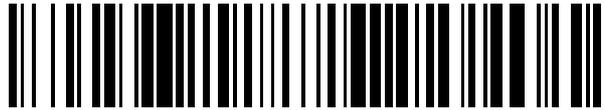


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 055**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2005 E 05736701 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2013 EP 1737891**

54 Título: **Anticuerpos anti-P-selectina**

30 Prioridad:

13.04.2004 EP 04008722

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.05.2013

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**GRAUS, YVO;
HIMBER, JACQUES;
JANSEN-MOLENAAR, MIRANDA;
KLING, DOROTHEE;
KOPETZKY, ERHARD;
PARREN, PAUL;
REBERS, FRANK;
STEINER, BEAT;
STERN, ANNE;
STREIN, PAMELA;
STUBENRAUCH, KAY-GUNNAR;
VAN DE WINKEL, JAN y
VAN VUGT, MARTINE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 403 055 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 anti-P-selectina

El invento se refiere a un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, no se fija sobre el factor de complemento C1q y tampoco a receptores de Fc γ sobre células NK, que contiene una parte Fc derivada de un origen humano y se caracteriza porque dicho anticuerpo es un anticuerpo del subgrupo humano IgG4 en donde S228 se sustituye por P y L235 se sustituye por E, inhibiendo la adhesión de células HL60 similar a leucocitos a P-selectina purificada con un valor IC50 de 0,08 a 0,5 μ g/ml y por comprender las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 3 y las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio de cadena variable pesada definido por la SEQ ID NO: 4. Esta divulgación se refiere en general a anticuerpos anti-P-selectina y, en particular, a anticuerpos anti-P-selectina que no fijan el factor de complemento C1q. De preferencia, los anticuerpos descritos aquí son anticuerpos humanos o humanizados.

La P-selectina (CD62P, GMP-140, PADGEM, LECAM-3) es una proteína de 140 kDa que depende del calcio y fija hidratos de carbono y que se expresa en las superficies de plaquetas activadas y en el endotelio en respuesta a la trombina y otros agonistas (McEver y col., *J. Biol. Chem.* 270:11025 (1995); Varki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7390 (1994); Springer T.A., *Annu. Rev. Physiol.* 57:827 (1995)). En ambos tipos de células, la P-selectina se almacena en gránulos secretorios, es decir, gránulos α de plaquetas y cuerpos de Weibel-Palade de células endoteliales (McEver y col., *J. Clin. Invest.* 84:92 (1984)). Es una glucoproteína transmembrana de tipo I, que se compone de un dominio lectina con grupos NH₂ terminales, seguido de un dominio similar al EGF, nueve repeticiones cortas de consenso con homología con las proteínas reguladoras del complemento, un dominio transmembrana y una corta cola citoplásmica (Johnston y col., *Cell* 56:1033 (1989)). La estructura de la P-selectina es similar a la de otros dos representantes del grupo de la selectina, la E- y la L-selectina, que se expresan en células endoteliales activadas por citocina (E-selectina) o se expresan constitutivamente en la mayor parte de grupos de leucocitos (L-selectina).

Se sabe que todas las selectinas se fijan con poca afinidad sobre los oligosacáridos pequeños sialilados, fucosilados, por ejemplo el sialil-Lewis x (sLe^x; Foxall y col., *J. Cell. Biol.* 117:895 (1992); Varki, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 257:257 (1992)). La P- y la L-selectina, pero no la E-selectina, se fijan también sobre hidratos de carbono sulfatados concretos, por ejemplo el sulfato de heparina (véase una revisión en: McEver y Cummings, *J. Clin. Invest.* 100:S97 (1997)). Los ligandos de gran afinidad con la P-selectina son glucoproteínas similares a la mucina (McEver y col., *J. Biol. Chem.* 270:11025 (1995)), que constan de una estructura de polipéptido con racimos de O-glucanos sialilados. Un ligando sialomucina sobre el que se fija con preferencia la P-selectina es el ligando 1 de glucoproteína de P-selectina (PSGL-1, CD162), que normalmente se expresa como homodímero con dos subunidades unidas mediante un disulfuro de pesos moleculares relativos aproximadamente de 120 kDa con leucocitos circulantes. El punto de unión de la P-selectina se localiza en la parte del extremo de grupos terminales NH₂ del PSGL-1. Mediante la unión a este ligando, la P-selectina interviene en el rodamiento de los leucocitos sobre las plaquetas activadas y células endoteliales. El proceso de rodamiento reduce en gran manera la velocidad de movimiento de los leucocitos, lo cual es un requisito previo para la adhesión firme y posterior transmigración de los leucocitos al subendotelio pero también para la acumulación de leucocitos en los trombos.

Las investigaciones que utilizan ratones deficientes en P-selectina y anticuerpos que bloquean específicamente la P-selectina han puesto de manifiesto que la P-selectina interviene en la patofisiología de numerosas enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, incluida la lesión por isquemia/reperfusión (Winn y col., *J. Clin. Invest.* 92:2042 (1993); Massberg y col., *Blood* 92:507 (1998)). Además, existe una contribución clara de la P-selectina a las enfermedades cardiovasculares que tienen un componente inflamatorio, por ejemplo la aterosclerosis (Collins y col., *J. Exp. Med.* 191: 189 (2000); Johnson y col., *J. Clin. Invest.* 99:1037 (1997)), la restenosis (Manka y col., *Circulation* 103:1000 (2001); Bienvenu y col., *Circulation* 103:1128 (2001)) y la trombosis (Kumar y col., *Circulation* 99:1363 (1999); Andre y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13835 (2000); Blann y col., *Br. J. Haematol.* 108:191 (2000); Myers y col., *Thromb. Haemostasis* 85: 423 (2001). Evidentemente, la inhibición de la función de la P-selectina podría ser eficaz como terapia en varias enfermedades que implican la adherencia de los leucocitos al endotelio vascular o a las plaquetas (véase, p.ej. WO 93/06863, WO 94/25067).

En el estado de la técnica se han descrito los anticuerpos contra la P-selectina y se han investigado sus efectos antiinflamatorios y antitrombóticos. En la patente US-4.783.399 y el documento WO 93/06863 se describen anticuerpos monoclonales de ratón contra la P-selectina que reaccionan con plaquetas activadas. Geng J. G. y col. (*J. Biol. Chem.*, 266 (1991) 22313-22318) describen anticuerpos monoclonales de ratón que se fijan sobre el fragmento de aminoácidos (aa) de la P-selectina, que es el fragmento aa 60-75 (de Cis a Glu), realizando el recuento con arreglo a la secuencia Swiss-Prot P16109 que incluye la secuencia de señal. El documento WO 93/21956 se refiere a anticuerpos monoclonales de ratón contra la P-selectina y a anticuerpos humanizados del subgrupo IgG1 que compiten con un anticuerpo definido y se fijan en presencia del fragmento de la P-selectina (aa 60-75) y en ausencia de iones calcio.

La WO 94/25067 describe anticuerpos de anti-P-selectina monoclonales de ratón (anticuerpo de ratón PB 1.3 como se secreta mediante una línea celular designada acceso ATCC N° HB 1104) y anticuerpos humanizados frente a P-selectina. Ninguno de los anticuerpos monoclonales de ratón mencionados contra la P-selectina humana es útil para

el tratamiento de pacientes humanos. Actualmente se halla en fase de desarrollo preclínico un anticuerpo humanizado contra la P-selectina del subgrupo IgG1 humano, mencionado en el documento WO 93/21956 (www.mrctechnology.org).

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

- 5 La invención se refiere a anticuerpos caracterizados porque dichos anticuerpos fijan la P-selectina y no fija el factor de complemento C1q humano y tampoco el receptor Fcγ sobre células NK. Los anticuerpos del invento contienen una parte Fc derivada de origen humano, y se caracterizan porque estos anticuerpos son de la subclase humana IgG4 en donde S228 se sustituye por P y L235 se sustituye por E y por la inhibición de la adhesión de células HL60 leucocitarias a P-selectina purificada con un valor IC50 de 0,08 a 0,5 µg/ml y comprendiendo las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio variable de cadena ligera definido por la aminosecuencia SEQ ID n° 3 y las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio variable de cadena pesada definido por la SEQ ID n° 4.

10 Los anticuerpos de la invención contienen una parte Fc derivada de un origen humano. Estos anticuerpos son con preferencia anticuerpos humanizados o humanos. Los anticuerpos tienen propiedades nuevas y susceptibles de invención, que producen un beneficio a un paciente que sufra trastornos inflamatorios y trombóticos, que sufra en especial la enfermedad oclusiva de arterias periféricas (PAOD) y la isquemia crítica de extremidades (CLI).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

En la figura 1 se muestra que los anticuerpos de la invención inhiben la adhesión de las células HL60, similares a los leucocitos, sobre placas de microvaloración recubiertas con P-selectina purificada. Los anticuerpos mutados son mas potentes que el anticuerpo "original", no mutado.

- 20 En la figura 2 se representa la actividad inhibidora de los anticuerpos de la invención en los ensayos de roseteado para medir la adhesión de plaquetas activadas con trombina sobre las células HL60.

En las figuras 3a y 3b se representa la actividad cruzada de los anticuerpos de la invención con la P-selectina de rata y cinomóloga. Según la figura 3a, los anticuerpos anti-P-selectina no afectan la adhesión de las plaquetas de rata activadas con trombina sobre las células HL60, mientras que los anticuerpos anti-P-selectina policlonales disponibles comercialmente (Pharmingen 09361A) inhiben esta interacción. Según la figura 3b, los anticuerpos de la invención inhiben la adhesión de las plaquetas cinomólogas activadas sobre las células HL60.

25 En las figuras 4a-c se pone de manifiesto la selectividad de los anticuerpos de la P-selectina frente a la E- y la L-selectina mediante curvas representativas de la fijación sobre transfectantes de P-, E- y L-selectina. Los anticuerpos de la invención se fijan sobre células CHO de P-selectina, con valores EC₅₀ se sitúan en el margen de 0,01 a 0,07 µg/ml. Los valores EC₅₀ en células CHO de E-selectina y sobre células 300.19 de L-selectina se sitúan con preferencia por encima de los 100 µg/ml.

En la figura 5 se representa la actividad inhibidora de los anticuerpos de la invención en un sistema de flujo totalmente humano. Inhiben la adhesión de los leucocitos humanos a una monocapa de plaquetas de una manera dependiente de la concentración en una velocidad de cizallamiento de 65/s.

- 35 En la figura 6 se representa el efecto inhibidor de los anticuerpos de la invención en la adhesión de los leucocitos sobre las células endoteliales humanas que expresan la P-selectina. En la figura 6a se pone de manifiesto la inhibición total de la adhesión de leucocitos en % del control, en la figura 6b se pone de manifiesto de modo representativo el efecto inhibidor de uno de los anticuerpos en el número absoluto de diferentes subgrupos de leucocitos.

40 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

I. Definiciones

El término "P-selectina" indica una proteína de 140 kDa, expresada por plaquetas y células endoteliales humanas, según han descrito Hsu-Lin y col., J. Biol. Chem. 259: 9121 (1984), y Mc Ever y col., J. Clin. Invest. 84:92 (1989). Esta glucoproteína transmembrana de tipo I se compone de un dominio lectina con grupos NH₂ terminales, seguido por un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y nueve dominios de repetición de consenso. Está anclada en la membrana mediante un solo dominio transmembrana y contiene una pequeña cola citoplásmica. Se describen anticuerpos, que son capaces de inhibir una o varias actividades biológicas mediadas por la P-selectina, por ejemplo, su actividad inflamatoria o trombótica. Los anticuerpos se fijan sobre la P-selectina y actúan de modo que interfieren en la fijación de la P-selectina sobre su ligando.

50 El término "ligando de P-selectina" denota con preferencia el ligando de gran afinidad y biológicamente relevante de la P-selectina, por ejemplo el ligando glucoproteína-1 de P-selectina (PSGL-1), una glucoproteína similar a la mucina, descrita por Moore y col.; J. Cell. Biol. 118:2445 (1992), Sako y col., Cell 75:1179 (1993). El PSGL-1 es una proteína membrana de tipo I con un dominio extracelular rico en serinas, treoninas y prolinas, que incluye una serie de repeticiones decaméricas unidas a racimos de O-glucanos sialilados. Se expresa normalmente como

homodímero de dos subunidades unidas mediante un disulfuro, con pesos moleculares relativos aproximados de 120 kDa, por los leucocitos circulantes. El lugar de fijación de la P-selectina se localiza en la parte del extremo con grupos terminales NH₂ del PSGL-1. Recientemente se ha demostrado que la sialomucina GPIIb que se expresa por las plaquetas y tiene semejanzas estructurales con el PSGL-1 es un ligando plaquetario para la P-selectina (Romo y col., J. Exp. Med. 190:803 (1999)). Las consecuencias fisiológicas de la fijación de la GPIIb sobre la P-selectina se hallan todavía en investigación, pero es probable que la interacción contribuya a la rodadura y adherencia de las plaquetas sobre las células endoteliales activadas (Berndt y col., Thromb. Haemost. 86:178 (2001)). La P-selectina se fija también con poca afinidad sobre oligosacáridos pequeños, sialilados, fucosilados, por ejemplo el sialil-Lewis x (Foxall y col., J. Cell. Biol. 117:895 (1992), Varki, Curr. Opin. Cell. Biol. 257 (1992) y sobre hidratos de carbono sulfatados concretos, por ejemplo el sulfato de heparina (McEver y col., J. Biol. Chem. 270:11025 (1995)).

El término "anticuerpo" abarca las distintas formas de anticuerpos, con preferencia los anticuerpos monoclonales que incluyen, pero no se limitan a anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos de ingeniería genética (anticuerpos variantes o mutantes), en el supuesto de que se mantengan las propiedades características según la invención. Son preferidos en especial los anticuerpos monoclonales humanos o humanizados, sobre todo en forma de anticuerpos humanos recombinantes.

Los términos "anticuerpo monoclonal" y "composición de anticuerpos monoclonales" utilizados en la presente invención se refieren a la obtención de moléculas de anticuerpo de una sola composición de aminoácidos.

El término "anticuerpo quimérico" denota un anticuerpo monoclonal que contiene una región variable, es decir, una región de fijación, de una fuente o especie y por lo menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, obtenida por lo general mediante técnicas de DNA recombinante. Son preferidos en especial los anticuerpos quiméricos que contienen una región variable murina y una región constante humana. Dichos anticuerpos quiméricos murino/humanos son el producto de los genes de inmunoglobulina expresados que contienen segmentos de DNA que codifican regiones variables de inmunoglobulina murina y segmentos de DNA que codifican regiones constantes de inmunoglobulina humana. Otras formas de "anticuerpos quiméricos" contemplados por la presente invención son aquellas en las que la región constante se ha modificado o cambiado con respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades según la invención, en especial en lo que respecta a la fijación del C1q y/o a la fijación del receptor Fc (FcR). Tales anticuerpos "quiméricos" se denominan también "anticuerpos desviados de grupo" (class-switched antibodies). Los métodos para la obtención de anticuerpos quiméricos incluyen las técnicas convencionales de DNA recombinante y de transfección genética, que son bien conocidas en la técnica anterior. Véase, p.ej. Morrison, S.L., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; patentes US-5,202,238 y 5,204,244.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que se han modificado el armazón o las "regiones que determinan la complementariedad" (CDR) para abarcar la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente si se compara con la de la inmunoglobulina original. En una forma preferida de ejecución se injerta una CDR murina en la región de armazón de un anticuerpo humano para obtener el "anticuerpo humanizado". Véase, p.ej. Riechmann, L. y col., Nature 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M.S. y col., Nature 314 (1985) 268-270. Las CDR especialmente preferidas corresponden a aquellas que representan secuencias que reconocen los antígenos mencionados anteriormente de los anticuerpos quiméricos y bifuncionales. Otras formas de "anticuerpo humanizados" contempladas aquí son aquellas en las que la región constante del anticuerpo original se ha modificado o cambiado para generar las propiedades aquí descritas, en especial en lo tocante a la fijación del C1q y/o a la fijación del receptor Fc (FcR).

El término "anticuerpo humano", utilizado en la descripción, tiene un significado que incluye anticuerpos provistos de regiones variables y constantes, derivados de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk y van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368 (2001)). Los anticuerpos humanos pueden producirse también en animales transgénicos (p.ej. ratones) que sean capaces, después de la inmunización, de producir el repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de la producción endógena de inmunoglobulina. La transferencia del conjunto genético de la inmunoglobulina de línea germinal humana a dichos ratones mutantes de línea germinal se traducirá en la producción de anticuerpos humanos después del reto de los antígenos (véase, p.ej. Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551-2555 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann y col., Year in Immuno., 7:33 (1993)). Los anticuerpos humanos pueden producirse también en bibliotecas de despliegue de fagos (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1992); Marks y col., J. Mol. Biol., 222:581 (1999)). Se dispone además de las técnicas de Cole y col. y de Boerner y col. para la obtención de anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., Anticuerpos monoclonales y terapia del cáncer, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner y col., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)). Tal como se ha mencionado antes a raíz de los anticuerpos quiméricos y humanizados aquí descritos, el término "anticuerpo humano" empleado en la descripción abarca también a los anticuerpos modificados en su región constante para generar las propiedades aquí descritas, en especial en lo tocan a la fijación del C1q y/o a la fijación del FcR. Se describen además anticuerpos humanos que se fijan sobre el C1q y/o el FcR. Tales anticuerpos humanos se caracterizan por una gran selectividad con la P-selectina si se compara con la E- y la L-selectina. Tales anticuerpos según la invención se fijan sobre las células que expresan la P-selectina con valores de EC₅₀ comprendidos entre 0,01 y 0,07 µg/ml. Los valores de EC₅₀ en las células que expresan la E-selectina y la L-

selectina se sitúan con preferencia por encima de los 100 µg/ml. Tales anticuerpos son útiles con preferencia como productos intermedios de la obtención de anticuerpos humanos provistos de propiedades aquí descritas.

El término "anticuerpo humano recombinante", utilizado en esta descripción, tiene un significado que incluye todos los anticuerpos humanos que se obtienen, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, por ejemplo los anticuerpos aislados de una célula hospedante, como pueda ser una célula NS0 o CHO o de un animal (p.ej. un ratón) que sea transgénico para los genes de inmunoglobulina humana o los anticuerpos expresados empleando un vector de expresión recombinante transfectado a la célula hospedante. Tales anticuerpos recombinantes humanos tienen regiones variables y constantes en una forma preestablecida. Los anticuerpos recombinantes humanos según la invención se han sometido a una hipermutación somática "in vivo". Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, a pesar de derivarse de y guardar relación con las secuencias VH y VL de la línea germinal humana, no pueden existir de forma natural "in vivo" dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos.

La "región variable" (región variable de una cadena ligera (VL), región variable de una cadena pesada (VH)), tal como se utilizan en esta descripción, denota cada una de las cadenas ligera y pesada que intervienen directamente en la fijación del anticuerpo sobre el antígeno. Los dominios de las cadenas ligera y pesada humanas variables tienen la misma estructura general y cada dominio consta de cuatro regiones de armazón (FR, framework) cuyas secuencias se conservan ampliamente, conectadas a tres "regiones hipervariables" (o regiones que determinan la complementariedad, CDR). Las regiones de armazón adoptan una conformación de lámina β y las CDR pueden formar bucles que conecten con la estructura de lámina β. Las CDR de cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional gracias a las regiones de armazón y junto con las CDR de la otra cadena forma un sitio de fijación de antígeno. Las regiones CDR3 de cadena ligera y pesada de anticuerpo desempeñan un papel especialmente importante en la especificidad/afinidad de fijación de los anticuerpos aquí descritas y por ello constituyen otro objeto aquí descrito.

El términos "región hipervariable" o "porción de un anticuerpo que fija un antígeno", utilizados en esta descripción, significan los restos aminoácido de un anticuerpo que hacen viable la fijación del antígeno. La región hipervariable comprende los restos aminoácido de las "regiones que determinan la complementariedad" o "CDR". Las regiones de "armazón" o "FR" son aquellas regiones de dominio variable, diferentes de los restos de región hipervariable definidos en esta descripción. Por lo tanto, las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo constan, desde el extremo N al C, de los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. En especial, el dominio CDR3 de la cadena pesada es la región que más contribuye a la fijación del antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan con arreglo a la definición estándar de Kabat y col. (Secuencias de proteínas de interés inmunológico, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable".

El término "ácido nucleico o molécula de ácido nucleico", utilizado en esta descripción, tiene un significado que incluye las moléculas de DNA y las moléculas de RNA. Una molécula de ácido nucleico puede tener forma mono- o bicatenaria, pero el DNA tiene con preferencia una forma bicatenaria.

Ácido nucleico está "unido operativamente" cuando guarda una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el DNA de una presecuencia o guía secretorio está unido operativamente al DNA de un polipéptido si se expresa como preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador está unido operativamente a una secuencia codificadora si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión de un ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificadora si está posicionado de modo que facilita la traducción. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de DNA que están unidas son contiguas y, en el caso de una guía secretorio, son contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los intensificadores no tienen que estar contiguos. La unión se lleva a cabo por ligación en los sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, entonces se utiliza adaptadores o engarces de oligonucleótidos sintéticos con arreglo a la práctica convencional.

Tal como se utilizan en esta descripción, las expresiones "célula," "línea celular" y "cultivo celular" se emplean indistintamente y todas estas denominaciones incluye la progenie. De este modo, los términos "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula objeto primaria y los cultivos derivados de la misma, con independencia del número de transferencias. Se da también por supuesto que toda la progenie puede que no sea exactamente idéntica en cuanto al contenido del DNA, debido a las mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie variante que tiene la misma función o la misma actividad biológica que se ha explorado en la célula transformada original. Cuando se emplean denominaciones distintas, su significado resultará claro gracias al contexto.

Los "dominios constantes" no participan directamente en la fijación de un anticuerpo sobre un antígeno, pero despliegan diversas funciones efectoras. En función de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se dividen en los grupos siguientes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de ellos pueden dividirse a su vez en subgrupos (isotipos), p.ej. IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a los diferentes grupos de inmunoglobulinas se denominan α, β, ε, γ md g y μ, respectivamente. Los anticuerpos según la invención son con preferencia del tipo IgG.

La parte Fc de un anticuerpo interviene directamente en la activación del complemento, la fijación del C1q y la fijación del receptor Fc. La influencia de un anticuerpo en el sistema de complemento depende de ciertas condiciones, mientras que la fijación sobre el C1q es provocada por sitios de fijación definidos de la parte Fc. Estos sitios de fijación ya son conocidos en el estado de la técnica y se describen p.ej. en Boakle y col., Nature 282 (1975) 742-743, Lukas y col., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560, Brunhouse y Cebra, Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917, Burton y col., Nature 288 (1980) 338-344, Thommesen y col., Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004, Idusogie y col., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184, Hezareh y col., J. Virology 75 (2001) 12161-12168, Morgan y col., Immunology 86 (1995) 319-324, EP 0307434. Dichos sitios de fijación son p.ej. L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (la numeración se realiza con arreglo al índice EU de Kabat, ver más abajo). Los anticuerpos de los subgrupos IgG1, IgG2 e IgG3 presentan por lo general activación del complemento y fijación del C1q y C3, mientras que el IgG4 no activa el sistema del complemento y no fija al C1q ni al C3. Tal como se emplea en esta descripción, el término "parte Fc derivada de origen humano" significa una parte Fc que es una parte Fc de un anticuerpo humano del subgrupo IgG4 o una parte Fc de un anticuerpo humano de los subgrupos IgG1, IgG2 o IgG3 que se ha modificado de manera que no puede detectarse una fijación de C1q ni fijación de FcR definidas a continuación. Un "parte Fc de un anticuerpo" es un término bien conocido de los expertos en la materia y que se define en base a la rotura de anticuerpos con papaína. Los anticuerpos según la invención contienen como parte Fc una parte Fc derivada de un origen humano y con preferencia las partes restantes de regiones constantes humanas. La parte Fc es con preferencia una parte Fc humana y de forma especialmente preferida es de un subgrupo IgG4 humano. De forma muy especialmente preferida, las partes Fc y las regiones constantes de cadena pesada son las representadas en la SEQ ID NO: 28.

II. Formas de ejecución preferidas de la invención

El anticuerpo de conformidad con el invento se caracteriza de preferencia porque la secuencia CDR3 de aminoácidos de cadena pesada variable de dicho anticuerpo es la secuencia CDR3 de cadena pesada SEQ ID NO: 39.

El anticuerpo de conformidad con el invento se caracteriza de preferencia porque consta de una cadena pesada variable y una cadena ligera variable, caracterizado porque la cadena pesada variable contiene las secuencias CDR siguientes: CDR1, CDR2 y CDR3 y la CDR1 es la SEQ ID NO: 30; la CDR2 es la SEQ ID NO: 34 y la CDR3 es la SEQ ID NO: 39; dichas CDR se eligen con independencia entre sí.

El anticuerpo según la invención está caracterizado con preferencia porque la cadena ligera variable contiene las secuencias CDR siguientes: CDR1, CDR2 y CDR3; y la CDR1 es la SEQ ID NO: 43; la CDR2 es la SEQ ID NO: 45; y la CDR3 es la SEQ ID NO: 48; dichas CDR se eligen con independencia entre sí.

El anticuerpo está caracterizado con preferencia porque, como CDR de cadena pesada, contiene las CDR de la SEQ ID NO: 4 y como CDR de cadena ligera contiene las CDR de la SEQ ID NO: 3.

Las secuencias CDR pueden determinarse con arreglo a la definición estándar de Kabat y col., Secuencias de proteínas de interés inmunológico, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Las CDR de cada cadena están separadas por los aminoácidos de armazón. Las CDR de las SEQ ID NO: 1-22 se muestran en las SEQ ID NO: 29-52.

El anticuerpo según la invención está caracterizado con preferencia porque dicho anticuerpo fija la P-selectina y consta de una región pesada y una ligera variables elegidas entre el dominio variable de cadena pesada definido por la secuencia de aminoácidos SQ ID NO: 4 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 3. Asimismo se describen anticuerpos caracterizados porque estos anticuerpos fijan la P-selectina y comprenden una región de cadena pesada y ligera variable elegida independientemente del grupo constituido por

a) el dominio variable de cadena pesada definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 1;

b) el dominio variable de cadena pesada definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 5;

c) el dominio variable de cadena pesada definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 7;

d) el dominio variable de cadena pesada definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 9;

e) el dominio variable de cadena pesada definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 11;

f) el dominio variable de cadena pesada definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 13;

g) el dominio variable de cadena pesada definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 15;

h) el dominio variable de cadena pesada definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 17;

5 i) el dominio variable de cadena pesada definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 19; y

j) el dominio variable de cadena pesada definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 21.

10 El anticuerpo según la invención está caracterizado con preferencia porque la región variable de cadena pesada contiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

El anticuerpo según la invención está caracterizado con preferencia porque la región variable de cadena ligera contiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

15 Se describen aquí anticuerpos que fijan la P-selectina y no fijan el factor de complemento C1q ni los receptores Fc. Estos anticuerpos no emanan la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) ni la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Este anticuerpo está caracterizado con preferencia porque fija la P-selectina, contiene una parte Fc derivada de un origen humano y no fija el factor de complemento C1q. Con mayor preferencia, estos anticuerpos son anticuerpos humanos o humanizados.

20 El anticuerpo aquí descrito está caracterizado con preferencia porque las cadenas constantes son de origen humano. Tales cadenas constantes son bien conocidas en el estado de la técnica y se describen p.ej. en Kabat (véase p.ej. Johnson, G. y Wu, T.T., Ácidos nucleicos Res. 28 (2000) 214-218). Por ejemplo, una región constante de cadena pesada humana útil contiene una secuencia de aminoácidos elegida con independencia entre el grupo formado por las SEQ ID NO: 28. Por ejemplo una región constante de cadena ligera humana útil contiene una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera kappa de la SEQ ID NO: 23.

25 Las funciones efectoras mediadas por la parte Fc de la región Fc del anticuerpo se refieren a las funciones efectoras que actúan después de la fijación de un anticuerpo sobre un antígeno (estas funciones incluyen la activación de la cascada del complemento y/o la activación celular por parte del receptor Fc (FcR)).

30 La función de la cascada del complemento puede evaluarse mediante un ensayo CH50. Se añaden glóbulos rojos de oveja, sensibilizados con anticuerpos anti-glóbulos rojos (EA), al suero de ensayo para activar el mecanismo clásico que provoca la hemólisis. El volumen de suero que se necesita para producir la lisis del 50 % de los glóbulos rojos constituye la unidad de CH50. El AP-CH50 mide los mecanismos alternativo y el terminal. El procedimiento es similar pero ahora se utilizan glóbulos rojos de conejo. El mecanismo alternativo se activa con la adición del suero de ensayo.

35 El C1q y dos proteasas de serina, C1r y C1s, forman el complejo C1, el primer componente del mecanismo de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Para activar la cascada del complemento, el C1q se fija por lo menos sobre dos moléculas de IgG1 o una molécula de IgM, unidas a la diana antigénica (Ward y Ghetie, Therapeutic Immunology 2:77-94 (1995)). Burton describe (Molec. Immunol., 22(3):161-206 (1985)) que la región de cadena pesada que contiene los restos de aminoácidos de 318 a 337 interviene en la fijación del complemento. Duncan y Winter (Nature 332:738-40 (1988)), aplicando una mutagénesis dirigida a un sitio, describen que el Glu318, Lis320 y Lis322 forman el sitio de fijación para el C1q. El papel que desempeñan los restos Glu318, Lis320
40 y Lis 322 en la fijación del C1q se confirma con la capacidad que tiene un péptido sintético corto, que contiene estos restos, de inhibir la lisis mediada por el complemento.

45 El término "citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" se refiere a la lisis de la P-selectina que se expresa en células endoteliales y plaquetas humanas por acción del anticuerpo según la invención en presencia del complemento. La CDC se mide con preferencia tratando la P-selectina que se expresa en células endoteliales y plaquetas humanas con un anticuerpo según la invención en presencia del complemento. Las células se marcan preferentemente con calceína. Se observa CDC si el anticuerpo induce la lisis del 20% o más de las células diana en una concentración de 30 µg/ml. Sin embargo, se ha encontrado que para las propiedades de los anticuerpos aquí descritos es esencial una fijación reducida sobre el factor de complemento C1q en un ensayo ELISA. En tal ensayo se recubre en principio una placa ELISA con una serie de concentraciones del anticuerpo, al que se ha añadido C1q
50 humano purificado o suero humano. La fijación del C1q se detecta mediante un anticuerpo dirigido contra el C1q y después mediante un conjugado marcado con peroxidasa. La detección de la fijación (fijación máxima: Bmax) se mide en forma de densidad óptica a 405 nm (OD405) para el sustrato ABTS (2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato (6)] de peroxidasa. La presente invención se refiere, pues, a un anticuerpo caracterizado porque la no fijación del anticuerpo sobre el factor de complemento C1q se refiere a la medición mediante ensayo ELISA, en el que la fijación máxima (Bmax) del C1q sobre el anticuerpo en una concentración de 10 µg/ml del anticuerpo es ≤ 30% de la Bmax del anticuerpo LC 1004-002 de la línea celular hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC2641), con preferencia es un 20% o menos.
55

Es preferido además que un anticuerpo aquí descrito tenga una fijación reducida sobre el factor de complemento C3 en un ensayo ELISA. Este ensayo se lleva a cabo de igual manera que el ensayo del C1q. En tal ensayo, en principio se recubre la placa ELISA con una serie de concentraciones del anticuerpo, al que se añade C3 humano purificado o suero humano. La fijación del C3 se detecta mediante un anticuerpo dirigido contra el C3 y después con un conjugado marcado con peroxidasa. La detección de la fijación (fijación máxima: Bmax) se mide en forma de densidad óptica a 405 nm (OD405) para el sustrato ABTS (2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolinasulfonato (6)] de peroxidasa. La divulgación se refiere, pues, a un anticuerpo caracterizado porque la no fijación del anticuerpo al factor de complemento C3 se refiere a una medición mediante ensayo ELISA en el que la fijación máxima (Bmax) del C3 sobre el anticuerpo en una concentración de 10 µg/ml del anticuerpo es un 10% de la Bmax del anticuerpo LC 1004-002 de la línea celular hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC2641), con preferencia un 5% o menos.

El término "citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC)" es una función mediada por la fijación del receptor Fc y se refiere a la lisis de células diana en las que se expresa la P-selectina mediante un anticuerpo aquí descrito en presencia de las células efectoras. La ADCC se mide con preferencia tratando una preparación de células endoteliales en las que se expresa la P-selectina con un anticuerpo según la invención en presencia de células efectoras, por ejemplo células PBMC (células mononucleares de sangre periférica) recién aisladas o células efectoras purificadas de recubrimientos pulidos, como son los monocitos y las células asesinas naturales (NK, natural killer). Las células diana se marcan con Cr⁵¹ y seguidamente se incuban con los anticuerpos. Se incuban las células marcadas junto con células efectoras y se analiza el líquido sobrenadante para determinar el Cr⁵¹ liberado. Los controles incluyen la incubación de las células endoteliales diana con células efectoras, pero sin el anticuerpo. La capacidad de los anticuerpos de inducir las etapas iniciales que median la ADCC se determina midiendo su fijación sobre las células en las que se expresan los receptores Fcγ, por ejemplo los granulocitos (en los que se expresan el FcγRII y RIII), las células NK (en las que se expresan FcγRIII) y los monocitos (en los que se expresan el FcγRI y RII).

Las funciones efectoras de fijación del receptor Fc pueden mediarse con la interacción de la región Fc de un anticuerpo con receptores Fc (FcR), que son receptores de superficie especializados en células hematopoyéticas. Los receptores Fc pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se ha constatado que intervienen tanto en la eliminación de patógenos recubiertos con anticuerpos por fagocitosis de complejos inmunes, como en la lisis de eritrocitos y diversas dianas celulares más (p.ej. células tumorales) recubiertos con los anticuerpos correspondiente, gracias a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), véase Van de Winkel y Anderson, *J. Leuk. Biol.* 49:511-24 (1991). Los FcR se definen por su especificidad para los isotipos de inmunoglobulina; los receptores Fc de los anticuerpos IgG anticuerpos se denominan FcγR, de los IgE se llaman FcεR, de los IgA se llaman FcαR, etcétera. La fijación del receptor Fc se describe p.ej. en Ravetch y Kinet, *Ann. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492, Capel y col., *Immunomethods* 4 (1994) 32-34, de Has y col., *J. Lab. Clin. Med.* 126 (1995) 330-341 y Gessner y col., *Ann. Hematol.* 76 (1998) 231-248. Los anticuerpos aquí descritos presentan con preferencia una fijación reducida sobre los receptores Fcγ, con preferencia sobre los FcγRI, -IIA, -IIB y/o IIIA.

Los anticuerpos aquí descritos no despliegan con preferencia función efectora alguna y no se fijan sobre el FcγR existente en las células NK. El término "no fijación del FcγR" significa, pues, que en una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml la fijación de un anticuerpo según la invención sobre células NK es del 1% o menos con respecto a la fijación observada para el anticuerpo LC 1004-002 de la línea celular hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC2641).

El IgG4 muestra una fijación reducida al FcR, pero los anticuerpos de otros subgrupos IgG despliegan una fijación fuerte. Sin embargo, los restos Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida de hidrato de carbono de Fc), Pro329 y 234, 235, 236 y 237, Ile253, Ser254, Lis288, Thr307, Gln311, Asn434 e His435 son restos que, si se alteran, proporcionan también una fijación reducida sobre el FcR (Shields y col., *J. Biol. Chem.* 276 (2001), 6591-6604, Lund y col., *FASEB J.* 9 (1995), 115-119, Morgan y col., *Immunology* 86 (1995) 319-324, EP 0307434). Un anticuerpo aquí descrito es con preferencia, en lo que respecta a la fijación sobre el FcR, del subgrupo IgG4 con una mutación en S228 y/o L235. Son especialmente preferidas las mutaciones S228P (IgG4) y/o L235E (IgG4). En la tabla 1 se muestran también las combinaciones preferidas de mutaciones.

El término "fijación sobre la P-selectina" empleado en esta descripción indica la fijación del anticuerpo sobre la P-selectina ya sea en un ensayo BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Upsala, Suecia), ya sea en un ensayo ELISA en el que las placas de microvaloración se recubren con P-selectina purificada o con transfectantes CHO de P-selectina.

En el ensayo BIAcore se fija el anticuerpo sobre una superficie y se mide la fijación de la P-selectina mediante una Surface Plasmon Resonance (SPR). La afinidad de la fijación se define en términos k_a (constante de la asociación del anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno), k_d (constante de disociación) y K_D (k_d/k_a). Los anticuerpos aquí descritos poseen un valor K_D de 10^{-8} o menos, con preferencia entre 10^{-11} y 10^{-9} M (ver ejemplos). La presente invención se refiere, pues, a un anticuerpo ya descrito anteriormente, dicho anticuerpo se fija sobre la P-selectina con un valor K_D inferior a 10^{-8} M en un ensayo BIAcore, el valor K_D se sitúa con preferencia entre 10^{-11} y 10^{-9} M.

El anticuerpo es con preferencia de un subtipo IgG4 humano.

El anticuerpo está caracterizado con mayor preferencia porque ser un anticuerpo del subgrupo IgG4 humano, que lleva por lo menos una mutación en L235 y S228 (numeración con arreglo al índice EU).

5 En el ensayo ELISA específico de la P-selectina, se recubren con P-selectina purificada las placas de microvaloración y se detecta la fijación del anticuerpo sobre la P-selectina con un IgG biotinilado antihumano y las etapas usuales de un ELISA. Los valores de la EC₅₀ en este ensayo se sitúan con preferencia entre 0,002 y 0,03 µg/ml en células CHO de P-selectina, es decir, la presente invención se refiere a anticuerpos, cuyos valores EC₅₀ para la fijación sobre la P-selectina se sitúan en el margen comprendido entre 0,002 y 0,03 µg/ml en células CHO que presentan P-selectina en un ensayo ELISA. En un ensayo, en el que se recubren las placas de microvaloración con transfectantes CHO en los que se expresa la P-selectina, los valores de EC₅₀ se sitúan entre 0,01 y 0,08 µg/ml, con preferencia entre 0,01 y 0,04 µg/ml.

Los valores de EC₅₀ en los transfectantes de E- y L-selectina son con preferencia superiores a 100 µg/ml. Los anticuerpos de la invención están caracterizados porque se fijan por lo menos con una especificidad 1000 mayor sobre la P-selectina que sobre la E- y/o L-selectina en base a los valores EC₅₀ medidos en un ensayo ELISA, en el que las placas de microvaloración se recubren con P- y E- y/o L-selectina.

15 El término "inhibición de la fijación del ligando de la P-selectina sobre la P-selectina" empleado en esta descripción indica la fijación de la P-selectina purificada o expresada en células sobre su ligando, presente en células HL60. La fijación de la P-selectina sobre su ligando se inhibe mediante los anticuerpos aquí descritos. La inhibición se mide en forma de IC₅₀ en ensayos "in vitro" que analizan la capacidad del anticuerpo de inhibir la fijación de la P-selectina sobre un ligando. Tales ensayos se describen en los ejemplos. Como fuentes idóneas de P-selectina se emplean en los ejemplos la P-selectina purificada por afinidad y plaquetas activadas y como fuentes idóneas de ligando se emplean células de tipo leucocito, por ejemplo células HL60. En tales ensayos se mide la adhesión de las células HL60, en las que se expresa el PSGL-1 como ligando fisiológicamente relevante de la P-selectina, sobre la P-selectina o plaquetas activadas sin y con concentraciones crecientes del anticuerpo. Los valores IC₅₀ se determinan como valores promedio por lo menos de tres mediciones independientes. La inhibición significa un valor IC₅₀ no superior a 1 µg/ml, con preferencia entre 0,5 y 0,08 µg/ml.

Los anticuerpos aquí descritos inhiben la adhesión de células HL60 de tipo leucocito sobre la P-selectina purificada con valores IC₅₀ comprendidos entre 0,08 y 0,5 µg/ml, con preferencia entre 0,08 y 0,11 µg/ml. La adhesión de células HL60 de tipo leucocito sobre plaquetas activadas se inhibe con valores IC₅₀ comprendidos entre 0,05 y 0,3 µg/ml.

30 Otras formas de ejecución aquí descritas se refieren, pues, a anticuerpos caracterizados porque los valores EC₅₀ de la fijación de la P-selectina se sitúan entre 0,01 y 0,08 µg/ml en un ensayo ELISA en el que las placas de microvaloración se recubren con transfectantes CHO en los que se expresa la P-selectina. El margen preferido se sitúa entre 0,01 y 0,04 µg/ml. Los valores EC₅₀ en transfectantes de E- y L-selectina son mayores que 100 µg/ml. En otra forma de ejecución, los anticuerpos de la presente invención inhiben la adhesión de células HL60 de tipo leucocito sobre P-selectina purificada con valores IC₅₀ comprendidos entre 0,08 y 0,5 µg/ml. El intervalo preferido se sitúa entre 0,08 y 0,11 µg/ml.

Los anticuerpos aquí descritos inhiben la interacción de los leucocitos y una monocapa de plaquetas con preferencia en más del 70% en un sistema de flujo humano complejo (en una concentración de 10 µg/ml). Además, estos anticuerpos inhiben la adhesión de los leucocitos sobre células endoteliales activadas en un sistema de flujo humano en un orden del 60-90 % en una concentración de 3 µg/ml (con efectos diferentes según los subtipos de leucocitos).

40 Los anticuerpos aquí descritos son capaces con preferencia de fijarse sobre la P-selectina en presencia del fragmento aa 60-75 de P-selectina (Swiss-Prot secuencia P16109) y/o no inhiben competitivamente la fijación de un anticuerpo secretado por una línea celular designada con el número de entrada (accession) ATCC HB11041 sobre la P-selectina.

45 Los anticuerpos de la invención con preferencia no inhiben la interacción de la P-selectina la glucoproteína de membrana de plaqueta GPIb α en un formato de ensayo ELISA. En el ensayo ELISA, la glucocalicina, la porción extracelular soluble de la GPIb α está inmovilizada en los hoyos de las placas de microvaloración, tal como se ha descrito en Romo y col., J. Exp. Med. 190:803 (1999) y la fijación de la P-selectina purificada después de la preincubación con la P-selectina HuMabs se detecta con un anticuerpo anti-P-selectina policlonal.

50 En otra forma preferida de ejecución aquí descrita, el anticuerpo, caracterizado porque no fija la proteína C3, está caracterizado con mayor preferencia porque no despliega citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Además, el anticuerpo puede caracterizarse porque no se fija sobre los receptores Fc γ de las células efectoras NK. El anticuerpo está caracterizado porque es un anticuerpo del subgrupo IgG4 humano, que lleva por lo menos una mutación en los restos L235 y S228 (numeración con arreglo al índice EU). En otra forma preferida de ejecución, el anticuerpo está caracterizado porque no despliega citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC).

55 En otra forma incluso más preferida de ejecución, los anticuerpos aquí descritos están caracterizados porque fijan la P-selectina y porque llevan una región variable, que se elige con independencia entre el grupo formado por:

- a) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 2;
- b) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 4;
- 5 c) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 6;
- d) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 8;
- 10 e) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 10;
- f) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 12;
- g) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 14;
- 15 h) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 15 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 16;
- i) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 17 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 18;
- 20 j) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 19 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 20; y
- k) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 22.

Los anticuerpos contienen con preferencia el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia SEQ ID NO: 4.

- 25 Los anticuerpos preferidos están caracterizados porque los anticuerpos son del subgrupo IgG4 humano. Estos anticuerpos variantes llevan por ejemplo la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 28.

30 Un anticuerpo anti-P-selectina "variante" significa en este caso una molécula que difiere en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-P-selectina "original" en virtud de la adición, delección y/o sustitución de uno o varios restos de aminoácido en la secuencia del anticuerpo original. En la forma preferida de ejecución, la variante comprende una o varias sustituciones de aminoácidos en una o varias regiones variables o constantes del anticuerpo original, con preferencia en la región constante. Por ejemplo, la variante puede comprender por lo menos una, p.ej. de una a diez y con preferencia de dos a cinco sustituciones en una o varias regiones variables del anticuerpo original. Normalmente, la variante tendrá una secuencia de aminoácidos provista por lo menos de un 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias de dominio constante y/o variable del anticuerpo original, con mayor preferencia por lo menos un 95% y con preferencia especial por lo menos un 99%.

40 La identidad u homología con respecto a esta secuencia se defina en esta descripción como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos con los restos del anticuerpo original, después de alinear las secuencias e introducir brechas (gaps), si fuera necesario, para lograr el porcentaje máximo en la identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, delecciones o inserciones N-terminales, C-terminales o internas de la secuencia del anticuerpo debería diseñarse para afectar la identidad u homología de secuencias. La variante conserva la capacidad de fijar la P-selectina humana y tiene con preferencia propiedades, que son superiores a las del anticuerpo original. Por ejemplo, la variante puede tener una afinidad de fijación más fuerte, una capacidad mayor de tratar una enfermedad asociada con la isquemia crítica de extremidades o la enfermedad oclusiva de

45 arterias periféricas (CLI/PAOD).

El anticuerpo variante de interés especial en esta solicitud es un que despliega por lo menos una intensificación 4 veces mayor de la actividad inhibitora, si se compara con el anticuerpo original, debido a la eliminación de la fijación sobre los receptores Fcγ.

50 El anticuerpo "original" de esta descripción es uno que, se codifica mediante una secuencia de aminoácidos empleada para la preparación de la variante. El anticuerpo original tiene con preferencia una región de armazón humana y, si está presente, tiene regiones constantes de anticuerpo humano. Por ejemplo, el anticuerpo original puede ser un anticuerpo humano o humanizado.

- Los anticuerpos aquí descritos incluyen, además, aquellos anticuerpos que tienen "modificaciones de secuencias conservadoras", modificaciones de nucleótidos y de secuencia de aminoácidos, que no afectan ni alteran las características mencionadas anteriormente del anticuerpo según la invención. Las modificaciones pueden introducirse por métodos estándar ya conocidos en la técnica, por ejemplo la mutagénesis dirigida a un sitio y la mutagénesis mediada por la PCR. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen aquellas en las que se reemplaza el resto aminoácido por otro resto aminoácido que contiene una cadena lateral similar. En la técnica ya se han definido los grupos de restos de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estos grupos incluyen los aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas (p.ej. lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p.ej. ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p.ej. glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (p.ej. alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas en beta (p.ej. treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p.ej. tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un resto aminoácido no esencial previsto en un anticuerpo anti-P-selectina humano puede reemplazarse con preferencia por otro resto aminoácido del mismo grupo de cadenas laterales.
- 15 Las sustituciones de aminoácidos pueden llevarse a cabo con preferencia por mutagénesis basada en un modelado molecular, descrito por Riechmann, L. y col., Nature 332 (1988) 323-327 y Queen, C. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033.

En otra forma preferida de ejecución, los anticuerpos contienen una región constante de cadena ligera κ como la definida en la SEQ ID NO: 23.

- 20 Los anticuerpos preferidos según la invención son anticuerpos definidos como IgG4v1 (S228P; L235E).

En otra forma preferida de ejecución, estos anticuerpos contienen además fragmentos de anticuerpo seleccionados entre el grupo formado por Fab, F(ab')₂ y fragmentos de cadena simple.

- 25 La invención se refiere además a un método para la producción de un anticuerpo aquí descrito que consiste en las etapas siguientes: a) transformar una célula hospedante con una primera secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de un anticuerpo humano original aquí descrito y una segunda secuencia de DNA que codifica una cadena pesada de dicho anticuerpo humano original, en el que la parte Fc se modifica en el sentido de que dicha parte Fc no fija el factor de complemento C1q ni el receptor Fc; b) expresar dichas secuencias primera y segunda de DNA de modo que se produzcan dichas cadenas ligera y pesada de anticuerpo y c) recuperar dicho anticuerpo de la célula hospedante o del cultivo de células hospedantes.

- 30 La invención se refiere también a anticuerpos intermedios, es decir, anticuerpos anti-P-selectina caracterizados porque estos anticuerpos son anticuerpos humanos o humanizados y se fijan sobre la P-selectina con una especificidad por lo menos 1000 veces mayor que sobre la E- o la L-selectina, según mediciones efectuadas en ensayo ELISA, en el que las placas de microvaloración se recubren con P- y E- y/o L-selectina. Estos anticuerpos son con preferencia anticuerpos IgG4. Estos anticuerpos son con preferencia los anticuerpos producidos mediante una línea celular hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC2641).

- 40 Los anticuerpos aquí descritos incluyen además aquellos anticuerpos que tienen "modificaciones de secuencias conservadoras", modificaciones de nucleótidos y de secuencia de aminoácidos, que no afectan ni alteran las características mencionadas anteriormente del anticuerpo aquí descritos. Las modificaciones por métodos estándar ya son conocidas en la técnica, por ejemplo la mutagénesis dirigida a un sitio y la mutagénesis mediada por la PCR. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen aquellas en las que se reemplaza el resto aminoácido por otro resto aminoácido que contiene una cadena lateral similar. En la técnica ya se han definido los grupos de restos de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estos grupos incluyen los aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas (p.ej. lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p.ej. ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p.ej. glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (p.ej. alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas en beta (p.ej. treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p.ej. tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un resto aminoácido no esencial previsto en un anticuerpo anti-P-selectina humano puede reemplazarse con preferencia por otro resto aminoácido del mismo grupo de cadenas laterales.

- 50 Las sustituciones de aminoácidos pueden llevarse a cabo con preferencia por mutagénesis basada en un modelado molecular, descrito por Riechmann, L. y col., Nature 332 (1988) 323-327 y Queen, C. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033.

- 55 La divulgación comprende además moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo mencionado anteriormente, los vectores correspondientes que contienen estos ácidos nucleicos y la correspondiente célula hospedante para estos vectores. La descripción abarca un método para la obtención de los anticuerpos que consiste en cultivar las correspondientes células hospedantes en condiciones que permitan la síntesis de dichas moléculas de anticuerpo y en recuperar dichos anticuerpos de dicho cultivo, p.ej. expresando un ácido nucleico que codifica

una cadena pesada y un ácido nucleico que codifica una cadena ligera en una célula hospedante procariótica o eucariótica y recuperando dicho polipéptido de dicha célula.

Se contemplan los usos diagnóstico y terapéutico del anticuerpo. En una aplicación diagnóstica, la invención proporciona un método para determinar la presencia de la proteína P-selectina que consiste en exponer una muestra, de la que se sospecha que contiene P-selectina, a un anticuerpo anti-P-selectina y en determinar la fijación del anticuerpo sobre la muestra. Para este uso, la invención proporciona un kit que contiene el anticuerpo e instrucciones de uso del anticuerpo para detectar la proteína P-selectina.

Los anticuerpos aquí descritos son útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y trombóticas. Tales enfermedades incluyen los trastornos vasculares, por ejemplo la aterosclerosis, las trombosis arteriales, las trombosis de venas profundas, la restenosis después de una angioplastia o colocación de un catéter. Las aplicaciones preferidas son la enfermedad oclusiva de arterias periféricas (PAOD) y la isquemia crítica de extremidades (CLI). Otras aplicaciones son el tratamiento de lesiones post-isquémicas de tejidos, mediadas por leucocitos, provocadas por infartos de miocardio, episodios isquémicos cerebrales (p.ej. apoplejía), el infarto renal y similares. Los anticuerpos son idóneos además para el tratamiento de la sepsis, de la lesión pulmonar aguda, mediada por leucocitos, y las reacciones alérgicas, por ejemplo el asma. Otras aplicaciones son la prevención del rechazo de órganos trasplantados y las enfermedades autoinmunes, incluida la artritis reumatoide. Con la inhibición de la adhesión de las células cancerosas en circulación puede prevenirse además la metástasis de tumores.

La divulgación describe los anteriores anticuerpos para uso en un método para el tratamiento de mamíferos que sufren los trastornos inflamatorios y trombóticos recién mencionados, en especial la PAOD y la CLI (enfermedad oclusiva de arterias periféricas e isquemia crítica de extremidades, respectivamente).

La invención proporciona además el uso de los anticuerpos anteriores para la terapia, p.ej. para la fabricación de medicamentos destinados al tratamiento de estas enfermedades.

La invención se refiere también al uso de los anticuerpos definidos anteriormente para la fabricación de una composición farmacéutica y comprende una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo aquí descrito en una cantidad farmacéuticamente eficaz, opcionalmente junto con un tampón y/o un adyuvante útil para la formulación de anticuerpos para fines farmacéuticos.

Se describen también composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos en un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una forma de ejecución, la composición farmacéutica puede incluirse en un artículo de fabricación o kit.

La revelación proporciona líneas celulares de hibridoma, que producen tales anticuerpos monoclonales antagonistas, p.ej. los anticuerpos originales, según la invención.

La línea celular preferidas de hibridoma aquí descrita, hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (anticuerpo HuMab 002) se depositó con arreglo al Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos, para los fines del procedimiento de patente en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ), Alemania.

Línea celular	nº depósito	fecha depósito
hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002	DSM ACC2641	30.03.2004

Los anticuerpos que pueden obtenerse a partir de dichas líneas celulares son formas de ejecución preferidas de la invención.

Los anticuerpos aquí revelados se producen con preferencia por medios recombinantes. Tales métodos son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y consisten en la expresión de la proteína en células procarióticas y eucarióticas y el posterior aislamiento del polipéptido del anticuerpo y normalmente en la purificación para obtener una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de la proteína se insertan ácidos nucleicos que codifican cadenas ligeras y pesadas o fragmentos de las mismas en vectores de expresión aplicando métodos estándar. La expresión se realiza en células hospedantes procarióticas o eucarióticas apropiadas del tipo células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, levadura o células de *E.coli* y se recupera el anticuerpo de las células (líquido sobrenadante o células después de la lisis).

La producción recombinante de anticuerpos es bien conocida en el estado de la técnica y se describe por ejemplo en los artículos de revisión de Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202; Geisse, S., y col., Proten Expr. Purif. 8 (1996) 271-282; Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-161; Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880.

Los anticuerpos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en forma parcialmente purificada o

sustancialmente pura. La purificación se realiza con el fin de eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, p.ej. otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, por técnicas estándar, incluido el tratamiento alcalino/SDS, la cromatografía de columna y otros bien conocidos de la técnica. Véase Ausubel, F. y col., coord., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York (1987).

- 5 La expresión en células NS0 se describe p.ej. en Barnes, L.M. y col., *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; y Barnes, L.M. y col., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. La expresión transitoria se describe p.ej. en Durocher, Y. y col., *Nucl. Acids Res.* 30 (2002) E9. La clonación de dominios variables se describe en Orlandi, R. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837; Carter, P. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; y Norderhaug, L. y col., *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87. Un sistema preferido de expresión transitoria (HEK 293) se describe en Schlaeger, E.-J. y Christensen, K., *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83 y en Schlaeger, E.-J., *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199.

Las secuencias de control que son idóneas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio para la fijación de ribosoma. Las células eucariotas se sabe que utilizan promotores, intensificadores y señales de poliadenilación.

- 15 El ácido nucleico está "unido operativamente" cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el DNA de una presecuencia o guía secretorio está unido operativamente al DNA de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador está unido operativamente a una secuencia codificadora si afecta la transcripción de tal secuencia; o un sitio de unión de ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificadora si está posicionado de forma que facilita la traducción. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de DNA que se van a unir son contiguas y, en el caso del guía secretorio, son contiguas y están dentro del marco de lectura. Sin embargo, los intensificadores no tienen que estar contiguos. La unión se lleva a cabo por ligación en los sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, entonces se emplearán adaptadores o engarces de oligonucleótidos sintéticos con arreglo a las prácticas convencionales.
- 20
- 25 Los anticuerpos monoclonales se separan de forma apropiada del medio de cultivo por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulina, por ejemplo, por proteína A-Sepharose, cromatografía a través de hidroxilapatita, electroforesis a través de gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El DNA y el RNA que codifican los anticuerpos monoclonales se aíslan fácilmente y se secuencian utilizando procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir de fuente de tales DNA y RNA. Una vez aislado, el DNA puede insertarse en
- 30 vectores de expresión, que seguidamente se transfectan a células hospedantes, por ejemplo células HEK 293, células CHO o células de mieloma que, de otro modo, no producirían la proteína inmunoglobulina para lograr la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células hospedantes.

- Las variantes (o mutantes) de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-P-selectina humano se preparan introduciendo cambios apropiados de nucleótidos en el DNA del anticuerpo o sintetizando nucleótidos. Sin embargo, tales modificaciones pueden llevarse a cabo solamente en un margen muy limitado, p.ej. el descrito anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características del anticuerpo mencionado anteriormente, por ejemplo la fijación del isotipo de IgG y del epítipo, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de la proteína o facilitar la purificación.
- 35

- Puede sustituirse también cualquier resto cisteína que no intervenga en el mantenimiento de la conformación correcta del anticuerpo anti-P-selectina, normalmente por serina, para mejorar la estabilidad a la oxidación de la molécula y prevenir reticulaciones aberrantes. También a la inversa, los enlaces de cisteína pueden añadirse al anticuerpo para mejorar su estabilidad (en particular cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo un fragmento Fv).
- 40

- Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo altera el modelo original de glucosilación del anticuerpo. Se entiende por alterar la delección de uno o varios restos hidrato de carbono existentes en el anticuerpo, y/o la adición de uno o varios sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glucosilación de anticuerpos se realiza normalmente con enlaces N. Enlaces N significa la unión del resto hidrato de carbono con la cadena lateral de un resto asparagina. Las secuencias tripéptido de asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido, excepto la prolina, son las secuencias de reconocimiento de la unión enzimática del resto hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de estas secuencias tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se lleva a cabo de modo conveniente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o varias de las secuencias tripéptido recién descritas (para sitios de glucosilación con enlaces N).
- 45
- 50

- Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-P-selectina se obtienen por un gran número de métodos, ya conocidos de la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a: el aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos de existencia natural) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a un sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis de cassette de una variante preparada anteriormente o de una versión no variante de un anticuerpo anti-P-selectina humanizado.
- 55

La invención se refiere además a inmunoconjugados que contienen el anticuerpo según la invención conjugado con un agente citotóxico, por ejemplo un agente quimioterapéutico, una toxina (p.ej. una toxina activa enzimáticamente de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de la misma), un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado) o un profármaco (prodrug) de un agente para la profilaxis o tratamiento de trastornos inflamatorios y trombóticos, en especial de la PAOD y la CLI. Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se obtienen utilizando un gran número de agentes de unión de proteínas bifuncionales, por ejemplo el 3-(2-piridilditiol)propionato de N-succinimidilo (SPDP), el iminotiolano (IT), los derivados bifuncionales de imidoésteres (por ejemplo el adipimidato de dimetilo HCl), los ésteres activos (como el suberato de disuccinimidilo), los aldehídos (como el glutaraldehído), los compuestos bis-azido (por ejemplo la bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), los derivados de bis-diazonio (por ejemplo la bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), los diisocianatos (por ejemplo el 2,6-diisocianato de toluileno) y los compuestos de difluor activo (por ejemplo el 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzoceno). Puede obtenerse, por ejemplo, una inmunotoxina de ricino del modo descrito por Vitetta, E.S. y col., *Science* 238 (1987) 1098-1104). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno-triaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos con el anticuerpo. Véase WO 94/11026.

Otro tipo de modificación covalente implica la adición de glucósidos por vía química o enzimática al anticuerpo. Estos procedimientos son ventajosos por cuanto no requieren la producción del anticuerpo en una célula hospedante que tenga capacidad de glucosilación con uniones N u O. Dependiendo del modo de unión utilizado, el o los azúcares pueden unirse a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres, como los de la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres, como los de la serina, treonina o hidroxiprolina, (e) restos aromáticos, por ejemplo los de fenilalanina, tirosina o triptófano o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en WO 87/05330 y en Aplin, J.D. y Wriston, J.C. Jr., *CRC Crit. Rev. Biochem.* (1981) 259-306.

La eliminación de cualquier resto hidrato de carbono que esté presente en el anticuerpo puede llevarse a cabo por vía química o enzimática. La desglucosilación química requiere la exposición del anticuerpo al compuesto ácido trifluormetanosulfónico o un compuesto equivalente. Este tratamiento produce la rotura de la mayor parte o de todos los azúcares, excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), quedando intacto el anticuerpo. La desglucosilación química se describe en Sojhr, H.T. y Bahl, O.P., *Arch. Biochem. Biophys.* 259 (1987) 52-57 y en Edge, A. S. y col., *Anal. Biochem.* 118 (1981) 131-137. La rotura enzimática de los restos hidrato de carbono de los anticuerpos puede llevarse a cabo aplicando una gran variedad de endo- y exo-glucosidasas del modo descrito por Thotakura, N.R. y Bahl, O.P., *Meth. Enzymol.* 138 (1987) 350-359.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo consiste en unir el anticuerpo a uno de los muchos polímeros no proteínicos, p.ej. el polietilenglicol, el polipropilenglicol o poli(óxidos de alquileno), del modo descrito en las patentes US-4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 ó 4,179,337.

En otro aspecto, la invención proporciona células B aisladas de un animal transgénico no humano, p.ej. un ratón transgénico, que expresa el anticuerpo anti-P-selectina humano (p.ej. los anticuerpos originales producidos por una línea celular hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC2641) aquí descrita. Los ratones KM son ratones transcromosómicos idóneos. El ratón KM contiene un transcromosoma de cadena pesada humano y un transgén de cadena ligera kappa humano. Los genes de cadena pesada y ligera de ratón endógeno pueden haberse roto también en los ratones KM de modo que la inmunización de los ratones conduce a la producción de inmunoglobulinas humanas antes que a la producción de inmunoglobulinas de ratón. El diseño de ratones KM y su utilización para generar inmunoglobulinas humanas se describe con detalle en el documento WO 02/43478.

Las células B aisladas se obtienen con preferencia de un animal transgénico no humano, p.ej. un ratón transgénico, que se ha inmunizado con una forma purificada o recombinante del antígeno anti-P-selectina y/o células que expresan la P-selectina. El animal transgénico no humano, p.ej. un ratón transgénico, tiene con preferencia un genoma que consiste en un transgén de cadena pesada humano y un transgén de cadena ligera humano que codifica todo el anticuerpo de la invención o una porción del mismo. Las células B aisladas se immortalizan seguidamente para proporcionar una fuente (p.ej. un hibridoma) de anticuerpos anti-P-selectina humanos. Por lo tanto, esta revelación proporciona también un hibridoma capaz de producir anticuerpos monoclonales humanos según la invención. En una forma de ejecución, el hibridoma incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, p.ej., un ratón transgénico que tiene un genoma que contiene un transgén de cadena pesada humano y un transgén de cadena ligera humano que codifican a todo el anticuerpo de la invención o una parte del mismo, fusionado sobre una célula immortalizada.

En una forma particular de ejecución, el animal transgénico no humano es un ratón transgénico que tiene un genoma provisto de un transgén de cadena pesada humano y un transgén de cadena ligera humano que codifican todo el anticuerpo de la invención o una porción del mismo. El animal transgénico no humano puede inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida en el antígeno de P-selectina y/o células que expresan la P-selectina. El animal transgénico no humano, p.ej. el ratón transgénico, es capaz con preferencia de producir isotipos de P-selectina de anticuerpos monoclonales humanos de la P-selectina.

Los anticuerpos monoclonales humanos aquí descritos pueden producirse inmunizando un animal transgénico no humano, p.ej. un ratón transgénico, que tenga un genoma provisto de un transgén de cadena pesada humano y un transgén de cadena ligera humano que codifica todo el anticuerpo de la invención o una porción del mismo, con una

preparación purificada o enriquecida en antígeno de P-selectina y/o células que expresan la P-selectina. Después se obtienen las células B (p.ej. células B del bazo) del animal y se fusionan con células de mieloma para formar células inmortales de hibridoma que secretan anticuerpos monoclonales humanos contra la P-selectina.

5 En una forma preferida de ejecución, los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra la P-selectina pueden generarse utilizando ratones transgénicos que lleven partes del sistema inmune humano con preferencia sobre el sistema murino. Estos ratones transgénicos, denominados en la descripción ratones "HuMab", contienen un miniloci de gen de inmunoglobulina humana que codifica genes no realineados de inmunoglobulina humana, que incluyen la cadena pesada (μ y γ) y cadena ligera κ (genes de región constante), junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de las cadenas μ y κ (Lonberg, N. y col., *Nature* 368 (1994) 856-859). Por consiguiente, los ratones presentan una expresión reducida de la IgM o K de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes humanos de cadena pesada y ligera introducidos sufren desviación de grupo y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG humanos de alta afinidad (Lonberg, N. y col., *Nature* 368 (1994) 856-859; revisión en Lonberg, N., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113 (1994) 49-101; Lonberg, N. y Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* 25 (1995) 65-93; y Harding, F. y Lonberg, N., *Ann. N. Acad. Sci.* 764 (1995) 536-546). La obtención de ratones HuMab se describe en Taylor, L. y col., *Nucleic Acids Research* 20 (1992) 6287-6295; Chen, J. y col., *International Immunology* 5 (1993) 647-656; Tuailon, N. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 3720-3724; Choi, T.K. y col., *Nature Genetics* 4 (1993) 117-123; Chen, J. y col., *EMBO J.* 12 (1993) 821-830; Tuailon, N. y col., *Immunol.* 152 (1994) 2912-2920; Lonberg, N. y col., *Nature* 368 (1994) 856-859; Lonberg, N., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113 (1994) 49-101; Taylor, L. y col., *Int. Immunol.* 6 (1994) 579-591; Lonberg, N. y Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* 25 (1995) 65-93; Harding, F. y Lonberg, N., *Ann. N. Acad. Sci.* 764 (1995) 536-546; Fishwild, D.M. y col., *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 845-851, los contenidos de dichas publicaciones se incorporan a la presente descripción en su totalidad como referencias. Véanse además las patentes US-5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877, 397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 5,545,807; 5,770,429; WO 98/24884; WO 94/25585; WO 93/1227; WO 92/22645; y WO 92/03918.

25 Para generar anticuerpos monoclonales totalmente humanos contra la P-selectina pueden inmunizarse los ratones HuMab con una preparación purificada o enriquecida en antígeno de P-selectina y/o células que expresan la P-selectina con arreglo al método general, descrito por Lonberg, N. y col., *Nature* 368 (1994) 856-859; Fishwild, D.M. y col., *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 845-851 y WO 98/24884. Los ratones tendrán con preferencia una edad de 6-16 semanas en el momento de la primera inmunización. Puede utilizarse, por ejemplo, una preparación purificada o enriquecida en antígeno soluble de P-selectina (p.ej. purificada a partir de células que expresan la P-selectina) para inmunizar los ratones HuMab por vía intraperitoneal. En el caso de que las inmunizaciones empleando una preparación purificada o enriquecida en antígeno de P-selectina no produzcan anticuerpos, los ratones podrán inmunizarse también con células que expresan la P-selectina, p.ej. una línea celular tumoral, para promover respuestas inmunes. La experiencia acumulada con varios antígenos pone de manifiesto que los ratones HuMab transgénicos responden muy bien cuando se inmunizan inicialmente por vía intraperitoneal (i.p.) con el antígeno en un adyuvante de Freund completo y posteriormente se inmunizan en cualquier otra semana (por ejemplo, hasta un total de 6) por vía i.p. con el antígeno en un adyuvante de Freund incompleto. Puede hacerse el seguimiento de la respuesta inmune a lo largo del programa de inmunización con muestras de plasma obtenidas por sangrados retroorbitales. El plasma puede analizarse con un ensayo ELISA y los ratones con una concentración suficiente de inmunoglobulina humana anti-P-selectina pueden utilizarse para la inmortalización de las células B correspondientes. Los ratones pueden estimularse por vía intravenosa con el antígeno de 3 a 4 días antes del sacrificio y extracción de los nodos esplénicos y linfáticos. Se espera que tengan que realizarse 2-3 fusiones para cada antígeno. Se inmunizan varios ratones para cada antígeno. Por ejemplo, puede inmunizarse un total de doce ratones HuMab de las cepas HCo7 y HCo12.

45 Los ratones HCo7 tienen una disrupción JKD en sus genes endógenos de cadena ligera (κ) (descrita en Chen, J. y col., *EMBO J.* 12 (1993) 821-830), una disrupción CMD en sus genes endógenos de cadena pesada (descrita en el ejemplo 1 del documento WO 01/14424), un transgén de cadena ligera κ humano KCo5 (descrito en Fishwild, D.M. y col., *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 845-851), y un transgén HCo7 de cadena pesada humano (descrito en la patente US-5,770,429).

50 Los ratones HCo12 tienen una disrupción JKD en sus genes endógenos de cadena ligera (κ) (descrita en Chen, J., y col., *EMBO J.* 12 (1993) 821-830), una disrupción CMD en sus genes endógenos de cadena pesada (descrita en el ejemplo 1 del documento WO 01/14424), un transgén KCo5 de cadena ligera κ humano (descrito en Fishwild, D.M. y col., *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 845-851), y un transgén HCo12 de cadena pesada humano (descrito en el ejemplo 2 del documento WO 01/14424). Los linfocitos de ratón pueden aislarse y fusionarse con una línea celular de mieloma de ratón empleando PEG en base a programas estándar para generar hibridomas. A continuación se exploran los hibridomas resultantes para producir anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, se fusionan suspensiones celulares individuales de linfocitos derivados de nodos esplénicos y linfáticos de ratones inmunizados con un sexto del número de las células de mieloma de ratón que no secretan SP 2/0 (ATCC, CRL 1581) con un 50% de PEG. Se depositan las células en placas de microvaloración de fondo plano a razón de 2×10^5 , a continuación se incuban durante unas dos semanas en un medio selectivo.

Después se exploran los hoyos individuales con un ensayo ELISA en busca de los anticuerpos IgM e IgG monoclonales anti-P-selectina humanos. Una vez se ha producido el crecimiento extensivo del hibridoma, se analiza el

medio, normalmente después de 10-14 días. Se vuelven a colocar en placas los anticuerpos que secretan hibridomas, se exploran de nuevo y, si todavía da resultado positivo de anticuerpos monoclonales IgG anti-P-selectina humanos, entonces pueden subclonarse por lo menos dos veces limitando la dilución. Seguidamente se cultivan los subclones estables "in vitro" para producir anticuerpos en un medio de cultivo de tejido para la caracterización.

Dado que se atribuyen a las secuencias CDR las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar los anticuerpos recombinantes aquí descritos construyendo vectores de expresión que incluyan las secuencias CDR según la invención sobre secuencias de armazón de un anticuerpo humano diferente (ver, p.ej. Riechmann, L. y col., Nature 332 (1998) 323-327; Jones, P. y col., Nature 321 (1986) 522-525; y Queen, C. y col., Proc. Natl. Acad. U.S.A. 86 (1989)10029-10033). Dichas secuencias de armazón pueden obtenerse de bases de datos públicas de DNA que incluyen secuencias de genes de anticuerpos humanos de línea germinal. Estas secuencias de línea germinal serán diferentes de las secuencias de genes de anticuerpos maduros porque no incluyen genes variables completamente ensamblados, que se forman por unión de V(D)J durante la maduración de la célula B. Las secuencias de genes de línea germinal diferirán también de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de gran afinidad tanto en la región constante individual como en la variable.

La invención se refiere además al uso de un anticuerpo aquí descrito para el diagnóstico de la P-selectina "in vitro", con preferencia mediante un ensayo inmunológico que determine la fijación entre la P-selectina de una muestra y el anticuerpo de la invención.

En otro aspecto, se describe aquí una composición, p.ej. una composición farmacéutica, que contiene un anticuerpo monoclonal humano o una combinación de anticuerpo monoclonales humanos, o la porción de los mismos que se une a un antígeno, aquí descrito, formulados junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Más en concreto, la composición es una composición farmacéutica o de diagnóstico y de modo todavía más específico la composición farmacéutica contiene un anticuerpo ya definido anteriormente y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas aquí descritas pueden administrarse también en terapias de combinación, es decir combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente invención con por lo menos un agente útil para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad asociada con la isquemia crítica de extremidades (CLI/PAOD) u otra terapia convencional.

Tal como se utiliza en esta descripción, "excipiente farmacéuticamente aceptable" indica uno cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. El excipiente es con preferencia idóneo para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (p.ej. mediante inyección o infusión).

Una "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal que conserva la actividad biológica deseada del anticuerpo y no aporta efectos toxicológicos molestos de ningún tipo (véase p.ej. Berge, S.M. y col., J. Pharm. Sci. 66 (1977) 1-19). Dichas sales se describen aquí. Son ejemplos de dichas sales las sales de adición de ácido y las sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, por ejemplo las sales clorhidrato.

Una composición aquí descrita puede administrarse mediante gran número de métodos ya conocidos en la técnica. El experto en la materia comprenderá fácilmente que la vía y/o el modo de administración pueden variar en función de los resultados deseados.

Para administrar un compuesto aquí descrito mediante determinadas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con un material para impedir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un excipiente apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen la solución salina y las soluciones acuosas tamponadas.

Los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen las soluciones o dispersiones acuosas estériles y los polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para principios activos farmacéuticos ya es conocido en la técnica.

Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" que se emplean en esta descripción indican modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección e incluyen, sin limitación, la inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal así como la infusión.

Estas composiciones pueden contener además excipientes o adyuvantes, por ejemplo conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse tanto por procedimientos de esterilización, ver antes, como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, paraben, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. Puede ser

también deseable integrarse en las composiciones agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, cloruro sódico y similares. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede realizarse mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción, por ejemplo el monoestearato de aluminio y la gelatina.

5 Con independencia de la vía de administración que se elija, los compuestos aquí descritos, que pueden utilizarse en una forma hidratada idónea y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales ya conocidos de los expertos en la materia.

10 Los niveles actuales de dosificación de los ingredientes activos de las composiciones farmacéuticas aquí descritas pueden variarse con el fin de obtener una cantidad de ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada en un paciente particular, en una composición y modo de administración concretos, sin que sea tóxica para el paciente. El nivel de dosificación elegido dependerá de un gran número de factores farmacocinéticos, incluida la actividad de las composiciones particulares de la presente invención que se empleen, o del éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de eliminación de un compuesto concreto que se emplee, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales que se empleen en combinación con las composiciones concretas aplicadas, la edad, el sexo, el peso, el estado físico, el estado de salud y el historial médico anterior del paciente que se va a tratar y factores similares, que los facultativos médicos conocen bien. Una dosificación semanal típica puede situarse entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg o más, en función de los factores recién mencionados.

20 La composición tiene que ser estéril y fluida hasta el punto de que dicha composición pueda administrarse con una jeringuilla. Además de agua, el excipiente puede ser una solución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerina, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) así como las mezclas adecuadas de los mismos.

25 La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, utilizando un recubrimiento, por ejemplo lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y empleando tensioactivos. En muchos casos es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, como la manita o la sorbita, y cloruro sódico en la composición. La absorción de larga duración de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, el monoestearato de aluminio o la gelatina.

30 La invención comprende un método para el tratamiento de un paciente que necesite una terapia, caracterizado porque se administra al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, que contiene una parte Fc derivada de un origen humano y que no se fija sobre el factor de complemento C1q.

La invención comprende el uso de anticuerpo que fija la P-selectina, contiene una parte Fc derivada de un origen humano y no fija el factor de complemento C1q para fines terapéuticos.

35 La invención comprende el uso de un anticuerpo que fija la P-selectina, contiene una parte Fc derivada de un origen humano y no fija el factor de complemento C1q para la fabricación de un medicamento destinado a la profilaxis y el tratamiento de trastornos inflamatorios y trombóticos.

La invención comprende el uso de un anticuerpo que fija la P-selectina, contiene una parte Fc derivada de un origen humano y no fija el factor de complemento C1q para el tratamiento de la PAOD y la CLI.

40 La invención proporciona, pues, un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, no se fija sobre el factor de complemento C1q, contiene una parte Fc derivada de un origen humano y está caracterizado porque dicho anticuerpo es un anticuerpo del subgrupo humano IgG4 en el que S228 se ha reemplazado por P y L235 se ha reemplazado por E. En una forma de ejecución aquí descrita, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En otra forma de ejecución, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

45 En una forma de ejecución, aquí descrita, un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, no se fija sobre el factor de complemento C1q, contiene una parte Fc derivada de un origen humano se caracteriza porque dicho anticuerpo es un anticuerpo del subgrupo humano IgG4 en el que S228 se reemplaza por P y L235 se reemplaza por E, en el que la no fijación del anticuerpo sobre el factor de complemento C1q se refiere a una medición realizada mediante un ensayo ELISA en el que la fijación máxima (Bmax) del C1q al anticuerpo en una concentración de 10 µg/ml del anticuerpo es $\leq 30\%$ de la Bmax del anticuerpo LC 1004-002 de la línea celular hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC2641). En otra forma de ejecución, la fijación máxima es $\leq 20\%$ de la Bmax del anticuerpo LC 1004-002 de la línea celular hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC2641).

55 En una forma de ejecución aquí descrita un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, no se fija sobre el factor de complemento C1q, contiene una parte Fc derivada de un origen humano, se caracteriza porque dicho anticuerpo es un anticuerpo del subgrupo humano IgG4 en el que S228 se reemplaza por P y L235 se reemplaza por E, en el que el anticuerpo se fija sobre la P-selectina con un valor K_D de menos de 10^{-8} M en un ensayo BIAcore. En otra forma de ejecución, el valor de K_D se sitúa entre 10^{-11} y 10^{-9} M.

5 En una forma de ejecución aquí descrita un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, no se fija sobre el factor de complemento C1q, contiene una parte Fc derivada de un origen humano. se caracteriza porque dicho anticuerpo es un anticuerpo del subgrupo humano IgG4 en el que S228 se reemplaza por P y L235 se reemplaza por E, en el que el anticuerpo se fija sobre la P-selectina con una especificidad por lo menos 1000 mayor que sobre la E- y/o L-selectina según se determina a partir de los valores de EC₅₀ hallados en un ensayo ELISA, en el que se recubre la placa de microvaloración con la P- y E- y/o L-selectina. En otra forma de ejecución, los valores de EC₅₀ de los transfectantes de E- y L-selectina se sitúan por encima de 100 µg/ml.

10 En una forma de ejecución aquí descrita un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, no se fija sobre el factor de complemento C1q, contiene una parte Fc derivada de un origen humano, se caracteriza porque dicho anticuerpo es un anticuerpo del subgrupo humano IgG4 en el que S228 se reemplaza por P y L235 se reemplaza por E, en el que el anticuerpo inhibe la adhesión de células HL60 similares a leucocitos sobre la P-selectina purificada con un valor de IC₅₀ no superior a 1 µg/ml. En otra forma de ejecución, el valor de IC₅₀ se sitúa entre 0,08 y 0,5 µg/ml. En otra forma de ejecución adicional, el valor de IC₅₀ está comprendido entre 0,08 y 0,11 µg/ml.

15 En una forma de ejecución aquí descrita un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, no se fija sobre el factor de complemento C1q, contiene una parte Fc derivada de un origen humano, se caracteriza porque dicho anticuerpo es un anticuerpo del subgrupo humano IgG4 en el que S228 se reemplaza por P y L235 se reemplaza por E, en el que

(a) la adhesión de las células HL60 similares a leucocitos sobre las plaquetas activadas se inhibe con un valor de IC₅₀ situado entre 0,05 y 0,3 µg/ml;

(b) el anticuerpo inhibe la interacción de los leucocitos con una monocapa de plaquetas en más del 70%;

20 (c) el anticuerpo inhibe la adhesión de leucocitos sobre células endoteliales activadas de un sistema de flujo humano en un intervalo del 60 al 90% en una concentración de 3 µg/ml;

(d) el anticuerpo no fija la proteína C3;

(e) el anticuerpo no despliega citotoxicidad dependiente del complemento (CDC);

(f) el anticuerpo no se fija sobre receptores Fcγ de células efectoras NK; o

25 (g) el anticuerpo no despliega citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

En una forma de ejecución aquí descrita un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina se caracteriza porque la secuencia variable de aminoácidos de cadena pesada CDR3 de dicho anticuerpo es la secuencia CDR3 de cadena pesada SEQ ID NO: 39.

30 En una forma de ejecución aquí descrita un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, que consta de una cadena pesada variable y una cadena ligera variable, se caracteriza porque la cadena pesada variable contiene las secuencias CDR siguientes: CDR1, CDR2 y CDR3 y la CDR1 es la SEQ ID NO: 30; la CDR2 es la SEQ ID NO: 34; y la CDR3 es la SEQ ID NO: 39; dichas CDR se eligen con independencia entre sí.

35 En una forma de ejecución aquí descrita un anticuerpo se caracteriza porque la cadena ligera variable contiene las secuencias CDR siguientes: CDR1, CDR2 y CDR3; y la CDR1 es la SEQ ID NO: 43; la CDR2 es la SEQ ID NO: 45; y la CDR3 es la SEQ ID NO: 48; dichas CDR se eligen con independencia entre sí.

En una forma de ejecución aquí descrita un anticuerpo se caracteriza porque dicho anticuerpo se fija sobre la P-selectina y porque el anticuerpo contiene una región variable, elegida de:

el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de cadena pesada definido por la SEQ ID NO: 4;

40 En una forma de ejecución aquí descrita un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, no se fija sobre el factor de complemento C1q, contiene una parte Fc derivada de un origen humano se caracteriza porque dicho anticuerpo es un anticuerpo del subgrupo humano IgG4 en el que S228 se reemplaza por P y L235 se reemplaza por E, en el que el anticuerpo contiene las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 y las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio variable de cadena pesada definido por la SEQ ID NO: 4. En otra forma de ejecución, el anticuerpo comprende el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 y el dominio variable de cadena pesada definido por la SEQ ID NO: 4.

50 En una forma de ejecución aquí descrita un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, no se fija sobre el factor de complemento C1q, contiene una parte Fc derivada de un origen humano se caracteriza porque dicho anticuerpo es un anticuerpo del subgrupo humano IgG4 en el que S228 se reemplaza por P y L235 se reemplaza por E, en el que

(a) el anticuerpo contiene por lo menos una mutación de aminoácido en la parte Fc que provoca la no fijación sobre el factor de complemento C1q;

(b) la región constante de cadena pesada humana contiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 28;

(c) el anticuerpo contiene una región constante de cadena ligera κ definida con la SEQ ID NO: 23;

(d) el anticuerpo contiene por lo menos una mutación de aminoácido que provoca la no fijación sobre el complemento C1q;

5 (e) el anticuerpo contiene una región constante de cadena pesada IgG4v1; o

(f) el anticuerpo es un fragmento Fab, $F(ab')_2$ o un fragmento de cadena simple.

En una forma de ejecución, la invención proporciona un anticuerpo anti-P-selectina, caracterizado porque es un anticuerpo humano o humanizado. En otra forma de ejecución, el anticuerpo aquí descrito contiene la secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 28 $\gamma 4$ de la región constante de cadena pesada. En otra forma de ejecución más, el anticuerpo "original" aquí descrito se produce en una línea celular hu-Mab<P-selectina>LC 1004-002 (DSM ACC264).

10

Se debe entender que la revelación proporciona las formas de ejecución con las definiciones descritas en los párrafos anteriores, de [00129] a [00141], y también las combinaciones de los mismos.

15 Los siguientes ejemplos, referencias, listados de secuencias y figuras se facilitan para ayudar la comprensión de la invención.

Descripción de los listados de secuencias.

SEQ ID NO: 1 LC1004-001 dominio variable de cadena ligera del HuMab 1004-001

SEQ ID NO: 2 LC1004-001 dominio variable de cadena pesada del HuMab 1004-001

SEQ ID NO: 3 LC 1004-002 dominio variable de cadena ligera del HuMab 002

20 SEQ ID NO: 4 LC 1004-002 dominio variable de cadena pesada del HuMab 002

SEQ ID NO: 5 LC 1004-003 dominio variable de cadena ligera del HuMab 003

SEQ ID NO: 6 LC 1004-003 dominio variable de cadena pesada del HuMab 003

SEQ ID NO: 7 LC 1004-004 dominio variable de cadena ligera (I) del HuMab 004 (I)

SEQ ID NO: 8 LC 1004-004 dominio variable de cadena pesada (I) del HuMab 004 (I)

25 SEQ ID NO: 9 LC 1004-004 dominio variable de cadena ligera (II) del HuMab 004 (II)

SEQ ID NO: 10 LC 1004-004 dominio variable de cadena pesada (II) del HuMab 004 (II)

SEQ ID NO: 11 dominio variable de cadena ligera del HuMab 005

SEQ ID NO: 12 dominio variable de cadena pesada del HuMab 005

SEQ ID NO: 13 dominio variable de cadena ligera del HuMab 010 (I)

30 SEQ ID NO: 14 dominio variable de cadena pesada del HuMab 010 (I)

SEQ ID NO: 15 dominio variable de cadena ligera del HuMab 010 (II)

SEQ ID NO: 16 dominio variable de cadena pesada del HuMab 010 (II)

SEQ ID NO: 17 dominio variable de cadena ligera del HuMab 010 (III)

SEQ ID NO: 18 dominio variable de cadena pesada del HuMab 010 (III)

35 SEQ ID NO: 19 dominio variable de cadena ligera del HuMab 011

SEQ ID NO: 20 dominio variable de cadena pesada del HuMab 011

SEQ ID NO: 21 dominio variable de cadena ligera del HuMab 017

SEQ ID NO: 22 dominio variable de cadena pesada del HuMab 017

SEQ ID NO: 23 región constante de cadena ligera κ

40 SEQ ID NO: 24 región constante de cadena pesada $\gamma 1$

SEQ ID NO: 25 región constante de cadena pesada γ 1 PVA236/ GLPSS331 (IgG1v1)

SEQ ID NO: 26 región constante de cadena pesada γ 1 L234A/ L235A (IgG1v2)

SEQ ID NO: 27 región constante de cadena pesada γ 4

SEQ ID NO: 28 región constante de cadena pesada γ 4 S228/L235E (IgG4v1)

5 SEQ ID NO: 29-32 cadena pesada CDR1

SEQ ID NO: 33-37 cadena pesada CDR2

SEQ ID NO: 38-42 cadena pesada CDR3

SEQ ID NO: 43-44 cadena ligera CDR1

SEQ ID NO: 45-46 cadena ligera CDR2

10 SEQ ID NO: 47-52 cadena ligera CDR3

Abreviaturas:

Los aminoácidos se abrevian aplicando el código de tres letras (Leu) o de una letra (L).

El anticuerpo HuMab 00X se denomina también anticuerpo 00X.

L234 significa el aminoácido leucina de la posición 234 según la numeración EU (Kabat).

15 L234A significa que el aminoácido leucina de la posición 234 se ha cambiado por alanina.

PVA236 significa que en la región 236, el ELLG del IgG1 o el EFLG del IgG4 se modifica en PVA.

GLPSS331 significa que en la región 331, el ALPAP del IgG1 o el GLPAP del IgG2 se cambia por GLPSS.

Las modificaciones o enmiendas en los demás subgrupos IgG se indican de forma similar.

EJEMPLOS

20 Generación de una línea celular de hibridoma que produce anticuerpos anti-P-selectina

Cultivo de hibridomas

Se cultivan los hibridomas de HuMab en un medio IMDM (Cambrex), suero bovino Fetal clone 1 (Perbio Science), factor de clonación de hibridoma de origen (Igen), piruvato sódico, penicilina/estreptomicina, 2-mercaptoetanol, HAT (Sigma-Aldrich) y canamicina (Invitrogen) a 37°C y un 5% de CO₂.

25 Generación de una línea celular de hibridoma que produce anticuerpos anti-P-selectina

Procedimiento de inmunización de ratones transgénicos

Protocolo A:

30 Se inmunizan 10 ratones transgénicos HCo7 (5 machos y 5 hembras), de la cepa GG2201 (Medarex, San José, CA, USA) con una forma truncada recombinante de la P-selectina que carece de la transmembrana y del dominio citoplásmico de la P-selectina y que se adquiere de la empresa R&D Systems. Para la primera inmunización se mezclan 50 μ g de P-selectina recombinante, disueltos en 100 μ l de PBS, con 100 μ l adyuvante de Freund completo. Para las inmunizaciones restantes se utiliza P-selectina recombinante unida a KLH. Para la segunda inmunización se disuelven 50 μ g de P-selectina recombinante unida a KLH en 100 μ l de PBS y se mezclan con 100 μ l de adyuvante de Freund incompleto. Para las inmunizaciones restantes se disuelven 20 μ g P-selectina recombinante unida a KLH en 100 μ l de PBS y se mezclan con 100 μ l de adyuvante de Freund incompleto. Se administran las inmunizaciones de forma alternada por vía interperitoneal y subcutánea, empezando con la inmunización interperitoneal.

Protocolo B:

40 Se inmunizan 3 ratones HCo7 (todas hembras) y 3 ratones KM (todos machos) transgénicos, de la cepa GG2489 (Medarex, San José, CA, USA) con una P-selectina de longitud completa, purificada a partir de plaquetas humanas obsoletas por cromatografía de inmunoafinidad (ver a continuación). Para la primera inmunización se mezclan 50 μ g de la P-selectina purificada, disueltos en 100 μ l de PBS, con 100 μ l de adyuvante de Freund completo (CFA; Difco Laboratories, Detroit, USA). Para la segunda inmunización se mezclan 50 μ g de la P-selectina purificada, disueltos en 100 μ l de PBS, con 100 μ l de adyuvante de Freund incompleto (ICFA; Difco).

Para las demás inmunizaciones se utilizan 20 µg de la P-selectina purificada y se mezclan con 100 µl de adyuvante de Freund incompleto.

Ensayo ELISA específico de antígeno

5 Se determinan las concentraciones del anti-P-selectina en los sueros de ratones inmunizados mediante un ensayo ELISA específico de antígeno. Se recubre la placa (placa ELISA de fondo plano con 96 hoyos, Greiner) con 0,1 µg/ml de P-selectina purificada, disuelta en PBS y se recubre durante una noche a temperatura ambiente. A continuación se bloquean los hoyos con PBSTC (PBS que contiene un 0,05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich Chemie BV) y un 2% de suero de pollo (Gibco)) a temperatura ambiente durante 1 hora.

10 Se diluyen calidades de suero comprobadas en proporción 1:100 con PBSTC y se añaden a los hoyos. Se disuelve el suero obtenido de los ratones antes de la inmunización en proporción 1:100 con PBSTC y se emplea como control negativo. Se disuelve un anticuerpo de ratón dirigido contra la P-selectina humana (1/7, producción interna de la empresa Roche, Basilea) en proporción 1:100 con PBSTC y se emplea como control positivo. Se incuban las placas a temperatura ambiente durante 1 hora. Seguidamente se lavan las placas dos veces con PBST (PBS que contiene un 0,05% de Tween 20). Se diluye el Gt-α-hulgG-HRP (Jackson) en proporción 1:5000 con PBSTC y se añade a los hoyos que contienen las calidades comprobadas y el control negativo. Se diluye el Rb-α-mIgG (Jackson) en proporción 1:3000 con PBSTC y se añade a los hoyos que contienen el control positivo. Se incuban las placas a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente se lavan las placas dos veces con PBST se revelan con una solución de ABTS® recién preparada (1 mg/ml) (ABTS: 2,2'-azinobis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) a temperatura ambiente (RT) durante 30 minutos en la oscuridad. Se mide la absorbancia en 405 nm.

20 Estimulación de los ratones

Cuando las concentraciones del anti-P-selectina en suero son suficientes, se estimulan los ratones adicionalmente con 20 µg de P-selectina recombinante humana en 100 µl de PBS, por vía intravenosa 4 y 3 días antes de la fusión.

Generación de hibridoma

25 Se sacrifican los ratones y se les extraen los nodos esplénicos y linfáticos que flanquean la aorta abdominal y la vena cava. Se efectúa la fusión de los esplenocitos y las células de nodos linfáticos con el reactivo de fusión, las células SP 2.0, con arreglo a procedimientos operativos estándar.

Con el procedimiento de inmunización se obtienen anticuerpos monoclonales humanos de secuencias pesada y ligera variables, de las SEQ ID NO 1 – 22.

ELISA κ

30 Para determinar si los hibridomas resultantes de la fusión generan anticuerpos humanos se efectúa un ensayo ELISA κ. Se recubren las placas ELISA con anticuerpos IgG de cadena ligera κ antihumanos de ratón (DAKO) diluidos 1/10000 con PBS mediante una incubación a 4°C durante una noche. Después de descartar los hoyos, se bloquean las placas por incubación con PBSTC a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación se incuban los hoyos con el líquido sobrenadante del cultivo de hibridoma, diluido 1/2 con PBSTC. Se diluye el medio de cultivo a 1/2 con PBSTC y se utiliza como control negativo, se diluye el suero de ratón positivo ligero κ en proporción 1/100 con PBSTC y se emplea como control positivo. A continuación se lavan los hoyos tres veces y se incuban con IgG F(ab')₂ antihumano de ratón, conjugado con HRP (DAKO), diluido en proporción 1/2000 con PBSTC a 37°C durante 1 h. Se lavan los hoyos tres veces y se revelan las muestras con una solución de ABTS® recién preparada (1 mg/ml) a temperatura ambiente (RT) durante 30 minutos en la oscuridad. Se mide la absorbancia en 405 nm con un lector de placas ELISA.

Clonación y análisis de secuencias de los dominios variables del HuMab anti-P-selectina (cadenas ligeras κ y cadenas pesadas γ1)

Se aíslan las secuencias de nucleótido que codifican a la región variable de cadena ligera VL y la región variable de cadena pesada VH de los HuMab anti-P-selectina por un procedimiento estándar de síntesis de cDNA/PCR.

45 Se prepara el RNA total a partir de 1×10^6 – 1×10^7 células de hibridoma utilizando el minikit RNeasy® (Qiagen). El DNA derivado del hibridoma se utiliza como molde para la síntesis del cDNA de la 1ª hebra o cadena que se transforma con arreglo a un método convencional, recurriendo a un cebador oligo dT. La síntesis del cDNA de la 2ª cadena y la posterior amplificación por PCR de los fragmentos de cDNA que codifican a la VL y VH se realiza con cebadores de cadena ligera y pesada inversos, complementarios de las secuencias de nucleótido de las regiones constantes de cadena ligera κ y de cadena pesada γ1 y cebadores de cadena ligera y pesada específicos de 5', respectivamente. Los productos de la PCR se clonan empleando el kit de clonación TOPO TA de la empresa Invitrogen™ Life Technologies y el pCR4-TOPO como vector de clonación. Se identifican los productos de la PCR clonados por mapeo de restricción de los plásmidos apropiados empleando EcoRI para la digestión y los tamaños de los fragmentos de DNA esperados/calculados de 740 y 790 bp para la VL y la VH, respectivamente.

La secuencia de DNA de los fragmentos de la PCR clonados se determina por secuenciación bicatenaria.

Para procesar los datos generales se emplea el paquete de programas informáticos de GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin), versión 10.2. Las secuencias de DNA y proteínas se alinean empleando el módulo CLUSTALW de GCG. Las alineaciones de secuencia se tabulan, se editan y se codifican con color empleando el programa GENEDOC (versión 2.1).

5

Diseño de plásmidos de expresión para un HuMab IgG1 anti-P-selectina

Los genes que codifican la cadena ligera y pesada del HuMab anti-P-selectina se ensamblan por separado en vectores de expresión de células de mamíferos.

10

Para ello se juntan los segmentos de genes que codifican la región variable de cadena ligera (V_L) del HuMab anti-P-selectina y la región constante de cadena ligera κ humana (C_L) al igual que los segmentos de genes de la región variable de cadena pesada (V_H) de los HuMab anti-P-selectina y la región constante de cadena pesada $\gamma 1$ humana (C_{H1} -Hinge- C_{H2} - C_{H3}).

15

Se encontrará información general referente a las secuencias de nucleótidos de cadenas ligeras y pesadas humanas, a partir de las que se puede deducir el uso de codón, en: Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. y Foeller, C. (1991) Secuencias de proteínas de interés inmunológico, quinta ed., publicación NIH nº 91-3242.

La unidad de transcripción de la cadena ligera κ del HuMab anti-P-selectina se compone de los elementos siguientes:

20

- El intensificador y promotor inmediatamente anterior del citomegalovirus humano (HCMV),
- Un 5'-UT sintético, incluida una secuencia Kozak,
- Una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina, incluido el intrón de la secuencia de señal,
- El cDNA de cadena ligera variable de HuMab anti-P-selectina clonado, dispuesto en un único sitio de restricción BsmI en el extremo 5' y un sitio dador de empalme y un único sitio de restricción NotI en el extremo 3',
- La región constante del gen κ humano genómico, incluido el intensificador Ig- κ de ratón de intrón 2 [Picard, D. y Schaffner, W. (1984) Nature 307, 80-82] y

25

- La secuencia de señal de poliadenilación κ ("poly A") de inmunoglobulina humana.

La unidad de transcripción de la cadena pesada $\gamma 1$ del HuMab anti-P-selectina se compone de los elementos siguientes:

30

- El intensificador y promotor inmediatamente anterior del citomegalovirus humano (HCMV),
- Un 5'-UT sintético, incluida una secuencia Kozak,
- Una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina modificada, incluido el intrón de la secuencia de señal,
- El cDNA de cadena pesada variable del HuMab anti-P-selectina clonado, dispuesto en un único sitio de restricción BsmI en el extremo 5' y un sitio dador de empalme y un único sitio de restricción NotI en el extremo 3',

35

- La región constante del gen pesada $\gamma 1$ humana genómica, incluido el intensificador μ Ig de ratón [Neuberger, M. S. (1983) Embo J. 2, 1373-1378],
- La secuencia de señal de poliadenilación ("poly A") de inmunoglobulina $\gamma 1$ humana.

Elementos funcionales de los plásmidos de expresión de cadena pesada $\gamma 1$ y de cadena ligera κ del HuMab anti-P-selectina: aparte del cassette de expresión de la cadena ligera κ y de la cadena pesada $\gamma 1$ del HuMab anti-P-selectina, estos plásmidos contienen:

40

- Un gen de resistencia a la higromicina
- Un origen de replicación, oriP, del virus de Epstein-Barr (EBV)
- Un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en la *E. coli* y
- Un gen de β -lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina en la *E. coli*.

Diseño de plásmidos de expresión para un HuMab IgG4 anti-P-selectina

5 Se deriva un plásmido de expresión prototipo de cadena pesada $\gamma 4$ anti-P-selectina a partir del plásmido de expresión de cadena pesada $\gamma 1$ anti-P-selectina reemplazando la región constante $\gamma 1$ genómica humana y la secuencia de señal de poliadenilación ("poly A") de inmunoglobulina $\gamma 1$ por la región constante $\gamma 4$ genómica humana y la secuencia de señal de poliadenilación de inmunoglobulina $\gamma 4$.

Para la expresión de las cadenas ligeras κ del HuMab anti-P-selectina se utilizan los mismos plásmidos de expresión descritos para el IgG1 (ver antes).

Diseño de plásmidos de expresión para IgG1 e IgG4 anti-P-selectina mutantes (variantes)

10 Los plásmidos de expresión que codifican las cadenas pesadas $\gamma 1$ y $\gamma 4$ del anti-P-selectina mutante se crean por mutagénesis dirigida a un sitio de los plásmidos de expresión de tipo salvaje utilizando el kit llamado QuickChange™ Site-Directed mutagenesis Kit (Stratagene).

15 Se generan los siguientes mutantes para el LC1004-002. Los aminoácidos se numeran con arreglo al sistema de numeración EU [Edelman, G. M., Cunningham, B. A., Gall, W. E., Gottlieb, P. D., Rutishauser, U. y Waxdal, M. J. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 78-85; Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. y Foeller, C. (1991) Secuencias de proteínas de interés inmunológico, quinta ed., publicación NIH n° 91-3242].

Tabla 1

Isotipo	Abreviatura	Mutaciones	Descripción
IgG1	IgG1v1	PVA-236; GLPSS331 especificado por E233P; L234V; 235A; delta G236; A327G; A330S; P331S SEQ ID NO: 25	La secuencia de aminoácidos Glu ₂₃₃ Leu ₂₃₄ Leu ₂₃₅ Gly ₂₃₆ de la cadena pesada $\gamma 1$ humana se sustituye por la secuencia de aminoácidos Pro ₂₃₃ Val ₂₃₄ Ala ₂₃₅ de la cadena pesada $\gamma 2$ humana. La secuencia de aminoácidos Ala ₃₂₇ Leu ₃₂₈ Pro ₃₂₉ Ala ₃₃₀ Pro ₃₃₁ de la cadena pesada $\gamma 1$ humana se sustituye por la secuencia de aminoácidos Gly ₃₂₇ Leu ₃₂₈ Pro ₃₂₉ Ser ₃₃₀ Ser ₃₃₁ de la cadena pesada $\gamma 4$ humana.
IgG1	IgG1v2	L234A; L235A SEQ IDNO:26	La secuencia de aminoácidos Leu ₂₃₄ Leu ₂₃₅ de la cadena pesada $\gamma 1$ humana se sustituye por la secuencia de aminoácidos Ala ₂₃₄ Ala ₂₃₅
IgG4	IgG4v1	S228P; L235E SEQ ID NO: 28	Ser ₂₂₈ de la cadena pesada $\gamma 4$ humana se sustituye por Pro ₂₂₈ y Leu ₂₃₅ de la cadena pesada $\gamma 4$ humana se sustituye por Glu ₂₃₅

Producción de HuMab anti-P-selectina recombinantes

20 Los HuMab recombinantes se generan por transfección transitoria de células HEK293-EBNA adherentes (ATCC n° CRL-10852) cultivadas en medio DMEM (Gibco) suplementado con un 10 % de IgG FCS ultra-bajo (Gibco), 2mM de glutamina (Gibco), 1% v/v de aminoácidos no esenciales (Gibco) y 250 μ g/ml de G418 (Roche). Para la transfección se emplea el reactivo llamado Fugene™ 6 (Roche) Transfection Reagent en una proporción entre reactivo (μ l) y DNA (μ g) comprendida entre 3:1 y 6:1. Las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina se expresan a partir de dos plásmidos diferentes, aplicando una proporción molar entre el plásmido que codifica la cadena ligera y el plásmido que codifica la cadena pesada comprendida entre 1:2 y 2:1. Los líquidos sobrenadantes de cultivos
25 celulares que contienen los HuMab se recolectan en los días de 4 a 11 después de la transfección. Los líquidos sobrenadantes se guardan almacenados a -20°C hasta el momento de la purificación.

Se encontrará información general relativa a la expresión recombinante de anticuerpos humanos p.ej. en HEK293 en la referencia: Meissner, P., Pick, H., Kulangara, A., Chatellard, P., Friedrich, K. y Wurm, F. M., Biotechnol. Bioeng. 75, 197-203 (2001).

30

Determinación de la afinidad de los HuMab anti-P-selectina

Equipo:

Instrumento: BIACORE® 2000

Chip: CM5

5 Adición: adición de aminas

Tampón: HBS (HEPES, NaCl), pH 7,4, 25°C.

10 Para las mediciones de afinidad se unen anticuerpos Fc γ de conejo antihumanos (Dianova) por adición de amina sobre la superficie del chip para la presentación del anticuerpo contra la P-selectina. Se fijan aproximadamente 400 RU de anticuerpos anti-P-selectina. Se añade P-selectina recombinante (R&D Systems) en diversas concentraciones comprendidas entre 0 y 50 nM. Se mide la asociación por inyección de la P-selectina durante 120 segundos; se mide la disociación por lavado de la superficie del chip con solución tampón durante 180 segundos. Los datos de afinidad de los diferentes anticuerpos anti-P-selectina se recogen en la tabla 2. Utilizando un programa informático de Biaevaluation se ajustan los datos cinéticos a un modelo de unión de Langmuir 1:1 de la P-selectina con el anticuerpo monoclonal presentado.

15 Tabla 2

Datos de afinidad medidos por SPR (BIACORE® 2000)				
Anticuerpo HuMab	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)
001	6,08 x 10 ⁵	4,19 x 10 ⁻⁴	1,45 x 10 ⁹	6,89 x 10 ⁻¹⁰
002	8,10 x 10 ⁵	2,13 x 10 ⁻³	3,81 x 10 ⁹	2,63 x 10 ⁻⁹
003	6,60 x 10 ⁵	2,91 x 10 ⁻⁴	2,27 x 10 ⁹	4,41 x 10 ⁻¹⁰
005	8,42 x 10 ⁵	2,89 x 10 ⁻⁴	2,91 x 10 ⁹	3,43 x 10 ⁻¹⁰
011	1,77 x 10 ⁶	2,38 x 10 ⁻³	7,44 x 10 ⁸	1,34 x 10 ⁻⁹
012	1,08 x 10 ⁶	1,25 x 10 ⁻⁴	8,65 x 10 ⁹	1,16 x 10 ⁻¹⁰
013	1,46 x 10 ⁶	2,02 x 10 ⁻⁴	7,22 x 10 ⁹	1,39 x 10 ⁻¹⁰
017	7,79 x 10 ⁵	1,39 x 10 ⁻⁵	5,59 x 10 ⁹	1,79 x 10 ⁻¹¹

Actividad inhibitora de los anticuerpos anti-P-selectina en un ensayo de adhesión de base celular y en un ensayo de roseteado

Materiales y métodos

20 Ensayo de adhesión celular

En el ensayo de adhesión se evalúa el efecto de los HuMab en la adhesión de las células HL60 (ATCC CCL 240), similares a leucocitos, sobre la P-selectina que recubre las placas de microvaloración. Las células HL60 se marcan con BCECF-AM (éster acetoximetílico de la 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5-(y -6)-carboxifluoresceína; n° de catálogo 216254, de Calbiochem). Con P-selectina purificada de longitud completa (procedimiento de purificación: ver páginas anteriores) de una concentración de 1 µg/ml en un tampón que contiene 150 mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 20 mM Tris (pH 7,4) y un 0,0005% de Tx100 se recubren a 4°C durante una noche las placas de 96 hoyos (Nunc Immunoplate Maxisorp F96). A continuación se bloquean los hoyos con el tampón mencionado anteriormente que contiene un 3,5% de albúmina de suero bovino (BSA, Fluka) a temperatura ambiente (RT) durante 2 h. Se preincuban los hoyos con 50 µl de diferentes diluciones de los HuMab anti-P-selectina o con anticuerpos anti-P-selectina de ratón de referencia (WAPS 12.2, la correspondiente línea celular de hibridoma facilitada por la ATCC) en el tampón mencionado anteriormente que contiene un 1% de BSA a RT durante 20 minutos. Se añaden las

células HL60 marcadas (50 μ l, 70.000 células/hoyo) y se dejan unir a RT durante 45 min. En algunos ensayos se preincuban las células HL60 con 20 μ g/ml de IgG1 humano durante 30 minutos antes de introducir las en los hoyos, con el fin de bloquear los receptores Fc. Una vez eliminadas las células HL60 sin fijar mediante un lavado suave (4 veces con el tampón mencionado anteriormente), las células adherentes se someten a una lisis con 120 μ l de NP-40 (Fluka; al 1% en H₂O). Se transfieren 100 μ l del líquido sobrenadante a placas para medir la fluorescencia respectiva en una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 538 nm empleando para ello un espectrómetro de luminiscencia LS 50B (Perkin Elmer).

Ensayo de roseteado

Para evaluar el efecto de los anticuerpos en la interacción de las plaquetas activadas con las células HL60 se lleva a cabo un ensayo de roseteado (Jungi y col., Blood 67:629 (1986)) combinado con un análisis citofluorimétrico de doble color (Evangelista y col., Blood 88:4183 (1996)). Se preparan plaquetas humanas lavadas del modo descrito (Fox y col., Methods Enzymol. 215:45 (1992)). Se activan con trombina (conc. final: 1 U/ml) durante 5 min y se marcan con un anticuerpo p1-36 antihumano GPIIb conjugado con FITC (Kouns y col., J. Biol. Chem. 267:18844 (1992)). Seguidamente se incuban 1,4–2x10⁶ plaquetas dentro de 70 μ l de una solución de Tyrode con diferentes diluciones de los HuMab (100 μ l) en la oscuridad, a RT durante 30 min. Se añaden 50 μ l de una suspensión de células HL60 (en solución de Tyrode) ajustada a 20x10⁶/ml. Se marcan las células HL60 por incubación con 20 μ l de un anticuerpo CD45 antihumano conjugado con PE (ficoeritrina) (nº de código: 555483, de Pharmingen). Después de incubar las células HL60 marcadas con las plaquetas y los HuMab en tubos FACS (Becton Dickinson) a temperatura ambiente durante 30 min, se analiza la formación de agregados mixtos o rosetas midiendo la fluorescencia del marcador tanto en plaquetas como en células HL60 empleando para ello un FACScan (Becton Dickinson). Se captan la difusión frontal y lateral así como las señales del verde (FITC) y del rojo (PE) mediante amplificación logarítmica con longitud de onda de excitación de 488 nm y longitud de onda de emisión de 530 nm (FITC) y de 570 nm (PE), respectivamente. Se realiza una compensación electrónica para eliminar el solapamiento espectral. Se identifican las células HL60 sobre la fase de la difusión frontal y lateral. Se efectúa una estimulación (gating) de casos identificados como células HL60 para excluir las plaquetas simples. Se miden cinco mil casos de células HL60 estimuladas en cada muestra. Se utiliza una muestra, en la que se mezclan plaquetas no activadas o plaquetas activadas con trombina con células HL60 en presencia de EDTA (10 mmol/l), para establecer el umbral en la escala de fluorescencia verde. El porcentaje de células HL60 superior al umbral representa el porcentaje de plaquetas que se fijan sobre células HL60. El desplazamiento de la fluorescencia del marcador de plaquetas hacia valores de fluorescencia más bajos refleja la reducción del número de agregados mezclados con un número mayor de plaquetas adheridas en favor de un incremento del número de agregados mezclados con un número bajo de plaquetas adheridas.

Resultados:

En el ensayo de adhesión de las células HL60, los anticuerpos de la P-selectina inhiben la adhesión de las células HL60 sobre la P-selectina purificada con valores de IC₅₀ comprendidos entre 0,08 y 0,5 μ g/ml. Aunque las mutaciones se introducen en la porción Fc del anticuerpo, las dos variantes IgG4 e IgG1 de los HuMab son más potentes que el anticuerpo original con valores de IC₅₀ entre 0,08 y 0,11 μ g/ml según se ilustra en la figura 1. Cuando se preincuban las células HL60 con IgG1, la potencia de los anticuerpos originales no mutados aumenta con una reducción en un factor de 3 a 4 de los valores de IC₅₀, según se pone de manifiesto para el HuMab 002 en la figura 1. Este resultado sugiere que la mayor eficacia de los mutantes en el ensayo de adhesión se debe ante todo a la eliminación de la adhesión de las células HL60 sobre la P-selectina gracias a la porción Fc del anticuerpo con los receptores Fc γ .

En el ensayo de roseteado que evalúa la adhesión de las plaquetas activadas humanas que expresan la P-selectina sobre las células HL60, los valores de IC₅₀ de los HuMab son incluso inferiores a los del ensayo de adhesión debido al bajo número de receptores de P-selectina en este ensayo (IC₅₀: 0,05 – 0,3 μ g/ml, con preferencia entre 0,05 y 0,2 μ g/ml). La eficacia de las variantes de Fc de los HuMab correspondientes tiende a aumentar si se compara con el anticuerpo original no mutado (fig. 2). La preincubación de las células HL60 con IgG1 e IgG4 antes de la incubación con las plaquetas activadas no afecta de modo significativo la actividad inhibitoria tanto de los mutantes como del anticuerpo original, indicando un papel menos acusado de la fijación mediada por los receptores Fc γ en el ensayo de roseteado si se compara con el ensayo de adhesión.

Reactividad cruzada de los anticuerpos de la P-selectina con la P-selectina de especies animales

Materiales y métodos

La reactividad cruzada de los HuMab de la P-selectina se evalúa midiendo (i) la fijación de los HuMab sobre las plaquetas activadas de la rata y del mono cinomólogo aplicando un análisis FACS y (ii) su actividad inhibitoria en el ensayo de roseteado que evalúa la adhesión de las plaquetas de la rata y del cinomólogo sobre las células HL60.

Para medir la fijación de los HuMab sobre plaquetas activadas de rata y cinomólogo, se lavan las plaquetas de la rata y del cinomólogo y se preparan de modo similar al aplicado para la preparación de plaquetas humanas lavadas (ver páginas anteriores). Se activan con trombina (conc. final: 1 U/ml) durante 5 min. Se incuban las plaquetas

activadas con diferentes diluciones de los HuMab (20 µl) a RT durante 30 min. Después de la unión de los HuMab se fijan las plaquetas con PFA del 2% a RT durante 15 min. Se lavan las muestras con tampón Tyrode y se resuspenden en 300 ml de Tyrode. La unión de los HuMab se detecta con un fragmento F(ab')₂ conjugado con FITC de un IgG de conejo antihumano (código nº F0056, de Dako). Como anticuerpo de control que presenta P-selectina de rata se utiliza un anticuerpo policlonal anti-P-selectina de conejo antihumano (código nº 09361A, de Pharmingen).

Para medir el efecto inhibitor de los HuMab de la P-selectina en el ensayo de rosetado se preparan plaquetas lavadas de rata y de cinomólogo del modo ya descrito para las plaquetas humanas. Se lleva a cabo el ensayo de rosetado esencialmente del modo ya descrito para las plaquetas humanas. Para el marcado de las plaquetas del cinomólogo se emplea el anticuerpo pI-36 antihumano GPIIb conjugado con FITC, mientras que las plaquetas de rata se marcan con el anticuerpo antirrata CD61 de ratón conjugado con FITC (código nº 554952, de Pharmingen).

Resultados

Ninguno de los anticuerpos específicos de la P-selectina de la invención, que inhiben funciones mediadas por la P-selectina humana, demostró fijarse sobre la P-selectina de rata o inhibir la formación de agregados mezclados, compuestos por plaquetas de rata y células HL60, tal como se pone de manifiesto en algunos ejemplos de la fig. 3a. Sin embargo, los HuMab de la P-selectina se fijan sobre e inhiben la P-selectina del cinomólogo (fig. 3b).

Selectividad de los anticuerpos de la P-selectina frente a la E- y la L-selectina

Materiales y métodos

La selectividad de los HuMab de la P-selectina frente a la E- y la L-selectina se determina en un ensayo ELISA sin células que mide la fijación de los anticuerpos sobre la E- y L-selectina recombinantes (ADP1 y ADP2, R&D Systems) y en un ensayo ELISA con células que mide la fijación de los anticuerpos sobre los transfectantes CHO de la E-selectina y los transfectantes 300.19 de la L-selectina (los transfectantes se generan del modo descrito por Goetz y col., J. Cell. Biol. 137:509 (1997); Ley y col., Blood 82:1632 (1993)).

En el ensayo ELISA sin células se recubren con las P-, E- o L-selectina recombinantes en una concentración de 1 µg/ml en un tampón que contiene 150 mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 20 mM Tris (pH 7,4) más un 0,0005% de Tx100 a 4°C durante una noche las placas de 96 hoyos (Nunc Immunoplate Maxisorp F96). A continuación se bloquean los hoyos con el tampón mencionado anteriormente que contiene un 3,5% de albúmina de suero bovino (BSA, Fluka) a RT durante 2 h. Se preincuban los hoyos con 50 µl de diferentes diluciones de los HuMab de la P-selectina o del anticuerpo de ratón de la P-, E-selectina de referencia (BBA26; R&D Systems) y del anticuerpo de cabra de la L-selectina (AF728; R&D Systems) en el tampón mencionado anteriormente que contiene un 1% de BSA a RT durante una noche. La fijación de los HuMab se detecta empleando un IgG antihumano biotinilado (Amersham, RPN1003, concentración final: 1:1000) o para los anticuerpos de control los IgG correspondientes biotinilados antirratón o anticabra. Después de una incubación de 1 h se lavan los hoyos (3 veces) con el tampón mencionado anteriormente y se añaden 0,1 ml del complejo de estreptavidina-peroxidasa biotinilada (Amersham, RPN1051), diluido 1:750 en el tampón mencionado que contiene un 0,1% de BSA durante 30 min. Seguidamente se lavan los hoyos y se añaden 0,2 ml de la solución de sustrato de peroxidasa que contiene ABTS (2,2'-azino-di-(3-etilbenzotiazolina sulfonato), Boehringer, Mannheim) (solución patrón de ABTS: 1 ml de 40 mM ABTS, 5 µl de H₂O₂ del 30 % y 20 ml de 0,1 M acetato Na, 0,05 NaH₂PO₄). Se interrumpe la reacción al cabo de unos 10 min empleando 50 µl de citrato 0,1 M y un 0,01% de NaN₃. La reacción del color se lee en 405 nm.

En el ensayo ELISA con células se siembran los transfectantes CHO de la P- y la E-selectina, después de separar las células de la solución de disociación celular (Sigma C5914), en cada uno de los 96 hoyos de las placas (TC Microwell F96 Nunc 167008) ajustados a 100.000 células/hoyo y se cultivan en los medios respectivos a 37°C durante una noche (medio para los transfectantes CHO de la P-selectina: DMEM + 10% FCS + 2 mM glutamina + penicilina 100 U/ml /estreptomomicina 100 µg/ml; medio para los transfectantes de la E-selectina: HAM F-12 + 10% FCS + 2 mM glutamina + penicilina 100 U/ml /estreptomomicina 100 µg/ml + 0.1% Fungizone + 100 µg/ml de neomicina). Después de eliminar los medios y bloquear los hoyos con tampón A-T (150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 20 mM Tris (pH 7,4)) que contiene un 3% de TopBlock (código nº TB232010; Juro) durante 1 h, se añaden 50 µl de diferentes diluciones de los HuMab de la P-selectina o del anticuerpo de referencia de ratón de la P- y la E-selectina (ver antes) en el tampón mencionado anteriormente que contiene un 1% de TopBlock y un 0,1% de azida y se incuban a RT durante 60 min. Después de lavar los hoyos (4 veces), se detectan los anticuerpos fijados aplicando las mismas etapas que se mencionan en el ensayo ELISA sin células.

Dado que las células 300.19 de la L-selectina son células en suspensión, se ha tenido que modificar el formato del ELISA con células depositando los transfectantes 300.19 de la L-selectina en placas filtro de poliestireno de 96 hoyos (Corning 3510). Utilizando las placas filtro se eliminan las soluciones de bloqueo y de incubación por filtrado de las mismas a través del fondo de las placas, por lo demás el protocolo es el mismo que se ha aplicado a las células CHO de la P- y E-selectina. Como controles se emplean CHO y 300.19 no transfectadas.

Resultados

Los anticuerpos de la invención son muy selectivos frente a la E- y la L-selectina. Se fijan sobre las células CHO de la P-selectina con valores de EC50 comprendidos entre 0,01 y 0,08 µg/ml, con preferencia entre 0,01 y 0,04 µg/ml, mientras que los valores de EC50 de las células CHO de la E-selectina y las 300.19 de la L-selectina se sitúan claramente por encima de 50 µg/ml, con preferencia por encima de 100 µg/ml. El HuMab 002 tiene la selectividad más elevada con un factor de selectividad frente a la E- y la L-selectina de más de 4.000 en el ensayo ELISA con células. Además, el HuMab 002 no se fija sobre los transfectantes de la E- y L-selectina por encima de los niveles de base hasta una concentración de 100 µg/ml. La selectividad de las variantes IgG4v1 e IgG1v1 de Fc del HuMab 002 es similar a la del HuMab 002 original (fig. 4a-c).

10 Actividad inhibitoria "ex vivo" de los anticuerpos de la P-selectina en un sistema de flujo sanguíneo humano completo

Efecto de los HuMab de la P-selectina en la adhesión de los leucocitos a una monocapa de plaquetas

Materiales y métodos

15 Para abordar el efecto de los anticuerpos de la P-selectina en el reclutamiento de leucocitos hacia sitios de lesión de pared vascular y trombos de plaquetas se utiliza un sistema de flujo sanguíneo humano completo, que permite medir la interacción de los leucocitos humanos y las plaquetas humanas en diferentes velocidades de cizallamiento, esencialmente del modo ya descrito (Kirchhofer y col., Blood 89:1270 (1997)). En un dispositivo paralelo de perfusión sobre una superficie de colágeno que simula un pared vascular desnuda lesionada. Se preparan las hojas de tapa recubiertas de colágeno del modo descrito (Kirchhofer y col., Blood 89:1270 (1997)). Se colocan en tres cámaras paralelas de la placa de perfusión. Para permitir la medición de las diferentes velocidades de cizallamiento (65/s y 280/s) se utilizan diferentes dimensiones de cámaras de perfusión y se perfunde la sangre sobre las hojas de tapa recubiertas con colágeno con un flujo constante de sangre de 1 ml/min que se controla con bombas individuales de rodillo situadas en posición distal con respecto al dispositivo de perfusión. Inmediatamente después de la extracción de la sangre de la vena y de separar la sangre en tres tubos se añade un inhibidor GPIIb/IIIa (0,5 µmol/lamifiban) para impedir la agregación plaquetaria y generar monocapas de plaquetas. Al mismo tiempo se administran los anticuerpos de la P-selectina (los HuMab, los mutantes, los correspondientes anticuerpos de referencia o los IgG1 e IgG4 humanos como controles) en diferentes concentraciones y seguidamente se introduce la mezcla del inhibidor de sangre en la cámara de perfusión que contiene las hojas de tapa recubiertas con colágeno. Después de un período de perfusión de 5,5 minutos se perfunde el PBS a través de la cámara de perfusión sin interrumpir el flujo durante 3 min. Después de una breve interrupción del flujo se fijan las cámaras con un 3% de paraformaldehído en PBS a 1 ml/min durante 2 min. A continuación se retiran las hojas de tapa de las cámaras, se fijan de nuevo durante 1 h en un 3% de paraformaldehído en PBS a 4°C y se almacenan en PBS-0,03% de azida sódica. Para evaluar el número de leucocitos que se han adherido a la monocapa de plaquetas, después de secar con aire las hojas de tapa, estas se tiñen con una solución de Diff-Quick (Dade Behring AG) y se impregnan en Merckoglas (Merck, Germany). Se utiliza un sistema de análisis por la imagen (MCID, Imaging Research Inc.) para determinar el número de leucocitos adheridos a una superficie estándar, orientada en sentido perpendicular al flujo de la sangre, separada 1 mm del comienzo de las hojas de tapa. Con una velocidad de cizallamiento de 65/s y de 280/s, el área sobre la que se cuenta el número de leucocitos es de 3,1 mm² y 2,1 mm², respectivamente.

40 Resultados

Los HuMab de la P-selectina inhiben la adhesión de los leucocitos a la monocapa de plaquetas de un modo dependiente de la concentración. En una velocidad de cizallamiento de 65/s y una concentración de 10 µg/ml, los HuMab inhiben la adhesión de los leucocitos en un 60 – 99 %, con preferencia en un 70-99 %. El efecto inhibitorio de los HuMab es más pronunciado cuando la velocidad de cizallamiento es mayor, es decir, de 280/s (más próxima a una situación arterial) si se compara a una velocidad de cizallamiento venosa de 65/s. En conjunto, a una velocidad de cizallamiento de 280/s el número de leucocitos adheridos es menor que en la velocidad de 65/s. Si se comparan las variantes Fc con los correspondientes anticuerpos originales, aquellas tienen una actividad inhibitoria similar en la cámara de perfusión "ex vivo", tal como se ha demostrado para el HuMab 002 y sus variantes IgG4v1 e IgG1v1 (Fig.5). El aumento de la actividad inhibitoria de los mutantes frente al anticuerpo original, que se ha constatado en los ensayos "in vitro", no se observa en la cámara de perfusión "ex vivo", lo cual puede ser debido a la saturación de los receptores Fcγ de los leucocitos en la sangre humana total.

Efecto de los HuMab de la P-selectina en la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales

Materiales y métodos

55 Para abordar el potencial antiinflamatorio de los HuMab de la P-selectina en condiciones de cizallamiento se utiliza el sistema de flujo sanguíneo humano mencionado antes para un ensayo en el que las células endoteliales se aplican como cubierta sobre hojas de tapa. Se aíslan células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) del cordón umbilical por digestión con colagenasa de tipo II (Roche, Suiza) con arreglo al método de Jaffe y col., 1993 (añadir la cita completa). Se cultivan en frascos de cultivo de tejido cubierto con un 1 % de gelatina en un medio 199

(M199, Sigma, Alemania) suplementado con un 20% de suero fetal de ternera (Gibco, Auckland), 100 IU/ml de penicilina (Gibco, Auckland), 0,1 mg/ml de estreptomina (Gibco, Auckland), 2 mmol/l de L-glutamina (Gibco, Auckland), 10 U/ml de heparina (Sigma) y 50 µg/ml de EC suplemento de crecimiento (Sigma, Alemania). Se cultivan las HUVEC hasta confluencia (aprox. 4 días), se pasan con tripsina/ácido etilendiaminotetraacético (Gibco, Auckland) y se siembran sobre hoja de tapa de plástico Thermanox (aprox 200.000 EC/hoja de tapa) recubierta previamente con un 1% de gelatina (Fluka, Alemania). Se dejan sedimentar las HUVEC que se convierten en confluyentes en un período de 1-2 días. Se estimulan con 20 ng/ml de IL-4 (R&D Systems) 24 h antes de iniciar la perfusión y con histamina 10^{-4} M (Fluka, Germany) 5-10 min antes de la perfusión. Cada ensayo se realiza con las HUVEC del pasaje 1. Se colocan las hojas de tapa con las monocapas confluyentes de las HUVEC estimulados en las cámaras de perfusión de placas paralelas del modo descrito antes. De modo semejante a los ensayos de perfusión descritos antes, se extrae sangre total de donantes sanos. Sin embargo, en estos ensayos se anticoagula la sangre con un inhibidor de trombina Ro-46-6240 (10 µM) y se preincuba con diferentes concentraciones de los anticuerpos de la P-selectina (HuMab, mutantes, anticuerpos de referencia correspondientes) o IgG1 e IgG4 humanos como controles durante 5 min inmediatamente antes de la perfusión a través de las células endoteliales activadas. Se ajusta el caudal de sangre a 1 ml/min, la velocidad de cizallamiento a 65/s y el tiempo de perfusión a 5,5 min. Después de un período de lavado de 3 min con PBS, se fijan las HUVEC y los leucocitos adheridos con un 3% de paraformaldehído durante 2 min en las mismas condiciones de flujo ya descritas. A continuación se retiran las hojas de tapa de las cámaras, se sumergen en un fijador fresco durante 1 h y se almacenan en PBS-0,02% de azida sódica. Para los análisis morfométricos se tiñen los leucocitos con un anticuerpo de ratón contra el antígeno CD45 común de leucocitos, que se ha marcado previamente empleando una inmunoglobulina antirratón biotinilada modificada (Animal Research Kit, Dako, USA). Los núcleos se contratiñen con hematoxilina (J.T. Baker, Holanda).

Resultados

La estimulación de las HUVEC con la combinación de la IL-4 y la histamina da como resultado la expresión de la P-selectina y la adhesión de los diferentes tipos de leucocitos a los granulocitos (incluidos los PMN y los eosinófilos) que constituyen la porción predominante de los leucocitos adheridos. Los HuMab de la invención inhiben la adhesión de la población total de leucocitos en un 60-90 % en 3 µg/ml. La actividad inhibidora global de las variantes Fc no es significativamente diferente de la de los HuMab no mutados.

Los HuMab de la P-selectina no presentan un efecto diferencial en los diferentes subtipos de leucocitos. El efecto en los granulocitos es más pronunciado si se compara con los leucocitos mononucleados. Los anticuerpos de la invención inhiben la adhesión de los granulocitos (incluidos los PMN y los eosinófilos) en un 90-99 %, de los monocitos en un 50-88 % y de los linfocitos en un 5-40 %. La respectiva disminución de los números absolutos de los diferentes subtipos de leucocitos se presenta a título representativo en la figura 6 para el IgG4v1.

Potencial de los HuMab de la P-selectina para activar el sistema de complemento

Ensayo ELISA de fijación de C1q y C3c

Para determinar la capacidad de los anticuerpos de la invención para inducir la fijación de C1q y la activación de C3 se lleva a cabo un ensayo ELISA. El C1q forma parte del sistema inmune adaptador y, después de unirse a complejos inmunes, dispara la activación secuencial de diversos cimógenos. Las enzimas a su vez provocan la rotura de las moléculas de C3 lo cual puede traducirse en el inicio de una reacción inflamatoria, la opsonización de partículas extrañas o aberrantes y la lisis de las membranas celulares.

En principio se recubre la placa ELISA con una serie de concentraciones del anticuerpo, al que se añaden C1q o suero humano recogido, como fuentes de C3. La fijación del C1q o C3ε se detecta con un anticuerpo dirigido contra el C1q o C3ε humanos y después con un conjugado marcado con peroxidasa.

El HuMab 002 (el material derivado del hibridoma y del transfectoma transitorio), sus variantes mutantes y los anticuerpos de control se ensayan en concentraciones de 0,16-20 µg/ml. Como control negativo se utiliza un IgG4 humano (CLB, Holanda, 0,5 µg/ml patrón), que fija muy débilmente el C1q. Se incorpora como control positivo el IgG1 humano (Sigma, 2 µg/ml patrón). Para la detección del C1q se utiliza un anticuerpo de conejo dirigido contra el C1q (Dako) y un anticuerpo IgG de cerdo anticonejo, conjugado con peroxidasa de rábano picante (horseradish) (Sigma). Para la detección del C3ε se aplica un anticuerpo C3 de ratón antihumano y un anticuerpo IgG de conejo antirratón, conjugados con peroxidasa de rábano picante (Sigma).

Los cálculos relativos a los valores de EC50 o de la fijación máxima en 10 µg/ml (Bmax) de los HuMab ensayados se realizan empleando un ajuste de curva de regresión no lineal (fijación sobre un sitio) con un programa informático de la empresa Graphpad Prism.

Resultados

El HuMab 002 según la invención es capaz de fijar con eficacia el C1q según se desprende de los valores de EC50 de 0,946 µg/ml y 1,159 µg/ml, y de los valores de la Bmax (OD405) de 0,987 y 0,711 para el material derivado del hibridoma y del transfectoma, respectivamente. Como se esperaba, el control negativo humano IgG4 no fija el C1q, como se deduce del valor de la Bmax de 0,222 en OD405. Sin embargo, las tres variantes de Fc ensayadas

(IgG4v1, IgG1v1, IgG1v2) han perdido su capacidad de fijar el C1q, como indican los valores OD405 de la Bmax de 0,132, 0,119 y 0,132, respectivamente (tabla 3). En línea con las capacidades de fijación del C1q, la deposición del C3 sobre el HuMab 002 (derivado de hibridoma y de transfectoma) tiene lugar de un modo dependiente de la concentración de anticuerpo y los valores de EC50 se sitúan entre 2,7 µg/ml y 8,3 µg/ml. No obstante, las tres variantes de Fc son incapaces de iniciar la deposición del C3, tal como indican los valores OD405 de la Bmax de 0,104, 0,156 y 0,133, respectivamente (tabla 3).

Dado que el HuMab 002 interacciona con los componentes del complemento, este anticuerpo tiene el potencial intrínseco de inducir la CDC "in vivo". Por consiguiente, la parte Fc de este anticuerpo se modifica con arreglo a la invención.

10 Tabla 3

	ELISA de C1q		ELISA de C3	
	Bmax (OD405 a 10 µg/ml)	fondo (OD405)	Bmax (OD405 a 10 µg/ml)	fondo (OD405)
HuMab 002 (hibridoma)	0,987	0,079	4,47	0,098
IgG4v1	0,132		0,104	
IgG1v1	0,119		0,156	
IgG1v2	0,132		0,133	
HuMab 002 (transitorio)	0,711		4,071	
IgG4	0,222		0,182	

Potencial de los HuMab de la P-selectina para fijar los receptores Fcγ

Los efectos de citotoxicidad dependientes de los anticuerpos IgG vienen mediados por los receptores Fcγ de las células efectoras. Se investiga mediante análisis FACS la fijación del HuMab 002 derivado de hibridoma y de transfectoma así como de las variantes mutantes y los anticuerpos de control sobre las células efectoras de la sangre humana que expresan el FcγR.

Materiales y métodos

Los transfectantes FcγRI IIA1.6 o las células efectoras recién aisladas se incuban con anticuerpos y se detecta la fijación del anticuerpo con IgG F(ab)₂ de conejo antihumano marcado con FITC (DAKO) o con IgG F(ab)₂ de conejo antihumano marcado con FITC (BD/Pharmingen). Se ensaya el HuMab 002 (material transitorio derivado de transfectoma y/o de hibridoma y variantes mutantes) en una concentración de 1 µg/ml (transfectantes IIA1.6) o de 10 µg/ml (células efectoras). Como control negativo se utiliza la ausencia de anticuerpo primario o IgG4 humano (10 µg/ml). Para detectar la expresión de FcγRI en células IIA1.6 se utiliza el CD65 de ratón antihumano marcado con FITC (BD/Pharmingen). En los ensayos en los que se utilizan células mononucleadas de sangre periférica enriquecidas con células NK, las células NK se identifica por doble tinción empleando el CD56 de ratón antihumano marcado con PE (BD/Pharmingen). Los granulocitos y monocitos se identifican en base al perfil FSC/SSC.

Se incuban las células IIA1.6, transfectante IIA1.6-FcγRI y células efectoras recién aisladas con anticuerpos. Se detecta la fijación del anticuerpo con Rb-α-hulgG F(ab)₂ marcado con FITC (DAKO) o con Rb-α-hulgG F(ab)₂ marcado con FITC (BD/Pharmingen).

Se ensaya el HuMab 002 (material transitorio derivado de transfectoma, de hibridoma y variante mutante) en una concentración de 1 µg/ml en un ensayo de fijación de transfectante IIA1.6-FcγRI. Se utilizan como control negativo las células IIA1.6 de tipo salvaje. Como control de la expresión del FcγRI se utiliza el m-α-huCD64-FITC (BD/Pharmingen).

Se ensaya el HuMab 002 (material transitorio derivado de transfectoma, de hibridoma y variante mutante) en una concentración de 10 µg/ml en el ensayo de fijación de células efectoras. El material transitorio de transfectoma no se somete al ensayo de fijación de granulocitos. Se utiliza el IgG4 (10 µg/ml) como control negativo en todos los ensayos de fijación de células efectoras, excepto en el ensayo de fijación de granulocitos.

Se enriquece la sangre total con células NK empleando un kit de aislamiento de NK (Dynal Biotech ASA, Oslo,

Noruega). Las células NK se identifican por tinción con m- α -huCD56-FITC.

Las PBMC (células mononucleadas de la sangre periférica) se obtienen de sangre total empleando un procedimiento Ficoll descrito en el protocolo incluido en el kit de aislamiento de las células NK (DynaL Biotech ASA, Oslo, Noruega). Se identifican los monocitos en base a su perfil FSC/SSC. Los granulocitos se aíslan de la sangre total empleando el

5 tampón de lisis FACS y se identifican en base al perfil FSC/SSC.

Se incuban las células efectoras recién aisladas con los anticuerpos y se detecta la fijación con IgG F(ab)₂ de conejo antihumanos marcados con FITC (DAKO) o IgG F(ab)₂ de conejo antihumanos marcados con FITC (BD/Pharmingen). Se ensaya el HuMab 002 (material transitorio derivado de transfectoma, de hibridoma y variantes mutantes) en una concentración de 10 μ g/ml. Se utiliza como control negativo la ausencia del anticuerpo primario o el IgG4 humano (10 μ g/ml). Se aíslan las células NK de las muestras de MNC con el kit de aislamiento NK (Miltenyi Biotec, USA). En los ensayos en los que se utilizan células mononucleadas de sangre periférica enriquecidas con células NK, las células NK se identifica por doble tinción empleando el CD56 de ratón antihumano marcado con PE (BD/Pharmingen). Los granulocitos y monocitos se aíslan con arreglo al estado de la técnica a partir de las PBMC (p.ej. con el kit de aislamiento de monocitos (Miltenyi, ver más arriba). Los granulocitos y los monocitos se identifican

10 en base al perfil FSC/SSC.

Resultados

El HuMab 002 según la invención es capaz de fijarse sobre el FcR como indica la fijación sobre granulocitos, monocitos y células NK. Las tres variantes de Fc ensayadas (IgG4v1, IgG1v1 e IgG1v2) han perdido por complejo la capacidad de fijarse sobre las células NK (tabla 4). Además, el HuMab 002 se une eficazmente sobre granulocitos y monocitos, mientras que las variantes mutantes presentan niveles de fijación comparables a la ausencia de anticuerpo primario o de IgG4, tal como indican los porcentajes de células que se unen al anticuerpo en las tablas 5 y 6. Esto indica que las variantes mutantes han perdido la capacidad de interactuar con el FcR de las células efectoras.

20

Dado que el HuMab 002 puede interactuar eficazmente con FcR, este anticuerpo tiene el potencial intrínseco de inducir la citotoxicidad "in vivo" mediada por células dependiente de anticuerpo. La inactivación de la interacción con FcR realizada para las variantes de Fc según la invención impide la ADCC de manera eficaz.

25

Tabla 4

Anticuerpo	fijación a células NK (% de fijación del anticuerpo a células)
ninguno	0,03
HuMab 002 (hibridoma)	90,92
HuMab 002 (transitorio)	37,40
IgG4 humano	0,06
IgG4v1	0,06
IgG1v1	0,12
IgG1v2	0,00

Tabla 5

Anticuerpo	fijación a monocitos (% de fijación del anticuerpo a monocitos)
ninguno	8,5
HuMab 002 (hibridoma)	38,4
HuMab 002 (transitorio)	31,3
IgG4 humano	9,4

IgG4v1	14,5
IgG1v1	12,3
IgG1v2	14,0

Tabla 6

Anticuerpo	fijación a granulocitos (% de fijación del anticuerpo a granulocitos)
ninguno	1,2
HuMab 002 (hibridoma)	63,6
IgG4v1	1,6
IgG1v1	2,1
IgG1v2	2,0

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se fija sobre la P-selectina, no se fija sobre el factor de complemento C1q y tampoco sobre receptores de Fc γ sobre células NK, que contiene una parte Fc derivada de un origen humano y se caracteriza porque dicho anticuerpo es un anticuerpo del subgrupo humano IgG4 en donde S228 se sustituye por P y L235 se sustituye por E, inhibiendo la adhesión de células HL60 similares a leucocitos a P-selectina purificada con un valor IC50 de 0,08 a 0,5 μ g/ml y por comprender las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácido SEQ ID NO: 3 y las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio de cadena variable pesada definido por la SEQ ID NO: 4.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, caracterizado porque es un anticuerpo humano o humanizado.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, que comprende el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 y el dominio variable de cadena pesada definido por la SEQ ID NO 4.
4. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la región constante de cadena pesada humana comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 y la región constante de cadena ligera κ es como se define en la SEQ ID NO: 23.
5. Molécula de ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5.
7. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 6.
8. Un método para la preparación de una molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 7 bajo condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpo y recuperar dicha molécula de anticuerpo de dicho cultivo.
9. Un anticuerpo que se fija a la P-selectina, no fijándose al factor de complemento C1q y tampoco a los receptores Fc γ sobre células NK, conteniendo una parte Fc derivada de origen humano, en donde el anticuerpo es obtenible por la células huésped de la reivindicación 7.
10. Una composición que comprende una molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 9.
11. La composición de la reivindicación 10, que es una composición farmacéutica o de diagnóstico.
12. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 9 y por o menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
13. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 9 para uso en la profilaxis o tratamiento de trastornos inflamatorios y trombóticos.
14. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 9 para uso en la profilaxis o tratamiento de trastornos inflamatorios y trombóticos de conformidad con la reivindicación 13, en donde dicho trastorno es enfermedad oclusiva arterial periférica (PAOD) o isquemia crítica de las extremidades (CLI).
15. Un kit que comprende una molécula de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 9, una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 5, un vector de la reivindicación 6 o una célula huésped de la reivindicación 7.

35

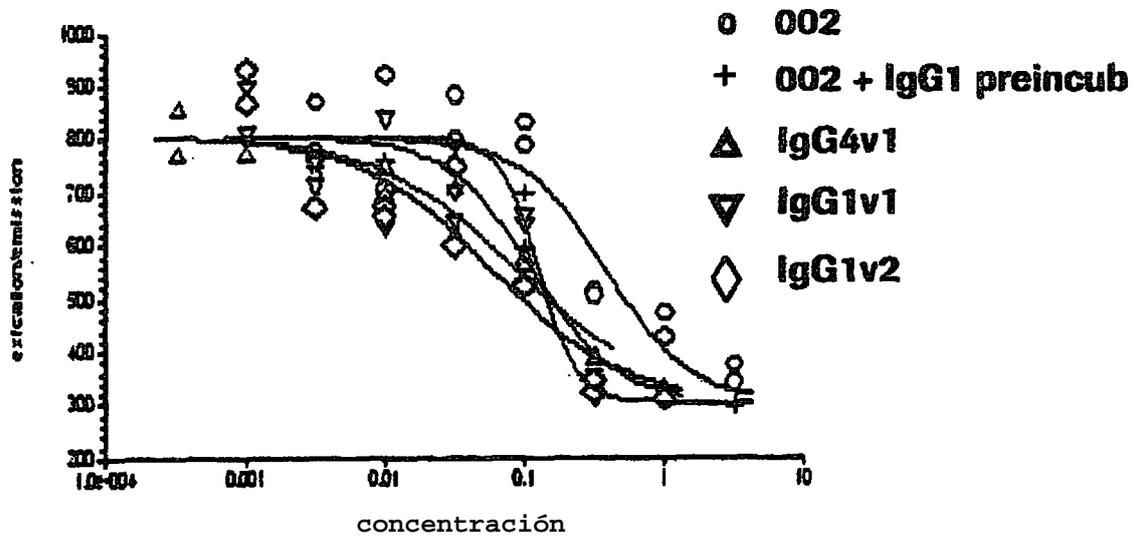


Fig.1

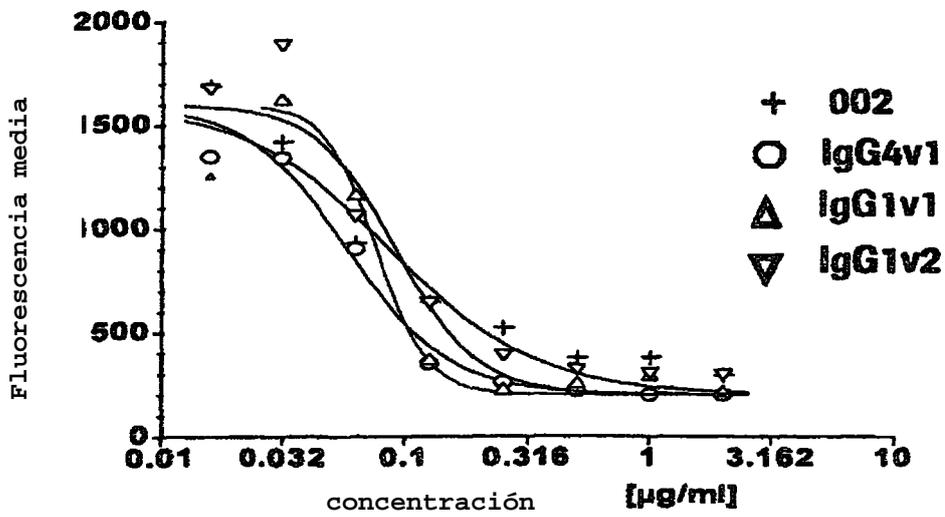


Fig.2

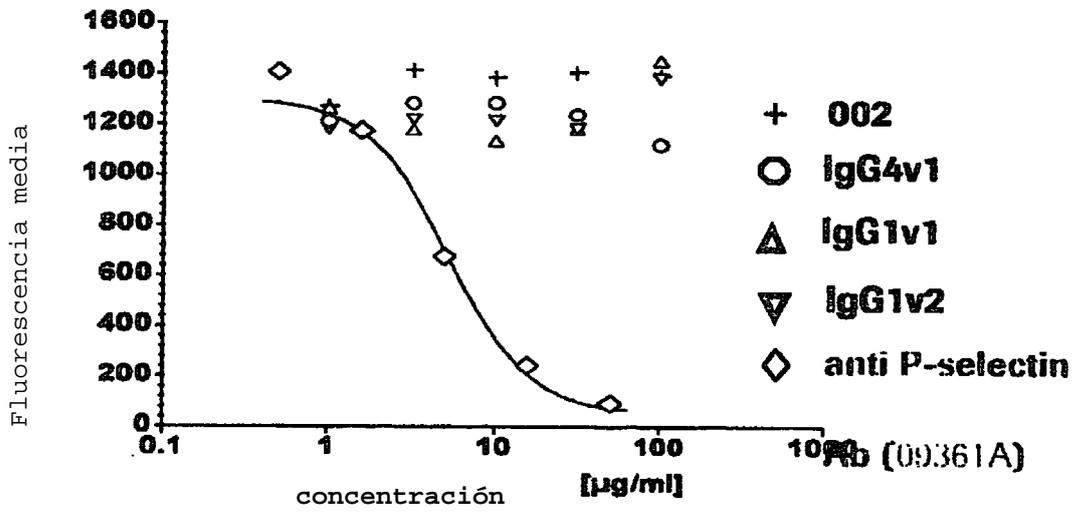


Fig. 3a

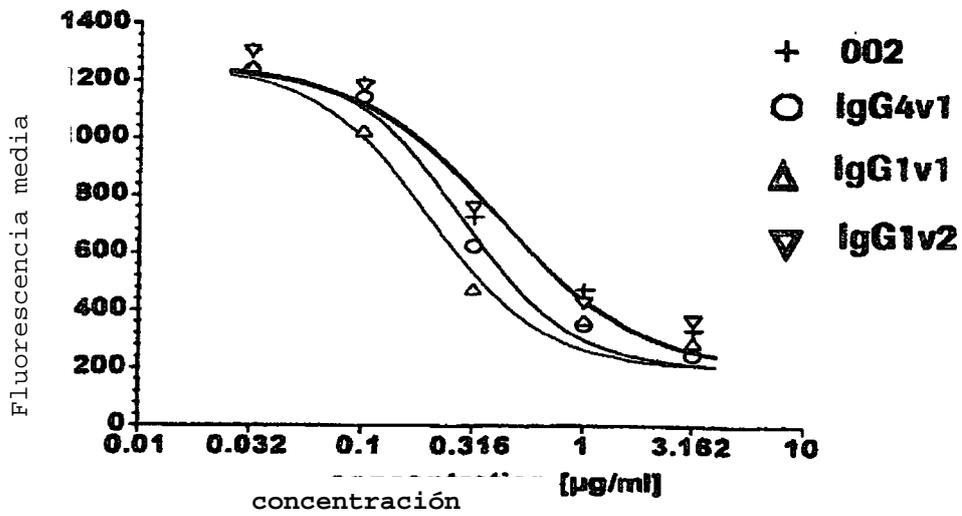


Fig. 3b

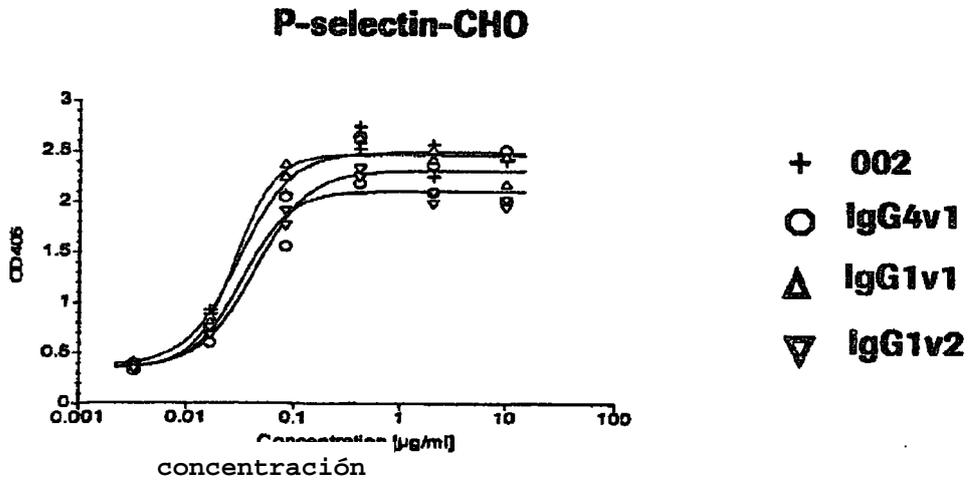


Fig. 4a

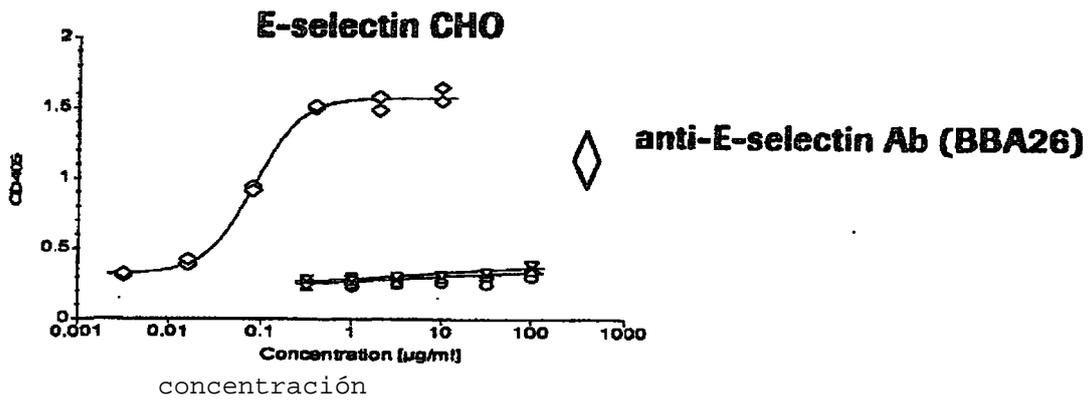


Fig. 4b

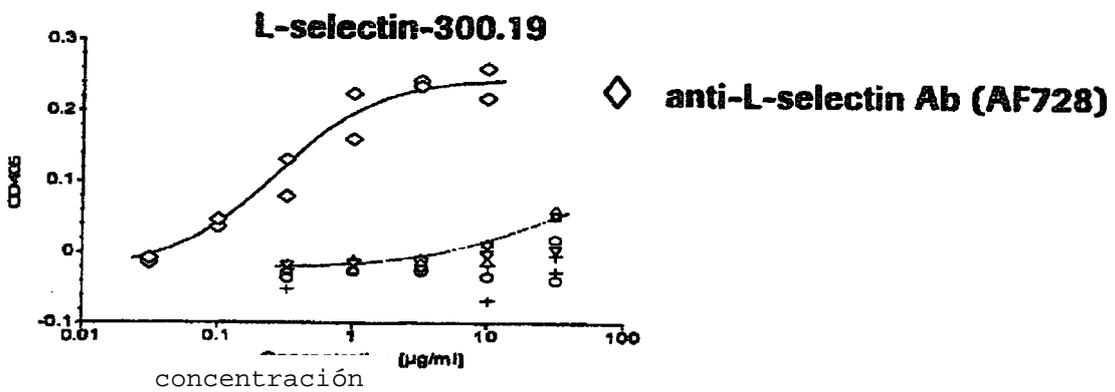


Fig. 4c

Velocidad de cizallamiento: 65/6

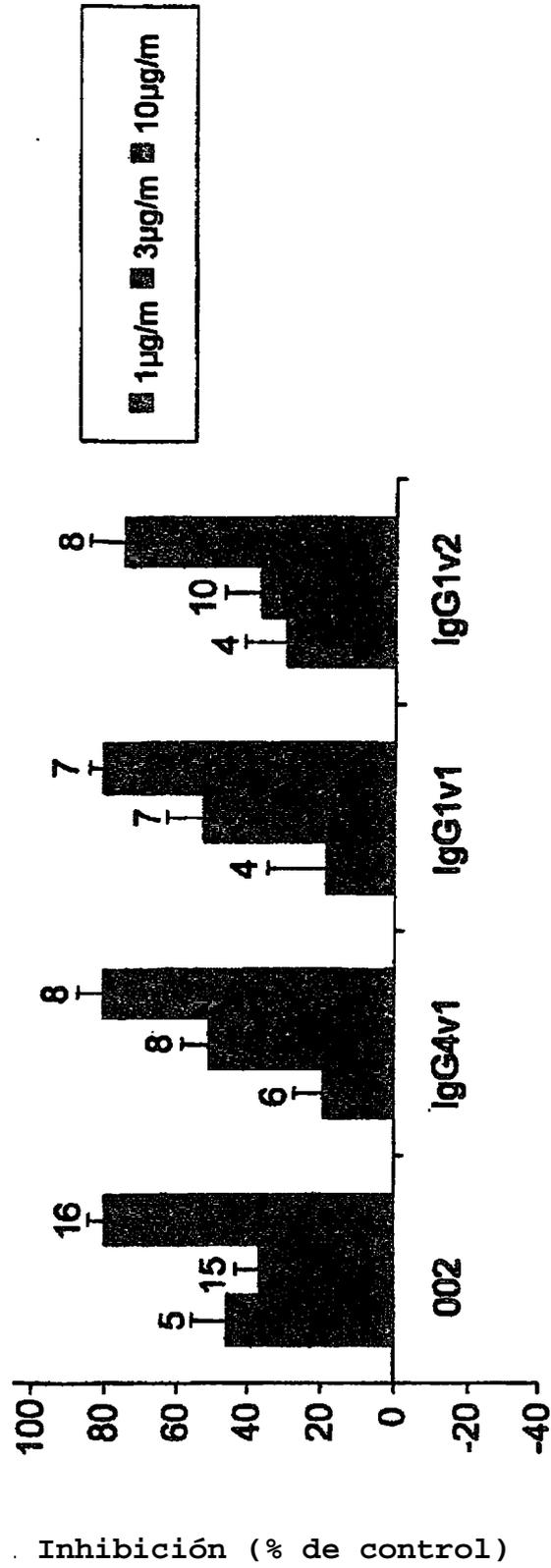


Fig. 5

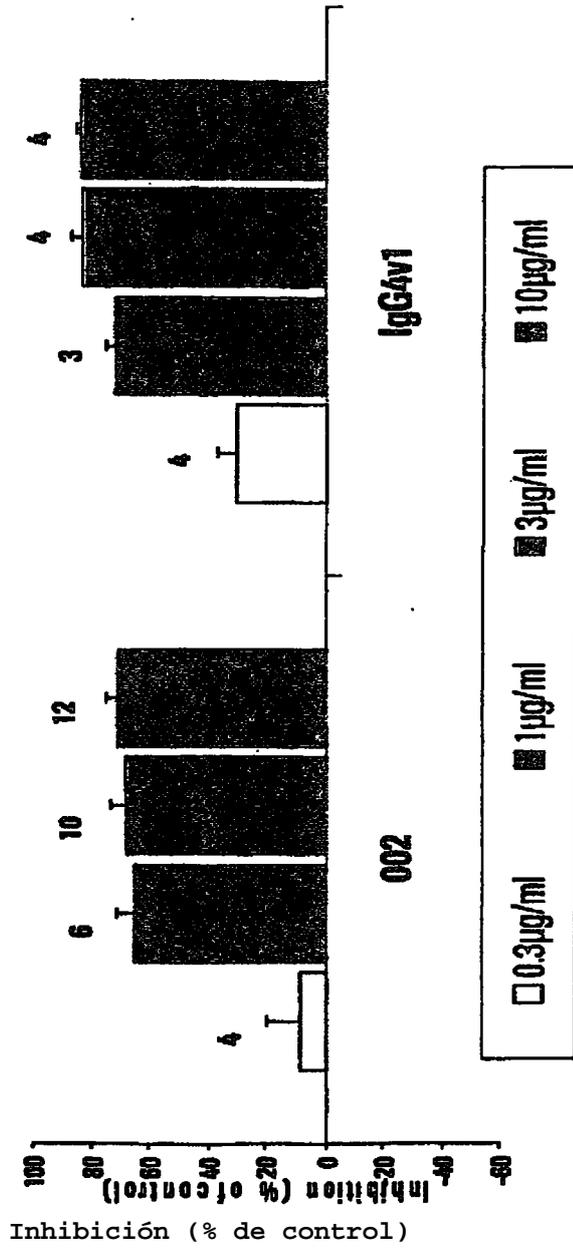
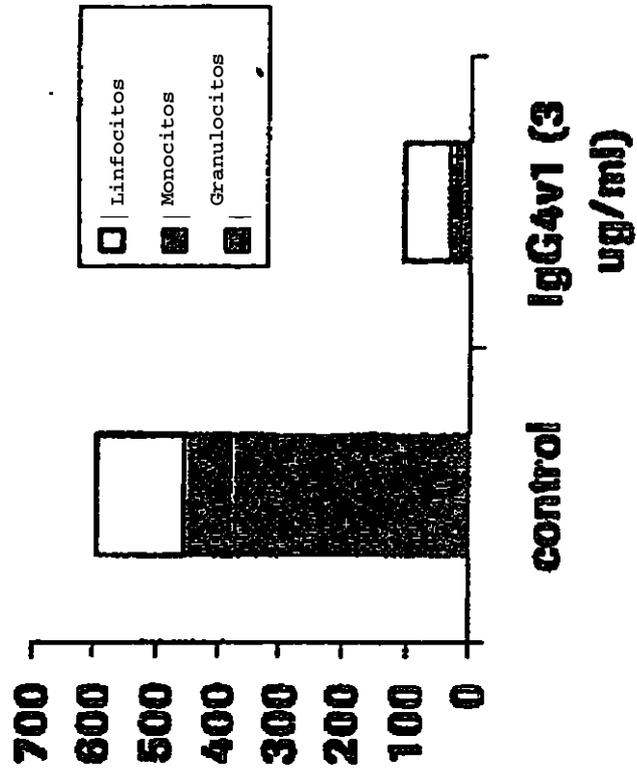


Fig. 6a



Adherencia de leucocitos/
área estandard

Fig. 6b