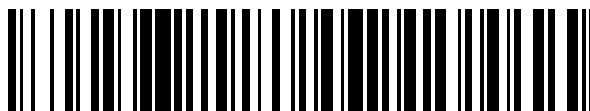


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 193**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2006 E 06770770 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 1888114**

54 Título: **Anticuerpos anti-MCP-1, composiciones, métodos y usos**

30 Prioridad:

19.05.2005 US 682654 P
19.05.2005 US 682620 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.01.2014

73 Titular/es:

JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US

72 Inventor/es:

DAS, ANUK;
SWEET, RAYMOND;
TSUI, PING y
BARDROFF, MICHAEL

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 438 193 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- MCP-1, composiciones, métodos y usos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos, incluyendo porciones o variantes especificadas, específicas para al menos una proteína o fragmento de la misma de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), así como a anticuerpos anti-idiotipo, y ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos anti-MCP-1, ácidos nucleicos complementarios, vectores, células huésped, y métodos para hacer y usar los mismos, incluyendo formulaciones terapéuticas, administración y dispositivos.

TECNICA RELACIONADA

La Proteína Quimioatrayente de Monocitos 1 (MCP-1) (también llamada CCL-2), una proteína de 8,6 kDa que contiene 76 residuos de aminoácidos, es un miembro de la familia quimioquina-beta (o C-C) de las citoquinas. Las quimioquinas son citoquinas de bajo peso molecular (8-10 kDa), inducibles, secretadas, pro-inflamatorias, quimiotácticas que han demostrado jugar un papel central en la trans migración peri-vascular y la acumulación de subconjuntos específicos de leucocitos en sitios de daño tisular. Se han definido dos familias principales dependiendo del posicionamiento de cuatro cisteínas conservadas. Las CXC o α -quimioquinas atraen predominantemente neutrófilos, mientras que las CC o β -quimioquinas atraen predominantemente monocitos y otros leucocitos pero no neutrófilos (Leonard y Yoshimura y otros, 1990). Los miembros de la familia de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) forman un componente principal de la familia C-C de quimioquinas y se consideran las quimioquinas principales implicadas en el reclutamiento de monocitos, macrófagos, y linfocitos activados. Mirando a la homología de la MCP-1 de diferentes especies, la MCP-1 humana y de mono difieren sólo en 2 aminoácidos, revelando una identidad de secuencia del 97%, mientras que la MCP-1 murina, una proteína de 13,8 kDa que contiene 125 residuos de aminoácidos, difiere de la MCP-1 humana en el tamaño molecular y la extensión de la glicosilación.

Los receptores de la quimioquina pertenecen a la familia grande de los receptores transmembrana de siete dominios (7 TM), acoplados a la proteína (GPCRs, también llamados receptores de serpiente). En base a la nomenclatura de receptores establecida en la Conferencia de Investigación de Gordon de 1996 en citoquinas quimiotácticas, los receptores de quimioquina que enlazan con las quimioquinas CXC se designan CXCRs y los receptores que enlazan con las quimioquinas CC se designan CCRs.

La MCP-1 se conoce que enlaza y señala a través del receptor de quimioquina CCR2. El CCR2 es un receptor acoplado a la proteína G que abarca la transmembrana 7 expresado en muchas células incluyendo monocitos, células T, células B, y basófilos. Se han clonado dos receptores específicos de la MCP-1, el CCR2A y el CCR2B, que señalan en respuesta a concentraciones nanomolares (nM) de MCP-1. El CCR2A (CC-CKR2A) y el CCR2B (CC-CKR2B) representan dos ADNcs que codifican dos receptores específicos de MCP-1 con colas carboxilo empalmadas. La MCP-1 enlaza con ambas isoformas con alta afinidad. La MCP-1 induce el flujo de calcio en células que expresan el CCR2B pero no en células que expresan el CCR2A. 5 veces menos MCP-1 induce la quimiotaxis en células que expresan el CCR2B en comparación que células que expresan el CCR2A.

Se conocen otras proteínas con cierta homología de secuencia y funcional con la MCP-1 humana. Especialmente similar a la MCP-1 (GenBank NP_002973) son la MCP-2 (GenBank NP_005614) y la eotaxina (GenBank P_51671); la MCP-2 teniendo un 61,8 por ciento y la eotaxina teniendo un 63,2 por ciento de identidad de secuencia con la MCP-1. El rango de actividades y espectro de participación de estas proteínas en mecanismos homeostáticos humanos y patología no está tan bien entendido para los homólogos de la MCP-1. Por ejemplo, la MCP-2 (renombrada CCL8) está relacionada estrechamente con la MCP-1 y la MCP-3 (renombrada CCL7, GenBank NP_006264) y usa tanto el CCR1 como el CCR2B como sus receptores funcionales. La MCP-3 enlaza con un receptor designado D6. La MCP-3 también enlaza con el CCR10 y el CCR1. La secuencia de la proteína MCP-3 (97 aminoácidos) muestra un 74 por ciento de identidad con la MCP-1 y un 58 por ciento de homología con la MCP-2. La MCP-3 secretada difiere de la MCP-1 en que es N-glicosilada. La MCP-4 (renombrada CCL13, Genbank NP_005399) comparte un 56-61 por ciento de identidad de secuencia con las tres proteínas quimiotácticas de monocitos conocidas y es un 60 por ciento idéntica con la Eotaxina-1. Las funciones de la MCP-4 parece que son altamente similares a las de la MCP-3 y la Eotaxina. Como la MCP-3, la MCP-4 es quimioatrayente potente para los monocitos y los linfocitos T. Es inactiva en neutrófilos. En los monocitos, la MCP-4 enlaza con receptores que reconocen la MCP-1, la MCP-3, RANTES (CCL5) y la eotaxina (los receptores CCR1 y CCR3) y muestra desensibilización cruzada completa con la eotaxina-1. La MCP-5 es quimioquina CC murina y está relacionada más cercanamente con la MCP-1 humana. (66% de identidad de aminoácidos). El símbolo de genes para la MCP-5 es SCYA12 (renombrado CCL12). Las células transfectadas con el receptor de quimioquina CCR2 han mostrado que responden a la MCP-5. Para información general de las citoquinas y quimioquinas ver <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi> y para el sistema de clasificación actual, Zlotnik A, Yoshie O. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12:121-127.

La 125I-MCP-1 enlaza con monocitos y el análisis del gráfico de Scatchard indicó que los monocitos tenían un mínimo de 1700 sitios de enlace por célula con una Kd de -2 nM (Yoshimura y Leonard, 1990). Los experimentos de enlace en equilibrio posteriores con monocitos humanos revelan la presencia de aproximadamente 3000 sitios de enlace por célula con una Kd de 0.77 nM (Ernst y otros, 1994). La 125I-MCP-1 también demostró alta afinidad de enlace con las células dEoL-3 que expresan el receptor CCR2 con un valor de Kd de 0,4 nM (Sarau y otros, 1997) confirmando la afinidad sub-nanomolar de la MCP-1 a su receptor. Para identificar las regiones de la MCP-1 que contactan con su receptor, CCR2, todos los residuos expuestos en la superficie se sustituyeron con alanina. Algunos residuos fueron también mutados a otros aminoácidos para identificar la importancia de la carga, hidrofobicidad, o aromaticidad en las posiciones específicas. Dos agrupaciones de residuos principalmente básicos (R24, K35, K38, K49 y Y13) separados por una ranura hidrofóbica 35 A, redujeron el nivel de enlace en 15- 100- veces. Los datos sugieren un modelo en el que un área de superficie grande de MCP-1 contacta con el receptor, la acumulación de un número de interacciones débiles resulta en la afinidad 35 pM observada en la proteína de tipo salvaje (WT) (Hemmerich y otros, 1999). El rango de afinidades desde 2 nM hasta 35 pM en la bibliografía se puede deber a los ensayos usados y las limitaciones de los ensayos respectivas.

Se conocen otras proteínas con cierta homología funcional y de secuencia con la MCP-1 humana. Especialmente similares a la MCP-1 (GenBank NP_002973) son la MCP-2 (GenBank NP_005614) y la eotaxina (GenBank P_51671); la MCP-2 teniendo un 61,8 por ciento y la eotaxina-1 teniendo un 63,2 por ciento de identidad de secuencia con la MCP-1. El rango de actividades y espectro de participación de estas proteínas en mecanismos homeostáticos y patología humanos no se entiende claramente para estos homólogos de la MCP-1. Por ejemplo, la MCP-2 está relacionada estrechamente con la MCP-1 y la MCP-3 (Genbank NP_006264) y usa tanto el CCR1 como la CCR2B como sus receptores funcionales. La MCP-3 enlaza con un receptor designado D6. La MCP-3 también enlaza con la CCR10. La secuencia de la proteína MCP-3 (97 aminoácidos) muestra un 74 por ciento de identidad con la MCP-1 y un 58 por ciento de homología con la MCP-2. La MCP-3 secretada difiere de la MCP-1 en que es N-glicosilada. La MCP-4 (Genbank NP_005399) comparte un 56-61 por ciento de identidad de secuencia con las tres proteínas quimiotácticas de monocitos conocidas y es un 60 por ciento idéntica con la Eotaxina 1. Las funciones de la MCP-4 parecen ser altamente similares a las de la MCP-3 y la Eotaxina. Como la MCP-3, la MCP-4 es un quimioatrayente potente para los monocitos y los linfocitos T. Es inactiva en los neutrófilos. En los monocitos la MCP-4 enlaza con receptores que reconocen la MCP-1, la MCP-3 y la RANTES (CCR2). En eosinófilos, la MCP-4 tienen una potencia y eficacia similares a la MCP-3, RANTES y Eotaxina. La MCP-4 comparte receptores con la eotaxina (CCR1 y CCR3) y muestra desensibilización cruzada completa con la eotaxina-1.

Se ha informado de otros anticuerpos capaces de enlazar con la MCP-1: La JP9067399 divulga un anticuerpo obtenido de células sanguíneas aisladas y la JP05276986 divulga un hibridoma que secreta MCP-1 anti-humana IgM. Más recientemente, se han divulgado anticuerpos capaces de enlazar con una pluralidad de beta-quimioquinas incluyendo la MCP-1 (WO3048083) y un anticuerpo que enlaza con la MCP-1 que también enlaza con la eotaxina (US20040047860). Ver también la WO 02/02640, la WO 2004/016769 y la WO 2004/024921.

En consecuencia, hay una necesidad de proporcionar anticuerpos humanos específicos para la MCP-1 humana para el uso en terapia para disminuir o eliminar los síntomas de las enfermedades dependientes de la MCP-1, así como mejoras sobre los anticuerpos conocidos o fragmentos de los mismos.

RESUMEN DE LA INVENCION

En la presente se divulgan anticuerpos y otras proteínas, fragmentos, productos de la escisión y otras porciones especificadas y variantes de los mismos derivados de la inmunoglobulina anti-MCP-1 aisladas humanas, de primate, de roedor, mamíferas, quiméricas, humanizadas y/o CDR-injertadas, así como composiciones de anticuerpos anti-MCP-1 que codifican o complementarios a ácidos nucleicos, vectores, células huésped, composiciones, formulaciones, dispositivos, animales transgénicos, plantas transgénicas, y métodos para hacer y usar los mismos, como se describe y se hace posible en la presente, en combinación con lo que es conocido en la técnica. Además de la composición de los anticuerpos de la invención como se describe en la presente, el anticuerpo de la presente invención se define por su afinidad para a MCP-1 humana, especificidad para la MCP-1 humana y capacidad para bloquear la bioactividad de la MCP-1 humana.

Se describe en la presente al menos un anticuerpo anti-MCP-1 aislado, como, pero no limitado a un anticuerpo, proteína de fusión de anticuerpos o fragmento. Un anticuerpo divulgado en la presente incluye cualquier proteína o péptido que contenga una molécula que comprenda al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina, como pero no limitada a, al menos un ligando que enlaza con el dominio, como pero no limitado a, región variable de cadena ligera o pesada o una porción de la misma que enlaza con el ligando como se proporciona en la Tabla 4A, B, D y E (SEQ ID NO: 6-26; y, opcionalmente funcionalmente asociado con una región marco (por ejemplo, FR1, FR2, FR3, FR4 o un fragmento de las mismas como se describe en la Tabla 4C (SEQ ID NO: 2-5), comprendiendo opcionalmente además al menos CH1, bisagra, CH2 o CH3 de una inmunoglobulina humana. La al menos una secuencia de aminoácidos de anticuerpos puede además comprender opcionalmente al menos una sustitución, inserción o delección especificada como se describe en la presente o como es conocido en la técnica.

En una realización de la invención, las porciones del anticuerpo que enlazan con el ligando comprenden la SEQ ID NO: 27 y 28. En un aspecto, la presente invención proporciona al menos un anticuerpo anti-MCP-1 mamífero aislado, que comprende al menos una región variable que comprende la SEQ ID NO: 27 ó 28.

5 En otro aspecto de la invención, la presente invención proporciona al menos un anticuerpo anti-MCP-1 mamífero aislado, que comprende o (i) todas las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes complementarias (CDR) de la cadena pesada de las ID NOS: 6, 7 y 9; o (ii) todas las secuencias de aminoácidos CDR de la cadena ligera de las SEQ ID NOS: 13, 14 y 16.

10 Se divulgan en la presente las moléculas de ácidos nucleicos aisladas que comprenden, complementarias, que hibridan con, un polinucleótido que codifica anticuerpos anti-MCP-1 específicos, que comprenden al menos una secuencia, dominio, porción o variante de los mismos especificada. La presente invención proporciona además vectores recombinantes que comprenden dichas moléculas de ácidos nucleicos de anticuerpos anti-MCP-1, células huésped que contienen dichos ácidos nucleicos y/o vectores recombinantes, así como métodos de hacer y/o usar dichos ácidos nucleicos, vectores y/o células huésped de anticuerpos.

15 Al menos un anticuerpo divulgado en la presente enlaza con al menos un epítipo especificado específico para al menos una proteína MCP-1 o variante o derivado como las proporcionadas en la SEQ ID NO: 1. El al menos un epítipo puede comprender al menos una región que enlaza con el anticuerpo que comprende al menos una porción de dicha proteína, dicho epítipo está preferiblemente compuesto de al menos 1-5 aminoácidos de al menos una porción del mismo, como pero no limitado a, al menos un dominio funcional, extracelular, soluble, hidrofílico, externo o citoplásmico de dicha proteína, o cualquier porción del mismo.

20 El al menos un anticuerpo puede opcionalmente comprender al menos una porción especificada de al menos una región determinante complementaria (CDR) (por ejemplo, CDR1, CDR2 o CDR3 de la región variable de cadena pesada o ligera proporcionadas como SEQ ID Nos: 27 y 28, respectivamente) proporcionadas como SEQ ID NOS: 6, 7, 9, 13, 14 y 16; y opcionalmente comprender además al menos una región de marco constante o variable o cualquier porción de la misma, en donde el anticuerpo bloquea, inhibe o evita al menos una actividad, como, pero no limitado a el enlace de la MCP-1 con el receptor en superficies celulares, la internalización del receptor CCR2, la movilización de Ca²⁺ estimulada por MCP-1 o cualquier otro ensayo de la MCP-1 conocido adecuado. Un anticuerpo anti-MCP-1 puede por lo tanto cribado para una actividad correspondiente de acuerdo con métodos conocidos, como pero no limitado a, al menos una actividad biológica hacia una proteína MCP-1.

25 Se divulga en la presente al menos un anticuerpo anti-idiotipo de la MCP-1 a al menos un anticuerpo de la MCP-1 de la presente invención. El anticuerpo anti-idiotipo incluye cualquier proteína o péptido que contiene la molécula que comprende al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina, como pero no limitado a porción (LBP) que enlaza con el ligando como, pero no limitado a región determinante complementaria (CDR) de una cadena pesada o ligera, o una porción que enlaza con el ligando de la misma, una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera, una región marco, o cualquier porción de la misma, que puede ser incorporada en el anticuerpo anti-idiotipo. Un anticuerpo anti-idiotipo divulgado en la presente puede incluir o estar derivada de cualquier mamífero, como, pero no limitado a un humano, un ratón un conejo, una rata, un roedor, un primate, y similares.

30 En un aspecto se divulgan moléculas de ácidos nucleicos aisladas que comprenden, complementarias, o hibridan a, un polinucleótido que codifica al menos un anticuerpo anti-idiotipo de la MCP-1, que comprende al menos una secuencia, dominio, porción o variante de la misma especificada.

35 También se divulgan vectores recombinantes que comprende dicho anticuerpo anti-idiotipo de la MCP-1 que codifican moléculas de ácidos nucleicos, células huésped que contienen dichos ácidos nucleicos y/o vectores recombinantes, así como métodos para hacer y/o usar dichos ácidos nucleicos, vectores, y/o células huésped del anticuerpo anti-idiotipo.

40 La presente invención también proporciona al menos un método para expresar al menos un anticuerpo anti-MCP-1, o anticuerpo anti-idiotipo de la MCP-1, en una célula huésped, que comprende cultivar una célula huésped como se describe en la presente bajo condiciones en donde al menos un anticuerpo anti-MCP-1 es expresado en cantidades detectables y/o recuperables.

45 La presente invención también proporciona al menos una composición que comprende (a) un ácido nucleico y/o anticuerpo que codifica un anticuerpo anti-MCP-1 como se describe en la presente; y (B) un portador o diluyente adecuado. El portador o diluyente puede opcionalmente ser farmacéuticamente aceptable, de acuerdo con los portadores o diluyentes conocidos. La composición puede opcionalmente comprender además al menos un compuesto, proteína o composición adicional.

50 También se divulga en la presente al menos un método o composición de anticuerpo anti-MCP-1, para administrar una cantidad terapéuticamente efectiva para modular o tratar al menos una condición relacionada con la

MCP-1 en una célula, tejido, órgano, animal o paciente y/o, antes de, posterior a, o durante una condición relacionada, como se conoce en la técnica y/o se describe en la presente.

5 También se divulga en la presente al menos una composición, dispositivo y/o método de administración de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente efectiva de al menos un anticuerpo anti-MCP-1, de acuerdo con la presente invención.

10 La presente invención proporciona además al menos un método o composición del anticuerpo anti-MCP-1, para diagnosticar al menos una condición relacionada con la MCP-1 en una célula, tejido, órgano, animal o paciente y/o, antes de, posterior a, o durante una condición relacionada, como se conoce en la técnica y/o se describe en la presente.

15 La presente invención también proporciona al menos una composición, dispositivo y/o método de administración para diagnosticar al menos un anticuerpo anti-MCP-1, de acuerdo con la presente invención.

En un aspecto, la presente invención proporciona al menos un anticuerpo anti-MCP-1 mamífero aislado, que comprende al menos una región variable que comprende la SEQ ID NO: 27 ó 28.

20 Otro aspecto divulgado en la presente es al menos un anticuerpo anti-MCP-1 mamífero aislado, que comprende o (i) todas las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes complementarias (CDR) de cadena pesada de SEQ ID NOS: 6, 7 y 8 ó 9; o (ii) todas las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera de SEQ ID NOS: 13, 14 y 15 ó 16.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona al menos un anticuerpo anti-MCP-1 mamífero aislado, que comprende al menos uno de (i) todas las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes complementarias (CDR) de cadena pesada de SEQ ID NOS: 6, 7 y 8 ó 9; o (ii) todas las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena ligera de SEQ ID NOS: 13, 14 y 15 ó 16.

30 El al menos un anticuerpo puede opcionalmente además al menos uno de: enlazar MCP-1 con una afinidad de al menos una seleccionada desde al menos 10^{-9} M, al menos 10^{-10} M, al menos 10^{-11} M, o al menos 10^{-12} M; neutralizar sustancialmente al menos una actividad de al menos una proteína de MCP-1. También se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica al menos un anticuerpo anti-MCP-1 mamífero aislado; un vector de ácido nucleico aislado que comprende el ácido nucleico aislado, y/o célula huésped procarionota o eucariota que comprende el ácido nucleico aislado. La célula huésped puede opcionalmente ser al menos una seleccionada de células NSO, COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, YB2/0, SP2/0, HeLa, de mieloma, o de linfoma, o cualquier célula derivada, inmortalizada o transformada de las mismas. También se proporciona un método para producir al menos un anticuerpo anti-MCP-1, que comprende traducir el ácido nucleico que codifica el anticuerpo bajo condiciones in vitro, in vivo o in situ, de tal forma que el anticuerpo de la MCP-1 es expresado en cantidades detectables o recuperables.

40 También se proporciona una composición que comprende al menos un anticuerpo anti-MCP-1 mamífero aislado y al menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

45 También se divulga un método para diagnosticar o tratar una condición relacionada con la MCP-1 en una célula, tejido, órgano o animal que comprende (a) poner en contacto o administrar una composición que comprende una cantidad efectiva de al menos un anticuerpo anti-MCP-1 mamífero aislado de la invención con, o a, la célula, tejido, órgano o animal.

50 También se proporciona un dispositivo médico, que comprende al menos un anticuerpo anti-MCP-1 mamífero aislado de la invención, en donde el dispositivo es adecuado para poner en contacto o administrar el al menos un anticuerpo anti-MCP-1 por al menos un modo seleccionado de parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocardiaco, intraóseo, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarectal, intrarenal, intraretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, intralesional, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmico.

60 También se proporciona un artículo de fabricación para uso farmacéutico o de diagnóstico humano, comprendiendo material de envasado y un contenedor que comprende una solución, partículas, o una forma liofilizada de al menos un anticuerpo anti-MCP-1 mamífero aislado de la presente invención.

65 También se proporciona un método para producir al menos un anticuerpo anti-MCP-1 mamífero aislado de la presente invención, que comprende proporcionar una célula huésped o animal transgénico o planta transgénica o célula vegetal capaz de expresar en cantidades recuperables el anticuerpo. Además se proporciona en la presente invención un anticuerpo anti-MCP-1 producido por el método anterior.

BREVE DESCRIPCION DEL LISTADO DE SECUENCIAS

<u>SEQ ID NO:</u>	<i>Descripción</i>
1	MCP-1 (CCL2) Humana y variantes usadas para seleccionar enlazantes anti-MCP-1
2	Secuencia variable de cadena pesada de VH1A: FR1, CDR1, FR2, variantes de CDR2, FR3, CDR3, FR4
3	Secuencia variable de cadena pesada de VH3: FR1, CDR1, FR2, variantes de CDR2, FR3, CDR3, FR4
4	Secuencia variable de cadena ligera de Kappa3: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, variantes de CDR3, FR4
5	Secuencia variable de cadena ligera de Lambda3: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, variantes de CDR3, FR4
6	VH1A CDR1 Todas MOR03471
7	VH1A CDR2 3781, 3790, CNTO 888
8	VH1A CDR2 3899
9	VH1A CDR3 Todas MOR03471
10	VH3 CDR1 Todas MOR03548
11	VH3 CDR2 3744, 3747
12	VH3 CDR3 Todas MOR03548
13	Kappa3 CDR1 Todas MOR03471
14	Kappa3 CDR2 Todas MOR03471
15	Kappa3 CDR3 3781
16	Kappa3 CDR3 3790, CNT0888
17	Kappa3 CDR3 3899
18	Lamda3 CDR1 Todas MOR03548
19	Lamda3 CDR2 Todas MOR03548
20	Lamda3 CDR3 3744
21	Lamda3 CDR3 3747
22	Variantes de VH1A CDR2
23	Variantes de VH3 CDR2
24	Variantes de Lk CDR3
25	Variantes de LA CDR3
26	Variantes de HC CDR1
27	Región Variable de Cadena Pesada de CNT0888
28	Región Variable de Cadena Ligera de CNTO888

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Se divulga en la presente al menos un anticuerpo purificado, aislado, recombinante y/o sintético anti-MCP-1, humano, de primate, de roedor, mamífero, quimérico, humanizado, diseñado, o CDR-injertado y anticuerpos anti-idiotipo de la MCP-1 de los mismos, así como composiciones y moléculas de ácidos nucleicos codificantes que comprenden al menos un polinucleótido que codifica al menos un anticuerpo anti-MCP-1 o anticuerpo anti-idiotipo. La presente invención incluye además, pero no está limitada a, métodos para hacer y usar dichos ácidos nucleicos y anticuerpos y anticuerpos anti-idiotipo, incluyendo composiciones, métodos y dispositivos de diagnóstico y terapéuticos.

Citaciones: Ausubel, y otros, ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2004) ; Sambrook, y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor, NY (1989) ; Harlow y Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989) ; Colligan, y otros, eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994- 2004) ; Colligan y otros, Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997- 2004) .

Abreviaciones

aa: aminoácido; BSA: albúmina de suero bovino; CDR: regiones determinantes complementarias; ECL: electro-quimioluminiscencia; HuCAL[®]: Biblioteca de Anticuerpo Combinatoria Humana; HSA: albúmina de suero humano; MCP-1: Proteína-1 Quimioatrayente de Monocitos; Ig: Inmunoglobulina; IPTG isopropil β-D-tiogalactósido; mAb: anticuerpo monoclonal; PBS: solución salina regulada con fosfato, pH 7,4; SET titración de equilibrio de la solución; VH región variable de cadena pesada de inmunoglobulina; VL región variable de cadena ligera de inmunoglobulina.

Definiciones

Como se usa en la presente, un "anticuerpo anti-CCL2", "anticuerpo anti-MCP-1", "porción de anticuerpo anti-MCP-1", o "fragmento de anticuerpo anti-MCP-1" y/o "variante de anticuerpo anti-MCP-1" y similares incluyen cualquier proteína o péptido que contiene una molécula que comprende al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina como, pero no limitado a, una región determinante complementaria (CDR) de una cadena ligera o pesada o un porción que en laza con el ligando de la misma, una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera, una región marco, o cualquier porción de los mismos, o al menos una porción de un receptor de la MCP-1 o proteína de enlace, que puede ser incorporada en un anticuerpo de la presente invención. Dicho anticuerpo además opcionalmente afecta a un ligando específico como, pero no limitado a, donde dicho anticuerpo modula, disminuye, aumenta, antagoniza, angoniza, mitiga, alivia, bloquea, inhibe, abroga y/o interfiere con al menos una actividad o enlace de la MCP-1, o con una actividad o enlace del receptor de la MCP-1, *in vitro*, *in situ* y/o *in vivo*. Como un ejemplo no limitativo, un anticuerpo anti-MCP-1, porción especificada o variante adecuados de la presente invención puede enlazar con al menos una MCP-1, o porciones especificadas, variantes o dominios de la misma.

Como se usa en la presente, "epítipo" significa un segmento o característica de una proteína capaz de enlace específico con un anticuerpo. Los epítipos habitualmente consisten de agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que el enlace de los primeros pero no de los últimos se pierde en presencia de solventes desnaturalizantes. Están incluidos los epítipos de proteínas resultantes del plegamiento conformacional de la molécula de MCP-1 que surge cuando aminoácidos de porciones diferentes de la secuencia lineal de la molécula de MCP-1 se reúnen en proximidad estrecha en espacio tridimensional.

Por "MCP-1" se entiende la secuencia de 76 aminoácidos referenciada en el NCBI número de entrada No. NP_002973 y conocida diversamente como MCP (proteína quimiotáctica de monocitos), SMC-CF (factor quimiotáctico celular del músculo blando), LDCF (factor quimiotáctico derivado de linfocitos), GDCF (factor quimiotáctico de monocitos derivado de gliomas, TDCF (factores quimiotácticos derivados de tumores), HC11 (citoquina humana 11), MCAF (factor activante y quimiotáctico de monocitos). El símbolo genético es SCYA2, los genes JE en el cromosoma humano 17, y la nueva designación es CCL2 (Zlotnik, Yoshie 200. immunity 12:121-127). Je es el homólogo de ratón de la MCP-1/CCL2 humana.

Como se usa en la presente, el término "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que sustancialmente cada parte de la proteína (por ejemplo, CDR, marco, C_L, dominios de C_H (por ejemplo C_H1, C_H2, C_H3), bisagra, (V_L, V_H) está derivado de eventos de recombinación de secuencias genéticas de inmunoglobulina de línea germinal humana o de secuencias de anticuerpos humanas maduras. Además de anticuerpos humanos aislados, como un anticuerpo humano puede ser obtenido inmunizando ratones transgénicos capaces de montar una respuesta inmune con genes de la línea germinal de la inmunoglobulina humana (Lonberg y otros, Int Rev Immunol 13 (1) : 65- 93 (1995) y Fishwald y otros, Nat Biotechnol 14 (7) : 845- 851 (1996)) o puede ser seleccionada de una biblioteca de repertorio de anticuerpos humanos como se describe en la presente. Una fuente de dichas secuencias de genes humanos se puede encontrar en cualquier biblioteca adecuada como la VBASE, una base de datos de genes de anticuerpos humanos (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc>) o productos traducidos de la misma o en <http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/> que ofrece anticuerpos humanos clasificados en agrupaciones basadas en sus similitudes de secuencias de aminoácidos. Con el ámbito de esta definición, están anticuerpos compuestos o fragmentos funcionales de un anticuerpo compuesto humano que incluye regiones marco de una o más secuencias de anticuerpos humanos y regiones CDR de dos fuentes humanas o no humanas diferentes. Dentro de la definición de "anticuerpo humano" está un anticuerpo compuesto o fragmento funcional de un anticuerpo compuesto humano que contiene regiones marco de tanto secuencias de anticuerpos humanos de la línea germinal y reorganizadas y regiones CDR de dos anticuerpos de fuentes diferentes. Un anticuerpo compuesto humano o fragmento funcional de un anticuerpo compuesto humano de acuerdo con esta divulgación incluye regiones marco de una o más secuencias

de anticuerpos humanos, y regiones CDR derivadas de una secuencia de anticuerpos humanos o no humanos o puede ser completamente sintética. Por lo tanto, un anticuerpo humano es distinto de un anticuerpo quimérico o humanizado. Se indica que un anticuerpo humano puede ser producido por un animal no humano o célula procariota o eucariota que es capaz de expresar genes de inmunoglobulina humana funcionalmente reorganizada (por ejemplo, cadena pesada y/o cadena ligera). Además, cuando un anticuerpo humano es un anticuerpo de cadena única, puede comprender un péptido conector que no se encuentra en anticuerpos humanos nativos. Por ejemplo, un Fv puede comprender un péptido conector, como de dos a alrededor de ocho glicinas u otros residuos de aminoácidos, que conecta la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Se considera que dichos péptidos conectores son de origen humano.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos) son anticuerpos quiméricos que has reemplazado sustancialmente porciones de secuencia que fueron derivadas de inmunoglobulina no humana. En la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo recipiente) en las que los residuos de las CDR (las regiones determinantes complementarias que se conocen también como la región hipervariable) del recipiente son reemplazadas por residuos de CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunas situaciones, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo recipiente o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a las de la inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina IgG humana. Para detalles adicionales ver Jones y otros, Nature 321:522-525 (1986); Reichmann y otros, Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

Como se usa en la presente, K_d de un anticuerpo se refiere a la constante de disociación, K_D , el anticuerpo para un antígeno predeterminado es una medida de afinidad del anticuerpo para un objetivo específico. Los anticuerpos de alta afinidad tienen un K_D de 10^{-8} M o menos, más preferiblemente 10^{-9} M o menos e incluso más preferiblemente 10^{-10} M o menos, para un antígeno predeterminado. El término " K_{dis} " o " K_D " o " K_d " como se usa en la presente, se pretende que se refiera a la tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. El " K_D ", es el ratio de la tasa de disociación (k_2), también llamada la "constante de disociación (k_{off})", a la tasa de la tasa de asociación (k_1) o "constante de asociación (K_{on})". Por lo tanto, K_D , es igual a k_2/k_1 o k_{off}/k_{on} y se expresa como una concentración molar (M). Se deduce que cuanto más pequeña es la K_D , más fuerte es el enlace. Por lo tanto una K_D de 10^{-6} M (o 1 microM) indica enlace débil en comparación con 10^{-9} M (o 1nM).

Como se usa en la presente, los términos "especificidad para" y "enlace específico" y "enlaza específicamente" se refiere al enlace de anticuerpo con un antígeno predeterminado con mayor afinidad que para otros antígenos o proteínas. Típicamente, el anticuerpo enlaza con una constante de disociación (K_D) de 10^{-7} o menos, y enlaza con el antígeno predeterminado con una K_D que es al menos dos veces menor que su K_D para el enlace con un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína, o cualquier otro polipéptido especificado) que no sea el antígeno predeterminado. Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan en la presente intercambiamente con el término "un anticuerpo que enlaza específicamente con un antígeno" o "un anticuerpo específico del antígeno" por ejemplo un anticuerpo específico de la MCP-1.

1. Preparación de los Anticuerpos de la Invención

La preparación de anticuerpos humanos que son específicos para la proteína MCP-1 humana o fragmentos de los mismos, tales como aislados y/o proteína MCP-1 o una porción de la misma (incluyendo moléculas sintéticas, como péptidos sintéticos) se puede realizar usando cualquier técnica conocida en la técnica. Los anticuerpos humanos pueden ser producidos usando varias técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo humano es seleccionado de una biblioteca de fagos, donde esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan y otros. Nature Biotechnology 14:309-314 (1996); Sheets y otros. PITAS (USA) 95:6157-6162 (1998)); Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks y otros. J. Mol. Biol., 222:581 (1991)).

Los anticuerpos humanos también se pueden hacer introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Por ejemplo, un ratón transgénico, que comprende un transgén de cadena pesada de inmunoglobulina humana funcionalmente reorganizado y un transgén que comprende ADN de un locus de cadena ligera de inmunoglobulina humana que puede someterse a reorganización funcional, pueden ser inmunizados con MCP-1 humana o un fragmento de la misma para provocar la producción de anticuerpos. Si se desea, las células que producen anticuerpos pueden ser aisladas y se pueden preparar hibridomas u otras células productoras de anticuerpos inmortalizadas como se describe en la presente o se conoce en la técnica. Alternativamente, el

anticuerpo, porción especificada o variante puede ser expresado usando el ácido nucleico codificante o porción del mismo en una célula huésped adecuada.

5 En el momento del desafío con un antígeno apropiado, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la vista en humanos en todos los aspectos, incluyendo la reorganización de los genes, montaje, y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes US N° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 6.625.126; 5.633.425; 5.661.016 y en las siguientes publicaciones científicas: Marks y otros, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg y otros, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994); Fishwild y otros, *Nature Biotechnology* 14: 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996);
10 Lonberg and Huezar, *Intern. Rev.*

15 *Immunol.* 13:65-93 (1995). Alternativamente, el anticuerpo humano se puede preparar por inmortalización de linfocitos B humanos que producen un anticuerpo dirigido contra un antígeno objetivo (tales linfocitos B pueden ser recuperado de una individuo o pueden ser inmunizados in vitro. Ver, por ejemplo, Cole y otros, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner y otros, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95 (1991); y la Patente US N° 5.750.373. Las células que producen anticuerpos pueden obtenerse también de la sangre periférica o, preferiblemente de los ganglios del bazo o linfáticos, de humanos u otros animales adecuados que han sido inmunizados con el antígeno de interés. También se puede usar cualquier otra célula huésped adecuada para expresar el ácido nucleico heterólogo o endógeno que codifica un anticuerpo, fragmento especificado o variante del mismo, de la presente invención. Las células fusionadas (hibridomas) células recombinantes pueden ser aisladas usando condiciones de cultivo selectivas u otros métodos conocidos adecuados, y clonadas limitando la dilución o clasificación celular, u otros métodos conocidos. Las células que producen anticuerpos con la especificidad deseada pueden ser seleccionadas por un ensayo adecuado (por ejemplo, ELISA).

25 En un enfoque, un hibridoma se produce fusionando una línea celular inmortal adecuada (por ejemplo una línea celular de mieloma como, pero no limitada a, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A, o similar, o heteromielomas, productos de fusión de los mismos, o cualquier célula o célula de fusión derivada de los mismos, o cualquier otra línea celular adecuada como se conoce en la técnica. Ver, por ejemplo, www.atcc.org, www.lifetech.com, y similares, con células productoras de anticuerpos como, pero no limitado a, bazo aislado o clonado, sangre periférica, linfa, amígdala, u otras células inmunes o que contienen células B, o cualquier otra célula que exprese constante o variable o marco o secuencias de CDR de cadena pesada o ligera, ya sea ácido nucleico endógeno o heterólogo, como recombinante o endógena, viral, bacteriana, de algas, procarionta, anfibia, de insecto, de reptil, de pescado, mamífera, de roedor, equina, ovina, de cabra, de oveja, de primate, eucariota, ADN genómico, ADNc, ADNr, ADN o ARN mitocondrial, ADN o ARN de cloroplasto, ARNhn, ARNm, ARNt, de cadena sencilla, doble o triple, hibridado, y similares o cualquier combinación de los mismos, Ver, por ejemplo, Ausubel, supra, y Colligan, *Immunology*, supra, capítulo 2.

40 Los anticuerpos humanos que enlazan con la MCP-1 humana y que comprenden una región variable de cadena pesada o ligera se pueden preparar por métodos adecuados, como presentación en fagos (Katsube, Y., y otros, *Int J Mol. Med.*, 1 (5) : 863- 868 (1998)) . se pueden usar otros métodos adecuados de producir o aislar anticuerpos de la especificidad deseada incluyendo, pero no limitado a métodos que seleccionan anticuerpos recombinantes de una biblioteca de péptidos o proteínas (por ejemplo, pero no limitado a, bacteriofago, ribosoma, oligonucleótido, ARN, ADNc, os similares, biblioteca de presentación; por ejemplo como está disponible de Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, UK; MorphoSys, Martinsreid/ Planegg, DE; Biovation, Aberdeen, Escocia, UK; BioInvent, Lund, Suecia; Dyax Corp., Enzon, Affymax/ Biosite; Xoma, Berkeley, CA; Ixsys. Ver por ejemplo, EP 368, 684, PCT/GB91/01134; PCT/GB92/01755; PCT/GB92/002240; PCT/GB92/00883; PCT/GB93/00605; US 08/350260 (5/12/94) ; PCT/GB94/01422; PCT/GB94/02662; PCT/GB97/01835; (CAT/MRC) ; WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; PCT/US94/1234; WO92/18619; WO96/07754; (Scripps) ; WO96/13583, WO97/08320 (MorphoSys) ; WO95/16027 (BioInvent) ; WO88/06630; WO90/3809 (Dyax) ; US 4, 704, 692 (Enzon) ; PCT/US91/02989 (Affymax); WO89/06283; EP 371 998; EP 550 400; (Xoma) ; EP 229 046; PCT/US91/07149 (Ixsys); o péptidos o proteínas generados estocásticamente - US 5723323, 5763192, 5814476, 5817483, 5824514, 5976862, WO 86/05803, EP 590 689 (Ixsys, ahora Applied Molecular Evolution (AME)) o que se basan en la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones SCID, Nguyen y otros, *Microbiol. Immunol.* 41: 901-907 (1997) ; Sandhu y otros, *Crit. Rev. Biotechnol.* 16: 95- 118 (1996) ; Eren y otros, *Immunol.* 93: 154- 161 (1998).

Realización Específica

60 Los solicitantes ejemplificaron un método de seleccionar y hacer anticuerpos humanos con la afinidad, especificidad y bioactividad deseadas hacia la MCP-1 humana comenzando de una biblioteca Fab humana de presentación de fagos. En resumen, de todos los 10 barridos se cribaron 17856 clones llevando a 1104 resultados principales y finalmente 26 Fabs únicos.

65 Para proporcionar un ligando único que ejemplificara una capacidad de retención del antígeno para enlazar con receptores de MCP-1 de origen natural, la MCP-1 humana y sus análogos fueron sintetizados y modificados químicamente para usos específicos en ensayos de selección, afinidad y biológicos. Se usaron la MCP-1 Ile⁴¹

humana, y la MCP-1 Tyr⁴³ humana en el barrido de fase sólida inicial así como otros aspectos de ensayos selección de anticuerpos y maduración de la afinidad descritos en la presente como eran las versiones biotiniladas de la muteína de la MCP-1: Ile41, Lys (Biotina-PEG₄)⁶⁹) y (Ile41, Lys (biotina-PEG₄)⁷⁵ (SEQ ID NO: 1).

5 Como ninguno de estos 26 Fabs únicos tenían una afinidad medida como $K_D < 0,5$ nM o los calores de IC_{50} deseados en los bio-ensayos especificados, la maduración fue esencial. Los candidatos para la maduración de la afinidad fueron seleccionados como Fabs y las IgGs respectivas fueron analizadas en paralelo para el proceso de maduración. Los criterios de selección fueron 1) la actividad en el ensayo de enlace del receptor de la célula completa, 2) la actividad en el ensayo de movilización de calcio, 3) la afinidad con la MCP-1 humana, 4) la especificidad con la MCP-1 humana, y 5) la afinidad con la MCP-1 cyno y el enlace con la MCP-1 nativa. Las mediciones de afinidad Biacore en el modo de captura de Fab con la MCP-1 en solución funcionaron bien para la clasificación de los candidatos de maduración y las afinidades fueron en el intervalo de 49 a 406 nM. La mejor Fab parenteral mostró una afinidad de 50 nM, indicando que la afinidad tenía que ser optimizada al menos 100 veces para alcanzar el criterio de éxito de la afinidad. Además el enlace con la MCP-1 de mono cynomolgus y humana nativa podía ser detectada en el modo de captura de Fab, que fue un prerrequisito adicional para la maduración. Las afinidades con la MCP-1 de mono cynomolgus fueron en el mismo intervalo que para la MCP-1 humana. Debido a modificaciones potenciales, como por ejemplo la glicosilación, se tenía que demostrar que los anticuerpos no sólo reconocían la MCP-1 sintética o recombinante si no también la MCP-1 nativa que estaba expresada endógenamente y purificada de sobrenadante celular PANC-1 humano.

10 La especificidad con la MCP-1 se midió en el modo de captura de anticuerpos en Biacore, añadiendo 100 nM de cada quimioquina y detectando la señal de enlace. La mayoría de los Fabs candidatos para la maduración eran específicos, mientras que un par mostró alguna reactividad cruzada con quimioquinas homólogas.

15 Una característica muy importante del Fab fue la actividad neutralizante y se establecieron varios ensayos diferentes para analizar la actividad. El ensayo de enlace celular ¹²⁵I-MCP-1 THP1 fue el ensayo más sensible, que fue especialmente importante después de la optimización. Los Fabs parentales mostraron valores de IC_{50} de 10 - 650 nM. Además del ensayo de enlace de radioligando se planearon otros bioensayos secundarios para probar la actividad neutralizante a niveles diferentes de la vía de señalización secuencia abajo de la MCP-1.

20 La atracción de monocitos es una de las funciones principales de la MCP-1 pero lo más probable debido a actividad perdida, factores co-purificados o endotoxinas los Fabs parentales no funcionaron en los ensayos de quimiotaxis y por lo tanto se acordó probar la IgG1 respectiva solamente, en lugar de tratar de conseguir que los Fabs funcionasen en este ensayo. Otro evento de señalización secuencia abajo es la liberación de calcio en el citoplasma. De hecho todos los Fabs, que mostraron actividad neutralizante en el ensayo de enlace del radioligando, inhibieron la movilización de calcio inducida por la MCP-1 en las células THP-1 con un intervalo de IC_{50} de 0,1 a 3 μ M. Se tenía que demostrar que la actividad biológica de los Fabs parentales era completamente retenida después de la conversión en el formato IgG. Como se esperaba todas las IgG respectivas mostraron actividad en el ensayo de enlace del radioligando, el ensayo de movilización de calcio e incluso el ensayo de quimiotaxis, probando finalmente que todas las IgGs retuvieron las actividades vistas en el formato Fab e incluso inhibieron la quimiotaxis inducida por la MCP-1.

25 Para la maduración de la afinidad, se seleccionaron siete Fabs diferentes con un K_D en el intervalo de 10 - 400 nM y los valores de IC_{50} en el intervalo de 10 - 650 nM en el ensayo de enlace del radioligando de acuerdo con sus características. Posteriormente fueron agruparon en 3 grupos para la clonación de la biblioteca y la selección posterior. La optimización L-CDR3 y H-CDR-2 se realizaron en paralelo. Se generaron bibliotecas de alta calidad. El barrido de la solución se usó para el proceso de selección y el rigor de selección se aumento por la reducción de antígenos, selección de constante de disociación y pasos de lavados muy largos. Para el proceso de cribado siguiente se uso un cribado BioVeris permitiendo una clasificación del rendimiento alta de los enlazantes optimizados. El cribado funcionó muy eficientemente para la identificación de los enlazantes mejorados. Además los Fabs optimizados en L-CDR3 y H-CDR-2 pudieron ser identificados, haciendo la clonación cruzada posible para los derivados de MOR03471 y MOR03548. Especialmente la clonación cruzada de los derivados de MOR03471 fue muy exitosa llevando a una afinidad mejorada 100 veces adicional en comparación con los dos Fabs de partica optimizados. De los 17 Fabs optimizados, 16 fueron seleccionados para caracterización detallada y finalmente los 4 enlazantes, que cumplieron todos los criterios de éxito, derivadas del MOR03471 parenteral, dos fueron optimizadas en L-CDR3 solamente y dos venían de clonación cruzada. Los análisis y secuencias de los análisis de candidatos madurados se detallan en los Ejemplos 3 y 4, Tablas 4-6, y SEQ IS Nos: 2-28.

30 Después de la maduración, la afinidad de los enlazantes optimizadas no podía ser analizada en Biacore principalmente ya que se alcanzaron los límites de detección. En MorphoSys se usó un método de determinación de K_D muy sensible, siendo la titración de equilibrio de la solución (SET) combinada con tecnología BioVeris. Las constantes de disociación monovalentes podían ser calculadas por medio de modelos de ajuste apropiados para el Fab y la IgG. Además de la medición de la afinidad, este método se uso para estudios de reactividad cruzada. Las afinidades de los candidatos finales estuvieron en el intervalo de 10 a 320 pM para MCP-1 humana y de cynomolgus medidas en BioVeris y confirmadas por KinexA en Centocor. Las pruebas de especificidad usando BioVeris no mostraron reactividad cruzada con la MCP-2 humana para los 16 Fabs e IgGs probados. Varios Fab e IgG tampoco

mostraron reactividad cruzada significativa con la Eotaxina humana. De acuerdo con los criterios de éxito, el criterio de especificidad se fijó como no enlace con 100 mM de MCP-2, 3, 4 humana homóloga, y 100 nM de Eotaxina 1, 2 y 3 en el modo de captura de anticuerpos de Biacore. En el modo de captura Fab de Biacore todos los Fabs seleccionados mostraron diferente grado de reactividad cruzada con la MCP-2 y la Eotaxina. El putativo aumentó ligeramente la inestabilidad de los Fabs en comparación con las IgGs y la capacidad de enlace inespecífica general de las quimioquinas podía haber contribuido al enlace inespecífico. Varias de las IgG seleccionadas no mostraron señal de enlace significativa con las quimioquinas homólogas y cumplieron los criterios de éxito de especificidad en el modo de captura de IgG de Biacore. En los experimentos de titración de equilibrio de la solución usando BioVeris varios Fabs no mostraron reactividad cruzada. Para analizar si la actividad de enlace del Fab con la MCP-2 detectada en el Biacore se traduce en actividad neutralizadora, se desarrollaron ensayos de enlace celular completo de radioligando en Centocor. Los Fabs probados en los ensayos no mostraron inhibición significativa de la MCP-2 etiquetada 125I con el receptor CCR2 en células Thp-1 ($IC_{50} \geq 2\mu M$).

Debido a la baja cantidad de 1 ng/ml de MCP-1 necesitada, el ensayo de enlace de radioligando fue el ensayo más sensible en este proyecto con un límite de IC_{50} del ensayo de alrededor de 100 pM por Fab e incluso 20 pM por IgG. Además de la afinidad, la actividad en este ensayo se usó para la clasificación y selección de enlazantes optimizadas para la caracterización detallada. La mejora total en la actividad durante la optimización fue hasta un factor de 1000x y finalmente un Fab derivado del MOR03471, el MOR03878, mostró la afinidad más alta a 110 pM. Todas las IgG probadas retuvieron la actividad en el ensayo de enlace de radioligando. Los valores de IC_{50} de los 4 candidatos de IgG finales MOR03781, MOR03790, MOR03850 y MOR03878 estaban en el intervalo de 20 - 50 pM, siendo incluso ligeramente mejores en comparación con la actividad respectiva de los Fabs. Una razón para la actividad mejorada es que la IgG bivalente neutraliza dos MCP-1 por molécula (factor 2x). Las IgGs vinieron de una producción de mayor escala pura y por lo tanto otra razón podría haber sido la pureza, estabilidad o actividad de los anticuerpos. Como bio-ensayo secundario se desarrolló exitosamente un ensayo basado en FACS, que medía la inhibición de la internalización del receptor CCR2 inducida por MCP-1. Finalmente el ensayo incluso permitió la determinación y clasificación de IC_{50} . Los 4 Fabs candidatos finales, MOR03790, MOR03850, MOR03781 y MOR03878 mostraron valores de IC_{50} en el intervalo de 3 a 5 nM.

La MCP-1 nativa se necesitó para confirmar las actividades de los anticuerpos de la MCP-1 aislados contra la MCP-1 sintética o recombinante. La MCP-1 nativa fue purificada de sobrenadante PANC1 y usada para la inducción de la liberación de calcio. Los Fabs optimizados mostraron inhibición de la movilización de calcio inducida por la MCP-1 nativa con mayor actividad comparada con el anticuerpo de referencia C775. Todos los Fabs preseleccionados derivados de MOR03548 inhibieron completamente el enlace del C775 con la MCP1 en un ELISA competitivo. Todos los Fabs preseleccionados derivados de MOR03471 mostraron competición parcial (~60%) en el ELISA, indicando que los epítomos al menos se superponen. Finalmente los cuatro anticuerpos MOR03781, MOR03790, MOR03850 y MOR03878 cumplieron todos los criterios de éxito incluyendo el criterio de especificidad y la neutralización de la MCP-1 nativa.

Otros métodos adecuados de producir anticuerpos

Otros métodos para producir los anticuerpos de la invención que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos, como se conoce en la técnica y/o como se describe en la presente. Dichas técnicas incluyen, pero no están limitadas a, presentación de ribosomas (Hanes y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937-4942 (Mayo 1997); Hanes y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130-14135 (Nov. 1998)); tecnologías de producción de anticuerpos de una sola célula (por ejemplo, método de anticuerpos de linfocitos seleccionados ("SLAM") Patente US N° 5,627,052, Wen y otros, J. Immunol. 17:887-892 (1987); Babcook y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848 (1996)); microgotas de gel y citometría de flujo (Powell y otros, Biotechnol. 8:333-337 (1990); One Cell Systems, Cambridge, MA; Gray y otros, J. Imm. Meth. 182:155-163 (1995); Kenny y otros, Bio/Technol. 13:787-790 (1995)); selección de células B (Steenbakkers y otros, Molec. Biol. Reports 19:125-134 (1994); Jonak y otros, Progress Biotech, Vol. 5, In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Países Bajos (1988)).

Se pueden usar también métodos para diseñar o humanizar anticuerpos no humanos o humanos y son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado o diseñado tiene uno o más residuos de aminoácido de una fuente que es no humana, por ejemplo, pero no limitada a, ratón, rata, conejo, primate no humano u otro mamífero. A estos residuos de aminoácidos humanos se hace referencia a menudo como residuos "importados", que son tomados típicamente de una variable, constante u otro dominio "importado" de una secuencia humana conocida. Las secuencias de Ig humana conocidas son bien conocidas en la técnica y pueden cualquier secuencia conocida. Se han descrito varias estrategias para optimizar el enlace, conformación e inmunogenicidad reducida de anticuerpos humanos diseñados en ver, por ejemplo, Presta y otros. J Immunol. 151:2623-2632, 1993; WO200302019, y WO2005080432.

Dichas secuencias importadas pueden ser usadas para reducir la inmunogenicidad o reducir, potenciar o modificar el enlace, afinidad, constante de asociación, constante de disociación, avidéz, especificidad, vida media o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica. Generalmente parte o todas las secuencias de las CDR no humanas o humanas se mantienen mientras las secuencias no humanas de las regiones variable y

5 constante se reemplazan con aminoácidos humanos u otros. Los anticuerpos pueden también ser opcionalmente humanizados con la retención de la afinidad alta para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, los anticuerpos humanizados pueden ser opcionalmente preparados por un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles comúnmente y son familiares para los expertos en la técnica. Hay programas de ordenador disponibles que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas muestras permite el análisis de la función probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de 10 residuos que influencia la capacidad de la inmunoglobulina candidata para enlazar con su antígeno. De esta manera, los residuos de FR pueden ser seleccionados y combinados de las secuencias de consenso e importadas de tal forma que la característica del anticuerpo deseada, como la afinidad aumentada para el antígeno objetivo, se consigue. En general los residuos de las CDR están implicados directamente y más sustancialmente en influenciar el enlace con el antígeno. La humanización o diseño de anticuerpos de la presente invención se puede realizar usando cualquier método conocido como, pero no limitado a, los descritos en Winter (Jones y otros, Nature 321: 522 (1986); Riechmann y otros, Nature 332: 323 (1988); Verhoeyen y otros, Science 239: 1534 (1988)), Sims y otros, J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901 (1987), Carter y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 4285 (1992); Presta y otros, J. Immunol. 151: 2623 (1993), Patentes US N°: 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5, 766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539; 4816567, PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246.

25 Los ratones transgénicos que pueden producir un repertorio de anticuerpos humanos que enlazan con antígenos humanos pueden ser producidos por métodos conocidos (por ejemplo, pero no limitado a, Patentes US N° 5, 770, 428, 5, 569, 825, 5, 545, 806, 5, 625, 126, 5, 625, 825, 5, 633, 425, 5, 661, 016 y 5, 789, 650 emitidas a Lonberg y otros; Jakobovits y otros WO 98/50433, Jakobovits y otros WO 98/24893, Lonberg y otros WO 98/24884, Lonberg y otros WO 97/13852, Lonberg y otros WO 94/25585, Kucherlapate y otros WO 96/34096, Kucherlapate y otros EP 0463 151 B1, Kucherlapate y otros EP 0710 719 A1, Surani y otros Patente US No. 5, 545, 807, Bruggemann y otros WO 90/04036, Bruggemann y otros EP 0438 474 B1, Lonberg y otros EP 0814 259 A2, Lonberg y otros GB 2 272 440 A, Lonberg y otros Nature 368: 856- 859 (1994), Taylor y otros, Int. Immunol. 6 (4) 579-591 (1994), Green et al, Nature Genetics 7: 13- 21 (1994), Mendez y otros, Nature Genetics 15: 146- 156 (1997), Taylor y otros, Nucleic Acids Research 20 (23) : 6287- 6295 (1992), Tuailon y otros, Proc Natl Acad Sci USA 90 (8) 3720-3724 (1993), Lonberg y otros, Int Rev Immunol 13 (1) : 65- 93 (1995) and Fishwald y otros, NatBiotechnol 14 (7) : 845- 851 (1996)). Generalmente, estos ratones comprenden al menos un ADN que comprenden transgenes de al menos un locus de inmunoglobulina humana que está funcionalmente reorganizado, o que puede experimentar reorganización funcional. Los loci de inmunoglobulina endógenos en dichos ratones pueden ser desorganizados o borrados para eliminar la capacidad del animal de producir anticuerpos codificados por genes endógenos.

40 El cribar anticuerpos para enlace específico con proteínas o fragmentos similares se puede conseguir convenientemente usando bibliotecas de presentación de péptidos. Este método implica el cribado de grandes colecciones de péptidos para miembros individuales que tienen la función o estructura deseada, el cribado de anticuerpos de bibliotecas de presentación de péptidos es bien conocido en la técnica. Las secuencias de péptidos presentadas pueden ser de desde 3 a 5000 o más aminoácidos de longitud, frecuentemente de 5-100 aminoácidos de largo, y a menudo de alrededor de 8 a 25 aminoácidos de largo. Además de los métodos sintéticos químicos directos para generar bibliotecas de péptidos, se han descrito varios métodos de ADN recombinante. Un tipo implica la presentación de una secuencia de péptidos en la superficie de un bacteriófago o célula. cada bacteriófago o célula contiene la secuencia de nucleótido que codifica la secuencia del péptido presentado particular. Dichos métodos se describen en las Publicaciones de Patente de PCT N° 91/17271, 91/18980, 91/19818, y 93/08278. Otros sistemas para generar bibliotecas de péptidos tienen aspectos de tanto la síntesis química in vitro como de métodos recombinantes. Ver, Publicaciones de Patente PCT N° 92/05258, 92/14843, y 96/19256. Ver también las Patentes U.S. N° 5.658.754: y5.643.768. Las bibliotecas de presentación de péptidos, vectores y kits de cribado están disponibles comercialmente de proveedores como Invitrogen Carlsbad, CA), and Cambridge antibody Technologies (Cambridgeshire, UK). Ver, por ejemplo, Patentes U.S. N° 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456, cedidas a Enzon; 5223409, 5403484, 5571698, 55837500, cedidas a Dyax, 5427908, 5580717, cedidas a Affymax; 5885793, cedidas a Cambridge antibody Technologies; 5750373, cedidas a Genentech, 5618920, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493, 5698417, cedidas a Xoma, Colligan, supra; Ausubel, supra; o Sambrook, supra.

60 2. Ácidos Nucleícos de la Invención

Usando la invención proporcionada en la presente, como las secuencias de nucleótidos que codifican al menos un 70-100% de los aminoácidos contiguos de al menos una de las SEQ ID NOS: 2-5 y 27-28, fragmentos especificados, variantes o secuencias de consenso de las mismas, se puede obtener una molécula de ácido nucleico que codifica al menos un anticuerpo anti-MCP-1 usando métodos descritos en la presente usando métodos descritos en la presente o como se conoce en la técnica. Las moléculas de ácidos nucleicos aisladas pueden incluir moléculas de ácidos nucleícos que comprenden un marco de lectura abierto (ORF), opcionalmente con uno o más

intrones por ejemplo, pero no limitado a, al menos una porción especificada de al menos una CDR, como CDR1, CDR2 y/o CDR3 de al menos una cadena pesada (por ejemplo, SEQ ID NOS: 6-12, 22 y 23) o cadena ligera (por ejemplo, SEQ IS NOS: 13-21 y 24-26); moléculas de ácidos nucleicos que comprenden la secuencia codificante para un anticuerpo anti-MCP-1 o región variable (por ejemplo, SEQ ID NOS: 2-5, 27 y 28); y moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos sustancialmente diferente de las descritas anteriormente pero que, debido a la degeneración del código genético, todavía codifican al menos un anticuerpo anti-MCP-1 como se describe en la presente y/o se conoce en la técnica. Por supuesto, el código genético es bien conocido en la técnica. De este modo, será rutinario para alguien experto en la técnica el generar dichas variantes de ácidos nucleicos degeneradas que codifican para anticuerpos anti-MCP-1 específicos de la presente invención. Ver por ejemplo, Ausubel y otros, *supra*, y tales variantes de ácidos nucleicos están incluidas en la presente invención.

Como se indica en la presente, las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención que comprenden un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-MCP-1 pueden incluir, pero no están limitadas a, las que codifican la secuencia de aminoácidos de un fragmento de anticuerpos, por sí mismo; la secuencia codificante para el anticuerpo completo o una porción del mismo; la secuencia codificante para un anticuerpo, fragmento o porción, así como secuencias adicionales, como la secuencia codificante de al menos un péptido líder o de fusión señal, con o sin las secuencias codificantes adicionales anteriormente mencionadas, como al menos un intrón, junto con secuencias no codificantes adicionales incluyendo, pero no limitadas a, secuencias 5' y 3' no codificantes, como las secuencias no traducidas transcritas que juegan un papel en la transcripción, procesamiento de ARNm, incluyendo empalme y señales de poliadenilación (por ejemplo, enlace de ribosoma y estabilidad de ARNm); una secuencia codificante adicional que codifica para aminoácidos adicionales, como las que proporcionan funcionalidades adicionales. Por lo tanto, la secuencia que codifica un anticuerpo puede ser fusionada con una secuencia marcadora, como una secuencia que codifica un péptido que facilita la purificación del anticuerpo fusionado que comprende un fragmento o porción de anticuerpo.

Polinucleótidos Que Hibridan Selectivamente a un Polinucleótido como se Describe en la Presente: Los divulgados en la presente son ácidos nucleicos aislados que hibridan bajo condiciones de hibridación selectivas a un polinucleótido divulgado en la presente. Por lo tanto, los polinucleótidos de esta realización pueden ser usados para aislar, detectar, y/o cuantificar ácidos nucleicos que comprenden dichos polinucleótidos. Por ejemplo, los polinucleótidos de la presente invención pueden ser usados para identificar, aislar o amplificar clones de longitud completa o parcial en una biblioteca depositada. En algunas realizaciones divulgadas en la presente, los polinucleótidos son secuencias de ADNc o genómicas aisladas, o de otras formas complementarias a, un ADNc de una biblioteca de ácidos nucleicos mamífera o humana.

Preferiblemente, la biblioteca de ADNc comprende al menos un 80% de secuencias de longitud completa, preferiblemente al menos un 85% o 90% de secuencias de longitud completa, y más preferiblemente al menos un 95% de secuencias de longitud completa. Las bibliotecas de ADNc pueden ser normalizadas para aumentar la representación de secuencias raras. Las condiciones de hibridación de rigurosidad bajas o moderadas pueden ser típicamente, pero no exclusivamente, empleadas con secuencias que tienen una identidad de secuencia reducida en relación a secuencias complementarias. Las condiciones de rigurosidad moderadas y altas pueden ser opcionalmente empleadas para secuencias de identidad mayor. Las condiciones de rigurosidad bajas permiten la hibridación selectiva de secuencias que tienen alrededor del 70% de identidad de secuencia y pueden ser empleadas para identificar secuencias ortólogas o parálogas.

Opcionalmente, los polinucleótidos de esta invención codificarán al menos una porción de un anticuerpo codificado por los polinucleótidos descritos en la presente. Los polinucleótidos de esta invención abarcan secuencias de ácidos nucleicos que pueden ser empleadas para la hibridación selectiva aun polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente invención. Ver, por ejemplo, Ausubel, *supra*; Colligan, *supra*.

Construcción de Ácidos Nucleicos: Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención pueden ser hechos usando (a) métodos recombinantes, (b) técnicas sintéticas, (c) técnicas de purificación, o combinaciones de las mismas, como es bien conocido en la técnica.

Métodos Recombinantes para Construir Ácidos Nucleicos: Las composiciones de ácidos nucleicos aislados de esta invención, como ARN, ADNc, ADN genómico, o cualquier combinación de los mismos, se puede obtener de fuentes biológicas usando cualquier número de metodologías de clonación conocidas por aquellos expertos en la técnica. En algunas realizaciones, las sondas de oligonucleótidos que hibridan selectivamente, bajo condiciones de rigurosidad, a los polinucleótidos de la presente invención se usan para identificar la secuencia deseada en una biblioteca de ADNc o ADN genómico. El aislamiento del ARN, y la construcción de las librerías de ADNc y genómicas, es bien conocida para los expertos en la técnica. (ver, por ejemplo, Ausubel, *supra*; o Sambrook, *supra*)

Cribado de Ácidos Nucleicos y Métodos de Aislamiento: Una biblioteca de ADNc o genómica puede ser cribada usando una sonda basada en la secuencia de un polinucleótido de la presente invención, como los divulgados en la presente. Las sondas pueden ser usadas para hibridar con secuencias de ADN genómico o ADNc para aislar genes homólogos en los mismos organismos o en organismos diferentes. Aquellos expertos en la técnica apreciarán que se pueden emplear varios grados de rigurosidad de hibridación en el ensayo; y tanto el medio de

5 hibridación como el de lavado pueden ser rigurosos. A medida que las condiciones de hibridación se vuelven más rigurosas, debe haber un mayor grado de complementariedad entre la sonda y el objetivo para la que tenga lugar la formación dúplex. El grado de rigurosidad puede ser controlado por uno o más de temperatura, fuerza iónica, pH y la presencia de un solvente parcialmente desnaturizante como la formamida. Por ejemplo, la rigurosidad de la hibridación se varía convenientemente cambiando la polaridad de la solución reactiva a través de, por ejemplo, la manipulación de la concentración de formamida dentro del intervalo del 0% al 50%. El grado de complementariedad (identidad de secuencia) requerida para el enlace detectable variará de acuerdo con la rigurosidad del medio de hibridación y/o medio de lavado. El grado de complementariedad será óptimamente el 100% o el 70-100%, o cualquier intervalo o valor del mismo. Sin embargo, se debe entender que las variaciones de secuencia mínimas en las sondas y cebadores pueden ser compensadas reduciendo la rigurosidad del medio de hibridación y/o lavado.

10 Los métodos de amplificación de ARN o ADN son bien conocidos en la técnica y pueden ser usados de acuerdo con la presente invención sin experimentación indebida, en base a las enseñanzas y guía presentadas en la presente. Los métodos conocidos de amplificación de ADN o ARN incluyen, pero no están limitados a, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y procesos de amplificación relacionados (Mullis, y otros., Patente U.S. N° 4,683,202 (1987); e Innis, y otros, PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990).

15 Métodos Sintéticos para Construir Ácidos Nucleicos: Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden ser preparados también por síntesis química directa por métodos conocidos (ver por ejemplo, Ausubel y otros, supra). La síntesis química produce generalmente un oligonucleótido de cadena sencilla, que puede ser convertido en un ADN de cadena doble por hibridación con una secuencia complementaria, o por polimerización con una polimerasa de ADN usando la cadena sencilla como una plantilla. Alguien experto en la técnica reconocerá que mientras la síntesis química de ADN puede ser limitada a secuencias de alrededor de 100 o más bases, se pueden obtener secuencias más largas por la ligación de secuencias más cortas. Un método particularmente preferido para la síntesis química de secuencias codificantes se enseña en las Patentes US N° 6521427 y 6670127.

3. Vectores y Sistemas de Expresión

20 La invención proporciona vectores, preferiblemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-MCP-1, o pueden ser usados para obtener plásmidos que contienen gens HC o LC del anticuerpos o porciones de los mismos. Como se usa en la presente, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que ha sido ligado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN de cadena doble circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde los segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma vírico. La presente invención también se refiere a vectores que incluyen moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención, células huésped que están diseñadas genéticamente con los vectores recombinantes, y la producción de al menos un anticuerpo anti-MCP-1 por técnicas recombinantes, como es bien conocido en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook y otros, supra; Ausubel y otros, supra.

25 Para la expresión de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de los mismos, los ADNs que codifican cadenas pesadas o ligeras de longitud completa o parcial, pueden ser insertados en los casetes o vectores de expresión de tal forma que los genes estén ligados operativamente con las secuencias de control transcripcionales y traducionales. Un casete que codifica un anticuerpo, puede ser ensamblado como un constructo. Un constructo puede ser preparado usando métodos conocidos en la técnica. El constructo puede ser preparado como parte de un plásmido más grande. Dicha preparación permite la clonación y selección de las construcciones correctas de una manera eficiente. El constructo puede estar localizado entre sitios de restricción convenientes en el plásmido u otro vector de tal forma que pueden ser fácilmente aislados de las secuencias plásmidas restantes.

30 Generalmente, un vector plásmido se introduce en un precipitado, como un precipitado de fosfato cálcico, o en un complejo con un lípido cargado de DEAE-dextrano. si el vector es un virus, puede ser empaquetado in vitro usando una línea celular de empaquetado apropiada y después transducida en células huésped. La introducción de un constructo de vector en una célula huésped se puede efectuar también por electroporación u otros métodos conocidos. Dichos métodos están descritos en la técnica, como en Sambrook, supra, Capítulos 1-4 y 16-18; Ausubel, supra, Capítulos 1, 9, 13, 15, 16.

35 En este contexto, el término "ligado operativamente" se pretende que signifique que un gen de anticuerpo está ligado en un vector de tal forma que las secuencias de control transcripcional y traducional dentro del vector sirven a su función pretendida de regular la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se eligen para ser compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden ser insertados en vectores separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión por métodos estándar (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y el vector, o ligación de extremos romos si no hay presentes sitios de restricción.

Las regiones variables de la cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en la presente pueden ser usados para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isótopo de anticuerpo insertándolos en los vectores de expresión que ya codifican las regiones constante de la cadena ligera y constante de la cadena pesada del isotipo deseado como el del segmento VH ligado operativamente al segmento(s) CH dentro del vector y el segmento VI está ligado operativamente al segmento CL dentro del vector. Adicionalmente o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena del anticuerpo desde una célula huésped. El gen de la cadena del anticuerpo puede ser clonado en el vector de tal forma que el péptido señal esté ligado dentro del marco al término amino del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no de inmunoglobulina).

Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped o procariontes o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas es la más preferida, y más preferible células huésped mamíferas, porque dichas células eucariotas, y en particular las células mamíferas, son más propensas que las células procariontes a ensamblar y secretar un anticuerpo plegado correctamente e inmunológicamente activo.

En general, un vector de expresión mamífero contendrá (1) elementos reguladores, habitualmente en la forma de secuencias potenciadoras o promotoras virales y caracterizados por un intervalo de tejido y huésped amplio; (2) una secuencia "poliligadora", que facilita la inserción de un fragmento de ADN que comprende la secuencia codificadora del anticuerpo dentro del vector plásmido; y (3) las secuencias responsables del empalme del intrón y la poliadenilación de los transcritos de ARNm. Esta región contigua del sitio promotor-poliligador-poliadenilación es comúnmente referida como unidad de transcripción. El vector contendrá también probablemente (4) un(os) gen(es) marcador(es) seleccionable(s) (por ejemplo, el gen-beta-lactamasa), confiriendo a menudo resistencia a un antibiótico (como la ampicilina), permitiendo la selección de transformantes positivos iniciales en *E. coli*; y (5) secuencias que facilitan la replicación del vector tanto en huéspedes bacterianos como mamíferos. Se incluye un origen plásmido de la replicación para la propagación del constructo de expresión en *e. coli* y para la expresión transitoria en células Cos, el origen de SV40 de la replicación se incluye en el plásmido de expresión.

Un promotor puede ser seleccionado de un promotor de SV40 (por ejemplo, promotores de SV40 tardíos o tempranos, el promotor de CMV (Patentes US N° 5.168.062; 5.385.839) y el promotor de tk HASC, un promotor

pgk (fosfoglicerato quinasa), un promotor de EF-1 alfa (Patente US N° 5.266.491), al menos un promotor de inmunoglobulina humana.

Los vectores de expresión incluirán preferiblemente, pero opcionalmente, un marcador seleccionable. Dichos marcadores incluyen por ejemplo, pero no limitado a, resistencia a metotrexato (MTX), dihidrofolato reductasa (DHFR, Patentes US, N° 4,399,216; 4,634,665; 4,656,134; 4,956,288; 5,149,636; 5,179,017, ampicilina, neomicina (G417), ácido micofenólico, o glutamina sintetasa, (GS, Patentes US N° 5,122,464; 5,770,359; 5,827,739) para cultivo celular eucariota, y genes de resistencia a tetraciclina o ampicilina para cultivar en *E. coli* y otras bacterias y procariontes. Los medios y condiciones de cultivo apropiados para las células huésped anteriormente descritas se conocen en la técnica. Los vectores adecuados serán fácilmente evidentes para el experto en la técnica.

Cuando se emplean células huésped eucariotas, las secuencias terminadoras de transcripción o poliadenilación se incorporan típicamente en el vector. Un ejemplo de una secuencia terminadora es la secuencia de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento bovina. Se pueden incluir también las secuencias para el empalme adecuado del transcrito. Un ejemplo de una secuencia de empalme es el intrón VP1 de SV40 (Sprague y otros, *J. Virol.* 45:773-781 (1983)). Adicionalmente, se pueden incorporar las secuencias de genes para controlar la replicación en la célula huésped en el vector, como se conoce en la técnica. También, para evitar la expresión de superficie alta de moléculas de la cadena pesada, puede ser necesario usar un vector de expresión que elimina los empalmes variantes del dominio de la transmembrana.

Los elementos adicionales incluyen potenciadores, secuencias Kozak y secuencias intercaladas flanqueadas por sitios donadores y aceptores para el empalme de ARN. Una transcripción altamente eficiente se puede conseguir con los promotores tempranos y tardíos de SV40, las repeticiones terminales largas (LTRS) de Retrovirus, por ejemplo, RSV, HTLV1, HIV1, y el promotor temprano del citomegalovirus (CMV). Sin embargo, también se pueden emplear elementos celulares (por ejemplo, el promotor de actina humano). Los vectores de expresión adecuados para el uso en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, vectores como pIRES1neo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN, o pLNCX (Clonetech Labs, Palo Alto, CA), pcDNA3.1 (+/-), pcDNA/Zeo (+/-) o pcDNA3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen), pSVL y PMSG (Farmacia, Uppsala, Suecia), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) y pBC12MI (ATCC 67109).

Alternativamente, los ácidos nucleicos que codifican la secuencia de anticuerpos pueden ser expresados en líneas celulares estables que contienen el gen integrado en un cromosoma. La co-transfección con un marcador seleccionable como dhfr, gpt, neomicina, o higromicina permite la identificación y el aislamiento de las células transfectadas que expresan cantidades grandes del anticuerpo codificado. El marcador DHFR (dihidrofolato reductasa) es útil para desarrollar líneas celulares que llevan varios cientos o incluso varios miles de copias del gen

de interés. Otro marcador de selección útil es la enzima glutamina sintasa (GS) (Murphy, y otros, *Biochem. J.* 227: 277- 279 (1991) ; Bebbington, y otros, *Bio/ Technology* 10: 169- 175 (1992)). Usando estos marcadores, las células mamíferas se cultivan en medio selectivo y se seleccionan las células con la resistencia más alta. Estas líneas celulares contienen el gen amplificado integrado en el cromosoma. Las células NSO y de ovario de hámster chino (CHO) se usan a menudo para la producción de anticuerpos.

Los constructos de ADN usados en la producción de los anticuerpos de la invención pueden incluir opcionalmente al menos una secuencia aislante. Los términos "aislante", "secuencia aislante" y "elemento aislante" se usan intercambiamente en la presente. Un elemento aislante es un elemento de control que aísla la transcripción de genes colocados dentro de su rango de acción pero que no perturba la expresión génica, ya sea negativamente o positivamente. Preferiblemente, una secuencia aislante se inserta en cualquier lado de la secuencia de ADN a ser transcrita. Por ejemplo, el aislante puede ser posicionado de alrededor de 200 bp a alrededor de 1 kb, 5' del promotor, y al menos de alrededor de 1 kb a 5 kb del promotor, en el extremo 3' del gen de interés. La distancia de la secuencia aislante del promotor y del extremo 3' del gen de interés puede ser determinada por los expertos en la técnica, dependiendo de los tamaños relativos del gen de interés, del promotor y del potenciador usados en el constructo. Además, se puede posicionar más de una secuencia aislante a 5' del promotor o en el extremo 3' del transgén. Por ejemplo, dos o más secuencias aislantes se pueden posicionar a 5' del promotor. El aislante o aislantes en el extremo 3' del transgén pueden ser posicionados en el extremo 3' de los genes de interés, o en el extremo 3' de una secuencia regulatoria 3', por ejemplo, una región no traducida (UTR) 3' o en una secuencia flanqueadora 3'.

Ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* de no fusión inducibles adecuados incluyen el pTrc (Amann y otros, (1988) *Gene* 69:301-315) y el pET 11d (Studier y otros, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89). La expresión de los genes objetivo del vector pTrc se basa en la transcripción de un promotor de fusión T7 gn10-lac mediado por una polimerasa de ARN vírica co-expresada (T7 gn1). Esta polimerasa vírica es suministrada pro cepas huésped BL21 (DE3) o HMS174(DE3) de un profago λ residente que alberga un gen T7 gn1 bajo el control transcripcional del promotor lacUV 5.

En otra realización, el vector de expresión es un vector de expresión de levadura. Ejemplos de vectores para la expresión en levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSecl (Baldari y otros. (1987) *EMBO J.* 6: 229- 234) , pMFa (Kurjan y Herskowitz, (1982) *Cell* 30: 933- 943) , pJRY88 (Schultz y otros. (1987) *Gene* 54: 113- 123) , pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.) , y pPicZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.).

Alternativamente, el vector de expresión es un vector de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insectos cultivadas (por ejemplo, células Sf 9) incluyen las series pAc (Smith y otro (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) y las series pVL (Lucklow y Summers (1989) *Virology* 170: 31- 39).

En todavía otra realización, un ácido nucleico de la invención se expresa en células mamíferas usando un vector de expresión mamífero. Ejemplos de vectores de expresión mamíferos incluyen el pCDM8 (Seed (1987) *Nature* 329:840) y el pMT2PC (Kaufman y otros (1987) *EMBO J.* 6:187-195). Cuando se usan en células mamíferas las funciones de control de los vectores de expresión son proporcionadas a menudo por elementos regulatorios víricos. Por ejemplo, los promotores usados comúnmente están derivados del poliovirus, Adenovirus 2, citomegalovirus, y Virus Simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como eucariotas, ver capítulos 16 y 17 de Sambrook y otros, *supra*.

En otra realización, el vector de expresión mamífero recombinante es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico, preferencialmente en un tipo celular particular, como las células de linfoma (por ejemplo, células de mieloma de ratón). En tipos celulares específicos, los elementos regulatorios específicos del tejido se usan para expresar el ácido nucleico. Los elementos regulatorios específicos del tejido son conocidos en la técnica. Ejemplos no limitativos de promotores específicos del tejido adecuados incluyen el promotor de albumina (liverspecific; Pinkert y otros (1987) *Genes Dev.* 1: 268- 277), promotores específicos linfoides (Calame y Eaton (1988) *Adv. Immunol.* 43: 235- 275), en particular promotores de receptores de células T (Winoto y Baltimore (1989) *EMBO J.* 8: 729- 733) e inmunoglobulinas (Banerji y otros (1983) *Cell* 33: 729- 740; Queen and Baltimore (1983) *Cell* 33: 741- 748), promotores neuroespecíficos (por ejemplo, el promotor de neurofilamentos; Byrne and Ruddle (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5473-5477), promotores específicos del páncreas (Edlund y otros (1985) *Science* 230: 912- 916) y promotores específicos de las glándulas mamarias (por ejemplo, promotor del suero de leche, Patente U.S. Nº 4.873.316 y Publicación de Solicitud Europea Nº 264.166). También están englobados los promotores regulados desarrolladamente, por ejemplo, por los promotores de hox murino (Kessel y Gruss (1990) *Science* 249: 374-379) y el promotor de α -fetoproteína (campes y Tighman (1989) *Genes Dev.* 3:537-546).

La invención proporciona además un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ADN clonada en el vector expresión en una orientación antisentido. Esto es, la molécula de ADN está ligada operativamente a una secuencia regulatoria de una manera que permite la expresión (por transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que es antisentido al ARNm que codifica un polipéptido. Las secuencias regulatorias ligadas operativamente a un ácido nucleico clonado en la orientación antisentido pueden ser elegidas

para dirigir la expresión continua de la molécula ARN antisentido en una variedad de tipos celulares. Por ejemplo, los promotores y/o potenciadores víricos, o secuencias regulatorias pueden ser elegidas para la expresión constitutiva directa, específica de tejido, o específica del tipo celular del ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede estar en la forma de un plásmido recombinante, fagémido, o virus atenuado en el que los ácidos nucleicos antisentido se producen bajo el control de una región regulatoria de alta eficiencia, la actividad de la cual puede ser determinada por el tipo celular en la que se introduce el vector. Para un debate de la regulación de la expresión génica usando genes antisentido, ver Weintraub y otros *Reviews-Trends in Genetics*, Vol. 1(1) 1986).

Clonación y Expresión de Células de Mieloma

Se observó que un anticuerpo monoclonal de Ig/G1k quimérico ratón/humano contra la CD4 humana, conocido como cM-T412 (EP0511308) estaba expresado a niveles altos en células de mieloma de ratón transfectadas (Looney y otros. 1992. *Hum Antibodies Hybridomas* 3 (4) : 191- 200). Sin un gran esfuerzo en la optimización de las condiciones de cultivo, se obtuvieron fácilmente Niveles de producción de >500 mg/L (productividad específica en una base no conocida pg/célula/día) en Centocor, Inc. Malvern, Pa en 1990. En base a los componentes de estos vectores de expresión se desarrollaron vectores de clonación de anticuerpos útiles para la clonación de HC y LC que incluían la secuencia de ácidos nucleicos de iniciación /promotora de transcripción de los genes, las secuencias no traducidas 5' y las secuencias de ácidos nucleicos de inicio de la traducción, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la secuencia de señal, las secuencias donadoras de empalme intrón/exón para el intrón señal y el intrón J-C, y las secuencias de ácidos nucleicos potenciadores del intrón J-C. El plásmido p139, un plásmido pUC 19, contiene un fragmento genómico EcoRI-EcoRI clonado de células de hibridoma C123 que secretan el ratón totalmente M-T412Ab; el fragmento contiene el promotor y parte de la región V del gen cM-T412 HC. El material de partida para el diseño del vector de la región LC V fue el plásmido p39, un plásmido pUC que contiene 3 kb de fragmento genómico HindIII-HindIII clonado de células de hibridoma C123; este fragmento contiene el promotor y parte de la región V del gen cM-T412Lc. Los vectores diseñados derivados de p139 y p39 fueron diseñados para permitir el ensamblaje conveniente de los genes HC o LC adecuados para la expresión en una célula huésped mamífera en un proceso de dos pasos que implica 1) clonar ADN que codifica una secuencia de interés entre sitios de restricción especialmente preparados en un vector de la región V, por lo que la secuencia que codifica la región V está posicionada inmediatamente secuencia abajo de la secuencia señal codificada por el vector, así como secuencia abajo de parte o todo el promotor del gen; y 2) transferir un fragmento que abarca la secuencia insertada desde el vector de la región V al vector de la región C en la orientación apropiada por lo que el plásmido resultante constituye el plásmido de expresión final adecuado para la expresión en células (Scallion y otros. 1995 *Cytokine* 7 (8) : 759- 769).

Clonación y Expresión en Células CHO

El plásmido pC4 es un derivado del plásmido pSV2-dfrr (ATCC N° de entrada 37146). El plásmido contiene el gen DHFR de ratón bajo control del promotor temprano de SV40. El ovario de hámster chino u otras células que carecen de actividad de dihidrofolato que son transfectadas con estos plásmidos pueden ser seleccionadas cultivando células en un medio selectivo (por ejemplo alpha minus MEM, Life Technologies, Gaithersburg, MD) suplementado con el agente quimioterapéutico metotrexato. La amplificación de los genes DHFR en células resistentes al metotrexato (MTX) ha sido bien documentada (ver por ejemplo, F. W. Alt, y otros, *J. Biol. Chem.* 253:1357-1370 (1978); J. L. Hamlin y C. Ma, *Biochem. et Biophys. Acta* 1097:107-143 (1990); y M. J. Page y M. A. Sydenham, *Biotechnology* 9:64-68 (1991)). Las células cultivadas en concentraciones crecientes de MTX desarrollan resistencia al fármaco sobreproduciendo la enzima objetivo, DHFR, como un resultado de la amplificación del gen DHFR. Si un segundo gen es ligado al gen DHFR, está habitualmente co-amplificado y sobre-expresado. Se conoce en la técnica que este enfoque puede ser usado para desarrollar líneas celulares que llevan más de 1.000 copias del gen(es) amplificado(s). Posteriormente, cuando se retira el metotrexato, se obtienen las líneas celulares que contienen el gen amplificado integrado en uno o más cromosomas de la célula huésped.

El plásmido pC4 contiene para expresar el gen de interés el promotor fuerte de la repetición terminal larga (LTR) del Virus del Sarcoma de Rous Cullen, y otros, *Molec. Cell. Biol.* 5:438-447 (1985)) más un fragmento aislado del potenciador del gen temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV) (Boshart, et al., *Cell* 41:521-530 (1985)). Secuencia abajo del promotor están los sitios de escisión del enzima de restricción BamHI, XbaI, y Asp718 que permiten la integración de los genes. Detrás de estos sitios de clonación el plásmido contiene el sitio del intrón 3' y de poliadenilación del gen de preproinsulina de rata. También se pueden usar otros promotores de alta eficiencia para la expresión, por ejemplo, el promotor de b-actina humano, los promotores tempranos o tardíos de SV40 o las repeticiones terminales largas de otros retrovirus, por ejemplo, VIH y HTLV1. Se pueden usar los sistemas de expresión de genes Tet-Off y Tet-On de Clontech y sistemas similares para expresar el anticuerpo MCP-1 de una manera regulada en células mamíferas (M. Gossen, y H. Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551 (1992)). Par ala poliadenilación del ARNm se pueden usar otras señales, por ejemplo, genes de globina o la hormona de crecimiento humana también.

4. Células Huésped para la Producción de Anticuerpos

Al menos un anticuerpo ant-MCP-1 de la presente invención puede ser opcionalmente producido por una línea celular, una línea celular mixta, una célula inmortalizada o población clónica de células inmortalizadas, como es bien conocido en la técnica. Ver, por ejemplo, Ausubel, y otros, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987- 2004) ; Sambrook, y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición, Cold Spring Harbor, NY (1989) ; Harlow y Lane, *antibodies*, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989) ; Colligan, y otros, eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994- 2004) ; Colligan y otros, *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2004).

Para producir los productos biofarmacéuticos, se requiere una línea celular de producción capaz de la expresión eficiente y reproducible de un polipéptido recombinante. La línea celular es estable y financiable. Se pueden emplear una variedad de líneas celulares huésped para este propósito. A medida que la comprensión de las complejidades de como la maquinaria celular impacta en la cantidad y composición final de un producto bioterapéutico, la selección de una línea celular huésped que impartirá los atributos necesitados a la producción y la composición del producto se vuelve más evidente.

A diferencia de la mayoría de los genes que son transcritos de secuencias de ADN genómico continuo, los genes de anticuerpos son ensamblados de segmentos de genes que pueden ser separados ampliamente en la línea germinal. En particular, los genes de la cadena pesada están formados por recombinación de tres segmentos genómicos que codifican las regiones variable (V), de diversidad (D), de unión (J)/constante (C) del anticuerpo. Los genes de la cadena ligera funcionales son formados uniendo dos segmentos de genes; uno codifica la región V y el otro codifica la región J/C. Tanto los loci de la cadena ligera kappa como los de la cadena pesada contienen muchos segmentos de gen V (las estimaciones varían entre 100s y 1000s) que se estima que abarcan más de 1000 kb. El locus lambda es, al contrario, mucho más pequeño y ha demostrado que abarca aproximadamente 300 kb en el cromosoma 16 en el ratón. Consiste de dos segmentos de gen variables y cuatro segmentos de gen re la región (de unión/constante (J/C). La formación de un gen funcional requiere la recombinación entre un elemento de V y uno de J/C.

En la célula B en la que el anticuerpo se produce de forma natural, el control de la transcripción de los genes de tanto la cadena ligera kappa como de la pesada reorganizados depende de la actividad de un promotor específico de tejido secuencia arriba de la región V y un potenciador específico de tejido localizado en el intrón J-C. Estos elementos actúan sinérgicamente. También, se ha identificado un segundo potenciador específico de células B en el locus de la cadena ligera kappa. Este potenciador adicional está localizado 9 kb secuencia abajo de C_{kappa}. Por lo tanto el método de hibridoma de inmortalizar genes de expresión de anticuerpos se basa en las secuencias del promotor y potenciador endógenos del linaje de células B padre. Alternativamente, los ácidos nucleicos de la presente invención pueden ser expresados en una célula huésped encendiendo (por manipulación) en una célula huésped que contiene ADN endógeno que codifica un anticuerpo de la presente invención. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica, por ejemplo como se describe en las Patentes US N° 5,580,734, 5,641,670, 5,733,746, y 5,733,761.

La clonación de ADN genómico de anticuerpos en un vector artificial es otro método de crear células huésped capaces de expresar anticuerpos. Sin embargo, la expresión de anticuerpos monoclonales detrás de un promotor fuerte incrementa las posibilidades de identificar líneas celulares de alta producción y obtener rendimientos más altos de anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos de la invención pueden ser producidos en un transfectoma de una célula huésped usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como es bien conocido en la técnica (por ejemplo, Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

Son bien conocidos los sistemas para la clonación y expresión de biofarmacéuticos, incluyendo anticuerpos, en una variedad de células huésped. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células mamíferas, células vegetales, levadura y sistemas de baculovirus y plantas y animales transgénicos. Las líneas celulares mamíferas disponibles en la técnica para la expresión de proteínas glicosiladas intactas de polipéptidos heterólogos incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster cría (BHK), células de melanoma de ratón NSO y líneas celulares derivadas, por ejemplo células de mieloma de rata SP2/0, YB2/0 (ATC CRL-1662), células de riñón embrionarias humanas (HEK), células de retina embrionarias humanas, células PerC.6, células hep G2, BSC-1 (por ejemplo ATCC CRL-26) y muchas otras disponibles de , por ejemplo, American Type Culture Collection, Manassas, Va (www.atcc.org). Un huésped bacteriano común preferido es el *E. coli*.

Las células mamíferas como las células CHO, células de mieloma, células HEK293, células BHK (BHK21, ATCC CRL-10), células Ltk de ratón, y células NIH3T3 han sido usadas frecuentemente para la expresión estable de genes heterólogos. Por el contrario, las líneas celulares como las Cos (COS-1 ATCC CRL 1650; COS-7, ATCC CRL-1651) y HEK293 son usadas rutinariamente para la expresión transitoria de proteínas recombinantes.

Las células huésped mamíferas preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células de mieloma como las Sp2/0, YB2/0 (ATC Curl- 1662) , NSO, y P3X63.Ag8.653 (por ejemplo SP2/0-

Ag14) debido a su alta tasa de expresión. En particular, para el uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión de genes GS divulgado en la WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338.841. Cuando los genes de anticuerpos que codifican vectores de expresión recombinantes que se introducen en células huésped mamíferas, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que las células huésped se cultivan. Los anticuerpos pueden ser recuperados del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas estándar.

Ilustrativo de los cultivos celulares útiles para la producción de los anticuerpos, porciones especificadas o variantes de las mismas, son las células mamíferas. Los sistemas celulares mamíferos a menudo estarán en la forma de monocapas de células aunque también pueden ser usadas suspensiones o bioreactores de células mamíferas.

Se han desarrollado en la técnica un número de líneas celulares huésped adecuadas de expresar proteínas glicosiladas intactas, e incluyen las líneas celulares COS-1 (por ejemplo, ATCC CRL 1650), COS-7 (por ejemplo, ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (por ejemplo, ATCC CRL-10), CHO (por ejemplo, ATCC CRL 1610) y BSC-1 (por ejemplo, ATCC CRL-26), células Cos-7, células CHO, células hep G2, células P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, 293, células HeLa y similares, que están fácilmente disponibles de, por ejemplo, American Type Culture Collection, Manassas, Va (www.atcc.org). Las células huésped preferidas incluyen células de origen linfocítico como las células de mieloma o linfoma. Células huésped particularmente preferidas son las células P3X63Ag8.653 (ATCC Número de Entrada CRL-1580) y las células SP2/0-Ag14 (ATCC Número de Entrada CRL-1851).

Las células CHO-K1 y DHFR-CHO DG44 y DUK-B11 (G. Urlaub, L.A. Chasin, 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 4216- 4220) se usan para la producción de proteínas de alto nivel debido a que la amplificación de genes de interés es permitida por la incorporación de un marcador amplificable, seleccionable, DHFR usando por ejemplo el fármaco metotrexato (MTX) (R.J. Kaufman, 1990. Methods Enzymol. 185: 537- 566). Las células DHFR-CHO pueden ser usadas exitosamente para producir mAbs recombinantes a un nivel alto. La DHFR-CHO puede producir anticuerpos anti-MCP-1 a una tasa de 80-110 mg de 10^6 células⁻¹ día⁻¹ o más de 200 mg de 10^6 células⁻¹ día⁻¹. Se han usado una variedad de promotores para obtener la expresión de cadenas H- y L- en estas células CHO, por ejemplo, el promotor de la b-actina, el promotor CMV MIE humano, el promotor tardío principal del virus Ad (MLP) el promotor RSV, y un virus de leucemia murina LTR. En la bibliografía se describen un número de vectores para la expresión de mAb en las que dos cadenas de Ig son llevadas por dos plásmidos diferentes con un marcador seleccionable/amplificable independiente. Los vectores que contienen una cadena del anticuerpo, por ejemplo la cadena H-, ligada a un marcador DHFR, y un casete de expresión de la cadena L- con el marcador Neo^r o viceversa a lo que puede ser usado obtienen hasta 180 mg de un mAb humanizado L⁻¹ t día⁻¹ en matraces de agitación. Los métodos usados para la selección inicial y posterior amplificación pueden ser variados y son bien conocidos para los expertos en la técnica. En general, la expresión de mAb de alto nivel se puede obtener usando los pasos siguientes: selección inicial y posterior amplificación de los clones candidatos, coselección (por ejemplo en casos donde los vectores de expresión de tanto la cadena H- como la cadena L- llevan la unidad de expresión de DHFR) y amplificación, coamplificación usando diferentes marcadores amplificables, y selección inicial y amplificación en cultivo masivo, seguido por clonación de dilución para identificar clones de alta expresión individuales. Como los sitios de integración pueden influenciar en la eficiencia de la expresión de la cadena H- y la cadena L- y la expresión del mAb total, se han creado vectores individuales en los que dos unidades de expresión de la cadena Ig- están colocados en tándem. Estos vectores también llevan un marcador seleccionable dominante como el Neo^r y el casete de expresión de DHFR. Para una revisión ver Ganguly, S. y A. Shatzman. Expression Systems, mammalian cells IN: Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation. 1999 by John Wiley & Sons, Inc.

Cockett y otros (1990. Bio/Technology 8, 662-667) desarrollaron el sistema GS para la expresión de alto nivel de genes heterólogos en células CHO. La transfección de un vector de expresión que contiene un ADNc (bajo el control transcripcional del promotor hCMV) y un mini gen GS (bajo el control del promotor tardío de SV40) en células CHO-K1 (seguido por la selección con de 20 mM a 500 mM de MSX) puede ser usada para producir clones que expresan los anticuerpos de la invención en rendimientos comparables a los de los sistemas DHFR-CHO. El sistema GS se debate en su totalidad o en parte en conexión con las Patentes Europeas N° 0216846, 0256055, y 0323997 la Solicitud de Patente Europea N° 89303964.4.

Como un ejemplo no limitativo, se han usado exitosamente hojas de tabaco transgénicas que expresan proteínas recombinantes para proporcionar grandes cantidades de proteínas recombinantes, por ejemplo, usando un promotor inducible. Ver, por ejemplo, Cramer y otros, Curr. Top. Microbol. Immunol. 240: 95- 118 (1999) y las referencias citadas en la misma. También, se ha usado maíz transgénico para expresar proteínas mamíferas a niveles de producción comercial, con actividades biológicas equivalentes a las producidas en otros sistemas recombinantes o purificadas de fuentes naturales. Ver, por ejemplo, hood y otros Adv. Exp. Med. Biol. 464: 127- 147 (1999) y las referencias citadas en la misma. También se han producido anticuerpos en grandes cantidades de semillas de plantas transgénicas que incluyen fragmentos de anticuerpos, como anticuerpos de cadena sencilla (scFv's), incluyendo semillas de tabaco y tubérculos de patata. Ver, por ejemplo, Conrad y otros, Plant Mol. Biol. 38: 101- 109 (1998) y las referencias citadas en la misma. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente invención pueden

ser también producidos usando plantas transgénicas, de acuerdo con métodos conocidos. Ver también, por ejemplo, Fischer y otros, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30: 99- 108 (Oct., 1999) , Ma y otros, *Trends Biotechnol.* 13: 522- 7 (1995) ; Ma y otros, *Plant Physiol.* 109: 341- 6 (1995) ; Whitelam y otros, *Biochem. Soc. Trans.* 22: 940- 944 (1994); y las referencias citadas en las mismas. Ver, también generalmente para la expresión vegetal de anticuerpos, pero no limitado a, Patente US N° 5959177.

5. Purificación de un Anticuerpo

Un anticuerpo anti-MCP-1 puede ser recuperado y purificado de cultivos de células recombinantes por métodos bien conocidos incluyendo, pero no limitado a, purificación de proteína A, precipitación de etanol o sulfato de amonio, extracción ácida, cromatografía de intercambio de aniones o cationes, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía por afinidad, cromatografía de hidroxapatita y cromatografía de lectina. También se puede emplear la cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC") para la purificación, Ver, por ejemplo, Colligan, *Current Protocols in Immunology*, o *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997- 2001) , por ejemplo, Capítulos 1, 4, 6, 8, 9, 10.

Los anticuerpos de la presente invención incluyen productos purificados de forma natural, productos de procedimientos sintéticos químicos, y productos producidos por técnicas recombinantes de un huésped eucariota, incluyendo por ejemplo, levadura, planta superior, células de insectos y mamíferas. Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, el anticuerpo de la presente invención puede ser glicosilado o puede ser no glicosilado, prefiriendo glicosilado. Dichos métodos se describen en muchos manuales de laboratorio estándar, como Sambrook, *supra*, Secciones 17.37-17.42; Ausubel, *supra*, Capítulos 10, 12, 13, 16, 18 y 20, Colligan, *Protein Science*, *supra*, Capítulos 12-14.

6. Anticuerpos de la Invención

Los anticuerpos anti-MCP-1 (también denominados anticuerpos anti-CCL-2 o anticuerpos MCP-1) útiles en los métodos y composiciones de la presente invención pueden ser opcionalmente caracterizados por el enlace de afinidad alta con la MCP-1, el enlace específico alto con la MCP-1, la capacidad de inhibir una o más actividades biológicas asociadas con la MCP-1 y opcionalmente y preferiblemente por tener baja toxicidad.

Los anticuerpos de la invención pueden enlazar con MCP-1 humana con un amplio rango de afinidades (K_D). En una realización preferida, al menos un mAb humano de la presente invención puede enlazar opcionalmente MCP-1 humana con afinidad alta. Por ejemplo, un mAb humano puede enlazar MCP-1 humana con un K_D igual o menos que alrededor de 10^{-7} M, como pero no limitado a, 0,1-9,9 (o cualquier intervalo o valor del mismo) $\times 10^{-7}$, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} o cualquier intervalo o valor del mismo.

La afinidad o avidéz de un anticuerpo para un antígeno se puede determinar experimentalmente usando cualquier método adecuado (Ver, por ejemplo, Berzofsky, y otros, "Antibody-Antigen Interactions," In *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kuby, *Janis Immunology*, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992); y los métodos descritos en la presente). La afinidad medida de una interacción anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide bajo condiciones diferentes (por ejemplo, concentración de sal, pH). Por lo tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de enlace con el antígeno (por ejemplo, K_D , K_a , K_d) se hacen preferiblemente con soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y un regulador estandarizado, como las soluciones y reguladores estándar descritos en la presente.

Los anticuerpos aislados de la presente invención comprenden una secuencia de aminoácidos del anticuerpo divulgada en la presente codificada por cualquier polinucleótido adecuado, o cualquier anticuerpo aislado o preparado. Preferiblemente, el anticuerpo humano o el fragmento que enlaza con el antígeno enlaza con la MCP-1 humana y, de este modo neutraliza parcialmente o sustancialmente al menos una actividad biológica de la proteína. Un anticuerpo, o porción especificada o variante del mismo, que parcialmente o preferiblemente sustancialmente neutraliza al menos una actividad biológica de al menos una proteína MCP- o fragmento que enlaza con la proteína o fragmento y de este modo inhibe actividades mediadas a través del enlace de la MCP- con un receptor de MCP-1 o a través de otros mecanismos mediados o dependientes de la MCP-1. Como se usa en la presente, el término "anticuerpo neutralizante" se refiere a un anticuerpo que puede inhibir una actividad dependiente de la MCP-1 por alrededor del 20-120%, preferiblemente por al menos alrededor de 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% o más dependiendo del ensayo. La capacidad de un anticuerpo anti-MCP-1 de inhibir una actividad dependiente de la MCP-1 es evaluada preferiblemente por al menos un ensayo de proteína MCP-1 o receptor adecuado, como se describe en la presente y/o como se conoce en la técnica. Un anticuerpo humano de la invención puede ser de cualquier clase (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, etc.) o isotipo y puede comprender una cadena ligera kappa o lambda. En una realización, el anticuerpo humano comprende una cadena pesada o fragmento definido de IgG, por ejemplo, al menos uno de los isotipos, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Los anticuerpos de este tipo pueden ser preparados empleando un ratón transgénico u otro mamífero no humano transgénico que comprende al menos un transgén de cadena ligera humana (por ejemplo, IgG, IgA, e IgM (por ejemplo, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$) como se describe en la presente y/o se conoce en la técnica. En otra realización, el anticuerpo humano anti-MCP-1 humana comprende una cadena pesada de IgG1 y una cadena ligera de IgG1.

Al menos un anticuerpo divulgado en la presente enlaza con al menos un epítipo especificado específico para al menos una proteína, fragmento, porción de MCP-1 o combinación de los mismos. El al menos un epítipo puede comprender al menos una región de enlace con el anticuerpo que comprende al menos una porción de la proteína, dicho epítipo está preferiblemente comprendido por al menos 1-3 aminoácidos a la porción especificada completa de los aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:1.

Generalmente, el anticuerpo humano o el fragmento que enlaza con el antígeno comprenderá la región que enlaza con el antígeno que comprende al menos una región determinante complementaria humana (CDR1, CDR2, y CDR3) o variante de al menos una región variable de la cadena pesada y al menos una región determinante complementaria humana (CDR1, CDR2, y CDR3) o variante de al menos una región variable de la cadena ligera. Como un ejemplo no limitativo, el anticuerpo o porción o variante que enlaza con el antígeno puede comprender al menos una de la CDR3 de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 Ó 12, y/o una CDR de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15-17, 20 Ó 21. En una realización particular, el anticuerpo o fragmento que enlaza con el antígeno pueden tener una región que enlaza con el antígeno que comprende al menos una porción de al menos una CDR de la cadena pesada (es decir, CDR1, CDR2, y/o CDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de las CDRs correspondientes 1, 2 y/o 3 (por ejemplo, SEQ ID NOS: 6-12 y/o 22, 23 y 26). En otra realización particular, el anticuerpo o porción o variante que enlaza con el antígeno pueden tener una región que enlaza con el antígeno que comprende al menos una porción de al menos una CDR de la cadena ligera (es decir CDR1, CDR2, y/o CDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de las CDRs correspondientes 1, 2 y/o 3 (por ejemplo, SEQ ID NOS: 13-21 y/o 24 y 25). En una realización preferida las tres CDRs de la cadena pesada y las tres CDRs de la cadena ligera del anticuerpo o fragmento que enlaza con el antígeno una secuencia de aminoácidos derivada de la CDR correspondiente de al menos uno de Fab MOR0336, MOR03464, MOR03468, MOR03470, MOR03471, MOR03473, MOR03548 como se describe en la presente y las regiones marco de la cadena pesada derivadas de un anticuerpo VH3 (SEQ ID NO: 2) y las regiones marco de la cadena ligera derivadas de un anticuerpo de tipo kappa (SEQ ID No. 4). Dichos anticuerpos pueden ser preparados uniendo químicamente las varias porciones (las CDRs y marcos) del anticuerpo usando técnicas convencionales, preparando y expresando una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo usando técnicas convencionales o tecnología de ADN recombinante o usando cualquier otro método adecuado.

El anticuerpo anti-MCP-11 puede comprender al menos una de una región variable de la cadena ligera o pesada teniendo una secuencia de aminoácidos definida en las regiones marco. Por ejemplo, en una realización preferida, el anticuerpo anti-MCP-1 descrito en la presente comprende al menos una de al menos una región variable de la cadena pesada, teniendo opcionalmente la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 ó 3 y/o al menos una región variable de la cadena ligera, teniendo opcionalmente la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 ó 5.

La clase o isotipo de anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG, o IgM) es conferida por las regiones constantes que están codificadas por los genes de la región constante de la cadena pesada. Entre la clase de IgG humana, hay cuatro subclases o subtipos IgG1, IgG2, IgG3 IgG4 nombradas en orden de su abundancia natural en el suero comenzando de la más alta a la más baja. Los anticuerpos de IgA se encuentran en dos subclases, IgA1 e IgA2. Como se usa en la presente, "cambio de isotipo" se refiere también al cambio entre subclases o subtipos de IgG.

La invención también se refiere a anticuerpos, fragmentos que enlazan con el antígeno, cadenas de inmunoglobulina y CDRs que comprenden aminoácidos en una secuencia que es sustancialmente la misma que una secuencia de aminoácidos descrita en la presente. Preferiblemente, dichos anticuerpos o fragmentos que enlazan con el antígeno y anticuerpos que comprenden dichas cadenas o CDRs pueden enlazar MCP-1 humana con afinidad alta (por ejemplo, K_D menor que o igual a alrededor de 10^{-9} M). Las secuencias de aminoácidos que son sustancialmente las mismas que las secuencias descritas en la presente incluyen secuencias que comprenden sustituciones de aminoácidos conservadoras, así como deleciones y/o inserciones de aminoácidos. Una sustitución de aminoácidos conservadora se refiere al reemplazo de un primer aminoácido por un segundo aminoácido que tiene propiedades químicas y/o físicas (por ejemplo, carga, estructura, polaridad, hidrofobicidad/hidrofilidad) que son similares a las del primer aminoácido. Las sustituciones conservadoras incluyen el reemplazo de un aminoácido por otro dentro de los grupos siguientes: lisina (K), arginina (R) e histidina (H); aspartato (D) y glutamato (E); asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), tirosina (Y), K, R, H, D y E; alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), fenilalanina (F), triptófano (W), metionina (M), cisteína (C) y glicina (G); F, W e Y; C, S y T.

Un anticuerpo anti-MCP-1 de la presente invención puede incluir una o más sustituciones deleciones o adiciones de aminoácidos, ya sea de mutaciones naturales o manipulación humana, como se especifica en la presente o como se enseña en Knappik y otros, US6828422 para regiones variables derivadas de secuencias de genes germinales humanas y categorizadas por similitudes de secuencia en familias designadas como VH1A, VH1B, CH2, etc. y por cadenas ligeras como subgrupos kappa o lambda. Estas secuencias y otras secuencias que se pueden usar en la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, las configuraciones presentadas en la Tabla 1, como se describe adicionalmente en las Figuras 1-42 de la publicación de PCT WO 05/005604 y US 10/872.932, presentada el 21 de Junio del 2004, en donde las Figuras 1-42 referenciadas muestran ejemplos de secuencias, marcos, subdominios, regiones y sustituciones del dominio variable y constante de la cadena pesada y

ligera, porciones de los cuales pueden ser usados en proteínas derivadas de Ig de la presente invención, como se enseña en la presente.

5 Tabla 1. Configuraciones de Anticuerpo Humano

		REGIONES						
10	Región variable de la cadena pesada	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR 3	FR4
	Región variable de la cadena ligera	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR 3	FR4
15	IgA1, IgA2, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4	CH1	Bisagra 1-4	CH2	CH3			
	Regiones constantes							
	SIgA, IgM	CH1	Bisagra 1-4	CH2	CH3	Cadena J		
20	IgE	CH1		CH2	CH3	CH4		

25 El número de sustituciones de aminoácidos que un experto en la técnica tendría que hacer depende de muchos factores, incluidos los descritos anteriormente. Hablando de forma general, el número de sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos para cualquier anticuerpo anti-MCP-1, fragmento o variante no será más de 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, como 1-30 o cualquier intervalo o valor dentro del mismo como se especifica en la presente.

30 Los aminoácidos en un anticuerpo anti-MCP-1 de la presente invención que son esenciales para la función pueden ser identificados por métodos conocidos en la técnica, como mutagénesis dirigida al sitio, o mutagénesis de barrido de alanina (por ejemplo, Ausuble, supra, Capítulos 8, 15; Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085 (1989)). El último procedimiento introduce mutaciones de alanina individuales en cada residuo en la molécula. Las moléculas mutantes resultantes son entonces probadas para actividad biológica como, pero no limitado a, para al menos una actividad neutralizante de la MCP-1. Los sitios que son críticos para el enlace de anticuerpos pueden también ser identificados por análisis estructural como cristalización, resonancia magnética nuclear o etiquetado por fotoafinidad (Smith, y otros, J. Mol. Biol. 224:899-904 (1992) y de Vos, y otros, Science 255:306-312 (1992)).

40 Los anticuerpos anti-MCP-1 de la presente invención pueden incluir, pero no están limitados a, al menos una porción secuencia o combinación seleccionada de 5 a todos de los aminoácidos contiguos de al menos una de las SEQ ID NOS: 27-28.

45 Un anticuerpo anti-MCP-1 puede además comprender opcionalmente un polipéptido de al menos una de las SEQ ID NOS: 27 y 28. En una realización, la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina, o porción de la misma tiene alrededor de un 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la cadena correspondiente de al menos una de las SEQ ID NOS: 27-28 salvo para las sustituciones conservadores que no cambian la especificidad de enlace del anticuerpo anti-MCP-1. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena ligera se puede comparar con la secuencia de la SEQ ID NO: 4 ó 5, o la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada se puede comparar con la SEQ ID NO: 2 ó 3. Preferiblemente, la identidad de aminoácidos se determina usando un algoritmo informático, como se conoce en la técnica.

50 Como los expertos en la técnica apreciarán, la presente invención incluye al menos un anticuerpo biológicamente activo de la presente invención. Los anticuerpos biológicamente activos tienen una actividad específica de al menos un 20%, 30%, o 40% de a del anticuerpo nativo (no sintético), endógeno, o relacionado y conocido. Los métodos para evaluar y cuantificar mediciones de actividad enzimática y especificidad de sustrato son bien conocidos para los expertos en la técnica y se describen en la presente.

55 En otro aspecto, la invención se refiere a anticuerpos humanos y fragmentos que enlazan con el antígeno, como se describe en la presente, que son modificados por la unión covalente de una fracción orgánica. Dicha modificación puede producir un anticuerpo o fragmento que enlaza con el antígeno con propiedades farmacocinéticas mejoradas (por ejemplo, vida medio del suero *in vivo* aumentada). La fracción orgánica puede ser un grupo polimérico hidrofílico lineal o ramificado, grupo de ácido graso, o grupo éster de ácidos grasos. En realizaciones particulares, el grupo polimérico hidrofílico puede tener un peso molecular de alrededor de 800 a alrededor de 120.000 Daltons y puede ser un polialcano glicol (por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (PPG)), polímero de carbohidratos, polímero de aminoácidos, o polivinil pirrolidona, y el grupo de ácidos grasos o éster de ácidos grasos puede comprender de alrededor de ocho a alrededor de cuarenta átomos de carbono.

60

65

Los anticuerpos modificados y los fragmentos que enlazan con el antígeno de la invención pueden comprender una o más fracciones orgánicas que están enlazadas covalentemente, directa o indirectamente, con el anticuerpo. Cada fracción orgánica que está enlazada a un anticuerpo o fragmento que enlaza con el antígeno de la invención puede ser independientemente un grupo polimérico hidrofílico, un grupo de ácidos grasos o un grupo éster de ácidos grasos. Como se usa en la presente, el término "ácido graso" abarca ácidos mono-carboxílicos y ácidos di-carboxílicos. Un "grupo polimérico hidrofílico", como el término se utiliza en la presente, se refiere a un polímero orgánico que es más soluble en agua que en octano. Por ejemplo, la poliisina es más soluble en agua que en octano. Por lo tanto, un anticuerpo modificado por la unión covalente de poliisina está englobado por la invención. Los polímeros hidrofílicos adecuados para modificar anticuerpos de la invención pueden ser lineales o ramificados e incluyen, por ejemplo, polialcano glicoles (por ejemplo, PEG, monometoxi-polietilenglicol (mPEG), PPG y similares), carbohidratos (por ejemplo, dextrano, celulosa, oligosacáridos, polisacáridos y similares), polímeros de amino ácidos hidrofílicos (por ejemplo, poliisina, poliarginina, poliaspartato y similares), óxidos de polialcanos (por ejemplo, óxido de polietileno, óxido de polipropileno y similares) y polivinil pirolidona. preferiblemente, el polímero hidrofílico que modifica el anticuerpo de la invención tiene un peso molecular de alrededor de 800 a alrededor de 150.000 Daltons como una entidad molecular separada. Por ejemplo se pueden usar el PEG₅₀₀₀ y PEG₂₀₀₀₀, en donde el subíndice es el peso molecular medio del polímero en Daltons. El grupo polimérico hidrofílico puede ser sustituido con de uno a alrededor de seis grupos alquilo, de ácidos grasos o éster de ácidos grasos. Los polímeros hidrofílicos que son sustituidos con un grupo de ácidos grasos o éster de ácidos grasos se pueden preparar empleando métodos adecuados. Por ejemplo, un polímero que comprende un grupo amino puede ser acoplado con un carboxilato del ácido graso o éster de ácido graso, y un carboxilato activado (por ejemplo, activado con N,N-carbonil diimidazol) en un ácido graso o éster de ácido graso puede ser acoplado con un grupo hidroxilo en un polímero.

Los ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos adecuados para modificar anticuerpos de la invención pueden ser saturados o pueden contener un o más unidades de insaturación. Los ácidos grasos que son adecuados para modificar anticuerpos de la invención incluyen, por ejemplo, n-dodecanoato (C₁₂, laurato), n-tetradecanoato (C₁₄, miristato), n-octadecanoato (C₁₈, estearato), n-eicosanoato (C₂₀, araquidato), n-docosanoato (C₂₂, behenato), n-triacontanoato (C₃₀), n-tetracontanoato (C₄₀), cis-Δ⁹-octadecanoato (C₁₈, oleato), todos cis-Δ⁸, 8, 11, 14-eicosatetraenoato (C₂₀, araquidonato), ácido octanodioico, ácido tetradecanodioico, ácido ocatadecaodioico, ácido docosanodioico, y similares. Los ésteres de ácidos grasos adecuados incluyen mono-ésteres de ácidos dicarboxílicos que comprenden un grupo alquilo inferior lineal o ramificado. El grupo alquilo inferior puede comprender de uno a alrededor de doce, preferiblemente de uno a alrededor de seis, átomos de carbono.

Los anticuerpos humanos modificados y los fragmentos que enlazan con el antígeno de los mismos se pueden preparar usando métodos adecuados, como por reacción con uno o más agentes modificadores. Un "agente modificador" como se usa el término en la presente, se refiere a un grupo orgánico adecuado (por ejemplo, polímero hidrofílico, un ácido grado, un éster de ácidos grasos) que comprende un grupo de activación. Un "grupo de activación" es una fracción o grupo funcional químico que puede, bajo condiciones apropiadas, reaccionar con un segundo grupo químico formando de esta manera un enlace covalente entre el agente modificador y el segundo grupo químico. Por ejemplo, los grupos de activación reactivos con amina incluyen grupos electrofílicos como tosilato, mesilato, halo (cloro, bromo, flúor, yodo), N-hidroxisuccinimidil ésteres (NHS), y similares. Los grupos de activación que pueden reaccionar con tioles incluyen, por ejemplo, maleimida, yodoacetilo, acrilolilo, disulfuros de piridilo, ácido 5-tiol-2-nitrobenzoico tiol (TNB-tiol), y similares. Un grupo funcional aldehído puede ser acoplado a las moléculas que contienen amina o hidrazida, y un grupo azida puede reaccionar con un grupo de fósforo trivalente para formar ligamientos de fosforamidato o fosforimida. Los métodos adecuados para introducir métodos de activación en moléculas se conocen en la técnica (ver por ejemplo, Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, CA (1996)). Un grupo de activación puede estar enlazado directamente con el grupo orgánico (por ejemplo, polímero hidrofílico, ácido graso, o éster de ácidos grasos), o a través de una fracción conectora, por ejemplo un grupo C₁-C₁₂ divalente en donde uno o más átomos de carbono pueden ser reemplazado por un heteroátomo como oxígeno, nitrógeno o sulfuro. Las fracciones conectoras adecuadas incluyen, por ejemplo, tetraetilen glicol, -(CH₂)₃-, -NH- (CH₂)₆- NH-, -(CH₂)₂- NH- y- CH₂- O- CH₂- CH₂- O- CH₂- CH₂- O- CH- NH-. Los agentes modificadores que comprenden una fracción conectora se pueden producir, por ejemplo, reaccionando una mono-Boc-alquildiamina (por ejemplo, mono -Boc- etilendiamina, mono- Boc- diaminohexano) con un ácido graso en la presencia de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) para formar un enlace amida entre la amina libre y carboxilato de ácido graso. El grupo protector Boc puede ser retirado del producto por tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) para exponer una amina primaria que puede ser acoplada a otro carboxilato como se describe, o puede ser reaccionado con anhídrido maleico y el producto resultante ciclado para producir un derivado maleimido activado del ácido graso. (Ver, por ejemplo, Thompson y otros, WO 92/16221).

Los anticuerpos modificados de la invención pueden ser producidos reaccionando un anticuerpo humano o fragmento que enlaza con el antígeno con un agente modificador. Por ejemplo, las fracciones orgánicas pueden ser enlazadas con el anticuerpo de una manera no específica del sitio empleando un agente modificador reactivo con amina, por ejemplo, un éster NHS de PEG. Los anticuerpos humanos modificados o fragmentos que enlazan con el antígeno también pueden ser preparados reduciendo los enlaces de disulfuro) por ejemplo, enlaces de disulfuro intra-cadena) de un anticuerpo o fragmento que enlaza con el antígeno. En anticuerpo o fragmento que enlaza con el antígeno reducido puede ser entonces reaccionado con un agente modificador reactivo con tiol para producir el anticuerpo modificado de la invención. Los anticuerpos humanos modificados y fragmentos que enlazan con el

antígeno que comprenden una fracción orgánica que está enlazada con sitios específicos de un anticuerpo de la presente invención pueden ser preparados usando métodos adecuados, como proteólisis inversa (Fisch y otros, *Bioconjugate Chem.*, 3: 147- 153 (1992); Werlen y otros, *Bioconjugate Chem.*, 5: 411- 417 (1994); Kumaran y otros, *Protein Sci.* 6 (10) : 2233- 2241 (1997); Itoh y otros, *Bioorg. Chem.*, 24 (1) : 59- 68 (1996) ; Capellas y otros, *Biotechnol. Bioeng.*, 56 (4) : 456- 463 (1997)) , y los métodos descritos en Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996).

7. Anticuerpos Anti-Idiotipo a Anticuerpos Anti-MCP-1

Además de los anticuerpos anti-MCP-1 monoclonales o quiméricos, también se divulga en la presente un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) específico para dichos anticuerpos de la invención. Un anticuerpo anti-Id es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos asociados generalmente con la región que enlaza con el antígeno de otro anticuerpo. El anti-Id puede ser preparado inmunizando un animal de la misma especie y tipo genético (por ejemplo, cepa de ratón) como la fuente del anticuerpo Id con el anticuerpo o una región que contiene CDR del mismo. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante y producirá un anticuerpo anti-Id. El anticuerpo anti-Id puede ser usado también como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en todavía otro animal, produciendo el denominado anticuerpo anti-anti-Id.

8. Composiciones de Anticuerpos que comprenden ingredientes terapéuticamente activos adicionales

La composición puede comprender además opcionalmente una cantidad efectiva de al menos un compuesto o proteína seleccionado de al menos uno de un fármaco dermatológico, un fármaco antiinflamatorio, un analgésico, un fármaco renal (por ejemplo un bloqueador del receptor de angiotensina (ARB) o antagonista), un fármaco anti-infeccioso, un fármaco del sistema cardiovascular (CV), un fármaco del sistema nervioso central (CNS), un fármaco del sistema nervioso autónomo (ANS), un fármaco del tracto respiratorio, un fármaco del tracto gastrointestinal (GI), un fármaco hormonal, un fármaco para el equilibrio de fluidos o electrolitos, un fármaco hematológico, un antineoplásico, un fármaco para la inmunomodulación, un fármaco, oftálmico,ótico o nasal, un fármaco nutricional o similares. dichos fármacos son bien conocidos en la técnica, incluyendo las formulaciones, indicaciones, dosificaciones y administración para cada uno de los presentados en la presente (ver por ejemplo, *Nursing 2001 Handbook of Drugs*, 21^o edición, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; *Health Professional's Drug Guide 2001*, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ; *Pharmacotherapy Handbook*, Wells y otros, ed., Appleton & Lange, Stamford, CT).

Las composiciones de anticuerpos anti-MCP-1 de la presente invención puede comprender adicionalmente al menos uno de cualquier cantidad adecuada y efectiva de una composición o composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo anti-MCP-1 a una célula, tejido, órgano, animal o paciente con necesidad de dicha modulación, tratamiento o terapia, comprendiendo además opcionalmente al menos uno seleccionado de al menos un antagonista TNF (por ejemplo, pero no limitado a, un antagonista químico o proteínico TNF, anticuerpo o fragmento monoclonal o policlonal TNF, en receptor TNF soluble (por ejemplo, p55, p70 o p85) o fragmento, polipéptidos de fusión de los mismos, o un antagonista TNF de molécula pequeña, por ejemplo, proteína I o II de enlace TNF (TBP-1 o TBP-II), nerelimonmab, infliximab, entercept, CDP- 571, CDP- 870, afelimomab, lenercept, y similares), un antirreumático (por ejemplo, metotrexato, auranofina, auroglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato de sodio de oro, sulfato de hidroxiloroquina, leflunomida, sulfasalzina), un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano (por ejemplo, aminoglicosido, un antifúngico, un antiparasitario, un antivírico, un carbapenémico, cefalosporina, una fluoroquinolona, un macrólido, una penicilina, una sulfonamida, una tetraciclina, otro antimicrobiano), un antipsoriático, un corticoesteroide, un esteroide metabólico, una glicina relacionada con la diabetes, un mineral, un nutricional, un agente tiroideo, una vitamina, una hormona relacionada con el calcio, un antidiarreico, un antitusivo, un antiemético, un antiulceroso, un laxante, un anticoagulante, una eritropoyetina (por ejemplo, epoetina alfa), un filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), un sargramostim (GM-CSF, Leucina), un agente para enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (COPD), un agente anti-fibrótico, una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor (por ejemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo de hormona, un modulador del receptor de estrógeno, un midriático, un ciclológico, un agente alquilante, un antimetabolito, un inhibidor mitótico, un radiofarmacéutico, un antidepresivo, agente antimaniaco, un antipsicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un simpaticomimético, un estimulante, donepezilo, tacrina, una medicación para el asma, un beta antagonista, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrienos, una metilxantina, un cromolín, una epinefrina o análogo, dornase alfa (Pulmozyme), una citoquina o un antagonista de citoquina. Ejemplos no limitativos de dichas citoquinas incluyen, pero no están limitadas a , cualquiera de IL-1 a IL-29. Las dosificaciones adecuadas son bien conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Wells y otros, eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2^a Edición, Appleton y Lange, Stamford, CT (2000) ; *PDR Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edición, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000).

Dichos anti-cancerígenos o anti-infecciosos también pueden incluir moléculas de toxina que están asociadas, enlazadas, co-formuladas o co-administradas con al menos un anticuerpo de la presente invención. La toxina puede opcionalmente actuar para matar selectivamente la célula o tejido patológico. La célula patológica

puede ser una célula cancerosa u otra célula. Dichas toxinas pueden ser, pero no están limitadas a, toxina purificada o recombinante o fragmento de toxina que comprende al menos un dominio citotóxico funcional de toxina, por ejemplo, seleccionado de al menos uno de ricina, toxina de la difteria, una toxina venenosa, o una toxina bacteriana. El término toxina también incluye tanto endotoxinas como exotoxinas producidas por cualquier bacteria o virus de origen natural, mutante o recombinante que puede causar cualquier condición patológica en humanos y otros mamíferos, incluyendo choque tóxico, que puede resultar en la muerte. Dichas toxinas pueden incluir, pero no están limitadas a, enterotoxina lábil al calor de *E. coli* enterotoxigénica (LT), enterotoxina estable al calor (ST), citotoxina de *Shigella*, enterotoxinas de *Aeromonas*, tóxina-1 del síndrome del choque tóxico (TSST-1), enterotoxina A de *Staphylococcus*, (SEA), B (SEB), o C (SEC), enterotoxinas de *Streptococcus* y similares. Las mencionadas bacterias incluyen, pero no están limitadas a, cepas de una especie de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágico (por ejemplo, cepas del serotipo O157:H7), especies de *Staphylococcus* (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*), especies de *Shigella* (por ejemplo, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, y *Shigella sonnei*), especies de *Salmonella* (por ejemplo, *Salmonella typhi*, *Salmonella cholera-suis*, *Salmonella enteritidis*), especies de *Clostridium* (por ejemplo, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*), especies de *Campylobacter* (por ejemplo, *Caniphlobacter jejuni*, *Campylobacter fetus*), especies de *Helicobacter*, (por ejemplo, *Helicobacter pylori*), especies de *Aeromonas* (por ejemplo, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*), *Pleisomonas shigelloides*, *Yersinia enterocolitica*, especies de *Vibrios* (por ejemplo, *Vibrios cholerae*, *Vibrios parahemolyticus*), *Klebsiella* species, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Streptococci* Ver., por ejemplo, Stein, ed., INTERNAL MEDICINE, 3ª ed., pp 1-13, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans y otros, eds., Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 2ª Ed., pp 239-254, Plenum Medical Book Co., New York (1991); Mandell y otros, Principles and Practice of Infectious Diseases, 3ª. Ed., Churchill Livingstone, New York (1990); Berkow y otros, eds., The Merck Manual, 16ª Edición, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Wood y otros, FEMS Microbiology Immunology, 76:121-134 (1991); Marrack y otros, Science, 248:705-711 (1990).

Los compuestos, composiciones, o combinaciones de anticuerpos anti-MCP-1 de la presente invención pueden comprender además al menos un agente auxiliar adecuado como, pero no limitado a, diluyente, aglutinante, estabilizante, reguladores, sales, solventes lipofílicos, conservantes, adyuvantes o similares. Se prefieren los auxiliares farmacéuticamente aceptables. Ejemplos no limitativos de, y métodos de preparar dichas soluciones estériles con bien conocidos en la técnica como, pero no limitado a, Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990. Pueden ser seleccionados rutinariamente portadores farmacéuticamente aceptables que son adecuados para el modo de administración, solubilidad y/o estabilidad del anticuerpo, fragmento o composición variante anti-MCP-1 como se conoce bien en la técnica o como se describe en la presente.

Los excipientes y aditivos farmacéuticos útiles en la presente composición incluyen, pero no están limitados a, proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos, y carbohidratos (por ejemplo, azúcares, incluyendo monosacáridos, di-, tri-, tetra-, y oligosacáridos; azúcares derivados como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares; y polisacáridos o polímeros de azúcar), que pueden estar presentes individualmente o en combinación, comprendiendo solos o en combinación un 1-99,99% por peso o volumen. Los excipientes de proteína ejemplares incluyen albúmina de suero como albúmina de suero humana (HSA), albúmina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína y similares. Los componentes de aminoácidos/anticuerpos representativos, que pueden también funcionar en una capacidad reguladora, incluyen alanina, glicina, arginina, betaina, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo, y similares. Otro aminoácido preferido es la glicina.

Los excipientes de carbohidratos adecuados para el uso en la invención incluyen, por ejemplo, monosacáridos como la fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa, y similares; disacáridos, como la lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; polisacáridos como la rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles, como el manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol), mioinositol y similares. Los excipientes de carbohidratos preferidos para el uso en la presente invención son el manitol, la trehalosa y la rafinosa.

Las composiciones de anticuerpos anti-MCP-1 pueden también incluir un regulador o un agente ajustador del pH-; típicamente, el regulador es una sal preparada de un ácido o base orgánico. Los reguladores representativos incluyen sales de ácidos orgánicos como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético, o ácido ftálico; Tris, hidrocloreuro de trometamina, o reguladores de fosfato. Los reguladores preferidos para el uso en las presentes composiciones son sales de ácidos orgánicos como el citrato.

Adicionalmente, las composiciones de anticuerpos anti-MCP-1 de la invención pueden incluir excipientes/aditivos poliméricos como polivinilpirrolidonas, ficolls (un azúcar polimérico), dextratos (por ejemplo, ciclodextrinas, como 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina), polietilenglicoles, agentes aromatizantes, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, surfactantes (por ejemplo, polisorbatos como "TWEEN 20" y "TWEEN 80"), lípidos (por ejemplo, fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides (por ejemplo, colesterol), y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA).

Estos y excipientes y/o aditivos adicionales farmacéuticos conocidos adecuados para el uso en el anticuerpo, porción o composiciones variantes de anti-MCP-1 de acuerdo con la invención se conocen en la técnica, por ejemplo, como se enumeran en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19ª ed., Williams & Williams, (1995), y en el "Physician's Desk Reference", 52ª ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998). Los materiales excipientes o portadores preferidos son carbohidratos (por ejemplo, sacáridos y alditoles) y los reguladores (por ejemplo citrato) o agentes poliméricos.

9. Formulaciones

Como se ha señalado anteriormente, la invención proporciona formulaciones estables adecuadas para el uso farmacéutico o veterinario, comprendiendo al menos un anticuerpo anti-MCP-1 en una formulación farmacéuticamente aceptable.

Como se ha señalado anteriormente, la invención proporciona un artículo para la fabricación, que comprende envasar material y al menos un frasco que comprende una solución de al menos un anticuerpo anti-MCP-1 con los reguladores y/o conservantes prescritos, opcionalmente en un diluyente acuoso, en donde el mencionado material de envasado comprende una etiqueta que indica que dicha solución puede ser mantenida durante un periodo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 horas o mayor. La invención comprende además un artículo para la fabricación, comprendiendo material de envasado, un primer frasco que comprende al menos un anticuerpo anti-MCP-1 liofilizado, y un segundo frasco que comprende un diluyente acuoso de regulador o conservante prescrito, en donde el mencionado material de envasado comprende una etiqueta que instruye a un paciente para reconstituir el al menos un anticuerpo anti-MCP-1 en el diluyente acuoso para formar una solución que puede ser mantenida durante un periodo de veinticuatro horas o mayor.

El rango del al menos un anticuerpo anti-MCP-1 en el producto de la presente invención incluye cantidades que se producen en el momento de la reconstrucción, si es en un sistema húmedo/seco, las concentraciones de alrededor de 1,0 µg/ml a alrededor de 1000 mg/ml, aunque concentraciones menores y mayores son funcionales y son dependientes del vehículo de administración pretendido, por ejemplo, las formulaciones de la solución diferirán de parches transdérmicos, métodos de micro bomba u osmóticos, pulmonares, transmucosales.

El diluyente acuoso comprenderá además opcionalmente un conservante farmacéuticamente aceptable. Los conservantes preferidos incluyen los seleccionados del grupo consistente de fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal, o mezclas de los mismos. La concentración del conservante usado en la formulación es una concentración suficiente para producir un efecto anti-microbiano. Dichas concentraciones son dependientes del conservante seleccionado y son fácilmente determinadas por el experto en la técnica.

Otros agentes, por ejemplo, agentes de isotonicidad, reguladores, antioxidantes, potenciadores de conservantes, pueden ser opcionalmente y preferiblemente añadidos al diluyente. Un agente de isotonicidad, como la glicerina, es usado comúnmente a concentraciones conocidas. Se añade preferiblemente un regulador fisiológicamente tolerado para proporcionar control de pH mejorado. Las formulaciones pueden cubrir un amplio intervalo de pHs, como de alrededor de pH 4 alrededor de pH10, y los intervalos preferidos de alrededor de pH 5 a alrededor de pH 9, y el intervalo más preferido de alrededor de 6,0 a alrededor de 8,0. Preferiblemente las formulaciones de la presente invención tienen un pH entre alrededor de 6,8 y alrededor de 7,8. Los reguladores preferidos incluyen reguladores de fosfato, más preferiblemente fosfato de sodio, particularmente solución salina regulada por fosfato (PBS).

Otros aditivos, tales como solubilizantes farmacéuticamente aceptables como Tween20 (polioxietilen (20) sorbitan monolaurato), Tween 40 (polioxietilen (20) sorbitan monopalmitato), Tween 80 (polioxietilen (20) sorbitan monooleato), Pluronic F68 (copolímeros de bloque de polioxietilen polioxipropilen), y PEG (polietilenglicol) o surfactantes no iónicos como polisorbato 20 ó 80 o poloxámero 184 ó 188, polioles Pluronic®, otros polímeros de bloque, y quelantes como EDTA y EGTA pueden ser opcionalmente añadidos a las formulaciones o composiciones para reducir la agregación. Estos aditivos son particularmente útiles si se usa un recipiente de bomba o plástico para administrar la formulación. La presencia de surfactantes farmacéuticamente aceptables mitiga la propensión de la proteína a agregarse.

Las formulaciones de la presente invención pueden ser preparadas por un proceso que comprende mezclar al menos un anticuerpo anti-MCP-1 y una solución regulada en cantidades suficientes para proporcionar la proteína a las concentraciones deseadas. Variaciones de este proceso serán reconocidas por alguien experto en la técnica. Por ejemplo, el orden en que los componentes son añadidos, si se usan aditivos adicionales, la temperatura y pH al que la formulación se prepara, son todos factores que pueden ser optimizados para la concentración y medio de administración usado.

Las formulaciones reivindicadas se pueden proporcionar a pacientes como soluciones o como frascos duales que comprenden un frasco del al menos un anticuerpo anti-MCP-1 liofilizado que se reconstituye con un segundo frasco que contiene agua, un conservante y/o excipientes, preferiblemente un regulador y/o solución salina de fosfato y una sal elegida, en un diluyente acuoso. Ya sea un frasco de solución individual o un frasco dual que requiere la reconstitución puede ser reutilizado múltiples veces y puede ser suficiente para un único ciclo o múltiples ciclos del tratamiento del paciente y por lo tanto puede proporcionar un régimen de tratamiento más conveniente que los actualmente disponibles.

Los presentes artículos reivindicados de fabricación son útiles para la administración durante un periodo de tiempo de inmediato a veinticuatro horas o mayor. En consecuencia, los artículos reivindicados ahora de fabricación ofrecen ventajas significativas al paciente. Las formulaciones de la invención pueden opcionalmente ser almacenadas de forma segura a temperaturas de desde alrededor de 2 a alrededor de 40° C y mantener la actividad biológica de la proteína durante periodos de tiempo prolongados, por lo tanto, permitiendo una etiqueta de envasado que indica que la solución puede ser mantenida y/o usada durante un periodo de 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 ó 96 horas o más. Si se usa diluyente conservado, dicha etiqueta puede incluir usar hasta 1-12 meses, medio, uno y medio y/o dos años.

Los productos reivindicados pueden ser proporcionados indirectamente a los pacientes proporcionando a farmacias, clínicas, u otras instituciones e instalaciones, soluciones claras o frascos duales que comprenden un frasco del al menos un anticuerpo anti-MCP-1 liofilizado que es reconstituido con un segundo frasco que contiene el diluyente acuoso. La solución clara en este caso puede ser de hasta un litro o de tamaño mayor, proporcionando un depósito grande del que se pueden recuperar porciones más pequeñas de la solución del al menos un anticuerpo una o múltiples veces para la transferencia a frascos más pequeños y proporcionados por la farmacia o clínica a sus clientes y/o pacientes.

Los dispositivos reconocidos que comprenden estos sistemas de frasco único incluyen aquellos dispositivos de inyector tipo lápiz para la administración de una solución como BD Pens, BD Autojector®, Humaject®, NovoPen®, B- D®Pen, AutoPen®, and OptiPen®, GenotropinPen®, Genotronorm Pen®, Humatro Pen®, Reco-Pen®, Roferon Pen®, Biojector®, lject®, J- tip Needle- Free Injector®, Intraject®, Medi- Ject®, por ejemplo, como son hechos o desarrollados por Becton Dickensen (Franklin Lakes, NJ, www.bectondickenson.com), Disetronic (Burgdorf, Suiza, www.disetronic.com); Bioject, Portland, Oregón (www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, UK, www.weston-medical.com), Medi- Ject Corp (Minneapolis, MN, www.mediject.com). Los dispositivos reconocidos que comprenden un sistema de frascos dual incluyen sistemas de inyector de tipo lápiz para reconstituir un fármaco liofilizado en un cartucho para la administración de la solución reconstituida como el HumatroPen®.

Los productos ahora reivindicados incluyen material de envasado. El material de envasado proporciona, además de la información requerida por las agencias regulatorias, las condiciones bajo las que el producto puede ser usado. El material de envasado de la presente invención proporciona instrucciones al paciente para reconstituir el al menos un anticuerpo anti-MCP-1 en el diluyente acuoso para formar una solución y para usar la solución durante un periodo de 2-24 horas o más para el producto de dos viales, húmedo/seco. Para el producto de solución, vial único, la etiqueta indica que dicha solución puede ser usada durante un periodo de 2-24 horas o más. Los productos ahora reivindicados son útiles para el uso del producto farmacéutico humano.

Otras formulaciones o métodos de estabilizar el anticuerpo anti-MCP-1 pueden resultar en que no sea una solución clara del polvo liofilizado que comprende el mencionado anticuerpo. Entre las soluciones no claras están las formulaciones que comprenden suspensiones de partículas, dichas partículas siendo una composición que contiene el anticuerpo anti-MCP-1 en una estructura de dimensión variable y conocida diversamente como una microesfera, micropartícula, nanopartícula, nanoesfera, o liposoma. Tales formulaciones de partículas esencialmente esféricas relativamente homogéneas que contienen un agente activo pueden ser formadas poniendo en contacto una fase acuosa que contiene el activo y un polímero y una fase no acuosa seguido por la evaporación de la fase no acuosa para provocar una coalescencia de partículas de la fase acuosa como se enseña en la U.S. 4.589.330. Las micropartículas porosas pueden ser preparadas usando una primera fase que contiene activo y polímero dispersado en un solvente continuo y eliminando dicho solvente de la suspensión por secado por congelación o precipitación por dilución- extracción- como se enseña en la U.S. 4.818.542. Los polímeros preferidos para dichas preparaciones son copolímeros o polímeros naturales o sintéticos seleccionados del grupo consistente de agar de gelatina, almidón, arabinogalactano, albúmina, colágeno, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, ácido glicólico-L(-) láctico poli (épsilon-caprolactona, poli(épsilon-caprolactona-CO-láctico), poli (ácido épsilon-caprolactona-CO-glicólico), poli (ácido β-hidroxi butírico), óxido de polietileno, polietileno, poli (alquil-2-cianocrilato), poli (hidroxietyl metacrilato), poliamidas, poli (aminoácidos), poli (2-hidroxietil DL-aspartamida), poli (éster urea), poli (L-fenilalanina/etilen glicol/1,6-diidocianatohexano) y poli (metil metacrilato). Los polímeros particularmente preferidos son poliésteres como el ácido poliglicólico, el ácido poliláctico, glicolido-L(-) láctico poli (épsilon-caprolactona, poli (ácido épsilon-caprolactona-CO-láctico, y poli (ácido épsilon-caprolactona-CO-glicólico). Los solventes útiles para disolver el polímero y/o el activo incluyen: agua, hexafluoroisopropanol, metilenecloruro, tetrahidrofurano, hexano, benceno, o hexafluoroacetona sesquihidrato. El proceso de dispersar la fase que contiene el activo con una segunda fase puede incluir forzar con presión la mencionada primera fase a través de un orificio en una boquilla para afectar a la formación de las gotas.

Las formulaciones de polvos secos pueden resultar de procesos que no sean la liofilización como por secado por pulverización o extracción del solvente por evaporación o por precipitación de una composición cristalina seguido por uno o más pasos para eliminar el solvente acuoso o no acuoso. La preparación de una preparación de anticuerpos secada por pulverización se enseña en la U.S. 6.019.968. Las composiciones de polvos secos basadas en anticuerpos pueden ser producidas por soluciones o lechadas de secado por pulverización del anticuerpo y, opcionalmente, excipientes, en un solvente bajo condiciones para proporcionar un polvo seco respirable. Los solventes pueden incluir compuestos polares como agua y etanol, que pueden ser fácilmente secados. La estabilidad del anticuerpo puede ser mejorada realizando los procedimientos de secado por pulverización en ausencia de oxígeno, como bajo una manta de nitrógeno o usando nitrógeno como el gas de secado. Otra formulación relativamente seca es una dispersión de una pluralidad de microestructuras perforadas dispersas en un medio de suspensión que comprende típicamente un propulsor de hidrofluoroalcano como se enseña en la WO 9916419. Las dispersiones estabilizadas pueden ser administradas al pulmón de un paciente usando un inhalador de dosis medidas. El equipamiento útil en la fabricación comercial de los medicamentos secados por pulverización es fabricado por Buchi Ltd. o NiroCorp.

Al menos un anticuerpo anti-MCP-1 en las formulaciones o soluciones estables o conservadas descritos en la presente, pueden ser administrados a un paciente de acuerdo con la presente invención por una variedad de métodos de administración incluyendo inyección SC o IM; transdérmica, pulmonar, transmucosal, implante, bomba osmótica, cartucho, micro bomba, u otros medios apreciados por el experto en la técnica, como es bien conocido en la técnica.

10. Aplicaciones Terapéuticas

Se divulga en la presente un método para modular o tratar al menos una enfermedad relacionada con la MCP-1, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, como se conoce en la técnica o como se describe en la presente, usando al menos un anticuerpo anti-MCP-1 de la presente invención. Se divulga en la presente un método para modular o tratar al menos una enfermedad relacionada con la MCP-1, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente incluyendo, pero no limitado a, al menos una de enfermedad maligna, enfermedad metabólica, una enfermedad relacionada inmune o inflamatoria, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad infecciosa, o una enfermedad neurológica.

Dichas condiciones son seleccionadas de, pero no limitadas a, enfermedades o condiciones mediadas por adhesión celular y/o angiogénesis. Dichas enfermedades o condiciones incluyen un trastorno o enfermedad inmune, un trastorno o enfermedad cardiovascular, un trastorno o enfermedad infecciosa, maligno, yo neurológico, u otras condiciones relacionadas con la MCP-1 especificadas o conocidas. en particular, los anticuerpos son útiles para el tratamiento de enfermedades que implican angiogénesis como enfermedad del ojo y enfermedad neoplásica, remodelación del tejido como la reestenosis, y la proliferación de ciertos tipos de células particularmente epiteliales y carcinomas de células escamosas. Las indicaciones particulares incluyen el uso en el tratamiento de aterosclerosis, reestenosis, metástasis cancerosa, artritis reumatoide, retinopatía diabética y degeneración macular. Los anticuerpos neutralizantes de la invención son también útiles para evitar o tratar la resorción o degradación ósea no deseada, por ejemplo como se encuentra en la osteoporosis o resultante de la sobreexpresión de la PTHrP por algunos tumores. Los anticuerpos pueden ser también útiles en el tratamiento de varias enfermedades fibróticas como fibrosis pulmonar idiopática, nefropatía diabética, hepatitis, y cirrosis.

Se divulga en la presente un método para modular o tratar al menos una enfermedad relacionada con la MCP-1, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, como se conoce en la técnica o como se describe en la presente, usando al menos un anticuerpo de la MCP-1 de la presente invención. Las indicaciones particulares se analizan a continuación:

Enfermedad Pulmonar

También se divulga en la presente un método para modular o tratar al menos una enfermedad maligna en una célula, tejido, órgano, animal o paciente incluyendo, pero no limitado a, al menos una de: neumonía; absceso pulmonar; enfermedades ocupacionales pulmonares causadas por agentes en la forma de polvos, gases o nieblas, asma, bronquitis fibrosa obliterante, fallo respiratorio, enfermedades hipersensibles de los pulmones incluyendo neumonitis por hipersensibilidad (alveolitis alérgica extrínseca), aspergilosis broncopulmonar alérgica, y reacciones a fármacos; síndrome de dificultad respiratoria adulta (ARDS), Síndrome de Goodpasture, trastornos de las vías respiratorias obstructivas crónicas (COPD), enfermedades de pulmón intersticiales idiopáticas como fibrosis y sarcoidosis pulmonar idiopática, neumonía intersticial descamativa, neumonía intersticial aguda, enfermedad pulmonar intersticial asociada con bronquitis respiratoria, bronquitis idiopática obliterante con neumonía organizativa, neumonitis intersticial linfocítica, granulomatosis de células de Langerhan, hemosiderosis pulmonar idiopática; bronquitis aguda, proteinosis alveolar pulmonar, bronquiectasias, trastornos de la pleura, atelectasia, fibrosis cística, y tumores del pulmón, y embolismo pulmonar.

Enfermedad Maligna

También se divulga en la presente un método para modular o tratar al menos una enfermedad maligna en una célula, tejido, órgano, animal o paciente incluyendo, pero no limitado a, al menos una de: leucemia, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (ALL), de células B, células T o FAB ALL, leucemia mielode aguda (AML), leucemia mielocítica crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas, síndrome mielodisplásico (MDS), un linfoma, enfermedad de Hodgkin, un linfoma maligno, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, sarcoma de Kaposi, carcinoma colorectal, carcinoma pancreático, carcinoma de células renales, cáncer de pecho, carcinoma nasofaríngeo, histiocitosis maligna, síndrome/hipercalcemia paraneoplásico de malignidad, tumores sólidos, adenocarcinomas, carcinomas de células escamosas, sarcomas, melanoma maligno, melanoma particularmente metastásico, hemangioma, enfermedad metastásica, resorción ósea relacionada con el cáncer, dolor óseo relacionado con el cáncer, y similares.

Enfermedades Relacionadas Inmunes

También se divulga en la presente un método para modular o tratar al menos una enfermedad relacionada inmune en una célula, tejido, órgano, animal o paciente incluyendo, pero no limitado a, al menos una de: artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, inicio de artritis reumatoide juvenil sistémica, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, úlcera gástrica, artropatías seronegativas, osteoartritis, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico, síndrome antifosfolípido, neuritis iridociclitis/uveítis/ óptica, fibrosis pulmonar idiopática, vasculitis sistémica/granulomatosis de Wegener, arcoidosis, procedimientos de reversión de orquitis/vasectomía, enfermedades alérgicas/atópicas, asma, rinitis alérgica, eczema, dermatitis alérgica de contacto, conjuntivitis alérgica, neumonitis por hipersensibilidad, trasplantes, rechazo de órganos trasplantados, enfermedad de injerto contra huésped, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, síndrome de sepsis, sepsis de gram positiva, sepsis de gram negativa, sepsis negativa de cultivo, sepsis por hongos, fiebre neutropénica, sepsis urinaria, meningococcemia, trauma/hemorragia, quemaduras, exposición a radiación ionizante, pancreatitis aguda, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, artritis reumatoide, hepatitis inducida por el alcohol, patologías inflamatorias crónicas, sarcoidosis, Patología de Crohn, anemia de células falciformes, diabetes, nefrosis, enfermedades atópicas, reacciones hipersensibles, rinitis alérgica, fiebre del heno, rinitis perenne, conjuntivitis, endometriosis, asma, urticaria, anafalaxis sistémica, dermatitis, anemia perniciosa, enfermedad hemolítica, trombocitopenia, rechazo de injerto de cualquier órgano o tejido, rechazo del riñón trasplantado, rechazo de trasplante de corazón, rechazo de trasplante de hígado, rechazo de trasplante de páncreas, rechazo de trasplante de pulmón, rechazo de trasplante de médula ósea (TMO), rechazo de aloinjertos de piel, rechazo de trasplante de cartilago, rechazo de injerto de hueso, rechazo de trasplante de intestino pequeño, rechazo del implante del timo fetal, rechazo del trasplante de paratiroides, rechazo de xenoinjertos de cualquier órgano o tejido, rechazo de aloinjerto, reacciones de hipersensibilidad a anti-receptores, enfermedad de Graves, enfermedad de Raynaud, diabetes insulino-resistente tipo B, asma, miastenia gravis, citotoxicidad mediada por anticuerpos, reacciones de hipersensibilidad de tipo III, lupus eritematoso sistémico, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal y Síndrome de cambios en la piel), polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal, síndrome de cambios de la piel, síndrome antifosfolípido, pénfigo, esclerodermia, enfermedad del tejido conectivo mixto, enfermedad de Addison idiopática, diabetes mellitus, hepatitis activa crónica, cirrosis biliar primaria, vitiligo, vasculitis, síndrome de cardiomiopatía post-MI, hipersensibilidad de tipo IV, dermatitis de contacto, neumonitis por hipersensibilidad, rechazo de aloinjertos, granulomas debidos a microorganismos intracelulares, sensibilidad a fármacos, metabólica / idiopática, enfermedad de Wilson, hemacromatosis, deficiencia de alfa-1-antitripsina, retinopatía diabética, tiroiditis de hashimoto, osteoporosis, evaluación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, cirrosis biliar primaria, tiroiditis, encefalomielititis, caquexia, fibrosis quística, enfermedad pulmonar crónica neonatal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), Linfocitosis de hematofagocitos familiar, condiciones dermatológicas, psoriasis, alopecia, síndrome nefrótico, nefritis, nefritis glomerular, fallo renal agudo, hemodiálisis, uremia, toxicidad, preeclampsia, terapia con OKT3, terapia anti-CD3, terapia con citocinas, quimioterapia, terapia de radiación (por ejemplo, incluyendo pero no limitado a, toaesthesia, anemia, caquexia y similares), intoxicación por salicilato crónica, y similares. Ver, por ejemplo, el Merck Manual, 12^a-17^a Ediciones, Merck&Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells y otros, eds., Segunda Edición, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000).

Enfermedad Cardiovascular

También se divulga en la presente un método para modular o tratar al menos una enfermedad cardiovascular en una célula, tejido, órgano, animal o paciente incluyendo, pero no limitado a, al menos una de: síndrome de aturdimiento cardíaco, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, derrame cerebral, derrame cerebral isquémico, hemorragia, arteriosclerosis, aterosclerosis, reestenosis, enfermedad arterioesclerótica por diabetes, hipertensión, hipertensión arterial, hipertensión renovascular, síncope, choque, sífilis del sistema cardiovascular, insuficiencia cardíaca, cor pulmonar, hipertensión pulmonar primaria, arritmias cardíacas, latidos de fibrilación ectópica, aleteo auricular, fibrilación auricular (sostenida o paroxística), síndrome de la perfusión posterior, respuesta a inflamación de bypass cardiopulmonar, taquicardia auricular caótica o multifocal, taquicardia QRS regular estrecha, arritmias específicas, fibrilación ventricular, arritmias completas His, bloqueo auriculoventricular, bloqueo de rama completo, trastornos isquémicos del miocardio, enfermedad de la arteria coronaria, angina de

pecho, infarto de miocardio, cardiomiopatía, cardiomiopatía congestiva dilatada, miocardiopatía restrictiva, enfermedades valvulares cardíacas, endocarditis, enfermedad pericárdica, tumores cardíacos, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, inflamación de la aorta, oclusión de la aorta abdominal y sus ramificaciones, trastornos vasculares periféricos, trastornos arteriales oclusivos, enfermedad aterosclerótica periférica, tromboangitis obliterante, trastornos arteriales periféricos funcionales fenómeno y enfermedad de Raynaud, acrocianosis, eritromelalgia, enfermedades venosas, trombosis venosa, venas varicosas, fístula arteriovenosa, linfoderma, lipedema, angina inestable, lesión de reperfusión, síndrome de bomba post, lesión por isquemia-reperfusión, y similares. Dicho método puede opcionalmente comprender administrar una cantidad efectiva de una composición o composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo anti-MCP-1 a una célula, tejido, órgano, animal o paciente con necesidad de dicha modulación, tratamiento o terapia.

Enfermedad Neurológica

También se divulga en la presente un método para modular o tratar al menos una enfermedad neurológica en una célula, tejido, órgano, animal o paciente incluyendo, pero no limitado a, al menos una de: enfermedades neurodegenerativas, esclerosis múltiple, dolor de cabeza por migraña, complejo de demencia del SIDA, enfermedades desmielinizantes, como la esclerosis múltiple y mielitis transversal aguda; trastornos extrapiramidales y cerebelosos, tales como lesiones del sistema corticoespinal; trastornos de los ganglios basales o trastornos cerebelosos; trastornos del movimiento hiperkinético tales como Corea de Huntington y corea senil; trastornos del movimiento inducidos por fármacos, tales como los inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina del SNC; trastornos del movimiento hipocinético, como enfermedad de Parkinson; Parálisis supranúcleo progresiva; lesiones estructurales del cerebelo; degeneraciones espinocerebelosas, tales como ataxia espinal, ataxia de Friedreich, degeneraciones corticales cerebelosas, degeneraciones de sistemas múltiples (Mencel, Dejerine-Thomas, Shi-Drager, y Machado-Joseph), trastornos sistémicos (enfermedad de Refsum, abetalipoproteinemia, ataxia, telangiectasia y trastorno multisistema mitocondrial), trastornos centrales desmielinizantes, tales como esclerosis múltiple, mielitis transversa aguda, y trastornos de la unidad motora como atrofia musculoso neurogénica (degeneración de células del cuerno anterior, tales como esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal infantil y atrofia muscular espinal juvenil); enfermedad de Alzheimer, síndrome de Down en la mediana edad; enfermedad de cuerpos de Lewy difusos; demencia senil del tipo de cuerpo de Lewy, síndrome de Wernicke-Korsakoff, alcoholismo crónico, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; panencefalitis esclerosante subaguda, enfermedad Hallerorden-Spatz, y demencia pugilística, y similares. Dicho método puede opcionalmente comprender administrar una cantidad efectiva de una composición o composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo TNF o porción o variante especificada a una células, tejido, órgano, animal o paciente con necesidad de dicha modulación, tratamiento o terapia. Ver, por ejemplo, el Merck Manual, 16ª Edición, Merck & Company, Rahway, NJ (1992).

Condiciones Fibróticas

Además de las condiciones y enfermedades anteriormente descritas, también se divulga un método para modular o tratar condiciones fibróticas de varias etiologías como fibrosis hepática (incluyendo pero no limitado a cirrosis inducida por el alcohol, cirrosis inducida por virus, hepatitis autoinmune inducida), fibrosis pulmonar (incluyendo pero no limitada a esclerodermia, fibrosis pulmonar idiopática); fibrosis renal incluyendo pero no limitado a esclerodermia, nefritis diabética, glomerulonefritis, nefritis lúpica); fibrosis dérmica (incluyendo pero no limitado a esclerodermia, cicatrización hipertrófica y queloides, quemaduras); mielofibrosis; neurofibromatosis; fibroma; fibrosis intestinal; y adhesiones fibróticas resultantes de procesos quirúrgicos.

También se divulga en la presente un método para modular o tratar al menos una herida, trauma o lesión del tejido o condición crónica resultante de o relacionada con, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente incluyendo, pero no limitada a, al menos una de: lesión corporal o un trauma asociado con cirugía incluyendo cirugía torácica, abdominal, craneal u oral; o en donde la herida es seleccionada del grupo consistente de heridas asépticas, heridas contusas, heridas incisas, heridas laceradas, heridas no penetrantes, heridas abiertas, heridas penetrantes, heridas perforantes, heridas punzantes, heridas sépticas, infartos y heridas subcutáneas; o en donde la herida es seleccionada del grupo consistente de úlceras isquémicas, llagas por presión, fístulas, mordeduras severas, quemaduras térmicas y heridas en el sitio donante; o en donde la herida es una herida aftosa, una herida traumática o una herida asociada al herpes. Las heridas en el sitio donante son heridas que por ejemplo tienen lugar en conexión con la retirada de tejido duro de una parte del cuerpo a otra parte del cuerpo por ejemplo en relación con trasplantes. Las heridas resultantes de dichas operaciones son muy dolorosas y es más valioso por lo tanto una curación mejorada. La herida de fibrosis es también sensible a una terapia de anticuerpos anti-MCP-1 ya que las primeras células en invadir el área de la herida son neutrófilos seguidos por monocitos que son activados por los macrófagos. Se cree que los macrófagos son esenciales para la curación eficiente de la herida ya que son también responsables de la fagocitosis de los organismos patogénicos y una limpieza de los desechos de tejido. Además liberan numerosos factores implicados en eventos posteriores del proceso de curación. Los macrófagos atraen fibroblastos que empiezan la producción del colágeno. Casi todos los procesos de reparación de tejidos incluyen la formación de tejido conectivo temprana, una estimulación de esto y los procesos posteriores mejoran la curación del tejido, sin embargo, la sobreproducción de tejido conectivo y colágeno puede llevar a un tejido fibrótico caracterizado

como inelástico e hipóxico. Los anticuerpos anti-MCP-1 de la invención pueden ser usados en métodos para modular, tratar o prevenir dichas secuelas de la curación de heridas.

5 Los presentes anticuerpos de la presente invención pueden también ser usados en métodos para modular o tratar al menos un síntoma de rechazo crónico de un órgano, tejido o célula trasplantado, como un trasplante cardiaco.

Otros Usos Terapéuticos de los Anticuerpos Anti-MCP-1

10 También se divulga en la presente un método para modular o tratar al menos una enfermedad infecciosa en una célula, tejido, órgano, animal o paciente incluyendo, pero no limitado a, al menos uno de: infección bacteriana crónica o aguda; procesos infecciosos o parasitarios crónicos y agudos, incluyendo infecciones bacterianas, virales y fúngicas, infección por VIH/neuropatía por VIH, meningitis, hepatitis (A, B, o C, o similares), artritis séptica, peritonitis, neumonía, epiglotitis, e. coli 0157:h7, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica, malaria, dengue hemorrágico, leishmaniasis, lepra, síndrome de choque tóxico, miositis estreptocócica, gangrena gaseosa, tuberculosis por micobacterias, Mycobacterium avium intracellulare, neumonía por pneumocystis carinii, enfermedad inflamatoria pélvica, orquitis/epididimitis, legionela, enfermedad de lyme, gripe a, virus de Epstein-Barr, síndrome hemafagocítico vital-asociado, encefalitis vital/ meningitis aséptica, y similares.

20 Cualquier método divulgado en la presente puede comprender administrar una cantidad efectiva de una composición o composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo anti-MCP-1 a una célula, tejido, órgano, animal o paciente con necesidad de dicha modulación, tratamiento o terapia. Dicho método puede opcionalmente además al menos uno seleccionado de al menos un antagonista TNF (por ejemplo, pero no limitado a un anticuerpo o fragmento TNF, un receptor o fragmento TNF soluble, proteínas de fusión de los mismos, o un antagonista TNF de moléculas pequeñas), un antirreumático (por ejemplo metotrexato, auranofina, aurotioglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato sódico de oro, sulfato de hidroxycloquina, leflunomida, sulfasalazina), un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano (por ejemplo, aminoglicosido, un antifúngico, un antiparasitario, un antivírico, un carbapenémico, cefalosporina, una fluoroquinolona, un macrólido, una penicilina, una sulfonamida, una tetraciclina, otro antimicrobiano), un antipsoriático, un corticoesteroide, un esteroide metabólico, una gente relacionado con la diabetes, un mineral, un nutricional, un agente tiroideo, una vitamina, una hormona relacionada con el calcio, un antidiarreico, un antitusivo, un antiemético, un antiulceroso, un laxante, un anticoagulante, una eritropoyetina (por ejemplo, epoetina alfa), un filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), un sargramostim (GM-CSF, Leucina), una inmunización, una inmunoglobulina (rituximab), un inmunosupresor (por ejemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), una hormona de crecimiento, un antagonista de la hormona, un antagonista de la hormona reproductivo (flutamida, nilutamida), un modulador de liberación de la hormona (leuprolida, goserelina), un fármaco de sustitución hormonal, un receptor del modulador de estrógeno (tamoxifeno), un retinoide (tretinoína), un inhibidor de la topoisomerasa (etopósido, irinotecán), una citoxina (doxorubicina), un midriático, un ciclopléxico, un agente de alquilación (carboplatino), una mostaza nitrogenada (melphalen, chlorabucil), una nitrosourea (carmustina, estramustine), un antimetabolito (metotrexato, citarabina, fluorouracilo), un inhibidor mitótico (vincristina, taxol), un radiofármaco (Iodine131-tositumomab), un radiosensibilizador (misonidazol, tirapazamina), un antidepresivo, agente antimaniaco, un antipsicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un simpaticomimético, un estimulante, donepezil, tacrina, un medicamento para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrienos, una metilxantina, un cromolín, una epinefrina o análogo, dornasa alfa (Pulmozyme), una citoquina (interferón alfa-2, IL-2) o un antagonista de citoquina (infliximab). Las dosificaciones adecuadas son bien conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Wells y otros, eds., Pharmacotherapy Handbook, 2ª Edición, Appleton y Lange, Stamford, CT (2000) ; PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edición, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000).

50 Las combinaciones particulares para el tratamiento de enfermedades neoplásicas comprenden la co-administración o terapia de combinación administrando, antes concurrentemente, y/o después, un agente antineoplásico como un agente alquilante, una mostaza de nitrógeno, una nitrosourea, un antibiótico, un antimetabolito, un agonista o antagonista hormonal, un inmunomodulador, y similares. Para el uso en melanoma metastásico y otras enfermedades neoplásicas, una combinación preferida es co-administrar el anticuerpo con dacarbazina, interferón alfa, interleucina-2, temozolomida, cisplatino, vinblastina, mesilato de Imatinib, carmustina, paclitaxel y similares. Para el melanoma metastásico, se prefiere la dacarbazina.

11. Dosificaciones y Métodos de Administración

60 Un método divulgado en la presente puede comprender un método para tratar trastornos mediados por hMCP-1, comprendiendo administrar una cantidad efectiva de una composición o composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo anti-MCP-1 a una célula, tejido, órgano o paciente con necesidad de dicha modulación, tratamiento o terapia. Dicho método puede opcionalmente además comprender la coadministración o terapia de combinación para tratar tales enfermedades o trastornos, en donde la administración de dicho al menos un anticuerpo anti-MCP-1, porción o variante especificada del mismo, comprende además administrar, antes concurrentemente, y/o después, al menos uno seleccionado de un fármaco renal, un fármaco dermatológico, un

fármaco antiangiogénico, un fármaco anti-infeccioso, un fármaco para el sistema cardiovascular (CV), un fármaco para el sistema nervioso central (CNS), un fármaco para el sistema nervioso autónomo (ANS), un fármaco del tracto respiratorio, un fármaco del tracto gastrointestinal (GI), un fármaco hormonal, un fármaco para el equilibrio de fluidos o electrolítico, un fármaco hematológico, una antineoplásico, un fármaco inmunomodulador, un fármaco oftálmico, 5 ótico o nasal, un fármaco tópico, un fármaco nutricional o similares, al menos uno de antagonista TNF (por ejemplo, pero no limitado a, anticuerpo o fragmento TNF, un receptor o fragmento TNF soluble, proteínas de fusión del mismo, o un antagonista TNF de moléculas pequeñas), un antirreumático (por ejemplo, metotrexato, auranofina, aurotioglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato de sodio de oro, sulfato de hidroxycloquinina, leflunomida, sulfasalazina), un relajante muscular, un narcótico, un fármaco anti-inflamatorio no esteroide (NSAID), un analgésico, 10 un anestésico, un sedante, un anestésico locales, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano (por ejemplo, aminoglucósido, un antifúngico, un antiparasitario, un antiviral, un carbapenem, cefalosporina, una fluorquinolona, un macrólido, una penicilina, una sulfonamida, una tetraciclina, otro antimicrobiano), un antipsoriásico, un corticosteroide, un esteroide anabólico, un agente relacionado con la diabetes, un mineral, un nutricional, un agente tiroideo, una vitamina, una hormona relacionada con calcio, un antiarreico, un antitusivo, un antiemético, 15 un antiulceroso, un laxante, un anticoagulante, una eritropoyetina (por ejemplo, la epoetina alfa), un filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), un sargramostim (GM-CSF, Leukine), una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor (por ejemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), una hormona de crecimiento, un fármaco de sustitución hormonal, un modulador del receptor de estrógeno, un midriático, un ciclopléjico, un agente alquilante, un antimetabolito, un inhibidor de mitótico, un radiofármaco, un antidepresivo, un agente antimaníaco, un antipsicótico, 20 un ansiolítico, un hipnótico, un simpaticomimético, un estimulante, donepezilo, tacrina, un medicamento para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrienos, una metilxantina, un cromolín, una epinefrina o análogo, dornasa alfa (Pulmozyme), una citoquina o un antagonista de citoquina. Dichos fármacos son bien conocidos en la técnica, incluyendo formulaciones, indicaciones, dosificación y administración para cada uno de los presentados en la presente (ver por ejemplo, Nursing 2001 Handbook of Drugs, 21ª edición, Springhouse Corp., 25 Springhouse, PA, 2001; Health Professional's Drug Guide 2001, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ; Pharmacotherapy Handbook, Wells y otros, ed., Appleton & Lange, Stamford, CT).

Típicamente, el tratamiento de condiciones patológicas se efectúa administrando una cantidad o dosificación efectiva de al menos una composición de anticuerpos anti-MCP-1 que en total, de media, un intervalo de 30 al menos alrededor de 0,01 a 500 miligramos de al menos un anticuerpo anti-MCP-1 por kilogramo del paciente por dosis, y preferiblemente de al menos alrededor de 0,1 a 100 miligramos de anticuerpo/kilogramo del paciente por administración única o múltiple, dependiendo de la actividad específica de lo contenido en la composición. Alternativamente, la concentración de suero efectiva puede comprender de 0,1-5000 µg/ml de concentración de suero por administración única o múltiple. Las dosificaciones adecuadas son conocidas por los practicantes médicos 35 y dependerán, por supuesto, del estado de la enfermedad particular, actividad específica de la composición que se está administrando, y el paciente particular bajo tratamiento. En algunas situaciones, para conseguir la cantidad terapéutica deseada, puede ser necesario proporcionar administración repetida, es decir, administraciones individuales repetidas de una dosis monitorizada o medida particular, donde las administraciones individuales se repiten hasta que se consigue la dosis o efecto diario deseado.

Las dosis preferidas pueden incluir opcionalmente 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y/o 100- 45 500 mg/kg/administración, o cualquier intervalo, valor o fracción de los mismos, para conseguir una concentración de suero de 0.1, 0.5, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.5, 1.9, 2.0, 2.5, 2.9, 3.0, 3.5, 3.9, 4.0, 4.5, 4.9, 5.0, 5.5, 5.9, 6.0, 6.5, 6.9, 7.0, 7.5, 7.9, 8.0, 8.5, 8.9, 9.0, 9.5, 9.9, 10, 10.5, 10.9, 11, 11.5, 11.9, 20, 12.5, 12.9, 13.0, 13.5, 13.9, 14.0, 14.5, 4.9, 5.0, 5.5, 5.9, 6.0, 6.5, 6.9, 7.0, 7.5, 7.9, 8.0, 8.5, 8.9, 9.0, 9.5, 9.9, 10, 10.5, 10.9, 11, 11.5, 11.9, 12, 12.5, 12.9, 13.0, 13.5, 13.9, 14, 14.5, 15, 15.5, 15.9, 16, 16.5, 16.9, 17, 17.5, 17.9, 18, 18.5, 18.9, 19, 19.5, 19.9, 20, 20.5, 20.9, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 50 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, y/o 5000 µg/ml de concentración de suero por administración única o múltiple, o cualquier intervalo, valor, o fracción de los mismos.

Alternativamente, la dosificación administrada puede variar dependiendo de los factores conocidos, como 55 las características farmacodinámicas del agente particular, y su modo o vía de administración, edad, salud, y peso del recipiente; naturaleza y extensión de los síntomas, tipo de tratamiento concurrente, frecuencia del tratamiento, y el efecto deseado. Habitualmente una dosificación de ingrediente activo puede ser de alrededor de 0,1 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal. Ordinariamente de 0,1 a 50, y preferiblemente de 0,1 a 10 miligramos por kilogramo por administración o en forma de liberación sostenida son efectivos para obtener los resultados 60 deseados.

Como un ejemplo no limitativo, el tratamiento de humanos o animales se puede proporcionar como una dosificación de una vez o periódica de al menos un anticuerpo de la presente invención de 0,1 a 100 mg/kg, como 65 0.5, 0.9, 1.0, 1.1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100 mg/kg, por día, en al menos uno del día 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, ó 40, o

alternativamente o adicionalmente, al menos una de la semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, ó 52, o alternativamente o adicionalmente, al menos uno de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ó 20 años, o cualquier combinación de los mismos, usando dosis únicas, de infusión o repetidas.

Las formas de dosificación (composición) adecuadas para la administración interna generalmente contienen de alrededor de 0,0001 miligramos a alrededor de 500 miligramos de ingrediente activo por unidad o contenedor. En estas composiciones farmacéuticas el ingrediente activo estará presente ordinariamente en una cantidad de alrededor del 0,5-99,999% por peso en base al peso total de la composición.

Para la administración parenteral, el anticuerpo puede ser formulado como una solución, suspensión, emulsión, partícula, polvo, o polvo liofilizado en asociación, o proporcionado de forma separada, con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de dichos vehículos son agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, y albúmina de suero humana al 1-10%. También se pueden usar liposomas y vehículos no acuosos como aceites fijos. el vehículo o polvo liofilizado puede contener aditivos que mantienen la isotonicidad (por ejemplo, cloruro sódico, manitol) y la estabilidad química (por ejemplo, reguladores y conservantes). La formulación se esteriliza por técnicas conocidas o adecuadas. Los portadores farmacéuticamente aceptables se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, un texto de referencia estándar en este campo.

Administración Alternativa. Se pueden usar muchos modos conocidos y desarrollados para administrar cantidades farmacéuticamente efectivas de al menos un anticuerpo anti-MCP-1 de acuerdo con la presente invención. Mientras que la administración pulmonar se usa en la siguiente descripción, pueden ser usados otros modos de administración con resultados adecuados. Los anticuerpos anti-MCP-1 de la presente invención pueden ser entregados en un portador, como una solución, emulsión, coloide, o suspensión, o como un polvo seco, usando cualquiera de una variedad de dispositivos y métodos adecuados para la administración por inhalación u otros modos descritos en la presente conocidos en la técnica.

Formulaciones Parentales y Administración. Las formulaciones para la administración parenteral pueden contener como excipientes comunes agua estéril o solución salina, polialquilenglicoles como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados y similares. Las suspensiones acuosas o aceitosas para inyección pueden ser preparadas usando un emulsionante o humidificante apropiado y un agente de suspensión, de acuerdo con métodos conocidos. Los agentes para inyección pueden ser un agente diluyente administrable de forma no oral, no tóxico como solución acuosa o una solución o suspensión inyectable estéril en un solvente. Como el vehículo o solvente utilizable se permiten agua, solución de Ringer, solución salina isotónica, etc.; como solvente ordinario o solvente de suspensión, se puede usar aceite no volátil estéril. Para estos propósitos, se puede usar cualquier tipo de aceite no volátil y ácido graso, incluyendo aceites grasos o ácidos grasos naturales o sintéticos o semisintéticos; mono- o di- o tri- glicéridos naturales o sintéticos o semisintéticos. La administración parenteral se conoce en la técnica e incluye, pero no está limitada a, medios convencionales de inyecciones, un dispositivo de inyección sin aguja presionado por gas, o dispositivo perforante por laser, como es bien conocido en la técnica (por ejemplo, pero no limitado a, materiales y métodos divulgados en la Patente U.S. N° 5.851.198 y Patente U.S. N° 5.839.446).

Entrega Alternativa. En la presente se divulga la administración de al menos un anticuerpo anti-MCP-1 por medios parenterales, subcutáneos, intramusculares, intravenosos, intraarticulares, intrabronquiales, intraabdominales, intracapsulares, intracartilagosos, intracavitarios, intraceliales, intracelebrales, intracerebroventriculares, intracólicos, intracervicales, intragástricos, intrahepáticos, intramiocárdiacos, intraóseos, intrapélvicos, intrapericardiacos, intraperitoneales, intrapleurales, intraprostáticos, intrapulmonares, intrarrectales, intrarrenales, intrarretinales, intraespinales, intrasinoviales, intratorácicos, intrauterinos, intravesicales, intralesionales, bolo, vaginales, medios rectales, bucales, sublinguales, intranasales, o transdérmicos. Al menos una composición de anticuerpos anti-MCP-1 puede ser preparada para el uso para administración parenteral (subcutánea, intramuscular o intravenosa) o cualquier otra administración particularmente en la forma de soluciones o suspensiones líquidas; para el uso en administración vaginal o rectal particularmente en formas semisólidas como, pero no limitado a, cremas y supositorios; para administración bucal o sublingual tales como, pero no limitado a, en forma de comprimidos o cápsulas; o intranasalmente como, pero ni limitado a, en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles o ciertos agentes; o transdérmicamente como, pero no limitado a, un gel, pomada, loción, suspensión o sistema de entrega por parches con potenciadores químicos como sulfóxido de dimetilo para o modificar la estructura de la piel o para mejorar la concentración del fármaco en el parche transdérmico (Junginger, y otros, en "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S., Eds., pp. 59- 90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994), o con agentes oxidantes que permiten la aplicación de formulaciones que contienen proteínas y péptidos en la piel (WO 98/53847), o aplicaciones de campos eléctricos para crear vías de transporte transitorias como electroporación, o para aumentar la movilidad de los fármacos cargados a través de la piel como iontoforesis, o la aplicación de ultrasonidos como la sonoforesis (Patentes U.S. N° 4.309.989 y 4.767.402).

Administración Pulmonar/Nasal. Para la administración pulmonar, se administra preferiblemente al menos una composición de anticuerpos anti-MCP-1 en un tamaño de partícula efectivo para alcanzar las vías respiratorias inferiores del pulmón o senos. como se divulga en la presente, al menos un anticuerpo anti-MCP-1 se

5 puede administrar por una variedad de dispositivos nasales o de inhalación conocidos en la técnica para la administración de un agente terapéutico por inhalación. Estos dispositivos capaces de depositar formulaciones en forma de aerosol en la cavidad sinusal o alveolos de un paciente incluyen inhaladores de dosis medidas, nebulizadores, generadores de polvo seco, pulverizadores, y similares. También son conocidos en la técnica otros dispositivos adecuados para dirigir la administración nasal o pulmonar de anticuerpos. Todos esos dispositivos pueden usar formulaciones adecuadas para la administración para el dispensación de anticuerpos en un aerosol. Tales aerosoles pueden estar compuestos o de soluciones (tanto acuosas como no acuosas) o partículas sólidas. Los inhaladores de dosis medidas como el inhalador de dosis medida Ventolin®, típicamente usan un gas propulsor y requieren accionamiento durante la inspiración (ver, por ejemplo, WO 94/16970, WO 98/35888). Los inhaladores de polvo seco como Turbuhaler™ (Astra) , Rotahaler® (Glaxo) , Diskus® (Glaxo) , inhalador Spiros™ (Dura), dispositivos comercializados por Inhale Therapeutics, y el inhalador de polvos Spinhalers® (Fisons), usan accionamiento por respiración de un polvo mezclado (US 4668218 Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552 Dura, US 5458135 Inhale, WO 94/06498 Fisons). Los nebulizadores como AERx™ Aradigm, el nebulizador Ultravent® (Mallinckrodt), y el nebulizador Acorn II® (Marquest Medical Products) (US 5404871 Aradigm, WO 97/22376), producen aerosoles de soluciones, mientras que los inhaladores de dosis medida, inhaladores de polvo seco, etc. generan aerosoles de partículas pequeñas. Estos ejemplos específicos de dispositivos de inhalación comercialmente disponibles se pretende que sean representativos de dispositivos específicos adecuados para la práctica divulgada en la presente. preferiblemente, una composición que comprende al menos un anticuerpo anti-MCP-1 se administra por un inhalador de polvo seco o un pulverizador. Hay un número de varias características deseables de un dispositivo de inhalación para la administración de al menos un anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, la administración por el dispositivo de inhalación es ventajosamente fiable, reproducible y precisa. El dispositivo de inhalación puede opcionalmente entregar partículas secas pequeñas, por ejemplo de menos de alrededor de 10 µm, preferiblemente de alrededor de 1-5 µm, para una buena respirabilidad.

25 **EJEMPLO 1: GENERACION DE ANTICUERPOS DE MCP-1 ESPECIFICOS PARA LA MCP-1 USANDO PRESENTACION EN FAGOS COMO UN EJEMPLO NO LIMITATIVO**

30 Los solicitantes han mostrado anteriormente las características terapéuticas deseables de un anticuerpo de la MCP-1 anti-humano murino designado C775 y han descrito en la solicitud de patente U.S. co-pendiente de los solicitantes N° Ser. 11/170453 (SEQ ID NO: 7 y 8 de esa aplicación para las regiones variables de la cadena pesada y ligera respectivamente) y presentaciones relacionadas. El objetivo del esfuerzo actual era identificar al menos un anticuerpo humano de la HuCAL GOLD®, que neutraliza la actividad biológica de la MCP-1 de la quimioquina humana y muestra atributos similares. Los atributos del anticuerpo C775, el por lo tanto anticuerpo anti-MCP-1 humano deseado, fueron definidos por los criterios de éxito descritos a continuación.

35 Criterios de Éxito para al Menos un Anticuerpo Terapéutico:

- 40 Enlaza con la MCP-1 humana en formato de fase sólida;
- Especificidad definida como falta de enlace a 100 nM con las proteínas homólogas humana MCP-2, 3, 4 y Eotaxina humana 1, 2 y 3;
- 45 Inhibe el enlace de la MCP-1 humana con su receptor humano CCR2 en las células Thp-1 y el valor de IC50 menor que para el Fab de referencia C775;
- Inhibe la quimiotaxis mediada por la MCP-1 humana de las células THP-1 y el valor de IC50 es menor que para el Fab de referencia C775;
- 50 Inhibe la actividad mediada por la MCP-1 humana en un segundo bioensayo (por ejemplo movilización de Ca²⁺ o internalización del receptor inducido por CCL-2) como un criterio cualitativo sí/no, o con potencia comparable con el Fab de referencia C775 en un ensayo cuantitativo;
- Enlaza con la MCP-1 humana con un K_d<0,5 nM;
- 55 Enlaza con la MCP- de mono cynomolgus un K_D < 20 nM, y preferiblemente < 10 nM;
- Inhibe la bioactividad de la MCP-1 humana sintetizada químicamente y la MCP-1 humana nativa con potencias comparables;
- 60 Mantiene los criterios 1-8 después del rediseño del Fab como una IgG y en base a la forma de IgG de longitud completa del C775 como comparador.

Resumen del Proceso de selección

65 Se realizaron diez barridos diferentes usando HuCAL GOLD® y se cribaron 17856 clones resultando en 1104 resultados primarios. Finalmente se identificaron 26 Fabs únicos que enlazaban con la MCP-1 humana

sintética en ELISA. Fuera de esos, se seleccionaron 7 Fabs diferentes para la maduración por afinidad de acuerdo con la afinidad, bioactividad, especificidad y enlace con la MCP-1 de cynomolgus y nativa humana. Las afinidades de los Fabs parentales estuvieron en el intervalo de 10 a 400 nM y los valores de IC₅₀ en el ensayo de enlace de radio-
ligando fueron de 10 a 600 nM.

5

Materiales y Métodos

Los enzimas de modificación y restricción de ADN así como las polimerasas fueron compradas de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), New England Biolabs (Beverly, MA, USA), Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania) and MBI Fermentas (Vilnius, Lituania). Un conjugado POD específico del fragmento F(ab')₂ de IgG anti-humana de cabra fue suministrado por Jacksons (west Grove, PN, USA), anticuerpo específico del fragmento Fd de IgG anti-humana de oveja por The Binding Site (Birmingham, UK) y conjugado de estreptavidina con fosfatasa alcalina (grado ZyMAX™) por Zymed Laboratories (San Francisco, CA, USA). Quimioquinas humanas recombinantes, hMCP-1, 2, 3, 4 y Eotaxina 1, 2 y 3 (R&D systems(Reactivos, Ligandos y anticuerpos. mAb 279, específica para la MCP-1 humana (R&D systems); hMCP-1 sintética (Bachem); biotina anti hCCR2 de ratón mAb1 (R&D systems); globulina gamma humana (Jackson Immuno Research); globulina gamma de ratón (Jackson Immuno Research); biotina de control del isotipo mIgG2b mAb (R&D systems); estreptavidina-PE (BD Pharmingen); Versene (Invitrogen); PBS (Invitrogen). FCS (PAN); placas de pocillos de fondo en V (Greiner); y placas de pocillos de fondo en U (Nunc).

10

15

20

25

30

35

Preparación de polipéptido de MCP-1 y análogos. Síntesis de péptido en fase sólida paso a paso y purificación por afinidad para proporcionar MCP-1 humana aislada, de longitud completa, madura (76 aminoácidos), y correctamente plegada y opcionalmente modificada y variantes con actividad biológica como se describe en la solicitud U.S. co-pendiente de los solicitantes N° Serie 60/682620 y en Kruszynski y otros 2006, J Peptide Sci. 12:25-32. Las variantes, diseñadas para mostrar topología de superficie nativa y estructura de esqueleto de péptido, incluyen A40S, V41I, y F43Y. La síntesis química también proporcionó un método para la biotinylación específica del sitio de la MCP-1 humana usando el grupo épsilon-amino de la lisina no implicado en el enlace del receptor o la activada de la superficie en K69 y K75 está desordenado en la estructura (U.S. N° de Serie 60/682620 y Kruszynski y otros 2006, J Peptide Sci. 12:354- 360). Se insertó un espaciador hidrofílico de cuatro unidades de etileno (PEG₄) entre la biotina y el grupo ε-amino del residuo de lisina. La longitud de la cadena desde la amida de biotina al carbonilo terminal es de 19.2 Å. El espaciador fue elegido para aumentar la solubilidad y proporcionar suficiente longitud de espaciador para enlazar los conjugados de estreptavidina. La secuencia de la MCP-1 y variantes se da en la SEQ ID NO:1. Las variantes se determinaron para mantener la capacidad de inducir la movilización de Ca²⁺ en células THP-1. Las MCP-1 biotin-Lys⁶⁹ y biotin-Lys⁷⁵ se compararon juntas en el cribado, consolidación y determinación de la afinidad y no se pudieron observar diferencias significativas. Usando Biacore, se analizaron 35 Fabs optimizados en la MCP-1 Ile⁴¹, Lys (biotin-PEG₄)⁶⁹ y la MCP-1 Ile⁴¹ Lys (biotin-PEG₄)⁷⁵ inmovilizadas en fichas de estreptavidina en paralelo. En general las afinidades medidas en la MCP-1 K69 y K75 eran comparables.

40

45

Librería Fab de Fagos. La librería fagémida se basa en el concepto HuCAL® (Knappik y otros, 2000) y emplea la tecnología CysDisplay™ para mostrar el Fab en la superficie del fago (Löhring, 2001). La librería codifica aproximadamente 10¹⁰ Fabs únicos representados en el bacteriófago M13 como fusiones con una proteína de recubrimiento menor, pIII. Para las selecciones los fagos de anticuerpo HuCAL GOLD® se dividieron en tres grupos que comprendían diferentes genes maestros de VH. Además la librería completa se uso en un grupo (VH1-6). Se usaron 2X10 fagos de entrada HuCAL GLOD® para cada barrido. Se aplicaron 4 estrategias de barrido diferentes, incluyendo 3 rondas de barrido en el análogo-1 (V41I, Ile⁴¹) y el análogo-2 (F43Y, Tyr⁴³) de MCP-1 humana respectivamente y dos barridos alternantes en los análogos en el orden 1-21 y 2-1-2.

50

55

60

65

Barrido de fase sólida. Se recubrió directamente una alícuota de 100 µl de análogo-1 (V41I) o análogo-2 (F43Y) de MCP-1 humana en 50 µg/ml en PBS, pH 7.4 en pocillos Maxisorp® (Nalgen Nunc, Rochester, NY) durante la noche a 4° C. Los pocillos recubiertos fueron lavados y bloqueados con un 5% de MPBS (PBS, 5% polvo de leche bajo en grasa). Se añadieron 100 µl de fagos HuCAL GOLD® bloqueados por pocillo durante 2 horas a RT. Después de varios pasos de lavado, los fagos enlazados fueron eluidos con 100 µl 20 mM de DTT en 10 mM de Tris/HCl, pH 8.0 incubado a temperatura ambiente durante 10 minutos. El eluido fue usado para infectar *E.coli* TG1 de fase media (Stratagene, Amsterdam, Países Bajos) y los fagémidos se amplificaron como se ha descrito (Krebs y otros, 2001).

Barrido de Semi-Solución Contra Análogo1 (V41I) y Análogo 2 (F43Y) de MCP-1 humana Resultando en la Neutralización de Moléculas Fab. Se realizó un barrido de semi-solución incubando dos derivados de MCP-1 humana biotinilados, V41I, K69-PEG-biotina o V41I, K75-PEG-biotina (SEQ ID NO: 1) con los fagos HuCAL GOLD® en solución seguido por la captura de los complejos del antígeno del fago a tiras de placa de microtitulación Recubiertas de Poliestireno Neutravidina Reacti-Bind (PERBIO). Para el barrido se bloquearon 1,5 ml de tubos Eppendorf con Chemiblocker (Chemicon International) 1:1 diluido con PBS O/N a 4° C. Al día siguiente se enjuagaron tiras de placa de microtitulación Reacti-Bind™ NeutrAvidin™ (Pierce, Rockford, IL, USA) (capacidad de enlace: 25 pmoles de biotina/pocillo; PERBIO) con 2x300 µl de PBS, necesario para los 2 pasos de pre-adsorción para reducir el número de enlazantes de neutravidina. Se añadieron 2x10¹³ fagos de la librería HuCAL GOLD™ en 100 µl de 50% de Chemiblocker (Chemicon, 0,05% de Tween20 (Sigma) por pocillo y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente agitando suavemente. Para el segundo paso de re-adsorción la solución de fagos se transfirió a nuevas tiras de placa de microtitulación Recubiertas de Poliestireno Neutravidina Reacti-Bind y se incubó

durante 1 hora a temperatura ambiente agitando suavemente. Después los fagos pre-adsorbidos y los antígenos biotinilados (3:1 proporción de biotina a antígeno para la biotinilación; 200 nM de concentración final) se añadieron a los tubos Eppendorf de 1,5 ml pre-bloqueados y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en una rueda giratoria. En paralelo, se enjuagaron a tiras de placa de microtitulación Recubiertas de Poliestireno Neutravidina Reacti-Bind adicionales con 2x300 µl de PBS, bloqueadas con 300 µl de Chemiblocker 1:1 diluidas con PBS durante 1 hora y lavadas con 1x300 µl de PBS. Se pipetearon 100 µl/pocillo del complejo Biotina-antígeno-fago en las tiras de la placa de microtitulación y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente agitando suavemente. Después de varios pasos de lavado, los fagos enlazados se eluyeron con 110 µl 20 mM de DTT en 10 mM de Tris/HCl, pH 8.0 se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. El eluido se usó para infectar *E.coli* TG1 de fase media (Stratagene, Amsterdam, Países Bajos) y los fagémidos se amplificaron como se ha descrito (Krebs y otros, 2001).

Subclonación y Microexpresión de Fragmento Fab Seleccionados. Para facilitar la expresión rápida de Fab soluble, los insertos que codifican Fabs de los fagos HuCAL GOLD® seleccionados se subclonaron por XbaI t EcoRI en el vector de expresión pMORPH®X9_FH. Los fragmentos Fab llevan una etiqueta FLAG™ C-terminal (Prickett y otros, 1989) y como una segunda etiqueta C-terminal la 6x His-tag (Chen y otros, 1994). Después de la transformación del TG1-F la expresión de clon único y la preparación de extractos periplásmicos que contienen fragmentos Fab HuCAL® se realizaron como se ha descrito anteriormente (Rauchenberger y otros, 2003).

El ensayo de enlace de formato de fase sólida en el análogo-1 de MCP-1 humana (V411) se realizó como se ha descrito anteriormente. Después del bloqueo, se añadieron los extractos periplásmicos. La detección de los fragmentos Fab se realizó por incubación con IgG anti-humana de cabra, anticuerpo específico del fragmento F(ab')₂.

El cribado de V411 de hMCP-1 inmovilizado, biotinilado se realizó usando 384placas de pocillo Reacti-Bind™ NeutrAvidin™ (Pierce, Rockford, IL, USA) recubiertas con 20 µl 0,5 µl/ml de análogo 1 de hMCP-1 biotinilado (V411) o análogo-2 (F43Y) diluido en PBS, pH 7.4, durante 16 h a 4° C. Después del bloqueo con un 1% de BSA en TBS, 0,05% de Tween20 (sigma, St. Louis, MO, USA) durante 1 hora a temperatura ambiente, se añadieron los extractos periplásmicos. La detección de los fragmentos Fab se realizó por incubación con IgG anti-humana de cabra, anticuerpo específico del fragmento F(ab')₂.

El cribado de la fase de solución con Análogo-1 de hMCP-1 biotinilado (V411) se realizó recubriendo 384 placas de pocillos Maxisorp (Nunc, Rochester, NY, USA) con 20 µl de IgG anti-humana de oveja, anticuerpo específico del fragmento Fd diluidos 1:1000 en PBS, pH 7.4 durante 16 horas a 4° C. Después del bloqueo con un 3% de BSA en TBS, 0,05% de Tween20 (Sigma, St. Louis, MO, USA) durante 2 horas a temperatura ambiente, se añadieron los extractos periplásmicos. Posteriormente se permitió que los fragmentos Fab HuCAL® capturados enlazasen con 0,2 µg/ml de análogo-1 de hMCP-1 biotinilado (V411) en TBS, que fue detectado por incubación con estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina seguido por la adición de sustrato de fluorescencia AttoPhos (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). La emisión de fluorescencia a 535 nm se registró con excitación a 430 nm.

40 Ensayos de Bioactividad

Cultivo celular. Todas las células fueron cultivadas bajo condiciones estandarizadas a 37° C y 5% de CO₂ en una incubadora humidificada. Las células que expresaban el CCR2 fueron cultivadas en medio estándar. Además las células THP-1 (células de leucemia monocítica aguda humana) se cultivaron en RPMI que contenía 2 mM de L-glutamina, 1,5 g/L de bicarbonato sódico, 4,5 g/L de glucosa, 10 mM de HEPES y 1,0 mM de piruvato sódico, 90%; 10% de suero fetal bovino (FBS; Vitacell RPMI 20-2001, ATCC, Manassas, VA) a 37° C y 5% de CO₂ a una densidad de 4-8 x 10⁵ células/mL.

Ensayo de Enlace de Radioligandos. Los ensayos de competición se realizaron en placas de filtro Millipore (Millipore, Bedford, MA). Se incubaron 1x10⁶ THP-1 células/pocillo con ¹²⁵I-MCP-1 (1 ng/mL; Perkin Elmer Life science, Boston, MA) junto con diferentes concentraciones de MCP-1 humana recombinante (rh) (279-MC, R&D Systems, Minneapolis, MN) o proteínas sintéticas. Todos los reactivos fueron diluidos en regulador de enlace que consistía de Medio RPMI 1640 (Invitrogen Corp., Grand Island, NY) y 0,1% de BSA. Se permitió que la competición procediera durante 1 hora a temperatura ambiente y los pocillos fueron lavados 3 veces con 150 µl/pocillo de regulador de lavado (regulador de enlace + 1 M de NaCl). La radioactividad en los filtros se contó usando el Contador Gamma Automático Wallac Wizard 1470 (Perkin Elmer Life Sciences Inc., Boston, MA). Se calcularon los porcentajes de inhibiciones de el enlace de la ¹²⁵I-MCP-1 con el CCR2 por las dosis variantes de cada MCP-1 recombinante o sintética. Los valores de porcentaje de inhibición fueron después importados en el programa Graphpad Prism y se trazaron usando una curva de respuesta a dosis sigmoidea con una inclinación variable y constantes de inferior = 0 y superior = 100.

Ensayo de Movilización de Calcio. El ensayo de movilización de Ca²⁺ se realizó en un formato de 96 pocillos, usando el Kit de Ensayo FLEXstation™ Ca²⁺ Plus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) siguiendo el protocolo del fabricante para células no adherentes y un FLEXstation™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los valores de RFU máximos se importaron en el Graphpad Prism para análisis.

Ensayo FACS de Internalización del Receptor CCR2 Inducido por MCP-1: Después de la optimización de la concentración de ligandos (EC50 de MCP-1 sintética ~100 ng/ml) y el tiempo de incubación (después de 1 hora la mayoría de la internalización había tenido lugar) el IC50 se determinó añadiendo diferentes concentraciones de anticuerpos. Las células que expresaban CCR2 cultivada se lavaron con PBS y se separaron con Versene (Invitrogen) durante alrededor de 10 minutos a 37° C. Todos los pasos de centrifugación de las células fueron a alrededor de 200 Xg. Las células se lavaron dos veces con regulador FACS (PBS/ 3% de FCS), contadas y comprobadas para la viabilidad (azul de tripán). Se llenaron placas de pocillos de inferior en V de 96 (Greiner) con 2,5x10⁵ células en 100 µl por pocillo y se pusieron en hielo. En una placa de pocillos de inferior en U de 96 (Nunc) los anticuerpos se diluyeron en medio de cultivo celular (MEME) para dar alrededor de 200 µg/ml hasta 0,001 µg/ml en muestras triplicadas. Las diferentes concentraciones de los anticuerpos se pre-incubaron con una concentración final de

10 ng/ml de MCP-1 sintética (Bachem) durante a temperatura ambiente. Las células fueron re-suspendidas con la mezcla de 100 µl de MCP-1/anticuerpo pre-incubada y se incubaron durante 1 hora a 37° C en una incubadora para la internalización del receptor. Después de la internalización las células fueron lavadas una vez con 180 µl de regulador FACS frío y las placas tuvieron que ser mantenidas en hielo para todos los pasos posteriores para evitar internalización adicional. Se diluyó mAb anti-hCCR2 de ratón biotilado en 1:10 en regulador FACS. Como control se diluyó también mAb de biotina del isotipo IgG2 de ratón (R&D Systems) 1:10 en regulador FACS. Se añadieron 10 µg/ml de concentración final de una mezcla 1:1 de gamma globulina humana y de ratón (Jackson Immuno Research) a tanto el anti-hCCR2 como al mAb de control para bloquear los receptores Fc. Las células fueron re-suspendidas en 50 µl de mezcla de anti-CCR2/gamma globulina (o mezcla IgG2b/gamma globulina de control) y se incubaron durante 1 hora en hielo. Las células fueron lavadas dos veces con 180 µl de regulador FACS, re-suspendidas en 50 µl 1:400 diluidas con Estreptavidina-PE (BD Pharmingen) e incubadas durante 1 hora a 4° C en hielo a oscuras. Las células fueron lavadas dos veces con 180 µl de regulador FACS, re-suspendidas en 100 µl 2% PFA/PBS y almacenadas durante la noche a 4° C para la fijación (alternativamente es posible la medición directa son fijación PFA). Para la medición FACS las células fueron re-suspendidas con 200 µl de regulador FACS y al menos se contaron 5000 células cada una.

Ensayos de Afinidad

Método de Titulación de la Solución de Equilibrio (SET) para la Determinación de K_D y Estudios de Reactividad Cruzada Usando BioVeris. La determinación de la afinidad en la solución se realizó básicamente como se describe en la bibliografía (Friguet y otros, 1985). Para mejorar la sensibilidad y precisión del método SER, se transfirió del ELISA clásico a tecnología BioVeris basada en ECL (Haenel y otros, 2005, aceptada para publicación en *Analytical Biochemistry*. Se etiquetaron 1mg/ml de anticuerpos específicos del fragmento Fc (Jackson Immuno Research), IgG (Fab)₂ anti-humana de cabra o anti-ratón de cabra con NHS-éster BV-tag™ (Bioveris Europe, Witney, Oxfordshire, UK) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los experimentos se llevaron a cabo en placas de microtitulación de polipropileno y PBS pH 7.4 con 0,5% de BSA y 0,02% de Tween 20 como regulador del ensayo. Se diluyó antígeno sin etiquetar en serie 4ⁿ: Para MCP-1 humana y cyno se eligió un intervalo de concentración de 10 pM a 40 nM y para los controles de reactividad cruzada (eotaxina y MCP-2) un intervalo de concentración de 40 pM a 160 nM. Se usaron los pocillos sin antígeno para determinar los valores S_{max}. Después de la adición de 100 pM de Fab o IgG (concentración final en 75 µL de volumen final), la mezcla se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se recubrió una mezcla de 25 µl de Dynabeads (0,4 mg/ml M-280 Estreptavidina, DYNAL, Hamburgo) con 0,25 µg/ml de MCP-1 biotilada (K69) y se añadió por pocillo anticuerpo de detección etiquetado BV-tag en una dilución final de 1:4000 para el Fab antihumano o 1:2000 para la IgG anti-ratón. Después de incubación durante 30 minutos en un agitador Eppendorf (700 rpm) a temperatura ambiente, se detectaron señales de electroquimioluminiscencia usando la Estación de Trabajo M-384 SERIES® (Bioveris Europe). Los datos se evaluaron con el software Origin 5.0 (Microcal) aplicando modelos de ajuste personalizados (para Fab: Haenel y otros, 2005, aceptado para publicación en *Analytical Biochemistry*, para IgG: de acuerdo con Piehler y otros, 1997).

Determinación de K_D con Biacore en Antígeno Directamente Recubierto. Las constantes cinéticas k_{on} y k_{off} se determinaron con diluciones en serie de los Fab respectivos enlazando directamente con MCP-1 inmovilizadas covalentemente usando el instrumento BIAcore 3000 (Biacore, Uppsala, Suecia). Para la inmovilización del antígeno covalente se usó química de acoplamiento de amina EDC-NHS estándar. Las mediciones cinéticas se realizaron en PBS (136 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10mM de Na₂HPO₄, 1,76 mM de KH₂PO₄ pH 7.4) a un caudal de 20 µl/min usando un intervalo de concentración de Fab de 1,5-500 nM. El tiempo de inyección para cada concentración fue de 1 minuto, seguido por una fase de disociación de 3 minutos. Para la regeneración se usaron 5 µl 10 mM de HCl. Todos los sensogramas fueron ajustados usando el software de evaluación BIA 3.1 (Biacore). Determinación de la K_D por Biacore en MCP-1 Biotina-K69 Humana y MCP-1 Cyno. La MCP-1 humana Biotina-K69 y la MCP-1 cyno biotilada se recubrieron a superficie de ficha de estreptavidina y la MCP-1 cyno se recubrió directamente a fichas CM5. El enlace de los Fabs se probó usando métodos estándar.

Determinación de K_D por Biacore en el Modo de Captura de Anticuerpos. Los Fabs fueron capturados a 500 nM con anti-hFab (s.3.15) en una ficha CM5 (caudal 5µl/min), se inyectó la solución de cada análogo (MCP1, 2, 3, 4 y Eotaxina, Eotaxina-2 y -3). Todas las citocinas estaban libres de portadores y se usaron en un intervalo de

concentración de 15 a 500 nM (para Fabs parentales antes de la optimización) como un analito para la determinación de la Afinidad. Los sensogramas se analizaron usando el software BIAevaluation. La determinación de afinidad por Biacore para la MCP-1 en el modo de captura de anticuerpos no fue posible para los enlazantes optimizados porque se alcanzaron los límites de detección del Biacore.

Para el análisis de especificidad de los Fabs, se usó resonancia de plasmones de superficie (Biacore 3000, Uppsala, Suecia) usando el ensayo de captura. Los Fabs fueron capturados y las varias proteínas (MCP-2, -3, -4 y Eotaxina-1, -2 y -3) se usaron como analitos. Las fichas CM5 (Biacore, Suecia) fueron recubiertas con 6500-8000 RU anti-F(ab)₂ (Dianova, IgG anti-humana de cabra fragmento F(ab)₂ Affipure, fragmento específico F(ab)₂, 10 mM regulador de acetato, pH 4.5) en las 4 células de flujo, usando química de acoplamiento de aminos EDC-NHS estándar. Las células de flujo 2-4 se capturaron con Fabs anti-MCP-1 específicas (20 µl de 500 nM de Fab a un caudal de 10 µl/ml, resultaron en una densidad de captura de 300-400RU). Después de la captura de los Fabs se inyectaron las quimiocinas (20 µl, caudal 20 µl/min, PBS pH 7.4) a una concentración de 100 nM. Las quimiocinas fueron almacenadas en alícuotas pequeñas y sólo se usó material recién descongelado con 1 ciclo máximo de congelado descongelado para las mediciones. Para evitar una combinación de constantes de disociación suscitadas por la constante de disociación de la MCP-1, la interacción específica del Fab y al interacción anti-Fab/Fab, es inyectó regulador, para determinar la disociación de la interacción anti- Fab/Fab. El sensograma de regulador obtenido se sustrajo del específico. Las unidades de respuesta se normalizaron a la cantidad de anticuerpos capturados en la superficie.

Enlace de la MCP-1 Nativa en el Modo de Captura de Anticuerpos. El método se usó como se ha descrito anteriormente. La MCP-1 Nativa se purificó del sobrenadante PANC1 y se usó para análisis de enlace. El enlace la MCP-1 nativa en el modo de captura Fab estuvo muy por encima del límite de detección, sin embargo, una medición de afinidad verdadera no fue posible debido a las impurezas en el extracto que oscurecían la concentración correcta de la MCP-1 nativa.

Conversión a IgG

Para expresar la IgG de longitud completa, se subclonaron fragmentos del dominio variable de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL) de los vectores de expresión Fab en vectores pMorph_hlg apropiados para la IgG1 humana, IgG4 humana, IgG1 humana/de ratón quimérica y la IgG2a. Se usaron los enzimas de restricción *EcoRI*, *MfeI*, *BspI* para la subclonación del fragmento del dominio de la VH en pMorph_hlgG1.1, pMorph_hlgG4.1, pMorph_mlgG1.1 o pMorph_mlgG2a.1 y *EcoRV*, *BsWI* para la subclonación del dominio de la VL en vectores de pMorph_hlgk_1, pMorph_hlgλ_1, pMorph_mlgk_1 o pMorph_mlgλ_1 respectivamente. Los constructos de IgG resultantes se expresaron en CNTO.

Resultados

El barrido de fase sólida se realizó en hMCP-1 (411) y hMCP-1 (43Y) recubierto directamente a placas Maxisorp. Se aplicaron cuatro estrategias de barrido diferentes, conteniendo cada una tres rondas de selección. Después de la sub-clonación en el vector de expresión pMORPHx9_Fab_FH se realizó el cribado de la fase sólida en hMCP-1 (411) directamente recubierta y en hMCP-1 biotinilada. En total se analizaron 8832 clones en el cribado primario y se obtuvieron 983 resultados primarios. Finalmente se identificaron 5 Fabs únicos, pero los 5 Fabs no neutralizaron la MCP-1 en ensayos celulares, indicando que el recubrimiento directo a Maxisorp podría impedir la conformación o al menos la accesibilidad de los epítopos neutralizantes.

Se realizó un barrido de semi-solución incubando el análogo-1 (V411) y el análogo 2 (F43Y) de MCP-1 humana biotinilada con los fagos HuCAL GOLD® en solución seguido por la captura de los complejos del antígeno del fago como se ha descrito. Se aplicaron dos estrategias de barrido principales diferentes incluyendo 3 rondas de barrido en análogo-1 (V411) y análogo-2 (F43Y) de proteína MCP-1 humana biotinilada respectivamente (no barrido alterno). En total se analizaron 9024 clones en el cribado primario y se obtuvieron 121 resultados primarios, revelando finalmente 18 enlazantes únicos. Un re-cribado basado en Luminex de 192 clones del barrido en el análogo-1 (V411) de proteína MCP-1 humana biotinilada llevo a 9 resultados primarios adicionales y 3 enlazantes únicos adicionales, mostrando que el cribado Luminex es un método de cribado alternativo adecuado para el cribado de captura. En total se identificaron 21 enlazantes únicos del barrido de semi-solución y 14 de estos enlazantes mostraron actividad neutralizantes. Todos los Fabs neutralizantes del HuCAL GOLD® se derivaron de este barrido.

Caracterización de los Fabs HuCAL GOLD®. Los Fabs únicos se expresaron y purificaron para caracterización adicional. La afinidad de enlace con hMCP-1 se determinó por BIAcore y los Fabs se caracterizaron en los siguientes ensayos: 1) inhibición del enlace de ¹²⁵I-CCL-2 con células Thp-1 y 2) inhibición de la movilización de Ca²⁺ inducida por hMCP-2 en células Thp-1. Los Fabs que demostraron actividad de neutralización en los ensayos basados en células se probaron además para 1) enlace con la hMCP-2 de cynomolgous sintética; 2) enlace con la familia de hMCP-2 relacionada con quimiocinas humanas para la especificidad de enlace (es decir, MCP-2, 3, 4 y Eotaxina 1, 2, 3); y 3) enlace con la hMCP-2 humana nativa para asegurar que los fabs seleccionados usando el péptido de hMCP-2 sintética, reconocen la hMCP-2 nativa. Se eligieron siete Fabs con las propiedades más óptimas para maduración de la afinidad adicional. Las propiedades de los Fabs seleccionados para la

5 maduración de la afinidad se resumen en la Tabla 2. Los siete Fabs que fueron seleccionados para la maduración de la afinidad se asignaron a 3 grupos para la clonación y selección de la biblioteca. La optimización de la L-CDR3 y H-CDR2 se realizó en paralelo. La optimización en paralelo de las cadenas variables ligera y pesada creó el potencial para combinar cadena pesada y ligera a través de clonación cruzada para generar incluso anticuerpos mejorados adicionales.

Tabla 2. Un resumen de los candidatos Fab seleccionados para la maduración de la afinidad

Designación Fab	Grupo	Kd MCP-1 (nM)	Enlace de Radio-ligando IC ₅₀ (nM)	Movilización de Ca ²⁺ IC ₅₀ (nM)	Especificidad	Kd Cyno [nM]	Enlace de MCP-1 Nativa	Grupo de secuencia Hc Lc
MOR 03336	1	60 ± 33	114	526	MCP-1	170 ± 42	Sí	VH3 / VL - λ3
MOR 03464	1	75 +/- 50	105	1340	MCP-1, 2	175 ± 49	sí	VH3 / VL - λ3
MOR 03468	1	ND	255	2000	MCP-1	550 ± 14	ND	VH1B / VL - λ3
MOR 03470	1	46 +/-1	645	2100	MCP1	145 ± 92	sí	VH1B / VL - λ3
MOR 03471	2	94+/-6	180	1256	MCP-1	465 ± 106	sí	VH1A / VL - κ3
MOR 03473	2	175+/-20	184	2900	MCP-1	478 ± 95	sí	VH1A / VL - κ3
MOR 03548	3	42	11	124	MCP-1, Eo	54 ± 8	sí	VH3 / VL - λ3

EJEMPLO 2: EVALUACION DE AFINIDAD ALTA, ANTICUERPO ESPECIFICOS DE MCP-1 DE FABS

40 Como se ha indicado, la selección de candidatos para la maduración de la afinidad se realizó en candidatos en el formato Fab libre. Los criterios de selección fueron: actividad en el ensayo de enlace de radio-ligandos, actividad en el ensayo de movilización de Ca²⁺, afinidad con la MCP-1 humana medida por Biacore, especificidad con la MCP-1 humana, especificidad con la MCP-1 de cyno, y enlace con la MCP-1 nativa detectado en Biacore. Los criterios adicionales para la agrupación de los Fabs parentales fueron la competición de C775 en ELISA y se basaron en la familia marco de la cadena pesada y ligera variable. La caracterización de los candidatos para maduración como IgG, especialmente en el ensayo de quimiotaxis, se realizó en paralelo con el proceso de selección para maduración.

45 Los siete Fabs seleccionados para la maduración cayeron en 3 clases de secuencia diferentes. En una clase (Grupo 1, Tabla 2), los Fabs 03336, 03464, 03468 y 03470 tenían marcos de la cadena ligera de VL3 con uno de dos marcos de la cadena pesada diferentes. Los Fabs 03336 y 03464 tenían marcos de la cadena pesada de VH3 y los Fabs 03468 y 03470 tenían marcos de la cadena pesada de VH1B. La segunda clase de Fabs (Grupo 2, Tabla 2), 03471 y 03473, tenían marcos de la cadena pesada de VH1A y marcos de la cadena ligera de VK3. El Fab 03548 tenía los mismos marcos de las cadenas pesada y ligera como los dos Fabs de la primera clase (VH3, VL3) pero se mantuvo de forma separada (Grupo 3, Tabla 2) ya que tenía actividad biológica excepcionalmente potente y reactividad cruzada de enlace con la Eotaxina. Para una descripción completa de la clasificación de la secuencia de la región variable usada aquí ver la Patente US N° 6828422. El objetivo de la última maduración fue mejorar la afinidad del 03548 para el CCL-2 mientras se aumentaba la especificidad.

60 Antes de la maduración, sólo se determinó el enlace pero no la afinidad con la MCP-1 humana nativa y de cynomolgus en el modo de captura Fab de Biacore. Los 7 Fabs parentales mostraron enlace tanto con la MCP-1 nativa como la de cyno-, que era un prerrequisito para la maduración.

65 Especificidad de Enlace las IgGs Parentales. Después de la conversión de todas los Fabs parentales a IgG1, los estudios de reactividad cruzada se repitieron para las formas de IgG. La Eotaxina 3 enlazó de forma no específica con la superficie de dextrano en las fichas del sensor y este enlace no específico pudo ser vencido añadiendo carboxil metil dextrano. Como era también posible el enlace no específico con la superficie de dextrano

de otras quimiocinas, se añadió carboxil metil dextrano en todos los ensayos de especificidad Biacore. Al contrario que los Fabs, dos de las IgGs no mostraron enlace significativo con la MCP-1 humana, de forma interesante los 4 enlazantes finales que cumplieron todos los criterios de éxito provenían de un Fab parenteral.

5 La señal de enlace de la MCP-1 (unidades de respuesta) se normalizó por la cantidad de anticuerpo capturado en la superficie: Tasa de enlace molar = (RU del enlace del antígeno/MW del antígeno) X (MW del MAB/RU del mAb capturado en la superficie) y se esperó que una proporción de enlace molar menor de 0,5 no fuese significativa. Cuatro de las IgGs mostraron proporción de enlace normalizada con la MCP-1 >0,5 y todas las quimiocinas homólogas <0,5 y fueron por lo tanto designadas específicas en el nivel de IgG. Una IgG también
10 mostró algún enlace con la MCP-2 y la Eotaxina, que fue ya detectada en el nivel de Fab, pero esta reactividad cruzada se redujo en el nivel de IgG. Los Datos de la MOR03468 IgG no se muestran.

15 Inhibición de del Enlace de la 125 I-MCP-1 con Células THP-1 (CNTO). Se probó primero el neutralizar la actividad de los enlazantes parentales en el formato IgG1 en el ensayo de enlace de radio-ligandos. Después del bloqueo de los receptores de Fc en las células THP-1 por la adición de IgG1 humana no relacionada, la inhibición del enlace de la MCP-1 fue detectable para todas las IgGs parentales. Cuatro IgGs mostraron inhibición de la MCP-1 humana radio-etiquetada con las células THP-1 con valores de IC_{50} en el intervalo de la IgG de referencia C775.

20 Inhibición de la Movilización del Calcio (CNTO). Todas las IgGs parentales inhibieron la movilización de calcio inducida por MCP-1 en las células THP-1. Cuatro IgGs mostraron inhibición de la movilización del calcio inducida por MCP-1 a una concentración de anticuerpos más alta en comparación con la IgG de referencia C775.

25 Inhibición de la Quimiotaxis inducida por MCP-1 (CNTO). Como los Fabs parentales no pudieron ser probados en el ensayo de quimiotaxis, la inhibición de la quimiotaxis inducida por MCP-1 se probó en el formato de IgG. Todas las IgGs parentales probadas fueron activas en el ensayo de quimiotaxis, y cuatro IgGs mostraron inhibición de la quimiotaxis inducida por MCP-1 a concentraciones de anticuerpos más altas en comparación con la IgG de referencia C775.

30 EJEMPLO 3: MADURACION DE LA AFINIDAD DE FAB SELECCIONADOS POR INTERCAMBIO PARALELO DE CASSETES L-CDR3/H-CDR2

Resumen del Proceso de Maduración de la Afinidad

35 En la primera ronda de maduración se realizaron la optimización de la L-CDR3 y la optimización de la H-CDR2 en paralelo. El ADN de cada clase de Fabs se agrupó para la construcción de la biblioteca de maduración. Las secuencias de la cadena pesada de la CDR2 y la cadena ligera de la CDR3 originales se reemplazaron por secuencias aleatorias por cada grupo de ADN resultante en las 6 nuevas bibliotecas. 3 bibliotecas de H-CDR2 aleatorias y 3 de L-CDR aleatorias. La diversidad de cada una de las 6 bibliotecas fue mayor que 10^8 Fabs únicos. el péptido CCL-2 411-biotina-K69 sintético se usó o para el barrido de solución o para el barrido del biotina-péptido
40 capturado en los pocillos de plástico recubiertos de neutravidina. Cada una de las 6 bibliotecas fue barrida bajo varias condiciones para enriquecer de Fabs con constantes de disociación lentas (es decir, lavado prolongado, concentración de antígeno reducida). Se realizaron 36 barridos paralelos incluyendo barrido de solución y de semi-solución. La reducción de la concentración de antígeno, la selección de la tasa de disociación y el lavado prolongado resultó en condiciones de barrido rigurosas. El cribado de afinidad se realizó con la ayuda de la plataforma basada
45 en electroquimioluminiscencia (ECL) Bioveris (anteriormente IGEN), permitiendo un alto rendimiento en la valoración e identificación de la afinidad de las moléculas Fab con afinidad mejorada.

50 Bibliotecas para la Maduración de la Afinidad. Como las bibliotecas de la H-CDR-2 de la cadena pesada de H1A y H1B fueron clonadas de forma separada, se clonaron 7 bibliotecas de la región variable diferentes. Las dos bibliotecas de H1A y H1b fueron después agrupadas antes de la selección, dando 6b bibliotecas de selección. Los tamaños de las bibliotecas variaron de 10^8 a 8×10^9 . Toda la diversidad teórica se cubrió para todas las bibliotecas excepto la biblioteca MOR03548 λ 3 L-CDR3, donde aún se cubrió 0,625x de la diversidad teórica. El control de calidad de las bibliotecas se realizó por secuenciación de clones recogidos aleatoriamente. 71 de 75 (95%) de las secuencias fueron correctas y diversas, mientras que para 4 de las 75 secuencias se detectaron cambios de marco.
55 Los derivados de todos los Fabs parentales se encontraron en sus bibliotecas respectivas.

60 Para aumentar la afinidad y la actividad biológica de los fragmentos de anticuerpos seleccionados las regiones L-CDR3 y H-CDR2 fueron optimizadas en paralelo por mutagénesis de casete usando mutagénesis dirigida al trinucleótido (Virnekäs y otros, 1994), mientras que las regiones marcos se mantuvieron constantes. Antes de la clonación por maduración de la afinidad, todos los fragmentos de Fab parentales se transfirieron al vector de expresión correspondiente (pMORPH@X9_FH) en el vector CysDisplay™ pMORPH@25_LHC vía *Xba*I/ *Eco*R1. El pMORPH@25_LHC se creó del vector de presentación HuCAL GOLD® pMORPH@23_LHC por la eliminación de un sitio BssHII interfiriendo con la clonación de la biblioteca para la optimización de la H-CDR2. Para optimizar la L-CDR2 de un grupo de fragmentos de Fab parentales se eliminaron la L-CDR3, el marco 4 y la región constante de las cadenas ligeras (405 bp9 del grupo de enlazantes por *Bpi*I/ *Sph*I y se reemplazaron por un repertorio de L-CDR3s diversificadas junto con el marco 4 y el dominio constante. El diseño, la síntesis y la clonación de este casete
65

de la L-CDR3 se describirán en otra parte (manuscrito en preparación). Se ligaron 5 µg del vector del grupo de enlazantes con un exceso molar 3 veces del fragmento del inserto que lleva las L-CDR3s diversificadas. En un segundo conjunto de bibliotecas se diversificó la H-CDR2 (*XhoI/ BssHII*), mientras que las regiones marco de conexión se mantuvieron constantes. para monitorizar la eficiencia de la clonación la H-CDR2 parental se reemplazó por un maniquí, antes de que se clonase el casete de la H-CDR2 diversificado. Las mezclas de ligación de 7 bibliotecas diferentes fueron electroporadas en 4 ml de células *E. coli* TOP 1 OF (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) produciendo de 1x10⁸ a 8x10⁹ colonias independientes. Este tamaño de biblioteca aseguró la cobertura de la diversidad teórica. La amplificación de la biblioteca se realizó como se ha descrito antes (Rauchenberger y otros, 2003). Para el control de calidad se recogieron y secuenciaron aleatoriamente clones individuales (SequiServe, Vaterstetten, Alemania).

Barrido de Semi-Solución Contra MCP-1 Biotina-K69 Humana (V411) para Maduración de la Afinidad. Se pre-adsorbieron dos veces 1x10¹³ fagos rescatados de las bibliotecas de optimización en tiras de placas de microtitulación de Poliestireno Recubiertas con Neutravidina Reacti-Bind y después se bloquearon con ChemiBLOCKER (Chemicon, Temecula, CA, USA). Los fagos pre-adsorbidos y las diferentes concentraciones de MCP-1 biotina-K69 (0,02-50 nM) se incubaron durante 1,5 horas a 22° C en solución, seguido por la captura de los complejos fago-antígeno para las tiras de placas de microtitulación de Poliestireno Recubiertas con Neutravidina Reacti-Bind (PERBIO). Los pasos de lavado a 22° C se extendieron hasta 12 horas. La elución por 20 mM de DTT en 10 mM de Tris/HCl, pH 8.0, y la amplificación fagémida entre cada ronda de barrido se realizó como se ha descrito anteriormente.

Barrido de Solución Contra MCP-1 Biotina-K69 Humana (V411) para Maduración de la Afinidad. Se bloquearon veces 1x10¹³ fagos rescatados de la librería de maduración de la afinidad como se ha descrito anteriormente con ChemiBLOCKER (Chemicon, Temecula, CA, USA, 0,05% de Tween20 (Sigma, St. Louis, MO, USA) y se pre-adsorbieron dos veces en Estreptavidina Dynabeads® M-280 (DynaL Biotech, Oslo, Noruega) bloqueadas por ChemiBLOCKER sin Tween20. Se aplicó la reducción del antígeno durante las tres rondas de barrido y la concentración de MCP-1 biotina-K69 varió de 0,01 a hasta 5 nM. Se usaron el Dynabeads® bloqueado y un separador de partículas magnético, MPC-E (DynaL Biotech, Oslo, Noruega) para capturar fagos enlazados con el antígeno biotinilado. Los pasos de lavado (Rauchenberger y otros, 2003), elución por 20 mM de DTT en 10 mM de Tris/HCl, pH 8.0, y la amplificación fagémida entre cada ronda de barrido se realizó como se ha descrito anteriormente. Además la rigurosidad del barrido se aumento adicionalmente por la selección de la constante de disociación (Hawkins y otros, 1992) y por los pasos de lavado extendidos (hasta 6 horas).

Se cribaron 3312 clones y se identificaron 85 Fabs optimizados que venían de 4 de 7 Fabs parentales. Se identificaron los Fabs optimizados en tanto la L-CDR3 como la H-CDR2 y la clonación cruzada de las cadenas ligera y pesada mejoradas se realizó para derivados de 2 clones parentales diferentes llevando a una mejora adicional en la afinidad (K_D) de hasta 100 veces. Los enlazantes más valorados (alrededor de 100) con una Kd estimada a ~1-10 nM fueron secuenciados llevando a la identificación de 41 Fabs mejorados únicos. La mayoría de los enlazantes mejorados estaban derivados del Grupo III (03548). Se realizó un cribado adicional en los Grupos I y II para identificar más Fabs mejorados en estos grupos de maduración. Se identificaron veintinueve enlazantes de clase I y II adicionales. En conjunto se identificaron 87 Fabs únicos derivados de cinco de los siete Fabs parentales en el proceso de maduración. La Tabla 3 resume los resultados del barrido de maduración.

Tabla 3. Resumen de la selección de Fab con enlace mejorado con la MCP-1.

Grupo	Clon Parental Clone	L-CDR3 Mejorada	H-CDR2 Mejorada	
1	03336	-	14	
1	03470	-	2	
1	03464	-	1	
1	03468	-	-	
2	03471	23	1	
2	03473	-	-	
3	03548	11	35	
	Total Fabs mejorados	34	63	87

Los cambio de aminoácidos en los Fabs madurados fueron localizados o en la H-CDR2 o en la L-CDR3 de los clones parentales 03741 y 03548. la clonación cruzada de la mejor CDR2 de la cadena pesada mejorada con la mejor CDR3 de la cadena ligera de los Fabs se llevo entonces a cabo para tratar de generar Fabs con incluso afinidad más alta. Se generaron aproximadamente 36 clones cruzados. Todas las secuencias de Fab únicas también se cribaron para la predicción de sitios de glicosilación N-ligados. Se identificaron unos pocos Fabs con la secuencia de consenso Nls para la glicosilación en la DCR2 de la cadena pesada. Estos Fabs fueron excluidos de

caracterización adicional. Se expresaron un total de 84 Fabs y se purificaron en Morphosys y se transfirieron a Centocor para caracterización biológica.

5 El límite de la sensibilidad para la medición de la afinidad usando Biacore se alcanzó con los Fabs optimizados. Por lo tanto los valores de afinidad se determinaron por Titración de la solución de equilibrio (SET) basada en ECL (Haenel y otros, 2004, presentada para publicación en Analytical Biochemistry). Después de la maduración de la afinidad, se consiguió una K_D de alrededor de 10 pM y el valor se confirmó usando KinexA. El enlace de Fab en el ensayo de radio-ligandos alcanzó un IC_{50} de 110 pM. Por lo tanto, tanto la afinidad de la MCP-1 como las cinéticas de enlace mejoraron hasta 1000 veces en comparación con los Fabs parentales. Cuatro Fabs optimizados cumplieron todos de los 9 criterios de éxito. Dos fueron Fabs optimizados de la L-CDR3 y dos fueron clones cruzados compuestos de cadenas optimizadas de la L-CDR3 y la H-CDR2. Los 4 fueron convertidos a IgG1 y mantuvieron la actividad en todos los ensayos probados con mejor K_D de 10 pM y mejor IC_{50} de 20 pM en el ensayo de enlace de radio-ligandos. Un clon cruzado adicional MOR03899 cumplió todos los criterios de éxito como una IgG1 pero no como Fab. Todos los enlazantes que cumplían los criterios de éxito estaban derivados del Fab parental MOR03471 (SEQ ID Nos. 2, 4). El Fab único, MOR03790, fue elegido para la producción de IgG, el desarrollo de fabricación a escala, y la evaluación *in vivo* en modelos animales basados en el MOR03471 y comprendiendo las secuencias de las regiones variables de la cadena pesada y ligera dadas en las Tabla 4D y SEQ ID Nos. 6, 7, 9, 13, 14 y 16.

20 Cribado BioVeris Durante la Maduración de la Afinidad. Los clones Fab mejorados por afinidad se identificaron por un ensayo BioVeris de cribado de afinidad de alto rendimiento basado en ECL. Después de la selección de los resultados se consolidaron 4 sub- clones por el mismo método.

25 Estrategias de Barrido para la Maduración de la Afinidad. En total se realizaron 36 barridos diferentes. 18 barridos de solución contra la MCP-1 biotina-K69 (V411) con captura de complejos fago-antígeno a gotas de Estreptavidina. La rigurosidad durante el proceso de selección se aumentó con la reducción de la concentración de antígeno, la selección de la constante de disociación y el lavado prolongado. Además se ejecutaron 18 barridos de semi-solución contra la MCP-1 biotina-K69, capturando complejos fago-antígeno a placas de Neutravidina. En estos barridos la rigurosidad se aumentó por la reducción del antígeno y lavado prolongado.

30 Cribado BioVeris para la Maduración de la Afinidad. Se usó el antígeno MCP-1 biotina-K69 411 en el barrido de maduración y también para el cribado basado en BioVeris. El cribado funcionó muy eficientemente para la identificación de enlazantes mejorados. Para cada una de las 36 condiciones de barrido se cribaron 92 clones, resultando en 3312 clones cribados. En total, se identificaron 85 enlazantes optimizados únicos diferentes. Se encontraron Fabs optimizados de los 3 grupos. Además, pudieron ser identificados los Fabs optimizados en la L-CDR3 y la H-CDR2, haciendo posible la clonación cruzada para los Fabs designados MOR03471 y MOR03548 derivados. 46 Fabs optimizados derivados de MOR03548, 35 de los Fabs venían de la optimización de la H-CDR2 mostrando afinidad y actividad más altas en comparación con los 11 Fabs optimizados de la L-CDR3. También el MOR03471 fue optimizado muy exitosamente en esta maduración con 23 Fabs optimizados en la L-CDR3 y uno optimizado en la H-CDR2. Los Fabs mejorados derivados de 4 de 7 Fabs parentales, indicando que cada enlazante parental tenía diferente potencial para ser optimizado. Finalmente 4 Fabs que cumplían todos los criterios de éxito derivados de MOR03471, dos optimizados en la L-CDR3 sólo y dos de clonación cruzada, optimizados en la L-CDR3 y la H-CDR2.

45 Clonación Cruzada de moléculas Fab optimizadas. La estructura modular de la tecnología HuCAL® permite la clonación cruzada rápida de las cadenas ligera y pesada optimizadas de Fabs optimizados derivados del mismo clon parental, simplemente combinando las dos cadenas optimizadas en un paso de clonación. La clonación cruzada es un método rápido con el potencial de conseguir anticuerpos mejorados adicionales sin una ronda de maduración adicional. Por un lado 2 derivados de MOR03548 optimizados de la L-CDR3 se clonaron de forma cruzada con 6 MOR03548 optimizados de la H-CDR2 llevando a 12 clones cruzados. Por otro lado 22 MOR03471 optimizados de la L-CDR3 se clonaron de forma cruzada con un clon MOR03471 optimizado de la H-CDR2 disponible. En este proyecto la clonación cruzada fue exitosa llevando a dos clones cruzados derivados de MOR03471 diferentes. MOR03850 y MOR03878, que finalmente cumplieron todos los criterios de éxito.

55 Caracterización detallada de los 16 Anticuerpos Preseleccionados

60 85 Fabs optimizados identificados del cribado de afinidad y 34 clones cruzados adicionales (ver arriba) resultaron en un total de 119 Fabs optimizados únicos diferentes, que no fueron todos caracterizados por todos los ensayos disponibles. Por lo tanto, los 16 Fabs optimizados fueron preseleccionados de acuerdo con su IC_{50} en la inhibición del enlace de radio ligando, la actividad en el ensayo de liberación de calcio, la carencia de sitios de N-glicosilación en las CDRs (Tabla 4A y B) y la afinidad. La caracterización detallada adicional incluía la prueba de especificidad, el enlace con y la neutralización de la MCP-1 nativa, la afinidad con MCP-1 humana y de cyno, la actividad en el ensayo de quimiotaxis y la caracterización de todas las IgG1 convertidas.

65 Los clones que representan los Fabs optimizados están representados por las secuencias dadas en la Tabla 4A-C, donde el Fab parental del clon MOR03471 tiene CH3 x kappa3 marcos y el MOR03548 tiene VH1A x

lambda3 marcos. Los 17 Fabs seleccionados con atributos fisicoquímicos deseables (sin sitios de N-glicosilación en las CDRs) y propiedades optimizadas de afinidad y bioactividad, muestran ciertas secuencias de CDR únicas alternas u secuencias de consenso representativas entre las secuencias de la HC-CDR2 y la LC CDR3 dentro de los marcos usados (VH3 y VH1A) así como, de forma más general, un consenso entre todas las HC-CDR!. Estas secuencias de consenso se muestran en las Tablas 4C - 4E y los SEQ IN Nos: 2-26.

5

Tabla 4A: Secuencias de la CDR de la Cadena Pesada de los 17 enlazantes seleccionados

Parental	MOR #	Tipo VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3
MOR03471 derivada (L-CDR3)	3781	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGGIIPFGTANYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 derivada (L-CDR3)	3790	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGGIIPFGTANYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 derivada (L-CDR3)	3791	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGGIIPFGTANYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 x clon (3822x3797)	3849	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 x clon (3822x3819)	3850	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 x clon (3822x3794)	3878	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 x clon (3822x3788)	3885	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 x clon (3822x3876)	3899	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03548 derivada (L-CDR3)	3744	VH3	GFTFRSYGMS	WVSNIRSDGSYTYADSVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 derivada (L-CDR3)	3747	VH3	GFTFRSYGMS	WVSNIRSDGSYTYADSVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 derivada (H-CDR2)	3753	VH3	GFTFRSYGMS	WVSSIEHKWSGYTTSYAASVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 derivada (H-CDR2)	3754	VH3	GFTFRSYGMS	WVSSIEHKWSGYATTYAASVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 derivada (H-CDR2)	3755	VH3	GFTFRSYGMS	WVSSIEHKWSGYATGYAASVKG	FEFTPWTYFDF

65

(continuada)

5	Parental	MOR #	Tipo VH	HCDR1	HCDR2	HCDR3
10	MOR03548 derivada (H-CDR2)	3757	VH3	GFTFRSYGMS	WVSSIEHKWTNYATSYAASVKG	FEFTPWTYFDF
15	MOR03548 derivada (H-CDR2)	3758	VH3	GFTFRSYGMS	WVSSIEHKWTGYATSYAASVKG	FEFTPWTYFDF
20	MOR03548 derivada (H-CDR2)	3832	VH3	GFTFRSYGMS	WVSSIEHKWSNYATSYAAGVKG	FEFTPWTYFDF
25	MOR03548 derivada (H-CDR2)	3836	VH3	GFTFRSYGMS	WVSSIEHKWSGYATGYAASVKG	FEFTPWTYFDF

25

30

Tabla 4B: Secuencias de la CDR de la Cadena Ligera de 17 enlazantes seleccionados

Parental	MOR #	Tipo VL	LCDR1	LCDR2	LCDR3
MOR03471 derivada (L-CDR3)	3781	VL-k3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	HQYIELWSF
MOR03471 derivada (L-CDR3)	3790	VL-k3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	HQYIQLHSF
MOR03471 derivada (L-CDR3)	3791	VL-k3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYIDISPM
MOR03471 x clon (3822x3797)	3849	VL-k3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYISHPQ
MOR03471 x clon (3822x3819)	3850	VL-k3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYITYPPF
MOR03471 x clon (3822x3794)	3878	VL-k3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYISFPA
MOR03471 x clon (3822x3788)	3885	VL-k3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYISQPV
MOR03471 x clon (3822x3876)	3899	VL-k3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	HQYIFYPN
MOR03548 derivada (L-CDR3)	3744	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDDNRPS	QTYDRFSSTA
MOR03548 derivada (L-CDR3)	3747	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDDNRPS	QSYDRFSSTG
MOR03548 derivada (H-CDR2)	3753	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 derivada (H-CDR2)	3754	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 derivada (H-CDR2)	3755	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 derivada (H-CDR2)	3757	VL-λ3	SGDNLGKKYV Y	LVIYDDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 derivada (H-CDR2)	3758	VL-λ3	SGDNLGKKYVY Y	LVIYDDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 derivada (H-CDR2)	3832	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 derivada (H-CDR2)	3836	VL-λ3	SGDNLGKKYVY	LVIYDDDNRPS	QSYTAQSSAS

65

Tabla 4C: Secuencias de Consenso para las Regiones V anti-MCP-1

SEQ ID NO:	Región-wV	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
2	VH1A	QVELVQ SGAE VKKPGS SVKV SCKAS	<u>GGTFSSY</u> <u>GIS</u>	WVRQAPG QGLE	<u>WMGXIXPXXG</u> <u>XXXVYAKKFOG</u>	RVTITADEST STAYMELSSL RSEDTAVYYC AR	<u>YDGIYGELDF</u>	WGQGTLVTVSS
3	VH3	QVQLVE SGGG LVQPGG SLRL SCAAS	<u>GFTFRSY</u> <u>GMS</u>	WVRQAPG KGLE	<u>WVSNIRSDGS</u> <u>YTYVADSVKG</u>	RFTISRDNKS NTLYLQMNLS RAEDTAVYYC AR	<u>FEFTPWTFYDF</u>	WGQGTLVTVSS
4	Kappa3	DIVLTQ SPAT LSLSPG ERAT LSC	<u>RASQSVS</u> <u>DAYLA</u>	WYQKPG QAPR	<u>LLIYDASSRA</u> <u>T</u>	GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YC	<u>XQYIXXXX</u>	FTFGGQTKVEI K
5	Lambd a3	DIELTQ PPSV SVAPGQ TARI SC	<u>SGDNLGK</u> <u>KYV Y</u>	WYQKPG QAPV	<u>LVIYDDNRP</u> <u>S</u>	GIPERFSGSN SGNTATLTIS GTQAEDEADY YC	<u>QYXXXXSSXX</u>	FGGGTKLTVL

Tabla 4D. CDRs Unicas Anti-MCP-1

Región V	CDR	SEQ ID NO:	Designación Fab	SECUENCIA
VH1A	CDR1	6	Toda MOR03471	GGTFSSYGIS
VH1A	CDR2	7	3781, 3790, CNTO 888	WMGGIIPFGTANYAQKFQG
VH1A	CDR2	8	3899	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG
VH1A	CDR3	9	Toda MOR03471	YDGIYGELDF
VH3	CDR1	10	Toda MOR03548	GFTFRSYGMS
VH3	CDR2	11	3744, 3747	WVSNIRSDGS YTTYADSVKG
VH3	CDR3	12	Toda MOR03548	FEFTPWTYFD F
Kappa3	CDR1	13	Toda MOR03471	RASQSVSDAYLA
Kappa3	CDR2	14	Toda MOR03471	LLIYDASSRA T
Kappa3	CDR3	15	3781	HQYIELWSF
Kappa3	CDR3	16	3790, CNTO888	HQYIQLHSF
Kappa3	CDR3	17	3899	HQYIFYPN
Lamda3	CDR1	18	Toda MOR03548	SGDNLGKKYV Y
Lamda3	CDR2	19	Toda MOR03548	LVIYDDDNRP S
Lamda3	CDR3	20	3744	QTYDRFSSTA
Lamda3	CDR3	21	3747	QSYDRFSSTG

Tabla 4E: Secuencias de Consenso de las Regiones CDR ANti-MCP-1

CDR	SEQ ID NO:	SECUENCIA	VARIANTES
VH1A-CDR2	22	WMGXIXPXXG XXXYAQKFQG	X4 = A, G X6 = I, N X8 = I, L X9 = A, F X11 = H, T X12 = A, T X13 = H, N
VH3-CDR2	23	WVSSIEHKWX XYXTXYAAXV KG	X10 = S, T X11 = G, N X13 = A, T X15 = G, S, T X19 = G, S
Lk-CDR3	24	XQYIXXXX	X1 = H, Q X5 = D, E, F, Q, S, T X6 = Q, L, I, H, T, F X7 = W, H, S, P X8 = A, N, Q, V, P-F, P-M, S-F
LA-CDR3	25	QXYXXXSSXX	X2 = S, T X4 = D, T X5 = A, R X6 = F, Q X9 = A, T X10 = A, G, S
HC-CDR1	26	GXTFXSYGXS	X2 = F, G X5 = S, R X9 = I, M

Tabla 5: resumen de afinidad de los anticuerpos seleccionados

KD [nM]	MOR3757	MOR3781	MOR3790	MOR3850	MOR3878	MOR3899
Fab BioVeris rh MCP-1 n=2	0.008 / 0.02	0.03 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.32 ± 0.14	0.81 ± 0.18
Fab BioVeris cyno MCP-1 n=2	0.01 / 0.07	0.004 / 0.01	0.06 ± 0.02	0.04	0.32 ± 0.04	0.49 ± 0.04
Fab KinexA bt-K69 h MCP-1 (CNTO)	0.0067	0.0089	0.075	0.02	ND	ND
IgG1 BioVeris rh MCP-1 n=2	ND	0.02	0.07 ± 0.03 n=3	0.011 ± 0.005 n=3	0.27 ± 0.06	0.34 ± 0.05
IgG1 BioVeris cyno MCP-1 n=2	ND	0.016 ± 0.008	0.06 ± 0.01 n=3	0.021 ± 0.015 n=3	0.23 ± 0.02	0.36 ± 0.06

Enlace con la MCP-1 Nativa Medida por Biacore. El enlace con la MCP-1 nativa fue probada en el modo de captura de Fab de biacore y todos los Fabs seleccionados mostraron enlace con la MCP-1 nativa. Especialmente como los límites de detección para la determinación de K_D en el Biacore se alcanzaron con los Fabs optimizados, tuvieron que ser utilizados métodos alternativos para la determinación de la afinidad y la verificación de la especificidad.

Conversiones a IgG. Todos los Fabs optimizados seleccionados para caracterización detallada se convirtieron al formato IgG1, además 4 Fabs fueron sub-clonados al formato IgG4. Los datos de expresión y la actividad en diferentes ensayos de la IgG4 humana probada fueron tan buenos como los de la IgG1 respectiva.

Titulación de Equilibrio de la Solución Usando Bioveris. Como un método alternativo para las determinaciones de K_D sensibles, se realizó la titulación de equilibrio de la solución (SET) usando tecnología BioVeris. Las constantes de disociación monovalentes se calcularon por medio de modelos de ajuste apropiados para Fab e IgG. Este método era adecuado para la medición de la afinidad y estudios de reactividad cruzada. Los 16 enlazantes seleccionados fueron analizados por titulación de equilibrio de la solución (SET) usando BioVeris (Tabla 5 y Tabla 6) y estos valores de afinidad fueron considerados como los valores de afinidad finales. Varios enlazantes incluyendo MOR03757, MOR03781, MOR03790, MOR03850, MOR03878 como Fab e IgG y MOR03899 como IgG cumplieron los criterios de éxito de afinidad contra la MCP-1 humana siendo < 0,5 y MCP-1 de cyno siendo < 20 nM. Las mejores afinidades con la MCP-1 humana fueron de 20 a 40 pM en el nivel de Fab y de 10 a 20 pM en el nivel de IgG (Tabla 5). Las mejores afinidades con la MCP-1 de cynomolgus fueron de 10 a 40 pM en el nivel de Fab y 20 pM en el nivel de IgG (tabla 6).

Pruebas de Especificidad Usando Bioveris. Además de la afinidad también se analizó la especificidad, especialmente la reactividad cruzada con la Eotaxina y la MCP-2, en titulación de equilibrio de la solución (SET) usando Bioveris. No fue detectable reactividad cruzada con la MCP-2 humana para ninguno de los 16 Fabs seleccionados y las 15 IgGs probadas (una de las 16 IgGs seleccionadas no estaba disponible). Como la MCP-1 humana, la MCP-2 humana enlaza principalmente con el receptor CCR2, mientras que la Eotaxina humana enlaza predominantemente con el receptor CCR3. No fue detectable reactividad cruzada con la Eotaxina humana para los Fab e IgG MOR03744, MOR03747, MOR03790 y MOR03781 en Bioveris, mientras que 12 enlazantes seleccionados incluyendo el MOR03850 mostraron alguna reactividad cruzada con la Eotaxina en el formato Fab e IgG (datos no mostrados).

Especificidad de los Anticuerpos Optimizados en el Modo de Captura de Anticuerpos de Biacore (CNTO). La evaluación de la especificidad se realizó con IgGs seleccionadas. En Biacore 100 nM de MCP-1 humana, MCP-2, 3, 4 humana y Eotaxina 1, 2 y 3 humana se añadieron a los anticuerpos optimizados capturados. Las IgG MOR03790, MOR03791, MOR03747, MOR03850, MOR03744, MOR03849, MOR03878, MOR03885, MOR03899 y MOR03781 no mostraron señal de enlace significativa con las quimiocinas homólogas y cumplieron los criterios de éxito de especificidad (Tabla 6).

Los Fabs que enlazan con la MCP-2 no Inhiben el Enlace de la ¹²⁵I MCP-2 con Células Thp-1 (CNTO). Para analizar si la actividad de enlace del Fab con la MCP-2 y la Eotaxina detectada en Biacore se traduce en actividad neutralizante, se desarrollaron ensayos de enlace celular completos de radio-ligandos en Centocor. La ¹²⁵I MCP-2 mostro buen enlace con las células Thp-1 y el enlace se inhibió por la adición de MCP-2 sin etiquetar, pero no por la adición del anticuerpo C775 de referencia específico de la MCP-1. Los resultados proporcionaron un ensayo funcional importante para probar la especificidad de enlace/neutralización. Se usó 1 ng/ml de MCP-1 en el ensayo de enlace de receptores, mientras que fueron necesarios alrededor de 100 ng/ml de MCP-2 en estos ensayos, ya que la etiquetación de la MCP-2 podría haber causado una pérdida en la actividad. El MOR03754 no mostro inhibición significativa de la MCP-2 etiquetada ¹²⁵I que enlaza con el receptor CCR2 en células Thp-1 (IC₅₀ ≥ 2µM).

Los Fabs Madurados Inhiben Potentemente el Enlace de la ¹²⁵I con las Células THP-1 (CNTO). Debido a la baja cantidad de 1 ng/ml de MCP-1 necesaria, este ensayo fue el ensayo más sensible en este proyecto con un límite de IC₅₀ del ensayo de alrededor de 100 pM para Fab e incluso 20 pM para IgG (Tabla 5). Después de la optimización los Fabs tenían que inhibir el enlace de la MCP-1 humana con su receptor humano CCR2 en células Thp-1 con el IC₅₀ por debajo del Fab C775 de referencia. El Fab MOR03471 Parental mostro un IC₅₀ de 180 nM y los derivados del Fab MOR03471 optimizados (MOR03781 con 180 pM, MOR03790 con 260 pM, MOR03850 con 160 pM, MOR03878 con 110 pM y MOR03899 con 130 pM) mostraron una mejora total en la actividad durante la optimización hasta un factor de 1000x. Aunque este ensayo era el bioensayo más sensible disponible en este proyecto, incluso en este ensayo los enlazantes optimizados parecieron alcanzar los límites del ensayo.

Las IgGs Maduradas Inhiben Potentemente el Enlace de la ¹²⁵I MCP-1 con las Células THP-1 (CNTO). El bloqueo de los sitios de enlace del receptor de Fc por la adición de IgG1 humana no relacionada fue importante para los ensayos de enlace de radio-ligandos y movilización de calcio. Todas las IgG1 probadas mantuvieron la actividad en el ensayo de enlace de radio-ligandos. El valor de IC₅₀ del MOR03781 optimizado fue de 20 pM, 30 pM para el MOR03790, 50 pM para el MOR03850, 30 pM para el MOR03878 y 50 pM para el MOR03899. Desarrollo del Ensayo FACS de Inhibición de la Internalización del Receptor CCR2 inducida por la MCP-1. Los ensayos de internalización del receptor se realizaron usando células que expresaban el CCR2 que mostraban expresión de CCR2 más altas que las células THP-1, llevando a una mejora proporción señal-ruido. Primero la MCP-1 humana sintética fue titulada en el ensayo para determinar el valor EC₅₀. Se descubrió que el valor de EC₅₀ para la MCP-1 era de 116 ng/ml. Por lo tanto, se eligieron 100 ng/ml (~11 nM) de MCP-1 para ensayos FACS adicionales. Además del tiempo de incubación óptimo para obtener la internalización completa se evaluó a 37° C. La mayoría de la internalización tuvo lugar dentro de los primeros 30 minutos. Por lo tanto, se uso 1 hora de tiempo de incubación en todos los ensayos posteriores. El ensayo fue desarrollado exitosamente para permitir la determinación de IC₅₀. Se midió la actividad y clasificación de entre 0,001 a 200 µg/ml de Fab o IgG usada para inhibir la internalización del receptor inducida por la MCP-1. Los enlazantes optimizados seleccionados mostraron buena inhibición de la internalización del receptor inducida por la MCP-1 (datos no mostrados). Se probaron dos lotes diferentes de Fabs en paralelo con reproductividad demostrada.

Para el ensayo de internalización usando Fabs, se detectó un IC₅₀ de 5 nM para el MOR03790, 4 nM para el MOR03850, 7 nM para el MOR03781, 5,3 nM para el MOR03878 y 3,3 nM para el MOR03899 (Tabla 6). La IgG1 MOR03781 también mostro 7 nM, indicando que la actividad se conservó después de la conversión a IgG.

Inhibición de la Movilización de Calcio (CNTO). La MCP-1 induce la movilización de calcio en células THO-1 que puede ser detectada con la ayuda de un fluoróforo. Los anticuerpos optimizados mostraron inhibición potente de la movilización de calcio los 4 candidatos finales Fab MOR03781, MOR03790, MOR03850 y MOR03878 mostraron valores de IC₅₀ de 18 a 28 nM. Las IgGs respectivas conservaron la actividad y mostraron incluso valores de IC₅₀ ligeramente mejores de alrededor de 6 a 10 nM debido a su capacidad de neutralizar 2 moléculas de MCP-1 por IgG. De nuevo los límites del ensayo parecieron ser alcanzados a alrededor de 10 nM.

Inhibición de la Movilización de Calcio Inducida por MCP-1 Nativa. La MCP-1 Nativa fue purificada de sobrenadante PANC1 y se usó para la inducción de la liberación de calcio. Los Fabs optimizados mostraron inhibición de la movilización de calcio inducida por la MCP-1 nativa con mayor actividad en comparación con el anticuerpo de referencia C775. De nuevo el límite del ensayo pareció ser alcanzado a alrededor de 10 a 20 nM de MCP-1 nativa.

Inhibición de la Quimiotaxis. Debido a efectos inespecíficos potenciales los Fabs parentales no pudieron ser probados en el ensayo de quimiotaxis, pero después de la maduración todos los Fabs optimizados probados inhibieron específicamente la quimiotaxis, lo que pudo deberse a la actividad aumentada. Todas las IgGs optimizadas probadas fueron activas en el ensayo de quimiotaxis. Como el ensayo era semi-cuantitativo, No se pudieron determinar valores de IC₅₀ apropiados.

Competición de Enlace con el Anticuerpo de Referencia C775. Todos los Fabs preseleccionados derivados de MOR03548 inhibieron completamente el enlace del C775 con la MCP1 en un formato de fase sólida de competición. Los 7 Fabs preseleccionados derivados de MOR03471 mostraron competición parcial (~60%) en este ensayo.

expresadas. La secuencia modificada 3790 mAb es designada como CNTO 888 comprendiendo las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de SEQ ID NO: 27 y 28, respectivamente, y debajo (con las CDRS subrayadas), donde los residuos N-terminales de la cadena pesada son QVQ (Gln-Val-Gln9 y o de la cadena ligera son EIV (Glu-Ile-Val).

5 Secuencia variable de la Cadena pesada de CNTO888 (SEQ ID NO: 27)
 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYGISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGT
 ANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYDGIYGELDFWGQGT LVTVSS
 Variable de la cadena ligera de CNTO888 (SEQ ID NO: 28)
 10 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSDAYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATG
 VPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCHQYIQLHSFTFGQGTKVEIK

15 Caracterización bioquímica y biofísica del CNTO888. El CNTO 888 es un anticuerpo kappa de IgG1 humano completo, No hay sitios de glicosilación N-ligados previstos en la secuencia. Las propiedades bioquímicas y biofísicas del CNTO 888 (expresada transitoriamente en células HEK293 y purificada por cromatografía de afinidad de proteína A) se caracterizaron en SDS-PAGE, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), espectro de masas (MS) y BIAcore, para la afinidad de enlace (Kd) y especificidad. En SDS-PAGE, el CNTO 888 nativo emigra como una banda única a aproximadamente 150 kDa. Los emigrados de IgG reducidos/alquilados como dos bandas a aproximadamente 60 kDa y 33 kDa. La cromatografía de exclusión por tamaño del CNTO 888 demostró que la IgG eluye como un pico único al mismo volumen de elución que el medido para la IgG Remicade de control (datos no mostrados). Finalmente el análisis de Ms mostro que el CNTO888 tiene una masa de 147.000 Da (datos no mostrados). El análisis BIAcore demostró que la afinidad de enlace (kd) del CNTO 888 con la CCL-2 humana y de cyno era de 30 y 10 pM respectivamente. El CNTO888 no mostró enlace detectable en BIAcore con las quimiocinas relacionadas con la CCL-2, es decir, MCP-2, 3, 4 y eotaxina 1, 2 y 3.

25 Caracterización *In vitro* del CNTO 888. Las actividades biológicas del CNTO 888 se evaluaron en una variedad de ensayos basados en células. El CNTO 888 expresó transitoriamente evaluada en todos los ensayos de criterio de éxito que tenía actividades que eran indistinguibles de las de la mAB 3790 padre (Tabla 5).

30 **EJEMPLO 5: CLONACION Y EXPRESION DE ANTICUERPO ANTI-MCP-1**

Las alícuotas de *E. coli* con los plásmidos del CNTO 888, P2844 y p2882, contienen las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, respectivamente. El plásmido p2844 contiene la secuencia codificante de la cadena pesada optimizada de las regiones codificantes del CNTO888 bajo el promotor de la cadena pesada anti-CD4 y el plásmido p2882 contiene la cadena ligera optimizada de las regiones codificantes del CNTO888 bajo el promotor de la cadena ligera anti-CD4. Ambos constructos incluyen el gen de selección gpt para conferir resistencia química a MHX (Acido micofenólico, Hipoxantina y Xantina). Cada plásmido fue purificado, caracterizado, cuantificado, y secuenciado.

40 Las células de un cultivo exponencial de la línea celular huésped C463A, un derivado de Sp2/0 adaptado para crecer en medio definido químicamente (CD-Híbridoma), fueron co-electroporadas con p2844 y p2882 linealizadas. Después de 48 horas, las células se expusieron a 1 x MHX (0,5 mg/L de ácido Micofenólico, 2,5 mg/L de ipoxantina y 50 mg/L de Xantina). Tres días después de la selección, la viabilidad celular había disminuido a menos del 13%, momento en el cual se colocaron en placas 90.000 células viables en metilcelulosas. Las células fueron incubadas sin perturbaciones durante de ocho a trece días, después cribadas y recogidas en placas de 24 pocillos usando el procedimiento Halo. Los cultivos se expandieron y se obtuvieron títulos de sobrecrecimiento de 24 pocillos.

50 La línea parental más alta (1C4) tenía un título de sobrecrecimiento de 24 pocillos de 70 mg/L y un título de 108,5 mg/L en frascos de agitación (en medio Cd-híbridoma). Esta línea celular parental, C1262A, fue elegida para evaluación adicional en frascos de agitación. La C1262A se presentó al Cell Banking Group para la generación de Un Banco Celular de desarrollo (DCB). Las células del DCB, designadas C1262A:DCB;02SEP04, resultaron negativas para micoplasma y esterilidad. La producción del CNTO 888 para apoyar estudios de investigación adicionales de las células C1262A en frascos de agitación (con adición de peptona de soja) alcanzó un título de 230 mg/L y produjo 366 mg de CNTO 888 purificado de 2 L de cultivo. En paralelo, un cultivo de 9-L adicional de células C1262A produjo -2 g de material de CNTO 888 bruto para la purificación anticipada y el desarrollo de la formulación.

55 La línea celular parental, C1262A, fue subclonada usando el procedimiento Halo y produjo cinco líneas celulares de subclones de alta producción. La mejor línea celular de subclones (4D5) tenía un título de sobre crecimiento de 24 pocillos de 150,5 mg/L y un título de 167 mg/L en frascos de agitación (en CD-híbridoma). Este línea celular de subclones fue codificada C1262B.

60 **EJEMPLO 6: TRATAMIENTO DE TUMORES PANCREATICOS HUMANOS CON CNTO888**

65 Este estudio investiga si el bloqueo del tumor MCP-1 (producido por células derivadas de tumor humano) suprime el crecimiento tumoral en un xenoinjerto murino. Para calibrar el tumor, así como el homólogo de MCP-1 del huésped, JE, se probaron el papel en el crecimiento y progresión de la enfermedad maligna, tanto en anticuerpos de

MCP-1 anti-humana como JE anti-ratón para la capacidad de suprimir el crecimiento de tumores pancreáticos humanos *in vivo*.

Los ratones que llevaban tumores pancreáticos BxPC-3 fueron tratados con el anticuerpo de la MCP-1 anti-humano designado CNTO888 que comprende las secuencias de la región variable (SEQ ID Nos: 27 y 28) fusionadas con las regiones constantes de la IgG1 humana. Para comparar la actividad *in vivo* del CNTO888 con el anticuerpo murino anteriormente probado en el que se encontró más efectivo inhibir los efectos del huésped, tanto el CNTO888 como el de la MCP-1 anti-humana (C775) se administraron en combinación con el anti- μ JE (C1142). En base a la medición del peso del tumor final, tanto el Mab de la MCP-1 anti-humano humano (CNTO888) como el murino (C775) inhibieron significativamente el crecimiento tumoral.

Materiales y Métodos

Las BxPC-3 son células derivadas del cáncer pancreático humano. El Matrigel™ preparado del tumor Engelbreth-Holm-Swarm se obtuvo de Becton Dickinson (0,2 EU/mg, Bedford, MA).

El C775 es un Mab de MCP-1 anti-humano de ratón y el C1142 es un anticuerpo JE anti-ratón quimérico ratón/murino, con la región constante de ratón y la variable de rata descritas en la solicitud de patente U.S. pendiente de los solicitantes N° de Serie 11/170453 y presentaciones relacionadas. El anticuerpo de control cVaM es una IgG_{2a}k quimérica de rata/murino que consiste de una región variable de rata y una constante de ratón que sirve como un control de isotipo para el C1142 y el C775. La IgG humana de grado clínico se obtuvo de Beckett Apothecary y Home Health Care, Inc, Sharon Hill, PA y sirve como control para el CNTO888.

Se usaron ratones SCID hembra (6-8 semanas de edad) obtenidos de Charles River (Raleigh, NC) en el estudio. Los ratones fueron alojados en grupos en cajas de plástico rematadas con filtros y se les suministró comida y agua tratadas en autoclave.

Las células BxPC-3 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 que contenía un 10% de FBS (medio completo). Las células fueron divididas 1:3 cuarenta y ocho horas antes del comienzo del estudio. En el día del estudio, las células fueron tripsinizadas para generar una suspensión celular individual y la suspensión celular se lavó con 10 volúmenes del medio completo para neutralizar la tripsina. las células se centrifugaron y se resuspendieron en RPMI libre de suero. El Matrigel™ se descongeló a 4° C durante la noche. La suspensión Matrigel™-células tumorales se preparó mezclando volúmenes iguales de solución de Matrigel™ y células BxPC-3. LA concentración final de la suspensión de células cancerosas fue de 5×10^6 células/mL en 5 mg/ml de Matrigel™.

En el día 0, 80 ratones SCID hembra fueron implantados por vía subcutánea con 0,2 ml de suspensión de células BxPC-3. La suspensión celular de 0,2 ml contenía 1×10^6 células BxPC-3 y 1,0 mg de Matrigel™. Se usaron jeringuillas frías para evitar la polimerización del Matrigel™.

Tabla 7. Diseño del estudio anti-tumor

Número de Grupo	Animales por Grupo	Tratamiento (i.p.)
1	10	PBS
2	10	cVaM + hulG (20 mg/kg cada anticuerpo)
3	10	C775 + C1142 (20 mg/kg cada anticuerpo)
4	10	CNTO888 + C1142 (2 mg/kg cada anticuerpo)
5	10	CNTO888 + C1142 (20 mg/kg cada anticuerpo)

Todos los animales fueron pesados al comienzo del estudio y una vez a la semana durante el curso del estudio. una vez que se observó crecimiento tumoral ($3,0 \text{ mm}^3$), los tumores fueron medidos con calibradores en dos dimensiones (longitud y ancho) en milímetros (mm). Los ratones fueron monitorizados para el crecimiento tumoral y el volumen del tumor (mm^3) se calculó en base a la fórmula $[\text{longitud} \times \text{anchura} \times \text{anchura}]/2$.

En el día 14 después de la implantación de las células tumorales, los ratones con un volumen de tumor medio de alrededor de 50 mm^3 fueron aleatorizados en cinco grupos ($n=10/\text{grupo}$). El tratamiento (Tabla 7) comenzó en el día 14, y los tratamientos se administraron dos veces a la semana durante el resto del estudio (52 días después del comienzo del tratamiento en el día 14). Los tumores se midieron una vez a la semana durante el resto del estudio. Al final del estudio los ratones fueron sacrificados por asfixia con CO_2 . Los tumores fueron diseccionados, pesados en una balanza digital, y fijados. Los tumores se fotografiaron usando una cámara digital. En el Día 50, un ratón en el Grupo 3 tenía un tumor que excedía el límite aceptable bajo las directrices del estudio y fue sacrificado. El volumen y peso de este animal se incluyen en el análisis final.

Para los pesos tumorales, los datos fueron analizados por modelo lineal estándar y análisis de varianza (ANOVA). Los valores P- menores de 0,05 para todas las pruebas y comparaciones fueron considerados significativos a menos que se indique lo contrario. La escala logarítmica se usó ya que las suposiciones subyacentes de varianza igual y forma de distribución normal se satisficieron mejor. La media docena de valores cero, para los ratones que estaban libres de tumores, se reemplazaron con un pequeño valor interpolado en la curva (0,007240538) que facilitó el análisis estadístico en la escala logarítmica sin la corrupción de la estructura de datos.

Para el volumen tumoral, se ajustó un modelo de mediciones repetidas a los datos asumiendo una estructura de covarianza de autocorrelación de primer orden. Las curvas naturales se usaron para modelar flexiblemente la curvatura de las tendencias en los perfiles temporales. Las comparaciones por pares entre los grupos se hicieron en cada uno de los puntos temporales. Los cálculos se realizaron por el software ambiental R.

Resultados

Tanto el grupo de control negativo PBS como el cVam/hulgG mostraron crecimiento tumoral similar, alcanzando $\sim 350 \text{ mm}^3$ después de 51 días. Esto indica que el tratamiento de anticuerpos con anticuerpos irrelevantes no inhibe el crecimiento tumoral. El crecimiento tumoral en los tres grupos de prueba (C775/C1142 y CNTO888/C1142) fue más lento que en los grupos de control negativos, indicando que los tratamientos anti-CCL2/anti-JE tuvieron un impacto en el crecimiento tumoral. Los grupos C775/C1142 y CNTO888/C1142 (2 mg/kg) mostraron inhibición tumoral significativa en comparación con el grupo de control PBS, según lo medido por el volumen tumoral del Día 18 al final del estudio. El grupo CNTO888/C1142 (20 mg/kg) mostró inhibición significativa del Día 18 al Día 39, en comparación con el grupo de control PBS.

Los pesos tumorales se obtuvieron al final del estudio en el Día 51 (Tabla 8). Hubo ratones libres de tumores en el Grupo 1 de PBS (1 ratón), el Grupo 3 C775/C1142 (3 ratones) y el Grupo 4 CNTO888/C1142 (2 ratones). Cuando se compararon los pesos tumorales, cada uno de los grupos de prueba CNTO888 mostraron una reducción significativa en los pesos tumorales en comparación con el grupo de control PBS (Tabla 8). El porcentaje de inhibición en el grupo CNTO888/C1142 dosificado a 2 mg/kg fue del 80% ($P=0,006$), mientras que para el grupo CNTO888/C1142 dosificado a 20 mg/kg la inhibición fue del 68% ($P=0,046$). El grupo C775/C1142 también mostró una inhibición significativa del crecimiento tumoral ($P=0,004$). Las diferencias vistas en la interpretación estadística de los resultados del volumen tumoral frente al peso tumoral es probablemente debida a la imprecisión al medir el volumen tumoral con calibradores, en comparación con la precisión al pesar los tumores extirpados del animal.

Tabla 8. Pesos Tumorales Finales

Animal #	PBS	cVaM+Hu IgG	C775+C1142	CNTO888+C1142*	CNTO888+C1142
1	0	0.142	0	0.089	0.116
2	0.34	0.349	0.075	0	0.13
3	0.368	0.302	0	0.04	0.028
4	0.239	0.667	0.032	0.123	0.13
5	0.386	0.268	0.273	0.198	0.453
6	0.222	0.178	0.018	0.065	0.059
7	0.926	0.531	0.044	0.196	0.058
8	0.484	0.485	0.307	0.128	0.029
9	0.564	0.302	0	0	0.024
10	0.459	0.28	1.328	0.031	0.356
Peso Tumoral Medio (g)	0.399	0.350	0.208	0.087	0.138
SD	0.244	0.163	0.410	0.073	0.148

Colectivamente, estos resultados indican que en el modelo BxPC-3 establecido, el bloqueo de la MCP-1 y JE de ratón inhibe significativamente el crecimiento tumoral, y que el CNTO888 tiene actividad anti-tumoral.

Será evidente que la invención puede ser puesta en práctica de otra forma que la descrita particularmente en la descripción y ejemplos anteriores.

Referencias

Abraham R., Buxbaum, S. Link, J., Smith, R., Venti, C., Darsley, M. (1996) . Determination of Binding Constants of Diabodies directed against Prostate- specific Antigen using Electrochemiluminescence- based Immunoassays. J. Mol. Recognit., 9 (5- 6) : 456- 61.

- Ausbel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J.G., Smith, J. A., Struhl, K., (1998) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley New York, USA
- 5 Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Lynch JP 3rd, Xue YY, Berlin A, Ross DJ, Kunkel SL, Charo IF, Strieter RM. (2001) . Critical role for the chemokine MCP- 1/CCR2 in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Clin Invest.* 108 (4) : 547- 56.
- 10 Boder, E.T., Midelfort, K. S., Wittrup, K. D. (2000). Directed evolution of antibody fragments with nonvalent femtomolar antigen-binding affinity. *PNAS* 97,20, 10701-10705
- Carnevale KA, Cathcart MK. (2003) . Protein kinase C beta is required for human monocyte chemotaxis to MCP-1. *J Biol Chem.* 278 (28) : 25317- 22.
- 15 Chen Y, Hallenbeck JM, Ruetzler C, Bol D, Thomas K, Berman NE, Vogel SN. (2003) . Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in the brain exacerbates ischemic brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells. *J Cereb Flow Metab.* 23 (6) : 748- 55.
- 20 Chen, B.P., Hai, T. Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using *Escherichia coli* as host. *Gene* 139, 73-75. 1994
- Chen, Y., Wiesmann, C., Fuh, g., Li, B., Christinger H. W., McKay, P., de Vos, A. M., Lowman, H. B. (1999). Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody:crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *J. Mol. Biol.* 293, 865-881
- 25 Conti P, DiGiacchino M. (2001) . MCP- 1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc.* 22 (3) : 133- 7.
- 30 Dawson J, Miltz W, Mir AK, Wiessner C. (2003) . Targeting monocyte chemoattractant protein- 1 signalling in disease. *Expert Opin Ther Targets.* 7 (1) : 35- 48.
- Ernst CA, Zhang YJ, Hancock PR, Rutledge BJ, Corless CL, Rollins BJ. (1994) . Biochemical and biologic characterization of murine monocyte_ chemoattractant_ protein- 1. Identification of two functional domains. *J Immunol* 152 (7) : 3541- 9.
- 35 Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L., & Goldberg M.E. (1985). Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Meth.* 77, 305-319.
- 40 Frisch,C., Brocks,B., Ostendorp,R., Hoess,A., von Ruden,T., and Kretzschmar,T. (2003). From EST to IHC: human antibody pipeline for target research. *J Immunol Methods* 275, 203-212.
- Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, Rollins BJ, Charo IF. (1999) . MCP- 1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest.* 103 (6) : 773- 8.
- 45 Haenal C, Satzger M, Della Ducata D, Ostendorp R and Brocks B (2005) Characterization of High Affinity Antibodies by Electrochemiluminescence-Based Equilibrium Titration (accepted for publication in *Analytical Biochemistry*)
- 50 Hemmerich S, Paavola C, Bloom A, Bhakta S, Freedman R, Grundberger D, Krstenansky J, Lee S, McCarley D, Mulkins M, Wong B, Pease J, Mizoue L, Mirzadegan T, Polsky I, Thompson K, Handel TM, Jarnagin K. (1999) . Identification of residues in the monocyte chemotactic protein- 1 that contact the MCP- 1 receptor, CCR2. *Biochemistry* 38 (40) : 13013- 25.
- 55 Hughes PM, Allegrini PR, Rudin M, Perry VH, Mir AK, Wiessner C. (2002) . Monocyte chemoattractant protein- 1 deficiency is protective in a murine stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 22 (3) : 308- 17.
- Jarnagin K, Grunberger D, Mulkins M, Wong B, Hemmerich S, Paavola C, Bloom A, Bhakta S, Diehl F, Freedman R, McCarley D, Polsky I, Ping- Tsou A, Kosaka A, Handel TM. (1999) . Identification of surface residues of the monocyte chemotactic protein 1 that affect signaling through the receptor CCR2. *Biochemistry.* 38 (49) : 16167- 77.
- 60 Jimenez- Sainz MC, Fast B, Mayor F Jr, Aragay AM. (2003) . Signaling pathways for monocyte chemoattractant protein 1 mediated extracellular signal- regulated kinase activation. *Mol Pharmacol.* 64 (3) : 773- 82.
- 65 Knappik,A., Ge,L., Honegger,A., Pack,P., Fischer,M., Wellenhofer,G., Hoess,A., Wolle,J., Pluckthun,A., and Virnekas, B. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 296, 57-86.

- 5 Krebs,B., Rauchenberger,R., Reiffert,S., Rothe,C., Tesar,M., Thomassen,E., Cao,M., Dreier,T., Fischer,D., Hoss, A., Inge,L., Knappik,A., Marget,M., Pack,P., Meng,X.Q., Schier,R., Sohlmann,P., Winter,J., Wolle,J., and Kretzschmar,T. (2001). High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. *J Immunol Methods* 254, 67-84.
- Kretzschmar,T. and von Rüden, T. (2002). Antibody discovery: phage display. *Curr Opin Biotechnol* 13:598-602.
- Leonard EJ, Yoshimura T. (1990). Human monocyte chemoattractant protein-1. *Immunol Today*,11: 97-101.
- 10 Löhning,C. (2001). Novel methods for displaying (poly) peptides/proteins on bacteriophage particles via disulfide bonds. WO 01/05950.
- Losy J., Zaremba J. (2001) . Monocyte chemoattractant protein- 1 is increased in the cerebrospinal fluid of patients with ischemic stroke. *Stroke*. 32 (11) : 2695- 6.
- 15 Low,N. M., Holliger, P., Winter, G. (1996). Mimicking somatic hypermutation:affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J. Mol. Biol.* 260, 359-368
- Mahad DJ, Ransohoff RM. (2003) . The role of MCP- 1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) . *Semin Immunol.* 15 (1) : 23- 32.
- 20 McManus C, Berman JW, Brett FM, Staunton H, Farrell M, Brosnan CF. (1998) . MCP- 1, MCP- 2 and MCP- 3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neuroimmunol.* 86 (1) : 20- 9.
- 25 Nagy ZA, Hubner B, Löhning C, Rauchenberger R, Reiffert S, Thomassen- Wolf E, Zahn S, Leyer S, Schier EM, Zahradnik A, Brunner C, Lobenwein K, Rattel B, Stanglmaier M, Hallek M, Wing M, Anderson S, Dunn M, Kretzschmar T, Tesar M. (2002). Fully human, HLA- DR- specific monoclonal antibodies efficiently induce programmed death of malignant lymphoid cells. *Nat Med.* 8 (8) : 801- 7.
- 30 Nakamura M. Kyo S, Kanaya T, Yabate N, Maida Y, Tanaka M, Ishida Y, Fujii C, Kondo T, Inoue M, Mukaida N. (2004). hTERT-promoter-based tumor-specific expression of MCP-1 effectively sensitizes cervical cancer cells to a low dose of cisplatin. *Cancer Gene Ther.* 11(1):1-7.
- 35 Neumark E, Sagi- Assif O, Shalmon B, Ben- Baruch A, Witz IP. (2003) . Progression of mouse mammary tumors: MCP- 1- TNFalpha cross- regulatory pathway and clonal expression of promalignancy and antimalignancy_ factors. *Int J Cancer.* 106 (6) : 879- 86.
- 40 Ni W, Kitamoto S, Ishibashi M, Usui M, Inoue S, Hiasa K, Zhao Q, Nishida K, Takeshita A, Egashira K. (2004) . Monocyte chemoattractant protein- 1 is an essential inflammatory mediator in angiotensin II- induced progression of established atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24 (3) : 534- 9.
- 45 Nokihara H, Yanagawa H, Nishioka Y, Yano S, Mukaida N, Matsushima K, Sone S. (2000) . Natural killer celldependent suppression of systemic spread of human lung adenocarcinoma cells by monocyte chemoattractant protein- 1 gene transfection in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.* 15; 60 (24) : 7002- 7.
- Ohta M, Kitadai Y, Tanaka, S, Yoshihara M, Yasui W, Mukaida N, Haruma K, Chayama K. (2003) . Monocyte chemoattractant protein- 1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human gastric carcinomas. *Int J Oncol.* 22 (4) : 773- 8.
- 50 Piehler, J, Brecht, A., Giersch, T., Hock, B., Gauglitz, G(1997). Assessment of affinity constants by rapid solid phase detection of equilibrium binding in a flow system. *J. Immunol. Meth.* 201, 189-206.
- 55 Prickett, KS, Amberg DC, Hopp TP (1989). A calcium dependent antibody for identification and purification of recombinant proteins. *Biotechniques.* 7(6):580-9
- 60 Rauchenberger, R., Borges, E., Thomassen- Wolf, E., Rom, E., Adar, R., Yaniv, Y., Malka, M., Chumakov, I., Kotzer, S., Resnitzky, D., Knappik, A., Reiffert, S., Prassler, J., Jury, K., Waldherr, D., Bauer, S., Kretzschmar, T., Yayon, A., and Rothe, C. (2003) . Human combinatorial Fab Library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3. *J Biol Chem.* 278 (40) : 38194- 38205
- Ren G, Dewald O, Frangogiannis NG. (2003) . Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2 (3) : 242- 56.
- 65 Rose CE Jr, Sung SS, Fu SM. (2003) . Significant involvement of CCL2 (MCP- 1) in inflammatory disorders of the lung. *Microcirculation.* 10 (3- 4) : 273- 88.

- 5 Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ. (2000). Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP- 1: direct role of MCP- 1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood*. 96 (1) : 34- 40.
- 10 Sarau HM, Rush JA, Foley JJ, Brawner ME, Schmidt DB, White JR, Barnette MS. (1997) . Characterization of functional chemokine receptors (CCR1 and CCR2) on EoL- 3 cells: a model system to examine the role of chemokines in cell function. *J Pharmacol Exp Ther*. 283 (1) : 411- 8.
- 15 Sartipy P, Loskutoff DJ. (2003) . Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100 (12) : 7265- 70.
- Schier, R., Bye, J., Apell, G., Mc Call, A., Adams, G.P., Malmqvist, M., Weiner, L. M. Weiner, Marks, J. D. (1996a). Isolation of high- affinity monomeric human anti- c- erbB- 2 single chain Fv using affinity- driven selection. *J.Mol. Biol*. 255, 28- 43
- 20 Schier, R., McCall, A., Adams, G.P., Marshall, K. W., Merritt, H., Yim, M., Crawford, R. S., Weiner, L. M., Marks, C., Marks, J. D. (1996b) . Isolation of picomolar affinity anti- c- erbB- 2 single- chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J. Mol. Biol*. 263, 551- 567
- Schmidt, T.G.M., Koepke, J., Frank, R. and Skerra, A. (1996). Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target streptavidin. *J. Mol. Biol*. 255, 753-766
- 25 Seli E, Selam B, Mor G, Kayisli UA, Pehlivan T, Arici A. (2001) . Estradiol regulates monocyte chemotactic protein-1 in human coronary artery smooth muscle cells: a mechanism for its antiatherogenic effect. *Menopause*. 8 (4) : 296- 301.
- 30 Sung FL, Zhu TY, Au- Yeung KK, Siow YL, OK. (2002) . Enhanced MCP- 1 expression during ischemia/ reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF- kappaB. *Kidney Int*. 62 (4) : 1160- 70.
- Szalai C, Kozma GT, Nagy A, bojszko A, Krikovszky D, Szabo T, Falus A. (2001) . Polymorphism in the gene regulatory region of MCP- 1 is associated with asthma susceptibility and severity. *J Allergy Clin Immunol*. 108 (3) : 375- 81.
- 35 Takahashi K, Mizuarai S, Araki H, Mashiko S, Ishihara A, Kanatani A, Itadani H, Kotani H. (2003) . Adiposity elevates plasma MCP- 1 levels leading to the increased CD11b- positive monocytes in mice. *J. Biol Chem*. 278 (47) : 46654- 60.
- 40 Tonouchi H, Miki C, Ohmori Y, Kobayashi M, Mohri Y, Tanaka K, Konishi N, Kusunoki M. (2004) . Serum monocyte chemoattractant protein- 1 in patients with postoperative infectious complications from gastrointestinal surgery for cancer. *World J. Surg*. 28 (2) : 130- 6.
- 45 Van Der Voorn P, Tekstra J, Beelen RH, Tensen CP, Van Der Valk P, De Groot CJ. (1999) . Expression of MCP- 1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol*. 154 (1) : 45- 51.
- Voss, S. and Skerra, A. (1997). Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Streptag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng*. 10, 975-982
- 50 Yamada M, Kim S, Egashira K, Takeya M, Ikeda T, Mimura O, Iwao H. (2003) . Molecular mechanism and role of endothelial monocyte chemoattractant protein- 1 induction by vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23 (11) : 1996- 2001. Yang, W., Green, K., Pinz- Sweeney, S., Briones, A. T., Burton, D. R., Barbas III, C.F. (1995) . CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti- HIV- 1 antibody into the picomolar range. *J. Mol. Biol*. 254, 392- 403
- 55 Yoshimura T, Leonard EJ. (1999) . Identification of high affinity receptors for human monocyte chemoattractant protein- 1 on human monocytes. *J Immunol.*, 145 (1) : 292- 7.
- 60 Zhu BQ, Heeschen C, Sievers RE, Karliner JS, Parmley WW, Glantz SA, Cooke JP. (2003) . Second hand smoke stimulates tumor angiogenesis and growth. *Cancer Cell*. 4 (3) : 191- 6.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 65 <110> Centocor, Inc. Das, Anuk Sweet, Raymond Tsui, Ping Bardoff, Micheal
- <120> ANTICUERPOS ANTI-MCP1, COMPOSICIONES, METODOS YD USOS

<130> CEN5098 PCT

5 <150> US 60/682654
<151> 2005-05-19

<160> 28

10 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 76
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (1) .. (1)
<223> Xaa puede ser Gln, Glu, o ácido piroglutámico

20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (40) .. (40)
<223> Xaa puede ser Ala o Ser

25 <220>
<221> VARIANTE
<222> (41) .. (41)
<223> Xaa puede ser Val o Ile

30 <220>
<221> VARIANT
<222> (43) .. (43)
<223> Xaa puede ser Phe o Tyr

35 <220>
<221> SITIO
<222> (69) .. (69)

40 <220>
<221> SITIO
<222> (75) .. (75)
<223> Posición conjugada, por ejemplo biotina o PEG- biotina

45 <400> 1

Xaa Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr
1 5 10 15

50 Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr
20 25 30
Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Xaa Ile Xaa Lys Thr Ile Val Ala
35 40 45

55 Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met
50 55 60

60 Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr
65 70 75

65 <210> 2
<211> 119

ES 2 438 193 T3

```

<212> PRT
<213> humana

<220>
5 <221> FR1
  <222> (1)..(25)

<220>
10 <221> CDR1
   <222> (26).. (35)
   <223> Degenerada

<220>
15 <221> FR2
   <222> (36).. (46)
   <223> Degenerada

<220>
20 <221> CDR2
   <222> (47) .. (66)
   <223> Degenerada

<220>
25 <221> FR3
   <222> (67)..(98)

<220>
30 <221> CDR3
   <222> (99) .. (108)

<220>
  <221> FR4
  <222> (109) .. (119)
35 <400> 2

      Gln Val Glu Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
      1          5          10          15

40      Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30

45      Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35          40          45

50      Gly Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Gln Lys Phe
          50          55          60

55      Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
          65          70          75          80

      Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

60      Ala Arg Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
          100          105          110

65      Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115

```

- <210> 3
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Humana
- 5
- <220>
 <221> FR1
 <222> (1)..(23)
- 10
- <220>
 <221> CDR1
 <222> (24)..(35)
- 15
- <220>
 <221> FR2
 <222> (36)..(46)
- 20
- <220>
 <221> CDR2
 <222> (47)..(57)
- 25
- <220>
 <221> FR3
 <222> (58)..(89)
- 30
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (90) .. (90)
 <223> X puede ser H o Q
- 35
- <220>
 <221> CDR3
 <222> (90) .. (97)
- 40
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (94) .. (94)
 <223> X puede ser Glu, Gln, Asp, Ser, Thr, o Phe
- 45
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (95) .. (95)
 <223> X puede ser Leu, Ile, His, Tyr, Phe, o Gln
- 50
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (96) .. (96)
 <223> X puede ser Trp, His, Ser, Prolina
- 55
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (97) .. (97)
 <223> X puede ser Ala, Val, Asn, Gln, Ser, o Prolina
- 60
- <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (98) .. (98)
 <223> X puede estar ausente o ser Phe o Met
- 65
- <220>
 <221> FR4
 <222> (98) .. (109)
- 65
- <220>
 <221> FR4
 <222> (99) .. (109)

ES 2 438 193 T3

<400> 3

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

30 <210> 4
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Humana

35 <220>
 <221> FR1
 <222> (1)..(25)

40 <220>
 <221> CDR1
 <222> (26)..(35)

45 <220>
 <221> FR2
 <222> (36)..(46)

50 <220>
 <221> CDR2
 <222> (47)..(66)

55 <220>
 <221> FR3
 <222> (67)..(98)

60 <220>
 <221> CDR3
 <222> (99)..(110)

65 <220>
 <221> FR4
 <222> (111)..(120)

<400> 4

65

ES 2 438 193 T3

5 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr
 20 25 30
 10 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Asn Ile Arg Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 20 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 25 Ala Arg Phe Glu Phe Thr Pro Trp Thr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln
 100 105 110
 30 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

35 <210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Humana

40 <220>
 <221> FR1
 <222> (1)..(22)

45 <220>
 <221> CDR1
 <222> (23).. (33)

<220>
 <221> FR2
 <222> (34).. (44)

50 <220>
 <221> CDR2
 <222> (45).. (55)

55 <220>
 <221> FR3
 <222> (56).. (87)

60 <220>
 <221> CDR3
 <222> (88).. (97)

65 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (89).. (89)
 <223> Xaa puede ser Ser o Thr

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (91) .. (91)
 <223> Xaa puede ser Asp o Thr
 5

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (92) .. (92)
 <223> Xaa puede ser Arg o Ala
 10

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (93) .. (93)
 <223> Xaa puede ser Gln o Phe
 15

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (96) .. (96)
 <223> Xaa puede ser Thr o Ala
 20

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (97) .. (97)
 <223> Xaa puede ser Ala, Gly, o Ser
 25

<220>
 <221> FR4
 <222> (98) .. (107)
 30

<400> 5
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 35
 Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Tyr Val
 20 25 30
 40
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 45
 Asp Asp Asp Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 50
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 55
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Ser Ser Xaa
 85 90 95
 60
 65
 Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Humana
 <400> 6

ES 2 438 193 T3

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Ile Ser
 1 5 10

5

<210> 7
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Humana

10

<400> 7

Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln
 1 5 10 15

15

Lys Phe Gln Gly
 20

20

<210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Humana

25

<400> 8

Trp Met Gly Ala Ile Asn Pro Leu Ala Gly His Thr His Tyr Ala Gln
 1 5 10 15

30

Lys Phe Gln Gly
 20

35

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Humana

40

<400> 9

Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe
 1 5 10

45

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Humana

50

<400> 10

Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Gly Met Ser
 1 5 10

55

<210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Humana

60

<400> 11

65

ES 2 438 193 T3

Trp Val Ser Asn Ile Arg Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp
 1 5 10 15

5 Ser Val Lys Gly
20

10 <210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> Humana

15 <400> 12
Phe Glu Phe Thr Pro Trp Thr Tyr Phe Asp Phe
1 5 10

20 <210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> Humana

25 <400> 13
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Ala Tyr Leu Ala
1 5 10

30 <210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Humana

35 <400> 14
Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5 10

40 <210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> humana

45 <400> 15
His Gln Tyr Ile Glu Leu Trp Ser Phe
1 5

50 <210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> humana

55 <400> 16

60 His Gln Tyr Ile Gln Leu His Ser Phe
1 5

65 <210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Humana

<400> 17

5 His Gln Tyr Ile Phe Tyr Pro Asn
1 5

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
10 <213> Humana

<400> 18

15 Ser Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Tyr Val Tyr
1 5 10

<210> 19
<211> 11
20 <212> PRT
<213> Humana

<400> 19

25 Leu Val Ile Tyr Asp Asp Asp Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 20
<211> 10
30 <212> PRT
<213> Humana

<400> 20

35 Gln Thr Tyr Asp Arg Phe Ser Ser Thr Ala
1 5 10

<210> 21
<211> 10
40 <212> PRT
<213> Humana

<400> 21

45 Gln Ser Tyr Asp Arg Phe Ser Ser Thr Gly
1 5 10

50 <210> 22
<211> 20
<212> PRT
<213> Humana

55 <220>
<221> VARIANTE
<222> (4) .. (4)
<223> Xaa puede ser Gly o Ala

60 <220>
<221> VARIANTE
<222> (6) .. (6)
<223> Xaa puede ser Ile o Asn

65 <220>

- <221> VARIANTE
 <222> (8) .. (8)
 <223> Xaa puede ser Ile o Leu
- 5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9) .. (9)
 <223> Xaa puede ser Phe o Ala
- 10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11) .. (11)
 <223> Xaa puede ser Thr o His
- 15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (12) .. (12)
 <223> Xaa puede ser Ala o Thr
- 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (13) .. (13)
 <223> Xaa puede ser Asn o His
- 25 <400> 22
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Trp | Met | Gly | Xaa | Ile | Xaa | Pro | Xaa | Xaa | Gly | Xaa | Xaa | Xaa | Tyr | Ala | Gln |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
- 30 Lys Phe Gln Gly
 20
- 35 <210> 23
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Humana
- 40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10) .. (10)
 <223> Xaa puede ser Ser o Thr
- 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (11) .. (11)
 <223> Xaa puede ser Gly o Asn
- 50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (13) .. (13)
 <223> Xaa puede ser Ala o Thr
- 55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (15) .. (15)
 <223> Xaa puede ser Gly, Ser, o Thr
- 60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (19) .. (19)
 <223> Xaa puede ser Ser o Gly
- 65 <400> 23

Trp Val Ser Ser Ile Glu His Lys Trp Xaa Xaa Tyr Xaa Thr Xaa Tyr
 1 5 10 15

5

Ala Ala Xaa Val Lys Gly
 20

10 <210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Humana

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1) .. (1)
 <223> Xaa puede ser His o Gln

20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5) .. (5)
 <223> Xaa puede ser Asp, Glu, Gln, Ser, Thr, o Phe

25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6) .. (6)
 <223> Xaa puede ser Gln, Leu, Ile, His, Tyr, o Phe

30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7) .. (7)
 <223> Xaa puede ser Trp, His, Ser, o Pro

35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (8) .. (8)
 <223> Xaa puede ser Ala, Gln, Val, Asn, Pro- Phe, Pro- Met, o Ser- Phe

40 <400> 24

Xaa Gln Tyr Ile Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

45 <210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Humana

50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2) .. (2)
 <223> Xaa puede ser Ser o Thr

55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (4) .. (4)
 <223> Xaa puede ser Asp o Thr

60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5).. (5)
 <223> Xaa puede ser Ala o Arg

65 <220>

<221> VARIANTE
 <222> (6) .. (6)
 <223> Xaa puede ser Gln o Phe

5

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9) .. (9)
 <223> Xaa puede ser Ala o Thr

10

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10) .. (10)
 <223> Xaa puede ser Ala, Gly, o Ser

15

<400> 25

Gln	Xaa	Tyr	Xaa	Xaa	Xaa	Ser	Ser	Xaa	Xaa
1				5					10

20

<210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Humana

25

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (2) .. (2)
 <223> Xaa puede ser Gly o Phe

30

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5) .. (5)
 <223> Xaa puede ser Ser o Arg

35

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (9) .. (9)
 <223> Xaa puede ser Ile o Met

40

<400> 26

Gly	Xaa	Thr	Phe	Xaa	Ser	Tyr	Gly	Xaa	Ser
1				5					10

45

<210> 27
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Humana

50

<220>
 <221> MARCO1
 <222> (1) .. (25)
 <223> CDR3

55

<220>
 <221> CDR1
 <222> (26) .. (35)
 <223> CDR1

60

<220>
 <221> MARCO2
 <222> (36) .. (46)
 <223> CDR3

65

<220>

<221> CDR2
 <222> (47) .. (66)
 <223> CDR2

5 <220>
 <221> MARCO3
 <222> (67) .. (98)
 <223> CDR3

10 <220>
 <221> CDR3
 <222> (99) .. (108)
 <223> CDR3

15 <220>
 <221> MARCO4
 <222> (109)... (119)
 <223> CDR3

20 <400> 27

	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
	1				5					10					15	
25	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25						30		
	Gly	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35					40					45			
30	Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
		50					55					60				
35	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70					75					80
40	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
45	Ala	Arg	Tyr	Asp	Gly	Ile	Tyr	Gly	Glu	Leu	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly
			100						105					110		
	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
			115													

50 <210> 28
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Humana

55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (1) .. (1)
 <223> Xaa puede ser Asp o Glu

60 <220>
 <221> MARCO1
 <222> (1) .. (23)
 <223> VH1A

65 <220>

<221> CARACTERISTICA MISC
 <222> (24) .. (35)
 <223> CDR1

5 <220>
 <221> MARCO2
 <222> (36) .. (46)
 <223> VH1A

10 <220>
 <221> CARACTERISTICA MISC
 <222> (47) .. (57)
 <223> CDR2

15 <220>
 <221> MARCO3
 <222> (58) .. (89)
 <223> VH1A

20 <220>
 <221> CARACTERISTICA_MISC
 <222> (90) .. (97)
 <223> CDR3

25 <220>
 <221> MARCO4
 <222> (98) .. (109)
 <223> VH1A

30 <400> 28

Xaa Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

35

 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Ala
 20 25 30

40

 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

45

 Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

50

 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 65 70 75 80

55

 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile Gln Leu His
 85 90 95

60

 Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo de la MCP-1 mamífero aislado, que comprende (a) al menos una región variable que comprende al menos una región variable de la cadena pesada y al menos una cadena ligera, dicho anticuerpo de la MCP-1 comprendiendo tanto las regiones variables de la cadena pesada como la cadena ligera comprendiendo las SEQ ID NOS: 27 y 28; o (b) al menos una región variable de la cadena pesada y al menos una región variable de la cadena ligera, dicho anticuerpo comprendiendo todas las secuencias de aminoácidos de la región determinante complementaria (CDR) de la cadena ligera y la cadena pesada de las SEQ ID NOS: 6, 7, 9, 13, 14 y 16.
- 10 2. Un anticuerpo de la MCP-1 de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el mencionado anticuerpo enlaza con la MCP-1 con una afinidad de al menos una seleccionada de al menos 10^{-9} M, al menos 10^{-10} M, al menos 10^{-11} M, o al menos 10^{-12} M.
- 15 3. Un anticuerpo de la MCP-1 de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicho anticuerpo modula sustancialmente al menos una actividad de al menos un polipéptido de la MCP-1 seleccionada de enlace de la MCP-1 al receptor en las superficies celulares, la internalización del receptor de CCR2 y la movilización de Ca^{2+} estimulada por MCP-1.
- 20 4. Un ácido nucleico aislado que codifica al menos un anticuerpo de la MCP-1 mamífero aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 25 5. Un vector de ácido nucleico aislado que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 4.
- 30 6. Una célula huésped procariota o eucariota que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 5.
- 35 7. Una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicha célula huésped es al menos una seleccionada de COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, YB2/0, células de mieloma, o linfoma, o cualquier célula derivada, inmortalizada o transformada de las mismas.
- 40 8. Un método no terapéutico para producir al menos un anticuerpo de la MCP-1, que comprende traducir un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 bajo condiciones in vitro, in vivo o in situ, de tal forma que el anticuerpo de la MCP-1 sea expresado en cantidades detectables o recuperables, en donde el método no se realiza en un humano.
- 45 9. Una composición que comprende al menos un anticuerpo de la MCP-1 mamífero aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que tiene al menos una CDR humana, y al menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 50 10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 9, comprendiendo además al menos un compuesto o polipéptido seleccionado de al menos uno de un etiqueta o indicador detectable, un antagonista TNF, un fármaco anti-infeccioso, un fármaco del sistema cardiovascular (CV), un fármaco del sistema nervioso central (CNS), un fármaco del sistema nervioso autónomo (ANS), un fármaco del tracto respiratorio, un fármaco del tracto gastrointestinal (GI), un fármaco hormonal, un fármaco para el equilibrio de fluidos o electrolitos, un fármaco hematológico, un antineoplásico, un fármaco para la inmunomodulación, un fármaco oftálmico, nasal u ótico, un fármaco tópico, un producto nutricional, una citocina o un antagonista de citocina.
- 55 11. Un anticuerpo o fragmento anti-idiotipo que enlaza específicamente con al menos un anticuerpo de la MCP-1 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 60 12. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para diagnosticar o tratar una condición relacionada con la MCP-1 en una célula, tejido, órgano o animal.
- 65 13. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicho anticuerpo es para ser administrado en una cantidad efectiva de 0,001-50 mg/kilogramo de dichas células, tejido, órgano o animal.
14. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicho anticuerpo es para ser administrado por al menos un modo seleccionado de parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocardiaco, intraóseo, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarectal, intrarenal, intraretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, intralesional, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmico.

- 5 **15.** Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicho anticuerpo es para ser administrado antes, concurrentemente o después de al menos una composición que comprende una cantidad efectiva de al menos un compuesto o polipéptido seleccionado de al menos uno de una etiqueta o indicador detectable, un fármaco anti-infeccioso, un fármaco del sistema cardiovascular (CV), un fármaco del sistema nervioso central (CNS), un fármaco del sistema nervioso autónomo (ANS), un fármaco del tracto respiratorio, un fármaco del tracto gastrointestinal (GI), un fármaco hormonal, un fármaco para el equilibrio de fluidos o electrolitos, un fármaco hematológico, un antineoplásico, un fármaco para la inmunomodulación, un fármaco oftálmico, nasal u ótico, un fármaco tópico, un producto nutricional, una citocina o un antagonista de citocina.
- 10 **16.** Un dispositivo médico, que comprende al menos un anticuerpo de la MCP-1 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en donde dicho dispositivo es adecuado para poner en contacto o administrar el mencionado al menos un anticuerpo de la MCP-1 por al menos un modo seleccionado de parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocardiaco, intramiosclerótico, intraóseo, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarectal, intrarenal, intraretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, intralesional, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmico.
- 15 **17.** Un artículo de fabricación para el uso farmacéutico o de diagnóstico humano, que comprende material de envasado y un recipiente que comprende una solución o una forma liofilizada de al menos un anticuerpo de la MCP-1 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 20 **18.** El artículo de fabricación de la reivindicación 17, en donde el mencionado recipiente es un componente para un dispositivo o sistema de administración parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocardiaco, intraóseo, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarectal, intrarenal, intraretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, intralesional, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmico.
- 25 **19.** Un método para producir al menos un anticuerpo de la MCP-1 mamífero aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende proporcionar una célula huésped o animal transgénico no humano o planta o célula vegetal transgénica capaz de expresar en cantidades recuperables dicho anticuerpo.
- 30