido por bleomicina en el contenido de hidroxiprolina de pulmones de ratón. El número de animales en cada grupo se muestra entre paréntesis debajo de cada barra y los grupos de tratamiento están indicados a lo largo del eje x. SA: Solución salina; BL: Bleomicina; AbsJ: conjunto de 3 anticuerpos monoclonales de la invención; mAb1, un anticuerpo a modo de ejemplo de la invención. Los valores se expresan como media \pm EE. Las Figuras 5B y 5C muestran secciones de parafina teñidas con hematoxilina y eosina de ácinos proximales pulmonares de ratones expuestos a bleomicina por inyección intratraqueal y posteriormente tratados con solución salina o anticuerpos de la invención, respectivamente. En la Figura 5B, el ácino del tabique interalveolar delgado tiene un aspecto anormal, y están presentes células inflamatorias y fibrosis. En la Figura 5C, el parénquima es en gran parte normal y sólo hay un engrosamiento moderado de tabiques interalveolares.

35 Las Figuras 6A, 6B y 6C muestran el beneficio terapéutico de un anticuerpo de la invención en un modelo de fibrosis tubulointersticial en el riñón. La Figura 6A muestra la reducción en la fibrosis debida a obstrucción ureteral unilateral (OUU) tras el tratamiento con un anticuerpo de la invención, mAb1, o un anticuerpo dirigido contra el extremo C de CTGF, mAb3. El grado de fibrosis se expresa como la relación de hidroxiprolina con respecto a prolina en el riñón obstruido en comparación con el riñón sin obstruir contralateral (media \pm EE). Las Figuras 6B y 6C muestran secciones de parafina teñidas con tricromo de riñones obstruidos que reciben solución salina o terapia con anticuerpos, respectivamente.

40 μ muestran el beneficio terapéutico de un anticuerpo de la invención en un modelo de fibrosis glomerular en el riñón. Las Figuras 7A y 7B muestran fotomicrografías de tejido de riñón remanente teñido con tricromo después de recibir solución salina o terapia con anticuerpos, respectivamente.

45 Las Figuras 8A, 8B, 8C, 8D, 8E, 8F y 8G muestran la inducción de granulomas subcutáneos localizados en ratones recién nacidos. A la izquierda, las Figuras 8A y 8B muestran la formación de granuloma en el sitio de inyección subcutánea de TGF β solo o TGF β y CTGF, respectivamente. A la derecha, las Figuras 8C a 8G muestran un panel histológico que representa el sistema de puntuación (de 0 [normal] a 4 [fibrótico]) usado para evaluar el beneficio terapéutico del anticuerpo.

50 La Figura 9 muestra el grado de fibrosis en un modelo de granuloma subcutáneo localizado con y sin tratamiento con anticuerpos anti-CrGF. mAb1 es un anticuerpo a modo de ejemplo de la invención, mientras que mAb3 es un anticuerpo anti-CTGF que se une específicamente a un epítoto de CTGF del extremo C.

55 Las Figuras 10A, 10B, 10C y 10D muestran el beneficio terapéutico de un anticuerpo de la invención en fibrosis de órgano usando un modelo de esclerosis sistémica. Cada uno de los paneles muestra cambios en la acumulación de colágeno en órganos respectivos tras el tratamiento con solución salina (control), TGF β y CTGF, o tratamiento con TGF β y CTGF concomitante con terapia con anticuerpos.

Las Figuras 11A y 11B muestran una representación en diagrama de la clonación de las cadenas de inmunoglobulina pesadas y ligeras de un anticuerpo a modo de ejemplo de la invención, mAb1. La Figura 11A muestra el alineamiento de fragmentos de PCR de la cadena pesada usados para determinar la secuencia codificante (CDS) de la cadena pesada de mAb1. La Figura 11B muestra el alineamiento de fragmentos de PCR de la cadena ligera usados para determinar la secuencia codificante (CDS) de la cadena ligera de mAb1.

Las Figuras 12A y 12B muestran estudios de unión entre CTGF y TGF β . La Figura 12A muestra el grado de unión entre TGF β y cualquier CTGF, un fragmento de CTGF codificado por el exón 3 (Exón 3) o un fragmento de CTGF codificado por el exón 5 (Exón 5) en presencia o ausencia de anticuerpo anti-CTGF. La Figura 12B muestra el grado al que los anticuerpos anti-CTGF inhiben la interacción de TGF β y CTGF. En la figura, los anticuerpos incluyen anticuerpos a modo de ejemplo de la invención, mAb1 y mAb4, y un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo de CTGF del extremo C, mAb3.

Descripción de la invención

Antes de describir las presentes composiciones y procedimientos debe entenderse que la invención no se limita a las metodologías, protocolos, líneas celulares, ensayos y reactivos particulares descritos, ya que éstos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en este documento está prevista para describir realizaciones particulares de la presente invención, y de ninguna forma está prevista para limitar el alcance de la presente invención como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Debe observarse que, como se usa en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencias plurales, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Por tanto, por ejemplo, una referencia a “un fragmento” incluye una pluralidad de tales fragmentos, una referencia a un “anticuerpo” es una referencia a uno o más anticuerpos y a equivalentes de los mismos conocidos para aquellos expertos en la materia, etc.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen los mismos significados que comúnmente son entendidos por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque cualquier procedimiento y material similar o equivalente a aquellos descritos en este documento puede usarse en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen los procedimientos, dispositivos y materiales preferidos. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a anticipar la fecha de tal divulgación en virtud de la invención anterior.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, biología celular, genética, inmunología y farmacología, dentro de la habilidad de la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Gennaro, A.R., ed (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Co.; Colowick, S. y col., eds., Methods In Enzymology, Academic Press, Inc.; Handbook of Experimental Immunology, vol. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); Maniatis, T. y col., eds (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, vol. I-III, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. y col., eds (1999) Short Protocols in Molecular Biology, 4ª edición, John Wiley & Sons; Ream y col., eds (1998) Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, Academic Press); PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag).

Definiciones

“Factor de crecimiento de tejido conjuntivo” o “CTGF” se refiere a las secuencias de aminoácidos de CTGF sustancialmente purificado derivado de cualquier especie, particularmente una especie de mamífero, que incluye rata, conejo, bovina, ovina, porcina, murina, equina y homínido, preferentemente la especie humana, y de cualquier fuente, tanto si es natural, sintética, semi-sintética como si es recombinante.

El término “fragmento del extremo N” de CTGF se refiere a cualquier polipéptido que comprenda secuencias derivadas de la porción del extremo amino de un polipéptido de CTGF, o a cualquier variante, o fragmento de la misma. Fragmentos del extremo N pueden incluir todo, ninguno o porciones de CTGF desde el residuo de metionina inicial hasta la región “bisagra” libre de cisteína como se muestra en la Figura 1A y 1B. Además, los fragmentos del extremo N pueden incluir todo, ninguno o porciones del motivo de proteína de unión al factor de crecimiento de insulina y/o el dominio de tipo C de von Willebrand (SEC ID N°: 21) como se muestra en la Figura 1B. Los fragmentos del extremo N de CTGF también pueden incluir toda, ninguna o porciones de la región libre de cisteína. Además, los fragmentos del extremo N de CTGF pueden tener cualesquiera de quince o más aminoácidos contiguos contenidos dentro de cualquier fragmento del extremo N precedente definido anteriormente.

En un aspecto, “fragmento del extremo N” de CTGF se refiere a secuencias de polipéptidos derivadas de la porción del extremo amino de CTGF humano. Tales fragmentos pueden englobar toda la región del residuo de aminoácido 1 a aproximadamente el residuo de aminoácido 198 de SEC ID N°: 2, o de aproximadamente el aminoácido 23 a aproximadamente el aminoácido 198 de SEC ID N°: 2. El límite del fragmento del extremo N dentro de la región bisagra puede definirse opcionalmente por uno de varios sitios de escisión de proteasas definidos en SEC ID N°: 2, tales como sitios de escisión de quimotripsina entre los residuos 179 y 180, entre los residuos 182 y 183 y entre los

residuos 188 y 189; sitios de escisión de plasmina entre los residuos 183 y 184 y entre los residuos 196 y 197; y un sitio de escisión de la proteína-1 morfogenética ósea entre los residuos 169 y 170. Adicionalmente, los fragmentos del extremo N de CTGF humano pueden incluir toda, ninguna o porciones de la región del aminoácido 27 al aminoácido 97 de SEC ID N°: 2, del aminoácido 103 al aminoácido 166 de SEC ID N°: 2, o del aminoácido 167 al aminoácido 198 de SEC ID N°: 2. Además, los fragmentos del extremo N de CTGF humano pueden ser cualesquiera de quince o más aminoácidos contiguos contenidos dentro de cualquier fragmento precedente del extremo N definido anteriormente.

En realizaciones específicas, los fragmentos del extremo N de CTGF de la presente invención comprenden secuencias seleccionadas de las siguientes regiones de CTGF humano (SEC ID N°: 2) y fragmentos ortólogos de las mismas derivados de una especie diferente, particularmente una especie de mamífero que incluye rata, conejo, bovina, ovina, porcina, murina y equina: residuo de aminoácido 23 a residuo de aminoácido 96 (codificado por el exón 2); residuo de aminoácido 27 a residuo de aminoácido 97 (motivo de IGF-BP); residuo de aminoácido 97 a residuo de aminoácido 180 (codificado por el exón 3); residuo de aminoácido 103 a residuo de aminoácido 166 (dominio VWC); residuo de aminoácido 167 a residuo de aminoácido 198 (bisagra libre de cisteína); residuo de aminoácido 23 a residuo de aminoácido 180 (codificado por los exones 2 y 3); residuo de aminoácido 27 a residuo de aminoácido 166 (IGF-BP y VWC); y residuo de aminoácido 23 a residuo de aminoácido 198 (véase la Figura 1B).

El término "fragmento del extremo C" de CTGF se refiere a cualquier polipéptido que comprenda secuencias derivadas de la porción del extremo carboxi de una secuencia de polipéptidos de aminoácidos de CTGF, o a cualquier variante o fragmento de las mismas. Los fragmentos del extremo C de CTGF pueden incluir todas, ninguna o porciones de la región libre de cisteína del polipéptido de CTGF (aminoácido 167 a aminoácido 198 de SEC ID N°: 2).

Los fragmentos del extremo C pueden incluir todo, ninguno o porciones de CTGF de la región bisagra libre de cisteína al extremo de la proteína. Además, los fragmentos del extremo C pueden incluir todo, ninguno o porciones del motivo de trombospondina y/o el motivo de nudo de cisteína. Además, los fragmentos del extremo C de CTGF pueden ser cualesquiera de quince o más aminoácidos contiguos contenidos dentro de cualquier fragmento del extremo C precedente definido anteriormente.

En algunos aspectos, los fragmentos del extremo C pueden englobar la región entera del residuo de aminoácido 181 a aproximadamente el residuo de aminoácido 349 de SEC ID N°: 2. El límite del fragmento del extremo C dentro de la región bisagra puede definirse opcionalmente por uno de varios sitios de escisión de proteasas definidos en SEC ID N°: 2, tal como sitios de escisión de quimotripsina, plasmina y proteína-1 morfogenética ósea definidos anteriormente. Adicionalmente, los fragmentos del extremo C comprenden secuencias seleccionadas de las siguientes regiones de CTGF humano (SEC ID N°: 2) y fragmentos ortólogos de las mismas derivados de una especie diferente, particularmente una especie de mamífero que incluye rata, conejo, bovina, ovina, porcina, murina y equina: aminoácido 201 a aminoácido 242 de SEC ID N°: 2, aminoácido 247 a aminoácido 349 de SEC ID N°: 2, aminoácido 248 a aminoácido 349 de SEC ID N°: 2, o aminoácido 249 a aminoácido 346 de SEC ID N°: 2. Además, los fragmentos del extremo C de CTGF humano pueden ser cualesquiera de quince o más aminoácidos contiguos contenidos dentro de cualquier fragmento del extremo C precedente definido anteriormente.

Los términos "región libre de cisteína" o "región bisagra" de CTGF se refieren a cualquier polipéptido derivado de aproximadamente el residuo de aminoácido 167 a aproximadamente el residuo de aminoácido 198 de CTGF humano (SEC ID N°: 2) y fragmentos ortólogos del mismo derivados de una especie diferente, particularmente una especie de mamífero que incluye rata, conejo, bovina, ovina, porcina, murina y equina.

Los términos "secuencia de aminoácidos" o "polipéptido" o "polipéptidos" como se usa en este documento se refieren a secuencias de oligopéptidos, péptidos, polipéptidos o proteínas, y fragmentos de las mismas, y a moléculas que se producen naturalmente o sintéticas. Un fragmento de polipéptido o aminoácido es cualquier porción de un polipéptido que retiene al menos una característica estructural y/o funcional del polipéptido. Los fragmentos de CTGF incluyen cualquier porción de una secuencia de polipéptidos de CTGF que retiene al menos una característica estructural o funcional de CTGF. Cuando "secuencia de aminoácidos" se cita para referirse a la secuencia de polipéptidos de una molécula de proteína que se produce naturalmente, "secuencia de aminoácidos" y términos similares no pretenden limitar la secuencia de aminoácidos a la secuencia nativa completa asociada a la molécula de proteína citada.

El término "inmunogenicidad" se refiere a la capacidad de una sustancia, cuando se introduce en el cuerpo, para estimular la respuesta inmunitaria y la producción de un anticuerpo. Un agente que muestra la propiedad de inmunogenicidad se denomina en lo sucesivo que es inmunogénico. Agentes inmunogénicos pueden incluir, pero no se limitan a, una variedad de macromoléculas tales como, por ejemplo, proteínas, lipoproteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, bacterias y componentes bacterianos y virus y componentes víricos. Los agentes inmunogénicos tienen frecuentemente un peso molecular superior a 10 kDa. Fragmentos antigénicos se refiere a fragmentos de polipéptido de CTGF, preferentemente fragmentos de aproximadamente cinco a quince aminoácidos de longitud, que retienen al menos un aspecto biológico o inmunológico de la actividad del polipéptido de CTGF.

El término "anticuerpo" se refiere a moléculas intactas, además de a fragmentos de las mismas tales como fragmentos Fab, F(ab')₂ y Fv, que pueden unir el determinante epitópico e incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales. Los anticuerpos que se unen a GTGF o fragmentos de CTGF pueden prepararse usando polipéptidos intactos o usando fragmentos que contienen pequeños péptidos de interés como antígeno inmunizante. El polipéptido u oligopéptido usado para inmunizar un animal (por ejemplo, un ratón, rata, conejo, pollo, pavo, cabra, etc.) puede derivarse de la traducción de ARN, o sintetizarse químicamente, y puede conjugarse con una proteína transportadora, si se desea. Los vehículos comúnmente usados químicamente acoplados a péptidos incluyen, por ejemplo, albúmina de suero bovino, tiroglobulina y hemocianina de lapa californiana (KLH).

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en este documento se refiere a una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos en especificidad y afinidad, excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Obsérvese que una composición de anticuerpo monoclonal puede contener más de un anticuerpo monoclonal.

Los anticuerpos monoclonales incluidos dentro del alcance de la invención incluyen anticuerpos híbridos y recombinantes (por ejemplo, anticuerpos "humanizados") independientemente de las especies de origen o designación de clase o subclase de inmunoglobulinas, además de fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv), que tienen al menos una de las distintas características de los anticuerpos descritos en este documento. Realizaciones preferidas incluyen anticuerpos que pueden unirse a sustancialmente el mismo epítipo que es reconocido por el anticuerpo monoclonal mAb1 y/o tienen afinidad por ese epítipo que es mayor o igual a la afinidad de mAb1.

El término "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales de la invención pueden prepararse usando el procedimiento de hibridomas descrito por primera vez por Kohler y Milstein (1975, Nature 256:495-497), o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante. Por ejemplo, véanse Celltech Therapeutics Ltd., patente europea nº EP-0 120 694; Cabilly y col., patente de EE.UU. nº 4.816.567; o Mage y Lamoyi (1987; en: Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Nueva York pág. 79-97).

El término "anticuerpo neutralizante" como se usa en este documento se refiere a un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo monoclonal, que puede inhibir o eliminar sustancialmente una actividad biológica de CTGF. Normalmente, un anticuerpo neutralizante inhibirá la unión de CTGF a un cofactor tal como TGFβ, a un receptor específico de CTGF asociado a una célula diana, o a otra diana biológica. En una realización particular, un anticuerpo neutralizante inhibirá una actividad biológica de CTGF a un grado aproximadamente igual a o superior a mAb1. Preferentemente, un anticuerpo neutralizante inhibirá una actividad biológica de CTGF a un grado aproximadamente igual a o superior a CLN1.

El término "trastornos asociados a CTGF" como se usa en este documento se refiere a afecciones y enfermedades asociadas a expresión o actividad anormal o alterada de CTGF. La expresión anormal de CTGF se ha asociado a trastornos proliferativos de células tales como aquellos producidos por proliferación de células endoteliales; migración celular; crecimientos similares a tumores; cicatrización de tejido general; y diversas enfermedades caracterizadas por deposición inapropiada de matriz extracelular.

Los trastornos asociados a CTGF incluyen, pero no se limitan a, trastornos que implican angiogénesis y otros procedimientos que desempeñan una función central en afecciones tales como vitreorretinopatía proliferativa; cáncer, que incluye leucemia linfoblástica aguda, dermatofibromas, cáncer de mama, carcinoma, glioma y glioblastoma de mama, rhabdomyosarcoma y fibrosarcoma, desmoplasia, angioliopoma, angioleiomioma, cánceres desmoplásicos, y cáncer de próstata, ovario, colorrectal, pancreático, gastrointestinal y de hígado; otro crecimiento tumoral y metástasis; etc.

Los trastornos asociados a CTGF también incluyen trastornos fibróticos y afecciones relacionadas tales como cicatrización excesiva resultante de fibrosis localizada o sistémica, fibrosis crónica o aguda de órganos tales como el riñón, pulmones, hígado, ojos, corazón, piel, etc.; o un tejido seleccionado de, pero no se limita a, tejido epitelial, endotelial y conjuntivo. La fibrosis también puede producirse en el ojo y las articulaciones. Tales trastornos asociados a CTGF incluyen, por ejemplo, fibrosis cardíaca, que incluye fibrosis reactiva cardíaca o remodelación cardíaca tras infarto de miocardio o insuficiencia cardíaca congestiva; trastornos pulmonares, que incluyen fibrosis pulmonar intersticial, etc.; fibrosis asociada a diálisis que incluye diálisis peritoneal, por ejemplo, diálisis peritoneal ambulatoria continua (CAPD); fibrosis peridural; fibrosis renal; fibrosis pulmonar; fibrosis intersticial; fibrosis de la piel; y fibrosis resultantes de traumatismos agudos o repetitivos que incluyen cirugía, quimioterapia, tratamiento con radiación, rechazo de aloinjerto, rechazo crónico y agudo de trasplante (por ejemplo, riñón, hígado u otro órgano); bronquiolititis obliterante, por ejemplo, tras trasplante de pulmón; e inflamación e infección, por ejemplo, debidas a enfermedad o lesión.

Adicionalmente, los trastornos asociados a CTGF incluyen, pero no se limitan a, afecciones escleróticas que incluyen esclerosis sistémica, esclerodermia, queloides, cicatrización hipertrófica y otras enfermedades y afecciones

dermatológicas; aterosclerosis tales como afecciones que implican placas ateroscleróticas y aterosclerosis asociada a diabetes, diálisis peritoneal, etc.; artritis que incluyen artritis reumatoide, osteoartritis y otras afecciones inflamatorias de las articulaciones, etc.; enfermedades intersticiales que incluyen fibrosis intersticial; enfermedad de Crohn; enfermedad inflamatoria del intestino; retinopatías que incluyen, por ejemplo, vitreorretinopatía proliferativa, retinopatía diabética no proliferativa, retinopatía diabética proliferativa y degeneración macular (incluyendo enfermedad relacionada con la edad y juvenil (Stargardt) y desprendimiento del epitelio pigmentario); nefropatías que incluyen nefropatía diabética, nefropatía asociada a IgA, nefropatía debida a toxicidad, nefropatía lúpica, etc.; y afecciones asociadas a la destrucción de túbulos por toxicidad química.

Los trastornos asociados a CTGF también incluyen, pero no se limitan a, trastornos debidos a hiperglucemia, hipertensión, formación de productos finales de la glicación avanzada (AGE), etc. Tales trastornos pueden producirse, por ejemplo, debido a diabetes, obesidad, etc., e incluyen nefropatía diabética, retinopatía y enfermedad cardiovascular. Además, los trastornos asociados a CTGF pueden producirse por cualquier factor iniciador que incluye, pero no se limita a, exposición a agentes químicos o biológicos, respuesta inflamatoria, reacción autoinmunitaria, traumatismo, procedimientos quirúrgicos, etc. En algunas realizaciones, los procedimientos se usan para tratar un paciente predispuesto a un trastorno asociado a CTGF debido a una afección que incluye, pero no se limita a, infarto de miocardio, artritis e inflamación local o sistémica.

Los procedimientos y trastornos “proliferativos” citados en este documento incluyen estados patológicos caracterizados por la multiplicación continua de células que producen un crecimiento en exceso de una población de células dentro de un tejido. Las poblaciones de células no son necesariamente células transformadas, tumorigénicas o malignas, sino que también pueden incluir células normales. Por ejemplo, el CTGF puede estar patológicamente implicado induciendo una lesión proliferativa en la capa de la íntima de una pared arterial, produciendo aterosclerosis, o estimulando la neovascularización.

“Cáncer” se refiere a cualquier crecimiento autónomo de tejido que incluye crecimiento anormal no controlado de células, o a cualquier tumor maligno de crecimiento posiblemente ilimitado que se extiende localmente por invasión y sistémicamente por metástasis. Cáncer también se refiere a cualquier estado anormal marcado por un cáncer.

El término “fibrosis” se refiere a procesamiento anormal de tejido fibroso, o degeneración fibroide o fibrosa. La fibrosis puede resultar de diversas lesiones o enfermedades, y frecuentemente puede resultar de rechazo crónico de trasplante relacionado con el trasplante de diversos órganos. La fibrosis normalmente implica la producción, acumulación o deposición anormal de componentes de la matriz extracelular que incluye producción en exceso y aumento de la deposición de, por ejemplo, colágeno y fibronectina. “Fibrosis” se usa en este documento en su sentido más amplio con referencia a cualquier producción o deposición en exceso de proteínas de la matriz extracelular. Hay numerosos ejemplos de fibrosis que incluyen formación de tejido cicatricial tras un infarto de miocardio, que altera la capacidad del corazón para bombear. La diabetes frecuentemente produce lesión/cicatrización en los riñones, que conduce a una pérdida progresiva de la función renal; y en los ojos, que produce pérdida de visión. Después de la cirugía, el tejido cicatricial puede formarse entre órganos internos causando contractura, dolor y, en algunos casos, infertilidad. Los órganos principales tales como el corazón, riñón, hígado, ojo y la piel tienen tendencia a cicatrización crónica, comúnmente asociada a otras enfermedades. Las cicatrices hipertróficas (masa de tejido no maligno) son una forma común de fibrosis producida por quemaduras y otro traumatismo. Además, hay varios otros trastornos fibroproliferativos que incluyen esclerodermia, queloides y aterosclerosis que están asociados respectivamente a cicatrización de tejido general, crecimientos similares a tumores en la piel, o cicatrización sostenida de vasos sanguíneos que altera la capacidad de transportar sangre.

Los términos “ácido nucleico” o “polinucleótido” o “polinucleótidos” se refieren a oligonucleótidos, secuencias de nucleótidos, o polinucleótidos, o cualquier fragmento de los mismos, y a ADN o ARN de origen natural o sintético que puede ser monocatenario o bicatenario y puede representar la hebra sentido o codificante, a ácido nucleico peptídico (PNA), o a cualquier material similar a ADN o similar a ARN, de origen natural o sintético. Los fragmentos de polinucleótidos son cualquier porción de una secuencia de polinucleótidos que retiene al menos una característica estructural o funcional del polinucleótido. Los fragmentos de polinucleótidos pueden ser de longitud variable, por ejemplo, superior a 60 nucleótidos de longitud, al menos 100 nucleótidos de longitud, al menos 1000 nucleótidos de longitud, o al menos 10.000 nucleótidos de longitud.

Polinucleótidos “alterados” incluyen aquellos con deleciones, inserciones o sustituciones de diferentes nucleótidos produciendo un polinucleótido que codifica el mismo péptido o un polipéptido funcionalmente equivalente. Dentro de esta definición están incluidas secuencias que muestran polimorfismos que pueden o pueden no ser fácilmente detectables usando sondas de oligonucleótidos particulares o mediante deleción de hibridación incorrecta o no esperada con alelos, con un locus distinto del locus cromosómico normal para la secuencia de polinucleótidos objeto.

Los polipéptidos “alterados” pueden contener deleciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y producen un polipéptido funcionalmente equivalente. Las sustituciones deliberadas de aminoácidos pueden hacerse basándose en la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los residuos en tanto que se retenga la actividad biológica o inmunológica del polipéptido codificado. Por ejemplo, aminoácidos negativamente cargados pueden incluir ácido aspártico y ácido

glutámico; aminoácidos positivamente cargados pueden incluir lisina y arginina; y aminoácidos con grupos de cabeza polares sin carga que tienen valores de hidrofilia similares pueden incluir leucina, isoleucina y valina, glicina y alanina, asparagina y glutamina, serina y treonina, y fenilalanina y tirosina.

5 Una "variante" de polipéptido o aminoácido es una secuencia de aminoácidos que está alterada por uno o más aminoácidos de una secuencia de aminoácidos particular. Una variante de polipéptido puede tener cambios conservativos, teniendo un aminoácido sustituido propiedades estructurales o químicas similares al aminoácido sustituido, por ejemplo, sustitución de leucina con isoleucina. Una variante también puede tener cambios no conservativos, teniendo el aminoácido sustituido propiedades físicas diferentes de las del aminoácido sustituido, por ejemplo, sustitución de una glicina con un triptófano. Variaciones menores análogas también pueden incluir 10 delecciones o inserciones de aminoácidos, o ambas. Preferentemente, las variantes de aminoácido retienen ciertas características estructurales o funcionales de un polipéptido particular. La orientación en la determinación de qué residuos de aminoácidos pueden estar sustituidos, insertados o deleccionados puede encontrarse, por ejemplo, usando programas informáticos muy conocidos en la técnica tales como el software LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI).

15 Una variante de polinucleótido es una variante de una secuencia de polinucleótidos particular que tiene preferentemente al menos aproximadamente el 80%, más preferentemente al menos aproximadamente el 90%, y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 95% de similitud de secuencias de polinucleótidos con la secuencia de polinucleótidos particular. Se apreciará por aquellos expertos en la materia que como resultado de la degeneración del código genético puede producirse una multitud de secuencias de polinucleótidos de variantes que 20 codifican una proteína particular, llevando algunas homología mínima con las secuencias de polinucleótidos de cualquier gen conocido y que se produce naturalmente. Por tanto, la invención contempla todas y cada una de las posibles variaciones de la secuencia de polinucleótidos que podrían hacerse seleccionando combinaciones basadas en posibles elecciones de codones. Estas combinaciones se hacen según el código genético de triplete de codones estándar, y todas aquellas variaciones van a considerarse que están específicamente desveladas.

25 Una "delección" es un cambio en una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que resulta en ausencia de uno o más residuos de aminoácidos o nucleótidos.

Los términos "inserción" o "adición" se refieren a un cambio en una secuencia de polipéptidos o de polinucleótidos que produce la adición de uno o más residuos de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, con respecto a la molécula que se produce naturalmente.

30 El término "equivalente funcional" como se usa en este documento se refiere a un polipéptido o polinucleótido que posee al menos una característica funcional y/o estructural de un polipéptido o polinucleótido particular. Un equivalente funcional puede contener modificaciones que permiten la realización de una función específica. Está previsto que el término "equivalente funcional" incluya fragmentos, mutantes, híbridos, variantes, análogos o derivados químicos de una molécula.

35 El término "micromatriz" se refiere a cualquier disposición de ácidos nucleicos, aminoácidos, anticuerpos, etc., sobre un sustrato. El sustrato puede ser cualquier soporte adecuado, por ejemplo, perlas, vidrio, papel, nitrocelulosa, nailon, o cualquier membrana apropiada, etc. Un sustrato puede ser cualquier soporte rígido o semirígido que incluye, pero no se limita a, membranas, filtros, obleas, pastillas, portaobjetos, fibras, perlas, que incluyen perlas magnéticas o no magnéticas, geles, tubos, placas, polímeros, micropartículas, capilares, etc. El sustrato puede 40 proporcionar una superficie para el recubrimiento y/o puede tener una variedad de formas superficiales tales como pocillos, agujas, zanjias, canales y poros a los que pueden unirse los ácidos nucleicos, aminoácidos, etc.

El término "muestra" se usa en este documento en su sentido más amplio. Las muestras pueden derivarse de cualquier fuente, por ejemplo, de fluidos corporales, secreciones, tejidos, células o células en cultivo que incluyen, pero no se limitan a, saliva, sangre, orina, suero, plasma, humor vítreo, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, 45 líquido amniótico y tejido de órgano (por ejemplo, tejido biopsiado); de cromosomas, orgánulos u otras membranas aisladas de una célula; de ADN genómico, ADNc, ARN, ARNm, etc.; y de células o tejidos purificados, o transferencias o improntas de tales células o tejidos. Las muestras pueden derivarse de cualquier fuente tal como, por ejemplo, un sujeto humano, o un sujeto mamífero no humano, etc. También se contemplan muestras derivadas de cualquier modelo animal de enfermedad. Una muestra puede estar en disolución o puede, por ejemplo, fijarse o unirse a un sustrato. Una muestra puede referirse a cualquier material adecuado para probar la presencia de CTGF 50 o de fragmentos de CTGF o adecuado para cribar moléculas que se unen a CTGF o a fragmentos del mismo. Los procedimientos para obtener tales muestras están dentro del nivel de habilidad en la materia.

El término "hibridación" se refiere al procedimiento por el que una secuencia de ácidos nucleicos se une a una secuencia complementaria mediante apareamiento de bases. Las condiciones de hibridación pueden definirse, por ejemplo, por las concentraciones de sal o formamida en las disoluciones de prehibridación e hibridación, o por la 55 temperatura de hibridación, y son muy conocidas en la técnica. La hibridación puede producirse en condiciones de diversa rigurosidad.

En particular, la rigurosidad puede aumentarse reduciendo la concentración de sal, aumentando la concentración de formamida o aumentando la temperatura de hibridación. Por ejemplo, para los fines de la presente invención, la hibridación bajo condiciones de alta rigurosidad podría producirse en aproximadamente el 50% de formamida a aproximadamente 37°C a 42°C, y bajo condiciones de rigurosidad reducida en aproximadamente 35% al 25% de formamida a aproximadamente 30°C a 35°C. En particular, la hibridación se produce generalmente en condiciones de la mayor rigurosidad a 42°C en 50% de formamida, 5X SSPE, 0,3% de SDS y 200 µg/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado.

El intervalo de temperatura correspondiente a un nivel de rigurosidad particular puede estrecharse adicionalmente mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, calculando la relación de purina con respecto a pirimidina del ácido nucleico de interés y ajustando la temperatura consiguientemente. Para eliminar señales no específicas, las transferencias pueden lavarse secuencialmente, por ejemplo, a temperatura ambiente o hasta y que incluye 60°C, bajo condiciones crecientemente rigurosas de hasta 0,1X SSC y 0,5% de SDS. Las variaciones en los intervalos anteriores y las condiciones son muy conocidas en la técnica.

Invención

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF). Los anticuerpos son anticuerpos policlonales o monoclonales, preferentemente anticuerpos monoclonales, y más preferentemente anticuerpos monoclonales humanos. Los anticuerpos están dirigidos hacia el fragmento del extremo N de CTGF, mostrado en la Figura 1. Más específicamente, los anticuerpos están dirigidos hacia un fragmento de CTGF que se extiende de aproximadamente el residuo 143 a aproximadamente el residuo 154 de SEC ID N°: 2.

En realizaciones particulares, los anticuerpos neutralizan una actividad biológica de CTGF. Actividades biológicas de CTGF incluyen proliferación celular, diferenciación, expresión génica, etc. En realizaciones particulares, la actividad biológica se selecciona del grupo que consiste en diferenciación celular, por ejemplo, diferenciación o transdiferenciación de fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliales, etc., de diversas células precursoras; inducción de la expresión de proteínas que participan en la formación y remodelación de la matriz extracelular que incluyen, por ejemplo, colágeno de tipo I, fibronectina, etc.; inducción cooperativa de cascadas de señalización asociadas a diversos factores que incluyen, pero no se limitan a, TGF-β, IGF, VEGF, angiotensina II, endotelina, etc.; y respuesta celular a diversos estímulos medioambientales que incluyen, pero no se limitan a, aumento de glucosa (hiperglucemia), aumento del estrés mecánico (hipertensión), etc.

Aunque la invención no tiene que limitarse por el mecanismo por el que los anticuerpos neutralizan la actividad de CTGF, los anticuerpos pueden unirse a y prevenir la interacción de CRGF con receptores de células específicas. Los receptores pueden tener alta afinidad de unión por CTGF y, uniéndose a CTGF, estimulan una señal intracelular que conduce a proliferación, diferenciación, inducción de expresión génica y/o cambio en la morfología o función celular. La respuesta biológica particular de una célula a CTGF depende de la célula y del estado actual del medio circundante. Alternativamente, los receptores pueden tener baja afinidad de unión por CTGF y, uniéndose a CTGF, pueden, por ejemplo, la posición de CTGF con respecto a receptores de alta afinidad para facilitar el reconocimiento de y la respuesta a CTGF. Alternativamente, los anticuerpos pueden unirse a CTGF dentro de tejidos u órganos y facilitar la valoración o eliminación de CTGF del cuerpo.

Alternativamente o conjuntamente con los mecanismos descritos anteriormente, los anticuerpos pueden unirse a y prevenir la interacción de GTGF con cofactores secretados o unidos a membrana. Tales cofactores incluyen específicamente miembros de la superfamilia de TGFβ que incluye, por ejemplo, TGFβ-1, -2 y -3; activina-A, -B, -C y -E; BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7, -8a, -8b, -9, -10, -11 y -15; y GDF-3, -5, -6, -7, -9 y -10. Por ejemplo, se ha mostrado que CTGF se une a TGFβ-1 y BMP-4 y modula su actividad (Abreu y col (2002) Nat Cell Biol 4: 599-604). La presente invención proporciona pruebas de que la región de CTGF que se une a TGFβ está codificada por el exón 3 (Figura 1B; nucleótido 418 a nucleótido 669 de SEC ID N°: 1) y los anticuerpos que se unen dentro de esta región evitan la interacción entre CTGF y TGFβ (Ejemplo 12, más adelante). Además, se ha mostrado que los anticuerpos que se unen dentro de esta región de CTGF neutralizan procedimientos asociados a CTGF específicos en modelos animales. Por ejemplo, se ha mostrado que los anticuerpos que se unen dentro de esta región de CTGF inhiben específicamente la migración celular en ensayos *ex vivo* y reducen la fibrosis en modelos animales. Anticuerpos a modo de ejemplo de la invención son mAb1 y CLN1; el anticuerpo CLN1 se produce por la línea celular definida por el n° de acceso de ATCC PTA-0006 depositada en la Colección americana de cultivos tipo (Manassus VA).

Independientemente del mecanismo de acción, la presente invención proporciona anticuerpos para su uso en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos asociados a CTGF. Enfermedades y trastornos asociados a CTGF incluyen, pero no se limitan a, nefropatías, fibrosis pulmonares, retinopatías, esclerodermia, fibrosis hepáticas, insuficiencia cardíaca, artritis y aterosclerosis. Adicionalmente, los trastornos asociados a CTGF se producen debido a diversos factores que incluyen, pero no se limitan a, hiperglucemia, hipertensión, diabetes, obesidad, etc.; e incluyen nefropatía diabética, retinopatía, enfermedad cardiovascular y similares. Como CTGF se expresa en exceso en una amplia variedad de enfermedades que incluyen aquellas enumeradas anteriormente, la invención contempla tratar pacientes que tienen un trastorno asociado a CTGF con un anticuerpo contra CTGF para mejorar o estabilizar la patología, retener o restaurar la función, mejorar la calidad de vida y prolongar la supervivencia.

Por ejemplo, los anticuerpos están particularmente dirigidos contra regiones de CTGF que participan en actividades biológicas asociadas a aspectos tanto fibróticos como no fibróticos de diversos trastornos que incluyen, por ejemplo, fibrosis pulmonar intersticial, nefropatía diabética y retinopatía, degeneración macular, etc. La invención también se refiere a anticuerpos para su uso en el tratamiento de trastornos asociados a CTGF que incluyen trastornos fibróticos localizados y sistémicos tales como aquellos del pulmón, hígado, corazón, piel y riñón, etc.; y formación de cicatrices localizada debido a, por ejemplo, traumatismo, procedimientos quirúrgicos, etc.

Los anticuerpos de la invención también pueden usarse en cualquier procedimiento que implique unión a CTGF. Tales procedimientos incluyen purificación de CTGF o fragmentos de CTGF, por ejemplo, por cromatografía de afinidad; detección de CTGF o fragmentos de CTGF en una muestra, por ejemplo, usando ELISA o técnicas inmunohistoquímicas; diagnóstico de un trastorno asociado a CTGF usando el procedimiento de detectar CTGF para medir niveles de CTGF en una muestra de paciente y comparación del nivel de CTGF en la muestra con un patrón.

Anticuerpos dirigidos contra CRGF

Se ha demostrado la modulación de la cantidad y/o actividad de factores celulares secretados usando, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, y se han aprobado varios anticuerpos terapéuticos o están en desarrollo (véanse, por ejemplo, abciximab (Reopro; Centocor, Inc., Malvern PA), infliximab (Remicade; Maini y col (1998) *Arthritis Rheum* 41:1552-1563; Targan y col (1997) *N Engl J Med* 337:1029-1035); basiliximab (Simulect) y daclizumab (Zenapax) (Bumgardner y col (2001) *Transplantation* 72:839-845; Kovarik y col (1999) *Transplantation* 68:1288-1294); y trastuzumab (Herceptin; Baselga (2001) *Ann Oncol* 12 Suppl 1:S49-55)). Numerosos procedimientos de producción de anticuerpos, que incluyen producción en animales, plantas, hongos y bacterias; construcción sintética; y cultivo *ex vivo*; son conocidos y están disponibles para aquellos expertos en la materia.

Los anticuerpos de la invención pueden prepararse usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo. Técnicas para la producción *in vivo* e *in vitro* de tanto anticuerpos monoclonales como policlonales son muy conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, Pound (1998) *Immunochemical Protocols*, Humana Press, Totowa NJ; Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2ª edición, Academic Press; Schook (1987) *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc.). La producción de anticuerpos quiméricos también es muy conocida en la técnica, como es la producción de anticuerpos monocatenarios (véanse, por ejemplo, Morrison y col (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6851-6855; Neuberger y col (1984) *Nature* 312:604-608; Takeda y col (1985) *Nature* 314:452-454). Los anticuerpos con especificidad relacionada, pero de distinta composición idiotípica, pueden generarse mediante una variedad de medios disponibles, por ejemplo, por barajado de cadenas de bibliotecas de inmunoglobina combinatorias al azar (véase, por ejemplo, Burton (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11120-11123).

Los anticuerpos también pueden producirse induciendo la producción *in vivo* en la población de linfocitos o por cribado de bibliotecas de inmunoglobulina o paneles de reactivos de unión altamente específica (véanse, por ejemplo, Orlandi y col (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3833-3837; Winter y Milstein (1991) *Nature* 349:293-299). También pueden generarse fragmentos de anticuerpos que contienen sitios de unión específica para el polipéptido diana. Tales fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos F(ab')₂ que pueden producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y fragmentos Fab, que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, las bibliotecas de expresión de Fab pueden construirse para permitir la rápida y fácil identificación de fragmentos monoclonales Fab con la especificidad deseada (véase, por ejemplo, Huse y col (1989) *Science* 254:1275-1281).

Los anticuerpos monoclonales de la invención también pueden prepararse usando el procedimiento de hibridomas (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497) o mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Celltech Therapeutics Ltd., patente europea nº EP 0 120 694; Cabilly y col., patente de EE.UU. nº 4.816.567; y Mage y Lamoyi (1987) en: *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, pág. 79-97).

En el procedimiento de hibridomas, un ratón u otro animal huésped apropiado se inmuniza con CTGF o un fragmento del mismo por vías subcutánea, intraperitoneal o intramuscular para hacer que los linfocitos produzcan o puedan producir anticuerpos que se unirán específicamente al polipéptido usado para la inmunización. Alternativamente, el animal huésped puede ser un mamífero transgénico que tiene transgenes que codifican genes de inmunoglobulina humana y que tienen loci de inmunoglobulina endógenos inactivados. El mamífero transgénico responde a inmunógenos produciendo anticuerpos humanos (véanse, por ejemplo, Lonberg y col., documento WO 93/12227 (1993), patente de EE.UU. nº 5.877.397, y *Nature* 148:1547-1553 (1994); y Kucherlapati y col (1991) documento WO 91/10741). Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro* y luego fusionarse con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado tal como polietilenglicol para formar una célula de hibridoma (véase, por ejemplo, Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2ª edición, Academic Press, pág. 59-103). Alternativamente, las células somáticas humanas que pueden producir anticuerpo, específicamente linfocitos B, son adecuadas para fusión con líneas de células de mieloma. Aunque pueden usarse linfocitos B de bazo biopsizados, amígdalas o ganglios linfáticos de un individuo, se prefieren los linfocitos B de sangre periférica más fácilmente accesibles. Además, los linfocitos B humanos pueden immortalizarse directamente

por el virus de Epstein-Barr (véase, por ejemplo, Cole y col (1995) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pág. 77-96).

Líneas de células de mieloma preferidas para su uso en los procedimientos de fusión de hibridomas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan expresión de anticuerpos de alto nivel estable por la célula productora de anticuerpos seleccionada, tienen deficiencias en enzimas que hacen que no puedan crecer en ciertos medios selectivos que soportan el crecimiento de los hibridomas deseados y que no produzcan por sí mismos anticuerpo. Ejemplos de líneas de células de mieloma que pueden usarse para la producción de hibridomas en la presente invención incluyen P3X63Ag8, P3X63Ag8-653, NS1/1.Ag4.1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7, S194/5XX0 Bul, todas derivadas de ratones; R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210, todas derivadas de ratas; y U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2, UC729-6, todas derivadas de seres humanos (véanse, por ejemplo, Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2ª edición, Academic Press, pág. 65-66; y Campbell (1984) en: *Monoclonal Antibody Technology Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 13 (Burden y Von Knippenberg, eds). Ámsterdam, Elsevier, pág. 75-83).

Las células de hibridoma se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales sin fusionar. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá una sustancia tal como hiperxantina, aminopterina y timidina (medio HAT) que previene el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

El medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra CTGF o fragmentos de CTGF. Preferentemente, la especificidad de unión se determina por cromatografía de afinidad, inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro* tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), o por análisis de citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS). Los anticuerpos monoclonales de la invención son aquellos que se unen a CTGF, y adicionalmente aquellos que neutralizan una actividad biológica de CTGF, como se ejemplifica más adelante.

Los anticuerpos producidos, por ejemplo, como se describe anteriormente son opcionalmente cribados para detectar anticuerpos que se unen sustancialmente al fragmento del extremo N de CTGF. Los anticuerpos están dirigidos hacia un fragmento de CTGF que se extiende de aproximadamente el residuo 143 a aproximadamente el residuo 154 de SEC ID N°: 2 En una realización particular, el cribado detecta anticuerpos que se unen sustancialmente al mismo epítipo reconocido por el anticuerpo mAb1 como se ha determinado, por ejemplo, por ensayos de competencia del tipo descrito más adelante. En otra realización particular, el cribado detecta anticuerpos que se unen sustancialmente al mismo epítipo reconocido por el anticuerpo CLN1 como se ha determinado, por ejemplo, por ensayos de competencia del tipo descrito más adelante. Debe tenerse en cuenta que "mismo epítipo" no significa el aminoácido o hidrato de carbono exacto al que se une el anticuerpo de referencia, como puede determinarse, por ejemplo, por mapeado de epítopes usando variantes barridas con alanina de CTGF. "Mismo epítipo" significa el dominio de CTGF que se bloquea por la unión a CTGF del anticuerpo de referencia nativo en forma intacta. Por supuesto, "mismo epítipo" incluye los residuos del dominio de CTGF o hidrato de carbono que interactúa estructuralmente o se une a las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de referencia de mAb1 o CLN1.

En una realización preferida de la invención, el anticuerpo monoclonal tendrá una afinidad que es igual a o superior a la de Ab1 como se determina, por ejemplo, por el análisis de Scatchard de Munson y Pollard (1980, *Anal Biochem* 107:220).

Después de identificarse células de hibridoma que producen anticuerpos neutralizantes de la especificidad y afinidad deseadas, los clones normalmente se subclonan por procedimientos de dilución limitante y se cultivan mediante procedimientos convencionales (Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2ª edición, Academic Press, pág. 59-104). Medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio Eagle modificado por Dulbecco o medio RPMI-1640, Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como ascitis de tumores en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales, por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo. Una vez aislado, el ADN puede ligarse en vectores de expresión o de clonación, que luego se transfectan en células huésped tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo proteína de inmunoglobulina. Las células así transformadas se cultivan en condiciones adecuadas para la

síntesis de anticuerpos monoclonales en el cultivo recombinante de células huésped. Una línea celular a modo de ejemplo se define por el nº de acceso de ATCC PTA-6006.

El ADN se modifica opcionalmente con el fin de cambiar el carácter de la inmunoglobulina codificada. Las variantes de inmunoglobulinas son muy conocidas. Por ejemplo, los anticuerpos quiméricos se preparan sustituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes de la cadena pesada y ligera de una especie, por ejemplo, ratón, con las secuencias homólogas de otras especies, por ejemplo, humana (véanse, por ejemplo, Boss y col., publicación internacional nº WO 84/03712; Cabilly y col., patente de EE.UU. nº 4.816.567; o Morrison y col (1984) Proc Nat Acad Sci 81:6851). En una realización particular, las formas humanizadas de anticuerpos murinos pueden prepararse sustituyendo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), es decir, los dominios variables, de un anticuerpo de ratón en un dominio de región estructural, es decir, la región constante, de un anticuerpo humano (véase, por ejemplo, publicación internacional nº WO 92/22653). En algunas realizaciones, los residuos de la región estructural murina seleccionada también están sustituidos en la inmunoglobulina del receptor humano. Además, el dominio Fc elegido puede ser cualquiera de IgA, IgD, IgE, IgG-1, IgG-2, IgG-3, IgG-4 o IgM. El dominio Fc puede realizar opcionalmente funciones efectoras tales como unión a complemento.

Los anticuerpos anti-CTGF de la presente invención también pueden fusionarse con restos que proporcionan capacidades adicionales tales como detección o efectos citotóxicos. Las fusiones de las inmunoglobulinas de la presente invención y los restos citotóxicos se hacen, por ejemplo, ligando a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido de no inmunoglobulina citotóxico. Tales polipéptidos de no inmunoglobulina incluyen toxinas de polipéptido tales como toxina de ricina, diftérica o exotoxina de *Pseudomonas*. Los conjugados también pueden prepararse por procedimientos *in vitro*. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter entre la inmunoglobulina y el polipéptido de toxina. Ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y 4-mercaptobutirimidato de metilo. Normalmente, tales polipéptidos de fusión de no inmunoglobulina sustituyen a los dominios constantes de un anticuerpo de la invención. Alternativamente, sustituyen a los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención.

La sustitución de Fv o CDR de un anticuerpo que tiene especificidad por un antígeno de no CTGF creará un anticuerpo quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por CTGF y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente. En tales realizaciones, la cadena ligera está delecionada y el Fv de la cadena pesada está sustituido con el polipéptido deseado. Estos anticuerpos se llaman bivalentes o polivalentes, dependiendo del número de "brazos" de inmunoglobulina poseídos por el dominio de Fc empleado; por ejemplo, las IgG serán bivalentes y las IgM serán polivalentes. Aparte de las no inmunoglobulinas mencionadas anteriormente, el anticuerpo también se convierte en multivalente por recombinación de anticuerpos que tienen más de una especificidad. Por ejemplo, el anticuerpo en algunas realizaciones puede unirse a CTGF como se describe en cualquier parte en este documento, pero también puede unirse a un segundo factor de crecimiento, por ejemplo, TGFβ, VEGF, FGF, otros miembros de la familia de CCN, por ejemplo, CYR61, y similares, o una citocina. Los anticuerpos dirigidos contra estos factores a modo de ejemplo son muy conocidos. Los anticuerpos multivalentes multispecíficos se preparan cotransformando una célula con ADN que codifica las cadenas pesadas y ligeras de ambos anticuerpos y teniendo la proporción de anticuerpos expresados la estructura deseada recuperada por inmunocromatografía de afinidad o similares. Alternativamente, tales anticuerpos se preparan a partir de anticuerpos monovalentes que se recombinan *in vitro* en modo convencional.

Los anticuerpos monovalentes también se preparan por técnicas que son por sí convencionales. La expresión recombinante de cadena ligera y una cadena pesada modificada es adecuada. La cadena pesada está truncada generalmente en cualquier punto en la región Fc de manera que se evite la reticulación de las cadenas pesadas. Alternativamente, las cisteínas relevantes están sustituidas con otro residuo o delecionadas de manera que se evite la reticulación. También se usan procedimientos *in vitro* para producir anticuerpos monovalentes, por ejemplo, los fragmentos Fab se preparan por escisión enzimática de anticuerpo intacto.

Diagnóstico

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para detectar cuantitativamente y cualitativamente CTGF en una muestra. Las muestras pueden ser de cualquier fuente, que incluye medios acondicionados de células cultivadas en cultivo; muestras de tejido, por ejemplo, biopsias de tejido y trasplantes de órgano; fluidos corporales que incluyen sangre, orina, líquido de ampollas, líquido cefalorraquídeo, humor vítreo y líquido sinovial; etc. En una realización, la detección de CTGF se usa para diagnosticar el estado de células cultivadas en cultivo, por ejemplo, con respecto a la diferenciación, producción de matriz, etc. El CTGF tiene diversos efectos autocrinos y paracrinos sobre células cultivadas, y el nivel de CTGF asociado a la capa de células o presente en medios acondicionados puede ser indicativo del estado presente de la célula o predictivo del estado futuro de la célula (véase, por ejemplo, publicación internacional nº WO 96/38168). En otras realizaciones, la detección de CTGF se usa para determinar el estado de un tejido u órgano. Por ejemplo, un órgano destinado para el trasplante puede evaluarse midiendo los niveles de CTGF, en el que el nivel de CTGF expresado por células en el órgano indica la salud relativa del órgano y la idoneidad para el trasplante. Los niveles de CTGF también pueden determinarse en tejido biopsizado para determinar el estado de un órgano, o el estado y posible potencial metastásico de un cáncer.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos se usan para diagnosticar una enfermedad o trastorno asociado a CTGF (véase, por ejemplo, publicación internacional nº WO 03/024308). En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos para diagnosticar un trastorno asociado a CTGF obteniendo una muestra, detectando y cuantificando el nivel de CTGF en la muestra y comparando el nivel de CTGF en la muestra con el de una cantidad patrón de CTGF, siendo un aumento o disminución de la cantidad de CTGF en la muestra indicativo de la presencia de un trastorno asociado a CTGF. Los trastornos asociados a niveles anómalos (por ejemplo, elevados o disminuidos) de CTGF incluyen, pero no se limitan a, trastornos asociados a expresión alterada y proteínas asociadas a la deposición de matriz extracelular. Tales trastornos incluyen, por ejemplo, cánceres tales como cáncer de mama, pancreático y gastrointestinal; aterosclerosis, artritis, retinopatías tales como retinopatía diabética; nefropatías tales como nefropatía diabética; fibrosis cardíaca, pulmonar, hepática y renal, y enfermedades asociadas a inflamación y/o infección crónica. Los trastornos asociados a CTGF también están asociados a afecciones tales como infarto de miocardio, diabetes, diálisis peritoneal, rechazo crónico y agudo de trasplante, quimioterapia, radioterapia y cirugía.

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos para identificar si un individuo tienen o no una predisposición para desarrollar un trastorno asociado a CTGF. Una predisposición puede indicarse inicialmente por hiperglucemia, hipertensión u obesidad en un sujeto. Adicionalmente, una predisposición puede sospecharse debido a un acontecimiento, por ejemplo, un infarto de miocardio, cirugía, inmovilización ortopédica o paralítica, insuficiencia cardíaca congestiva, embarazo o varicosidades en el sujeto.

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos para monitorizar la progresión de un trastorno asociado a CTGF o monitorizar la eficacia terapéutica del tratamiento de un trastorno asociado a CTGF. Por ejemplo, un procedimiento de uso de los anticuerpos puede comprender obtener muestras de un sujeto con el tiempo; detectar y cuantificar el nivel de CTGF en cada muestra; y comparar el nivel de CTGF en muestras posterior con niveles de CTGF en muestras anteriores o previas. Un cambio en el nivel de CTGF entre muestras con el tiempo es indicativo de la progresión del trastorno asociado a CTGF o la eficacia terapéutica del tratamiento del trastorno asociado a CTGF.

Para aplicaciones de diagnóstico, los anticuerpos de la invención normalmente se marcarán con un resto detectable. El resto detectable puede ser cualquier resto que pueda producir, tanto directamente como indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I , un compuesto fluorescente o quimioluminiscente tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; o una enzima tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante.

Puede emplearse cualquier procedimiento conocido en la técnica para conjugar por separado el anticuerpo con el resto detectable (véanse, por ejemplo, Hunter y col (1962) *Nature* 144:945; David y col (1974) *Biochemistry* 13:1014; Pain y col (1981) *J Immunol Meth* 40:219; y Nygren (1982) *J Histochem Citochem* 30:407). Los anticuerpos de la presente invención pueden emplearse en cualquier procedimiento de ensayo conocido tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación (Zola (1987) en: *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., pág. 147-158).

Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un patrón marcado (que puede ser CTGF o una porción inmunológicamente reactiva del mismo) de competir con el analito de muestra de prueba (CTGF) por la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de CTGF en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se une, los anticuerpos se insolubilizan generalmente antes o después de la competencia, de manera que el analito patrón que está unido a los anticuerpos pueda separarse convenientemente del patrón y analito que sigue sin unir.

Los ensayos de tipo sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno los cuales puede unirse a una porción inmunogénica diferente, o epítipo, de la proteína que va a detectarse. En un ensayo de tipo sándwich, el analito de muestra de prueba es unido por un primer anticuerpo que se inmoviliza sobre un soporte sólido, y después un segundo anticuerpo se une al analito, formándose así un complejo de tres partes insoluble (David y Greene, patente de EE.UU. nº 4.376.110). El segundo anticuerpo puede marcarse por sí mismo con un resto detectable (ensayos de tipo sándwich directo) o puede medirse usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está marcado con un resto detectable (ensayo de tipo sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo de tipo sándwich es un ensayo de ELISA, en cuyo caso el resto detectable es una enzima. Un ensayo a modo de ejemplo en el que los anticuerpos de la invención pueden usarse se describe, por ejemplo, en la publicación internacional nº WO 03/024308.

Los anticuerpos de la invención también son útiles para la obtención de imágenes *in vivo*, en el que un anticuerpo marcado con un resto detectable tal como un agente radiopaco, radioisótopo o resto fluorescente tal como proteína verde fluorescente (GFP) se administra a un huésped, preferentemente en la circulación sanguínea, y se ensaya la presencia y la localización del anticuerpo marcado en el huésped. Esta técnica de obtención de imágenes es útil en la estadificación y el tratamiento de trastornos asociados a CTGF tales como trastornos fibróticos. El anticuerpo puede marcarse con cualquier resto que sea detectable en un huésped, tanto por resonancia magnética nuclear, radiología como otros medios de detección conocidos en la técnica.

Agentes terapéuticos

La presente invención proporciona anticuerpos para el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos asociados a CTGF. Se ha encontrado que los anticuerpos de la invención reducen los efectos perjudiciales de la producción o actividad de CTGF en varios trastornos, como se ejemplifica más adelante. Además, los anticuerpos muestran farmacocinética favorable haciéndolos agentes terapéuticos superiores para el tratamiento de trastornos asociados a CTGF.

Los anticuerpos anti-CTGF de la presente invención inhiben el desarrollo de fibrosis en modelos animales de, por ejemplo, fibrosis pulmonar y renal. Específicamente, los anticuerpos atenúan el 60-70% de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones como se ha determinado por la inhibición de la acumulación de hidroxiprolina pulmonar (colágeno) y examen histológico de preparaciones de tejido. Además, los anticuerpos reducen la acumulación de colágeno en un modelo de riñón remanente de rata (es decir, nefrectomía de 5/6) y en ratones tras la obstrucción ureteral unilateral (OUU). Los anticuerpos también reducen la fibrosis inducida por infusión subcutánea o intraperitoneal combinada de CTGF y TGF β en ratones recién nacidos. Adicionalmente., los anticuerpos reducen complicaciones asociadas a insuficiencia orgánica, por ejemplo, mejora de la función renal en diversos modelos de insuficiencia renal crónica y aguda. No se ha observado toxicidad con estos anticuerpos en animales. Como el CTGF se expresa en exceso en una amplia variedad de enfermedades fibróticas que incluyen esclerodermia difusa y limitada, osteoartritis, nefropatía diabética y retinopatía, etc., la invención contempla tratar pacientes con un trastorno asociado a CTGF con un anticuerpo contra CTGF para mejorar o estabilizar la patología, restaurar la función del órgano, mejorar la calidad de vida y prolongar la supervivencia.

Por tanto, los anticuerpos de la invención son especialmente útiles en aplicaciones terapéuticas para prevenir o tratar trastornos asociados a CTGF en un sujeto. Tales trastornos incluyen, pero no se limitan a, angiogénesis y otros procedimientos que desempeñan una función central en condiciones tales como aterosclerosis, glaucoma, etc.; y en cáncer que incluye leucemia linfoblástica aguda, dermatofibromas, cáncer de mama, carcinoma, glioma y glioblastoma de mama, rhabdomyosarcoma y fibrosarcoma, desmoplasia, angioliopoma, angioleiomioma, cánceres desmoplásicos, y cáncer de próstata, ovario, colorrectal, pancreático, gastrointestinal y de hígado, y otro crecimiento tumoral y metástasis.

Adicionalmente, los anticuerpos de la invención son útiles en aplicaciones terapéuticas para prevenir o tratar trastornos asociados a CTGF que implican fibrosis. En un aspecto, los anticuerpos de la invención son para administración a un sujeto para prevenir o tratar un trastorno asociado a CTGF que incluye, pero no se limita a, trastornos que presentan expresión alterada y deposición de proteínas asociadas a la matriz extracelular, por ejemplo, trastornos fibróticos. En diversos aspectos, la fibrosis puede localizarse en un tejido particular tal como tejido epitelial, endotelial o conjuntivo; o en un órgano tal como riñón, pulmón o hígado. La fibrosis también puede producirse en el ojo y las articulaciones. En otros aspectos, la fibrosis puede ser sistémica e implicar múltiples sistemas de órganos y tejidos. Los trastornos asociados a CTGF incluyen, por ejemplo, aterosclerosis, artritis, retinopatías tales como retinopatía diabética; nefropatías tales como nefropatía diabética; fibrosis cardíaca, pulmonar, hepática y renal, y enfermedades asociadas a inflamación y/o infección crónica.

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos para prevenir un trastorno asociado a CTGF en un sujeto que tiene una predisposición a desarrollar un trastorno tal. Una predisposición puede incluir, por ejemplo, hiperglucemia, hipertensión u obesidad en el sujeto. Tales trastornos pueden producirse, por ejemplo, debido a diabetes, obesidad, etc., e incluyen nefropatía diabética, retinopatía y enfermedad cardiovascular. Adicionalmente, una predisposición puede sospecharse debido a un acontecimiento, por ejemplo, un infarto de miocardio, cirugía, diálisis peritoneal, rechazo crónico y agudo de trasplante, quimioterapia, radioterapia, traumatismo, inmovilización ortopédica o parálítica, insuficiencia cardíaca congestiva, embarazo o varicosidades en el sujeto.

En realizaciones particulares, como se ejemplifica en este documento, los anticuerpos de la presente invención son para administración a un sujeto para tratar fibrosis de un órgano, por ejemplo, pulmón o riñón. Los anticuerpos se muestran en este documento para proporcionar beneficio en diversos modelos de pulmón y fibrosis renal (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 7 a 9). En otra realización particular, los anticuerpos en la presente invención son para administración a un sujeto para reducir esclerosis local o sistémica (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 11 y 12). En realizaciones adicionales, los anticuerpos son para administración a un sujeto para tratar o prevenir trastornos oculares tales como vitreorretinopatía proliferativa, retinopatía diabética, degeneración macular, etc. Como el CTGF participa en una amplia variedad de trastornos, la invención proporciona además anticuerpos para tratar pacientes que tienen un trastorno asociado a CTGF para mejorar o estabilizar la patología y la función de los órganos, mejorar la calidad de vida y prologar la supervivencia.

Para aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos de la invención son para administración a un mamífero, preferentemente un ser humano, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Los anticuerpos pueden ser para administración intravenosa como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, y/o por vías intramuscular, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intravítrea, intracraneal, oral, tópica, o por inhalación. Si el anticuerpo posee la actividad adecuada, también pueden utilizarse vías de administración intratumorales, peritumorales, intralesionales o perilesionales para ejercer efectos terapéuticos locales, además de sistémicos.

Tales formas de dosificación engloban vehículos farmacéuticamente aceptables que son inherentemente no tóxicos y no terapéuticos. Ejemplos de tales vehículos incluyen intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina; proteínas del suero tales como albúmina de suero humano; tampones tales como fosfato o glicina; ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales; o electrolitos tales como sulfato de protamina, cloruro sódico, sales metálicas, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, polímeros celulósicos y polietilenglicol. Los vehículos para formas tópicas o basadas en gel de anticuerpo incluyen polisacáridos tales como carboximetilcelulosa o metilcelulosa sódica, polivinilpirrolidona, poliácridatos, polímeros de bloques de polioxietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y alcoholes de cera de la madera. Formas de depósito convencionales incluyen, por ejemplo, microcápsulas, nanocápsulas, liposomas, yesos, comprimidos sublinguales y matrices de polímeros tales como copolímeros de polilactida:poliglicolida. Si están presentes en una forma de dosificación acuosa, en vez de liofilizarse, el anticuerpo normalmente se formulará a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml, aunque se permite una amplia variación fuera de estos intervalos.

Para la prevención o el tratamiento de enfermedad, la dosificación de anticuerpo apropiada dependerá del tipo de enfermedad que va a tratarse, como se define anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si los anticuerpos son para administración para fines preventivos o terapéuticos, la evolución de la terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico adjunto. El anticuerpo es adecuadamente para administración al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos.

Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 0,015 a 15 mg de anticuerpo/kg de peso de paciente es una dosificación candidata inicial para administración al paciente, tanto si es, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, como por infusión continua. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento debe repetirse hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación y no se excluyen de la presente invención.

Según otra realización de la invención, la eficacia del anticuerpo en prevenir o tratar enfermedad puede mejorarse administrando el anticuerpo seriadamente o en combinación con otro agente que es eficaz para el mismo objetivo clínico tal como otro anticuerpo dirigido contra un epítipo diferente al del anticuerpo principal, o uno o más agentes terapéuticos convencionales conocidos para la indicación terapéutica prevista, por ejemplo, prevención o tratamiento de afecciones asociadas a producción excesiva de matriz extracelular tal como fibrosis o esclerosis, inhibición del crecimiento celular tumoral o metástasis, inhibición de neovascularización, o reducción de inflamación. Tales agentes pueden mejorar síntomas o mejorar el desenlace mediante un mecanismo de acción similar, por ejemplo, anticuerpos anti-TGF β , o por un mecanismo diferente, por ejemplo, interferón- γ . Tales agentes pueden mejorar adicionalmente síntomas directamente o indirectamente asociados a un trastorno asociado a CTGF o una predisposición para desarrollar un trastorno asociado a CTGF, por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y bloqueantes de receptores de angiotensina (Arb).

Por ejemplo, pacientes con esclerodermia que reciben infusiones del agonista de la prostaciclina estable iloprost frecuentemente informan una mejora en la tensión de la piel de acuerdo con un efecto inhibitor sobre la formación de tejido cicatricial por fibroblastos de la piel. Se ha mostrado que los prostanoides ejercen un efecto inhibitor sobre la síntesis de colágeno, y varias líneas de evidencia demuestran que iloprost bloquea la inducción de CTGF en esclerodermia (Korn y col (1980) J Clin Invest 65:543-554; Goldstein y Polger (1982) J Biol Chem 257:8630-8633; y Stratton y col (2001) J Clin Invest 108:241-250). El CTGF es siete veces elevado en líquido de ampollas en pacientes con esclerodermia en comparación con controles sanos, sin embargo los pacientes que reciben administración intravenosa de iloprost muestran una marcada disminución en CTGF en líquido de ampollas (Stratton y col (2001) J Clin Invest 108:241-250). En conjunto, estos resultados sugieren que algunos de los beneficios de la terapia con iloprost en esclerodermia podrían derivarse de efectos antifibróticos mediados por la reducción en los niveles de CTGF. Como hay interés en lo referente al uso de un potente análogo de la prostaciclina vasodilatador y antiplaquetario en administración sistémica crónica en pacientes con esclerodermia, una terapia que utiliza un anticuerpo anti-CTGF solo o conjuntamente con niveles reducidos de iloprost podría proporcionar un tratamiento seguro y eficaz para esclerodermia.

50 Usos adicionales

Los anticuerpos de la invención también son útiles como agentes de purificación por afinidad. En este procedimiento, los anticuerpos contra CTGF se inmovilizan sobre un soporte adecuado tal como resina Sephadex o papel de filtro usando procedimientos muy conocidos en la técnica. Entonces, el anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el CTGF que va a purificarse, y después el soporte se lava con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra, excepto el CTGF que se une al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, tal como tampón glicina (pH 5,0), que liberará el CTGF del anticuerpo.

Ejemplos

La invención se entenderá adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos, que pretenden ser puramente a

modo de ejemplo de la invención. Estos ejemplos se proporcionan únicamente para ilustrar la invención reivindicada. La presente invención no está limitada en alcance por las realizaciones ejemplificadas, que sólo están previstas como ilustraciones de aspectos individuales de la invención. Diversas modificaciones de la invención, además de aquellas descritas en este documento, serán evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de la descripción anterior y figuras adjuntas.

Ejemplo 1. Producción de CTGF humano recombinante

Se produjo una construcción de baculovirus de CTGF humano recombinante como se describe en Segarini y col ((2001) J Biol Chem 276:40659-40667). Brevemente, un ADNc de CTGF que comprende sólo el marco de lectura abierto se generó por PCR usando DB60R32 (Bradham y col (1991) J Cell Biol 114:1285-94) como molde y los cebadores 5'-gctccgccgagtggtgacccATGaccgccgc-3' y 5'-ggatccggatccTCAtgccatgtctccgta-3', que añaden sitios de enzimas de restricción BamHI a los extremos del producto amplificado. Los codones de iniciación y terminación nativos están indicados en letras mayúsculas.

El fragmento de ADN resultante amplificado se digirió con BamHI, se purificó por electroforesis sobre un gel de agarosa y se subclonó directamente en el sitio BamHI del plásmido de expresión PFASTBAC1 de baculovirus (Invitrogen Corp., Carlsbad CA). La secuencia y orientación del casete de expresión se verificó por secuenciación de ADN. Entonces, el casete de expresión de CTGF resultante se transfirió a ADN de bácmido por recombinación específica de sitio en bacterias. Entonces, este bácmido se usó para generar un baculovirus de CTGF completamente recombinante en células de insecto Sf9 de *Spodoptera frugiperda* según protocolos suministrados por el fabricante (BAC-TO-BAC Expression System manual; Invitrogen). La expansión de títulos de baculovirus recombinante en células de insecto Sf9 se realizó usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica.

Células de insecto Hi5 se adaptaron para el crecimiento en suspensión por pase seriado de células en cultivo en matriz con agitación acompañado de enriquecimiento en cada pase para células separadas. Las células Hi5 en suspensión se cultivaron en 1 l de medio SF900II SFM (Invitrogen) complementado con 20 µg/ml de gentamicina (Mediatech, Inc., Herndon VA) y 1x lípido (Invitrogen) en matraces de cultivo Fernbach de 2,8 l desechables (Corning Inc., Acton MA) sobre una plataforma agitadora a 110 rpm a 27°C. Una vez las células habían alcanzado una densidad de 1,0-1,5x10⁶ células/ml con una viabilidad de >95%, se infectaron con baculovirus recombinante a una multiplicidad de infección (MOI) de 10. Entonces, los cultivos se incubaron a 27°C durante 40 a 44 horas adicionales. Los medios acondicionados, que contenían rhCTGF, se recogieron, se extinguieron sobre hielo y se centrifugaron a 5000 x g. Entonces, el sobrenadante se pasó por un filtro de 0,45 mm.

Alternativamente, se produjo CTGF de rata recombinante insertando el clon 2-4-7, que codifica CTGF de rata (Schmidt y col., patente de EE.UU. nº 6.348.329) en el vector de expresión pMK33 (construido por Michael Koelle, tesis doctoral de la Universidad de Stanford, 1992). La construcción de expresión de CTGF de rata se transfirió en 2 células de Schneider (Colección americana de cultivos tipo, Manassas VA; Schneider (1972) J Embryol Exp Morphol 27:353-365) usando el reactivo CELLECTIN (Invitrogen Corp., Carlsbad CA). Las células se cultivaron en medio que contenía 300 µg/ml de higromicina B durante 6 semanas, y luego se cultivaron sin selección durante tres días. La expresión de CTGF se indujo mediante la adición de CuSO₄ 500 µM y ZnSO₄ 100 µM, y después de cuatro días el medio se recogió y se clarificó por centrifugación y filtración como antes.

El CTGF producido por cualquier procedimiento descrito anteriormente se purificó del siguiente modo. Se cargaron cuatro litros de medio acondicionado sobre un columna de 5 ml de heparina HI-TRAP (Amersham Biosciences Corp., Piscataway NJ) previamente equilibrada con Tris 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM. La columna se lavó con 10 volúmenes de columna de NaCl 350 mM, Tris 50 mM (pH 7,5). El CTGF se eluyó de la columna con un gradiente de sal de NaCl creciente. Las fracciones eluidas se cribaron por SDS-PAGE, y se reunieron aquellas que contenían CTGF.

El CTGF purificado por heparina se diluyó a una conductividad final de 5,7 mS con agua destilada doble no pirogénica y el pH se ajustó a 8,0. Se utilizó una columna de intercambio aniónico fuerte Q-SEPHAROSE (Amersham Biosciences) que contenía aproximadamente 23 ml de resina conectada en tándem con una columna de carboximetilo (CM) POROS-poliestireno (Applied Biosystems) que contenía aproximadamente 7 ml de resina para la eliminación de endotoxina, y la captura y elución de rhCTGF purificado. Antes de la carga de la muestra, la columna en tándem se lavó con NaOH 0,5 M, seguido de NaOH 0,1 M, y finalmente tampón de equilibración. La muestra de carga se pasó sobre una columna en tándem, se quitó la columna de Q-Sepharose y el CTGF se eluyó de la columna CM POROS (Applied Biosystems) con un gradiente creciente de NaCl 350 mM a 1200 mM. La pureza de las fracciones eluidas que contenían CTGF se evaluó por análisis de SDS-PAGE antes de formar un conjunto de muestra final.

Ejemplo 2. Producción de fragmentos del extremo N y del extremo C de CTGF

Los fragmentos del extremo N y los fragmentos del extremo C de CTGF se prepararon del siguiente modo. CTGF humano recombinante, preparado y purificado como se ha descrito anteriormente, se digirió a temperatura ambiente durante 6 horas mediante tratamiento con perlas de quimotripsina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a 1,5 mg de CTGF por unidad de quimotripsina. La mezcla se centrifugó, las perlas de quimotripsina se desecharon, y el

sobrenadante, que contenía rhCTGF enzimáticamente escindido, se diluyó 1:5 con Tris 50 mM, pH 7,5. El sobrenadante diluido se aplicó a una columna de heparina Hi-Trap. Se recogió el flujo continuo, que contenía fragmentos del extremo N de CTGF. La columna de heparina se lavó con NaCl 350 mM, y los fragmentos unidos del extremo C de CTGF se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl 350 mM a 1200 mM, como se ha descrito anteriormente. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE, y se reunieron las fracciones que contenían fragmentos del extremo C de CTGF.

El flujo continuo de la columna de heparina, que contenía fragmentos del extremo N de CTGF, se ajustó a sulfato de amonio 0,5 M / Tris 50 mM, pH 7,5, y luego se cargó sobre una columna de fenil-Sepharose HP de 15 ml (Amersham-Pharmacia) que se había equilibrado previamente con sulfato de amonio 0,5 M / Tris 50 mM, pH 7,5. La columna se lavó con 15 volúmenes de columna de sulfato de amonio 0,5 M / Tris 50 mM, pH 7,5, y los fragmentos unidos del extremo N de CTGF se eluyeron con un gradiente lineal de sulfato de amonio 0,5 M a 0 M / Tris 50 mM, pH 7,5, durante aproximadamente 15 volúmenes de columna. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE, y se reunieron las fracciones que contenían los fragmentos del extremo N de CTGF. La disolución reunida se concentró y el tampón se intercambió con Tris 50 mM, NaCl 400 mM (pH 7,2), usando una membrana de ultrafiltración ULTRACEL AMICON YM10 (Millipore Corp., Bedford MA).

Ejemplo 3. Producción de anticuerpos monoclonales humanos anti-CTGF

Anticuerpos monoclonales completamente humanos para CTGF humano se prepararon usando las cepas de ratón HUMAB HCo7, HCo12 y HCo7+HCo12 (Medarex, Inc., Princeton NJ). Los ratones se inmunizaron por hasta 10 inyecciones intraperitoneales (IP) o subcutáneas (Sc) de 25-50 mg de CTGF humano recombinante en adyuvante completo de Freund durante un periodo de 2-4 semanas. La respuesta inmunitaria se monitorizó por sangrados retroorbitales. El plasma se cribó por ELISA (como se describe más adelante) y se usaron ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina anti-CTGF para las fusiones. Los ratones se reforzaron intravenosamente con antígeno 3 y 2 días antes del sacrificio y la extirpación del bazo.

Se fusionaron suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con un cuarto del número de células de mieloma de ratón no secretantes P3X63-Ag8.653 (Colección americana de cultivos tipo (ATCC), Manassas VA) con 50% de PEG (Sigma, St. Louis MO). Las células se sembraron a aproximadamente 1×10^5 células/pocillo en una placa de microtitulación de fondo plano y se incubaron durante aproximadamente dos semanas en DMEM con alto contenido de glucosa (Mediatech, Herndon VA) que contenía L-glutamina y piruvato de sodio, 10% de suero bovino fetal, 10% de medio acondicionado P388D1 (ATCC), 3-5% de Origen (Igen International, Gaithersburg MD), HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 mg/ml de gentamicina y 1x HAT (Sigma). Después de 1-2 semanas, las células se cultivaron en medio en el que el HAT se había sustituido con HT. Entonces, los pocillos individuales se cribaron por ELISA (descrito más adelante). Los hibridomas secretadores de anticuerpo se sustituyeron, se cribaron de nuevo y, si todavía eran positivos para anticuerpos anti-CTGF, se subclonaron al menos dos veces por dilución limitante. Entonces, los subclones estables se cultivaron *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo de tejido para la caracterización. Un clon de cada hibridoma que retuvo la reactividad de las células parentales se usó para generar 5-10 bancos de células viales guardadas en nitrógeno líquido.

Los ensayos de ELISA se realizaron como se describe por Fishwild y col (1996, Nature Biotech 14:845-851). Brevemente, placas de microtitulación se recubrieron con 1-2 $\mu\text{g/ml}$ de CTGF recombinante purificado en PBS a 50 $\mu\text{l/pocillo}$, se incubaron a 4°C durante la noche, luego se bloquearon con 200 $\mu\text{l/pocillo}$ de 5% de suero de pollo en PBS/Tween (0,05%). Las diluciones de plasma de ratones inmunizados con CTGF o sobrenadantes de cultivo de hibridoma se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y luego se incubaron con un anticuerpo policlonal Fc de cabra dirigido contra IgG humana acoplado a peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar, las placas se revelaron con 0,22 mg/ml de sustrato ABTS (Sigma) y se analizaron por espectrofotómetro a 415-495 nm.

Ejemplo 4: Caracterización de anticuerpos

Los hibridomas que produjeron anticuerpos para CTGF humano se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 3. Células de hibridoma clonadas se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco-alto contenido de glucosa/RPMI 1640 (50:50) con L-glutamina 8 mM, $\frac{1}{2}$ x aminoácidos no esenciales y 10% de suero bovino fetal. Las células expandidas para la preparación de anticuerpos se cultivaron en el medio con 1,5% de suero bovino fetal de bajo IgG durante 4-9 días a 37°C y 6% de CO₂. El medio acondicionado resultante se depuró de células y se concentró usando un sistema de filtración/concentración de flujo tangencial. El concentrado se pasó sobre una columna de proteína A y los anticuerpos monoclonales unidos se eluyeron con glicina 100 mM, pH 3. El eluato se neutralizó con Tris 1 M, pH 8,0, y se dializó contra PBS.

4.1 Mapeo de epítopes

El mapeo de epítopes de anticuerpos por experimentos de unión competitiva es muy conocido por aquellos expertos en el campo de la inmunología (véase, por ejemplo, Van Der Geld y col (1999) Clinical and Experimental Immunology 118:487-96). Cada población de anticuerpos aislada de células propagadas de una única célula de

5 hibridoma clonada se mapeó y se asignó a un dominio de unión específico sobre CTGF humano usando experimentos de unión y bloqueo convencionales (véanse, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988) Harlow y Lane (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press; *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2ª ed., (1994) Capítulo 10 (Immunochemical Techniques), Saunders; y *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation* (1984) Capítulo 10 (Immunochemical Techniques) y Capítulo 11 (Competitive Binding Assays), C.V. Mosby, St. Louis). Los dominios de unión independientes se definieron inicialmente por experimentos de competencia de anticuerpos en los que dos anticuerpos diferentes se incubaron en orden secuencial sobre placas recubiertas con CTGF. Si el impedimento estérico del primer anticuerpo previno la unión del segundo anticuerpo a CTGF, entonces los dos anticuerpos se asignaron al mismo dominio de unión. Debe entenderse, sin embargo, que dos anticuerpos podrían tener distintos epítopes que todavía están suficientemente próximos entre sí para designarse como miembros del mismo dominio de unión.

15 Se identificaron dominios de unión que abarcaban cuatro exones de CTGF humano. Todos los dominios de unión se definen conformacionalmente, de forma que los anticuerpos se unen a CTGF bajo condiciones no reductoras en ensayos de transferencia Western. Algunos de los anticuerpos también se unieron a CTGF bajo condiciones reductoras en ensayos de transferencia Western, sugiriendo que cada uno de estos anticuerpos se unió a un epítipo lineal sobre la proteína de CTGF. Por tanto, anticuerpos que representan un subconjunto de los dominios de unión muestran reactividad cruzada con CTGF de ratón en análisis de transferencia Western. El anticuerpo de cada grupo que tiene la mayor afinidad por CTGF completo se usó para la caracterización y análisis adicional.

20 Se realizó un mapeo de epítipes más refinado por análisis de ELISA usando fragmentos de CTGF recombinantemente expresados específicos. Por ejemplo, los anticuerpos que reconocieron epítipes en el dominio del extremo N de CTGF se identificaron por análisis de ELISA contra fragmentos inmovilizados obtenidos de la expresión recombinante del exón 2 y/o exón 3 del gen de CTGF. De este modo, anticuerpos que reconocen específicamente los dominios del extremo N o fragmentos del extremo N de CTGF se seleccionaron y se caracterizaron adicionalmente. Los anticuerpos que reconocen específicamente los dominios del extremo C o fragmentos del extremo C de CTGF también se seleccionaron y se caracterizaron adicionalmente.

30 El grupo del epítipo definido por mAb1 se une a un epítipo lineal sobre el fragmento del extremo N de CTGF codificado por el exón 3. Se generó una serie de péptidos sintéticos truncados que cubren regiones codificadas por el polinucleótido del exón 3, y se realizaron pruebas de ELISA usando estos péptidos para definir adicionalmente el epítipo de mAb1. Los resultados se resumen en la Tabla 1; a "+" indica unión entre el péptido y mAb1, mientras que a "-" indica que mAb1 no se une al péptido. Una "C" en cursiva negrita indica un residuo de cisteína en el péptido que fue esencial para la unión de mAb1. Una "C" subrayada indica un residuo de cisteína añadido al extremo y no una parte de la secuencia de CTGF nativa.

Tabla 1. Unión de mAb1 a series de péptidos truncadas codificadas por el exón 3.

Péptido	Secuencia	Unión de mAb1	SEC ID Nº:
N-CTGF		+	
Exón 3		+	
Pep135	<u>C</u> PLCSMDVRLPSPDCPFPRRVKLP	+	22
PC5444	PLSSMDVRLPSPDS	-	
PC5445	RLPSPDSPFPRRVKLP GK	+	23
PEP5	RLPSPDCPFPRRVKL	+	24
P40340	RLPSPDCPFPRRV	+	25
P40341	RLPSPDSPFPRRV	-	
P40342	LPSPDCPFPRRVKL	+	26
10MER	SPDSPFPRRV	-	
10MER2	SPDCPFPRRV	-	
9MER	PDSPFPRRV	-	
9MER2	CPFPRRVKL	-	
8MER	DSPFPRRV	-	

(continuación)

Péptido	Secuencia	Unión de mAb1	SEC ID N°:
8MER2	CFPRRVKL	-	
7MER	CPRRVKL	-	
6MER	CRRVKL	-	
5MER	CRVKL	-	

Por tanto, mAb1 es un miembro de una clase de anticuerpos que se une a la región del extremo N de CTGF. El epítipo lineal sobre CTGF necesario y suficiente para la unión de mAb1 se define por el residuo de aminoácido L143 a V154 de CTGF humano (SEC ID N°: 2). La confirmación adicional de la especificidad de unión de mAb1 por este péptido se obtuvo por RIA y cromatografía de afinidad. Los anticuerpos que comparten este epítipo, en parte o en conjunto, están específicamente incluidos en la presente invención. Adicionalmente, los anticuerpos que compiten con mAb1 para unirse a CTGF o un fragmento del mismo también están específicamente incluidos en la presente invención.

4.2 Afinidad de anticuerpos por CTGF

La afinidad de anticuerpos se define como la intensidad de las interacciones no covalentes totales entre un único sitio de unión a antígeno sobre un anticuerpo y un único epítipo sobre un antígeno. La afinidad se calcula midiendo la constante de asociación (K_a), de forma que

$$Afinidad = K_a = \frac{[Ab \cdot Ag]}{[Ab][Ag]} = \frac{1}{K_d}$$

en la que $[Ab]$ es la concentración de sitio de unión a antígeno libre sobre el anticuerpo, $[Ag]$ es la concentración de antígeno libre, $[Ab \cdot Ag]$ es la concentración de sitio de unión a antígeno sobre el anticuerpo ocupado por el antígeno y K_d es la constante de disociación del inmunocomplejo

La afinidad de cada población de anticuerpos identificada por el mapeo de epítopes se midió usando RIA, en la que rhCTGF completo se radioyodó y se añadió a pocillos que contenían anticuerpo monoclonal inmovilizado del siguiente modo. CTGF humano recombinante se radiomarcó con ^{125}I usando el procedimiento de cloramina-T (véase, Greenwood y col (1963) Biochem J 89:114-123). Normalmente, al menos el 60% del ^{125}I se incorporó y la actividad específica del CTGF marcado fue al menos 1×10^5 cpm/ng, aunque puede usarse CTGF marcado de menor actividad específica en el radioinmunoensayo. Se añadió anticuerpo de captura específico de γFc de cabra dirigido contra IgG humana (Jackson ImmunoResearch) en DPBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (Mediatech, Herndon VA) a los pocillos de una placa de microtitulación MAXISORP BREAKAPART (Nalge Nunc International, Rochester NY) y se dejó que se uniera durante la noche a 4°C. Entonces, los pocillos se bloquearon con 1% de BSA en DPBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} durante al menos 4 horas a 4°C. La disolución de bloqueo se eliminó y se añadieron 100 μ l de anticuerpo de prueba a 2-50 ng/ml en DPBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} y se dejó que se uniera durante la noche a 4°C. Mezclas de diluciones seriadas de CTGF sin marcar en una cantidad constante de $[^{125}I]rhCTGF$ se añadieron a los pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 4 a 8 horas. Entonces, los pocillos se lavaron cuatro veces con 0,1% de Tween 20 en PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (Mediatech), y los pocillos de la placa de microtitulación se separaron y se contaron en un contador gamma.

La afinidad se estimó gráficamente mediante el procedimiento de Scatchard (1948, Ann NY Acad Sci 51:660-72). La concentración total de CTGF marcado aplicado a la placa se calculó como

$$[CTGF]_{total} = \frac{cpm_aplicadas}{cpm/fmol} \cdot \frac{1}{0,1_ml} + \frac{[CTGF]_{disolución_madre_fría}}{dilución}$$

en la que $cpm_aplicadas$ son los recuentos obtenidos de viales de control que se cargan con mezclas de CTGF en paralelo con los pocillos de la placa de microtitulación; $cpm/fmol$ es la actividad específica de $[^{125}I]CTGF$, $[CTGF]_{disolución_madre_fría}$ es la concentración de CTGF sin marcar añadido a cada pocillo, y $dilución$ es el factor de dilución para el CTGF marcado.

La concentración de CTGF unido a anticuerpo se calcula a partir de la proporción de recuentos unidos a los pocillos y la concentración total de CTGF aplicada a los pocillos.

$$[CTGF]_{unido} = \frac{(cpm_unidas - blanco)}{cpm_total} \cdot [CTGF]_{total}$$

La concentración de CTGF libre (sin unir) es la diferencia entre la concentración total de CTGF aplicada y la concentración de CTGF unido.

$$[CTGF]_{libre} = [CTGF]_{total} - [CTGF]_{unido}$$

5 Las representaciones de Scatchard de determinaciones de afinidad para anticuerpos de la invención se muestran en la Figura 2. La Figura 2A representa la unión de un anticuerpo de la invención, mAb2, a [¹²⁵I]rhCTGF en presencia de concentraciones crecientes de rhCTGF sin marcar. La Figura 2B representa la unión de un anticuerpo a modo de ejemplo de la invención, mAb1, a [¹²⁵I]rhCTGF en presencia de concentraciones crecientes de rhCTGF sin marcar. Se da mayor peso a puntos con proporciones similares de CTGF unido y sin unir debido a que estos puntos tendrán recuentos unidos en exceso sustancial de los blancos (por lo tanto, recuentos unidos bien determinados), pero todavía sustancialmente inferiores a los recuentos totales aplicados (por lo tanto, recuentos libres bien determinados). La unión máxima ($B_{máx}$) y K_d se representan como el corte x y el corte y, respectivamente.

10 La afinidad (K_d) de mAb1 por CTGF es inferior a 10^{-9} M, la afinidad normalmente encontrada en anticuerpos terapéuticos comercialmente satisfactorios (véanse, por ejemplo, Maini y col (1998) *Arthritis Rheum* 41:1552-1563; Targan y col (1997) *N Engl J Med* 337:1029-1035; Bumgardner y col (2001) *Transplantation* 72:839-45; y Kovarik y col (1999) *Transplantation* 68:1288-94). Por tanto, mAb1 es un candidato adecuado para uso terapéutico, y los anticuerpos que comparten unión a epítoto con mAb1, como se ha descrito anteriormente, y tienen una afinidad por CTGF que es similar a o superior a mAb1 (es decir, una $K_d \leq 10^{-9}$) son asimismo candidatos adecuados para uso terapéutico. Los anticuerpos que comparten unión a epítoto con mAb1, pero que tienen menor afinidad (es decir, K_d superior) a mAb1, también están incorporados dentro de la presente invención y son potencialmente útiles en diversos ensayos y aplicaciones de diagnóstico como se describe en este documento. Tales anticuerpos pueden ser adicionalmente útiles en aplicaciones terapéuticas, especialmente si tienen una alta afinidad por antígeno, como se describe más adelante.

4.3 Afinidad de anticuerpos

25 Para anticuerpos con más de un sitio de unión a antígeno (multivalencia), la afinidad en un sitio de unión no siempre refleja la intensidad verdadera de la interacción anticuerpo-antígeno. Si un anticuerpo multivalente se une a un antígeno que tiene múltiples epítopes de repetición, la interacción de una interacción de antígeno en un sitio de unión sobre el anticuerpo aumenta la posibilidad de la interacción de antígeno con los sitios de unión adicionales. La afinidad mide la intensidad de combinación funcional de un anticuerpo con su antígeno, que está relacionada con tanto la afinidad de la reacción entre los epítopes y parátotoes como las valencias del anticuerpo y antígeno. Por tanto, la afinidad proporciona una medida más precisa de la tendencia de un anticuerpo a disociarse.

30 La alta afinidad puede compensar la baja afinidad. Por ejemplo, sitios de unión a antígeno de IgM son generalmente de menor afinidad que IgG, pero la multivalencia de IgM da una alta afinidad, permitiendo así que se una eficazmente a antígeno.

35 Para determinar la afinidad de anticuerpos de la invención, los fragmentos Fab se prepararon primero por digestión con papaína convencional de la inmunoglobulina correspondiente. Entonces se usó proteína A inmovilizada para separar los fragmentos Fab de Fc y el anticuerpo sin digerir.

40 Aproximadamente 1 ml de suspensión de papaína inmovilizada que contiene 0,5 ml de gel sedimentado, 250 µg de papaína y 3,5 unidades de BAE se lavó 3 x 1 ml y 1 x 10 ml con tampón de digestión (DB; fosfato de sodio 20 mM, EDTA 10 mM, cisteína 20 mM, pH 7,0). Entonces, la suspensión se resuspendió con 0,3 ml de DB, se mezcló con 1,1 ml de anticuerpo (aproximadamente 5 mg, pH 7) y se agitó durante la noche a 37°C. Entonces, el digesto de anticuerpo se separó de la resina, y el fragmento Fab se separó de los fragmentos Fc y el anticuerpo sin digerir por cromatografía de afinidad usando Proteína A. La pureza del fragmento Fab se monitorizó por SDS-PAGE (Figura 3A).

45 La unión monovalente se distinguió de la unión bivalente eluyendo con anticuerpos unidos a antígeno con concentraciones variables de tiocianato. Aumentando la concentración de ión caotrópico (tiocianato) en la disolución, asociaciones de menor afinidad (por ejemplo, unión monovalente de Fab a antígeno) se rompen primero, mientras que las asociaciones de mayor afinidad (por ejemplo, unión bivalente de IgG a ligando) siguen estando tal cual estaban. Por tanto, aumentando la concentración de tiocianato pueden distinguirse dos uniones diferentes.

50 Las placas se recubrieron con 10 µg/ml de CTGF o péptidos de CTGF en tampón bicarbonato 50 mM (pH 8,5) a 4°C durante la noche, se bloquearon con caseína bloqueante/TBS a 4°C durante la noche y luego se incubaron con 100 µg/ml de anticuerpo o Fab correspondiente en caseína bloqueante/TBS a temperatura ambiente durante la noche con agitación. Entonces, las placas se incubaron con diluciones (1:1) de tiocianato (0-7,6 M) en tampón fosfato 100 mM (pH 6,0) durante 15 minutos a temperatura ambiente con agitación, seguido de un conjugado de fosfatasa alcalina-anti-(Fab)₂ humano de ratón (dilución 1:1000) a temperatura ambiente durante 45 minutos. Se añadió sustrato de fosfatasa alcalina (1 mg/ml; Sigma) en dietanolamina 1 M, MgCl₂ 0,5 mM (pH 9,8), las placas se incubaron a temperatura ambiente y la absorbancia a 405 nm se determinó después de 2, 10, 20 y 60 minutos.

55 El *índice de afinidad* es la concentración de agente caotrópico (tiocianato) que produce una reducción del 50% en la

absorbancia inicial. Para un anticuerpo a modo de ejemplo de la invención, el índice de afinidad de mAb1 para la disociación de Fab de CTGF fue 0,46 M, mientras que el índice de afinidad para la disociación de IgG intacta de CTGF fue 1,8 M (Figura 3B). Por tanto, mAb1 se une a antígeno predominantemente bivalentemente (afinidad), y se disocia de antígeno mucho más lentamente que un anticuerpo que se une monovalentemente. Anticuerpos adicionales de la invención que comparten parámetros de unión a epítipo con mAb1 pueden ser similarmente bivalentes o pueden ser mono- o multivalentes. Cualquiera de los anticuerpos de la invención puede manipularse para mejorar la afinidad, por ejemplo, combinando sitios de unión a epítipo en una única construcción de anticuerpo, por ejemplo, un tricuerpo, etc (véase, por ejemplo, Schoonjans y col (2000) J Immunol 165:7050-7057).

4.4 Reactividad cruzada

El radioinmunoensayo descrito anteriormente (Ejemplo 4.2) se usó para determinar la reactividad cruzada de los anticuerpos, excepto que rhCTGF sin marcar se sustituyó con otro competidor sin marcar, CTGF de rata derivado de células de riñón de rata normal (NRK). Se cultivaron células NRK hasta confluencia y luego el medio de cultivo se cambió a medio libre de suero que contenía 2 ng/ml de TGF- β 2, 50 μ g/ml de heparina y 250 μ g/ml de BSA. El medio acondicionado se recogió después de dos días de cultivo, se centrifugó para eliminar el residuo y se incubó con perlas de heparina-Sepharose (1/100 v/v de suspensión de perlas:medio) durante 2 h a 4°C con agitación. Entonces, la mezcla se centrifugó; las perlas se recogieron y se lavaron con PBS, y luego se lisaron en tampón SDS.

Una representación de Scatchard de la unión de mAb2 a [125 I]rhCTGF en presencia de concentraciones crecientes de CTGF de rata sin marcar se muestra en la Figura 4A; y una representación de Scatchard de la unión de mAb1 a [125 I]rhCTGF en presencia de concentraciones crecientes de CTGF de rata sin marcar se muestra en la Figura 4B. Como puede apreciarse en la figura, mAb1 se une a CTGF tanto humano como de rata, mientras que mAb2 se une a CTGF humano, pero no se une a CTGF de rata.

Para mAb1, las representaciones de Scatchard para la competencia con CTGF de rata (Figura 4B) tienen pendientes más bajas, menor afinidad aparente y mayor $B_{m\acute{a}x}$ aparente que las representaciones para la competencia con rhCTGF (Figura 2B). Por tanto, aunque CTGF de rata puede competir con CTGF humano para unirse a mAb1, el anticuerpo tiene mayor afinidad por CTGF humano recombinante que por CTGF de rata recombinante. mAb1 también reacciona de forma cruzada con CTGF de ratón y de mono (datos no mostrados). Pueden usarse anticuerpos que muestran afinidad adecuada por CTGF de otras especies en el tratamiento y la prevención de trastornos en aquellas especies. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención que muestra una K_d adecuada para CTGF canino podría usarse para tratar un trastorno asociado a CTGF en perros. Los anticuerpos de la invención que muestran afinidad por especies cruzadas tal como mAb1 también son útiles como herramientas de investigación para estudiar trastornos asociados a CTGF en diversos modelos animales.

4.5 Glicosilación

El radioinmunoensayo descrito anteriormente (Ejemplo 4.2) se usó para determinar el efecto de la glicosilación de anticuerpos sobre la afinidad de unión a antígeno. El anticuerpo mAb1 se trató durante 8 días a 37°C en PBS, EDTA 0,5 M, pH 8,0, con péptido N-glicosidasa F (PNGasa F), que escinde oligosacáridos de glicoproteínas ligadas en N. Después de la incubación, la disolución de reacción tanto se usó directamente como se fraccionó sobre una columna de proteína A-SEPHAROSE FASTFLOW (Amersham Bioscience, Piscataway NJ) y se eluyó con glicina 0,1 M-HCl, pH 2,5. La recuperación de anticuerpos después del fraccionamiento fue aproximadamente el 87%, y el nivel de endotoxina fue 0,30 UE/mg. La desglicosilación se confirmó por SDS-PAGE. La actividad de unión de anticuerpo desglicosilado por CTGF recombinante humano fue idéntica dentro del error experimental a la actividad de unión de la forma glicosilada del anticuerpo.

Como diversas células producen diferentes patrones de glicosilación, la producción de proteínas recombinantes, por ejemplo, anticuerpos, en células cultivadas o especies no homólogas puede generar glicosilación no nativa. Algunas proteínas requieren glicosilación específica para actividad, y la glicosilación alterada reduce la actividad; por ejemplo, en el caso de anticuerpos, se reduce la afinidad por antígeno. La producción de proteínas en ciertos sistemas, por ejemplo, plantas y huevos de gallina, puede también producir patrones de glicosilación que son inmunogénicos, reduciéndose así la capacidad de usar las proteínas en ciertas aplicaciones. La capacidad de los presentes anticuerpos para mostrar la misma actividad en una forma glicosilada y no glicosilada demuestra que la invención no está limitada por la presencia de glicosilación, particularmente una glicosilación específica de especies.

50 Ejemplo 5. Ensayo de migración celular

La migración celular es un acontecimiento celular normal e importante, por ejemplo, durante el desarrollo y la cicatrización. La migración celular también es un factor en la patología de trastornos tales como formación de lesiones fibróticas, y las células aisladas de lesiones fibróticas son más sensibles a estimulantes quimiotácticos que las células de tejido normal correspondiente.

Los anticuerpos de la presente invención se analizaron para su capacidad para inhibir la migración quimiotáctica estimulada por CTGF de células de músculo liso usando un ensayo en cámara de Boyden del siguiente modo. Células de músculo liso arterial de rata (ASMC) en medio que contenía 0,1% de suero bovino fetal (SBF) se añadieron al compartimento superior de una cámara de Boyden, y el medio que contenía tanto 300 ng/ml de

rhCTGF, 10% de SBF como 0,1% de SBF solo se añadió al compartimento inferior. Un filtro recubierto de colágeno que tiene poros con un diámetro de 8 µm separó la cámara superior de la cámara inferior. Se dejó que las células se adhirieran y migraran a través del filtro durante 2-3 horas. Entonces, el filtro se quitó, las células se fijaron sobre el filtro y se tiñeron, y las células que migraron por el filtro se contaron. La incubación con 300 ng/ml de rhCTGF aumentó el número de células que migraron por el filtro aproximadamente 5 veces con respecto al 0,1% de controles de SBF. El aumento en la migración estimulada por CTGF fue aproximadamente el 27% del efecto quimiotáctico observado con 10% de SBF, que contiene múltiples factores quimiotácticos.

Los anticuerpos de la invención se probaron para su capacidad para inhibir la migración celular mediada por CTGF usando el ensayo descrito anteriormente, excepto que se añadió tanto anticuerpo anti-CTGF (a 30 y 300 µg/ml) como IgG humana reunida a la cámara inferior. Se contaron cuatro campos de células de cada uno de los 3 filtros separados para cada muestra en cada ensayo. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Inhibición de la migración celular mediada por CTGF.

Anticuerpo	Migración celular (%)	
	Promedio	DE
hIgG	100	10
7 (30 µg/ml)	77	13
19 (30 µg/ml)	71	14
19 (300 µg/ml)	43	12

Como puede apreciarse en la Tabla 2, los anticuerpos que se unen a CTGF dentro del epítipo definido por mAb1 inhiben la migración celular mediada por CTGF de un modo dependiente de la dosis. Los anticuerpos de este grupo de epítopes sólo fueron los anticuerpos anti-CTGF probados que inhibieron repetidamente y reproduciblemente la migración inducida por CTGF.

Diversos procedimientos tales como angiogénesis, condrogénesis y oncogénesis requieren alteraciones en la adhesión y migración celular. El CTGF se ha asociado tanto a adhesión como a migración celular, y la capacidad de anticuerpos dirigidos contra CTGF para afectar diferencialmente una actividad frente a otra proporciona un diverso repertorio de agentes terapéuticos para el tratamiento de afecciones asociadas a CTGF. Los anticuerpos proporcionados por la presente invención demuestran claramente la actividad diferencial referente a la neutralización de actividades de CTGF. Como se ejemplifica más adelante, estas capacidades proporcionan potencial terapéutico único en esta clase de anticuerpo anti-CTGF.

Ejemplo 6. Trastornos pulmonares

La instilación intratraqueal (IT) de bleomicina en ratones es un sistema de modelo ampliamente usado para estudiar fibrosis pulmonar y para cribar agentes antifibróticos posiblemente deseables. Los anticuerpos de la invención se probaron para su capacidad para reducir la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina *in vivo* usando el procedimiento descrito por Wang y col (2000) *Biochem Pharmacol* 60:1949-1958, del siguiente modo.

Ratones C57BL/6 macho se dividieron aleatoriamente en dos grupos. Los ratones se anestesiaron con isoflurano, y luego se inyectaron intratraquealmente con tanto una dosis única de bleomicina en 0,9% de solución salina a 0,1 unidades/50 µl/ratón como con 0,9% de solución salina sola. Cada grupo se dividió y se trató inmediatamente y después una vez cada dos días durante un total de siete dosis con tanto solución salina como anticuerpo administrado intraperitonealmente (IP). Catorce días después de la instilación IT, los ratones se sacrificaron por exanguinación de la aorta abdominal descendente con anestesia y se recogió el tejido de pulmón.

El contenido de colágeno del pulmón se analizó midiendo el nivel de hidroxiprolina y prolina usando el procedimiento de Palmerini y col (1985; *J Chromatogr* 339:285-292), excepto que se sustituyó la 3,4-deshidropolina con ácido L-azetidín-2-carboxílico (Aldrich) como patrón interno. Brevemente, muestras de tejido se hidrolizaron en HCl 6 N durante 22 horas a 105°C. Las muestras se sometieron a derivatización en pre-columna con o-ftalaldehído y luego 4-cloro-7-nitrobenzofurano (Aldrich) para formar aductos fluorescentes de prolina y hidroxiprolina. Los aductos fluorescentes se separaron por HPLC de fase inversa seguido de detección fluorométrica.

La Figura 5 muestra el resultado de la administración terapéutica de solución salina (SA), un anticuerpo a modo de ejemplo de la invención, mAb1, y un conjunto de anticuerpos específicos de CTGF (AbsJ) se compararon para su capacidad para suprimir la fibrosis pulmonar tras el tratamiento con bleomicina. Como puede apreciarse en la Figura 5A, el tratamiento con bleomicina (BL+SA) aumentó significativamente el contenido de hidroxiprolina de pulmón al 168% con respecto al grupo de control (SA+SA; 220 ± 15 µg/pulmón). Sin embargo, el posterior tratamiento con

anticuerpos reunidos de la invención (BL+AbsJ) mostró una disminución del 60% en la hidroxiprolina de pulmón en comparación con el tratamiento con bleomicina sola. Similarmente, el posterior tratamiento con mAb1 (BL+ mAb1) mostró una disminución del 70% en hidroxiprolina de pulmón en comparación con bleomicina sola.

5 El examen histológico de los pulmones de ratón reveló tejido parenquimatoso pulmonar normal en el grupo de control (no mostrado). Sin embargo, en pulmones tratados con bleomicina, se observó claramente un aumento en las regiones de fibrosis (Figura 5B; flechas). La administración terapéutica de un anticuerpo de la invención posterior al tratamiento con bleomicina mostró una clara reducción en la fibrosis (Figura 5C), aunque algunos lóbulos todavía mostraron un grado leve de fibrosis intersticial. Por tanto, los anticuerpos de la invención proporcionan beneficio terapéutico cuando se administran a pacientes en riesgo de o que padecen un trastorno pulmonar tal como fibrosis pulmonar idiopática (FPI).

Ejemplo 7. Trastornos renales

7.1. Insuficiencia renal

15 La fibrosis tubulointersticial es un componente principal de varias enfermedades renales asociadas a la progresión a insuficiencia renal terminal (Sharma y col (1993) *Kidney Int* 44:774-788). La obstrucción ureteral unilateral (OUU), caracterizada por disminución de la función renal y aumento de la fibrosis intersticial se ha usado como un modelo experimental para inducir lesión y fibrosis tubulointersticial (Fern y col (1999) *J Clin Invest* 103:39-46).

20 Los ratones se anestesiaron con isofluorano y luego se realizó la ligación del uréter izquierdo según el procedimiento descrito por Moriyama y col (1998; *Kidney Int* 54:110-119). Los ratones se trataron inmediatamente tras la cirugía y después una vez cada dos días durante un total de siete dosis con tanto solución salina como anticuerpo administrados intraperitonealmente (IP). Catorce días después de la OUU, los animales se anestesiaron y se sacrificaron por exanguinación de la aorta abdominal descendente. Tanto los riñones derecho como izquierdo se descapsularon por separado y se pesaron. La mitad de cada riñón se fijó en 10% de formalina para histología (tinción con tricromo) y la otra mitad se pesó y se guardó a -70°C para la determinación de hidroxiprolina. La hidroxiprolina y la prolina se determinaron como se ha descrito anteriormente.

25 Como puede apreciarse en la Figura 6A, la OUU aumentó el contenido de colágeno del riñón aproximadamente 4 veces como se mide por la relación de hidroxiprolina a prolina del riñón izquierdo obstruido con respecto al riñón derecho sin obstruir en cada ratón. El tratamiento con un anticuerpo de la invención, mAb1, produjo una reducción dependiente de la dosis estadísticamente significativa en la fibrosis del riñón obstruido (Figura 6A). Sin embargo, un anticuerpo que se une a un epítopo del extremo C sobre CTGF, mAb3, no mostró efecto significativo. La tinción con tricromo del riñón con OUU identifica regiones de acumulación elevada de colágeno (Figura 6B, flechas), mientras que el tratamiento con un anticuerpo de la invención muestra una reducción considerable en la tinción del colágeno en el riñón obstruido (Figuras 6C).

35 Alternativamente, la fibrosis renal puede estudiarse en el modelo de riñón remanente de rata de insuficiencia renal progresiva. El modelo, que implica nefrectomía unilateral de 2/3 combinada con ablación renal completa contralateralmente (nefrectomía total de 5/6), induce cambios parenquimatosos degenerativos asociados a insuficiencia renal crónica en el resto renal, y los animales se vuelven urémicos y presentan albuminuria marcada, glomeruloesclerosis, fibrosis intersticial y atrofia tubular (véanse, por ejemplo, Frazier y col (2000) *Vet Pathol* 37:328-335; y Gandhi y col (1998) *Kidney Int* 54:1157-1165).

40 La nefrectomía de 5/6 se realizó según Frazier y col (2000, *Vet Pathol* 37:328-335). Ratas Sprague-Dawley macho de cinco semanas de edad (Harlan, Indianapolis IN) que promediaban 120 g se anestesiaron con ketamina y xilazina, y se practicó una incisión 1/3 craneal y 1/3 caudal del riñón izquierdo. Una esponja de gasa se aplicó brevemente para proporcionar hemostasia, el abdomen se aclaró con solución salina, 0,2 ml de butorfenol, y el animal se suturó. Una semana después de la cirugía inicial, el riñón contralateral se extirpó completamente.

45 Las ratas se dividieron en grupos tratados con solución salina y anticuerpo con tratamiento iniciado 2 semanas tras la nefrectomía de 5/6. La solución salina o el anticuerpo a una dosificación de 5 mg/kg se administró por inyección IP (0,5 ml cada una) cada 3 días durante 15 días (un total de 5 inyecciones). Semanalmente se tomaron muestras de sangre y de orina de ratas nefrectomizadas al azar para seguir el desarrollo de la enfermedad renal y para establecer una correlación entre el trastorno funcional renal y los cambios histológicos. Los resultados del análisis de la fibrosis renal, el análisis de orina y los ensayos de la química del suero se compararon entre los grupos a los 18 y 50 28 días después del inicio del tratamiento.

55 La fibrosis renal fue evaluada independientemente por dos anatomopatólogos de una forma ciega; tres secciones histológicas de cada riñón se examinaron usando tres tinciones morfológicas distintas: hematoxilina/eosina, tricromo de Masson y ácido pícrico-rojo Sirio. Además, la inmunohistoquímica se realizó sobre secciones congeladas para evaluar el tipo de deposición de colágeno en cada localización en el riñón. Se realizó la evaluación cuantitativa del colágeno (relación de hidroxiprolina/prolina) y la función renal se evaluó usando tanto análisis de orina como química del suero de muestras recogidas en el momento de la eutanasia.

Histológicamente, se observaron diferencias moderadas en la fibrosis entre riñones remanentes sin tratar y tratados

con anticuerpo (Figura 7). 3 días después del tratamiento, la evaluación subjetiva cegada produjo una puntuación de fibrosis media de 12,6 en el grupo tratado con solución salina frente a 10,7 en el grupo tratado con anticuerpo ($p < 0,05$). Se mantuvieron diferencias estadísticamente significativas en el grado de fibrosis histológica entre ratas tratadas con anticuerpo y solución salina 14 días después del tratamiento, con una puntuación de fibrosis media de 16,9 en el grupo tratado con solución salina frente a 14,4 en el grupo tratado con anticuerpo ($p < 0,05$). El análisis cuantitativo del contenido de hidroxiprolina del colágeno también demostró una tendencia hacia la disminución de la fibrosis en el grupo tratado con anticuerpo con respecto al grupo tratado con solución salina, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa.

También se observaron diferencias cualitativas entre grupos de tratamiento. Mientras que la mayoría de la deposición de colágeno en los grupos tratados con anticuerpo se limitó al intersticio corticomedular y medular, la fibrosis en las ratas tratadas con solución salina fue de multifocal a difusamente distribuida por toda la corteza y médula. Las diferencias histopatológicas más marcadas fueron en la cantidad de fibrosis glomerular. Muchos del grupo tratado con solución salina tuvieron glomeruloesclerosis de moderada a grave con fibrosis pericapsular, membrana de Bowman engrosada, sinequia y obsolescencia glomerular. Estos cambios fueron de mínimos a leves en los otros grupos, que incluyen los riñones de rata tratados con anticuerpo. La acumulación de colágeno se visualizó con tinciones con tricromo de Masson y ácido pícrico-rojo Sirio.

En ambos modelos de insuficiencia renal progresiva, el anticuerpo de la invención redujo la degradación de tejido y mejoró la función renal. Por tanto, los anticuerpos de la invención proporcionan beneficio terapéutico cuando se administran a pacientes en riesgo de o que padecen un trastorno renal tal como glomerulonefritis, nefropatía por IgA, glomeruloesclerosis; e insuficiencia renal y destrucción de túbulos debida a toxinas, etc.

7.2. Nefropatía diabética

La diabetes conduce a insuficiencia de múltiples órganos que incluyen, pero no se limitan a, riñón, corazón y ojo. Un componente principal de la progresión patológica de la insuficiencia orgánica diabética es la fibrosis. Un modelo establecido de nefropatía diabética es un ratón que lleva una mutación de pérdida de función en el receptor de leptina (Ob-R; codificada por el gen *db*). Las características clave en común entre la nefropatía diabética de ratón *db/db* y humana incluyen hipertrofia renal, distensión glomerular, albuminuria y expansión de la matriz mesangial.

Los anticuerpos de la invención se probaron usando el modelo de ratón *db/db* de nefropatía diabética del siguiente modo. Ratones *db/db* de ocho semanas de edad (Harlan, Indianapolis IN) y sus compañeros de camada *db/+* heterocigotos se trataron por inyección intraperitoneal con tanto anticuerpo de la invención (CLN1; véase más adelante) como IgG humana de control (clgG). En todos los animales, una inyección inicial de 300 μ g de anticuerpo fue seguida de 100 μ g de dosis administrada 3 veces por semana durante 60 días. Las muestras de sangre se recogieron y se midieron los pesos corporales al principio de y periódicamente durante todo el periodo de tratamiento. También se registró el consumo de alimentos.

A las 11 semanas existió una clara distinción entre los animales diabéticos (*db/db*) y los animales no diabéticos (*db/+*) con respecto al peso corporal, niveles de glucosa en sangre y consumo de alimentos. El tratamiento con tanto anticuerpo de la invención como anticuerpo de control no afectó significativamente ninguno de estos parámetros. Sin embargo, diversas mediciones de la función renal demostraron una clara diferencia entre ratones diabéticos y no diabéticos. Como puede apreciarse en la Tabla 3, los ratones diabéticos mostraron un aumento del peso del riñón, eliminación de creatinina y tasa de secreción de albúmina (AER) con respecto a ratones no diabéticos. Sin embargo, los animales diabéticos tratados con anticuerpo de la invención mostraron valores normalizados para todos los parámetros. Todos los datos se expresan como media \pm EEM. El número de ratones por grupo (*n*) osciló de 9 a 15.

Tabla 3. Función renal en ratones *db/db* y *db/+*.

Grupo de animales	Tratamiento	Peso del riñón (mg)	Creatinina (ml/h)	AER (μ g/24 h)
<i>db/+</i>	clgG	133,8 \pm 5,1	12,17 \pm 0,29	0,30 \pm 0,02
<i>db/+</i>	mAb1	141,0 \pm 4,3	2,37 \pm 0,19	0,23 \pm 0,04
<i>db/db</i>	clgG	207,8 \pm 3,9**	5,39 \pm 0,36**	2,52 \pm 0,20**
<i>db/db</i>	mAb1	177,4 \pm 4,5*	2,76 \pm 0,31 Δ	0,98 \pm 0,09 $^{\circ}$

** $P < 0,01$ frente a ratones *db/+*. * $P < 0,01$ frente a ratones *db/+* y $P < 0,05$ frente a ratones *db/db* tratados con clgG.
 $\Delta P < 0,01$ frente a ratones *db/db* tratados con clgG. $^{\circ} P < 0,01$ frente a ratones *db/+* y ratones *db/db* tratados con clgG.

Como CTGF se induce por glucosa alta y media en diversas actividades que incluyen producción de ECM en tejidos como resultado de lesión, por ejemplo, debido a la formación y acumulación de productos finales de la glicación avanzada (AGE), etc., patologías asociadas a diabetes tales como nefropatía diabética pueden prevenirse usando los anticuerpos de la invención.

5 Ejemplo 8. Trastornos oculares

El aumento de la expresión de CTGF se ha asociado a diversos trastornos oculares que incluyen vitreorretinopatía proliferativa (PVR), degeneración macular y retinopatía diabética (véanse, por ejemplo, Hinton y col (2002) Eye 16:422-428; He y col (2003) Arch Ophthalmol 121:1283-1288; y Tikellis y col (2004) Endocrinology 145:860-866). Se ha propuesto la función de CTGF y el uso de agentes terapéuticos anti-CTGF (véase la publicación internacional nº WO 03/049773). Los anticuerpos de la presente invención representan una clase única terapéuticamente eficaz de agente terapéutico anti-CTGF para su uso en tales trastornos oculares. La capacidad de los anticuerpos de la presente invención para mejorar complicaciones en trastornos oculares se prueba en modelos de enfermedad ocular del siguiente modo.

8.1. Retinopatía diabética

15 En el Ejemplo 7.2 anterior se describen modelos animales de diabetes, por ejemplo, ratones *db/db*. Cualquiera de estos modelos puede usarse para demostrar la eficacia del tratamiento de retinopatía diabética usando los anticuerpos de la invención. Un modelo particular para retinopatía diabética se proporciona a continuación, en el que los animales se inyectan con estreptozotocina (STZ), una toxina conocida de las células de islotes β pancreáticos secretores de insulina.

20 La diabetes se induce en ratas (por ejemplo, Long-Evans, Sprague-Dawley, etc.) mediante inyección, por ejemplo, intraperitonealmente de estreptozotocina (STZ), por ejemplo, a aproximadamente 60 a 85 mg/kg de peso corporal. Para mejorar la supervivencia, a las ratas se les puede administrar 10% de agua con azúcar durante 24 horas y/o 2 a 4 unidades de insulina por día tras la inyección de STZ. Diversos factores que incluyen, por ejemplo, peso corporal, tasa de secreción de albúmina urinaria, glucosa en sangre, hemoglobina glicada, tensión arterial, etc., se miden después de, por ejemplo, 4, 8 y 12 semanas. Los animales de control inyectados con tampón solo son seguidos simultáneamente. La mitad de las ratas tratadas con STZ y de control se tratan adicionalmente con anticuerpo de la invención inyectado, por ejemplo, intravenosamente, intraperitonealmente o intraocularmente. Durante todo el estudio, los animales tienen acceso a comida y agua a voluntad. Los animales se sacrifican a las 12 semanas, y se recogen los ojos y se examinan para cambios histológicos.

30 Una reducción en los cambios patológicos en animales tratados con anticuerpo con respecto a controles no tratados en indicativo de eficacia terapéutica en retinopatía diabética. Como CTGF se induce por glucosa alta y media en diversas actividades que incluyen producción de ECM en tejidos como resultado de lesión, por ejemplo, debido a formación y acumulación de productos finales de la glicación avanzada (AGE), etc., patologías asociadas a diabetes tales como nefropatía diabética pueden prevenirse usando los agentes terapéuticos anti-CTGF (véase, por ejemplo, la publicación internacional nº WO 03/049773). Los anticuerpos de la presente invención representan una clase única terapéuticamente eficaz de agente terapéutico anti-CTGF para su uso en trastornos oculares, por ejemplo, retinopatía diabética.

8.2. PVR

40 Se aíslan células epiteliales pigmentadas de retina de conejo (RPE) de ojos de conejo adulto y se cultivan en DMEM complementado con 10% de suero bovino fetal. Los cultivos subconfluentes (normalmente en el pase 2 a 3) se usan para todas las inyecciones posteriores. En el momento de la inyección, las células RPE cultivadas se recogen y se suspenden en PBS a aproximadamente $2,5 \times 10^6$ células/ml. Se eliminan aproximadamente 0,2 ml de humor acuoso de cada ojo de conejo receptor usando una aguja de calibre 25 y luego se inyectan células RPE a través de la esclerótica en un punto tres milímetros posterior al limbo justamente por encima y sobre la papila óptica usando aguja de calibre 27. Tras la inyección de células RPE se inyectan tanto 0,1 ml de PDGF BB (50-150 ng), CTGF (200-400 ng) como PDGF y CTGF en PBS por el mismo sitio de entrada. El ojo no inyectado de cada animal sirve de control. Opcionalmente, el CTGF puede inyectarse adicionalmente en el día 7 y/o el día 14 tras la primera inyección. La mitad de los animales se tratan adicionalmente con anticuerpo de la invención inyectado, por ejemplo, intravenosamente, intraperitonealmente o intraocularmente. Dependiendo del sitio de administración, el anticuerpo puede proporcionarse diariamente o administrarse menos frecuentemente, por ejemplo, en los días 7, 10, 14, etc.

55 Los animales se examinan usando procedimientos oftalmoscópicos indirectos para monitorizar el desarrollo y el grado de PVR, que se clasifica según parámetros descritos por Fastenberg (Fastenberg y col (1982) Am J Ophthalmol 93:565-572). Entonces, los animales se sacrifican y los ojos se analizan por examen histológico para tanto el grado de formación de membrana como de fibrosis. Adicionalmente puede recogerse retina y membrana fibrótica para la medición del contenido de colágeno.

Alternativamente, la PVR se induce en ojos de conejo usando inyección subretiniana de dispasa usando el modelo y un procedimiento adaptado de Frenzel y col (1998, Invest Ophthalmol Vis Sci 39:2157-2164). Se forma una ampolla subretiniana usando 50 μ l (0,05 U) de dispasa (Sigma Chemical Co.) en PBS. La mitad de los animales se

trata adicionalmente con anticuerpo de la invención inyectado, por ejemplo, intravenosamente, intraperitonealmente o intraocularmente. El desprendimiento de retina se induce en aproximadamente el 75% de los conejos inyectados que no reciben anticuerpo de la invención una semana después de la cirugía, y en aproximadamente el 100% de estos animales dos semanas tras la cirugía. Las membranas epirretinianas se examinan para el grado de fibrosis.

- 5 Una reducción en los cambios patológicos en animales tratados con anticuerpo con respecto a controles no tratados es indicativa de eficacia terapéutica en PVR. Como CTGF se ha asociado a lesión tisular en modelos de PVR, se han propuesto agentes anti-GTGF como agentes terapéuticos para su uso en tales trastornos (véase, por ejemplo, la publicación internacional nº WO 03/049773). Los anticuerpos de la presente invención representan una clase única terapéuticamente eficaz de agente terapéutico anti-CTGF para su uso en trastornos oculares, por ejemplo, PVR.

10 Ejemplo 9. Esclerosis

La esclerosis se caracteriza generalmente por fibrosis difusa, cambios degenerativos y anomalías vasculares en la piel (esclerodermia), articulaciones y órganos internos, especialmente el esófago, tubo gastrointestinal, pulmón, corazón y riñón.

9.1. Inducción de granuloma localizado

- 15 Ratones recién nacidos desarrollan una fibrosis localizada persistente cuando se les administra una combinación de TGF- β 2 y CTGF derivados de humano por inyección subcutánea durante 7 días consecutivos (Mori y col (1999) J Cell Physiol 181:153-159; Shinozaki y col (1997) Biochem Biophys Res Commun 237:292-297).

- Un día después del nacimiento, los ratones se dividieron en tres grupos de tratamiento y se les administró 40 μ l de 1% de albúmina de suero de ratón (MSA), PBS que contenía tanto 800 ng de TGF- β 2, 400 ng de CTGF como tanto 20 TGF- β 2 y CTGF, por inyección subcutánea en la región subscapular durante 7 días consecutivos. El grupo de TGF- β 2 y CTGF de combinación se dividió adicionalmente en dos grupos, recibiendo un grupo adicionalmente 40 μ g de anticuerpo de la invención, mAb1. En el día 11, los animales se sacrificaron y las secciones de los sitios de inyección se procesaron y se tiñeron con tricromo de Mason para la evaluación histológica. Los portaobjetos se aleatorizaron y fueron evaluados cualitativamente en un modo ciego por tres científicos; la puntuación osciló de 0 (sin cambio) a 4 (tejido fibrótico) basándose en el grado de fibrosis o la expansión de tejido conjuntivo (véase la Figura 8). Luego se calcularon las puntuaciones acumuladas de cada portaobjetos de todos los revisores individuales y el valor medio se comparó entre los grupos usando la prueba de ANOVA.

Las puntuaciones medias por grupos para el control de vehículo, TGF- β 2 y la combinación de TGF- β 2 y CTGF fueron 0,75, 6,83 y 9,00, respectivamente (Tabla 4).

30 **Tabla 4.** Puntuación histológica de granuloma en ratones neonatales

Tratamiento	Puntuación media	Error estándar	Tamaño del grupo
Vehículo	0,75	0,48	4
TGF- β 2	6,83	0,65	6
TGF- β 2+rhCTGF	9,00	0,72	7
TGF β 2+CTGF+mAb1	6,17	1,40	6
TGF β 2+GTGF + FG-3025	7,50	1,50	4
¹ Puntuación por grupo de portaobjetos de 3 lectores diferentes.			

- La puntuación media por grupo para el tratamiento con anticuerpo fue 6,17, una reducción estadísticamente significativa cuando se comparó con la combinación de TGF- β 2 y CTGF correspondiente ($p < 0,05$), mientras que el tratamiento con un anticuerpo anti-CTGF no neutralizante dirigido contra el extremo C no redujo la fibrosis. Por tanto, los anticuerpos de la presente invención son particularmente eficaces en la reducción de lesión esclerótica local a tejidos.

9.2. Fibrosis sistémica neonatal

- Ratones recién nacidos se dividieron en grupos y se les administró diariamente inyecciones intraperitoneales durante 21 días consecutivos con 300 μ g/kg/día de TGF β , 300 μ g/kg/día de CTGF, una combinación de 300 μ g/kg/día de cada uno de TGF β y CTGF, o la combinación de TGF β y CTGF precedida de la administración IP de 5 mg/kg de anticuerpo de la invención, mAb1, 30 min antes del tratamiento con factor de crecimiento. Las crías siguieron con sus madres durante el transcurso del tratamiento. En el día 21, los animales se sacrificaron, se extirparon los órganos principales y se midieron la prolina e hidroxiprolina total como antes.

Las inyecciones diarias de TGF β indujeron fibrosis sistémica menor, mientras que el CTGF solo no produjo respuesta. La combinación de TGF β y CTGF indujo fibrosis sistémica con deposición de colágeno extensiva en varios órganos (Figura 10) que incluyen hígado, pulmón, corazón, tubo gastrointestinal, diafragma y riñón; adhesiones intestinales extensivas; y un 25% del aumento en la mortalidad. La administración del anticuerpo de la invención conjuntamente con tratamiento con factor de crecimiento redujo o previno la fibrosis de órganos (Figura 10) y las adhesiones intestinales, y previno la mortalidad. Por tanto, los anticuerpos de la presente invención son adicionalmente eficaces cuando se administran sistémicamente en la reducción de lesión esclerótica a diversos tejidos y órganos. Los resultados presentados en los Ejemplos 10.1 y 10.2 demuestran claramente que los anticuerpos de la invención, cuando se administran localmente o sistémicamente, son terapéuticamente eficaces para el tratamiento de afecciones escleróticas.

9.3. Esclerodermia

Los anticuerpos de la invención pueden usarse para mejorar la fibrosis asociada a esclerodermia. Los procedimientos que miden el grado y la gravedad de la enfermedad de la piel en esclerodermia son conocidos dentro de la materia (véanse, por ejemplo, Rodnan y col (1979) *Arthritis Rheum* 22:130-40; Aghassi y col (1995) *Arch Dermatol* 131:1160-1166; Brennan y col (1982) *Br J Rheumatol* 31:457-460; Kahaleh y col (1986) *Clin Exp Rheumatol* 4:367-369; Falanga y Bucalo (1993) *J Am Acad Derm* 29:47-51; Seyger y col (1997) *J Am Acad Derm* 37:793-796; Seyger y col (1998) *J Am Acad Dermatol* 39: 220-225; Black (1969) *Br J Dermatol* 81:661-666; Ballou y col (1990) *J Rheumatol* 17:790-794; y Enomoto y col (1996) *J Am Acad Dermatol* 35:381-387).

Por ejemplo, la puntuación de la piel de Rodnan modificada mide la dureza de la piel usando un durómetro digital tipo OO Rex DD-3 (Rex Gauge Company, Buffalo Grove IL) en unidades de durómetro normalizadas con resolución de 0,1 unidades. Las mediciones del durómetro se realizan en todos los mismos sitios de la piel que se miden con la puntuación de la piel de Rodnan. Las puntuaciones de la piel y las lecturas del durómetro se realizan en el cribado de referencia, antes de la administración de un anticuerpo de la invención y cada tres meses durante todos los periodo de dosificación y seguimiento. Cada medición se repite cuatro veces, y se usa un análisis estructurado de varianza y cálculo de coeficientes de correlación entre clases para determinar entre variabilidad de repetición en relación con la variabilidad de sitio y paciente (Fleiss (1971) *Psychol Bull* 76:378-382). También se usan técnicas de correlación para evaluar la concordancia entre puntuaciones de la piel y puntuaciones del durómetro, tanto para puntuaciones globales como para puntuaciones de subgrupos en un momento de tiempo dado. También se realiza el análisis de correlación retardada (por ejemplo, que se refiere a puntuaciones del durómetro en la entrada para puntuaciones de la piel en el momento t + 3 meses, o t + 6 meses de tratamiento con anticuerpo). También puede recogerse la actividad de la enfermedad y la información del estado funcional, que incluyen datos de síntesis de colágeno (mediciones de PIIINP). La reducción en síntomas y/o las complicaciones de la esclerodermia como se miden usando cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente demuestran eficacia terapéutica de los anticuerpos de la presente invención.

35 Ejemplo 10. Osteoartritis

Los anticuerpos de la presente invención se prueban en uno de los siguientes modelos para demostrar eficacia terapéutica en osteoartritis. Para los siguientes ejemplos, la concentración de anticuerpo usado está en el intervalo de aproximadamente 0,015 a 15 mg de anticuerpo por kilogramo de peso corporal del sujeto; por ejemplo, se considera apropiada una dosificación de aproximadamente 5 mg de anticuerpo por kilogramo de peso corporal.

40 Animales, por ejemplo, ratones C57BL/6 macho de 12 semanas de edad se alojan en jaulas convencionales y se alimentan con una dieta convencional con agua de grifo a voluntad.

10.1 Inyección intraarticular de AdCTGF en articulaciones de la rodilla murinas

Se prepara una construcción de vector de expresión de adenovirus que contiene CTGF (AdCTGF) usando el sistema ADEASY (Qbiogene, Carlsbad CA) según procedimientos suministrados por el fabricante. Brevemente, un polinucleótido que codifica CTGF humano de longitud completa se inserta usando técnicas de clonación molecular convencionales en un plásmido pShuttle-CMV (Qbiogene). Entonces, la construcción pShuttle-CMV-CTGF se linealiza y se cotransfecta con el plásmido PADEASY-1 (Qbiogene) en células BJ-5183 de *E. coli* competentes por electroporación. AdCTGF se amplifica y se purifica usando procedimientos descritos por Kim y col (2001, *J Biol Chem* 276:38781-38786); se usa un vector adenovírico vacío como control. Las unidades formadoras de placa (intervalo 1,0-2,1 x 10¹⁰/ml) y las partículas de virus (intervalo 0,9-1,5 x 10¹²/ml) son similares para AdCTGF y el virus de control.

AdCTGF o adenovirus de control (1 x 10⁷ unidades formadoras de placa) se inyectan intraarticularmente; y los anticuerpos de la invención se administran por inyección intraarticular, intravenosa, intraperitoneal o subcutánea. El anticuerpo puede inyectarse al mismo tiempo como administración adenovírica o, alternativamente, puede empezarse terapia tanto antes como después de la inyección de AdCTGF. Los animales que reciben adenovirus de control son similarmente inyectados con tanto anticuerpo anti-CTGF como anticuerpo de control. Las articulaciones de la rodilla no inyectadas sirven de controles para los efectos de los anticuerpos.

Se aíslan articulaciones de la rodilla en diversos días, por ejemplo, 1, 3, 7, 14 y/o 28 días después de la inyección de

AdCTGF, se descalcifican durante 14 días en EDTA/polivinilpirrolidona y se guardan a -20°C usando el procedimiento descrito en Stoop y col (2001, Osteoarthritis Cartilage 9:308-315). La histología de las articulaciones se analiza para medir el espesor sinovial y la reducción de proteoglicanos; la hibridación *in situ* y la inmunohistoquímica se realizan para identificar la expresión de CTGF, además de la expresión de factores adicionales que incluyen colágeno (tipo I y/o III), etc. Se recoge líquido sinovial para determinar los niveles de CTGF, metaloproteinasas, etc. La eficacia de la terapia usando anticuerpos anti-CTGF se confirma por una reducción en los parámetros asociados a osteoarthritis con respecto a animales inyectados con AdCTGF y tratados con anticuerpo de control.

10.2 Inyección intraarticular de AdTGFβ en articulaciones de la rodilla murinas

Alternativamente, los anticuerpos pueden probarse en el modelo animal de osteoarthritis descrito por Bakker y col (2001, Osteoarthritis Cartilage 9:128-136). Por ejemplo, el anticuerpo de la invención o anticuerpo de control puede inyectarse al mismo tiempo que, posterior a o antes de la inyección intraarticular de 1×10^7 ufp de la construcción adenovirica que expresa TGFβ (AdTGFβ). Las articulaciones de la rodilla no inyectadas sirven de controles para los efectos de los anticuerpos. En diversos días, por ejemplo, día 3, 7, 14, etc., los animales de cada grupo se sacrifican y los tejidos se aíslan y se procesan. La histología de las articulaciones se analiza para medir el espesor sinovial, reducción de proteoglicanos y formación de osteofitos, etc.; la hibridación *in situ* y la inmunohistoquímica se realizan para identificar la expresión de CTGF, además de la expresión de factores adicionales que incluyen colágeno (tipo I y/o III), etc. Se recoge líquido sinovial para determinar los niveles de TGFβ, CTGF, metaloproteinasas, etc. La eficacia de la terapia usando anticuerpos de la invención se confirma por una reducción en los parámetros asociados a la osteoarthritis con respecto a animales inyectados con AdTGFβ y tratados con anticuerpo de control.

10.3 Inyección intraarticular de papaína en articulaciones de la rodilla murinas

Alternativamente, los anticuerpos pueden probarse usando el procedimiento descrito en van der Kraan y col (1989, Am J Pathol 135:1001-1014). La inyección intraarticular de papaína induce la formación de osteofitos, fibrosis y reducción de proteoglicanos del cartílago articular. El modelo de papaína se inicia inyectando 1 unidad de disolución de papaína (Sigma, St. Louis, MO) en la articulación de la rodilla derecha de los ratones. La articulación de la rodilla izquierda de cada animal sirve de control interno. Los anticuerpos de la invención se administran por inyección intraarticular, intravenosa, intraperitoneal o subcutánea al mismo tiempo que, posterior a o antes de la inyección intraarticular de papaína (0,5% por rodilla). En diversos días, por ejemplo, día 3, 7, 14, etc., los animales de cada grupo se sacrifican y los tejidos se aíslan y se procesan. La histología de las articulaciones se analiza para medir el espesor sinovial, reducción de proteoglicanos y formación de osteofitos, etc.; la hibridación *in situ* y la inmunohistoquímica se realizan para identificar la expresión de CTGF, además de la expresión de factores adicionales que incluyen colágeno (tipo I y/o III), etc. Se recoge líquido sinovial para determinar los niveles de TGFβ, CTGF, metaloproteinasas, etc. La eficacia de la terapia usando anticuerpos anti-CTGF se confirma por una reducción en los parámetros asociados a la osteoarthritis con respecto a animales inyectados con papaína y tratados con anticuerpo de control.

Ejemplo 11. Clonación y expresión

Aunque el siguiente ejemplo ilustra la clonación y expresión de un anticuerpo particular de la invención, los procedimientos son generalmente aplicables a todos los anticuerpos descritos y reivindicados en este documento.

Un anticuerpo a modo de ejemplo de la invención, mAb1, se identificó primero como parte de un anticuerpo humano complejo secretado por una línea celular de hibridoma (8C12-F10; preparada como se describe en el Ejemplo 3).

11.1 Clonación y secuenciación de la cadena pesada de mAb1

Se aisló ARN mensajero de un cultivo de células 8C12-F10 usando un kit MICRO-FAST TRACK (Invitrogen) siguiendo los protocolos proporcionados por el fabricante. Entonces se produjeron dos conjuntos de ADNc por síntesis de la segunda hebra usando un kit de ciclo celular de ADNc (Invitrogen) siguiendo los protocolos proporcionados por el fabricante y uno de los siguientes cebadores de sentido contrario de la cadena pesada:

AB90 (TGCCAGGGGGAAGACCGATGG; SEC ID N°: 3)
m19 H1504R (GCTGGGCGCCCGGGAAGTATGTA; SEC ID N°: 4)

Las secuencias de la región variable de la cadena pesada se clonaron por amplificación por PCR del conjunto de ADNc cebado con AB90 usando el cebador AB90 y uno de una serie de cebadores de la región V que incluyen cebadores correspondientes a las secuencias señal secretoras conservadas que codifican el extremo 5' de las regiones codificantes respectivas, y las secuencias de la región estructural 1 que codifican el inicio de las inmunoglobulinas maduras. Se usó Pfu ADN polimerasa (Stratagene) según los protocolos recomendados del fabricante con las siguientes variaciones: las reacciones se llevaron a cabo normalmente en 50 µl de volumen total que contenía 1 µl de ADNc, 0,75 µM de cada cebador directo e inverso, 200 µM de cada dNTP y 1 µl de Pfu polimerasa (2,5 unidades por µl). Se usó un programa de ciclador térmico de conteo regresivo con una incubación inicial a 94°C durante 2 min antes de la adición de enzima. Entonces se usaron los siguientes parámetros de ciclo: diez ciclos de 94°C durante 45 segundos, 65°C durante 45 segundos y 72°C durante 1 minuto; treinta ciclos de 94°C

durante 45 segundos, 55°C durante 45 segundos y 72°C durante 1 minuto; y luego un ciclo a 72°C durante 10 minutos.

Sólo un cebador de la secuencia señal de la cadena pesada, AB87 (ATGGAGTTTGGRCTGAGCTG; SEC ID N°: 5), que se une a las regiones V de la cadena pesada de la familia VH3, produjo producto significativo. El producto de PCR de 453 nucleótidos se clonó en el vector PCR BLUNT II-TOPO (Invitrogen), los clones se cribaron para el tamaño del inserto correcto y se secuenciaron tres clones correspondientes a los productos de PCR. Se obtuvieron secuencias idénticas para los tres clones.

Las secuencias de la región constante de la cadena pesada y UTR se clonaron por amplificación por PCR del conjunto de ADNc cebado con m19 H1504R. Un fragmento de PCR de 601 nucleótidos correspondiente al extremo 5' del segmento de la cadena pesada se amplificó usando el cebador de sentido directo VH3-33 29-51F (CGGCGGTGTTTCCATTTCGGTGAT; SEC ID N°: 6) y el cebador de sentido contrario de la región constante de la cadena pesada m19 H553R (GGGCGCCTGAGTTCCACGACAC; SEC ID N°: 7). Se usó clonación mediada por topoisomerasa para clonar los productos de PCR en el vector PCR-BLUNT II (Invitrogen), como se indica por el fabricante, y luego se secuenció el inserto. Similarmente, un fragmento de PCR de 505 nucleótidos se amplificó usando el cebador de sentido directo m19 H439F (GTCTTCCCCCTGGCACCTCCTC; SEC ID N°: 8) y el cebador de sentido contrario m19 H943R (CCCGCGGCTTTGTCTTGGCATTAT; SEC ID N°: 9), y se amplificó un fragmento de PCR de 503 nucleótidos usando el cebador de sentido directo m19 H1002F (CTGGCTGAATGGCAAGGAGTA; SEC ID N°: 10) y el cebador de sentido contrario m19 H1504R. Ambos fragmentos se clonaron por separado en el vector PCR-BLUNT II (Invitrogen) y se secuenciaron como se ha descrito anteriormente. Un cuarto fragmento de PCR de la cadena pesada de 586 nucleótidos se amplificó usando el cebador de sentido directo m19 H645F (GGGCACCCAGACCTACATC; SEC ID N°: 11) y el cebador de sentido contrario m19 H1230R (CTCCGGCTGCCATTGCTCTCC; SEC ID N°: 12) y se secuenció directamente.

La Figura 11A muestra un diagrama del alineamiento de los fragmentos de PCR clonados que proporcionaron la secuencia de nucleótidos de longitud completa (SEC ID N°: 13) que codifica la cadena pesada de mAb1 (SEC ID N°: 14). La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada se parece mucho al gen de la línea germinal de VH3 DP-44. Aunque no fue posible decir qué fragmento D se había usado, la secuencia de mAb1 se parece mucho a la familia DH4. La región JH coincide mucho con la línea germinal JH4 y JH5. La región constante de la cadena pesada de mAb1 coincide con el n° de acceso de GenBank BC016381, que indica un alotipo de G1m(3).

11.2 Clonación y secuenciación de la cadena ligera de mAb1

Se aisló ARN mensajero de un cultivo de células 8C12-F10 usando un kit MICRO-FAST TRACK (Invitrogen) siguiendo los protocolos proporcionados por el fabricante. Entonces se produjeron dos conjuntos de ADNc por síntesis de la segunda hebra usando un kit de ciclo celular de ADNc (Invitrogen) siguiendo los protocolos proporcionados por el fabricante y uno de los siguientes cebadores de ADNc de sentido contrario de la cadena ligera:

AB16 (CGGGAAGATGAAGACAGATG; SEC ID N°: 15)
Ck-760R (AAGGATGGGAGGGGGTCAGG; SEC ID N°: 16)

Las secuencias de la región variable de la cadena ligera se clonaron por amplificación por PCR del conjunto de ADNc cebado con AB16 usando el cebador AB16 y uno de una serie de cebadores de la región V que incluyen cebadores correspondientes a las secuencias señal secretoras conservadas que codifican el extremo 5' de las regiones codificantes respectivas, y las secuencias de la región estructural 1 que codifican el inicio de las inmunoglobulinas maduras. Se usó Pfu ADN polimerasa (Stratagene) según los protocolos recomendados del fabricante con las variaciones y parámetros del ciclo descritos anteriormente.

Sólo un cebador de la secuencia señal de la cadena ligera, AB123 (CCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTG; SEC ID N°: 17), que se une a las regiones V de la cadena pesada de la familia VK1, produjo producto significativo. El producto de PCR de 408 nucleótidos se clonó en el vector PCR BLUNT II-TOPO (Invitrogen), los clones se cribaron para el tamaño del inserto correcto y se secuenciaron tres clones correspondientes a los productos de PCR. Se obtuvieron secuencias idénticas para los tres clones.

Las secuencias de las regiones constantes de la cadena ligera se clonaron por amplificación por PCR del conjunto de ADNc cebado con Ck-760R. La secuencia codificante completa y la región 5' UTR de la cadena ligera se amplificó usando el cebador de sentido directo de la cadena ligera L15 22m (TCAGWCYAGTCAGGACACAGC; SEC ID N°: 18) y Ck-760R. El fragmento de 788 nucleótidos se clonó en el vector PCR BLUNT II (Invitrogen) y se secuenció. El plásmido resultante se designó 41m6.

La Figura 11B muestra un diagrama del alineamiento de los fragmentos de PCR clonados que proporcionaron la secuencia de nucleótidos de longitud completa (SEC ID N°: 19) que codifica la cadena ligera de mAb1 (SEC ID N°: 20). La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera coincide mucho con las regiones codificadas por secuencias de nucleótidos Vk L15 y Jk2 de la línea germinal. La región constante de la cadena ligera de mAb1 es idéntica a la secuencia de genes de inmunoglobulina de la cadena ligera kappa de la línea germinal

humana informada (Whitehurst y col (1992) Nucleic Acids Res 20:4929-4930).

11.3 Producción de construcciones de expresión de la cadena pesada y ligera de mAb1

Se generó ADNc de la cadena pesada de mAb1 de longitud completa por PCR de extensión por solapamiento en dos etapas a partir de los productos de PCR de la cadena pesada descritos anteriormente y mostrados en la Figura 11 A. Los dos productos de PCR en 5' se combinaron con los cebadores distales VH3-33 29-51F y m19 H943R en una reacción de extensión por solapamiento de PCR para producir un único fragmento de 991 nucleótidos. Similarmente, los dos productos de PCR en 3' se combinaron con los cebadores distales VH3-33 29-51F y m19 H943R en una reacción de extensión por solapamiento de PCR para producir un fragmento de 860 nucleótidos. Entonces, estos dos productos de reacción de extensión por PCR se purificaron en gel y se amplificaron juntos usando los cebadores distales VH3-33 29-51F y m19 H1504R para generar la secuencia codificante de ADNc de 1407 nucleótidos (residuos 441 a 1847 de SEC ID N°: 13) de la cadena pesada de mAb1 de longitud completa.

Entonces, el ADNc de la cadena pesada se clonó en el vector PCR-BLUNT II TOPO (Invitrogen) para producir el plásmido 43a4. Entonces, la región codificante de la cadena pesada de mAb1 se subclonó por digestión del plásmido 43a4 con las endonucleasas de restricción BamHI y XbaI, seguido de ligación del inserto escindido en el vector de expresión PCDNA5-FRT (Invitrogen), que se había digerido previamente con las endonucleasas de restricción BamHI y Nhe. El inserto del plásmido de expresión resultante, 44a1, se verificó por secuencia antes de subclonarse similarmente en orientación inversa en el vector PBK-CMV (Clontech) para producir el plásmido 47a4, y en el vector pCEP-Pu (E. Kohfeldt, Max-Planck-Institut für Biochemie), un vector derivado del vector pCEP4 (Invitrogen), para producir el plásmido 49a1.

El ADNc de 708 nucleótidos (residuo 415 a 1122 de SEC ID N°: 1) que codifica la cadena ligera de mAb1 de longitud completa se escindió del plásmido 41m6, descrito anteriormente, usando las endonucleasas de restricción HindIII y Xho I, y se ligó en el vector PCDNA5-FRT (Invitrogen), que se había digerido previamente con las endonucleasas de restricción HindIII y XhoI, para producir el plásmido de expresión de mamífero 42b2. El inserto de plásmido 42b2 se verificó por secuencia antes de subclonarse similarmente en orientación inversa en el vector PBK-CMV (Clontech) para producir el plásmido 47b3, y en el vector pCEP-Pu (E. Kohfeldt, Max-Planck-Institut für Biochemie) para producir el plásmido 49b1.

11.4 Transfección y expresión de construcciones de cadenas de anticuerpos

Se transfectaron células COS7 con plásmidos 44a1 (cadena pesada de mAb1) y 42b2 (cadena ligera de mAb1) en tanto transfecciones separadas como cotransfecciones usando procedimientos convencionales. El medio de cultivo se ensayó para la presencia de anticuerpo como se describe en el Ejemplo 4 (arriba). Sólo el medio de células cotransfectadas con tanto 44a1 como 42b2 expresó el anticuerpo humano que tenía actividad de unión a CTGF como se mide por ELISA usando procedimientos como se han descrito anteriormente. El anticuerpo, en este documento identificado como CLN1, producido por las células COS7 cotransfectadas se une a la mitad del extremo N de CTGF con una afinidad de 0,8 nM.

CLN1 también se ha expresado en células de ovario de hámster chino (CHO) genéticamente modificadas. Una línea celular de CHO que expresa el anticuerpo CLN1 a modo de ejemplo se depositó en la Colección americana de cultivos tipo (Manassas VA) y se identifica por el n° de acceso de ATCC PTA-6006. Las líneas celulares pueden optimizarse y la expresión del anticuerpo puede potenciarse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, por amplificación génica como se describe por Wigler y col (1980; Proc Natl Acad Sci USA 77:3567-3570) con modificaciones como se describen por Ringold y col (1981; J Mol Appl Genet 1:165-175), Gasser y col (1982; Proc Natl Acad Sci USA 79:6522-6526) y Kaufman y col (1985; Mol Cell Biol 5:1750-1759).

Ejemplo 12: Interacción de CTGF con TGFβ

Los anticuerpos de la invención se unen específicamente a regiones de CTGF definidas por los residuos codificados por el exón 3 (Figura 1B; nucleótido 418 a nucleótido 669 de SEC ID N°: 1). Esta región engloba del aminoácido 97 al aminoácido 180 de SEC ID N°: 2, e incluye el dominio de tipo C de von Willebrand (aminoácido 103 a aminoácido 164 de SEC ID N°: 2) y el epítipo de mAb1 (aminoácido 134 a aminoácido 158 de SEC ID N°: 2). Abreu y col (2002, Nat Cell Biol 4:599-604) informan que un dominio correspondiente al dominio de VWC de CTGF es importante para la interacción entre CTGF y TGFβ o BMP-4, y que dicha interacción modula la actividad de TGFβ y BMP-4. Los siguientes experimentos demuestran que las regiones codificadas por el exón 3 son necesarias y suficientes para la unión de CTGF a TGFβ, y que los anticuerpos de la invención pueden bloquear la interacción entre CTGF y TGFβ.

La interacción entre CTGF y TGFβ se ensayó usando el siguiente procedimiento. Los pocillos de una placa de ELISA MAXISORP de 96 pocillos (Nalge Nunc) se recubrieron durante la noche a 4°C con 10 µg/ml de tanto CTGF, el fragmento de CTGF codificado por el exón 3, como el fragmento de CTGF codificado por el exón 5, en PBS; o con PBS solo. Entonces, todos los pocillos se bloquearon con 1% de BSA en PBS, seguido de incubación durante 1 hora a temperatura ambiente en 50 µl de disolución que contenía TGFβ a 0,1, 3,3, 10, 33, 100, 333 ó 1000 ng/ml, y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-TGFβ MAB612 o MAB1835 (R&D Systems, Minneapolis MN) a 100, 300 ó 1000 ng/ml en PBS, 0,05% de Tween-20. MAB1835 reconoce TGF-β1, y -β2 bovino, de ratón y humano y bloquea la unión de TGFβ a timocitos de ratón. MAB612 reconoce TGF-β2, pero no inhibe las actividades de TGFβ. Los

5 pocillos se lavaron con PBS, 0,05% de Tween-20, y luego se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en una disolución que contenía un anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugada con fosfatasa alcalina diluido en PBS, 0,05% de Tween-20. Las placas se lavaron de nuevo y se añadió fosfato de p-nitrofenilo (PNPP) en etanolamina 1 M, MgSO₄ 1 mM, pH 9,8, los pocillos se incubaron durante un tiempo adecuado para revelarse, y entonces la reacción se terminó mediante la adición de NaOH. La absorbancia a λ de 405 nm se midió usando un espectrofotómetro.

10 La Figura 12 muestra que CTGF y el fragmento de CTGF codificado por el exón 3 pueden interactuar con TGF β a un grado equivalente, mientras que el fragmento de CTGF codificado por el exón 5 no mostró ninguna actividad de unión hacia TGF β . De forma interesante, el anticuerpo anti-TGF β MAB612 pudo detectar TGF β unido a CTGF de un modo dependiente de la dosis, pero el anticuerpo neutralizante, MAB1835, no pudo detectar TGF β unido a CTGF a ninguna concentración probada (datos no mostrados). Esto sugiere que CTGF compite con MAB 1835 para unirse a TGF β .

15 Los anticuerpos anti-CTGF se probaron para su capacidad para bloquear la unión entre CTGF y TGF β . Como se muestra en la Figura 12, los anticuerpos de la invención, ejemplificados por mAb4 y mAb1, bloquearon la unión a TGF β de tanto CTGF como del fragmento de CTGF codificado por el exón 3, mientras que un anticuerpo anti-CTGF dirigido contra un fragmento del extremo C de CRGF no bloqueó la unión. Estos resultados proporcionan soporte para un mecanismo de acción en el que los anticuerpos de la invención bloquean específicamente una interacción entre CTGF y TGF β , y posiblemente entre CTGF y otros miembros de la superfamilia de TGF β .

20 Diversas modificaciones de la invención, además de aquellas mostradas y descritas en este documento, serán evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de la descripción anterior.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> FIBROGEN, INC.
LIN, AI Y.
NEFF, Thomas B.
OLIVER, Noelynn A.
USINGER William R.
WANG, Qingjan
30 YEOWLL, David A.

<120> ANTICUERPOS CONTRA FACTOR DE CRECIMIENTO DE TEJIDO CONJUNTIVO

<130> FP0814 PCT

35 <150> US 60/475.598

<151> 04-06-2003

<160> 26

40 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 2075

<212> ADN

45 <213> Homo sapiens

<400> 1

cccggccgac agccccgaga cgacagcccg gcgcgtcccg gtccccacct cggaccaccg 60
 ccagcgctcc aggccccgcg ctccccgctc gccgccaccg cgccctccgc tccgcccgca 120
 gtgccaacca tgaccgccgc cagtatgggc cccgtccgcg tcgccttcgt ggtccctctc 180
 gccctctgca gccggccggc cgtcggccag aactgcagcg ggccgtgccg gtgcccggac 240
 gagccggcgc cgcgctgccc ggcgggctg agcctcgtgc tggacggctg cggctgctgc 300
 cgcgtctgcg ccaagcagct gggcgagctg tgcaccgagc gcgaccctg cgaccgcac 360
 aagggcctct tctgtgactt cggctccccg gccaacgcga agatcggcgt gtgcaccgcc 420
 aaagatggtg ctccctgcat ctccggtggt acggtgtacc gcagcggaga gtccttccag 480
 agcagctgca agtaccagtg cacgtgcctg gacggggcgg tgggctgcat gccctgtgc 540
 agcatggacg ttcgtctgcc cagccctgac tgccttcc cgaggagggt caagctgccc 600
 gggaaatgct gcgaggagtg ggtgtgtgac gagcccaagg accaaaccgt ggttgggcct 660
 gccctcgcgg cttaccgact ggaagacacg tttggcccag acccaactat gattagagcc 720
 aactgcctgg tccagaccac agagtggagc gcctgttcca agacctgtgg gatgggcatc 780
 tccaccggg ttaccaatga caacgcctcc tgcaggctag agaagcagag ccgcctgtgc 840
 atggtcaggc cttgcgaagc tgacctggaa gagaacatta agaagggcaa aaagtgcac 900
 cgtactccca aaatctcaa gcctatcaag tttgagctt ctggctgcac cagcatgaag 960
 acataccgag ctaaattctg tggagtatgt accgacggcc gatgctgcac cccccacaga 1020
 accaccacc tgccggtgga gttcaagtgc cctgacggcg aggtcatgaa gaagaacatg 1080
 atgttcatca agacctgtgc ctgccattac aactgtcccg gagacaatga catctttgaa 1140
 tcgctgtact acaggaagat gtacggagac atggcatgaa gccagagagt gagagacatt 1200
 aactcattag actggaactt gaactgattc acatctcatt tttccgtaaa aatgatttca 1260

gtagcacaag ttatttaaat ctgttttct aactggggga aaagattccc acccaattca 1320
 aaacattgtg ccattgcaaa caaatagtct atcttcccca gacactggtt tgaagaatgt 1380
 taagacttga cagtggaact acattagtac acagcaccag aatgtatatt aagggtgtggc 1440
 tttaggagca gtgggagggt accggcccgg ttagtatcat cagatcgact cttatacgag 1500
 taatatgcct gctatttgaa gtgtaattga gaaggaaaat tttagcgtgc tcaactgacct 1560
 gcctgtagcc ccagtgcag ctaggatgtg cattctccag ccatcaagag actgagtcaa 1620
 gttgttctt aagtcagaac agcagactca gctctgacat tctgattcga atgacactgt 1680
 tcaggaatcg gaatcctgtc gattagactg gacagcttgt ggcaagtgaa tttgcctgta 1740
 acaagccaga ttttttaaaa tttatattgt aaatattgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtata 1800
 tatatatata tatgtacagt tatctaagtt aatttaaagt tgtttgtgcc tttttatctt 1860
 tgtttttaat gctttgatat ttcaatgta gcctcaattt ctgaacacca taggtagaat 1920
 gtaaagcttg tctgatcgtt caaagcatga aatggatact tatatggaaa ttctgctcag 1980
 atagaatgac agtccgtcaa aacagattgt ttgcaaaggg gaggcacag tgtcttgga 2040
 ggctgatttc taggtaggaa atgtggtagc tcacg 2075

<210> 2
 <211> 349

ES 2 379 662 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

5

Met Thr Ala Ala Ser Met Gly Pro Val Arg Val Ala Phe Val Val Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Cys Ser Arg Pro Ala Val Gly Gln Asn Cys Ser Gly Pro
 20 25 30
 Cys Arg Cys Pro Asp Glu Pro Ala Pro Arg Cys Pro Ala Gly Val Ser
 35 40 45
 Leu Val Leu Asp Gly Cys Gly Cys Cys Arg Val Cys Ala Lys Gln Leu
 50 55 60
 Gly Glu Leu Cys Thr Glu Arg Asp Pro Cys Asp Pro His Lys Gly Leu
 65 70 75
 Phe Cys Asp Phe Gly Ser Pro Ala Asn Arg Lys Ile Gly Val Cys Thr
 85 90
 Ala Lys Asp Gly Ala Pro Cys Ile Phe Gly Gly Thr Val Tyr Arg Ser
 100 105 110
 Gly Glu Ser Phe Gln Ser Ser Cys Lys Tyr Gln Cys Thr Cys Leu Asp
 115 120 125

Gly Ala Val Gly Cys Met Pro Leu Cys Ser Met Asp Val Arg Leu Pro
 130 135 140
 Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg Val Lys Leu Pro Gly Lys Cys
 145 150 155 160
 Cys Glu Glu Trp Val Cys Asp Glu Pro Lys Asp Gln Thr Val Val Gly
 165 170 175
 Pro Ala Leu Ala Ala Tyr Arg Leu Glu Asp Thr Phe Gly Pro Asp Pro
 180 185 190
 Thr Met Ile Arg Ala Asn Cys Leu Val Gln Thr Thr Glu Trp Ser Ala
 195 200 205
 Cys Ser Lys Thr Cys Gly Met Gly Ile Ser Thr Arg Val Thr Asn Asp
 210 215 220
 Asn Ala Ser Cys Arg Leu Glu Lys Gln Ser Arg Leu Cys Met Val Arg
 225 230 235 240
 Pro Cys Glu Ala Asp Leu Glu Glu Asn Ile Lys Lys Gly Lys Lys Cys
 245 250 255
 Ile Arg Thr Pro Lys Ile Ser Lys Pro Ile Lys Phe Glu Leu Ser Gly
 260 265 270
 Cys Thr Ser Met Lys Thr Tyr Arg Ala Lys Phe Cys Gly Val Cys Thr
 275 280 285
 Asp Gly Arg Cys Cys Thr Pro His Arg Thr Thr Thr Leu Pro Val Glu
 290 295 300
 Phe Lys Cys Pro Asp Gly Glu Val Met Lys Lys Asn Met Met Phe Ile
 305 310 315 320
 Lys Thr Cys Ala Cys His Tyr Asn Cys Pro Gly Asp Asn Asp Ile Phe
 325 330 335
 Glu Ser Leu Tyr Tyr Arg Lys Met Tyr Gly Asp Met Ala
 340 345

5

<210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10

<220>
 <223> Cebador de la cadena pesada de Ig

<400> 3

tgccaggggg aagaccgatg g

5 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador de la cadena pesada de Ig

<400> 4
 gctgggcgcc cgggaagtat gta 23

15 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador de la cadena pesada de Ig

<400> 5
 atggagtttg grctgagctg 20

<210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador de la cadena pesada de Ig

<400> 6
 cggcgggtgtt tccattcggat gat 23

<210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador de la cadena pesada de Ig

<400> 7
 gggcgctga gttccacgac ac 22

<210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

50 <220>
 <223> Cebador de la cadena pesada de Ig

<400> 8
 gtctcccc tggcaccctc ctc 23

60 <210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

65 <220>

ES 2 379 662 T3

<223> Cebador de la cadena pesada de Ig

<400> 9
cccgcggctt tgtctggca ttat 24

5

<210> 10
<211> 21
<212> ADN
<213> secuencia artificial

10

<220>
<223> Cebador de la cadena pesada de Ig

<400> 10
ctggctgaat ggcaaggagt a 21

15

<210> 11
<211> 19
<212> ADN
<213> secuencia artificial

20

<220>
<223> Cebador de la cadena pesada de Ig

<400> 11
gggcacccag acctacatc 19

25

<210> 12
<211> 22
<212> ADN
<213> secuencia artificial

30

<220>
<223> Cebador de la cadena pesada de Ig

<400> 12
ctccggctgc ccattgctct cc 22

35

<210> 13
<211> 2197
<212> ADN
<213> Homo sapiens

40

<400> 13

45

ggtaccttct gaggcggaaa gaaccagctg tggaatgtgt gtcagttagg gtgtggaaag 60

tccccaggct ccccagcagg cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc 120

aggtgtggaa agtccccagg ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat 180

tagtcagcaa ccatagtccc gccctaact ccgcccattc cgcacctaac tccgcccagt 240

tccgcccatt ctccgcccc a tggctgacta atttttttta tttatgcaga ggccgaggcc 300

gcctcggcct ctgagctatt ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg cctaggcttt 360

tgcaaaaagc ggccgcaagc taattcgccc ttcggcggtg tttccattcg gtgatcagga 420

ctgaacacac aggaatcacc atggagtttg tgctgagctg ggttttcctt gttgctatat 480

taaaagggtg ccagtgtgag ggtcagctgg tgcaatctgg gggaggcttg gtacatcctg 540

gggggtccct gagactctcc tgtgcaggct ctggattcac cttcagtagc tatggtatgc 600

actgggttcg ccaggctcca ggaaaaggtc tggagtgggt atcaggtatt ggtactggtg 660

gtggcacata ctctacagac tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcca 720
 agaactcctt gtatcttcaa atgaacagcc tgagagccga ggacatggct gtgtattact 780
 gtgcaagagg agattactat ggttcgggga gtttctttga ctgctggggc cagggaaacc 840
 tggtcaccgt ctctcagcc tccaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcaccctcct 900
 ccaagagcac ctctgggggc acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tactteccccg 960
 aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg 1020
 ctgtcctaca gtctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca 1080
 gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaagggtg 1140
 acaagagagt tgagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac 1200
 ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacaccctca 1260
 tgatctcccg gaccctgag gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg 1320
 aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc 1380
 gggaggagca gtacaacagc acgtaccggg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgaccagg 1440
 actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca 1500
 tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacagggt tacaccctgc 1560
 ccccatcccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct 1620
 tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca 1680
 agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg 1740
 tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc 1800
 tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga gtgcgacggc 1860
 cggcaagccc cgctccccgg gctctcggcg tcgcacgagg atgcttggca cgtacccccct 1920
 gtacatactt cccgggcgcc cagcaagggc gaattgatcc agacatgata agatacattg 1980
 atgagtttgg acaaaccaca actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaattt 2040
 gtgatgctat tgctttattt gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt aacaacaaca 2100
 attgcattca ttttatgttt caggttcagg gggaggtgtg ggaggttttt taaagcaagt 2160
 aaaacctcta caaatgtggt atggctgatt atgatca 2197

<210> 14
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14

5

Met Glu Phe Val Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Gly Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His
 20 25 30

10

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Gly Ile Gly Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Ser Thr Asp
 65 70 75 80
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
 85 90 95
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Phe Phe Asp Cys
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 370 375 380
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460
 Leu Ser Pro Gly Lys
 465

5 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de la cadena ligera de Ig

 10 <400> 15
 cggaagatg aagacagatg 20

 15 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Cebador de la cadena ligera de Ig

 <400> 16
 aagatggga ggggtcagg 20

 25 <210> 17

ES 2 379 662 T3

<211> 24
<212> ADN
<213> secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador de la cadena ligera de Ig

<400> 17
cccgctcagc tcctggggct cctg 24

10 <210> 18
<211> 22
<212> ADN
<213> secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador de la cadena ligera de Ig

<400> 18
tcagwycag tcaggacaca gc 22

20 <210> 19
<211> 1433
<212> ADN
<213> Homo sapiens

25 <400> 19

ES 2 379 662 T3

ggtaccttct gaggcggaaa gaaccagctg tggaatgtgt gtcagttagg gtgtggaaag 60
 tccccaggct cccagcagg cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc 120
 aggtgtggaa agtccccagg ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat 180
 tagtcagcaa ccatagtccc gccctaaact ccgccatcc cggccctaac tccgccagt 240
 tccgccatt ctccgcccc tggctgacta attttttta ttatgcaga ggccgaggcc 300
 gcctcgccct ctgagctatt ccagaagtag tgaggaggct ttttggagg cctaggcttt 360
 tgcaaaaagc ggccgcaagc taattcgccc tttcagtctc agtcaggaca cagcatggac 420
 atgagggtcc tcgctcagct cctggggctc ctgctgctct gtttccagg tgccagatgt 480
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 540
 atcacttgct gggcgagtca gggatttagc agctggttag cctggtatca gcagaaacca 600
 gagaaagccc ctaagtccct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 660
 aggttcagcg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 720
 gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctcccac ttttggccag 780
 gggaccaagc tggagatcaa acgaaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 840
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 900
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 960
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 1020
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgctt gcgaagtac ccatcagggc 1080
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttagagga gaagtgcccc 1140

cacctgctcc tcagttccag cctgaccccc tccatcctt aagggcgaat tgatccagac 1200
atgataagat acattgatga gtttggacaa accacaacta gaatgcagtg aaaaaaatgc 1260
tttatttggtg aaatttggtg tgctattgct ttatttgtaa ccattataag ctgcaataaa 1320
caagttaaca acaacaattg cattcatttt atgtttcagg ttcaggggga ggtgtgggag 1380
gttttttaaa gcaagtaaaa cctctacaaa tgtggtatgg ctgattatga tca 1433

- 5
- <210> 20
 - <211> 236
 - <212> PRT
 - <213> Homo sapiens
 - <400> 20

Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys
 1 5 10 15
 Phe Pro Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys
 50 55 60
 Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110
 Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

195

200

205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 21
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> péptido sintético

<400> 21

5

10

Cys Ile Phe Gly Gly Thr Val Tyr Arg Ser Gly Glu Ser Phe Gln Ser
1 5 10 15

Ser Cys Lys Tyr Gln Cys Thr Cys Leu Asp Gly Ala Val Gly Cys Met
20 25 30

Pro Leu Cys Ser Met Asp Val Arg Leu Pro Ser Pro Asp Cys Pro Phe
35 40 45

Pro Arg Arg Val Lys Leu Pro Gly Lys Cys Cys Glu Glu Trp
50 55 60

5
 <210> 22
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> artificial

10
 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 22

Pro Leu Cys Ser Met Asp Val Arg Leu Pro Ser Pro Asp Cys Pro Phe
1 5 10 15

Pro Arg Arg Val Lys Leu Pro
20

15
 <210> 23
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> artificial

20
 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 23

25
Arg Leu Pro Ser Pro Asp Ser Pro Phe Pro Arg Arg Val Lys Leu Pro
1 5 10 15

Gly Lys

30
 <210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial

35
 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 24

Arg Leu Pro Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg Val Lys Leu
1 5 10 15

5 <210> 25
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> péptido sintético
10 <400> 25

Arg Leu Pro Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg Val
1 5 10

15 <210> 26
<211> 14
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> péptido sintético
20 <400> 26

Leu Pro Ser Pro Asp Cys Pro Phe Pro Arg Arg Val Lys Leu
1 5 10

25

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o porción del mismo que se une específicamente a al menos una parte de una región sobre CTGF humano definida como los aminoácidos 143 a 154 de SEC ID N°: 2 o a una región ortóloga sobre CTGF derivada de otras especies.
- 5 2. El anticuerpo de cualquier reivindicación precedente, en el que la afinidad del anticuerpo por CTGF es aproximadamente 10^{-9} M.
3. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo tiene la misma especificidad que un anticuerpo producido por la línea celular identificada por el n° de acceso de ATCC PTA-6006.
- 10 4. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo se produce por la línea celular identificada por el n° de acceso de ATCC PTA-6006.
5. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la porción es un fragmento Fab, F(ab)₂ o Fv.
- 15 6. Un anticuerpo que se une específicamente a al menos una parte de una región sobre CTGF humano definida como los aminoácidos 143 a 154 de SEC ID N°: 2 o a una región ortóloga sobre CTGF derivada de otras especies, que comprende un primer polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:
 - (a) una secuencia de la cadena pesada de la inmunoglobulina que comprende SEC ID N°: 14;
 - (b) una secuencia de la cadena pesada de la inmunoglobulina que comprende el dominio variable de SEC ID N°: 14; o
 - (c) una variante conservativa de (a) o (b);
 - 20 y un segundo polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:
 - (d) una secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina que comprende SEC ID N°: 20;
 - (e) una secuencia de la cadena ligera de la inmunoglobulina que comprende el dominio variable de SEC ID N°: 20; o
 - (f) una variante conservativa de (d), o (e).
- 25 7. El anticuerpo de la reivindicación 6, en el que el dominio variable del primer polipéptido comprende un dominio variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina como se define en los aminoácidos 1 a 167 de SEC ID N°: 14.
8. El anticuerpo de la reivindicación 6, en el que el dominio variable del segundo polipéptido comprende un dominio variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina como se define en los aminoácidos 1 a 136 de SEC ID N°: 20.
- 30 9. Un anticuerpo según la reivindicación 6 que comprende una cadena pesada de la inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos como se define en SEC ID N°: 14 y una cadena ligera de la inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos como se define en SEC ID N°: 20.
10. El anticuerpo de cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo puede neutralizar estimulación inducida por CTGF de migración celular.
- 35 11. El anticuerpo de cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo es para su uso en reducir fibrosis en un sujeto.
12. El anticuerpo de la reivindicación 11, en el que la fibrosis se produce dentro de un tejido seleccionado del grupo que consiste en tejido epitelial, endotelial y conjuntivo.
13. El anticuerpo de la reivindicación 11, en el que la fibrosis se produce dentro de un órgano seleccionado del grupo que consiste en riñón, pulmón, hígado, corazón y piel.
- 40 14. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que es un anticuerpo monocatenario.
15. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que es un anticuerpo humanizado.
16. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que es un anticuerpo quimérico.
17. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que es un anticuerpo multivalente.
- 45 18. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
19. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo está glicosilado.
20. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en el que el anticuerpo está no glicosilado.
21. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo está conjugado con

- un agente citotóxico o enzima.
22. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo está detectablemente marcado.
- 5 23. El anticuerpo de la reivindicación 22, en el que la marca detectable es una enzima, resto fluorescente, resto quimioluminiscente, biotina, avidina o radioisótopo.
24. Un anticuerpo quimérico según la reivindicación 1 que comprende una región variable derivada de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-23 y una región constante derivada de otra fuente.
25. El anticuerpo quimérico de la reivindicación 24, en el que la región constante se deriva de una región constante de una inmunoglobulina humana.
- 10 26. Una formulación farmacéutica de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
27. La formulación farmacéutica de la reivindicación 26 que comprende además un segundo agente terapéutico.
28. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-25 para su uso en medicina.
29. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-25 para administración a un sujeto predispuesto a o diagnosticado con hipertensión, hiperglucemia, diabetes, infarto de miocardio, artritis e inflamación local o sistémica.
- 15 30. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-25 para su uso en el tratamiento, o la prevención, de un trastorno proliferativo celular.
31. El anticuerpo de la reivindicación 30, en el que el trastorno proliferativo celular es angiogénesis, aterosclerosis, glaucoma o cáncer.
- 20 32. El anticuerpo de la reivindicación 31, en el que dicho cáncer incluye leucemia linfoblástica aguda, dermatofibromas, cáncer de mama, carcinoma de mama, desmoplasia, angioliopoma, angioleiomioma, cáncer desmoplásico, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer gastrointestinal o cáncer de hígado.
33. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-25 para su uso en el tratamiento de o la prevención de un trastorno fibrótico.
- 25 34. El anticuerpo de la reivindicación 33, en el que el trastorno fibrótico es fibrosis pulmonar idiopática, nefropatía diabética, retinopatía diabética, osteoartritis, esclerodermia, insuficiencia cardíaca crónica o hígado cirrótico.
35. Un medicamento que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-25 para tratar un sujeto que tiene un trastorno seleccionado del grupo que consiste en fibrosis pulmonar idiopática, nefropatía diabética, insuficiencia cardíaca crónica e hígado cirrótico.
- 30 36. Un medicamento que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-25 para tratar un sujeto predispuesto a un trastorno debido a una afección seleccionada del grupo que consiste en hipertensión, diabetes, infarto de miocardio, artritis e inflamación local o sistémica.
37. Un par de secuencias de polinucleótidos que comprende una primera secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- 35 (a) una secuencia de polinucleótidos que codifica SEC ID N°: 14;
 (b) una secuencia de polinucleótidos que codifica del aminoácido 1 al aminoácido 167 de SEC ID N°: 14;
 (c) SEC ID N°: 13; y
 (d) nucleótido 1 al nucleótido 501 de SEQ ID: 13;
- y
- 40 una segunda secuencia de polinucleótidos que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- (a') una secuencia de polinucleótidos que codifica SEC ID N°: 20;
 (b') una secuencia de polinucleótidos que codifica del aminoácido 1 al aminoácido 136 de SEC ID N°: 20;
 (c') SEC ID N°: 19; y
 (d') nucleótido 1 al nucleótido 408 de SEC ID N°: 19.
- 45 38. Un par de polinucleótidos recombinantes que comprende un primer polinucleótido recombinante que comprende la primera secuencia de polinucleótidos de la reivindicación 37 operativamente ligada a una secuencia de vector que contiene secuencias de control de la replicación y la transcripción; y un segundo polinucleótido recombinante que comprende la segunda secuencia de polinucleótidos de la reivindicación 37 operativamente ligada a una secuencia de vector que contiene secuencias de control de la replicación y la transcripción.

39. Los polinucleótidos recombinantes de la reivindicación 38, en los que el primer polinucleótido codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 14 y el segundo polinucleótido codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 20.
- 5 40. Los polinucleótidos recombinantes de la reivindicación 39, en los que el primer polinucleótido comprende SEC ID N°: 13 y el segundo polinucleótido comprende SEC ID N°: 19.
41. Una célula huésped transfectada con los polinucleótidos recombinantes de la reivindicación 38.
42. Una célula huésped que comprende una célula cotransfectada con un polinucleótido que codifica SEC ID N°: 14 y un polinucleótido que codifica SEC ID N°: 20, y que produce un anticuerpo funcional con las mismas características que el anticuerpo producido por la línea celular identificada por el n° de acceso de ATCC PTA-6006.
- 10 43. La célula huésped de la reivindicación 42, en la que la célula huésped es la línea celular identificada por el n° de acceso de ATCC PTA-6006.

Factor de crecimiento de tejido conjuntivo

Estructura modular

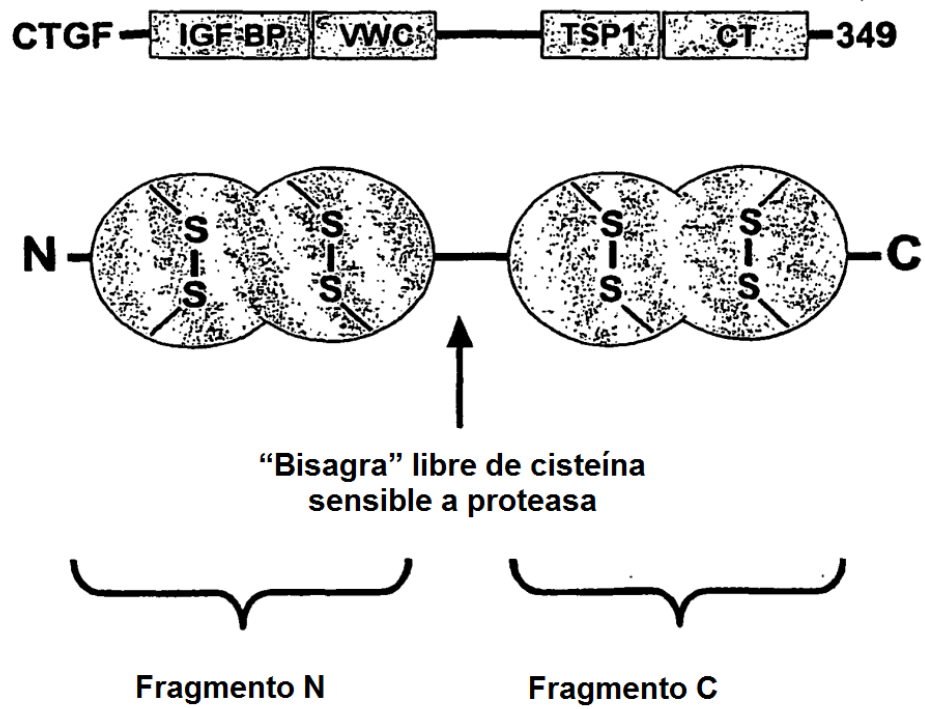


Figura 1A

FP0814 PCT

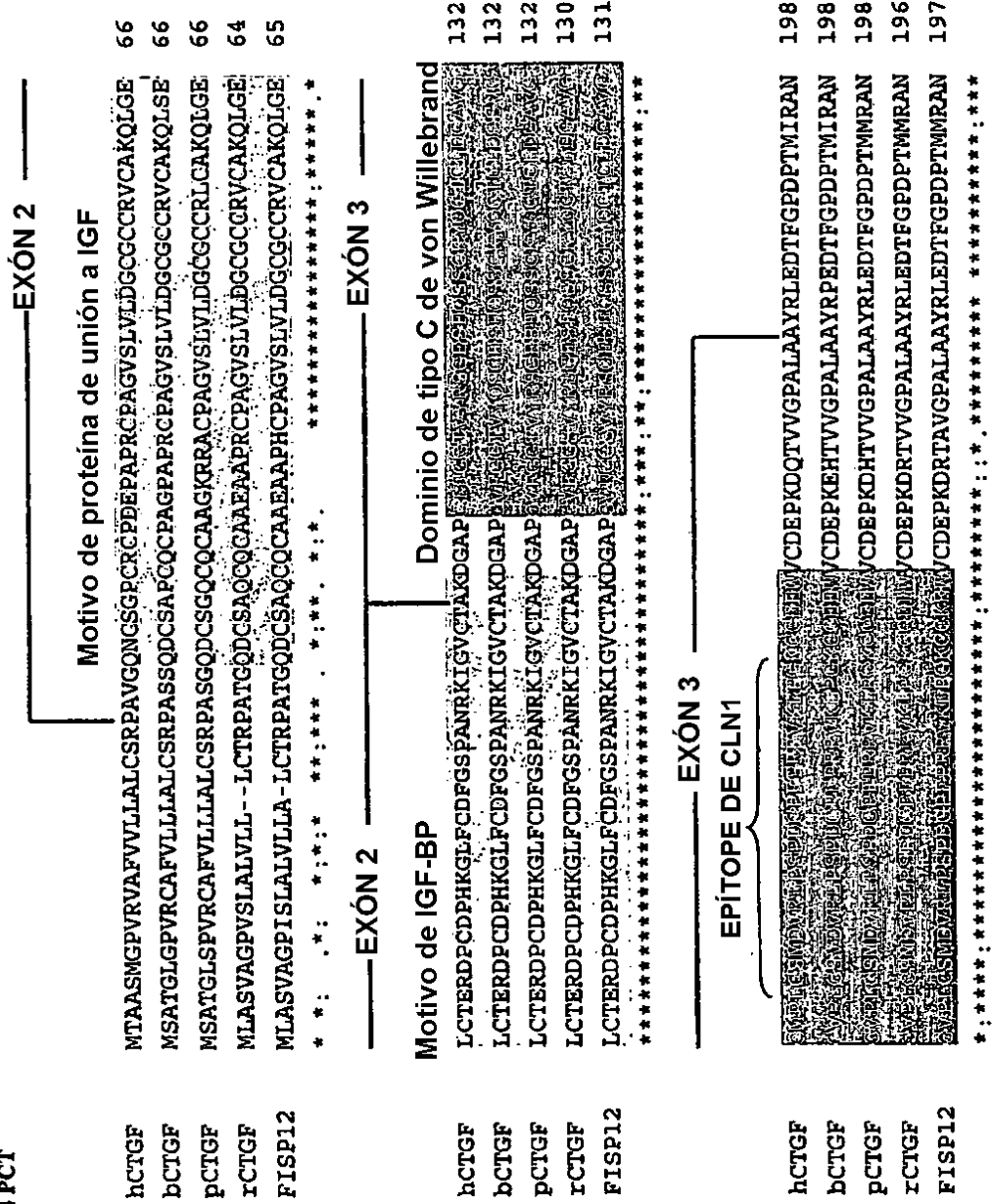
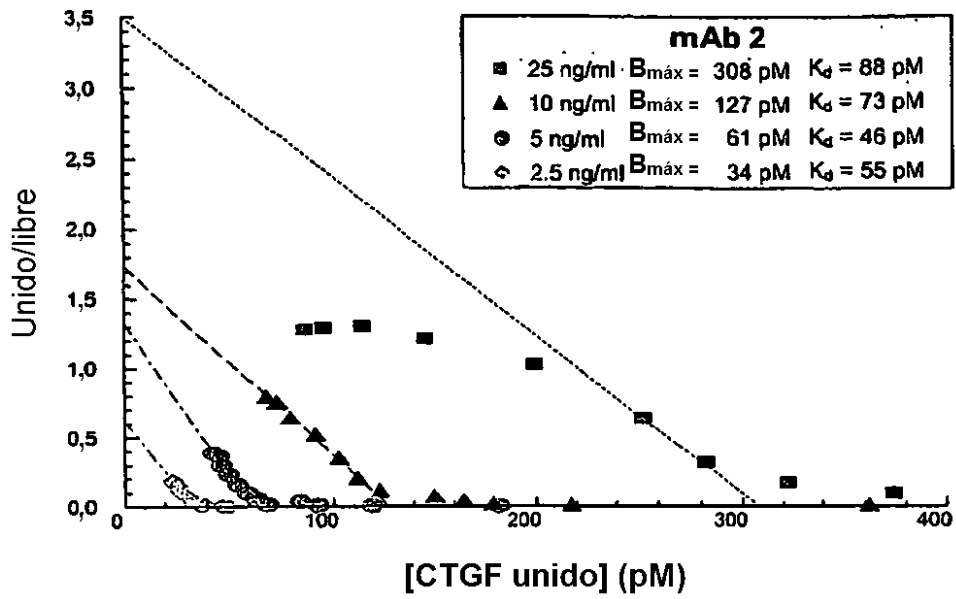


Figura 1B

A.



B.

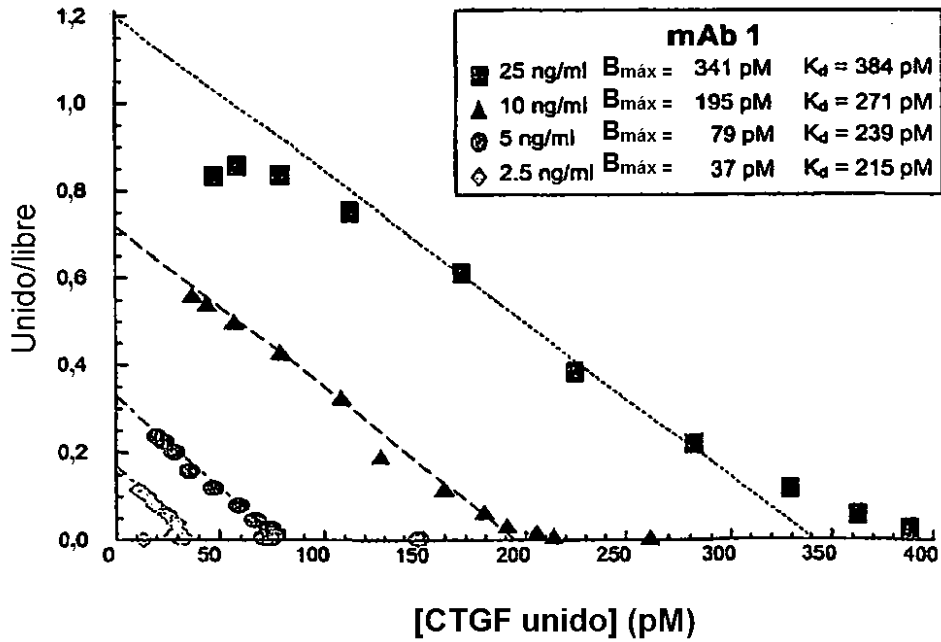


Figura 2

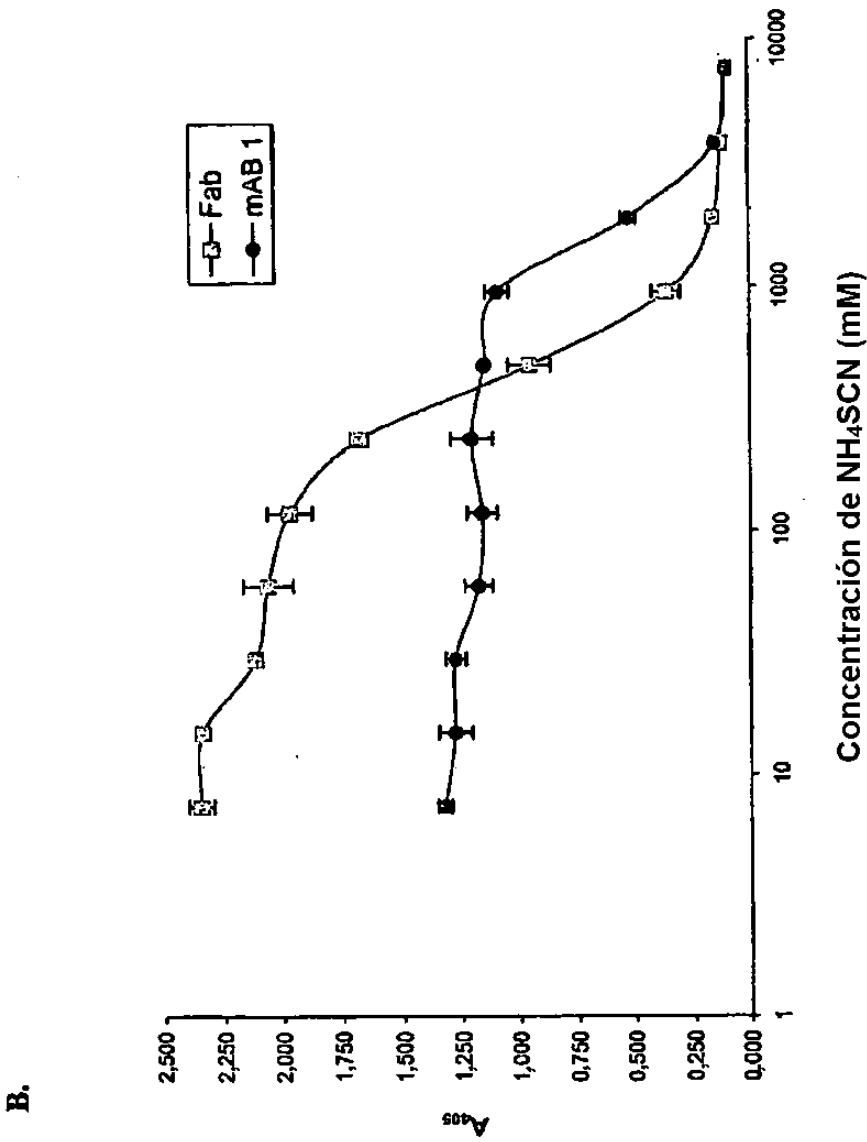


Figura 3

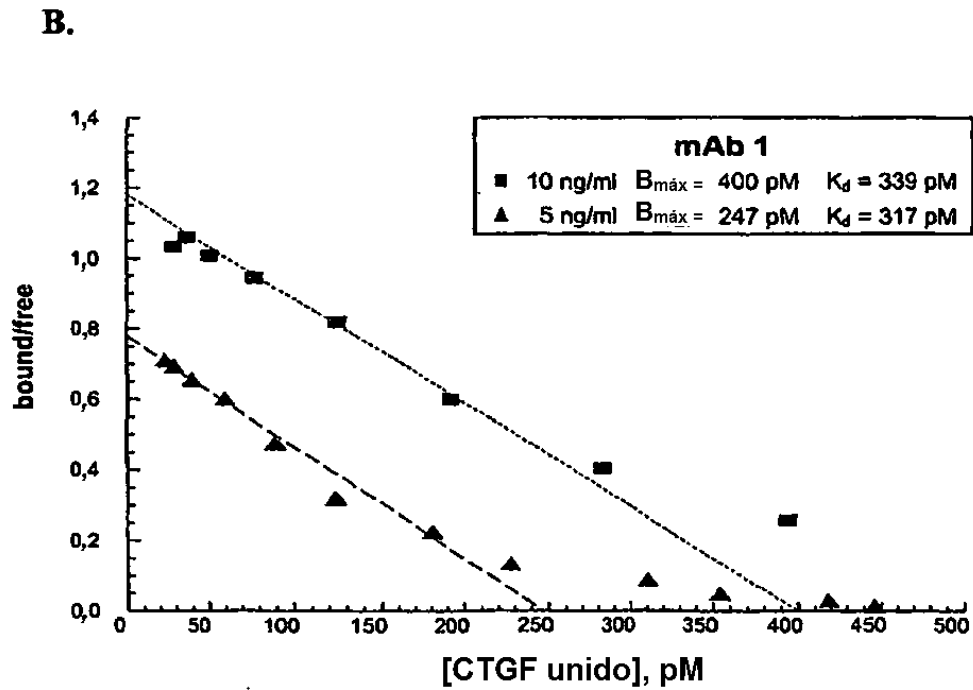
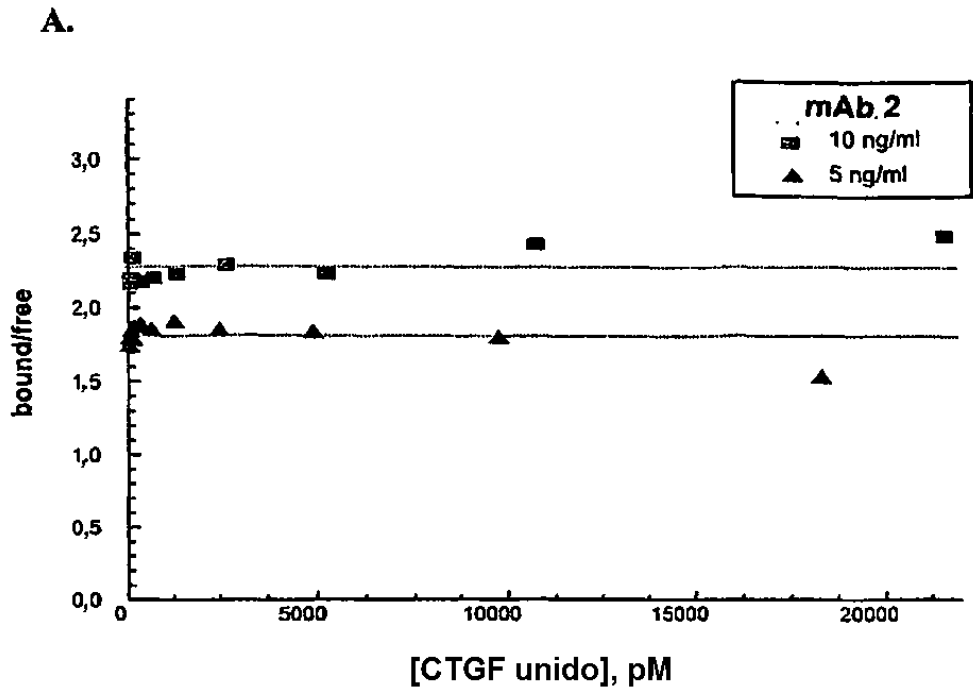
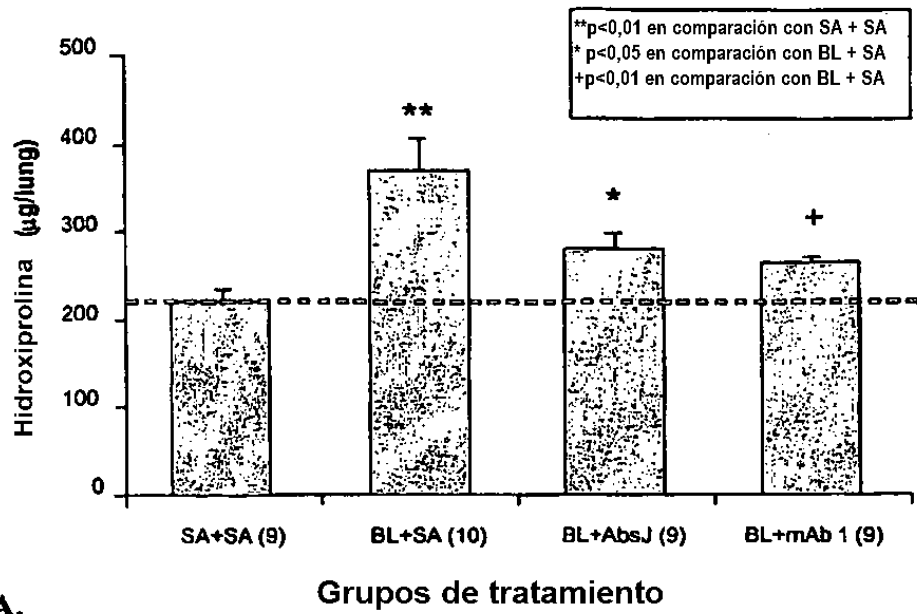
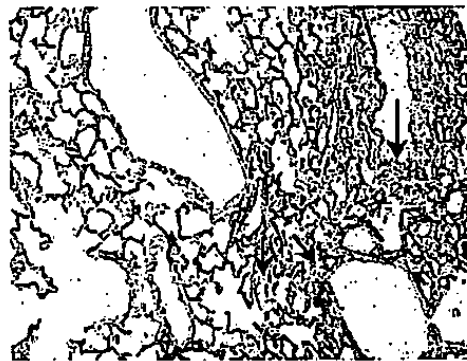


Figura 4

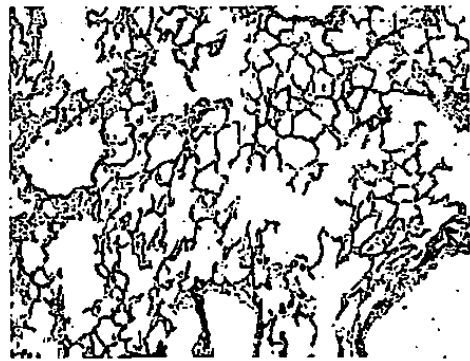


A.



Fibrosis pulmonar de ratón inducida por bleomicina

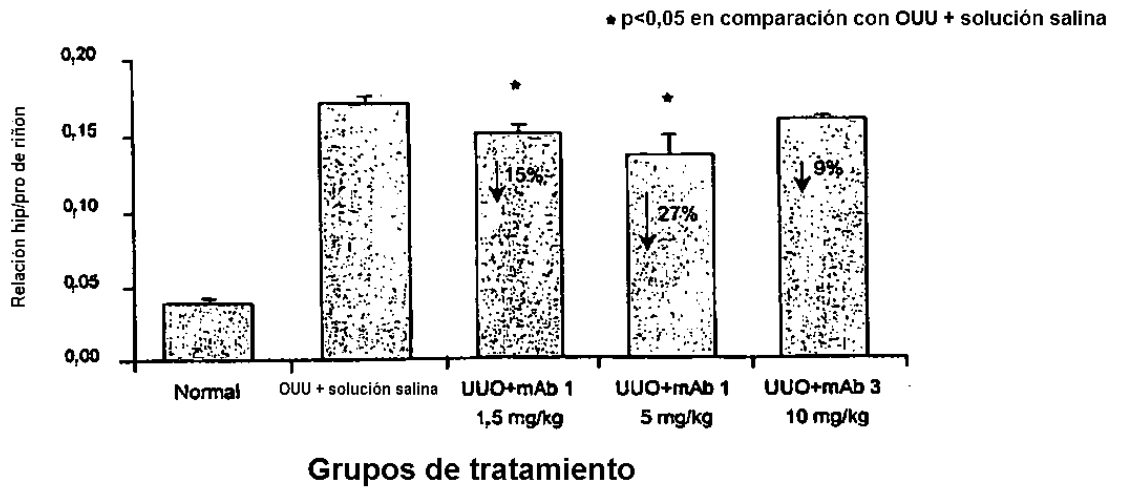
B.



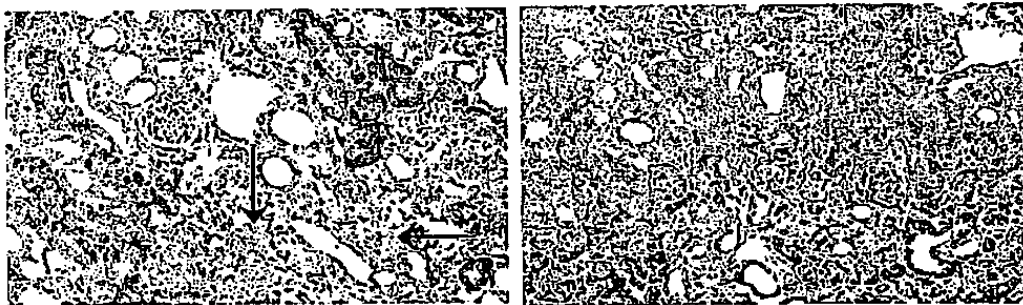
Tratamiento con anticuerpos en fibrosis pulmonar de ratón inducida por bleomicina

C.

Figura 5



A

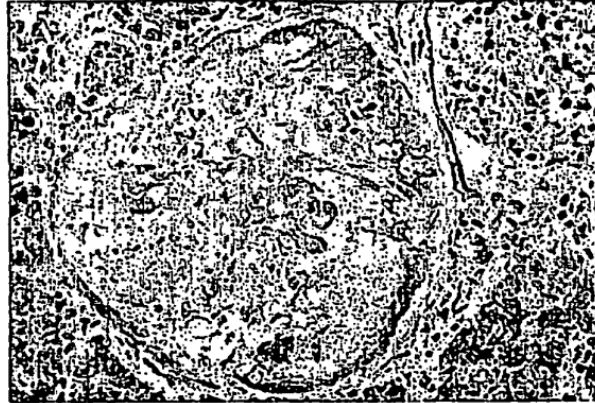


B Control de vehículo de fibrosis renal inducida por OOU

C Tratamiento con anticuerpos en fibrosis renal inducida por OOU

Figura 6

NEFRECTOMÍA DE 5/6



Tratados con solución salina (día 18)



Tratados con anticuerpos (día 18)

Figura 7

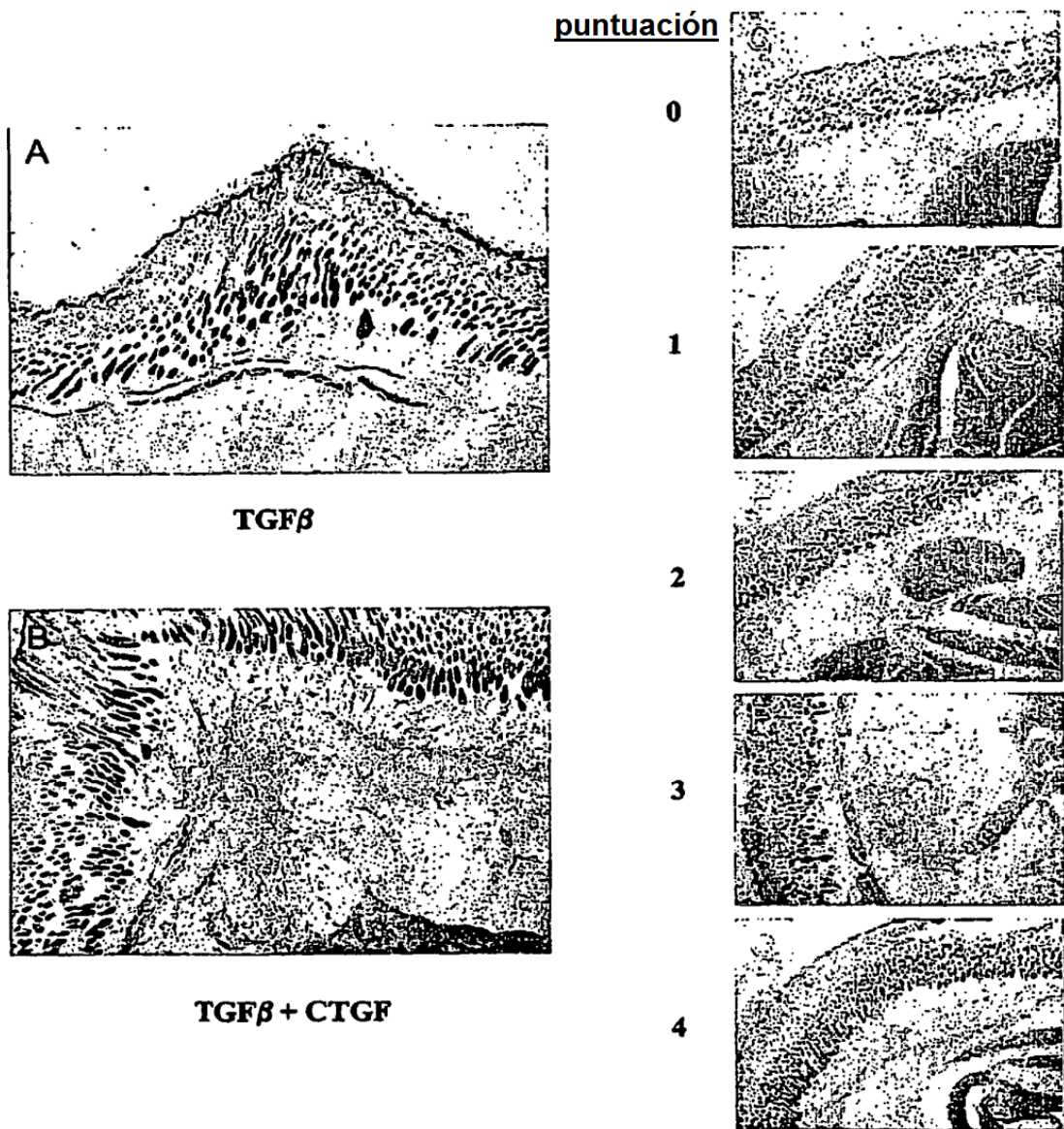


Figura 8

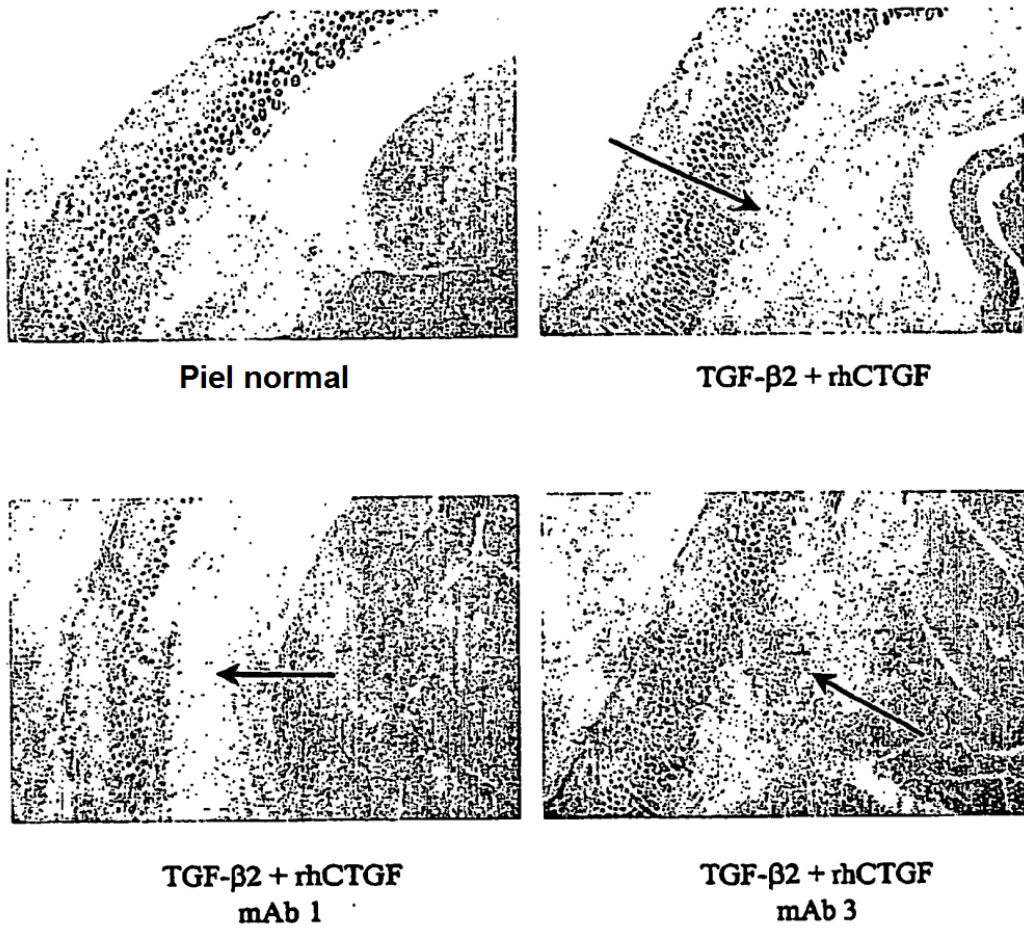


Figura 9

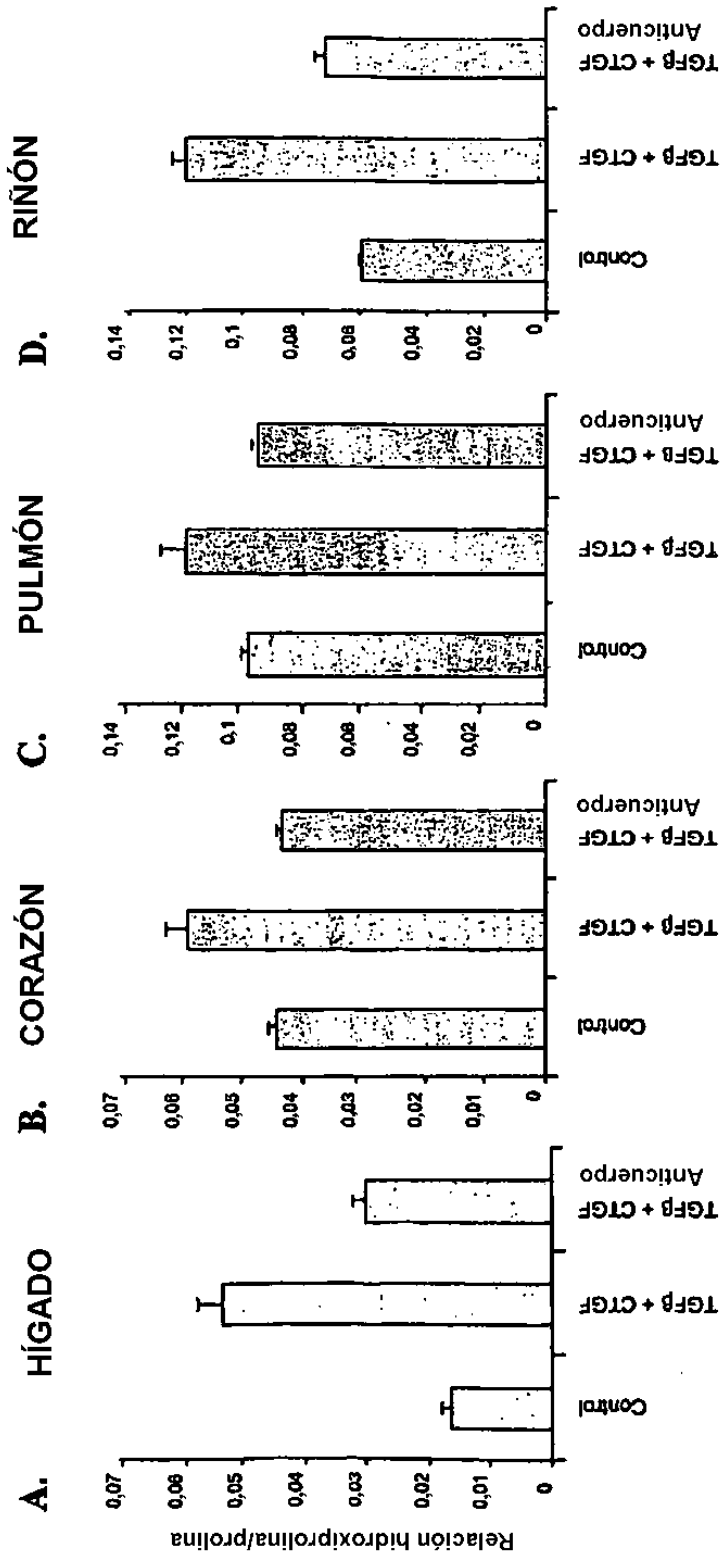


Figura 10

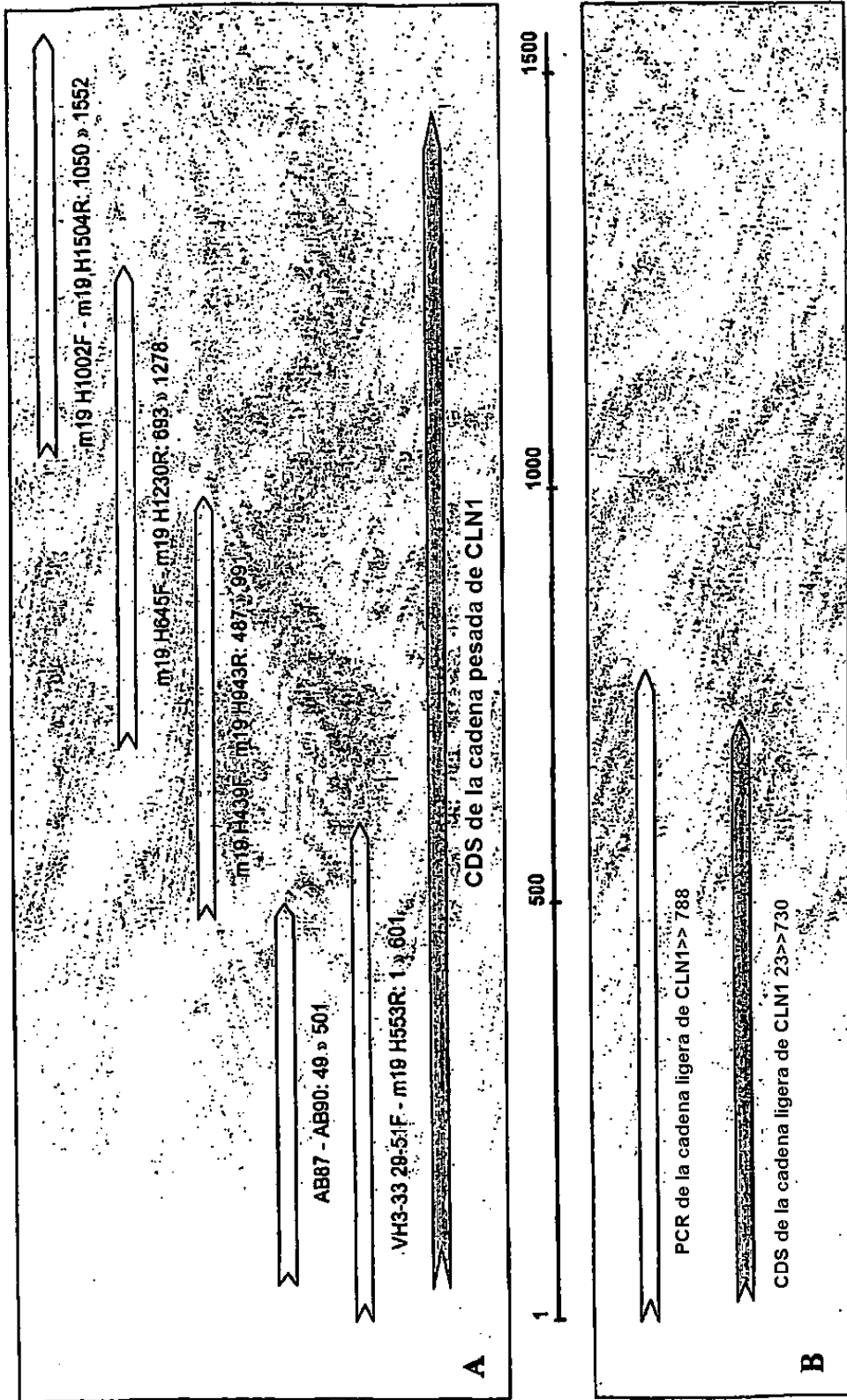
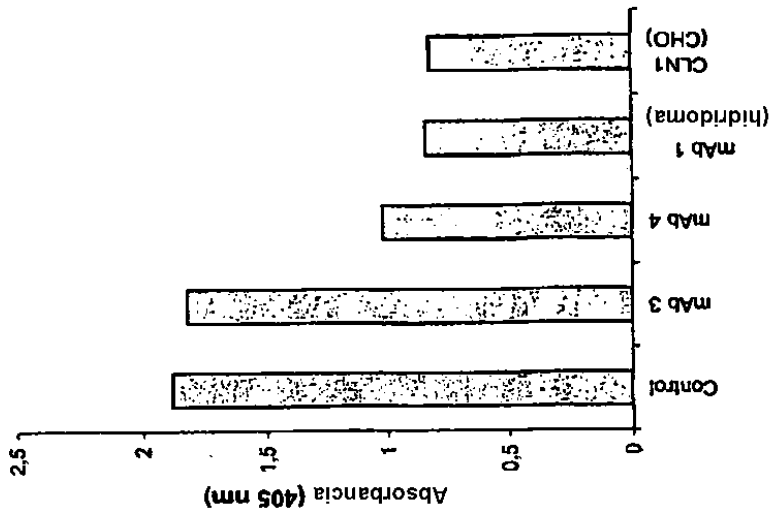
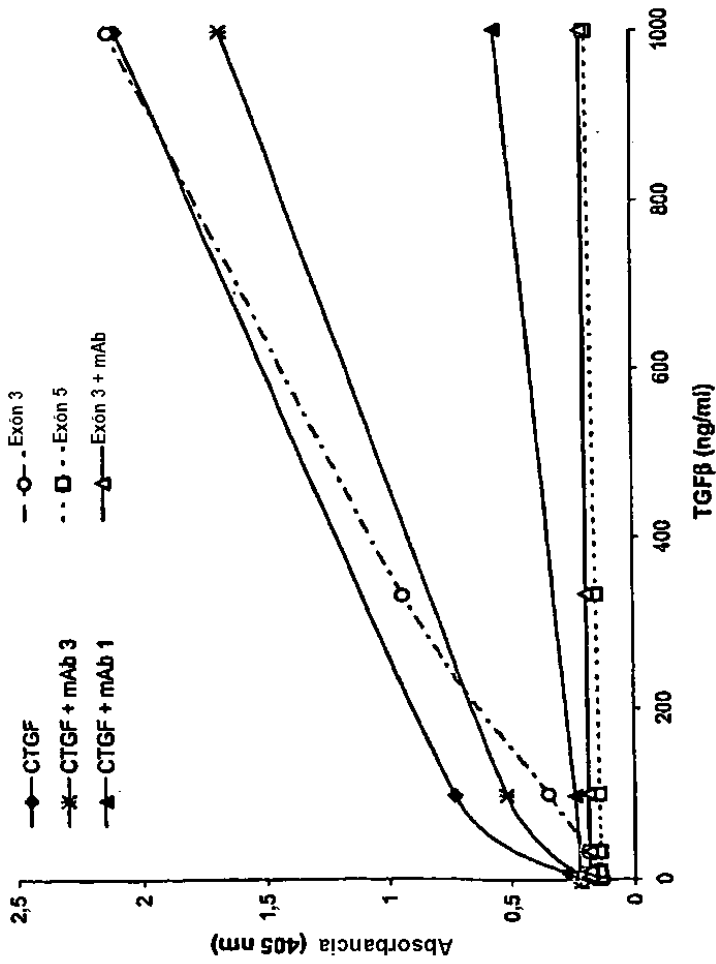


Figura 11



B.



A.

Figura 12