

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 639**

51 Int. Cl.:

C07K 16/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2004 E 04802719 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 1682580**

54 Título: **Anticuerpo monoclonal humano con efecto reductor de la grasa**

30 Prioridad:

14.11.2003 DE 10353175

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

07.10.2013

73 Titular/es:

**PATRYS LIMITED (100.0%)
517 FLINDERS LANE
MELBOURNE, VIC 3000, AU**

72 Inventor/es:

VOLLMERS, H. PETER

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 424 639 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal humano con efecto reductor de la grasa

La invención se refiere a un polipéptido purificado (SAM-6.10) y su uso en combinación con adyuvantes y/o excipientes habituales para la producción de un medicamento con efecto reductor de la grasa, así como a la producción de un medicamento para el tratamiento de enfermedades renales.

Antecedentes de la invención

Cuando existen unos niveles excesivos de colesterol (hiperlipoproteinemia) en el cuerpo, se produce una calcificación (placa aterosclerótica) de las capas internas de los vasos sanguíneos y un endurecimiento lento y progresivo de las paredes arteriales. En casos extremos, se puede producir la oclusión del vaso o la rotura de la placa y la formación de un trombo. La arteriosclerosis y sus complicaciones (enfermedades coronarias, infarto de miocardio, enfermedad oclusiva arterial periférica, ictus) sigue siendo la causa más frecuente de muerte en el mundo occidental. Se estima que bastante más de la mitad de los recursos disponibles para la asistencia médica se destinan a las consecuencias de la arteriosclerosis. Para aclarar las causas de la aterosclerosis, se han desarrollado varias teorías, de las cuales la teoría de los lípidos es la más considerada de todas.

En términos generales, cuanto mayor es el contenido de colesterol LDL o el contenido de colesterol LDL oxidado en la sangre, mayor es el riesgo de calcificación vascular, por ejemplo, con el resultado de infarto de miocardio. El sobrepeso y la hipercolesterinemia son los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de una arteriosclerosis.

Definiciones y términos

Las grasas como, por ejemplo, el colesterol no son solubles ni en agua ni en el plasma sanguíneo. Para poderlo transportar a regiones individuales del cuerpo, las grasas, una vez que se encuentran en la sangre, se unen a determinadas sustancias (proteínas). Estos compuestos constituidos por lípidos (grasas) y proteínas, se denominan lipoproteínas.

Las "lipoproteínas" del plasma, son complejos hidrosolubles de alto peso molecular que consisten en lípidos (colesterol, triglicéridos, fosfolípidos) y apolipoproteínas. La lipoproteína LDL que contiene colesterol (colesterol LDL) produce aterosclerosis y se denomina colesterol "malo".

El "colesterol" se sintetiza ubicuamente en el cuerpo y es un componente esencial de las membranas celulares y de las lipoproteínas. Al contrario que los triglicéridos y fosfolípidos sintetizados endógenamente, el anillo esterol de la molécula de colesterol no puede degradarse; el colesterol se convierte en el hígado en ácidos biliares o se excreta inalterado a través de la vesícula en el intestino.

En el plasma, el colesterol está en un 25-40 % en forma libre (no esterificado) y hasta en un 60-75 % esterificado con ácidos grasos insaturados. Ambas formas se denominan conjuntamente como colesterol total. Debido a su baja solubilidad en agua, el colesterol se transporta en el plasma como un complejo con las apolipoproteínas. En la sangre, aproximadamente el 70 por ciento del colesterol total se transporta mediante las lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Los "triglicéridos" son ésteres de glicerol con tres residuos de ácido graso. De manera análoga al colesterol, los triglicéridos del plasma, debido a su baja solubilidad, también se transportan unidos a apolipoproteínas.

Las "lipoproteínas" se sintetizan en el hígado o en el intestino y transportan en la sangre sustancias solubles en la grasas como el colesterol.

La clasificación de las lipoproteínas se hace en función de su densidad, se distinguen cinco clases de densidad: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Los quilomicrones, cuya concentración fisiológica en suero en ayunas, al contrario que otras lipoproteínas, es muy baja, son vehículos de transporte para glicéridos exógenos. La distribución fisiológica de las otras lipoproteínas es la siguiente: VLDL 10 %, LDL 70 % y HDL 20 %. Las VLDL son las precursoras de las LDL y el vehículo para el transporte de glicéridos endógenos. Las LDL se originan por hidrólisis de las VLDL. Las LDL y las HDL son reguladoras del colesterol celular y las HDL también regulan la lipólisis (escisión de triglicéridos en glicerol y ácidos grasos libres). Las LDL tienen un diámetro de aproximadamente 20 nm. Las HDL son las más pequeñas (7-10 nm) y las lipoproteínas con más contenido de proteína. Además de las LDL nativas (LDL), en la sangre se detectan LDL oxidadas (LDLox). Las LDLox interactúan con proteínas plasmáticas endógenas, especialmente, glucoproteínas, mediante ligandos específicos y forman complejos LDLox-glucoproteínas.

Las "apolipoproteínas" son un componente de las lipoproteínas y, junto con lípidos polares, rodean a modo de una cubierta externa el núcleo de la lipoproteína compuesto de lípidos hidrófobos. Salvo las LDL, que sólo contienen apolipoproteína B, las diferentes clases de lipoproteínas presentan varias clases de apolipoproteínas estructuralmente diferentes.

Transporte de las lipoproteínas

El colesterol es transportado fundamentalmente por las dos clases de lipoproteínas, LDL y HDL. Las LDL son las principales responsables del transporte del colesterol a las células periféricas que tienen receptores específicos de las LDL. Las HDL permiten y aceleran la salida del colesterol de las células extrahepáticas y de las paredes de los vasos sanguíneos y lo conducen hasta el hígado.

Patogenicidad

En cuanto a la patogenicidad en el metabolismo de los lípidos se puede decir en general que unos niveles elevados de colesterol LDL asociados a niveles reducidos de colesterol HDL representan el aumento de riesgo más pronunciado en el riesgo de aterosclerosis. Por lo tanto, en la patogénesis, las LDL, cuyas partículas contribuyen a la formación de placas ateroscleróticas, y las HDL desempeñan un papel opuesto. Para evaluar el riesgo de infarto, son determinantes el cociente colesterol total/colesterol HDL y, en particular, el cociente colesterol LDL/colesterol HDL. (El papel protector del colesterol HDL ha sido demostrado también en estudios epidemiológicos (estudio Framingham). Las secuelas de la aterosclerosis incluyen, además de cardiopatía coronaria y enfermedades oclusivas arteriales periféricas, especialmente el infarto de miocardio y el ictus).

Probablemente, las LDLox, al igual que las LDL, forman placas ateroscleróticas, representando las LDLox el mayor riesgo para el organismo.

En otras enfermedades, las LDLox también parecen jugar un papel importante. En pacientes con insuficiencia renal crónica y diabetes, la concentración de complejos LDLox-glucoproteína es mayor que en pacientes sanos.

Las LDL son eliminadas por el hígado y por los macrófagos de la corriente sanguínea. Los macrófagos son células del sistema de defensa frente a organismos extraños que son capaces de fagocitar partículas más grandes.

La vía depuradora (scavenger pathway) es un modelo conocido para explicar la captación de las partículas por las células (fagocitosis). La captación de partículas sólidas (desechos tisulares, cuerpos extraños, bacterias o placas de LDL) y su inclusión en el interior de la célula con la posterior degradación intracelular tiene lugar mediante fagocitosis. Las células con capacidad de fagocitosis, también conocidas como fagocitos, se dividen fundamentalmente en macrófagos tisulares y monocitos sanguíneos móviles.

En la "fagocitosis", tras la adhesión de las partículas a las membranas celulares de los fagocitos mediante unión a los receptores Fc y del complemento presentes en la membrana, se produce la activación de estructuras contráctiles dentro del citoplasma. Mediante invaginaciones locales de las membranas celulares se produce la inclusión de las partículas en las vacuolas citoplasmáticas.

Los denominados fagocitos barrederos (depuradores) se encuentran en los ganglios linfáticos y a lo largo de los cordones medulares de la médula espinal. Durante el paso de la linfa desde las terminaciones aferentes a las eferentes de los ganglios linfáticos, las células con capacidad de fagocitosis eliminan las partículas de antígenos.

Además, se sabe que la adherencia a las células fagocíticas, como leucocitos polimórficos y macrófagos se ve aumentada por la unión de inmunoglobulinas (Ig) a la superficie de bacterias (y a otros antígenos). Se cree que esta mayor adherencia se consigue mediante la adición de la fracción Fc de la inmunoglobulina a los receptores Fc de los fagocitos. Dependiendo de la afinidad de los antígenos por la adhesión de (o unión de) anticuerpos, más rápidamente se absorberá y digerirá el complejo antígeno-anticuerpo por las células fagocíticas. El recubrimiento de la superficie del anticuerpo con inmunoglobulinas se denomina también adherencia asociada a opsonina (Fc), la cual desempeña un papel importante en la defensa inmunitaria.

Los anticuerpos que se unen a la superficie a las células bacterianas son capaces de fijar determinados componentes de los líquidos extracelulares. Estos componentes se conocen en conjunto como el "complemento". Los experimentos realizados en animales han demostrado que la fagocitosis de las células recubiertas de anticuerpos es más lenta en aquellos animales con deficiencia en el complemento. Por lo tanto, se sugiere que durante la opsonización existe una sinergia entre los anticuerpos y el complemento.

Getz GS, 2001: "The first human monoclonal antibody to oxidized LDL," Arterioscler Thromb Vasc Biol volume 21, páginass 1254-1255, describe un anticuerpo monoclonal humano que se une específicamente a las LDL oxidadas, pero no a las LDL nativas y se discute su posible uso diagnóstico y terapéutico en relación con la arteriosclerosis.

El documento WO 03/048321 A2 divulga un anticuerpo híbrido o un fragmento del mismo. En particular, la Figura 3a muestra algunas secuencias de aminoácidos de las cadenas V_L de anticuerpos.

50 Descripción de la invención

El efecto de los medicamentos que reducen el colesterol LDL conocido en el estado de la técnica se basa en la inhibición de la enzima clave de la síntesis del colesterol (ESC). Como inhibidores de la síntesis de colesterol, cabe mencionar, por ejemplo, la sustancia comercializada con el nombre comercial de Lipobay. Los efectos secundarios de los inhibidores de la ESC son generalmente importantes e incluyen, entre otros, trastornos gastrointestinales,

insomnio, vértigo, alteraciones visuales, reacciones alérgicas y caída de cabello. Sólo en fase experimental y en casos de hipercolesterolemia familiar grave, se contempla la aplicación de la terapia génica que va dirigida a la transferencia del gen del receptor LDL a hepatocitos autólogos.

5 Hasta el momento no existe en el mercado ninguna sustancia reductora de las grasas que apenas esté asociada a efectos secundarios. En particular, hasta el momento no se conocen anticuerpos que induzcan una mayor acumulación intracelular de lipoproteínas. Aunque se conoce el papel perjudicial que tienen las lipoproteínas en las enfermedades renales (daño inducido por lípidos en las células del sistema de filtración glomerular del riñón), todavía no existe ninguna estrategia terapéutica basada en anticuerpos para las enfermedades renales, en especial, para la necrosis glomerular.

10 La tarea de la invención es la generación de una nueva sustancia o de una nueva clase de sustancias para la producción de un medicamento para la reducción del colesterol LDL en seres humanos y animales con el objetivo ventajoso de reducir el riesgo de infarto de miocardio.

15 Para resolver la tarea, se propone un anticuerpo purificado que tiene una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L), que es al menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H), que es al menos el 90 % idéntica a la SEC ID N° 3 y que se une a las lipoproteínas de alta densidad (LDL), especialmente al colesterol-LDL.

20 Además, el objeto se logra mediante un anticuerpo, que contiene las regiones determinantes de complementariedad (CDR), que presentan en la región variable de la cadena pesada (V_H) las secuencias de aminoácidos Ser-Tyr-Ala-Met-His (CDR1), Val-Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Ser-Asn-Lys-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Ser-Val-Lys-Gly (CDR2) y Asp-Arg-Leu-Ala-Val-Ala-Gly-Lys-Thr-Phe-Asp-Tyr (CDR3) de la SEC ID N° 3 y que en la región variable de la cadena ligera presentan las secuencias de aminoácidos Ser-Gly-Asp-Lys-Leu-Gly-Asp-Lys-Tyr-Ala-Cys (CDR1), Gln-Asp-Ser-Lys-Arg-Pro-Ser (CDR2) y Gln-Ala-Trp-Asp-Ser-Ser-Ile-Val-Val (CDR3) de la SEC ID N° 1 de la región variable de la cadena ligera (V_L) y donde el anticuerpo se une a las lipoproteínas de alta densidad (LDL), especialmente al colesterol-LDL.

25 Además, para la solución de la tarea se propone un procedimiento para la producción de los anticuerpos de la invención por tecnología del hibridoma, en el cual las células del hibridoma se obtienen por fusión de las células de heteromioma HAB-1 y sus subclones con linfocitos B extraídos de bazo, ganglios linfáticos o sangre humana.

30 El núcleo de la invención se basa en la sorprendente observación de que un anticuerpo purificado, cuya secuencia de la cadena ligera (V_L) y de la cadena pesada (V_H) corresponde a un anticuerpo monoclonal humano (SAM-6.1 0) con acción reductora de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). El descubrimiento de esta propiedad, que sugiere la utilización del anticuerpo en una formulación farmacéutica apropiada para la reducción de las grasas, se hizo en el contexto de la caracterización bioquímica del anticuerpo. Ventajosamente, la unión del anticuerpo de la invención a las LDL y a las VLDL, las precursoras de las LDL, es más fuerte que la unión a las HDL. Debido a esta propiedad, el anticuerpo de la invención tiene como resultado una reducción del valor de los correspondientes cocientes LDL/HDL, minimizando de esta forma el riesgo de infarto de miocardio.

35 La unión específica del anticuerpo a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) o al colesterol LDL se demostró experimentalmente mediante el método ELISA. En el mismo experimento se pudo demostrar que la unión de la sustancia de la invención a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) es débil.

En un desarrollo del anticuerpo de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano.

40 Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo (V_L) contienen las secuencias de aminoácidos Ser-Gly-Asp-Lys-Leu-Gly-Asp-Lys-Tyr-Ala-Cys (CDR1), Gln-Asp-Ser-Lys-Arg-Pro-Ser (CDR2) y Gln-Ala-Trp-Asp-Ser-Ser-Ile-Val-Val (CDR3) de la SEC ID N° 1; véase también la Figura 2.

45 Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo o fragmentos funcionales comprenden secuencias de aminoácidos que son esencialmente idénticas a Ser-Tyr-Ala-Met-His (CDR1), Val-Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Ser-Asn-Lys-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Ser-Val-Lys-Gly (CDR2) y Asp-Arg-Leu-Ala-Val-Ala-Gly-Lys-Thr-Phe-Asp-Tyr (CDR3) de la SEC ID N° 3 de la región variable de la cadena ligera (V_H); véase también la Figura 4.

50 Como "esencialmente idéntica" se entiende una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos o el 90 % de la secuencia de aminoácidos indicada como referencia (SEC ID N° 1 y 3) o de la secuencia de ácido nucleico (SEC ID N° 2 y 4). En un desarrollo posterior, se puede demostrar que la secuencia de aminoácidos o la secuencia de ácido nucleico tiene una identidad de al menos un 95 %, 98 %, 99 % o 100 % en comparación con las referencias indicadas.

55 Los anticuerpos de la invención se pueden generar mediante un procedimiento conocido como la técnica del hibridoma (Köhler, Milstein, Nature, 1975, vol 256,495) y que permite el aislamiento de anticuerpos monoclonales. Está basado en la obtención in vitro de híbridos celulares mediante la fusión celular de linfocitos normales con células de mieloma inmortales y capacidad de división ilimitada (por ej., HAB-1). Las células de hibridoma

5 producidas de esta manera presentan propiedades de ambas células parentales. De esta forma, presentan la capacidad de los linfocitos de producir anticuerpos (por ej., SAM-6.10) y la capacidad de las células de mieloma de dividirse de forma ilimitada, lo que permite la producción de anticuerpos en grandes cantidades. Cada una de las células híbridas resultantes de la fusión proporciona anticuerpos monoclonales cuya especificidad viene determinada por el linfocito original.

Las células de hibridoma se multiplican y se seleccionan aquellas que producen los anticuerpos con la especificidad deseada. El cultivo de la selección y su aislamiento conduce a anticuerpos con capacidad de reacción altamente específicos que sólo reaccionan con un determinante antigénico determinado.

10 La evidencia de una reducción significativa de las concentraciones de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (o del colesterol LDL) en el plasma sanguíneo se confirmó en experimentos en animales, sin una reducción de las concentraciones de las HDL en el intervalo de detección. Es fundamental, que durante la administración del anticuerpo no se vean afectadas las funciones vitales de los animales, de modo que la sustancia de la invención se pueda describir como exenta de efectos secundarios. (El efecto del anticuerpo de la invención se pudo explicar por analogía con el mecanismo de la vía depuradora).

15 Otra indicación para el uso del medicamento de la invención es el tratamiento de las enfermedades renales, especialmente de la necrosis glomerular (glomeruloesclerosis).

20 Dentro del alcance de la invención está que el polipéptido de la invención para la producción del medicamento se usa preferentemente en forma purificada y para cuya purificación se contemplan todos los procedimientos conocidos por el experto en la materia (por ej., cromatografía de afinidad, permeación en gel). Como indicación de la sustancia de la invención se contempla principalmente la acción reductora de las grasas, en particular, la reducción selectiva de las LDL o del colesterol LDL. Debido a la propiedad de unir las LDL con mayor fuerza que las HDL, el polipéptido de la invención actúa reduciendo el valor del cociente LDL/HDL y minimizando el riesgo de infarto.

25 Las sustancias auxiliares y los vehículos para la producción de un medicamento son conocidas en la técnica y se pueden preparar de acuerdo con la práctica estándar (véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed), ed. A.R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick y J.C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nueva York).

Materiales y métodos

Inmortalización de linfocitos y ensayo inicial de los anticuerpos

30 Para la inmortalización, los linfocitos se fusionan con el heteromioma HAB-1 (Faller et al., 1990) y se cultiva siguiendo el protocolo estándar. Resumiendo, los linfocitos se fusionan con células HAB-1 usando PEG. Los triomas se siembran en placas de 24 pocillos. La tasa de crecimiento promedio es del 80-90 %, el 50 % de los clones crecidos secretan inmunoglobulinas. El ensayo inicial de los anticuerpos monoclonales humanos secretados se realiza mediante ELISA para determinar el isotipo. A continuación, los anticuerpos monoclonales humanos pueden someterse a análisis inmunohistoquímicos, genéticos, bioquímicos y de biología molecular.

35 Materiales necesarios:

- RPMI 1640 (PAA) sin suplemento
- RPMI 1460 con suplemento de HAT (HAT-Supplement, PAA) y FCS 10 %, glutamina 1 % y penicilina/estreptomocina 1 %
- Lavar HAB-1 (pareja de fusión) dos veces con RPMI sin suplemento

40

- Centrifugar durante 5 min a 1500 rpm
- Descongelar los linfocitos congelados (de bazo, ganglios linfáticos o sangre) y lavar dos veces con RPMI sin suplemento y centrifugar
- Recoger ambos sedimentos, cada uno en 10 ml de RPMI sin suplemento y contar en la cámara de recuento Neubauer

45

- Fusionar Hab-1 con los linfocitos en una relación 1:2 – 1:3
- Reunir los sedimentos celulares después del segundo proceso de lavado, mezclar y centrifugar durante 8 min a 1.500 rev/min.
- Añadir gota a gota cuidadosamente el PEG (polietilenglicol 1500, Roche), calentado previamente a 37 °C sobre el sedimento con movimientos rotatorios suaves del vial de 50 ml.

50

- Resuspender ligeramente y a continuación dejar en rotación durante 90 seg en un baño de agua a 37 °C
- Lavar a continuación el PEG con RPMI sin suplemento (dos pipetas de 10 llenas)
- Centrifugar durante 5 min a 1.500 rev/min
- En placas de 24 pocillos, añadir 1 ml de RPMI con suplemento HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina) por pocillo

55

- Disolver el sedimento en RPMI con suplemento HAT
- Pipetear medio ml de las células en cada uno de los 24 pocillos
- Colocar las placas de fusión en el incubador

- Cambiar semanalmente el medio de RPMI con suplemento HAT

Purificación del anticuerpo SAM-6.10

Purificación del sobrenadante de cultivo mediante cromatografía de intercambio iónico mediante FPLC

Las células de hibridoma productoras del anticuerpo IgM SAM-6.10 se cultivaron en un medio de cultivo celular sin suero especial (medio AIMV, Gibco) y se determinó mediante nefelometría el contenido de IgM en el sobrenadante del cultivo. Para la purificación, el sobrenadante del cultivo se ajustó a un pH de 5,9 y se filtró la solución. Para la unión se utilizó una columna catiónica especial (columna (HiTrap™ SP FF, 5 ml, Amersham Biosciences). La columna se equilibró al principio de la purificación con tampón A filtrado (tampón fosfato 20 mM, pH 5,9). A continuación, el sobrenadante del cultivo enfriado en hielo se aplicó a la columna con un caudal de 1 ml/min. Tras la aplicación del sobrenadante, la columna se lavó con tampón A durante 20 min y con un caudal de 2 ml/min hasta constancia en la línea base para eliminar todas las proteínas no unidas. A continuación, los anticuerpos unidos a la columna se eluyeron añadiendo tampón B (tampón fosfato 20 mM, NaCl 1 M, pH 8,0) y se recogieron las fracciones. El contenido de anticuerpo (IgM) SAM-6.10 de las fracciones individuales se determinó por nefelometría y se analizó la pureza e integridad del anticuerpo purificado mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia (Western blot).

Medición de referencia de las LDLox

La medición se realiza mediante los kits de ensayo Oxidised LDL ELISA de Merckodia, Uppsala, Suecia. Principio del ensayo: El ELISA para LDL oxidadas es un inmunoensayo enzimático de dos vías basado en una fase sólida. Se basa en la técnica del sándwich directo, en la cual, se enfrentan dos anticuerpos monoclonales contra un determinado antígeno de la apolipoproteína B oxidada. Durante la incubación, la LDL oxidada de la muestra reacciona con un anticuerpo anti-LDL oxidada que está unido a los pocillos de la placa de microtitulación. Después del lavado, los componentes de la muestra no reactivos se eliminan, un anticuerpo anti-apolipoproteína B humana conjugado con peroxidasa detecta la LDL oxidada unida a la fase sólida. Tras una segunda incubación y procedimiento de lavado, que elimina el anticuerpo marcado con la enzima no unida, se detecta el conjugado por reacción la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). La reacción se detiene por adición de ácido para definir un punto final colorimétrico que se lee espectrofotométricamente a 450 nm.

Medición de referencia del SAM-6 sobre las LDLox

Se incubó una placa ELISA (Becton Dickinson Labware Europ, Francia) con fracciones de LDL de diferente grado de oxidación durante la noche a 4 °C. Los sitios de unión no específica se bloquearon con medio RPMI-1640 suplementado con FCS 10 % durante 1 hora. A continuación, se incubó la placa con 60 µg/ml de anticuerpo SAM-6 durante una hora a 37 °C. Después de lavar tres veces con PBS, la placa ELISA se incubó durante 1 h con un anticuerpo secundario acoplado a HRP (anti-IgM humana de conejo, Dako, Hamburgo, Alemania, 1:1000 en PBS). A continuación, la placa se lavó de nuevo con PBS y tampón citrato, se añadió OPD (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) y el viraje de color se midió a 490 nm con un lector ELISA.

Citometría de flujo (análisis FACS)

Las células adherentes utilizadas se desprendieron del fondo de los matraces de cultivo mediante tratamiento con tripsina/EDTA. La reacción se detuvo con 10 ml de medio RPMI-1640 (+suplemento) y las células se sedimentaron a 1.000 x g durante 5 min. Las células se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron en tampón FACS (PBS, azida Na 0,01 %) y se colocaron sobre hielo durante 30 min para la reconstitución de las membranas celulares. A continuación, las células se ajustaron a una densidad de 1×10^6 células/ml y se transfirieron 200 µl de las suspensiones celulares de los recipientes de reacción con FACS, de modo que el número de células por tubo era de 2×10^5 células. Las células se centrifugaron durante 5 min a 4 °C y 1.400 rpm, los sedimentos se resuspendieron y se incubaron con los anticuerpos primarios durante 15 min sobre hielo. Como anticuerpos primarios se utilizaron 100 mg/ml de anticuerpo SAM-6 en tampón FACS (volumen total 200 ml) o 100 mg/ml de LDL. Como control del isotopo se utilizaron 100 µg/ml de IgM humana Chrompure. Alternativamente, las células se preincubaron con LDL durante 30 min y a continuación se añadieron 100 µg/ml de anticuerpo SAM-6.

Tras la incubación, las células se centrifugaron, se desechó el sobrenadante y los sedimentos se lavaron con 500 µl de tampón FACS frío. A continuación, se incubó durante 15 min protegido de la luz con el anticuerpo secundario acoplado a FITC (anti-IgM humana de ratón, acoplada con FITC, 1:50 en tampón FACS para SAM-6 o IgM humana Chrompure). Después de otra etapa de lavado, las células se recogieron en 200 µl de tampón FACS frío y se conservaron en hielo protegidas de la luz. La medición se realizó mediante un citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson, EE.UU.).

Experimentos en animales para la detección de la acción *in vivo* del anticuerpo SAM—6.10

Experimento 1: Se inyectaron por vía intraperitoneal 500 µg de anticuerpo SAM-6.10 purificado. La concentración de LDL en el suero sanguíneo se midió después de 2 días (véase más adelante el método).

Experimento 2: Como el anterior

Experimento 3: Se inyectó por vía intraperitoneal 1 mg de anticuerpo SAM-6.10 purificado. La concentración de LDL en el suero sanguíneo se midió después de 14 días.

Control A: valores normales en el ratón control

Control B: valores normales en el ratón control

- 5 La concentración sérica de la LDL en los ratones tratados con SAM-6.10 está considerablemente reducida (véase la Figura 10 y la Figura 11).

Toxicidad

Se inyectaron a ratones por vía intraperitoneal 500 µg o 1 mg de anticuerpo purificado SAM-6-10.

- 10
- Ninguna toxicidad aguda
 - Ninguna toxicidad latente (período de tiempo 3 meses)

Se extirparon y se analizaron los órganos de los ratones sacrificados del experimento 1, 2 y 3 (véase más arriba): hígado, pulmón, corazón, bazo, intestino delgado, intestino grueso, riñones, estómago y cerebro no mostraban cambios morfológicos. Además, los órganos se examinaron inmunohistoquímicamente para detectar una posible retención de lípidos. La tinción con Sudan III no mostró acumulación de lípidos en ninguno de los órganos.

- 15 Los órganos de los animales sacrificados se fijaron en formol y se embebieron en parafina. La tinción se realizó con el tinte Sudán III según el siguiente protocolo:

Tinción Sudan III en cortes de parafina/en macrófagos

Eliminación de la parafina:

- 20
- Xileno 1 5 min
 - Xileno 2 5 min
 - Etanol al 100 % 1 5 min
 - Etanol al 100 % 2 5 min
 - 70 ml de metanol
- 25
- + H₂O₂ 500 µl 5 min
 - Etanol al 90 % 1 3 min
 - Etanol al 90 % 2 3 min
 - Etanol al 80 % 1 3 min
 - Etanol al 80 % 2 3 min
 - Etanol al 70 % 1 3 min
- 30
- Etanol al 70 % 2 3 min
 - Colocar los cortes en PBS
 - Incubar los cortes 15 min con Sudan III
 - Lavar con agua dest.
 - Sumergir 1x en isopropanol al 60 %
- 35
- Lavar con agua destilada
 - Contratinción con hematoxilina durante 6 min
 - Poner en remojo los cortes durante 10 min, lavar con agua destilada y cubrir con gelatina de glicerina

Para la tinción con Sudán III de los macrófagos, se cultivan macrófagos adherentes sobre los portas del microscopio y a continuación se tratan con los correspondientes agentes. La tinción se lleva a cabo de la siguiente forma:

- 40
- Fijar las células en isopropanol al 60 % (6 min)
 - Incubar durante 20 min con Sudán III
 - Lavar con agua destilada
 - Contratinción con hematoxilina durante 6 min
 - Poner en remojo los cortes durante 10 min, lavar con agua destilada y cubrir con gelatina de glicerina

45 Determinación de los lípidos en las muestras de sangre

La medición de los diferentes lípidos en el suero sanguíneo se llevó a cabo automáticamente con el aparato MODULAR D P800 (Roche).

La determinación del valor de colesterol LDL se realizó mediante un método enzimático colorimétrico (CHOD/PAP) sin tratamiento previo de la muestra.

50

Principio del ensayo para la determinación de la concentración de lípidos en suero:

Las HDL, VLDL y los quilomicrones se hidrolizan específicamente con un detergente 1. El colesterol liberado de estas lipoproteínas reacciona rápidamente mediante la acción enzimática de la colesterol esterasa (CE) y la colesterol oxidasa (CHOD) y se produce peróxido de hidrógeno. Este forma con 4-aminoantipiridina en presencia de una peroxidasa (POD) un producto incoloro. Durante este proceso, las partículas de LDL permanecen intactas. La reacción del colesterol LDL se inicia por la adición del detergente 2 y la sustancia de acoplamiento N,N-bis(4-sulfobutil)-m-toluidina (DSB-mT). El segundo detergente libera el colesterol de las partículas de LDL. En la reacción enzimática en presencia de la sustancia de acoplamiento se observa la formación de color. La intensidad del colorante quinona imina rojo formado es directamente proporcional a la concentración del colesterol LDL. Esta se determina por medición de la absorbancia a 552 nm.

ELISA (LDL/HDL)

- Cubrir previamente la placa ELISA con LDL (lipoproteína de baja densidad de plasma humano, Sigma, 10 µg/ml en PBS) o HDL (HDL humana, Chemicon 10 µg/ml en PBS) → 50 µl por pocillo
- Cubrir la placa y dejar en reposo durante la noche a 4 °C
- 15 - Lavar al día siguiente la placa 2 x con PBS
- Pipetear 100 µl de RPMI en cada pocillo. Incubar durante 1 h a TA
- Lavar a continuación 2 x con PBS
- Pipetear 50 µl de los respectivos controles positivos en 2 pocillos (doble determinación)
- 20 - Control positivo: Acm IgG2a anti-LDL humana de ratón 1:1.000 en PBS
- y además 50 µl de RPMI como control negativo (doble determinación)
- Pipetear sucesivamente las muestras (sobrenadante SAM6.10) (doble determinación)
- Incubar 1 h en el incubador
- Lavar 2 x con PBS
- Lavar 2 x con PBS/Tween al 0,05 %
- 25 - Lavar 2 x con PBS
- Pipetear 50 µl de los respectivos segundos Ac (conjugados con peroxidasa):
 - anti-IgM humana de conejo 1:1.000 en PBS/Tween al 0,05 % (para SAM-6-10)
 - anti-IgGs murina de conejo 1:1.000 con PBS Tween (para control positivo de LDL)
- Incubar 1 h en el incubador
- 30 - Lavar 2 x con PBS
- Lavar 1 x con PBS/Tween al 0,05 %
- Lavar 2 x con PBS
- Lavar 2 x con tampón citrato
- Para valorar: disolver comprimido de OPD (Dako, Hamburgo) en tampón citrato + H₂O₂ (3 ml de tampón
- 35 - citrato + un comprimido + 5 µl de H₂O₂)
- Pipetear 50 µl de colorante en cada pocillo
- En caso de reacción positiva (coloración amarilla), detener con 10 µl de H₂SO₄ 3 M

Explicación de las figuras

Listado de secuencias

- 40 - La Figura 1 muestra las secuencias de aminoácidos (SEC ID Nº 1) de la región variable de la cadena ligera (V_L).
- La Figura 2 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº 2) de la región variable de la cadena ligera (V_L). Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) están indicadas por guiones y son esencialmente idénticas a los nucleótidos 67-99 (CDR1), 145-165 (CDR2) y 262-288 (CDR3) de la SEC ID Nº
- 45 - 2.
- La Figura 3 muestra las secuencias de aminoácidos (SEC ID Nº 3) de la región variable de la cadena pesada (V_H).
- La Figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID Nº 4) de la región variable de la cadena pesada (V_H). Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) están indicadas por guiones y son
- 50 - esencialmente idénticas a los nucleótidos 91-105 (CDR1), 148-198 (CDR2) y 295-330 (CDR3) de la SEC ID Nº 4.

Experimentos de biología celular

Las siguientes figuras explicadas no pretenden limitar la invención, sino solamente aclarar y demostrar a modo de ejemplo la factibilidad de la invención.

La Figura 5 muestra la medición de referencia de las LDLox en función del tiempo de incubación con una solución de sulfato de cobre. En el experimento la LDL (Sigma, Taufkirchen, Alemania) se oxidó por incubación con CuSO_4 20 μM durante 3 o 15 h. La cantidad de LDL oxidadas se determinó con el Oxidised LDL ELISA de Mercodia siguiendo las instrucciones. Se puede reconocer fácilmente que la cantidad de LDL oxidadas aumenta a medida que lo hace el tiempo de incubación, donde cada fracción de LDL, que no fue tratada con iones de cobre, ya estaba presente parcialmente en forma oxidada. Tras 15 horas de incubación, la cantidad de LDL oxidada se había duplicado.

La Figura 6 muestra la detección de referencia, la unión de SAM-6 a las LDLox. Para la detección de la unión de SAM6 a las LDLox mediante en el ensayo de unión ELISA, se recubrió previamente la placa ELISA con fracciones de LDL en diferentes grados de oxidación antes de añadir el primer anticuerpo SAM-6 y el segundo anticuerpo anti-IgM humana necesario para la detección. El resultado muestra que cuanto mayor sea la cantidad de LDL presente en su forma oxidada, más fuertemente se une el anticuerpo de la invención SAM-6.

La Figura 7 muestra el resultado de un análisis FACS. Las células usadas en el análisis son células de la línea celular de macrófagos de ratón P388D1 (IL-1) (DSMZ N^o de acceso 288). La Figura 7A muestra la unión de los LDL a los macrófagos. La Figura 7B demuestra también que el anticuerpo monoclonal humano SAM-6 también se une a los macrófagos. Con la detección de la unión de una IgM control a los macrófagos en la Figura 7C, se muestra que los macrófagos poseen receptores μ . Con la desviación hacia la derecha de la señal en la Figura 7D se muestra que la incubación simultánea de las LDL con SAM-6 aumenta la unión de SAM-6 a las células.

Las Figuras 8 y 9 muestran el resultado de la tinción con Sudán III de las células de la línea celular de macrófagos de ratón P388D1(IL-1).

En la Figura 8 se muestran células que se incubaron durante 48 h con SAM-6 o con un anticuerpo de control IgM y que a continuación se sometieron a tinción con Sudán III. El color rojo que se observa en las células incubadas con el anticuerpo SAM-6 es debido a una acumulación importante de grasas neutras. Por el contrario, las células incubadas con el anticuerpo de control no muestran ninguna modificación.

En el caso de las tinciones de la Figura 9, los macrófagos se cultivaron durante 24 h con y sin adición de FCS. A continuación se añadieron durante otras 24 h solamente LDL o solamente SAM-6 o bien LDL y SAM-6 conjuntamente. A continuación se realizó una tinción con Sudán III. La columna de la izquierda de las Figuras 9A, 9C y 9E muestran células que se cultivaron sin añadir FCS. La columna de la derecha de las Figuras 9B, 9D y 9F muestran células que se cultivaron añadiendo FCS.

Las Figuras 9A y 9B demuestran que tanto los macrófagos, cultivados sin FCS, como los macrófagos, cultivados en presencia de FCS, muestran una acumulación de grasas neutras. La Figura 9C muestra que cuando se añade SAM-6 a los macrófagos, cultivados sin FCS, no se detectaba acumulación de grasa. Por el contrario, como se muestra en la Figura 9D, se observa una mayor acumulación de lípidos en los macrófagos cultivados con FCS y a los que se añadió posteriormente SAM-6. Las Figuras 9E y 9F muestran que, con la incubación simultánea de SAM-6 y LDL aumenta considerablemente la acumulación intracelular de lípidos tanto en macrófagos cultivados con FCS como en aquellos a los que no se añadió FCS.

La Figura 10 muestra el efecto del anticuerpo SAM-6 sobre los valores de LDL *in vivo*. En el experimento se inyectó i.p. a ratones 1 mg de anticuerpo SAM-6 purificado o en el experimento control, 1 mg de IgM humana Chrompure (control de isotipo). La concentración de LDL se midió en la sangre a las 24 y a las 48 h. Se pudo observar después de 24 y 48 h en los ratones tratados con SAM-6 una significativa reducción de las LDL séricas.

La medición de las LDL en el suero sanguíneo se realizó automáticamente con el instrumento MODULAR D P800 y los valores representados se dan como resultado del kit diagnóstico "LDL cholesterol Direct" (Roche Diagnostiks).

La Figura 11 muestra igualmente la acción *in vivo* de SAM-6-10, donde para el cálculo de los valores se aplicó un método indirecto según la fórmula de Friedenwald. Para ello, se calcula la cantidad de LDL a partir de la diferencia entre colesterol total, HDL y triglicéridos. Según este método de evaluación del experimento, la reducción de la concentración de LDL en suero sería aún mayor después del tratamiento con SAM-6-10. Este método indirecto debe contemplarse, sin embargo, en comparación con el método utilizado en la Figura 10 como un método más inexacto.

Listado de secuencias

<110> Vollmers, Philip

<120> Anticuerpo monoclonal humano

<150> DE-10 353 175.0

<151> 14-11-2003

<160> 4

<210> 1

ES 2 424 639 T3

<211> 96
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) del anticuerpo SAM-6

<400> 1

```

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly
 1           5           10           15

Gln Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asp Lys
           20           25           30

Tyr Ala Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu
           35           40           45

Val Ile Tyr Gln Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg
           50           55           60

Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser
           65           70           75

Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp
           80           85           90

Asp Ser Ser Ile Val Val
           95
    
```

10

<210> 2
 <211> 288
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) del anticuerpo SAM-6

20

<400> 2

ES 2 424 639 T3

tcc	tat	gtg	ctg	act	cag	cca	ccc	tca	gtg	tcc	gtg	tcc	cca	gga	45
Ser	Tyr	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Val	Ser	Pro	Gly	
1				5					10					15	
CDR1															
cag	aca	gcc	agc	atc	acc	tgc	tct	gga	gat	aaa	ttg	ggg	gat	aaa	90
Gln	Thr	Ala	Ser	Ile	Thr	Cys	Ser	Gly	Asp	Lys	Leu	Gly	Asp	Lys	
				20					25					30	
CDR2															
tat	gct	tgc	tgg	tat	cag	cag	aag	cca	ggc	cag	tcc	cct	gtg	ctg	135
Tyr	Ala	Cys	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Val	Leu	
				35					40					45	
CDR3															
gtc	atc	tat	caa	gat	agc	aag	cgg	ccc	tca	ggg	atc	cct	gag	cga	180
Val	Ile	Tyr	Gln	Asp	Ser	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	
				50					55					60	
ttc	tct	ggc	tcc	aac	tct	ggg	aac	aca	gcc	act	ctg	acc	atc	agc	225
Phe	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	
				65					70					75	
ggg	acc	cag	gct	atg	gat	gag	gct	gac	tat	tac	tgt	cag	gcg	tgg	270
Gly	Thr	Gln	Ala	Met	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Trp	
				80					85					90	
CDR3															
gac	agc	agc	att	gtg	gta										288
Asp	Ser	Ser	Ile	Val	Val										
															95

<210> 3
 <211> 110
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) del anticuerpo SAM-6

10

<400> 3

ES 2 424 639 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Leu Ala Val Ala Gly
 95 100 105
 Lys Thr Phe Asp Tyr
 110

5 <210> 4
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 10 <223> Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) del anticuerpo SAM-6
 <400> 4

ES 2 424 639 T3

cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg 45
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15

agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt 90
 Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

CDR1

agc tat gct atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg 135
 Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

CDR2

gag tgg gtg gca gtt ata tca tat gat gga agc aat aaa tac tac 180
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr
 50 55 60

gca gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc 225
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75

aag aac acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac 270
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90

CDR3

acg gct gtg tat tac tgt gcg aga gat cgg tta gca gtg gct ggt 315
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Leu Ala Val Ala Gly
 95 100 105

aaa act ttt gac tac
 Lys Thr Phe Asp Tyr
 110

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo purificado, caracterizado por que
 - la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) es al menos el 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) es al menos el 90 % idéntica a la SEC ID N° 3 y
 - el anticuerpo une lipoproteínas de baja densidad (LDL), en particular colesterol LDL.
2. Anticuerpo purificado de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera (V_L) es al menos el 95 % idéntica a la SEC ID N° 1 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) es al menos el 95 % idéntica a la SEC ID N° 3.
3. Anticuerpo purificado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la unión del anticuerpo a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) es más fuerte que la unión a lipoproteínas de alta densidad (HDL).
4. Anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el anticuerpo y las lipoproteínas de baja densidad (LDL) existentes en el cuerpo humano y animal tienen estructuras de hidratos de carbono complementarias.
5. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la secuencia de ácido nucleico de la región variable de la cadena ligera (V_L) es al menos el 90 % idéntica a la SEC ID N° 2 y la secuencia de ácido nucleico de la región variable de la cadena pesada (V_H) es al menos el 90 % idéntica a la SEC ID N° 4.
6. Anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que el anticuerpo está codificado por secuencias de ácido nucleico que son idénticas a los nucleótidos 67-99 (CDR1), 145-165 (CDR2) y 262-288 (CDR3) de la SEC ID N° 2 y son idénticas a los nucleótidos 91-105 (CDR1), 148-198 (CDR2) y 295-330 (CDR3) de la SEC ID N° 4.
7. Anticuerpo, que contiene las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que en la cadena pesada (V_H) presentan las secuencias de aminoácidos Ser-Tyr-Ala-Met-His (CDR1), Val-Ile-Ser-Tyr-Asp-Gly-Ser-Asn-Lys-Tyr-Tyr-Ala-Asp-Ser-Val-Lys-Gly (CDR2) y Asp-Arg-Leu-Ala-Val-Ala-Gly-Lys-Thr-Phe-Asp-Tyr (CDR3) de la SEC ID N° 3 y que en la cadena ligera, presentan las secuencias de aminoácidos (V_L) Ser-Gly-Asp-Lys-Leu-Gly-Asp-Lys-Tyr-Ala-Cys (CDR1), Gln-Asp-Ser-Lys-Arg-Pro-Ser (CDR2) y Gln-Ala-Trp-Asp-Ser-Ser-Ile-Val-Val (CDR3) de la SEC ID N° 1 y en donde el anticuerpo une lipoproteínas de baja densidad (LDL), en particular colesterol LDL.
8. Procedimiento para la producción de un anticuerpo purificado de acuerdo con una las reivindicaciones anteriores mediante la tecnología del hibridoma, caracterizado por que las células de hibridoma se obtienen por fusión de células de heteromioma HAB-1 y sus sub-clones con linfocitos B extraídos de bazo, ganglios linfáticos o sangre humanos.
9. Anticuerpo purificado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 - 7, caracterizado por que el anticuerpo se puede producir mediante el procedimiento reivindicado en la reivindicación 8.
10. Anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
11. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado por que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano.
12. Anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11 en combinación con adyuvantes y/o sustancias vehículo convencionales para uso como un fármaco que tiene un efecto reductor de las grasas.
13. Anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso como un fármaco para reducir lipoproteína de baja densidad (LDL) en la sangre.
14. Anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso como un fármaco para reducir el colesterol LDL.
15. Anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso como un fármaco para el tratamiento de enfermedades renales.
16. Anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 15 para la producción de un fármaco para el tratamiento de la glomerulonefrosis.

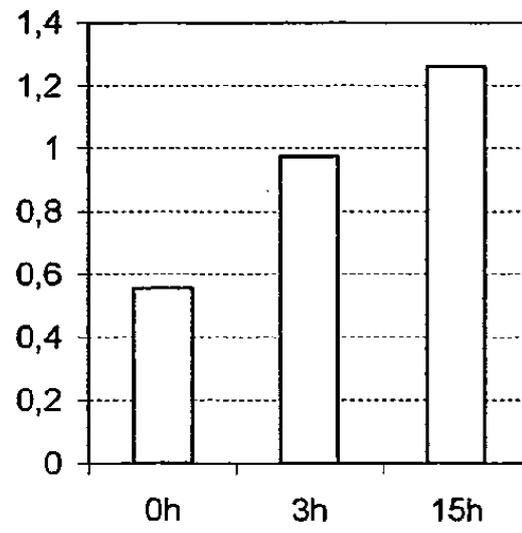


Figura 1

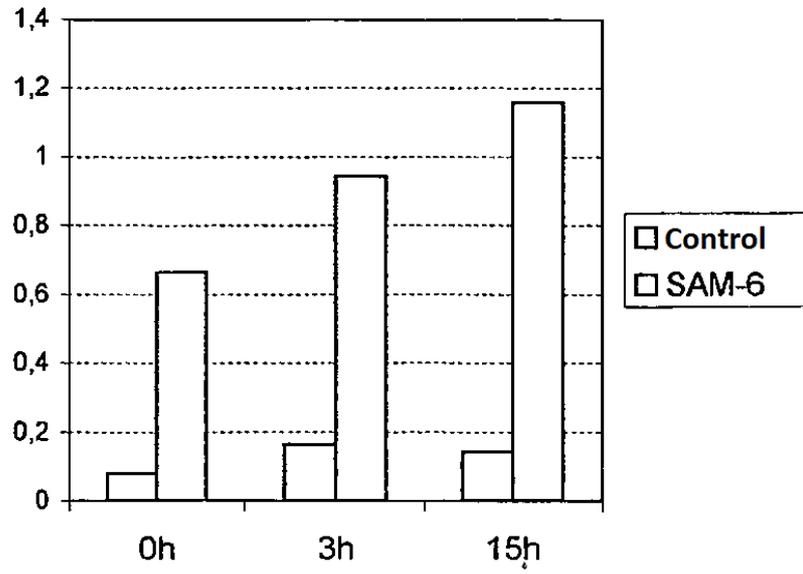


Figura 2

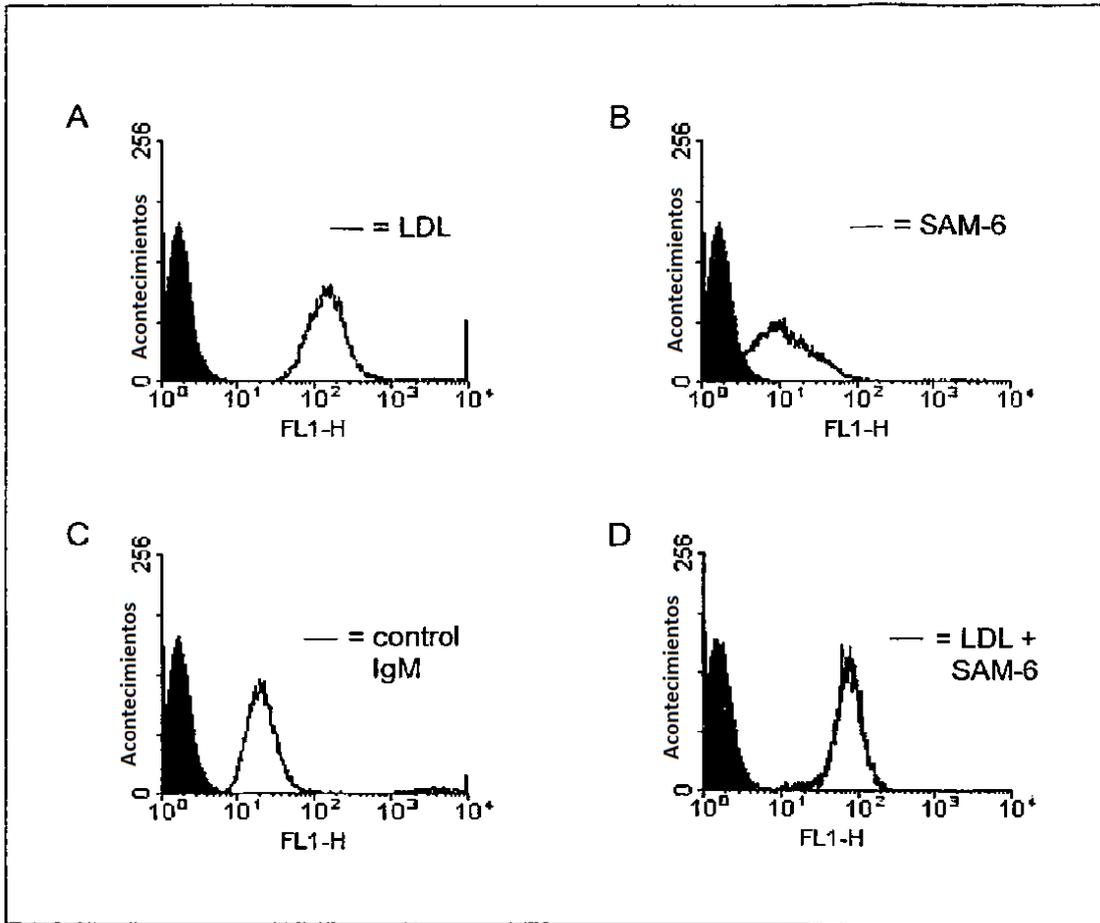


Figura 3

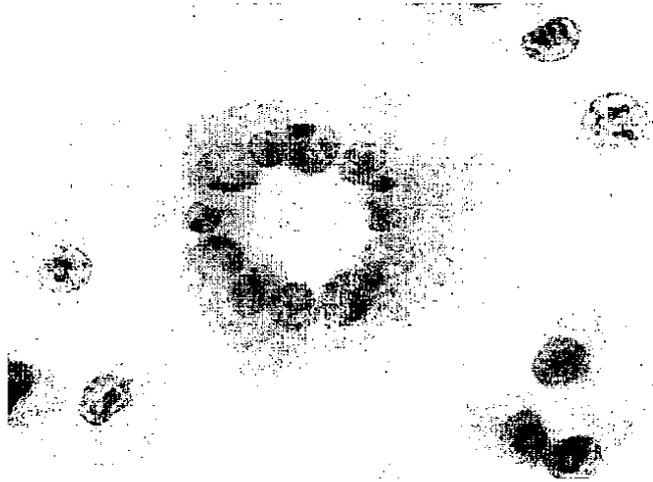


Figura 4

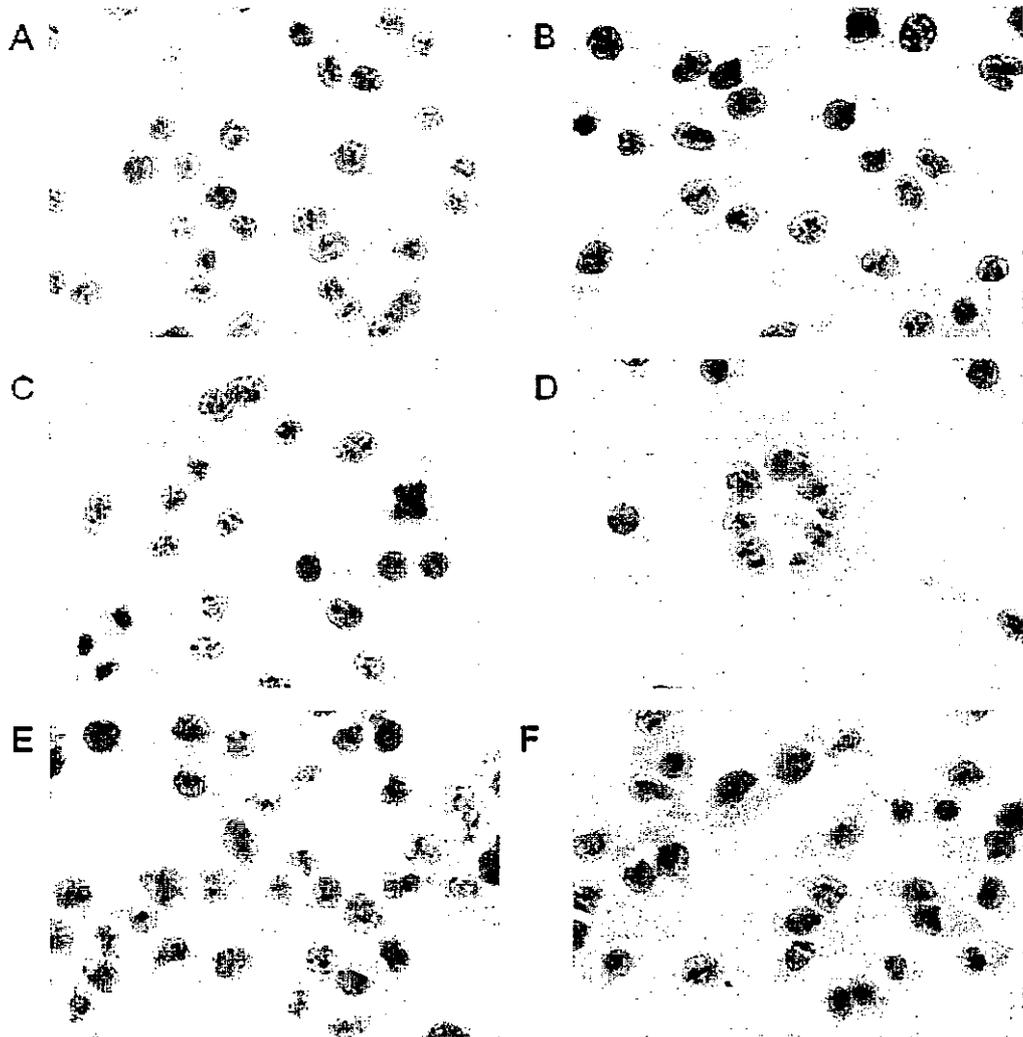


Figura 5

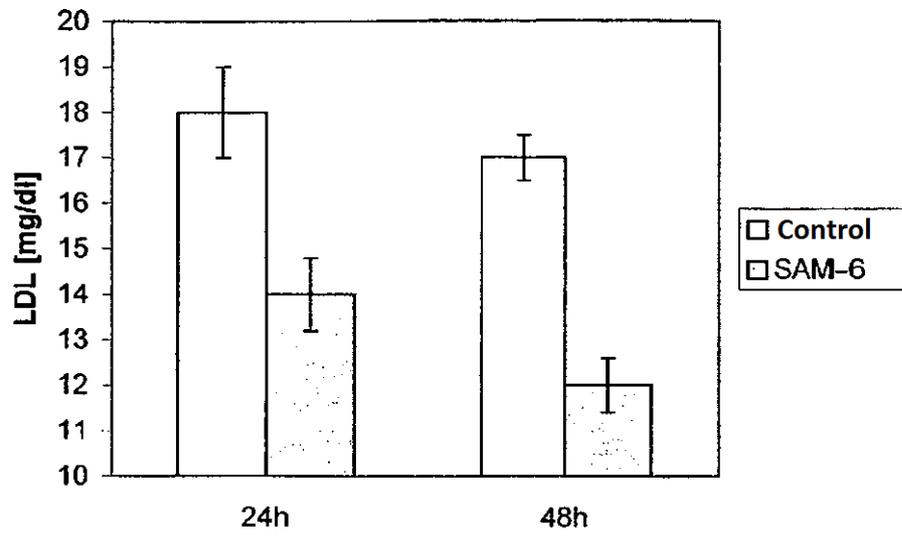


Figura 6

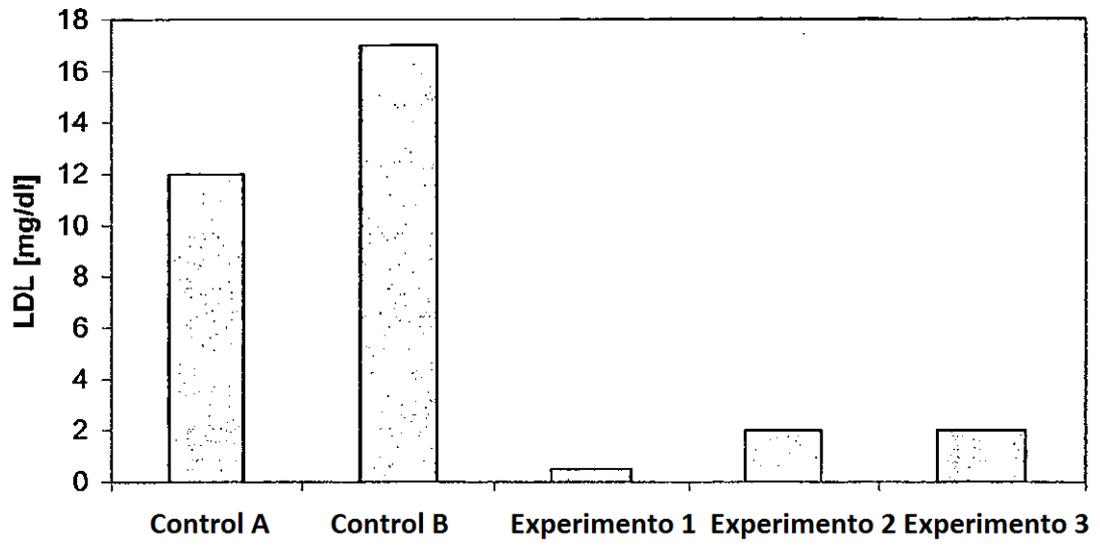


Figura 7