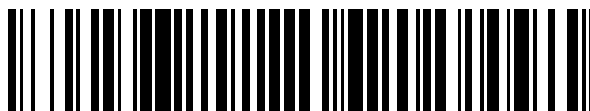


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 453 592**

51 Int. Cl.:

C12P 21/06 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2008** **E 08840836 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2013** **EP 2185719**

54 Título: **Anticuerpos anti-RANTES y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

02.08.2007 US 963271 P

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

08.04.2014

73 Titular/es:

**NOVIMMUNE SA (100.0%)
14 ch. Des Aulx, Plan-Les-Ouates
1228 Geneva, CH**

72 Inventor/es:

**FISCHER, NICOLAS;
KOSCO-VILBOIS, MARIE y
MACH, FRANCOIS**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 453 592 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-RANTES y métodos de uso de los mismos

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere en general a anticuerpos monoclonales completamente humanos que se unen a RANTES (regulada tras activación, expresada y secretada por células T normales) así como a métodos para el uso de los mismos.

10 Antecedentes de la invención

RANTES (regulada tras activación, expresada y secretada por células T normales, CCL5) es una quimiocina que es un quimioatrayente para eosinófilos, monocitos y linfocitos.

Bums *et al.* (Journal of Experimental Medicine vol. 188 (1998), págs. 1917-1927) se refiere a un anticuerpo monoclonal (Acm 4A12) que se une a RANTES humana, bloquea su actividad antiviral e inhibe la movilización de calcio intracelular provocada por RANTES.

Se han implicado niveles elevados de expresión de RANTES en una variedad de enfermedades y trastornos. Por consiguiente, existe una necesidad de terapias que seleccionen como diana la actividad de RANTES.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales, tales como anticuerpos monoclonales completamente humanos, que se unen específicamente a regulada tras activación, expresada y secretada por células T normales (RANTES, también denominada en el presente documento CCL5) y que comprenden las secuencias de CDR de regiones variables SEQ ID NO 8, 9, 20, 14, 15 y 16; o SEQ ID NO 8, 9, 10, 14, 15 y 16; o SEQ ID NO 28, 29, 30, 34, 35 y 36. Los anticuerpos monoclonales según la invención incluyen los anticuerpos a los que se hace referencia en el presente documento como 1D9, 1E4 y C8. Los anticuerpos se denominan respectivamente en el presente documento anticuerpos frente a huRANTES. Los anticuerpos frente a huRANTES incluyen anticuerpos monoclonales completamente humanos, así como anticuerpos monoclonales humanizados y anticuerpos quiméricos.

Preferiblemente, los anticuerpos frente a huRANTES tienen un formato de isotipo IgG1. Más preferiblemente, los anticuerpos frente a huRANTES tienen un formato de isotipo IgG1.

Anticuerpos con formato de IgG1 a modo de ejemplo proporcionados por la presente invención son los anticuerpos 1D9, 1E4 y C8 con formato de IgG1 que comprenden la secuencia de cadena pesada y la secuencia de cadena ligera mostradas a continuación, y las secuencias de CDR se muestran en recuadros:

> Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 1D9 (SEQ ID NO: 263)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTEFAMHWVROAPGKGLEWMGGFVPEDGETIYA
QKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATDPLYTPGLEPWGQGTTVTVSSAST
 KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 C
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 1D9 (SEQ ID NO: 264)

SYVLTPPPSVSVAPGQTARITCGGNNIESKSVHWYQQKPGQAPVLTVYDDSDRPSGIPERF
 SGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSNTDHWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP
 SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLT
 PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

> Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 1E4 (SEQ ID NO: 238)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLT[EFAMH]WVRQAPGKGLEWMGG[FVPEDGETIYA]
 [QKFQGR]VTMTEDTSTDYAMELSSLRSEDYAVYYCAT[DPLYEGSFVS]WGQGT[TVTVSS]AST
 KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 1E4 (SEQ ID NO: 254)

5 SYVLTQPPSVSVAPGQTARITC[GGNNIESKSVH]WYQOKPGQAPVLVYV[DDSDRPS]GI PERF
 SGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC[QVWDSNTDHWV]FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP
 SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLT
 PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

> Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de C8 (SEQ ID NO: 186)

10 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS[SYAMH]WVRQAPGKGLEWVA[VISYDGSNKYYA]
 [DSVKGR]FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR[ETFPHYYYYMDV]WGRGTLTVTVSS
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 LYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPS
 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

> Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de C8 (SEQ ID NO: 187)

15 SYVLTQPPSVSVAPGQTARITC[EGDDTDIGTVN]WYQOKPGQAPVLVIS[EDGYRPS]GI PERF
 SGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC[QFWDVSDHPV]FGGGTQLTVLGQPKAAPSVTLFPP
 SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLT
 PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

La línea germinal más cercana para los anticuerpos frente a huRANTES descritos en el presente documento se muestra a continuación en la tabla 1:

20 Tabla 1. Líneas germinales más cercanas para los anticuerpos frente a huRANTES. Los anticuerpos marcados en cursiva se derivaron mediante un proceso de maduración por afinidad a partir del anticuerpo 2D1 (parte inferior de la tabla).

ID de clon	Número dp de VH	Número dp de VL
C8	Vh3_DP-46_(3-30.3)	Vlambda3_3h
<i>1D9</i>	Vh1_DP-5_(1-24)	Vlambda3_3h
<i>1E4</i>	Vh1_DP-5_(1-24)	Vlambda3_3h

25 La invención también proporciona anticuerpos que se unen a RANTES humana cuando RANTES humana está unida a glucosaminoglucano (GAG), es decir, se unen a RANTES humana en el contexto de GAG. En una realización preferida, estos anticuerpos incluyen (a) una región CDR1 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; (b) una región CDR2 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; (c) una región CDR3 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 ó 20, (d) una región CDR1 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; (e) una región CDR2 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y (f) una región CDR3 de V_L que comprende la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16; o anticuerpos que incluyen (a) una región CDR1 de V_H que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 28; (b) una región CDR2 de V_H que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29; (c) una región CDR3 de V_H que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 30; (d) una región CDR1 de V_L que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 34; una región CDR2 de V_L que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 35; y (f) una región CDR3 de V_L que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 36.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal completamente humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un isotipo IgG, tal como, por ejemplo, un isotipo IgG1.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos de tratamiento, prevención o alivio de un síntoma de un trastorno relacionado con la inmunidad administrando un anticuerpo frente a huRANTES según la invención a un sujeto. Por ejemplo, los anticuerpos frente a huRANTES se usan para tratar, prevenir o aliviar un síntoma asociado con una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio. Opcionalmente, al sujeto se le administra adicionalmente un segundo agente tal como, pero sin limitarse a, un reactivo anti-citocinas, reactivo anti-quimiocinas, un reactivo anti-citocinas o un agente anti-receptor de quimiocinas que reconoce el ligando o receptor para proteínas tales como interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, MIP1 alfa, MIP1 beta, IP-10, MCP1, ITAC, MIG, SDF y fractalquina.

El sujeto está padeciendo o está predispuesto a desarrollar un trastorno relacionado con la inmunidad, tal como, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio. Preferiblemente, el sujeto es un mamífero, y más preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una serie de gráficos que representan la actividad de anticuerpos anti-huRANTES en ensayos de quimiotaxis usando células L1.2 transfectadas con hCCR5 y 1 nM o 0,2 nM de RANTES humana recombinante (figura 1A y B respectivamente) así como RANTES humana nativa (figuras 1C).

La figura 2 es un gráfico que representa la capacidad de anticuerpos anti-huRANTES para unirse a huRANTES en el contexto de glucosaminoglucanos y en un ensayo ELISA.

La figura 3 es una serie de gráficos que representan la actividad del anticuerpo anti-huRANTES 1E4 en ensayos de flujo de calcio usando: células L1.2 que expresan hCCR1 y RANTES humana recombinante 25 nM (figura 3A); células L1.2 que expresan hCCR3 y RANTES humana recombinante 25 nM (figura 3B); células L1.2 que expresan hCCR5 y RANTES humana recombinante 4 nM (figura 3C).

La figura 4 es una serie de gráficos que representan la actividad del anticuerpo anti-huRANTES 1E4 en ensayos de quimiotaxis usando: células L1.2 que expresan hCCR1 y 2 nM de RANTES humana recombinante (figura 4A); células L1.2 que expresan hCCR3 y 10 nM de RANTES humana recombinante (figura 4B); células L1.2 que expresan hCCR5 y 1 nM de RANTES humana recombinante (figura 4C); células L1.2 que expresan hCCR5 y aproximadamente 1 nM de RANTES humana nativa (figura 4D).

La figura 5 es un gráfico que representa el perfil de reactividad cruzada de anticuerpo 1E4 contra un panel de quimiocinas de ser humano, mono cynomolgus, ratón y rata en un ELISA.

La figura 6 es una alineación de secuencias de proteína RANTES madura de ser humano (SEQ ID NO: 170), mono cynomolgus (SEQ ID NO: 171), ratón (SEQ ID NO: 172) y rata (SEQ ID NO: 206). Las flechas indican las posiciones que están conservadas en RANTES de ser humano y mono cynomolgus pero no en las secuencias de ratón o rata y que se seleccionaron como diana mediante mutagénesis dirigida al sitio.

La figura 7 es un gráfico que representa la unión de anticuerpo 1E4 (barras blancas) o de un anticuerpo policlonal generado contra RANTES de ratón (barras con trama diagonal) a RANTES humana, RANTES de ratón y variantes de RANTES de ratón en las que los aminoácidos de ratón indicados se han reemplazado por los aminoácidos encontrados en la secuencia humana en la misma posición.

La figura 8 es una ilustración que representa el protocolo de un modelo de isquemia-reperfusión murino proporcionado en el presente documento.

La figura 9 es una serie de gráficos que representan que el tratamiento con anticuerpo anti-RANTES disminuyó el tamaño del infarto en un modelo murino de isquemia-reperfusión. Los datos representan 20 ratones por grupo.

La figura 10 es una serie de gráficos que representan que el tratamiento con anticuerpo anti-RANTES disminuyó el tamaño del infarto en un modelo murino de isquemia-reperfusión de una manera dependiente de la dosis. Los datos representan 3 ratones por grupo.

La figura 11 es una ilustración que representa el protocolo de un modelo de isquemia murino proporcionado en el presente documento.

- 5 La figura 12 es una serie de gráficos que representan que el tratamiento con anticuerpo anti-RANTES disminuyó el tamaño del infarto en un modelo murino de isquemia. Los datos representan 10 ratones por grupo.

- 10 La figura 13 es una serie de gráficos que representan que el tratamiento con anticuerpo anti-RANTES disminuyó el tamaño del infarto en un modelo murino de isquemia de una manera dependiente de la dosis. Los datos representan 3 ratones por grupo.

Descripción detallada

- 15 La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales completamente humanos específicos para la quimiocina regulada tras activación, expresada y secretada por células T normales (RANTES, CCL5). Los términos "RANTES" y "CCL5" se usan de manera intercambiable en el presente documento. Los anticuerpos se denominan conjuntamente en el presente documento anticuerpos frente a huRANTES. Los anticuerpos frente a huRANTES se unen específicamente a RANTES. Tal como se usan en el presente documento, los términos "específico para", "unión específica", "dirigido contra" (y todas las variaciones gramaticales de los mismos) se usan de manera
- 20 intercambiable en el contexto de anticuerpos que reconocen y se unen a un epítipo de RANTES cuando la constante de unión en equilibrio (K_d) es $\leq 1 \mu\text{M}$, por ejemplo, $\leq 100 \text{ nM}$, preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$ y más preferiblemente $\leq 1 \text{ nM}$. Por ejemplo, los anticuerpos frente a huRANTES proporcionados en el presente documento presentan una K_d en el intervalo entre aproximadamente $\leq 10 \text{ nM}$ y aproximadamente 100 pM .

- 25 Los anticuerpos frente a huRANTES son, por ejemplo, antagonistas o inhibidores de RANTES que modulan al menos una actividad biológica de RANTES. Las actividades biológicas de RANTES incluyen, por ejemplo, unión a un receptor de RANTES tal como, por ejemplo, CDR1, CCR3, CCR4 y/o CCR5; quimioatracción de eosinófilos, monocitos y linfocitos; unión de RANTES a glucosaminoglucanos así como oligomerización de RANTES. Por ejemplo, los anticuerpos frente a huRANTES inhiben completa o parcialmente la actividad de RANTES bloqueando
- 30 parcial o completamente la unión de RANTES a un receptor de RANTES (por ejemplo, CDR1, CCR3, CCR4 y/o CCR5). Se considera que los anticuerpos frente a RANTES inhiben completamente la actividad de RANTES cuando el nivel de actividad de RANTES en presencia del anticuerpo frente a huRANTES disminuye en al menos el 95%, por ejemplo, en el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% en comparación con el nivel de actividad de RANTES en ausencia de unión con un anticuerpo frente a huRANTES descrito en el presente documento. Se considera que los
- 35 anticuerpos frente a RANTES inhiben parcialmente la actividad de RANTES cuando el nivel de actividad de RANTES en presencia del anticuerpo frente a huRANTES disminuye en menos del 95%, por ejemplo, el 10%, el 20%, el 25%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 75%, el 80%, el 85% o el 90% en comparación con el nivel de actividad de RANTES en ausencia de unión con un anticuerpo frente a huRANTES descrito en el presente documento.

- 40 Los anticuerpos frente a huRANTES de la invención se producen inmunizando un animal con RANTES, tal como, por ejemplo, RANTES murina o humana o un fragmento inmunogénico, derivado o variante de la misma. Alternativamente, el animal se inmuniza con células transfectadas con un vector que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica para RANTES, de manera que se expresa RANTES y se asocia con la superficie de las células
- 45 transfectadas. Alternativamente, los anticuerpos se obtienen examinando una biblioteca que contiene secuencias de anticuerpos o de dominios de unión a antígeno para determinar su unión a RANTES. Esta biblioteca se prepara, por ejemplo, en un bacteriófago como fusiones de proteínas o péptidos a una proteína de la cubierta del bacteriófago que se expresa en la superficie de partículas de fago ensambladas y las secuencias de ADN codificantes contenidas dentro de las partículas de fago (es decir, "biblioteca presentada en fago").

- 50 Los anticuerpos frente a huRANTES de la invención incluyen las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada mostradas a continuación en la tabla 2, las CDR de cadena ligera mostradas en la tabla 3 y combinaciones de las mismas tal como se define en la reivindicación 1.

- 55 Tabla 2. Secuencias de CDR de V_H de clones de anticuerpo que se unen a y neutralizan RANTES. Los anticuerpos marcados en cursiva se derivaron mediante un proceso de maduración por afinidad a partir del anticuerpo 2D1 (parte inferior de la tabla).

ID de clon	CDR1 pesada	CDR2 pesada	CDR3 pesada
C8	SYAMH (SEQ NO: 28)	VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ NO: 29)	ETFPHYYYYMDV (SEQ NO: 30)
1D9	EFAMH (SEQ NO: 8)	GFVPEDGETIYAQKFQG (SEQ NO: 9)	DPLYTPGLEP (SEQ NO: 10)
1E4	EFAMH (SEQ NO: 8)	GFVPEDGETIYAQKFQG (SEQ NO: 9)	DPLYEGSFSV (SEQ NO: 20)

Tabla 3. Secuencias de CDR de V_L de clones de anticuerpo que se unen a y neutralizan RANTES. Los anticuerpos marcados en cursiva se derivaron mediante un proceso de maduración por afinidad a partir del anticuerpo 2D1 (parte inferior de la tabla).

ID de clon	CDR1 ligera	CDR2 ligera	CDR3 ligera
C8	EGDDTDIGTVN (SEQ NO: 34)	EDGYRPS (SEQ NO: 35)	QFWDVDSHPV (SEQ NO: 36)
<i>1D9</i>	GGNNIESKSVH (SEQ NO: 14)	DDSDRPS (SEQ NO: 15)	QVWDSNTDHWV (SEQ NO: 16)
<i>1E4</i>	GGNNIESKSVH (SEQ NO: 14)	DDSDRPS (SEQ NO: 15)	QVWDSNTDHWV (SEQ NO: 16)

Un anticuerpo monoclonal frente a huRANTES a modo de ejemplo es el anticuerpo 1D9 descrito en el presente documento. Tal como se muestra a continuación, el anticuerpo 1D9 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 2) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 1, y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 3. Las secuencias de CDR se muestran en recuadros.

> Secuencia de ácido nucleico del dominio variable de cadena pesada de 1D9 (SEQ ID NO: 1):

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTT
 CCTGCAAGGTTTCCGGATACACCTCAGTGGGTCGCGCATGCACATGGGTGCGACAGGCTCC
 TGGAAAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGTTTGTTCCTGAAGATGGTGAGACAATCTACGCG
 CAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATGG
 AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACAATATCCCCTGT
 TACTCCGGGTCTTGAGCCTTGGGGGACAGGGGACCAAGGTCACCGTCTCGAGT

> Secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de 1D9 (SEQ ID NO: 2):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTEFAMHWVRQAPGKGLEWMC¹GFVPEDGETIYA
 QKFQGRVMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATDPLYTPGLEP²WGQGT³TVTVSS

> Secuencia de ácido nucleico del dominio variable de cadena ligera de 1D9 (SEQ ID NO: 3):

TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCTCGGTGTGAGTGGCCCCAGGACAGACGGCCAGGATTA
 CCTGTGGGGGAAACAACATTGAAAGTAAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCA
 GGCCCTGTGCTGGTGGTCTATGATGATAGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTC
 TCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATG

AGGCCGACTATTACTGT⁴CAGGTGTGGGATAGTAATACTGATCATTGGGTG⁵TTCCGGCGGAGG
 GACCAAGCTCACCGTCCTA

> Secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera de 1D9 (SEQ ID NO: 4):

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGNNIESKSVH⁶WYQQKPGQAPVLV⁷VYDDSDRPS⁸GI⁹PERF
 SGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSNTDHWV¹⁰FGGGTKLTVL

Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son tal como se definen por Chothia *et al.* y E.A. Kabat *et al.* (Véanse Chothia, C, *et al.*, Nature 342:877-883 (1989); Kabat, EA, *et al.*, Sequences of Protein of immunological interest, quinta edición, US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office (1991)). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1D9 tienen las siguientes secuencias: EFAMH (SEQ ID NO: 8), codificada por la secuencia de ácido nucleico GAGTTCGCCATGCAC (SEQ ID NO: 5); GFVPEDGETIYAQKFQG (SEQ ID NO: 9), codificada por la secuencia de ácido nucleico GGT¹¹TTTGTTCCTGAAGATGGTGAGACAATCTACGCGCAGAAGTTCAGGGC (SEQ ID NO: 6); y DPLYTPGLEP (SEQ ID NO: 10), codificada por la secuencia de ácido nucleico GATCCCCTGTATACTCCGGGTCTTGAGCCT (SEQ

ID NO: 7). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1D9 tienen las siguientes secuencias: GGNIESKSVH (SEQ ID NO: 14), codificada por la secuencia de ácido nucleico GGGGGAACAACATTGAAAGTAAAGTGTGCAC (SEQ ID NO: 11); DDSRPS (SEQ ID NO: 15), codificada por la secuencia de ácido nucleico GATGATAGCGACCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 12); y QVWDSNTDHWV (SEQ ID NO: 16), codificada por la secuencia de ácido nucleico CAGGTGTGGGATAGTAATACTGATCATTGGGTG (SEQ ID NO: 13).

Un anticuerpo monoclonal frente a huRANTES a modo de ejemplo es el anticuerpo 1E4 descrito en el presente documento. Tal como se muestra a continuación, el anticuerpo 1E4 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 18) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 17 y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 3. Las secuencias de CDR se muestran en recuadros.

> Secuencia de ácido nucleico del dominio variable de cadena pesada de 1E4 (SEQ ID NO: 17):

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTTT
CCTGCAAGGTTTCCGGATACACCTCACTGAGTTCGCCATGCACATGGGTGCGACAGGCTCC
TGGAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGTTTTGTTCTGAAGATGGTGAGACAATCTACGCG
CAGAAGTTCAGGGCAGAGTCACCATGACCGAGGACACATCTACAGACACAGCCTACATGG

AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAACAATCCCTGTGA
TGAGGGTTCGTTTTCTGTTTGGGGGCAGGGGACCACGGTCACCGTCTCGAGT

> Secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de 1E4 (SEQ ID NO: 18):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTEFAMHWVRQAPGKGLEWMGGFVPEDGETIYA
QKFQGRVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDYAVYYCATDPLYEGSFSVWGQGTITVTVSS

> Secuencia de ácido nucleico de cadena ligera de 1E4 (SEQ ID NO: 3):

TCCTATGTGCTGACTCAGCCACCTCGGTGTGAGTGGCCCCAGGACAGACGGCCAGGATTA
CCTGTGGGGGAACAACATTGAAAGTAAAGTGTGCACATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCA
GGCCCCTGTGCTGGTGGTCTATGATGATAGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTC
TCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCTGACCATCAGCAGGGTCAAGCCGGGGATG
AGGCCGACTATTACTGTGAGGTGTGGGATAGTAATACTGATCATTGGGTGTTTCGGCGGAGG
GACCAAGCTCACCGTCCTA

> Secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera de 1E4 (SEQ ID NO: 4)

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGNNIESKSVHWYQKPGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERF
SGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYQVWDSNTDHWVFGGGTKLTVL

Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son tal como se definen por Chothia *et al.* y E.A. Kabat *et al.* (Véanse Chothia, C, *et al.*, Nature 342:877-883 (1989); Kabat, EA, *et al.*, Sequences of Protein of immunological interest, quinta edición, US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office (1991)). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo 1E4 tienen las siguientes secuencias: EFAMH (SEQ ID NO: 8), codificadas por la secuencia de ácido nucleico GAGTTCGCCATGCAC (SEQ ID NO: 5); GFVPEDGETIYAQKFQ (SEQ ID NO: 9), codificada por la secuencia de ácido nucleico GGTTTTGTTCCTGAAGATGGTGAGACAATCTACGCGAGAAGTCCAGGGC (SEQ ID NO: 6); y DPLYEGSFSV (SEQ ID NO: 20), codificada por la secuencia de ácido nucleico GATCCCTGTATGAGGGTCCGTTTTCTGTT (SEQ ID NO: 19). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo 1E4 tienen las siguientes secuencias: GGNIESKSVH (SEQ ID NO: 14), codificada por la secuencia de ácido nucleico GGGGGAACAACATTGAAAGTAAAGTGTGCAC (SEQ ID NO: 11); DDSRPS (SEQ ID NO: 15), codificada por la secuencia de ácido nucleico GATGATAGCGACCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 12); y QVWDSNTDHWV (SEQ ID NO: 16), codificada por la secuencia de ácido nucleico CAGGTGTGGGATAGTAATACTGATCATTGGGTG (SEQ ID NO: 13).

Un anticuerpo monoclonal frente a huRANTES a modo de ejemplo es el anticuerpo C8 descrito en el presente documento. Tal como se muestra a continuación, el anticuerpo C8 incluye una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 22) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 21 y una región variable de

cadena ligera (SEQ ID NO: 24) codificada por la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 23. Las secuencias de CDR se muestran en recuadros.

> Secuencia de ácido nucleico del dominio variable de cadena pesada de C8 (SEQ ID NO: 21)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCT
CCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGT[AGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCC
AGGCAAGGGGCTAGAGTGGGTGGCA][GTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTACGCA]
[GACTCCGTGAAGGGC]CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGC
AAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA[GAAACTTTCCC
CCACTACTACTACTACTACATGGACGTCTGGGGCCGGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCGAGT

> Secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de C8 (SEQ ID NO: 22)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS[SYAMH]WVRQAPGKGLEWVA[VISYDGSNKYYA]
[DSVKG]RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR[ETFPHYYYYYMDV]WGRGTLTVSS

> Secuencia de ácido nucleico del dominio variable de cadena ligera de C8 (SEQ ID NO: 23)

TCCTATGTGCTGACTCAGCCCCCTCGGTGTGCTGAGCCCCAGGGCAGACGGCCCCGCATTA
CCTGT[GAGGGAGACGACACTGACATTGGTACTGTCAAC]TGGTACCAGCAGAAACCAGGCCA
GGCCCCCTGTGTTGGTCATTAGT[GAGGATGGCTACCGGCCCTCA]GGGATCCCTGAACGATTC
TCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTTACCATCTCCAGGGTCGAGGCCGGGGATG
AGGCCGACTATTACTGT[CAGTTCTGGGATGTTGACAGTGATCATCCGGTT]TTCGGCGGAGG
GACCCAGCTCACCGTCCTA

> Secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera de C8 (SEQ ID NO: 24)

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITC[EGDDTDIGTVN]WYQOKPGQAPVLVIS[EDGYRPS]GIPERF
SGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC[QFWDVDSHPV]FGGGTQLTVL

Los aminoácidos que abarcan las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son tal como se definen por Chothia *et al.* y E.A. Kabat *et al.* (Véanse Chothia, C, *et al.*, Nature 342:877-883 (1989); Kabat, EA, *et al.*, Sequences of Protein of immunological interest, quinta edición, US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office (1991)). Las CDR de cadena pesada del anticuerpo C8 tienen las siguientes secuencias: SYAMH (SEQ ID NO: 28), codificada por la secuencia de ácido nucleico AGCTATGCTATGCAC (SEQ ID NO: 25); VISYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 29), codificada por la secuencia de ácido nucleico GTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTACGCACTCCGTGAAGGGC (SEQ ID NO: 26); y ETFPHYYYYYMDV (SEQ ID NO: 30), codificada por la secuencia de ácido nucleico GAAACTTTCCCCCACTACTACTACTACTACATGGACGTC (SEQ ID NO: 27). Las CDR de cadena ligera del anticuerpo C8 tienen las siguientes secuencias: EGDDTDIGTVN (SEQ ID NO: 34), codificada por la secuencia de ácido nucleico GAGGGAGACGACACTGACATTGGTACTGTCAAC (SEQ ID NO: 31); EDGYRPS (SEQ ID NO: 35), codificada por la secuencia de ácido nucleico GAGGATGGCTACCGGCCCTCA (SEQ ID NO: 32); y QFWDVDSHPV (SEQ ID NO: 36), codificada por la secuencia de ácido nucleico CAGTTCTGGGATGTTGACAGTGATCATCCGGTT (SEQ ID NO: 33).

A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos habituales en la técnica. Además, a menos que se requiera por el contexto de otra manera, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular e hibridación y química de proteínas y oligo o polinucleótidos descritas en el presente documento son las que se conocen bien y se usan comúnmente en la técnica. Se usan técnicas convencionales para síntesis de oligonucleótidos y ADN recombinante, así como cultivo tisular y transformación (por ejemplo, electroporación, lipofección). Se realizan reacciones enzimáticas y técnicas de purificación según las especificaciones del fabricante o tal como se logra comúnmente en la técnica o tal como se describe en el presente documento. Los procedimientos y técnicas anteriores se realizan generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y tal como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y tratan a lo largo de toda la presente memoria descriptiva. Véase por ejemplo, Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Las

nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos de laboratorio y técnicas de química analítica, química orgánica sintética y química farmacéutica y médica descritos en el presente documento son los bien conocidos y comúnmente usados en la técnica. Se usan técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, administración y tratamiento de pacientes.

Tal como se utilizan según la presente descripción, los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, se entenderá que tienen los siguientes significados:

Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” se refiere moléculas de inmunoglobulina y partes inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (Ig), es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona con) un antígeno. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena sencilla, fragmentos F_{ab} , $F_{ab'}$ y $F_{(ab')_2}$ y anticuerpos en una biblioteca de expresión de F_{ab} . Por “se une específicamente” o “inmunorreacciona con” quiere decirse que el anticuerpo reacciona con uno o más determinantes antigénicos del antígeno deseado y no reacciona (es decir, se une) con otros polipéptidos o se une a una afinidad mucho menor ($K_d > 10^{-6}$) con otros polipéptidos.

Se sabe que la unidad estructural básica del anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas de polipéptido, teniendo cada par una cadena “ligera” (aproximadamente 25 kDa) y una “pesada” (aproximadamente 50-70 kDa). La parte amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsable principalmente del reconocimiento del antígeno. La parte carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de una función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones constantes y variables están unidas por una región “J” de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región “D” de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase en general, Fundamental Immunology cap. 7 (Paul, W., ea., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo.

El término “anticuerpo monoclonal” (Acm) o “composición de anticuerpos monoclonales”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen sólo una especie molecular de molécula de anticuerpo que consiste en un único producto génico de cadena ligera y un único producto génico de cadena pesada. En particular, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. Los Acm contienen un sitio de unión a antígeno que puede inmunorreaccionar con un epítipo particular del antígeno caracterizado por una afinidad de unión única por el mismo.

En general, las moléculas de anticuerpo obtenidas de seres humanos se refieren a cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que difieren entre sí por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Determinadas clases tienen subclases también, tales como IgG₁, IgG₂ y otras. Además, en seres humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.

El término “sitio de unión a antígeno” o “parte de unión” se refiere a la parte de la molécula de inmunoglobulina que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión a antígeno está formado por residuos de aminoácido de las regiones variables (“V”) N-terminales de las cadenas pesadas (“H”) y ligeras (“L”). Tres tramos altamente divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesadas y ligeras, denominados “regiones hipervariables”, están interpuestos entre tramos flanqueantes más conservados conocidos como “regiones de entramado” o “FR”. Por tanto, el término “FR” se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran de manera natural entre, y adyacentes a, regiones hipervariables en inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada están dispuestas en relación entre sí en un espacio tridimensional para formar una superficie de unión a antígeno. La superficie de unión a antígeno es complementaria a la superficie tridimensional de un antígeno unido, y las tres regiones hipervariables de cada una de las cadenas pesadas y ligeras se denominan “regiones determinantes de complementariedad” o “CDR”. La asignación de aminoácidos a cada dominio es según las definiciones de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia *et al.* Nature 342:878-883 (1989).

Tal como se usa en el presente documento, el término “epítipo” incluye cualquier determinante proteico que pueda unirse específicamente a una inmunoglobulina o fragmento de la misma, o un receptor de células T. El término “epítipo” incluye cualquier determinante proteico que pueda unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T. Los determinantes epitópicos consisten habitualmente en agrupaciones de superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tienen habitualmente características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es $\leq 1 \mu\text{M}$; por ejemplo, $\leq 100 \text{ nM}$, preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$ y más preferiblemente $\leq 1 \text{ nM}$.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “unión inmunológica” y “propiedades de unión inmunológica” se refieren a las interacciones no covalentes del tipo que se producen entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el que la inmunoglobulina es específica. La fuerza, o afinidad de interacciones de unión inmunológica puede expresarse en cuanto a la constante de disociación (K_d) de la interacción, en la que una K_d más pequeña representa una mayor afinidad. Las propiedades de unión inmunológica de polipéptidos seleccionados se cuantifican usando métodos bien conocidos en la técnica. Un método de este tipo implica medir las velocidades de formación y disociación del complejo de sitio de unión a antígeno/antígeno, en el que las velocidades dependen de las concentraciones de las parejas del complejo, la afinidad de la interacción y parámetros geométricos que influyen igualmente en la velocidad en ambas direcciones. Por tanto, tanto la “constante de velocidad de asociación” (K_{on}) como la “constante de velocidad de disociación” (K_{off}) pueden determinarse mediante el cálculo de las concentraciones y las velocidades reales de asociación y disociación. (Véase Nature 361:186-87 (1993)). La razón de K_{off}/K_{on} permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y es igual a la constante de disociación K_d . (Véase, generalmente, Davies *et al.* (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Se dice que un anticuerpo de la presente invención se une específicamente a un epítipo de RANTES cuando la constante de unión en equilibrio (K_d) es $\leq 1 \mu\text{M}$, por ejemplo, $\leq 100 \text{ nM}$, preferiblemente $\leq 10 \text{ nM}$ y más preferiblemente $\leq 1 \text{ nM}$, tal como se mide mediante ensayos tales como ensayos de unión de radioligando o resonancia de plasmón superficial (SPR) o ensayos similares conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos frente a huRANTES proporcionados en el presente documento presentan una K_d en el intervalo de aproximadamente entre $\leq 10 \text{ nM}$ y aproximadamente 100 pM .

Los expertos en la técnica reconocerán que es posible determinar, sin experimentación excesiva, si un anticuerpo monoclonal humano tiene la misma especificidad que un anticuerpo monoclonal humano de la invención (por ejemplo, anticuerpo monoclonal D9, E4 o C8) determinando si el primero impide que este último se una a un polipéptido de antígeno de RANTES. Si el anticuerpo monoclonal humano que está sometiendo a prueba compite con un anticuerpo monoclonal humano de la invención, tal como se muestra mediante una disminución en la unión por el anticuerpo monoclonal humano de la invención, entonces los dos anticuerpos monoclonales se unen al mismo epítipo, o un epítipo estrechamente relacionado. Otra forma de determinar si un anticuerpo monoclonal humano tiene la especificidad de un anticuerpo monoclonal humano de la invención es preincubar el anticuerpo monoclonal humano de la invención con el polipéptido de antígeno de RANTES con el que normalmente es reactivo, y entonces añadir el anticuerpo monoclonal humano que está sometiendo a prueba para determinar si el anticuerpo monoclonal humano que está sometiendo a prueba se ve inhibido en su capacidad para unirse al polipéptido de antígeno de RANTES. Si el anticuerpo monoclonal humano que está sometiendo a prueba se inhibe, entonces, con toda probabilidad, tiene la misma especificidad epitópica, o funcionalmente equivalente, que el anticuerpo monoclonal de la invención.

Se usan diversos procedimientos conocidos dentro de la técnica para la producción de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra una proteína tal como una proteína RANTES, o contra derivados, fragmentos, análogos, homólogos u ortólogos de la misma. (Véase, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, y Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Anticuerpos completamente humanos son moléculas de anticuerpo en las que toda la secuencia de tanto la cadena ligera como la cadena pesada, incluyendo las CDR, surgen de genes humanos. Tales anticuerpos se denominan “anticuerpos humanos” o “anticuerpos completamente humanos” en el presente documento. Se preparan anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, usando los procedimientos descritos en los ejemplos proporcionados a continuación. También pueden prepararse anticuerpos monoclonales humanos usando la técnica del trioma; la técnica del hibridoma de células B humanas (véase Kozbor, *et al.*, 1983 Immunol Today 4: 72); y la técnica del hibridoma de VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase Cole, *et al.*, 1985 en: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Pueden utilizarse anticuerpos monoclonales humanos y pueden producirse usando hibridomas humanos (véase Cote, *et al.*, 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) o transformando células B humanas con virus de Epstein Barr *in vitro* (véase Cole, *et al.*, 1985 en: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96).

Los anticuerpos se purifican mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de afinidad usando proteína A o proteína G. Posterior o alternativamente, el antígeno específico que es la diana de la inmunoglobulina buscada, o un epítipo del mismo, puede inmovilizarse sobre una columna para purificar el anticuerpo específico inmunitario mediante cromatografía de inmuoafinidad. La purificación de inmunoglobulinas se trata, por ejemplo, por D. Wilkinson (The Scientist, publicado por The Scientist, Inc., Filadelfia PA, vol. 14, n.º 8 (17 de abril de 2000), págs. 25-28).

En algunos casos, puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a una función efectora, para potenciar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inmunidad. Por ejemplo, pueden introducirse residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una destrucción celular mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) aumentadas. (Véase Caron *et al.*, J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) y

Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)). Alternativamente, puede modificarse por ingeniería genética un anticuerpo para que tenga regiones Fc dobles y de ese modo pueda tener capacidades de CCDA y de lisis por el complemento potenciadas. (Véase Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)). En una realización preferida, los anticuerpos frente a huRANTES de la invención no están modificados con respecto a una función efectora.

La invención también incluye fragmentos de anticuerpos frente a huRANTES F_v, F_{ab}, F_{ab'} y F_{(ab')₂}, anticuerpos frente a huRANTES de cadena sencilla, anticuerpos frente a huRANTES biespecíficos y anticuerpos frente a huRANTES heteroconjugados.

Anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es por RANTES. La segunda diana de unión es cualquier otro antígeno, y en algunas realizaciones, la segunda diana de unión es una diana extracelular tal como una subunidad de receptor o receptor o proteína de la superficie celular.

Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la expresión conjunta de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes (Milstein y Cuello, Nature, 305:537-539 (1983)). Debido a la distribución al azar de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se logra habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. Se dan a conocer procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

Pueden fusionarse dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) con secuencias de dominios constantes de inmunoglobulinas. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere que tenga la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Se insertan ADN que codifican para las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, en vectores de expresión separados, y se transfectan conjuntamente en un organismo huésped adecuado. Para detalles adicionales de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

Otros enfoques para generar anticuerpos biespecíficos se describen, por ejemplo, en el documento WO 96/27011. Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos F(ab')₂). Se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando unión química. Véase por ejemplo, Brennan *et al.*, Science 229:81 (1985).

Adicionalmente, pueden recuperarse directamente fragmentos Fab' de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Véase por ejemplo, Shalaby *et al.*, J. Exp. Med. 175:217-225 (1992).

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Véase por ejemplo, Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992). La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993), ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. También se ha notificado otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase, Gruber *et al.*, J. Immunol. 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Véase, Tutt *et al.*, J. Immunol. 147:60 (1991).

Pueden unirse anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo a dos epítomos diferentes, al menos uno de los cuales se origina en el antígeno proteico de la invención. Alternativamente, puede combinarse un brazo anti-antigénico de una molécula de inmunoglobulina con un brazo que se une a una molécula de activación en un leucocito tal como una molécula de receptor de células T (por ejemplo CD2, IFN γ , CD28 o B7), o receptores de Fc para IgG (Fc γ R), tal como Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16) de modo que los mecanismos de defensa celular se concentran en la célula que expresa el antígeno particular. También pueden usarse anticuerpos biespecíficos para dirigir agentes citotóxicos a células que expresan un antígeno particular. Estos anticuerpos presentan un brazo de unión a antígeno y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelante de radionúclido, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al antígeno proteico descrito en el presente documento y se une además a factor tisular (TF).

Los anticuerpos heteroconjugados están también dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos unidos covalentemente. Se han propuesto tales anticuerpos, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (patente estadounidense n.º 4.676.980) y para el tratamiento de una infección por VIH (documentos WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Se contempla que los anticuerpos puedan prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteínas sintética, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuros o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y 4-mercaptobutirimidato de metilo y los dados a conocer, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 4.676.980.

La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Están disponibles una variedad de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re .

Se prepararan conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolileno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina ricina tal como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238: 1098 (1987). Ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de un radionucleótido al anticuerpo. (Véase el documento WO94/11026).

Los expertos habituales en la técnica reconocerán que pueden acoplarse una gran variedad de posibles restos a los anticuerpos resultantes o a otras moléculas de la invención. (Véase, por ejemplo, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse y R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, Nueva York, (1989).

El acoplamiento se logra mediante cualquier reacción química que unirá las dos moléculas siempre que el anticuerpo y el otro resto conserven sus respectivas actividades. Esta unión puede incluir cualquier mecanismo químico, por ejemplo unión covalente, unión de afinidad, intercalación, unión coordinada y complejación. Sin embargo, la unión preferida es la unión covalente. La unión covalente se logra o bien mediante condensación directa de cadenas laterales existentes o bien mediante la incorporación de moléculas de formación de puente externas. Muchos agentes de unión bivalentes o polivalentes son útiles en el acoplamiento de moléculas proteicas, tales como los anticuerpos de la presente invención, con otras moléculas. Por ejemplo, los agentes de acoplamiento representativos pueden incluir compuestos orgánicos tales como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de succinimida, diisocianatos, glutaraldehído, diazobencenos y hexametilendiaminas. Esta lista no pretende ser exhaustiva de las diversas clases de agentes de acoplamiento conocidos en la técnica sino, más bien, es a modo de ejemplo de los agentes de acoplamiento más comunes. (Véanse Killen y Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen *et al.*, Immunological Reviews 62:185-216 (1982); y Vitetta *et al.*, Science 238:1098 (1987). Se describen en la bibliografía ligadores preferidos. (Véase, por ejemplo, Ramakrishnan, S. *et al.*, Cancer Res. 44:201-208 (1984) que describen el uso de MBS (éster de M-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida). Véase también la patente estadounidense n.º 5.030.719, que describe el uso de derivado de acetilhidrazida halogenada acoplado a un anticuerpo por medio de un ligador oligopeptídico. Los ligadores particularmente preferidos incluyen: (i) EDC (clorhidrato de 1-metil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida); (ii) SMPT (4-succinimidiloxycarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)-tolueno) (Pierce Chem. Co., cat. (21558G); (iii) SPDP (6[3-(2-piridilditio)propionamido]hexanoato de succinimidilo) (Pierce Chem. Co., n.º de cat. 21651G); (iv) sulfo-LC-SPDP (6-[3-(2-piridilditio)-propanamida]hexanoato de sulfosuccinimidilo) (Pierce Chem. Co. n.º de cat. 2165-G); y (v) sulfo-NHS (N-hidroxisulfo-succinimida: Pierce Chem. Co., n.º de cat. 24510) conjugado con EDC.

El término "polinucleótido aislado" tal como se usa en el presente documento significará un polinucleótido de origen genómico, de ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen el "polinucleótido aislado" (1) no está asociado con todo o una parte de un polinucleótido en el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) está operativamente unido a un polinucleótido con el que no está unido en la naturaleza o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

El término “proteína aislada” al que se hace referencia en el presente documento significa una proteína de origen de ADNc, ARN recombinante o sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen, o fuente de derivación, la “proteína aislada” (1) no está asociada con proteínas encontradas en la naturaleza, (2) está libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, libre de proteínas murinas, (3) se expresa por una célula de una especie diferente o (4) no se produce en la naturaleza.

El término “polipéptido” se usa en el presente documento como un término genérico para referirse a fragmentos o análogos de proteína nativa de una secuencia de polipéptido. Por tanto, fragmentos y análogos de proteína nativa son especies del género polipéptido. Polipéptidos preferidos según la invención comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada humana presentadas en el presente documento y las moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera humana presentadas en el presente documento, así como moléculas de anticuerpo formadas por combinaciones que comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada con moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera, tales como moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera kappa y viceversa, así como fragmentos y análogos de los mismos.

El término “que se produce de manera natural” tal como se usa en el presente documento según se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido o secuencia de polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionadamente por el hombre en el laboratorio o de otra forma se produce de manera natural.

El término “operativamente unido” tal como se usa en el presente documento se refiere a que posiciones de componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar de su manera prevista. Una secuencia de control “operativamente unida” a una secuencia codificante está ligada de una forma tal que se logra la expresión de la secuencia codificante en condiciones compatibles con las secuencias de control.

El término “secuencia de control” tal como se usa en el presente documento se refiere a secuencias de polinucleótido que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de secuencias codificantes a las que están ligadas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped. En procariotas, tales secuencias de control incluyen generalmente un promotor, un sitio de unión al ribosoma y una secuencia de terminación de la transcripción. En eucariotas, generalmente, tales secuencias de control incluyen promotores y una secuencia de terminación de la transcripción. El término “secuencias de control” pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de parejas de fusión. El término “polinucleótido” tal como se le hace referencia en el presente documento significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, o bien ribonucleótidos o bien desoxinucleótidos o bien a una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas mono y bicatenarias de ADN.

El término oligonucleótido al que se hace referencia en el presente documento incluye nucleótidos que se producen de manera natural y modificados unidos entre sí por enlaces oligonucleotídicos que se producen de manera natural y que no se producen de manera natural. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótido que comprende generalmente una longitud de 200 bases o menos. Preferiblemente, los oligonucleótidos tienen de 10 a 60 bases de longitud y lo más preferiblemente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó de 20 a 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos son habitualmente monocatenarios, por ejemplo, para sondas, aunque los oligonucleótidos pueden ser bicatenarios, por ejemplo, para su uso en la construcción de un mutante génico. Los oligonucleótidos de la invención son oligonucleótidos o bien sentido o bien antisentido.

El término “nucleótidos que se producen de manera natural” al que se hace referencia en el presente documento incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término “nucleótidos modificados” al que se hace referencia en el presente documento incluye nucleótidos con grupos azúcar modificados o sustituidos y similares. El término “enlaces oligonucleotídicos” al que se hace referencia en el presente documento incluye enlaces oligonucleotídicos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforamidato y similares. Véanse por ejemplo, LaPlanche *et al.* Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec *et al.* J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein *et al.* Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon *et al.* Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon *et al.* Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, págs. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford Inglaterra (1991)); Stec *et al.* patente estadounidense n.º 5.151.510; Uhlmann y Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). Un oligonucleótido puede incluir un marcador para su detección, si se desea.

El término “se hibrida selectivamente” al que se hace referencia en el presente documento significa unirse detectable y específicamente. Polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos según la invención se hibridan selectivamente con hebras de ácido nucleico en condiciones de hibridación y lavado que minimizan cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos no específicos. Pueden usarse condiciones de alta rigurosidad para lograr condiciones de hibridación selectiva tal como se conoce en la técnica y se trata en el presente documento. Generalmente, la homología de secuencia de ácido nucleico entre los polinucleótidos, oligonucleótidos, y fragmentos de la invención y una secuencia de ácido nucleico de interés será de al menos el 80%, y más normalmente con homologías preferiblemente crecientes de al menos el 85%, el 90%, el 95%, el 99% y el 100%.

Dos secuencias de aminoácidos son homólogas si hay una identidad parcial o completa entre sus secuencias. Por ejemplo, un 85% de homología significa que el 85% de los aminoácidos son idénticos cuando las dos secuencias se alinean para obtener una coincidencia máxima. Se permiten huecos (en cualquiera de las dos secuencias que están haciéndose coincidir) en la maximización de la coincidencia. Se prefieren longitudes de hueco de 5 o menos, prefiriéndose más 2 o menos. Alternativa y preferiblemente, dos secuencias de proteína (o secuencias de polipéptido derivadas de las mismas de al menos 30 aminoácidos de longitud) son homólogas, tal como se usa este término en el presente documento, si tienen una puntuación de alineación de más de 5 (en unidades de desviación estándar) usando el programa ALIGN con la matriz de datos de mutación y una penalización por huecos de 6 o mayor. Véanse Dayhoff, M.O., en Atlas of Protein Sequence and Structure, págs. 101-110 (volumen 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) y Suplemento 2 a este volumen, págs. 1-10. Las dos secuencias o partes de las mismas son más preferiblemente homólogas si sus aminoácidos son más de o igual al 50% idénticos cuando se alinean de manera óptima usando el programa ALIGN. El término "corresponde a" se usa en el presente documento queriendo decir que una secuencia de polinucleótido es homóloga (es decir, es idéntica, no estrictamente relacionada evolutivamente) con toda o una parte de una secuencia de polinucleótido de referencia, o que una secuencia de polipéptido es idéntica a una secuencia de polipéptido de referencia. En contraposición, el término "complementario a" se usa en el presente documento queriendo decir que la secuencia complementaria es homóloga a toda o una parte de una secuencia de polinucleótido de referencia. Para ilustración, la secuencia de nucleótidos "TATAC" corresponde a una secuencia de referencia "TATAC" y es complementaria a una secuencia de referencia "GTATA".

Los siguientes términos se usan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más secuencias de aminoácidos o polinucleótido: "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad secuencial". Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida usada como base para una comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia mayor, por ejemplo, como un segmento de un ADNc de longitud completa o secuencia génica proporcionada en una lista de secuencias o puede comprender una secuencia génica o de ADNc completa. Generalmente, una secuencia de referencia tiene al menos 18 nucleótidos o 6 aminoácidos de longitud, frecuentemente al menos 24 nucleótidos o 8 aminoácidos de longitud, y a menudo al menos 48 nucleótidos o 16 aminoácidos de longitud. Puesto que dos polinucleótidos o secuencias de aminoácidos pueden comprender cada una (1) una secuencia (es decir, una parte de la secuencia de aminoácidos o polinucleótido completa) que es similar entre las dos moléculas y (2) puede comprender además una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos o secuencias de aminoácidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más) moléculas se realizan normalmente comparando las secuencias de las dos moléculas a lo largo de una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento conceptual de al menos 18 posiciones de nucleótido contiguas o 6 aminoácidos en el que una secuencia de polinucleótido o secuencia de aminoácidos puede compararse con una secuencia de referencia de al menos 18 nucleótidos contiguos o secuencias de 6 aminoácidos y en el que la parte de la secuencia de polinucleótido en la ventana de comparación puede comprender adiciones, delecciones, sustituciones, y similares (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o delecciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. Puede realizarse la alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en los paquetes de software Wisconsin Genetics Software Package versión 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks o MacVector), o mediante inspección, y se selecciona la mejor alineación (es decir, que da como resultado el mayor porcentaje de homología a lo largo de la ventana de comparación) generada por los diversos métodos.

El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de aminoácidos o polinucleótido son idénticas (es decir, en una base de nucleótido a nucleótido o de residuo a residuo) a lo largo de la ventana de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas óptimamente a lo largo de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que aparece la base de ácido nucleico (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) o residuo idéntico en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. El término "identidad sustancial" tal como se usa en el presente documento indica una característica de una secuencia de aminoácidos o polinucleótido, en el que el polinucleótido o aminoácido comprende una secuencia que tiene al menos el 85 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos del 90 al 95 por ciento de identidad de secuencia, más habitualmente al menos el 99 por ciento de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia a lo largo de una ventana de comparación de al menos 18 posiciones de nucleótido (6 aminoácidos), frecuentemente a lo largo de una ventana de al menos 24-48 posiciones de nucleótido (8-16 aminoácidos), en el que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia que puede incluir delecciones o adiciones que suman el 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia a lo largo de la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia mayor.

Tal como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase Immunology - A Synthesis (2ª edición, E.S. Golub y D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland Mass. (1991)). Estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos α,α -disustituidos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales pueden ser también componentes adecuados para polipéptidos de la presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilosina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos usada en el presente documento, la dirección a mano izquierda es la dirección amino-terminal y la dirección a mano derecha es la dirección carboxi-terminal, según la convención y el uso convencionales.

De manera similar, a menos que se especifique lo contrario, el extremo a mano izquierda de secuencias de polinucleótido monocatenarias es el extremo 5'. La dirección a mano izquierda de secuencias de polinucleótido bicatenarias se denomina dirección 5'. La dirección de adición de 5' a 3' de transcritos de ARN nacientes se denomina dirección de transcripción. Regiones de secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 5' con respecto al extremo 5' del transcrito de ARN se denominan "secuencias en el sentido de 5'", regiones de secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 3' con respecto al extremo 3' del transcrito de ARN se denominan "secuencias en el sentido de 3'".

Tal como se aplica a polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando pesos de hueco por defecto, comparten al menos el 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos el 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos el 95 por ciento de identidad de secuencia y lo más preferiblemente al menos el 99 por ciento de identidad de secuencia.

Preferiblemente, posiciones de residuos que no son idénticas difieren mediante sustituciones de aminoácidos conservativas.

Sustituciones de aminoácidos conservativas se refieren a la capacidad de intercambio de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas-de hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Grupos de sustituciones de aminoácidos conservativas preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutámico-aspartico y asparagina-glutamina.

Tal como se trata en el presente documento, se contempla que variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina están abarcadas por la presente invención, siempre que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, el 90%, el 95% y lo más preferiblemente el 99%. En particular, se contemplan reemplazos de aminoácidos conservativos. Reemplazos conservativos son los que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos codificados genéticamente se dividen generalmente en familias: (1) aminoácidos ácidos son aspartato, glutamato; (2) aminoácidos básicos son lisina, arginina, histidina; (3) aminoácidos no polares son alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano y (4) aminoácidos polares no cargados son glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Los aminoácidos hidrófilos incluyen arginina, asparagina, aspartato, glutamina, glutamato, histidina, lisina, serina y treonina. Los aminoácidos hidrófobos incluyen alanina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y valina. Otras familias de aminoácidos incluyen (i) serina y treonina, que son la familia alifática-de hidroxilo; (ii) asparagina y glutamina, que son la familia que contiene amida; (iii) alanina, valina, leucina e isoleucina, que son la familia alifática; y (iv) fenilalanina, triptófano y tirosina, que son la familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina o un reemplazo similar de un aminoácido por un aminoácido relacionado estructuralmente no tendrá un efecto importante sobre la unión o las propiedades de la molécula resultante, especialmente si el reemplazo no implica un aminoácido dentro de un sitio de entramado. Si un cambio de aminoácido da como resultado un péptido funcional puede determinarse fácilmente sometiendo a ensayo la actividad específica del derivado de polipéptido. Se describen ensayos en detalle en el presente documento. Los expertos en la técnica pueden preparar fácilmente fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina. Aparecen extremos amino- y carboxi-terminales preferidos de fragmentos o análogos cerca de los límites de dominios funcionales. Pueden identificarse dominios estructurales y funcionales mediante la comparación de los datos de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos con bases de datos de secuencias públicas o registradas. Preferiblemente, se usan métodos de comparación informatizados para identificar motivos de secuencia o dominios

de conformación de proteínas pronosticados que aparecen en otras proteínas de estructura y/o función conocida. Se conocen métodos para identificar secuencias de proteínas que se pliegan para dar una estructura tridimensional conocida. Bowie *et al.* Science 253:164 (1991). Por tanto, los ejemplos anteriores demuestran que los expertos en la técnica pueden reconocer motivos de secuencia y conformaciones estructurales que pueden usarse para definir dominios estructurales y funcionales según la invención.

Sustituciones de aminoácidos preferidas son las que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos proteicos, (4) alteran las afinidades de unión y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de tales análogos. Los análogos pueden incluir diversas mutaciones de una secuencia distinta de la secuencia peptídica que se produce de manera natural. Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples (preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia que se produce de manera natural (preferiblemente en la parte del polipéptido fuera del/de los dominio(s) que forma(n) contactos intermoleculares). Una sustitución de aminoácidos conservativa no debe cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debe tender a romper una hélice que aparece en la secuencia original, o alterar otros tipos de estructura secundaria que caracteriza a la secuencia original). Se describen ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas en la técnica en Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thornton *et al.* Nature 354:105 (1991).

El término "fragmento de polipéptido" tal como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que tiene una delección amino-terminal y/o carboxi-terminal, pero en el que el resto de la secuencia de aminoácidos es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia que se produce de manera natural deducida, por ejemplo, a partir de una secuencia de ADNc de longitud completa. Los fragmentos tienen normalmente al menos 5, 6, 8 ó 10 aminoácidos de largo, preferiblemente al menos 14 aminoácidos de largo, más preferiblemente al menos 20 aminoácidos de largo, habitualmente al menos 50 aminoácidos de largo e incluso más preferiblemente al menos 70 aminoácidos de largo. El término "análogo" tal como se usa en el presente documento se refiere a polipéptidos que están compuestos por un segmento de al menos 25 aminoácidos que tiene identidad sustancial con una parte de una secuencia de aminoácidos deducida y que tiene al menos una de las siguientes propiedades: (1) unión específica a RANTES, en condiciones de unión adecuadas o (2) capacidad para bloquear la unión a RANTES apropiada. Normalmente, los análogos de polipéptido comprenden una sustitución de aminoácidos conservativa (o adición o delección) con respecto a la secuencia que se produce de manera natural. Los análogos tienen normalmente al menos 20 aminoácidos de largo, preferiblemente al menos 50 aminoácidos de largo o más, y a menudo pueden ser tan largos como un polipéptido que se produce de manera natural de longitud completa.

Se usan comúnmente análogos peptídicos en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido molde. Estos tipos de compuesto no peptídico se denominan "miméticos peptídicos" o "peptidomiméticos". Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986), Veber y Freidinger TIBS p. 392 (1985); y Evans *et al.* J. Med. Chem. 30:1229 (1987). Tales compuestos se desarrollan a menudo con la ayuda de modelado molecular informatizado. Pueden usarse miméticos peptídicos que son estructuralmente similares a péptidos terapéuticamente útiles para producir un efecto profiláctico o terapéutico equivalente. Generalmente, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido modelo (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), tal como un anticuerpo humano, pero tienen uno o más enlaces peptídicos reemplazados opcionalmente por un enlace seleccionado del grupo que consiste en: --CH₂NH--, --CH₂S--, --CH₂-CH₂--, --CH=CH-- (cis y trans), --COCH₂--, CH(OH)CH₂-- y -CH₂SO--, mediante métodos bien conocidos en la técnica. Puede usarse la sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso por un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) para generar péptidos más estables. Además, pueden generarse péptidos constreñidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de secuencia consenso sustancialmente idéntica mediante métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992)); por ejemplo, añadiendo residuos de cisteína internos que pueden formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

El término "agente" se usa en el presente documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto preparado a partir de materiales biológicos.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "etiqueta" o "marcado" se refieren a la incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, mediante incorporación de un aminoácido radiomarcado o unión a un polipéptido de restos biotinilo que puede detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante métodos ópticos o calorimétricos). En determinadas situaciones, la etiqueta o el marcador también puede ser terapéutico. Se conocen en la técnica diversos métodos de marcaje de polipéptidos y glicoproteínas y pueden usarse. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánido), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa del rábano, p-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), quimioluminiscente, grupos biotinilo, epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador

secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítipo). En algunas realizaciones, se unen marcadores mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico potencial. El término "fármaco o agente farmacéutico" tal como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto químico o composición que puede inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra apropiadamente a un paciente.

Otros términos de química en el presente documento se usan según el uso convencional en la técnica, tal como se muestra a modo de ejemplo por The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Tal como se usa en el presente documento, "sustancialmente puro" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferiblemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en la que la especie objeto comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes.

Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, más preferiblemente más de aproximadamente el 85%, el 90%, el 95% y el 99%. Lo más preferiblemente, la especie objeto se purifica hasta homogeneidad sustancial (no pueden detectarse especies contaminantes en la composición mediante métodos de detección convencionales) en la que la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

El término paciente incluye sujetos humanos y veterinarios. El término sujeto incluye seres humanos y otros mamíferos.

Anticuerpos humanos y humanización de anticuerpos

Se genera un anticuerpo frente a huRANTES, por ejemplo, usando los procedimientos descritos en los ejemplos proporcionados a continuación.

En otros métodos alternativos, se desarrolla un anticuerpo frente a huRANTES, por ejemplo, usando métodos de presentación in vivo usando anticuerpos que contienen sólo secuencias humanas. Tales enfoques se conocen bien en la técnica, por ejemplo, en el documento WO92/01047 y la patente estadounidense n.º 6.521.404. En este enfoque, se examina una biblioteca combinatoria de fagos que portan pares al azar de cadenas pesadas y ligeras usando una fuente natural o recombinante de RANTES o fragmentos del mismo. En otro enfoque, puede producirse un anticuerpo frente a huRANTES mediante un procedimiento en el que al menos una etapa del procedimiento incluye inmunizar un animal transgénico, no humano con proteína RANTES humana. En este enfoque, se han inutilizado algunos de los loci de cadena ligera kappa y/o pesada endógenos de este animal no humano xenogénico y no pueden experimentar el reordenamiento requerido para generar genes que codifican para inmunoglobulinas en respuesta a un antígeno. Además, al menos un locus de cadena pesada humana y al menos un locus de cadena ligera humana se han transfectado de manera estable en el animal. Por tanto, en respuesta a un antígeno administrado, los loci humanos se reordenan para proporcionar genes que codifican para regiones variables humanas inmunoespecíficas para el antígeno. Tras la inmunización, por tanto, el xenorratón produce células B que secretan inmunoglobulinas completamente humanas.

Se conocen bien una variedad de técnicas en la técnica para producir animales no humanos xenogénicos. Por ejemplo, véanse las patentes estadounidenses n.º 6.075.181 y n.º 6.150.584. Se demostró esta estrategia general en relación con la generación de las primeras cepas XenoMouse™ tal como se publicó en 1994. Véase Green *et al.* Nature Genetics 7:13-21 (1994). Véanse también las patentes estadounidenses n.ºs 6.162.963, 6.150.584, 6.114.598, 6.075.181 y 5.939.598 y las patentes japonesas n.ºs 3 068 180 B2, 3 068 506 B2 y 3 068 507 B2 y la patente europea n.º EP 0 463 151 B1 y las solicitudes de patentes internacionales n.ºs WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310 y miembros relacionados de la familia.

En un enfoque alternativo, otros han utilizado un enfoque de "minilocus" en el que se imita un locus de Ig exógeno a través de la inclusión de trozos (genes individuales) del locus de Ig. Por tanto, se forman uno o más genes V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, una región constante mu y una segunda región constante (preferiblemente una región constante gamma) en un constructo para su inserción en un animal. Véanse por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.545.806; 5.545.807; 5.591.669; 5.612.205; 5.625.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.643.763; 5.661.016; 5.721.367; 5.770.429; 5.789.215; 5.789.650; 5.814.318; 5.877.397; 5.874.299; 6.023.010; y 6.255.458; y la patente europea n.º 0 546 073 B1; y las solicitudes de patentes internacionales n.ºs WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 y WO 98/24884 y miembros relacionados de la familia.

También se ha demostrado la generación de anticuerpos humanos a partir de ratones en los que, a través de fusión de microcélulas, se han introducido trozos grandes de cromosomas o cromosomas enteros. Véanse las solicitudes

de patentes europeas n.^{os} 773 288 y 843 961.

Las respuestas de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) han conducido a la industria a preparar anticuerpos humanos o humanizados de otra forma. Mientras que los anticuerpos quiméricos tienen una región constante humana y una región variable inmunitaria, se espera que se observen determinadas respuestas de anticuerpos anti-quiméricos humanos (HACA), particularmente en utilizaciones crónicas o de múltiples dosis del anticuerpo. Por tanto, sería deseable proporcionar anticuerpos completamente humanos contra RANTES con el fin de reducir o mitigar de otra forma problemas y/o efectos de la respuesta HAMA o HACA.

La producción de anticuerpos con inmunogenicidad reducida se logra también por medio de inmunización, quimerización y técnicas de presentación usando bibliotecas apropiadas. Se apreciará que pueden humanizarse o primatizarse anticuerpos murinos o anticuerpos de otras especies usando técnicas bien conocidas en la técnica. Véanse por ejemplo, Winter y Harris *Immunol Today* 14:43-46 (1993) y Wright *et al.* *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992). El anticuerpo de interés puede modificarse por ingeniería genética mediante técnicas de ADN recombinante para sustituir los dominios CH1, CH2, CH3, bisagra y/o el dominio de entramado por la correspondiente secuencia humana (véanse el documento WO 92102190 y las patentes estadounidenses n.^{os} 5.530.101, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.792, 5.714.350 y 5.777.085). Además, el uso de ADNc de Ig para la construcción de genes de inmunoglobulina quiméricos se conoce en la técnica (Liu *et al.* *P.N.A.S.* 84:3439 (1987) y J. *Immunol.* 139:3521 (1987)). Se aísla ARNm a partir de un hibridoma u otra célula que produce el anticuerpo y se usa para producir ADNc. El ADNc de interés puede amplificarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos (patentes estadounidenses n.^{os} 4.683.195 y 4.683.202). Alternativamente, se prepara una biblioteca y se examina para aislar la secuencia de interés. Entonces se fusiona la secuencia de ADN que codifica para la región variable del anticuerpo con secuencias de regiones constantes humanas. Las secuencias de genes de regiones constantes humanas pueden encontrarse en Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of immunological Interest*, publicación del N.I.H. n.º 91-3242. Están fácilmente disponibles genes de regiones C humanas a partir de clones conocidos. La elección del isotipo estará guiada por las funciones efectoras deseadas, tales como fijación del complemento o actividad en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Isotipos preferidos son IgG1, IgG3 e IgG4. Pueden usarse cualquiera de las regiones constantes de cadenas ligeras humanas kappa o lambda. El anticuerpo quimérico humanizado se expresa entonces por métodos convencionales.

Pueden prepararse fragmentos de anticuerpo, tales como Fv, F(ab')₂ y Fab mediante escisión de la proteína intacta, por ejemplo, mediante escisión química o con proteasas. Alternativamente, se diseña un gen truncado. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica para una parte del fragmento F(ab')₂ incluiría secuencias de ADN que codifican para el dominio CH1 y la región bisagra de la cadena H, seguido por un codón de terminación de la traducción para producir la molécula truncada.

Pueden usarse secuencias consenso de regiones H y L J para diseñar oligonucleótidos para su uso como cebadores para introducir sitios de restricción útiles en la región J para la unión posterior de segmentos de regiones V a segmentos de regiones C humanas. El ADNc de la región C puede modificarse mediante mutagénesis dirigida al sitio para colocar un sitio de restricción en la posición análoga en la secuencia humana.

Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, YAC, episomas derivados de VEB, y similares. Un vector conveniente es uno que codifica para una secuencia de inmunoglobulina CH o CL humana funcionalmente completa, con sitios de restricción apropiados diseñados de modo que cualquier secuencia V_H o V_L pueda insertarse y expresarse fácilmente. En tales vectores, el corte y empalme se produce habitualmente entre el sitio donador de corte y empalme en la región J insertada y el sitio aceptor de corte y empalme que precede a la región C humana, y también en las regiones de corte y empalme que aparecen dentro de los exones CH humanos. La poliadenilación y terminación de la transcripción se producen en sitios cromosómicos nativos en el sentido de 3' de las regiones codificantes. El anticuerpo quimérico resultante puede unirse a cualquier promotor fuerte, incluyendo LTR retrovirales, por ejemplo, promotor temprano de SV-40 (Okayama *et al.* *Mol. Cell. Bio.* 3:280 (1983)), LTR del virus del sarcoma de Rous (Gorman *et al.* *P.N.A.S.* 79:6777 (1982)) y LTR del virus de la leucemia murina de moloney (Grosschedl *et al.* *Cell* 41:885 (1985)). Además, tal como se apreciará, pueden usarse promotores de Ig nativos y similares.

Además, pueden generarse anticuerpos humanos o anticuerpos de otra especie a través de tecnologías de tipo presentación, incluyendo, sin limitación, presentación en fago, presentación retroviral, presentación ribosómica y otras técnicas, usando técnicas bien conocidas la técnica y las moléculas resultantes pueden someterse a maduración adicional, tal como maduración por afinidad, ya que tales técnicas se conocen bien en la técnica. Wright *et al.* *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992), Hanes y Plückthun *PNAS USA* 94:4937-4942 (1997) (presentación ribosómica), Parmley y Smith *Gene* 73:305-318 (1988) (presentación en fago), Scott, *TIBS*, vol. 17:241-245 (1992), Cwirla *et al.* *PNAS USA* 87:6378-6382 (1990), Russel *et al.* *Nucl. Acids Research* 21:1081-1085 (1993), Hoganboom *et al.* *Immunol. Reviews* 130:43-68 (1992), Chiswell y McCafferty *TIBTECH*; 10:80-8A (1992) y patente estadounidense n.º 5.733.743. Si se utilizan técnicas de presentación para producir anticuerpos que no son humanos, tales anticuerpos pueden humanizarse tal como se describió anteriormente.

Usando estas técnicas, pueden generarse anticuerpos frente a células que expresan RANTES, la propia RANTES,

formas de RANTES, epítomos o péptidos de la misma y bibliotecas de expresión para la misma (véase por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.703.057) que después de eso pueden examinarse tal como se describió anteriormente para detectar las actividades descritas anteriormente.

5

Diseño y generación de otros agentes terapéuticos

Según la presente invención y basándose en la actividad de los anticuerpos que se producen y caracterizan en el presente documento con respecto a RANTES, se facilita el diseño de otras modalidades terapéuticas más allá de restos de anticuerpo. Tales modalidades incluyen, sin limitación, agentes terapéuticos de anticuerpos avanzados, tales como anticuerpos biespecíficos, inmunotoxinas y agentes terapéuticos radiomarcados, generación de agentes terapéuticos peptídicos, terapias génicas, particularmente intracuerpos, agentes terapéuticos antisentido y moléculas pequeñas.

15

Por ejemplo, en relación con anticuerpos biespecíficos, pueden generarse anticuerpos biespecíficos que comprenden (i) dos anticuerpos uno con una especificidad frente a RANTES y otro frente a una segunda molécula que se conjugan entre sí, (ii) un único anticuerpo que tiene una cadena específica frente a RANTES y una segunda cadena específica frente a una segunda molécula o (iii) un anticuerpo de cadena sencilla que tiene especificidad frente a RANTES y una segunda molécula. Tales anticuerpos biespecíficos se generan usando técnicas que se conocen bien, por ejemplo, en relación con (i) y (ii) véanse por ejemplo, Fanger *et al.* Immunol Methods 4: 72-81 (1994) y Wright *et al.* Crit. Reviews in Immunol. 12:125-168 (1992), y en relación con (iii) véase por ejemplo, Trautner *et al.* Int. J. Cancer (supl.) 7:51-52 (1992).

20

En relación con inmunotoxinas, pueden modificarse anticuerpos para que actúen como inmunotoxinas utilizando técnicas que se conocen bien en la técnica. Véase por ejemplo, Vitetta Immunol Today 14:252 (1993). Véase también la patente estadounidense n.º 5.194.594. En relación con la preparación de anticuerpos radiomarcados, tales anticuerpos modificados también pueden prepararse fácilmente utilizando técnicas que se conocen bien en la técnica. Véase por ejemplo, Junghans *et al.* en Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2ª edición, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). Véanse también las patentes estadounidenses n.ºs 4.681.581, 4.735.210, 5.101.827, 5.102.990 (RE 35.500), 5.648.471 y 5.697.902. Cada una de las inmunotoxinas y moléculas radiomarcadas sería probable que destruyese células que expresan RANTES.

30

En relación con la generación de péptidos terapéuticos, a través de la utilización de información estructural relacionada con RANTES y anticuerpos frente a la misma, tal como los anticuerpos de la invención o el examen de bibliotecas de péptidos, pueden generarse péptidos terapéuticos que están dirigidos contra RANTES. El diseño y el examen de agentes terapéuticos peptídicos se trata en relación con Houghten *et al.* Biotechniques 13:412-421 (1992), Houghten PNAS USA 82:5131-5135 (1985), Pinalla *et al.* Biotechniques 13:901-905 (1992), Blake y Litz-Davis BioConjugate Chem. 3:510-513 (1992). También pueden prepararse inmunotoxinas y moléculas radiomarcadas, y de una manera similar, en relación con restos peptídicos tal como se trató anteriormente en relación con anticuerpos. Suponiendo que la molécula de RANTES (o una forma, tal como una variante de corte y empalme o una forma alternativa) es funcionalmente activa en un proceso patológico, también será posible diseñar un gen y agentes terapéuticos antisentido frente al mismo a través de técnicas convencionales. Tales modalidades pueden utilizarse para modular la función de RANTES. En relación con lo mismo los anticuerpos de la presente invención facilitan el diseño y uso de ensayos funcionales relacionados con los mismos. Se trata en detalle un diseño y estrategia para agentes terapéuticos antisentido en la solicitud de patente internacional n.º WO 94/29444. Se conocen bien diseños y estrategias para terapia génica. Sin embargo, en particular, el uso de técnicas terapéuticas génicas que implican intracuerpos podría demostrar ser particularmente ventajoso. Véase por ejemplo, Chen *et al.* Human Gene Therapy 5:595-601 (1994) y Marasco Gene Therapy 4:11-15 (1997). El diseño general de y consideraciones relacionadas con agentes terapéuticos génicos se trata también en la solicitud de patente internacional n.º WO 97/38137.

40

45

50

El conocimiento recogido de la estructura de la molécula de RANTES y sus interacciones con otras moléculas según la presente invención, tales como los anticuerpos de la invención y otros puede utilizarse para diseñar racionalmente modalidades terapéuticas adicionales. En este sentido, pueden utilizarse técnicas de diseño de fármacos racionales tales como cristalografía de rayos X, modelado molecular ayudado (o asistido) por ordenador (CAMM), relación de estructura-actividad cuantitativa o cualitativa (QSAR) y tecnologías similares para centrarse en esfuerzos de descubrimiento de fármacos. El diseño racional permite la predicción de estructuras sintéticas o de proteínas que pueden interaccionar con la molécula o formas específicas de la misma que pueden usarse para modificar o modular la actividad de RANTES. Tales estructuras pueden sintetizarse químicamente o expresarse en sistemas biológicos. Este enfoque se ha revisado en Capsey *et al.* Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs (Stockton Press, NY (1988)). Además, pueden diseñarse y sintetizarse bibliotecas combinatorias y usarse en programas de examen, tales como esfuerzos de examen de alto rendimiento.

60

Administración terapéutica y formulaciones

65

Se apreciará que la administración de entidades terapéuticas según la invención puede administrarse con portadores, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan en formulaciones para proporcionar transferencia, administración, tolerancia mejoradas, y similares. Puede encontrarse una multitud de formulaciones apropiadas en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences (15ª ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), particularmente el capítulo 87 por Blaug, Seymour, en el mismo. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, jaleas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como Lipofectin™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite, emulsiones de carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada en tratamientos y terapias según la presente invención, siempre que el principio activo en la formulación no se inactive por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Véanse también Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance". Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals". Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts". J Pharm Sci. 89(8):967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998) y las menciones en los mismos para información adicional relacionada con formulaciones, excipientes y portadores bien conocidos por químicos farmacéuticos.

Los anticuerpos frente a huRANTES y las formulaciones terapéuticas de la invención, que incluyen un anticuerpo frente a huRANTES de la invención pueden usarse para tratar o aliviar isquemia, una indicación clínica asociada con isquemia, lesión por reperfusión, un síntoma asociado con un trastorno relacionado con la inmunidad, tal como, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio. La invención proporciona anticuerpos para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio.

Las enfermedades autoinmunitarias incluyen, por ejemplo, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA, que es una enfermedad viral con un componente autoinmunitario), alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad de Addison autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno (EAOI), síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (SLPA), púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (PTA), enfermedad de Behcet, cardiomiopatía, esprúe celiaco-dermatitis herpetiforme; síndrome de disfunción inmunitaria y fatiga crónica (SDIFC), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC), penfigoide cicatricial, enfermedad de aglutininas frías, síndrome de Crest, enfermedad de Crohn, enfermedad de Degos, dermatomiositis juvenil, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), nefropatía de IgA, diabetes mellitus insulino dependiente, artritis crónica juvenil (enfermedad de Still), artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, miastenia grave, anemia perniciosa, poliarteritis nudosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia (esclerosis sistémica progresiva (ESP), también conocida como esclerosis sistémica (ES)), síndrome de Sjögren, síndrome de Stiffman, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vitíligo y granulomatosis de Wegener.

Los trastornos inflamatorios incluyen, por ejemplo, trastornos inflamatorios crónicos y agudos. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen enfermedad de Alzheimer, asma, alergia atópica, alergia, aterosclerosis, asma bronquial, eccema, glomerulonefritis, enfermedad de injerto contra huésped, anemias hemolíticas, osteoartritis, septicemia, accidente cerebrovascular, trasplante de tejido y órganos, vasculitis, retinopatía diabética y lesión pulmonar inducida por ventilador.

Los anticuerpos frente a huRANTES modulan una respuesta inmunitaria en un sujeto, por ejemplo, en un sujeto humano y órgano trasplantado. Tal como se da a conocer en el presente documento, el antagonista de RANTES, anticuerpo frente a huRANTES, fragmento del mismo o formulación terapéutica del mismo puede usarse para tratar isquemia, una indicación clínica asociada con isquemia, lesión por reperfusión y/u otro trastorno relacionado con la inmunidad conjuntamente con un tratamiento quirúrgico u otra terapia de intervención usada en la técnica para tratar un trastorno dado. Por ejemplo, las terapias de intervención usadas en el tratamiento de isquemia, una indicación clínica asociada con isquemia y/o lesión por reperfusión incluyen intervención quirúrgica o angioplastia. El antagonista de RANTES, anticuerpo frente a huRANTES, fragmento del mismo o formulación terapéutica del mismo se administra simultáneamente (es decir, durante) la terapia de intervención, o el antagonista de RANTES, anticuerpo frente a huRANTES, fragmento del mismo o formulación terapéutica del mismo se administra a un tiempo diferente que la terapia de intervención. Por ejemplo, el antagonista de RANTES, anticuerpo frente a huRANTES, fragmento del mismo o formulación terapéutica del mismo puede administrarse tras una terapia de intervención.

El antagonista de RANTES, anticuerpo frente a huRANTES, fragmento del mismo o formulación terapéutica del mismo usado para tratar isquemia, una indicación clínica asociada con isquemia, lesión por reperfusión y/u otro trastorno relacionado con inmunidad puede administrarse en combinación con cualquiera de una variedad de

agentes anti-citocina o agentes anti-quimiocina. Los agentes anti-citocina o anti-quimiocina adecuados reconocen, por ejemplo, citocinas tales como interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 e IL-31, y/o quimiocinas tales como MIP1 alfa, MIP1 beta, RANTES, MCP1, RANTES, ITAC, MIG, SDF y fractalquina.

El antagonista de RANTES, anticuerpo frente a huRANTES, fragmento del mismo o formulación terapéutica del mismo dado a conocer en el presente documento y usado para tratar isquemia, una indicación clínica asociada con isquemia, lesión por reperfusión y/u otro trastorno relacionado con inmunidad puede administrarse conjuntamente con uno o más agentes adicionales, o una combinación de agentes adicionales. Por ejemplo, el antagonista de RANTES (por ejemplo, anticuerpo frente a huRANTES) y el agente adicional se formulan en una única composición terapéutica, y el antagonista de RANTES y el agente adicional se administran simultáneamente. De manera alternativa, el antagonista de RANTES y el agente adicional están separados entre sí, por ejemplo, cada uno se formula en una composición terapéutica separada, y el antagonista de RANTES y el agente adicional se administran simultáneamente, o el antagonista de RANTES y el agente adicional se administran a diferentes tiempos durante un régimen de tratamiento. Por ejemplo, el antagonista de RANTES (por ejemplo, anticuerpo frente a huRANTES) se administra antes de la administración del agente adicional, el antagonista de RANTES se administra posteriormente a la administración del agente adicional o el antagonista de RANTES y el agente adicional se administran de un modo alterno. Tal como se describe en el presente documento, el antagonista de RANTES y el agente adicional se administran en una única dosis o en múltiples dosis.

Por ejemplo, en el tratamiento de arteriopatía coronaria, el antagonista de RANTES, anticuerpo frente a huRANTES, fragmento del mismo o formulación terapéutica del mismo se administra conjuntamente con uno o más agentes adicionales tales como medicamentos hipocolesterolémiantes, tales como estatinas; anticoagulantes, tales como heparina y/o anticoagulantes orales tales como warfarina y dicumarol; aspirina y otros medicamentos antiplaquetarios; inhibidores de ACE (enzima convertidora de angiotensina), tales como inhibidores de ACE que contienen sulfhidrilo (por ejemplo, captopril), inhibidores de ACE que contienen dicarboxilato (por ejemplo, enalapril, ramipril, quinapril, perindopril, lisinopril, benazepril); inhibidores de ACE que contienen fosfonato (por ejemplo, fosinopril); betabloqueantes; bloqueantes de canales de calcio; nitroglicerina; nitratos de actuación larga; inhibidores de glicoproteína IIb-IIIa; y agentes trombolíticos. El antagonista de RANTES y el agente adicional se administran simultáneamente, o el antagonista de RANTES y el agente adicional se administran a diferentes tiempos durante un régimen de tratamiento.

Por ejemplo, en el tratamiento de enfermedad vascular cerebral, el antagonista de RANTES, anticuerpo frente a huRANTES, fragmento del mismo o formulación terapéutica del mismo se administra conjuntamente con uno o más agentes adicionales tales como medicamentos hipocolesterolémiantes, tales como estatinas, aspirina y otros medicamentos antiplaquetarios. El antagonista de RANTES y el agente adicional se administran simultáneamente, o el antagonista de RANTES y el agente adicional se administran a diferentes tiempos durante un régimen de tratamiento.

Por ejemplo, en el tratamiento de isquemia cardíaca, el antagonista de RANTES, anticuerpo frente a huRANTES, fragmento del mismo o formulación terapéutica del mismo se administra conjuntamente con uno o más agentes adicionales tales como aspirina y otros medicamentos antiplaquetarios; inhibidores de ACE (enzima convertidora de angiotensina), tales como inhibidores de ACE que contienen sulfhidrilo (por ejemplo, captopril), inhibidores de ACE que contienen dicarboxilato (por ejemplo, enalapril, ramipril, quinapril, perindopril, lisinopril, benazepril); inhibidores de ACE que contienen fosfonato (por ejemplo, fosinopril); betabloqueantes; bloqueantes de canales de calcio; nitroglicerina; y nitratos de actuación larga. El antagonista de RANTES y el agente adicional se administran simultáneamente, o el antagonista de RANTES y el agente adicional se administran a diferentes tiempos durante un régimen de tratamiento.

Por ejemplo, en el tratamiento de isquemia miocárdica, el antagonista de RANTES, anticuerpo frente a huRANTES, fragmento del mismo o formulación terapéutica del mismo se administra conjuntamente con uno o más agentes adicionales tales como betabloqueantes; bloqueantes de canales de calcio; nitroglicerina; y nitratos de actuación larga. El antagonista de RANTES y el agente adicional se administran simultáneamente, o el antagonista de RANTES y el agente adicional se administran a diferentes tiempos durante un régimen de tratamiento.

Por ejemplo, en el tratamiento de isquemia renal, el antagonista de RANTES, anticuerpo frente a huRANTES, fragmento del mismo o formulación terapéutica del mismo se administra conjuntamente con uno o más agentes adicionales tales como medicamentos hipocolesterolémiantes, tales como aspirina, y otros medicamentos antiplaquetarios. El antagonista de RANTES y el agente adicional se administran simultáneamente, o el antagonista de RANTES y el agente adicional se administran a diferentes tiempos durante un régimen de tratamiento.

Por ejemplo, en el tratamiento de enfermedad vascular periférica, el antagonista de RANTES, anticuerpo frente a huRANTES, fragmento del mismo o formulación terapéutica del mismo se administra conjuntamente con uno o más agentes adicionales tales como anticoagulantes, tales como heparina y/o anticoagulantes orales tales como warfarina y dicumarol; aspirina y otros medicamentos antiplaquetarios; pentoxifilina; cilostazol; y agentes trombolíticos. El antagonista de RANTES y el agente adicional se administran simultáneamente, o el antagonista de

RANTES y el agente adicional se administran a diferentes tiempos durante un régimen de tratamiento.

Por ejemplo, en el tratamiento de esclerosis múltiple, el anticuerpo frente a huRANTES o formulación terapéutica del mismo se administra conjuntamente con uno o más agentes adicionales tales como interferón beta 1a, interferón beta 1b, acetato de glatirámico, natalizumab, copaxona y combinaciones de los mismos. El anticuerpo frente a huRANTES y el agente adicional se administran simultáneamente, o el anticuerpo frente a huRANTES y el agente adicional se administran a diferentes tiempos durante un régimen de tratamiento.

En el tratamiento de enfermedad de Crohn, el anticuerpo frente a huRANTES o formulación terapéutica del mismo se administra conjuntamente con uno o más agentes adicionales tales como un antibiótico, un aminosalicilato, infliximab, adalimumab y combinaciones de los mismos. Los antibióticos adecuados incluyen, por ejemplo, metronidazol y/o ciprofloxacino. Los aminosalicilatos adecuados incluyen, por ejemplo, mesalamina y/o sulfasalazina. El anticuerpo frente a huRANTES y el agente adicional se administran simultáneamente, o el anticuerpo frente a huRANTES y el agente adicional se administran a diferentes tiempos durante un régimen de tratamiento.

En el tratamiento de colitis ulcerosa, el anticuerpo frente a huRANTES o formulación terapéutica del mismo se administra conjuntamente con uno o más agentes adicionales tales como 6-mercaptopurina, azatioprina, infliximab y combinaciones de los mismos. El anticuerpo frente a huRANTES y el agente adicional se administran simultáneamente, o el anticuerpo frente a huRANTES y el agente adicional se administran a diferentes tiempos durante un régimen de tratamiento.

En el tratamiento de psoriasis, el anticuerpo frente a huRANTES o formulación terapéutica del mismo se administra conjuntamente con uno o más agentes adicionales tales como alefacept, efalizumab, adalimumab, infliximab, ciclosporina, metotrexato y combinaciones de los mismos. El anticuerpo frente a huRANTES y el agente adicional se administran simultáneamente, o el anticuerpo frente a huRANTES y el agente adicional se administran a diferentes tiempos durante un régimen de tratamiento.

En el tratamiento de aterosclerosis, el anticuerpo frente a huRANTES o formulación terapéutica del mismo se administra conjuntamente con uno o más agentes adicionales tales como warfarina, un fármaco hipocolesterolemizante y combinaciones de los mismos. Los fármacos hipocolesterolemizantes adecuados incluyen, por ejemplo, estatinas y fibratos. El anticuerpo frente a huRANTES y el agente adicional se administran simultáneamente, o el anticuerpo frente a huRANTES y el agente adicional se administran a diferentes tiempos durante un régimen de tratamiento.

Los anticuerpos frente a huRANTES y formulaciones terapéuticas de los mismos son para su uso según la invención en métodos de tratamiento o alivio de un síntoma asociado con un trastorno relacionado con la inmunidad. Por ejemplo, las composiciones de la invención se usan para tratar o aliviar un síntoma de cualquiera de las enfermedades autoinmunitarias y trastornos inflamatorios descritos en el presente documento. Los síntomas asociados con trastornos relacionados con la inmunidad incluyen, por ejemplo, inflamación, fiebre, pérdida de apetito, pérdida de peso, síntomas abdominales tales como, por ejemplo, dolor abdominal, diarrea o estreñimiento, dolor articular o dolencias (artralgia), fatiga, erupción, anemia, sensibilidad extrema al frío (fenómeno de Raynaud), debilidad muscular, fatiga muscular, cambios en la piel o el tono tisular, dificultad para respirar u otros patrones de respiración anómalos, dolor torácico o constricción de los músculos del tórax, frecuencia cardíaca anómala (por ejemplo, elevada o disminuida), sensibilidad a la luz, visión borrosa o anómala de otra forma y función orgánica reducida.

Los antagonistas de RANTES, tales como un anticuerpo frente a huRANTES y formulaciones terapéuticas de los mismos se administran a un sujeto que padece isquemia, una indicación clínica asociada con isquemia, lesión por perfusión y/o un trastorno relacionado con la inmunidad, tal como una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio. Se identifica un sujeto u órgano que padece isquemia, una indicación clínica asociada con isquemia, lesión por perfusión, una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se identifican sujetos usando cualquiera de una variedad de pruebas clínicas y/o de laboratorio tales como examen físico, examen radiológico y análisis de sangre, orina y heces para evaluar el estado inmunitario. Por ejemplo, se identifican pacientes que padecen lupus, por ejemplo, usando la prueba de anticuerpos anti-nucleares (ANA) para determinar si están presentes en la sangre auto-anticuerpos frente a núcleos celulares. Se identifican pacientes que padecen enfermedad de Crohn, por ejemplo, usando una serie gastrointestinal (GI) superior y/o una colonoscopia para evaluar los intestinos delgado y grueso, respectivamente. Se identifican pacientes que padecen psoriasis, por ejemplo, usando examen microscópico de tejido tomado del parche cutáneo afectado, mientras que se identifican pacientes que padecen artritis reumatoide usando, por ejemplo, pruebas sanguíneas y/o rayos x u otra evaluación de toma de imágenes. Se identifican pacientes que padecen aterosclerosis, por ejemplo, usando pruebas sanguíneas, electrocardiogramas (ECG), pruebas de estrés, angiografía coronaria, ultrasonidos y tomografía computerizada (CT).

La administración de un antagonista de RANTES, tal como un anticuerpo frente a huRANTES, a un paciente que padece isquemia, una indicación clínica asociada con isquemia, lesión por perfusión o trastorno relacionado con la

inmunidad tal como una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio se considera satisfactoria si se logra cualquiera de una variedad de resultados clínicos o de laboratorio. Por ejemplo, la administración de un anticuerpo frente a huRANTES a un paciente que padece isquemia, una indicación clínica asociada con isquemia, lesión por reperfusión, un trastorno relacionado con la inmunidad tal como una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio se considera satisfactorio si se alivian, reducen o no progresan a un estado adicional, es decir, peor, uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. La administración de un anticuerpo frente a huRANTES a un paciente que padece isquemia, una indicación clínica asociada con isquemia, lesión por reperfusión, un trastorno relacionado con la inmunidad tal como una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio se considera satisfactoria si el trastorno, por ejemplo, un trastorno autoinmunitario, entra en remisión o no progresa a un estado adicional, es decir, peor.

Formulaciones de diagnóstico y profilácticas

Los Acm anti-RANTES completamente humanos de la invención se usan en formulaciones de diagnóstico y profilácticas. Un antagonista de RANTES, tal como un Acm frente a huRANTES de la invención puede administrarse a pacientes que corren el riesgo de desarrollar isquemia, una indicación clínica asociada con isquemia, lesión por reperfusión y/o, según la invención, una de las enfermedades autoinmunitarias mencionadas anteriormente. Puede determinarse la predisposición de un paciente u órgano a isquemia, una indicación clínica asociada con isquemia, lesión por reperfusión y/o una o más de las enfermedades autoinmunitarias mencionadas anteriormente usando marcadores genéticos, serológicos o bioquímicos.

Se administra un antagonista de RANTES, tal como un anticuerpo frente a huRANTES a individuos humanos a los que se les diagnostica una indicación clínica asociada con isquemia, lesión por reperfusión, una o más de las enfermedades autoinmunitarias mencionadas anteriormente. Tras el diagnóstico, se administra un antagonista de RANTES, tal como un anticuerpo frente a huRANTES para mitigar o revertir los efectos de la indicación clínica asociada con isquemia, lesión por reperfusión o autoinmunidad.

Los anticuerpos de la invención también son útiles en la detección de RANTES en muestras de pacientes y por consiguiente son útiles como agentes de diagnóstico. Por ejemplo, los anticuerpos frente a huRANTES de la invención se usan en ensayos *in vitro*, por ejemplo, ELISA, para detectar los niveles de RANTES en una muestra de un paciente.

Se inmoviliza un anticuerpo frente a huRANTES de la invención sobre un soporte sólido (por ejemplo, el/los pocillo(s) de una placa de microtitulación). El anticuerpo inmovilizado sirve como anticuerpo de captura para cualquier RANTES que pueda estar presente en una muestra de prueba. Antes de poner en contacto el anticuerpo inmovilizado con una muestra de un paciente, el soporte sólido se enjuaga y se trata con un agente bloqueante tal como proteína láctea o albúmina para impedir la adsorción no específica del analito.

Posteriormente, se tratan los pocillos con una muestra de prueba de la que se sospecha que contiene el antígeno, o con una disolución que contiene una cantidad patrón del antígeno. Una muestra de este tipo es, por ejemplo, una muestra de suero de un sujeto del que se sospecha que tiene niveles de antígeno circulante que se considera que es un agente de diagnóstico de una patología. Tras eliminar mediante enjuague la muestra de prueba o el patrón, se trata el soporte sólido con un segundo anticuerpo que está marcado de manera detectable. El segundo anticuerpo marcado sirve como anticuerpo de detección. Se mide el nivel de marcador detectable, y se determina la concentración de antígeno RANTES en la muestra de prueba mediante comparación con una curva patrón desarrollada a partir de las muestras patrón.

Se apreciará que basándose en los resultados obtenidos usando los anticuerpos frente a huRANTES de la invención en un ensayo de diagnóstico *in vitro*, es posible estadificar una enfermedad (por ejemplo, una indicación clínica asociada con isquemia, un trastorno inflamatorio o autoinmunitario) en un sujeto basándose en los niveles de expresión del antígeno RANTES. Para una enfermedad dada, se toman muestras de sangre de sujetos a los que se les diagnostica que están en diversos estadios en la progresión de la enfermedad, y/o en diversos puntos en el tratamiento terapéutico de la enfermedad. Usando una población de muestras que proporciona resultados estadísticamente significativos para cada estadio de progresión o terapia, se designa un intervalo de concentraciones del antígeno que puede considerarse característico de cada estadio.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos realizados y los resultados logrados se proporcionan para fines ilustrativos sólo y no debe interpretarse que limitan la presente invención.

EJEMPLO 1: Clonación, expresión y purificación de RANTES humana

Clonación

Se clonó el gen que codifica para la proteína madura humana RANTES (n.º de registro de GenBank M21121) u otras

quimiocinas en un plásmido de expresión pET43 (Novagen Madison, WI) mediante amplificación por PCR. Se introdujo la secuencia para el sitio de escisión de proteasa factor X en el extremo C-terminal de NusA. Se introdujo la secuencia para el sitio de biotilación AviTag (Avidity, Denver CO) en el extremo C-terminal de la secuencia que codifica para quimiocina. Se usaron plásmidos derivados de pET para la transformación conjunta de la cepa bacteriana Origami B con el plásmido pACYC184-BirA que codifica para el gen de biotina ligasa. Para la expresión en células de mamífero, se clonó el gen que codifica para quimiocinas relevantes a partir de ADNc en el vector de expresión pEAK8 (Edge Biosystems, Gaithersburg, MD). Se introdujo un sitio de biotilación AviTag en el extremo C-terminal de la proteína seguido por un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) permitiendo la expresión del gen BirA que codifica para una biotina ligasa. Este constructo permite la expresión secretada de quimiocinas biotiniladas *in vivo* en un único sitio.

Expresión de proteína de fusión NusA-huRANTES en E. coli

Se diluyó un cultivo durante la noche de bacterias que albergan el constructo de expresión 1:30 en caldo Terrific (InvitroGen) que contenía ampicilina 50 µg/ml, kanamicina 10 µg/ml, tetraciclina 5 µg/ml, cloranfenicol 20 µg/ml y biotina 50 µM. Se incubó el cultivo a 37°C con agitación hasta que se alcanzó DO 600=0,7. Entonces se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM, se incubó durante 15 min. a 37°C y durante la noche a 25°C.

Expresión de huRANTES en células de mamífero

Se cultivaron células PEAK en DMEM (Sigma) complementado con FCS al 10%, L-glutamina 2 mM (Sigma), gentamicina 25 µg/ml (Sigma) y se incubaron a 37°C, un 5% de CO₂. Se transfectaron las células PEAK con los vectores pEAK8 modificados usando reactivo de transfección Mirus. Se añadió puromicina (Sigma) a 1 µg/ml tras la adherencia celular con el fin de seleccionar y mantener poblaciones celulares transfectadas. Se añadió biotina (Sigma) a lotes de producción a 50 µM. Se mostró que quimiocinas biotiniladas de los sobrenadantes de células PEAK transfectadas eran activas en ensayos de quimiotaxis.

Purificación y escisión de proteínas de fusión

Se resuspendieron sedimentos bacterianos en Bugbuster (Novagen) que contenía nucleasa benzonasa e inhibidor de proteasas Complete libre de EDTA (Roche) y se incubaron durante 1 hora a 4°C. Se separaron las fracciones soluble e insoluble mediante centrifugación a 10.000 g durante 15 min. a 4°C. Se analizaron las fracciones de proteína soluble e insoluble mediante SDS-PAGE (geles Novex, InvitroGen). Se diluyó la fracción soluble 1/2 con tampón A (Tris-HCl 100 mM pH 8,0, NaCl 600 mM, CaCl₂ 10 mM, imidazol 40 mM), se mezcló con Ni-NTA agarosa al 50% (v/v) (Qiagen) previamente equilibrada en tampón B (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, CaCl₂ 5 mM, imidazol 20 mM). Se incubó la mezcla durante 30 min. a TA con agitación suave. Se cargaron las perlas obtenidas tras la centrifugación en columnas de cromatografía Poly-Prep (Biorad), se lavaron tres veces con 5 volúmenes de tampón B y se eluyeron con tampón C (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 200 mM, CaCl₂ 5 mM, imidazol 400 mM). Se agruparon las fracciones de elución que contenían la proteína y se desalaron usando columnas PD-10 (Amersham). Se escindieron proteínas de fusión NusA-quimiocina mediante factor X (Novagen, Madison, WI) incubando 1 mg de proteína con 25 U de factor X a 30°C durante hasta 24 h en tampón de escisión (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 200 mM, CaCl₂ 5 mM). Para algunas de las proteínas de fusión, los parámetros para la escisión óptima eran ligeramente diferentes pero se determinaron fácilmente variando el tiempo de incubación (4-24 h) y/o la temperatura (25-37°C). Se analizó la proteína escindida mediante SDS-PAGE y se sometió a prueba la actividad mediante quimiotaxis.

EJEMPLO 2: Examen de bibliotecas de scFv humanos

Se describen procedimientos generales para la construcción y el manejo de bibliotecas de scFv humanos en Vaughan *et al.*, (Nat. Biotech. 1996, 14:309-314). Se examinaron bibliotecas de scFv humanos frente a huRANTES según el siguiente procedimiento.

Selecciones en fase líquida.

Se bloquearon alícuotas de bibliotecas de fagos con scFv (10¹² ufp) obtenidas de Cambridge Antibody Technology (Cambridge, RU) con PBS que contenía leche desnatada al 3% (p/v) durante una hora a temperatura ambiente en una mezcladora rotatoria. Entonces se deseleccionó el fago bloqueado sobre perlas magnéticas de estreptavidina (Dynal M-280) durante una hora a temperatura ambiente en una mezcladora rotatoria. Entonces se incubó el fago deseleccionado con huRANTES biotinilada *in vivo* (100 nM) durante dos horas a temperatura ambiente en una mezcladora rotatoria. Se realizó esta etapa de selección o bien en proteína de fusión biotinilada NusA-huRANTES o bien en huRANTES biotinilada liberada de la fusión por escisión proteolítica. Se capturaron perlas usando una base magnética mediante cuatro lavados con PBS/Tween 20 al 0,1% y 3 lavados con PBS. Entonces se añadieron directamente las perlas a 10 ml de células TG1 en crecimiento exponencial y se incubaron durante una hora a 37°C con agitación lenta (100 rpm). Se diluyó en serie una alícuota de la TG1 infectada para titular el rendimiento de selección. Se centrifugaron las TG1 infectadas restantes a 3000 rpm durante 15 minutos y se resuspendieron en

0,5 ml de 2xTY-AG (medio 2xTY que contenía ampicilina 100 µg/ml y glucosa al 2%) y se distribuyeron en placas de bioensayo de agar 2xTYAG. Tras la incubación durante la noche a 30°C, se añadieron 10 ml de 2xTYAG a las placas y se rasparon las células de la superficie y se transfirieron a un tubo de polipropileno de 50 ml. Se añadió 2xTYAG que contenía glicerol al 50% a la suspensión celular para obtener una concentración final de glicerol al 17%. Se mantuvieron alícuotas de la ronda de selección a -80°C.

Rescate de fagos.

Se añadieron 100 µl de suspensión celular obtenida de rondas de selección previas a 20 ml de 2xTYAG y se hicieron crecer a 37°C con agitación (240 rpm) hasta que se alcanzó una DO_{600} de 0,3 a 0,5. Entonces se superinfectó el cultivo con $3,3 \times 10^{10}$ fagos auxiliares MK13K07 y se incubó durante una hora a 37°C (150 rpm). Entonces se cambió el medio centrifugando las células a 2000 rpm durante 10 minutos, eliminando el medio y resuspendiendo el sedimento en 20 ml de 2xTYAK (ampicilina 100 µg/ml; kanamicina 50 µg/ml). Entonces se hizo crecer el cultivo durante la noche a 30°C (240 rpm).

Rescate de fagos monoclonales para ELISA.

Se recogieron clones individuales en una placa de microtitulación que contenía 150 µl de medio 2xTYAG (glucosa al 2%) por pocillo y se hicieron crecer a 37°C (100-120 rpm) durante 5-6 h. Se añadió fago auxiliar M13KO7 a cada pocillo para obtener una multiplicidad de infección (MOI) de 10 (es decir, 10 fagos por cada célula en el cultivo) y se incubó a 37°C (100 rpm) durante 1 h. Tras el crecimiento, se centrifugaron las placas a 3.200 rpm durante 10 min. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante, se resuspendieron las células en 150 µl de medio 2xTYAK y se hicieron crecer durante la noche a 30°C (120 rpm). Para el ELISA, se bloquean los fagos añadiendo 150 µl de PBS de concentración 2x que contenía leche desnatada en polvo al 5% seguido por incubación de una hora a temperatura ambiente. Entonces se centrifugaron las placas 10 minutos a 3000 rpm y se usó el sobrenadante que contenía fagos para el ELISA.

ELISA de fagos.

Se recubrieron placas de ELISA (Maxisorb, NUNC) durante la noche con proteína de fusión NusA-Rantes 2 µg/ml en PBS. Se recubrieron placas control con NusA 2 µg/ml. Entonces se bloquearon las placas con leche desnatada al 3%/PBS a temperatura ambiente durante 1 h. Se lavaron las placas 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,05% antes de la transferencia de los sobrenadantes de fagos bloqueados previamente y la incubación durante una hora a temperatura ambiente. Entonces se lavaron las placas 3 veces con PBS-Tween 20 al 0,05%. Se añadieron 50 µl de leche desnatada al 3%/PBS que contenía anticuerpo anti-M13 conjugado con (HRP) (Amersham, diluido 1:10.000) a cada pocillo. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 1 h, se lavaron las placas 5 veces con PBS-Tween 20 al 0,05%. Entonces se reveló el ELISA añadiendo 50 µl de TMB (Sigma) y 50 µl de H_2SO_4 2 N para detener la reacción. Se leyó la intensidad de absorción a 450 nm.

Secuenciación de clones de fagos

Se colocaron clones individuales en una placa de microtitulación que contenía 150 µl de medio 2xTYAG (glucosa al 2%) por pocillo y se hicieron crecer a 30°C (120 rpm) durante la noche. Al día siguiente se transfirieron 5 µl de cultivo a otra placa que contenía 45 µl de dH_2O y se mezclaron. Entonces se congelaron las placas a -20°C. Tras descongelar, se usó 1 µl de esta suspensión para la amplificación por PCR usando protocolos de PCR convencionales con cebador específico para pCANTAB6: mycseq, 5'-CTCTTCTGAGATGAGTTTTTG-3' (SEQ ID NO: 269) y gene3leader, 5'-TTATTATTCGCAATTCCTTTAGTTGTTTCCT-3' (SEQ ID NO: 270).

Se purificaron las reacciones de PCR en un formato de 96 pocillos usando el sistema Montage PCRµ96 (Millipore). Se secuenciaron 5 µl del ADN eluido usando los cebadores mycseq y gene3leader.

Preparación periplásmica de ScFv para pruebas funcionales.

Se inocularon clones individuales en una placa de microtitulación de pocillos profundos que contenía 0,9 ml de medio 2xTYAG (glucosa al 0,1%) por pocillo y se hicieron crecer a 37°C durante 5-6 h (250 rpm). Entonces se añadieron 100 µl por pocillo de IPTG 0,2 mM en medio 2xTY para dar una concentración final de IPTG 0,02 mM. Entonces se incubaron las placas durante la noche a 30°C con agitación a 250 rpm. Se centrifugaron las placas de pocillos profundos a 2.500 rpm durante 10 min. y se eliminó el sobrenadante cuidadosamente. Se resuspendieron los pocillos en tampón TES 150 µl (Tris/HCl 50 mM (pH 8), EDTA 1 mM (pH 8), sacarosa al 20%, complementado con inhibidor de proteasas Complete, Roche). Se produjo un choque hipotónico añadiendo 150 µl de tampón TES diluido (dilución TES:agua 1:5) e incubación en hielo durante 30 min. Entonces se centrifugaron las placas a 4000 rpm durante 10 minutos para eliminar las células y los residuos. Se transfirieron cuidadosamente los sobrenadantes a otra placa de microtitulación y se mantuvieron en hielo para pruebas inmediatas en ensayos funcionales o ELISA.

Purificación de scFv a gran escala

Se inoculó un cultivo iniciador de 1 ml de 2xTYAG con una única colonia de una placa de agar 2xTYAG recién sembrada en estrías y se incubó con agitación (240 rpm) a 37°C durante 5 horas. Se usaron 0,9 ml de este cultivo para inocular un cultivo de 400 ml del mismo medio y se hizo crecer durante la noche a 30°C con agitación vigorosa (300 rpm).

Al día siguiente se indujo el cultivo añadiendo 400 µl de IPTG 1 M y se continuó la incubación durante 3 horas adicionales. Se recogieron las células mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se resuspendieron las células sedimentadas en 10 ml de tampón TES enfriado con hielo complementado con inhibidores de proteasas tal como se describió anteriormente. Se logró un choque osmótico añadiendo 15 ml de tampón TES diluido 1:5 e incubación durante 1 hora en hielo. Se centrifugaron las células a 10.000 rpm durante 20 minutos a 4°C para sedimentar los residuos celulares. Se transfirió cuidadosamente el sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadió imidazol al sobrenadante hasta una concentración final de 10 mM. Se añadió 1 ml de resina Ni-NTA (Qiagen), equilibrada en PBS a cada tubo y se incubó en una mezcladora rotatoria a 4°C (20 rpm) durante 1 hora.

Se centrifugaron los tubos a 2.000 rpm durante 5 minutos y se eliminó cuidadosamente el sobrenadante. Se resuspendió la resina sedimentada en 10 ml de tampón de lavado 1 frío (4°C) (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH hasta 8,0). Se añadió la suspensión a una columna Polyprep (Biorad). Se usaron 8 ml de tampón de lavado 2 frío (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH hasta 8,0) para lavar la columna mediante flujo por gravedad. Se eluyeron los scFv de la columna con 2 ml de tampón de elución (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH hasta 8,0). Se analizaron las fracciones mediante absorción a 280 nm y se agruparon las fracciones que contenían proteína antes del intercambio de tampón en una columna de desalación PD10 (Amersham) equilibrada con PBS. Se analizaron los scFv en PBS mediante SDS-PAGE y se cuantificaron mediante absorción a 280 nm. Se alicuotaron los scFv purificados y se almacenaron a -20°C y a 4°C.

EJEMPLO 3: Inhibición del flujo de calcio inducido por huRANTES usando extractos de scFv

Se produjeron extractos periplásmicos de diversos scFv frente a huRANTES tal como se describió anteriormente. Se cultivaron células L1.2 que expresan hCCR5 en medio RPMI complementado con FCS al 10%. Se incubaron extractos que contenían el scFv con 2-10 nM de huRANTES (Peprotech, Rocky Hill NJ) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células en PBS y se cargaron con Fura 2/AM 2 µM. Se añadieron 100 µl de células cargadas a cada pocillo de una placa de fondo plano transparente, negra, de 96 pocillos y se registró la cinética de flujo de calcio midiendo la fluorescencia a 514 nm tras la excitación a 340 ó 380 nm en un instrumento Flex station II (Molecular Devices) tras la adición de mezcla de scFv frente a quimiocinas. Se evaluó la actividad inhibidora de cada extracto de scFv mediante comparación con un extracto que contenía un scFv irrelevante.

EJEMPLO 4: Inhibición por scfv de la quimiotaxis celular inducida por huRANTES

Se cultivaron células L1.2 de tipo natural y células L1.2 que expresan hCCR5 en medio RPMI complementado con FCS al 10%. El día antes del experimento, se incubaron las células con 0,6 mg/ml de ácido butírico. Se incubaron diferentes concentraciones de scFv purificado con huRANTES 0,2-10 nM y se colocaron en la cámara inferior de una placa de 96 pocillos de quimiotaxis (Neuroprobe). Se colocó la placa filtrante sobre la parte superior de la placa de quimiotaxis y se cubrió cada pocillo con 20 µl de una suspensión de 10⁶ células/ml. Se incubó la placa durante 2 horas a 37°C. Se tiñeron las células que migraron a través del filtro con DRAQ5 (Alexis Corporation) y se contaron en un lector FMAT 8200 (Applied Biosystems, Foster City CA). Se determinó la CI₅₀ (cuando se inhibe el 50% de la migración celular inducida por huRANTES, es decir, concentración inhibidora al 50%), para cada anticuerpo candidato (tabla 4).

Tabla 4. Potencia de anticuerpos sometidos a prueba en el formato de scFv en ensayos funcionales de quimiotaxis. Se realizó la quimiotaxis usando 1 nM de huRANTES.

ID de clon	CI ₅₀ de quimiotaxis (nM)
CG11	3,6
BG11	7
A9	72
E6	72
H6	25
G2	62
E10	9,4
C10	41
2D1	1,3
A5	21

H11	4,3
D1	22
E7	3,8
C8	90
1D9	0,82
1E4	1,25
3E7	0,47
4D8	0,08
5E1	0,2
6A8	0,94
7B5	1,6

EJEMPLO 5: Reformación de scFv en el formato de IgG

Se amplificaron las secuencias V_H y V_L de scFv seleccionados con oligonucleótidos específicos que introducen una secuencia líder y un sitio de restricción HindIII en el extremo 5'. Se introdujo un sitio Apal o uno AvrII en el extremo 3' de la secuencia de cadena pesada y ligera, respectivamente. Se digirieron las secuencias V_H amplificadas con HindIII/Apal y se clonaron en el vector de expresión pCon_gamma1 (LONZA, Basilea, Suiza). Se digirieron las secuencias V_L amplificadas con HindIII/ AvrII y se clonaron en el vector de expresión pCon_lambda2 (LONZA). Se verificaron las construcciones mediante secuenciación antes de la transfección en células de mamífero.

Se transfectaron las secuencias de ADNc de V_H y V_L en sus vectores de expresión apropiados en células de mamífero usando el reactivo de transfección Eugene 6 (Roche, Basilea, Suiza). En resumen, se cultivaron células Peak en placas de 6 pocillos a una concentración de 6×10^5 células por pocillo en 2 ml de medio de cultivo que contenía suero bovino fetal. Se cotransfectaron los vectores de expresión, que codificaban para las secuencias V_H y V_L candidatas, en las células usando el reactivo de transfección Eugene 6 según las instrucciones del fabricante. Un día tras la transfección, se aspiraron los medios de cultivo y se añadieron 3 ml de medio libre de suero nuevo a las células y se cultivaron durante tres días a 37°C. Tras un periodo de cultivo de tres días, se recogió el sobrenadante para IgG purificada sobre columnas 4B fast flow de proteína G-Sepharose (Sigma, St. Louis, MO) según las instrucciones del fabricante. En resumen, se incubaron los sobrenadantes de células transfectadas durante la noche a 4°C con tampón de unión a IgG ImmunoPure (G) (Pierce, Rockford IL). Entonces se hicieron pasar muestras sobre columnas 4B fast flow de proteína G-Sepharose y se purificó en consecuencia la IgG usando tampón de elución. Entonces se dializó la fracción de IgG eluida frente a PBS y se cuantificó el contenido en IgG mediante absorción a 280 nm. Se verificaron la pureza e integridad de IgG mediante SDS-PAGE.

EJEMPLO 6: Producción de huRANTES humana nativa.

Se cultivaron células THP1 en 10 ml de medios a una concentración a 1×10^6 /ml con LPS 10 µg/ml. Tras la incubación durante la noche a 37°C, se centrifugaron las células, se recogió el sobrenadante y se estimó la concentración de huRANTES nativa en un ensayo de quimiotaxis tal como se describe en el ejemplo 4. No sólo huRANTES nativa sino también otros ligandos de CCR5 se producen por células THP1 cuando se estimulan con LPS tal como se describió anteriormente. Por tanto, cuando se usan estos sobrenadantes en ensayos de quimiotaxis para determinar el potencial de neutralización de anticuerpos anti-huRANTES, se neutralizaron los otros ligandos de CCR5 con una mezcla de anticuerpos contra hMIP-1α, hMIP-1β, hMCP-2, hMIP-1δ cada uno a una concentración de 5 µg/ml (R&D Systems).

EJEMPLO 7: Inhibición de la quimiotaxis celular o el flujo de calcio inducido por huRANTES usando scfv reformado en el formato de IgG1

Se reformaron scFv en un formato de IgG tal como se describió anteriormente en el ejemplo 5. Se evaluó el potencial de neutralización de la quimiotaxis celular o el flujo de calcio inducido por huRANTES usando los ensayos basados en células descritos en el ejemplo 3 y 4. Tal como se muestra como ejemplos en la figura 1 las IgG C8, 1D9 y 1E4 inhiben la actividad de huRANTES tanto nativa como recombinante de una manera dependiente de la dosis. Los valores de CI_{50} en estos ensayos para todos los anticuerpos se resumen en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Potencia de anticuerpos sometidos a prueba en el formato de IgG1 en ensayos funcionales de flujo de calcio y quimiotaxis. Se realizó la quimiotaxis usando o bien 1 nM o bien 0,2 nM de huRANTES recombinante mientras que se indujo el flujo de calcio con 10 nM de huRANTES recombinante.

ID de clon	CI_{50} de quimiotaxis (nM), huRANTES 1 nM	CI_{50} de quimiotaxis (nM), huRANTES 0,2 nM	CI_{50} de flujo de calcio (nM), huRANTES
CG11	4,8	ND	9,5
BG11	29	ND	7,7
A9	1	ND	3,3

E6	14	ND	12,7
H6	8,7	ND	9
G2	18,4	ND	ND
E10	16	ND	ND
C10	17	ND	ND
2D1	1,7	1,3	ND
A5	13,2	ND	ND
H11	1,3	ND	ND
D1	7	ND	ND
E7	2,2	ND	ND
C8	2,1	0,49	ND
1D9	0,35	0,038	ND
1E4	0,46	0,034	ND
3E7	0,68	0,25	ND
4D8	1,16	0,22	ND
5E1	0,82	0,25	ND
6A8	0,74	0,31	ND
7B5	1,1	0,31	ND

Tabla 6. Potencia de anticuerpos sometidos a prueba en el formato de IgG1 en ensayo funcional de quimiotaxis realizado usando RANTES humana nativa producida por células THP1 a una concentración de <1 nM.

ID de clon	Cl ₅₀ de quimiotaxis (nM), huRANTES nativa >1 nM
C8	1,6
1D9	0,033
1E4	0,028

5

EJEMPLO 8: Unión de anticuerpos a huRANTES inmovilizada sobre glucosaminoglucano

Como con muchas quimiocinas, huRANTES puede oligomerizarse y unirse a glucosaminoglucanos (GAG) expresados en la superficie de células tales como células endoteliales. Con el fin de garantizar que los anticuerpos podrían unirse a huRANTES en este contexto, se sometieron a prueba en el siguiente ensayo. Se recubrieron placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina (Roche, Basilea, Suiza) con heparina marcada con biotina como GAG prototípico (Sigma, St. Louis, MO). Tras lavar la heparina en exceso se añadió huRANTES a los pocillos para su inmovilización sobre GAG. Tras la incubación con los anticuerpos que iban a someterse a prueba, se lavaron los pocillos y se reveló la unión con un anticuerpo específico de Fcg anti-IgG humana acoplado a HRP (Jackson, West Grove, PA). Tal como se muestra en la figura 2, algunos anticuerpos podían unirse a huRANTES cuando estaba unida a GAG mientras que otros no podían hacerlo debido probablemente a que su epítipo en huRANTES ya no era accesible dentro de la estructura oligomérica. La capacidad de los anticuerpos para unirse a huRANTES en el contexto de GAG se resume en la tabla 7.

20

Tabla 7. Capacidad de los anticuerpos para unirse a huRANTES inmovilizada sobre GAG.

ID de clon	Unión a huRANTES inmovilizada sobre GAG
CG11	No
BG11	Sí
A9	No
E6	Sí
H6	No
G2	Sí
E10	Sí
C10	Sí
2D1	Sí
A5	Sí
H11	No
D1	No
E7	No
C8	Sí
1E4	Sí
1D9	Sí

EJEMPLO 9: Maduración por afinidad del anticuerpo 2D1

Se sometió un candidato principal seleccionado (2D1) a maduración por afinidad con el fin de aumentar su afinidad por huRANTES y su potencia en ensayos de neutralización de huRANTES. Se aleatorizaron tramos de 5 residuos en la CDR3 de la cadena pesada o ligera con el fin de generar 6 bibliotecas (tamaño de biblioteca que oscilaba entre 5×10^7 y 10^9). Se realizaron tres rondas de selección de alta rigurosidad tal como se describió en el ejemplo 2. Se realizó la selección de una variante mejorada usando extractos periplásmicos de scFv en un ensayo de competición de epítomos. En resumen, se recubrió el anticuerpo original (2D1) sobre placas y se añadieron extractos de scFv periplásmicos diluidos a cada pocillo. Entonces se añadió huRANTES biotinilada y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras lavar, se reveló huRANTES que permanecía unida al anticuerpo original recubierto usando HRP acoplada a estreptavidina (Jackson, West Grove PA). Como referencia para identificar variantes mejoradas, se usó scFv de 2D1 para competir con 2D1 recubierto en un formato de IgG.

EJEMPLO 10: Generación de una línea celular estable CHOK1SV que expresa 1E4

Se usó la línea celular CHOK1SV, propiedad de Lonza Biologics, plc, para generar conjuntos a través de transfección semiestable para la producción del anticuerpo 1E4. En resumen, se sometieron a electroporación células en crecimiento exponencial en el medio CD-CHO (Invitrogen) complementado con 6 mM de L-glutamina, en las siguientes condiciones: en una cubeta de 0,4 cm, se mezclaron suavemente $1,0 \times 10^7$ células viables en 700 μ l de CD-CHO nuevo con 40 μ g de ADN en 100 μ l de disolución tampón Tris EDTA, pH 7,4, seguido inmediatamente por el suministro de un único pulso de 300 voltios, 900 μ F. Se transfirió inmediatamente el contenido de 2 cubetas en 200 ml de medio CD-CHO precalentado nuevo. Posteriormente se distribuyó esta suspensión celular en 4 frascos T75 tratados para cultivo celular y se colocaron en un incubador humidificado fijado a un 10% de CO₂ en aire y una temperatura de 37°C para generar cultivos semiestables. Alrededor de veinticuatro horas tras la transfección, se aplicó presión selectiva (mediante complementación con MSX a 50 μ M). Entonces se seleccionaron clones transfectados de manera estable individuales usando tecnología ClonePix (Genetix) y se examinaron para determinar la productividad de 1E4.

EJEMPLO 11: Purificación a gran escala de 1E4 a partir de sobrenadante de CHO

El proceso implica cromatografía de afinidad MabSelect SuRe (GE Healthcare), inactivación de retrovirus mediante tratamiento a pH bajo, ajuste del pH para la cromatografía de intercambio catiónico en SP Sepharose, concentración/diafiltración antes de la cromatografía de intercambio aniónico Capto Q (GE Healthcare) y concentración/diafiltración en el tampón de formulación final.

En resumen, se clarificó el sobrenadante producido por la fermentación en Wave Bag de 25 l del clon y se capturó sobre una columna de afinidad de proteína A MabSelect SuRe con una recuperación global del 95% a un 80% de la capacidad de carga máxima (32 mg de anticuerpo por ml de matriz). Se demostró que el eluato era estable al pH de elución hasta 48 h. También se evaluó la estabilidad del anticuerpo 1E4 al pH bajo (3,7) usado para la inactivación viral y el anticuerpo era estable hasta 48 h.

Entonces se cargó el conjunto de eluatos de proteína A sobre una columna de intercambio catiónico de SP Sepharose tras el ajuste del pH (pH 5). Se optimizó esta etapa para lograr una eliminación de agregados residuales eficaz, se encontró que el tampón de elución óptimo era cloruro de sodio 107 mM (en acetato de sodio 25 mM pH 5). Entonces se usó una etapa de concentración/diafiltración para intercambiar el tampón del anticuerpo 1E4 por el tampón apropiado para la cromatografía Capto Q (acetato de sodio 25 mM, cloruro de sodio 40 mM pH 5). Se alcanzó una concentración de aproximadamente 50 mg/ml sin ningún problema de degradación o agregación. Se optimizó la cromatografía Capto Q en modo de no unión para lograr una eliminación de contaminantes eficaz (Host Cell Proteins, proteína A y ADN). Finalmente se concentró el anticuerpo 1E4 y se sometió a diafiltración en el tampón de formulación de histidina 25 mM, NaCl 125 mM, pH 6 hasta una concentración final de aproximadamente 10 mg/ml.

El anticuerpo 1E4 no mostró una tendencia a agregarse a lo largo de todo el proceso de purificación, y presentaba buena estabilidad a través del proceso de purificación. El producto final alcanzó todas las especificaciones de requisitos previos en cuanto a niveles de agregados y contaminación residual.

EJEMPLO 12: Caracterización funcional del anticuerpo 1E4 purificado a partir de sobrenadante de CHO

RANTES es un ligando para los receptores CCR1, CCR3 y CCR5. Se sometió a ensayo la capacidad de 1E4 purificado a partir de sobrenadantes de CHO para bloquear la interacción con cada uno de estos receptores en ensayos de flujo de calcio y quimiotaxis.

Flujo de calcio

Se cultivaron células L1.2 que expresan o bien hCCR1, hCCR3 o bien hCCR5 en medio RPMI complementado con FCS al 10%. Para lograr resultados óptimos, se sometieron a privación células que expresan hCCR1 durante la noche en medio que contenía un 1% de FCS. El día antes del experimento, se incubaron todas las células con 0,3

mg/ml de ácido butírico. Se incubaron diferentes concentraciones de 1E4 con de 4 a 25 nM de huRANTES (Peprotech, Rocky Hill NJ) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células en PBS y se cargaron con Fura 2/AM 2 μ M. Se añadieron 100 μ l de células cargadas a cada pocillo de una placa de fondo plano transparente, negra, de 96 pocillos y se registró la cinética del flujo de calcio midiendo la fluorescencia a 514 nm tras la excitación a 340 o 380 nm en un instrumento Flex station II (Molecular Devices) tras la adición de la mezcla de quimiocina-anticuerpo. Tal como se muestra en la figura 3, 1E4 podía inhibir el flujo de calcio en células que expresan o bien hCCR1, hCCR3 o bien hCCR5 de una manera dependiente de la dosis. Se determinó la CI_{50} (cuando se inhibe el 50% del flujo de calcio inducido por huRANTES, es decir, concentración inhibidora del 50%) (tabla 8).

Tabla 8. Potencia del anticuerpo 1E4 purificado a partir de sobrenadante de CHO en ensayo funcional de flujo de calcio usando células que expresan uno de los tres receptores específicos de RANTES.

Células y concentración de huRANTES usada para la inducción del flujo de calcio	CI_{50} (nM)
L1.2-hCCR1; huRANTES 25 nM	4,9
L1.2-hCCR3; huRANTES 25 nM	4,46
L1.2-hCCR5; huRANTES 4 nM	0,54

Quimiotaxis

Se cultivaron células L1.2 de tipo natural y células L1.2 que expresan o bien hCCR1, hCCR3 o bien hCCR5 en medio RPMI complementado con FCS al 10%. Para lograr resultados óptimos, se sometieron a privación células que expresan hCCR1 durante la noche en medio que contenía un 1% de FCS. El día antes del experimento, se incubaron todas las células con 0,3 mg/ml de ácido butírico. Para lograr resultados óptimos, se sometieron a privación células que expresan hCCR1 durante la noche en medio que contenía un 1% de FCS. Se incubaron diferentes concentraciones de 1E4 con 1-10 nM de huRANTES recombinante o 1 nM de huRANTES nativa (generado tal como se describe en el ejemplo 6) y se colocaron en la cámara inferior de la placa de 96 pocillos de quimiotaxis (Neuroprobe). Se colocó la placa filtrante sobre la parte superior de la placa de quimiotaxis y se cubrió cada pocillo con 20 μ l de una suspensión de 10^6 células/ml. Se incubó la placa durante 2 horas a 37°C. Se tiñeron las células que migraban a través del filtro con DRAQ5 (Alexis Corporation) y se contaron en un lector FMAT 8200 (Applied Biosystems, Foster City CA). Tal como se muestra en la figura 4, 1E4 podía inhibir el flujo de calcio en células que expresan o bien hCCR1, hCCR3 o bien hCCR5 de una manera dependiente de la dosis. Se determinó la CI_{50} (cuando se inhibe el 50% de la migración celular inducida por huRANTES, es decir, concentración inhibidora del 50%) (tabla 9).

Tabla 9. Potencia del anticuerpo 1E4 purificado a partir de sobrenadante de CHO en ensayo funcional de quimiotaxis usando células que expresan uno de los tres receptores específicos de RANTES.

Células y concentración de huRANTES usada para ensayos de quimiotaxis	CI_{50} (nM)
L1.2-hCCR1; huRANTES 2 nM	0,46
L1.2-hCCR3; huRANTES 10 nM	3,33
L1.2-hCCR5; huRANTES 1 nM	0,2
L1.2-hCCR5; huRANTES nativa 1 nM	0,09

EJEMPLO 13: Reactividad cruzada del anticuerpo 1E4

Se sometió a prueba 1E4 para determinar su capacidad para unirse a un panel de quimiocinas de diferentes especies en un ELISA. El panel incluía las siguientes quimiocinas: RANTES humana, RANTES de mono cynomolgus, RANTES de rata, RANTES de ratón, ITAC humana, IP-10 humana, IP-10 de mono cynomolgus, MIG humana, MIG de mono cynomolgus, MIP1 α humana, MIP1 β humana, MCP-1 humana, MCP-2 humana. En resumen, se expresaron quimiocinas clonadas de ADNc aislado de ser humano, ratón, rata y mono cynomolgus como proteínas de fusión y se purificaron tal como se describe en el ejemplo 1. Se recubrieron las quimiocinas a 5 μ g/ml en una placa maxisorb (Nunc, Dinamarca) y se incubaron con un intervalo de concentración de 1E4. Se reveló el nivel de unión usando un anticuerpo específico anti-Fc- γ humano acoplado a peroxidasa del rábano (Jackson) y un sustrato fluorescente. Tal como se muestra en la figura 5, el anticuerpo 1E4 se une sólo a RANTES de ser humano y mono cynomolgus y no a RANTES de otra especie ni a ninguna de las otras quimiocinas humanas sometidas a prueba. Se controló el recubrimiento apropiado de todas las quimiocinas usando anticuerpos monoclonales dirigidos contra cada quimiocina y todas las quimiocinas sometidas a prueba pudieron detectarse en este formato.

EJEMPLO 14: Mapeo de epítomos del anticuerpo 1E4

En un ELISA, el anticuerpo 1E4 se une con afinidad aparente equivalente a RANTES tanto de ser humano como de mono cynomolgus (figura 5). Con el fin de identificar residuos potencialmente requeridos en huRANTES para unirse

a 1E4, se alinearon las secuencias de proteína RANTES de varias especies tal como se muestra en la figura 6. En la alineación, se analizaron los residuos que se conservan entre las secuencias de ser humano y mono cynomolgus y que son diferentes en RANTES de ratón y rata a las que 1E4 no podía unirse para identificar los siguientes aminoácidos: A16, R17, P18, G32, P37, R59 y S64. Se generaron tres mutantes de RANTES de ratón mediante mutagénesis dirigida al sitio con el fin de introducir los residuos humanos en esas posiciones: [S16A/L17R/A18P]; [S32G/L37P] y [Q59R/Y64S]. Se expresaron estas formas mutantes de RANTES de ratón y se biotinilaron *in vivo* tal como se describe en el ejemplo 1. Se capturaron estas variantes de RANTES de ratón en placas recubiertas con estreptavidina (Streptawell, Roche). Se confirmó el recubrimiento de la quimiocina biotinilada usando un anticuerpo policlonal anti-RANTES de ratón (R&D Systems). Entonces se sometió a prueba si la introducción de estos residuos podía restaurar la unión de 1E4 a RANTES de ratón. En resumen, se capturaron RANTES de ratón, RANTES humana así como tres formas mutantes de RANTES de ratón y sobrenadantes control en placas Streptawell (Roche) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar, se añadió el anticuerpo 1E4 a una concentración de 1 µg/ml en BSA al 1%-PBS y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó la placa y se incubó con un anticuerpo de cabra específico de Fcγ anti-IgG humana acoplado a peroxidasa del rábano (Jackson). Tras lavar, se reveló la señal con TMB (Roche) y se detuvo con H₂SO₄. Se leyeron las placas a 450 nm. Tal como se muestra en la figura 7, el mutante [S16A/L17R/A18P] restaura la unión de 1E4 a RANTES de ratón, lo que indica que A16, R17 y P18 son críticos para la integridad de epítomos de 1E4 en RANTES humana.

EJEMPLO 15: Afinidad y cinética de unión de 1E4

Se caracterizaron la afinidad y cinética de unión de 1E4 en RANTES humana y RANTES de mono cynomolgus en un instrumento Biacore 2000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Se inmovilizaron 433 UR (unidad de respuesta) de un anticuerpo policlonal de asno anti-IgG humana mediante química de EDC/NHS sobre un chip C 1 Biacore. Se usó esta superficie para capturar el anticuerpo 1E4. Se regeneró la superficie tras cada ciclo mediante inyección de glicina 10 mM pH=2 a 30 µl/min., durante 60 s seguido por 1 min. de tiempo de estabilización en tampón HBS-EP.

Se midió la unión haciendo pasar o bien huRANTES (Peprotech, Rocky Hill NJ) o bien proteínas de fusión con NusA de RANTES humana (NusA-huRANTES) y RANTES de mono cynomolgus (NusA-cynoRANTES) a diversas concentraciones. Se diluyeron todas las proteínas en el tampón de ejecución tampón HBS-EP (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Se realizó la inyección a 75 µl/min. durante 3 min. seguido por 15 min. de tiempo de disociación y se fijó la temperatura a 25°C. Se ajustaron los datos según el modelo de Langmuir 1:1 y se determinaron los valores de K_{on}, K_{off} y K_D. Se obtuvieron valores muy similares usando huRANTES o la fusión NusA-huRANTES, pero se obtuvieron mejores señales de respuesta con la proteína de fusión debido a su mayor tamaño que induce una mejor respuesta en el Biacore. La afinidad del anticuerpo 1E4 por huRANTES y cynoRANTES es de 0,45 nM y 2,24 nM, respectivamente. Se resumen las constantes cinéticas y afinidades de ambos anticuerpos en la tabla 10.

Tabla 10. Constantes de afinidad y cinética del anticuerpo 1E4 para RANTES humana y de mono cynomolgus medidas mediante Biacore.

	huRANTES	NusA-huRANTES	NusA-cynoRANTES
Ka (1/Ms)	5,36x10 ⁶	1,87x10 ⁶	5,46x10 ⁶
Kd (1/s)	2,44x10 ⁻³	8,35x10 ⁻⁴	1,22x10 ⁻³
KD (M)	4,55x10 ⁻¹⁰	4,47x10 ⁻¹⁰	2,24x10 ⁻⁹

EJEMPLO 16: Modelo animal de isquemia

Materiales y métodos

Animales: Se usan ratones C57BL/6 de ocho a 12 semanas de edad para los experimentos. Se aprobaron todos los estudios con animales por el comité de ética local.

Anticuerpos y tratamiento *in vivo*: Se les inyectó a los ratones C57BL/6 o bien en la cavidad peritoneal (i.p.) o bien por vía intravenosa (i.v.). Para el modelo de isquemia seguida por reperusión, se inyectaron anticuerpos monoclonales (Acm) 5 minutos antes del final del periodo de oclusión. Para el modelo de ligamiento permanente, se inyectaron Acm 5 minutos tras ponerse la ligadura crónica en su lugar. Los Acm incluían: (1) el anticuerpo de rata anti-RANTES de ratón (mRANTES), AcM478 y (2) Acm de rata control de isotipo anti-ratón, AcM64. Se obtuvieron hibridomas que producían AcM478 o AcM64 de R&D o la Colección Americana de Cultivos tisulares, respectivamente, y todos los Acm se produjeron, purificaron y almacenaron internamente.

Para el tratamiento i.p., se administró 1 mg/ratón de los Acm control de IgG o anti-mRANTES. Para el tratamiento i.v., se administraron o bien 0,1, 0,3, 0,5 ó 1 mg/ratón del Acm anti-mRANTES o bien 1 mg/ratón del control de IgG (es decir, la dosis más alta de anti-mRANTES).

Modelo de ligamiento permanente o isquemia-reperusión *in vivo*

Cirugía: Se anestesiaron inicialmente los ratones con isofluorano al 4%, luego se intubaron. Se realizó ventilación mecánica con un volumen tidal de 300 μ l a 120 respiraciones usando un respirador de roedor (modelo 683; Harvard Apparatus). Se mantuvo la anestesia con isofluorano al 2% suministrado un 100% a través del ventilador. Se realizó una toracotomía en el cuarto espacio intercostal izquierdo, y entonces se extrajo el saco pericárdico. Se hizo pasar una sutura de Prolene 8-0 bajo la arteria coronaria izquierda en el borde inferior de la aurícula izquierda y se ató con un nudo corredizo para producir la oclusión.

Para el modelo de reperfusión, se usó un pequeño trozo de tubo de polietileno para sujetar la ligadura sin dañar la arteria y tras 30 minutos de isquemia, se liberó la oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) y se permitió que se produjera reperfusión.

Para el modelo de ligamiento permanente, se ocluyó de manera irreversible la arteria coronaria LAD usando una sutura de Prolene 8-0 con un nudo doble. Entonces se cerró el tórax y se evacuó el aire de la cavidad torácica. Entonces se retiró el tubo endotraqueal y se restauró la respiración normal.

Tras 24 horas de reperfusión o tras 24 horas de oclusión permanente, se sacrificaron los animales para determinar el tamaño del infarto.

Evaluación de la zona de riesgo y del tamaño del infarto: Al final del periodo de reperfusión, volvieron a anestesiarse los ratones con 0,3 ml de ketamina-xilazina y volvió a ligarse la arteria coronaria LAD. Se inyectó colorante azul Evans al 3% (Sigma) por vía i.v. (administración retroorbital) para delinear la zona de riesgo *in vivo* (R). Se extirpó rápidamente el corazón y se enjuagó en solución salina. Tras la eliminación del ventrículo derecho y los tejidos conjuntivos, se congeló el corazón y entonces se cortó en secciones transversales de 3 mm desde el vértice hasta la base (5 cortes/corazón). Tras descongelar, se incubaron las secciones a 37°C con cloruro de trifeníltetrazolio al 1% en tampón fosfato (pH 7,4) durante 15 min., se fijaron en disolución de formaldehído al 10% y, tras 24 horas, se fotografiaron con una cámara digital para distinguir zonas de tejido viable teñido frente a tejido necrótico no teñido. Se determinó la zona de infarto ventricular izquierda (I) usando una técnica planimétrica computerizada (software MetaMorph6, Zeiss) y se expresó como un porcentaje de o bien el área en riesgo (AAR) o bien el área ventricular (V).

EJEMPLO 17: Efecto de la inhibición de RANTES en modelos de isquemia-reperfusión

Modelo 1: Isquemia-reperfusión

Se muestra en la figura 8 un diagrama que ilustra el protocolo del modelo de isquemia-reperfusión murino. En este protocolo, se dividen los ratones B6 en tres grupos y se les administra un control de vehículo (PBS), un control de isotipo (Acm 64 descrito en el ejemplo 10) o un anticuerpo monoclonal de rata anti-mRANTES según el siguiente programa:

- | | |
|----------|--|
| Grupo 1: | PBS administrado por vía i.p. o i.v. 5 minutos antes de la reperfusión: |
| Grupo 2: | IgG2a de rata (Acm 64; control de isotipo) administrada por vía i.p. (1 mg/ratón) o por vía i.v. (1,0 mg/ratón) 5 minutos antes de la reperfusión: |
| Grupo 3: | Anticuerpo de rata anti-RANTES de ratón (Acm 478) administrado por vía i.p. (1 mg/ratón) o por vía i.v. (0,1, 0,3, 0,5, 1,0 mg/ratón) 5 minutos antes de la reperfusión. |

Se sacrificaron todos los animales 24 horas tras la reperfusión. Se evaluó cada grupo de ratones valorando los siguientes parámetros:

- peso de los ratones;
- AAR/V = área en riesgo dividida entre el área total del corazón (zona isquémica);
- I/AAR = área infartada dividida entre el área en riesgo; y
- I/V = área infartada dividida entre el área total de los ventrículos.

Tanto I/AAR como I/V proporcionan datos sobre la extensión de tejido infartado.

Tal como se muestra en la figura 9, el tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-RANTES disminuyó el tamaño del infarto en el modelo murino de isquemia-reperfusión proporcionado en el presente documento. La inyección del Acm 478 (1 mg/ratón por vía i.p.) cinco minutos antes de la reperfusión disminuyó significativamente el tamaño del infarto en comparación con ratones tratados con PBS o control de isotipo. Los datos representan 20 ratones por grupo.

La figura 10 demuestra que el tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-RANTES disminuyó el tamaño del infarto en el modelo murino de isquemia-reperfusión de una manera dependiente de la dosis. La inyección del Acm 478 por vía i.v. (a dosis de 0,1, 0,3, 0,5, 1,0 mg/ratón) cinco minutos antes de la reperusión disminuyó significativamente el tamaño del infarto a dosis superiores en comparación con el control de isotipo (1 mg/ratón). Los datos representan 3 ratones por grupo.

Modelo 2: Oclusión permanente

Se muestra en la figura 11 un diagrama que ilustra el protocolo del modelo de oclusión permanente murino. En este protocolo, se dividen los ratones B6 en tres grupos y se les administra un control de vehículo (PBS), un control de isotipo (Acm 64 descrito en el ejemplo 10) o un anticuerpo monoclonal de rata anti-mRANTES según el siguiente programa:

- Grupo 1: PBS administrado por vía i.p. o i.v.;
- Grupo 2: IgG2a de rata (Acm 64; control de isotipo) administrada por vía i.p. (1 mg/ratón) o i.v. (1,0 mg/ratón);
- Grupo 3: Anticuerpo de rata anti-RANTES de ratón (Acm 478) administrado por vía i.p. (1 mg/ratón) o por vía i.v. (0,1, 0,3, 0,5, 1,0 mg/ratón).

Se evaluó cada grupo de ratones valorando los siguientes parámetros:

- peso de los ratones;
- AAR/V = área en riesgo dividida entre el área total del corazón (zona isquémica);
- I/AAR = área infartada dividida entre el área en riesgo; y
- I/V = área infartada dividida entre el área total de los ventrículos.

Se sacrificaron todos los animales a las 24 h tras la oclusión.

Tal como se muestra en la figura 12, el tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-RANTES disminuyó el tamaño del infarto en el modelo murino de isquemia proporcionado en el presente documento. La inyección del Acm 478 (1 mg/ratón por vía i.p.) disminuyó significativamente el tamaño del infarto en comparación con ratones tratados con PBS o control de isotipo. Los datos representan 10 ratones por grupo.

La figura 13 demuestra que el tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-RANTES disminuyó el tamaño del infarto en el modelo murino de isquemia de una manera dependiente de la dosis. La inyección del Acm 478 por vía i.v. (a dosis de 0,1, 0,3, 0,5, 1,0 mg/ratón) disminuyó significativamente el tamaño del infarto a dosis superiores en comparación con el control de isotipo (1 mg/ratón). Los datos representan 3 ratones por grupo.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti-RANTES humana monoclonal completamente humano aislado o fragmento del mismo, en el que dicho anticuerpo comprende:

a) una región CDR1 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; una región CDR2 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; una región CDR3 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; una región CDR1 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; una región CDR2 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y una región CDR3 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, o

b) una región CDR1 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; una región CDR2 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; una región CDR3 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; una región CDR1 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; una región CDR2 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y una región CDR3 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o

c) una región CDR1 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28; una región CDR2 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29; una región CDR3 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30; una región CDR1 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; una región CDR2 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35; y una región CDR3 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36;

en el que dicho anticuerpo se une a RANTES.

2. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que

a) dicho anticuerpo es un isotipo IgG o

b) dicho anticuerpo es un isotipo IgG1.

3. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende una región CDR1 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; una región CDR2 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; una región CDR3 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; una región CDR1 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; una región CDR2 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y una región CDR3 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, y en el que dicho anticuerpo comprende una secuencia variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una secuencia variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

4. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende una región CDR1 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; una región CDR2 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; una región CDR3 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; una región CDR1 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; una región CDR2 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15; y una región CDR3 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, y en el que dicho anticuerpo comprende una secuencia variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una secuencia variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

5. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende una región CDR1 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28; una región CDR2 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 29; una región CDR3 de V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 30; una región CDR1 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34; una región CDR2 de V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35; y una región CDR3 de V_L que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, y en el que dicho anticuerpo comprende una secuencia variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y una secuencia variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24.

6. Anticuerpo según la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 238 y una secuencia de cadena ligera

que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 254.

- 5 7. Anticuerpo según la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 263 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 264.
- 10 8. Anticuerpo según la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo comprende una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 186 y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 187.
- 15 9. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo se une a RANTES humana cuando RANTES humana está unida a un glucosaminoglucano (GAG).
- 20 10. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el fragmento se selecciona de Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos biespecíficos y anticuerpos heteroconjugados.
- 25 11. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un portador.
12. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en un método de tratamiento para aliviar un síntoma de una enfermedad autoinmunitaria o un trastorno inflamatorio, comprendiendo dicho método administrar el anticuerpo a un sujeto que lo necesita en una cantidad suficiente para aliviar el síntoma de la enfermedad autoinmunitaria o el trastorno inflamatorio en el sujeto.
13. Anticuerpo según la reivindicación 9, en el que dicho sujeto es un ser humano.

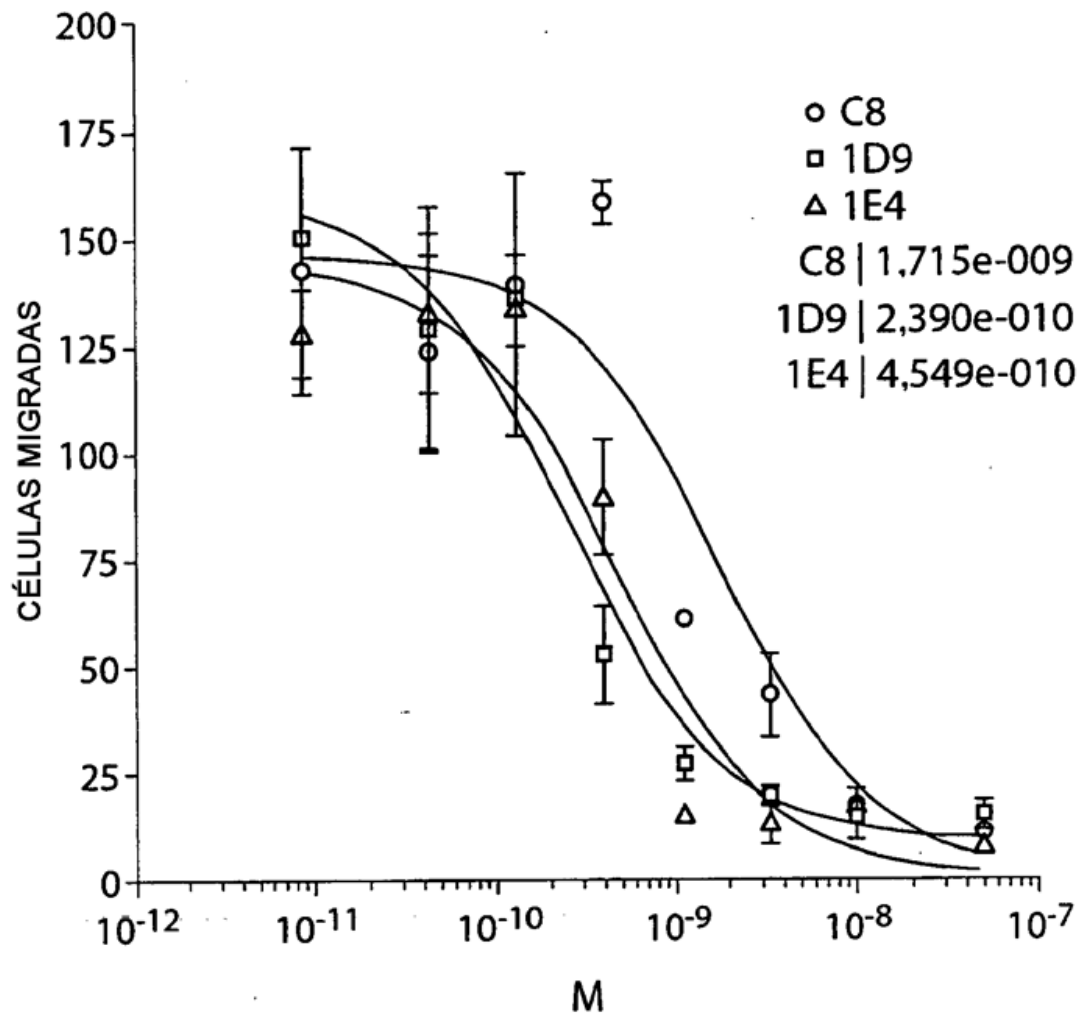


Fig. 1A

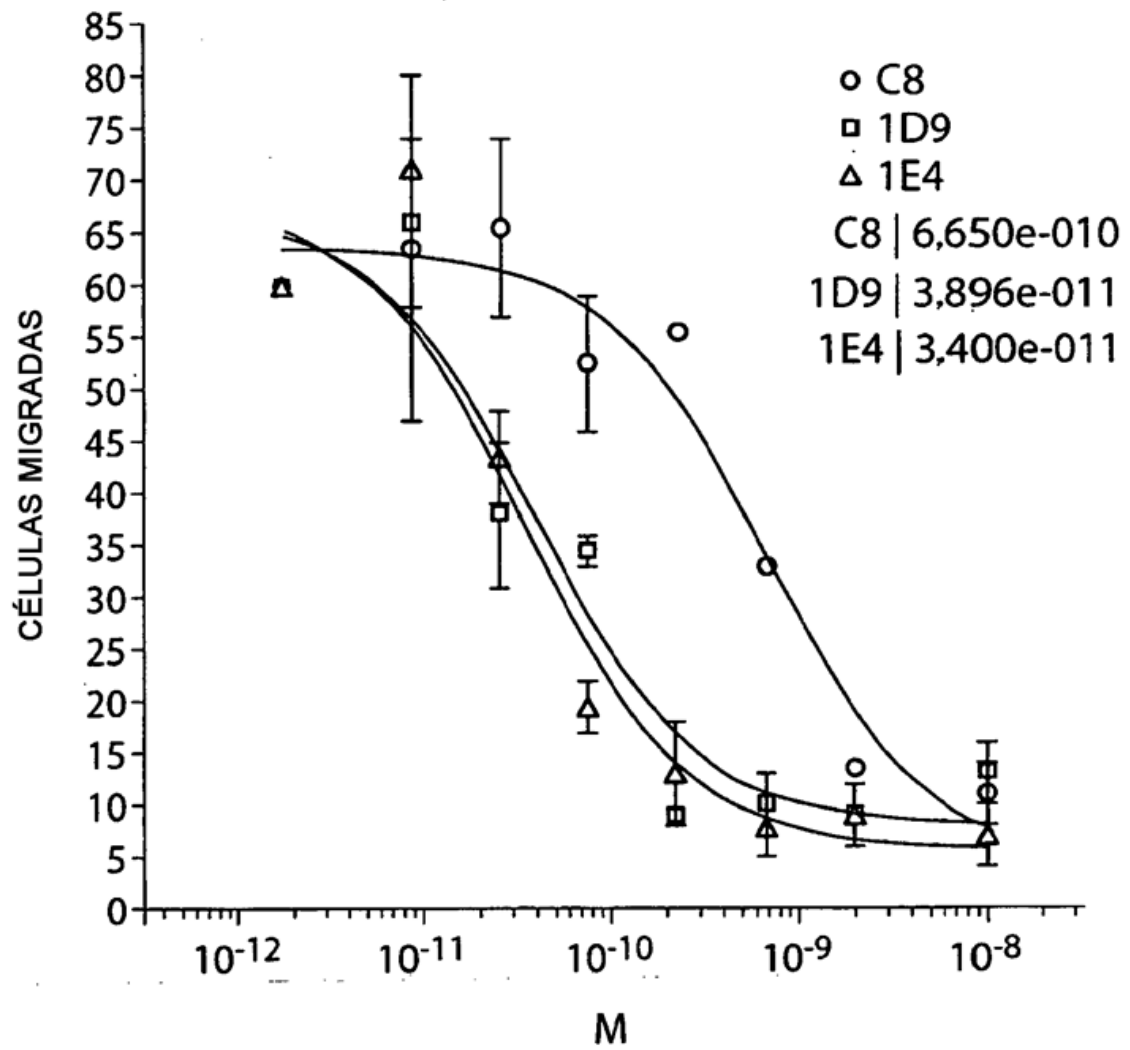


Fig. 1B

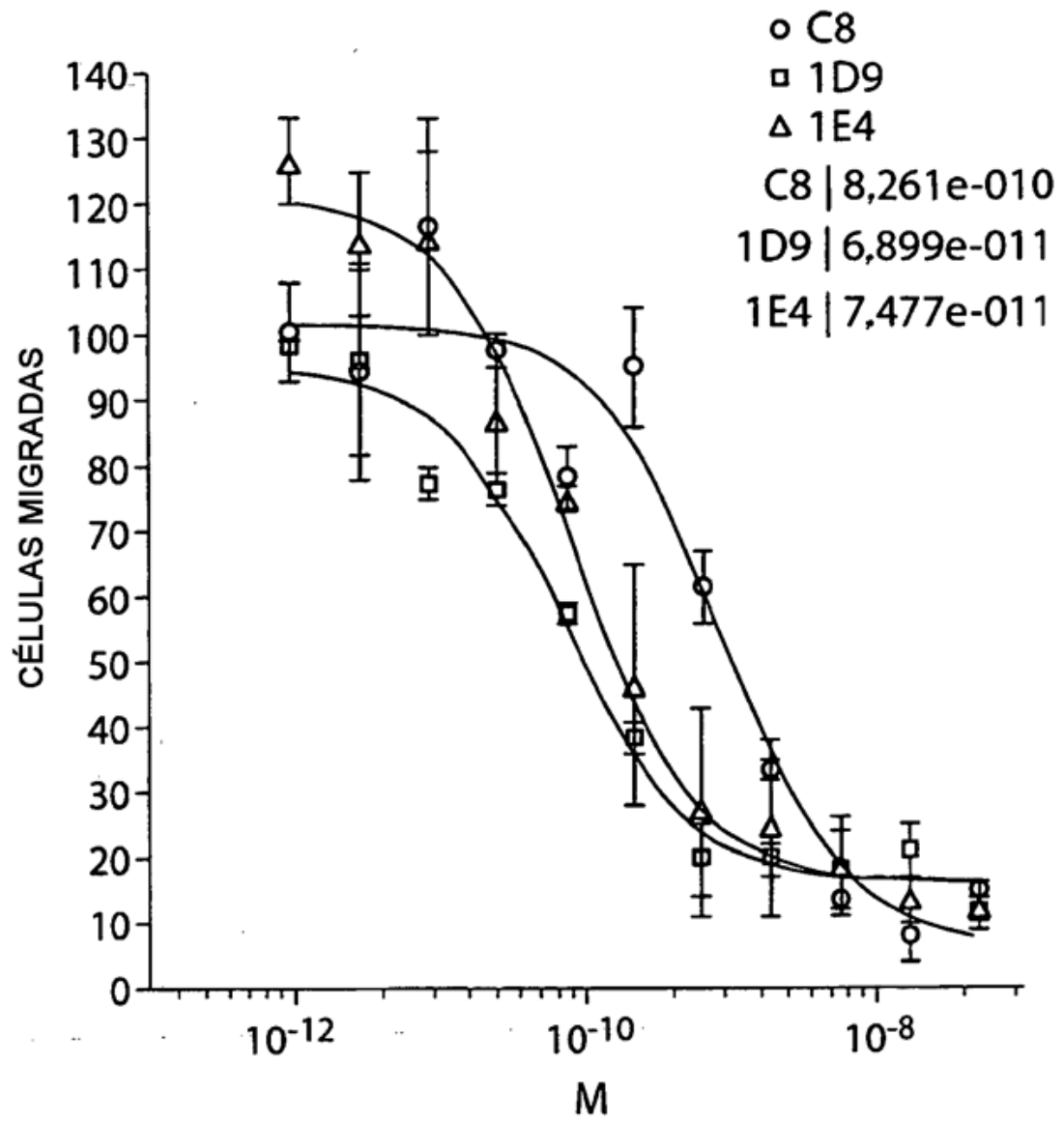


Fig. 1C

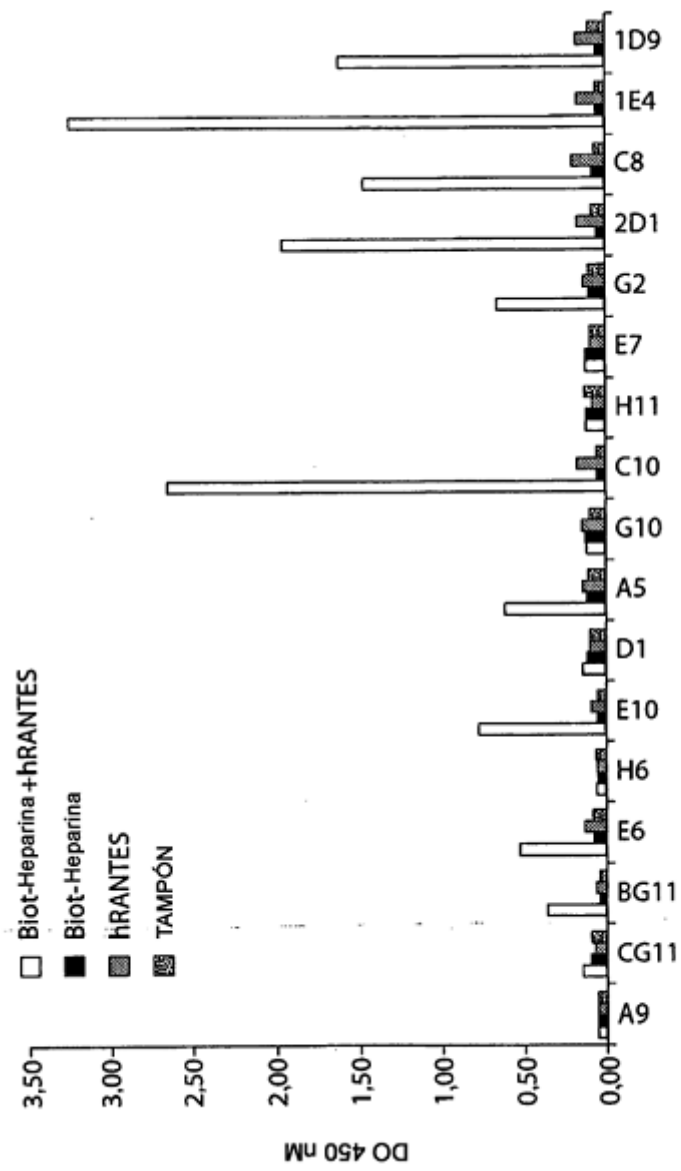
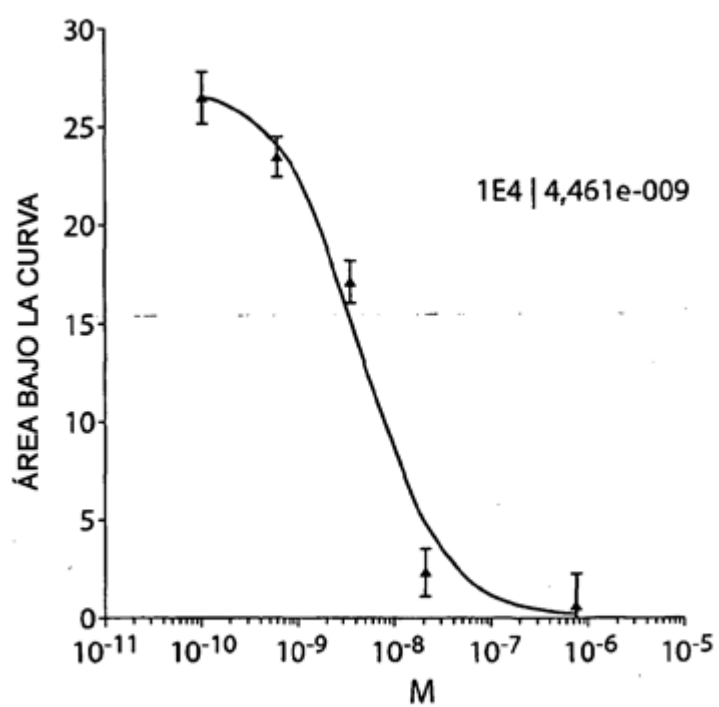
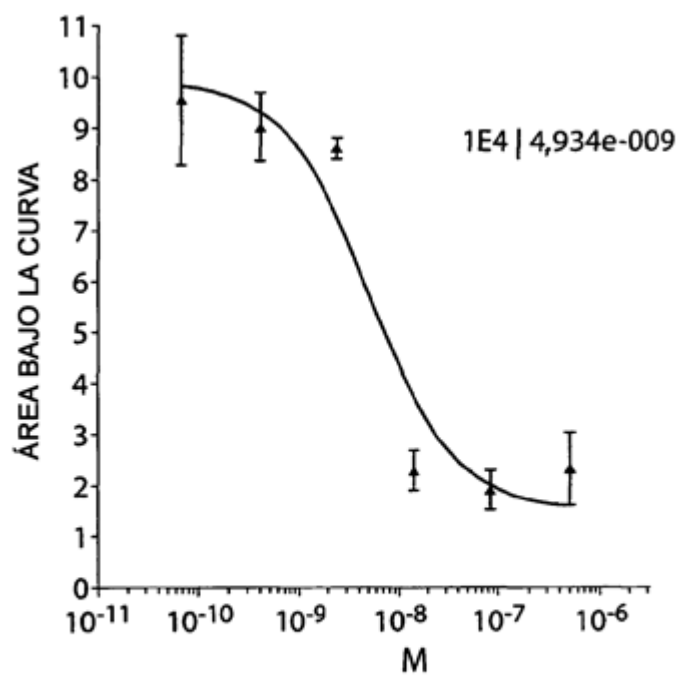


Fig. 2



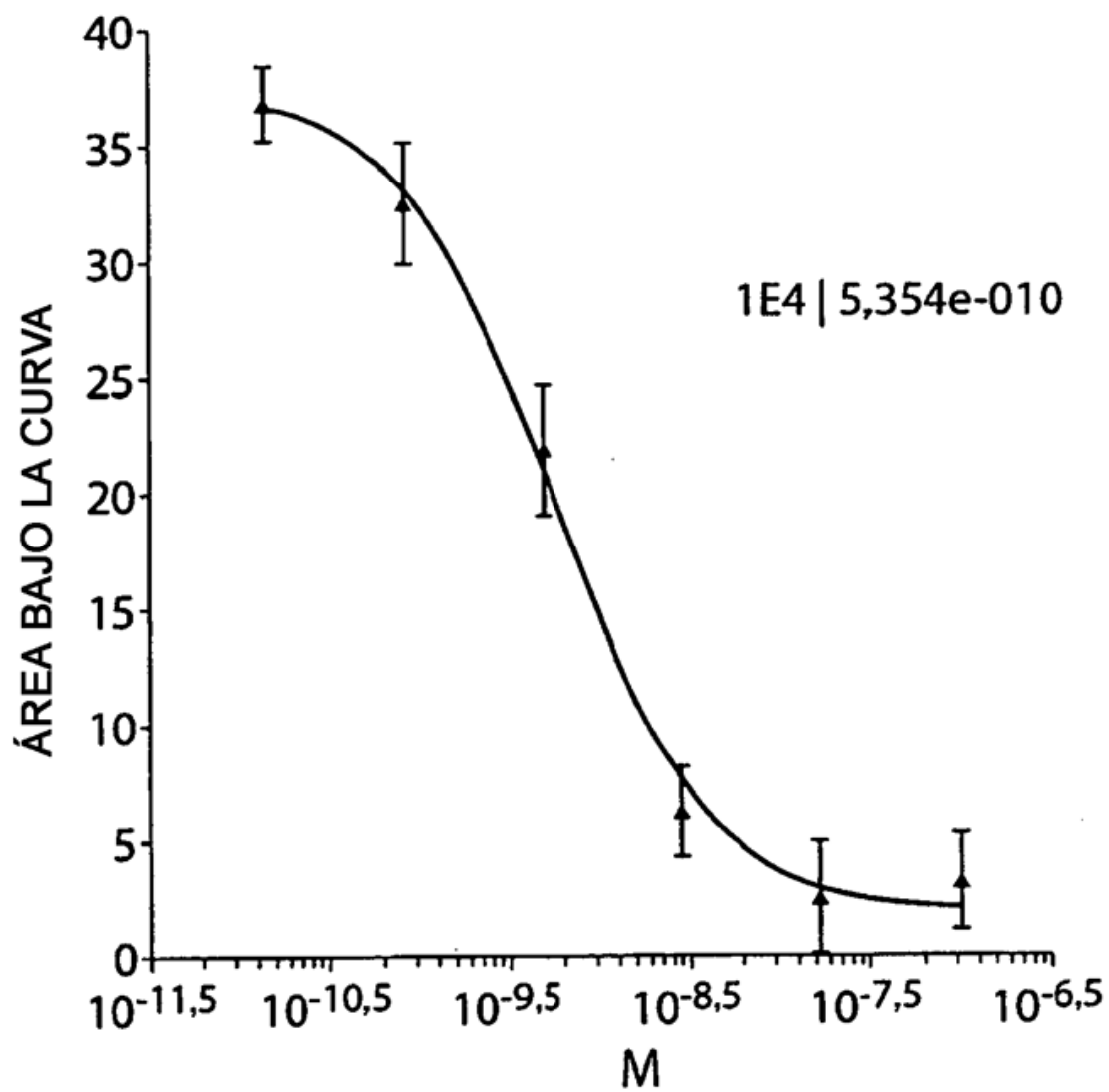


Fig. 3C

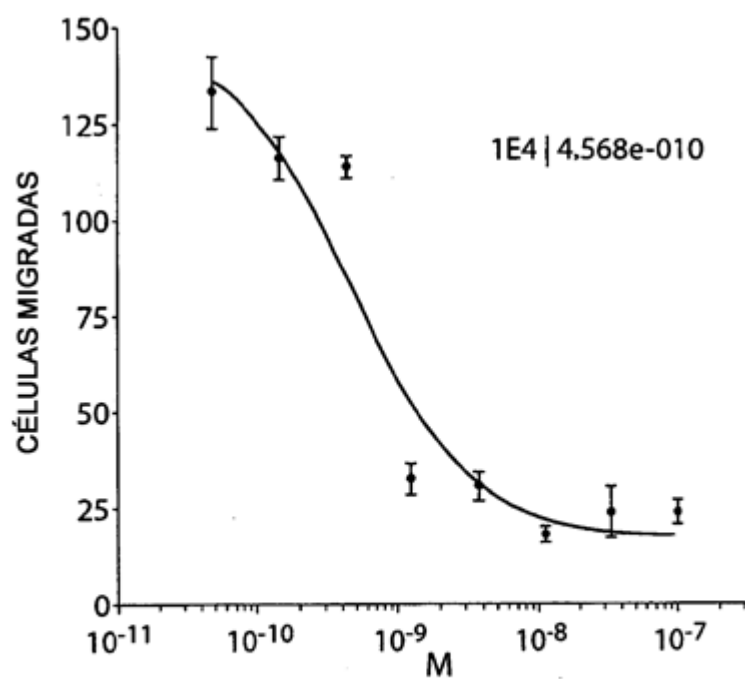


Fig. 4A

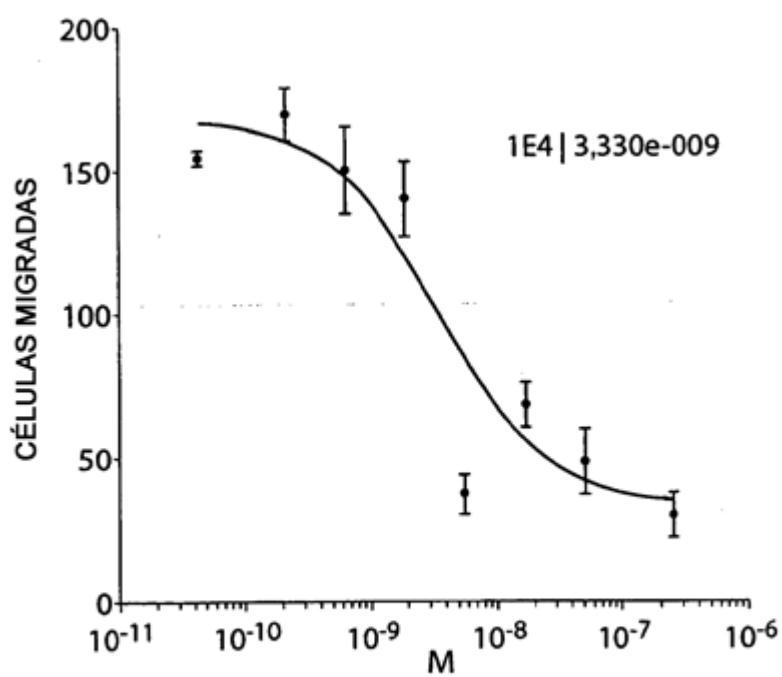
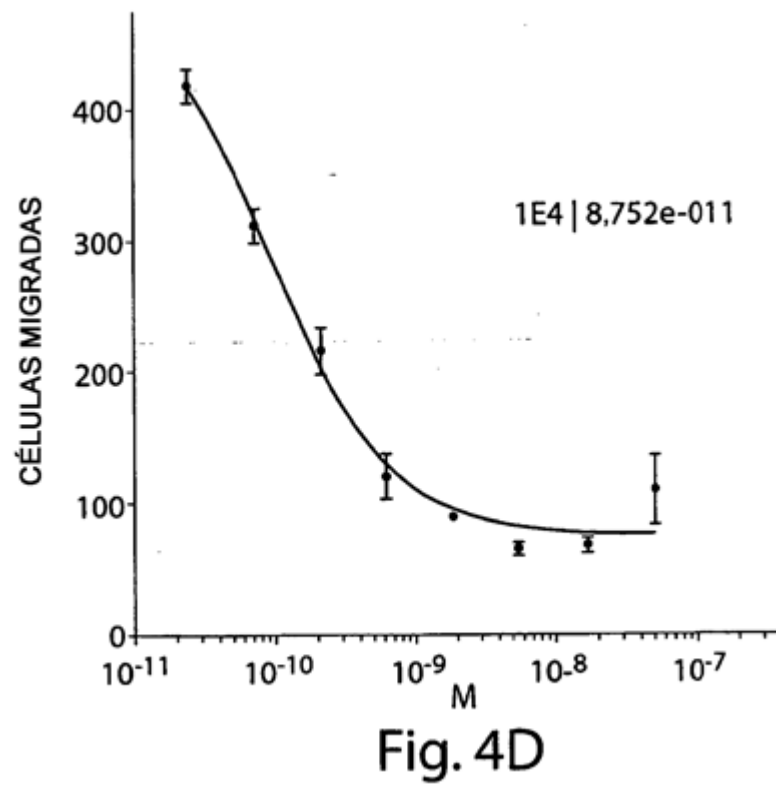
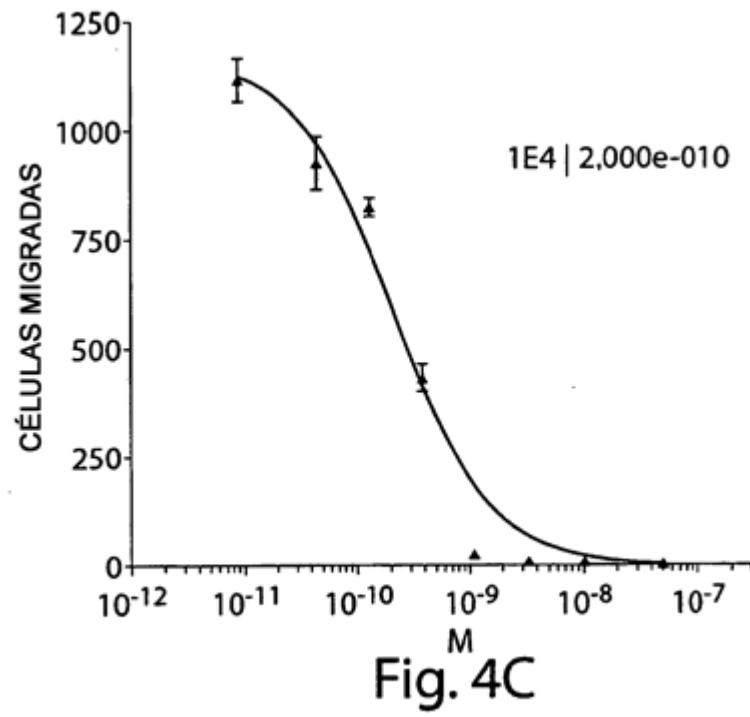


Fig. 4B



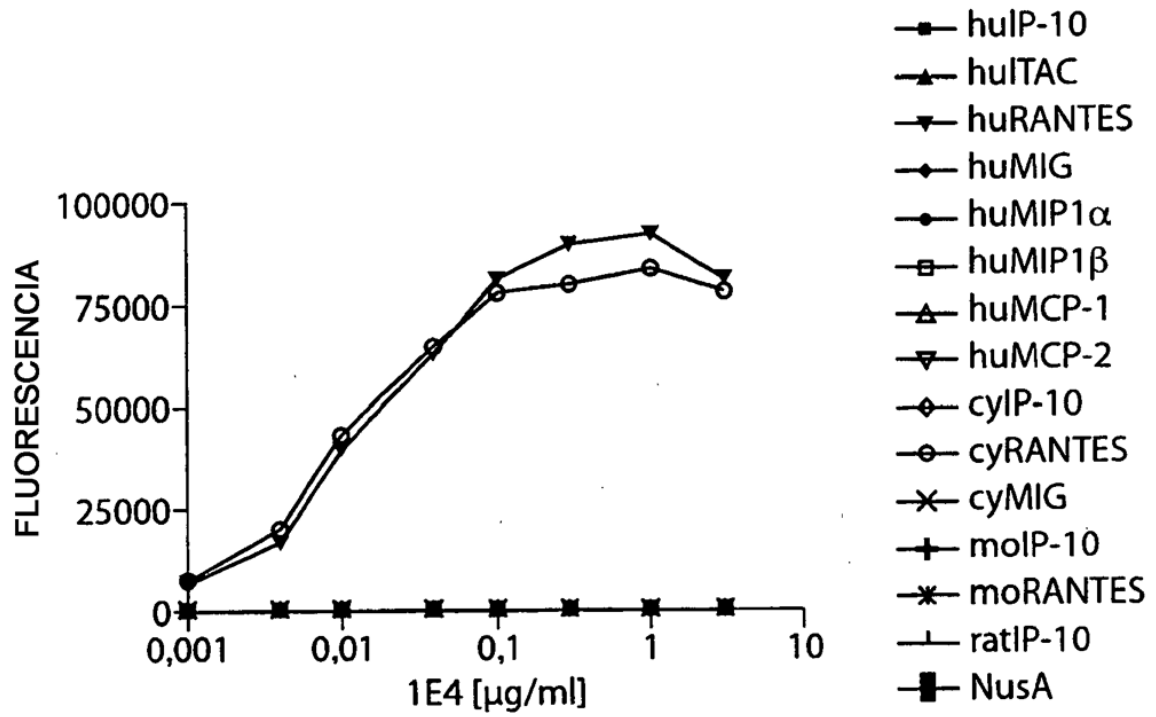


Fig. 5

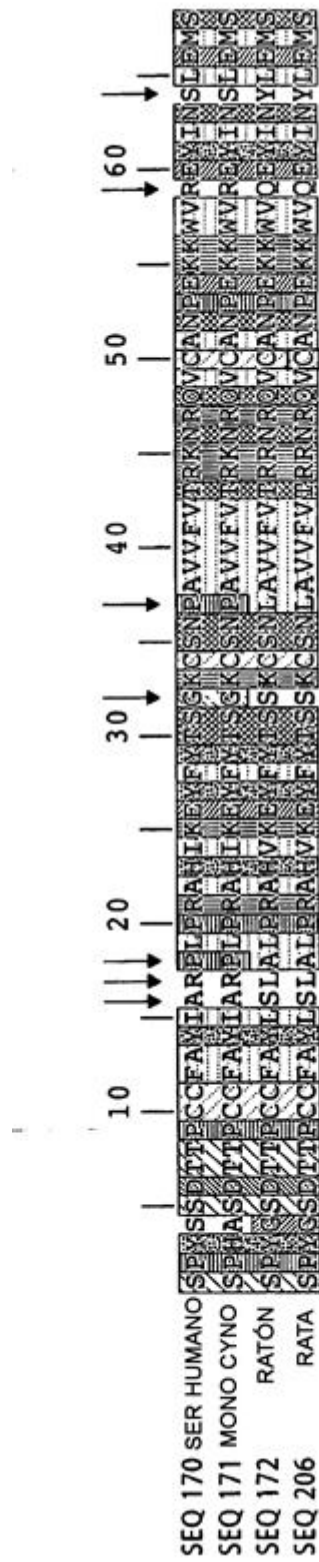


Fig. 6

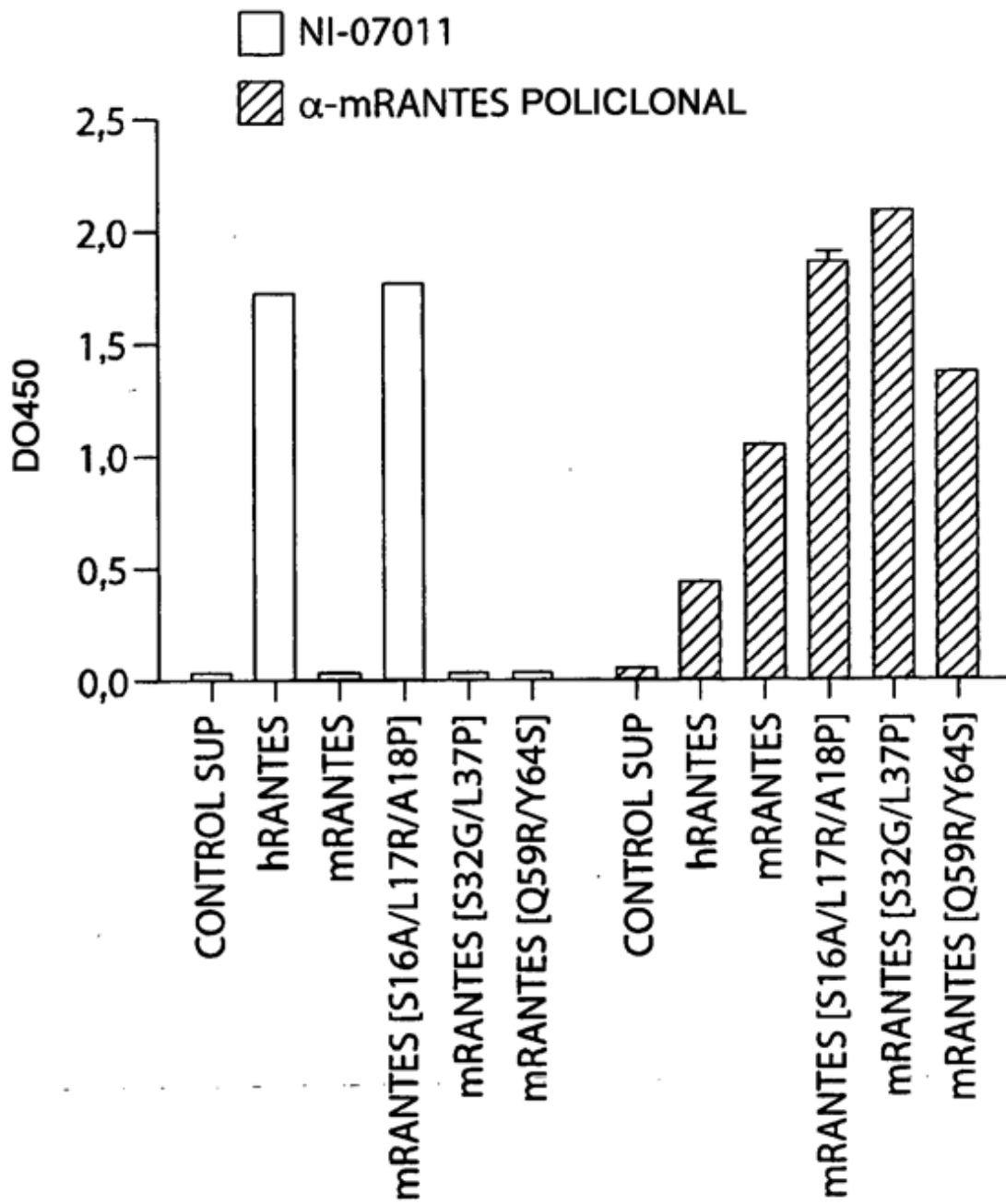


Fig. 7

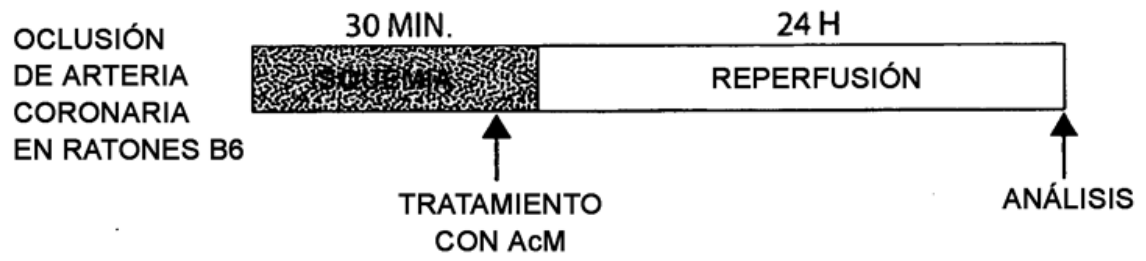


Fig. 8

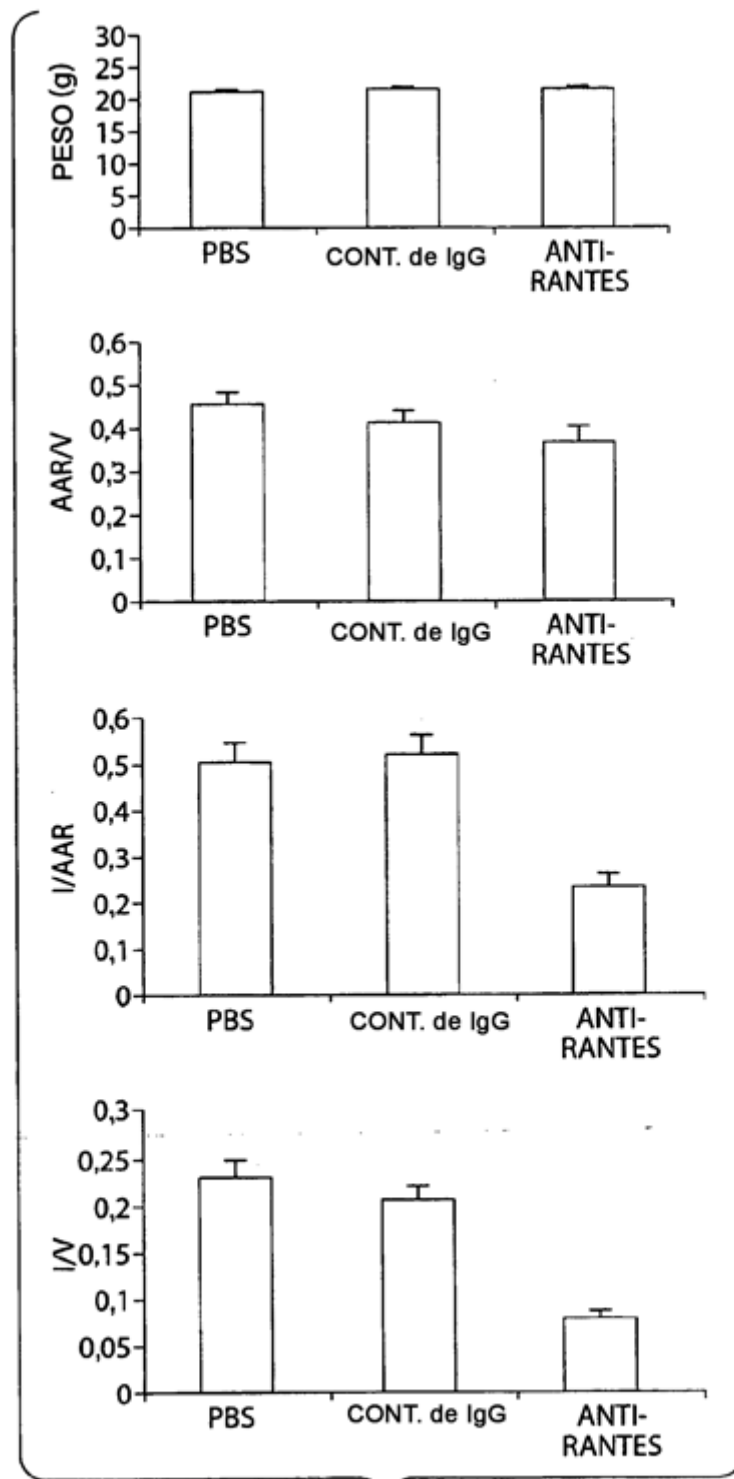


Fig. 9

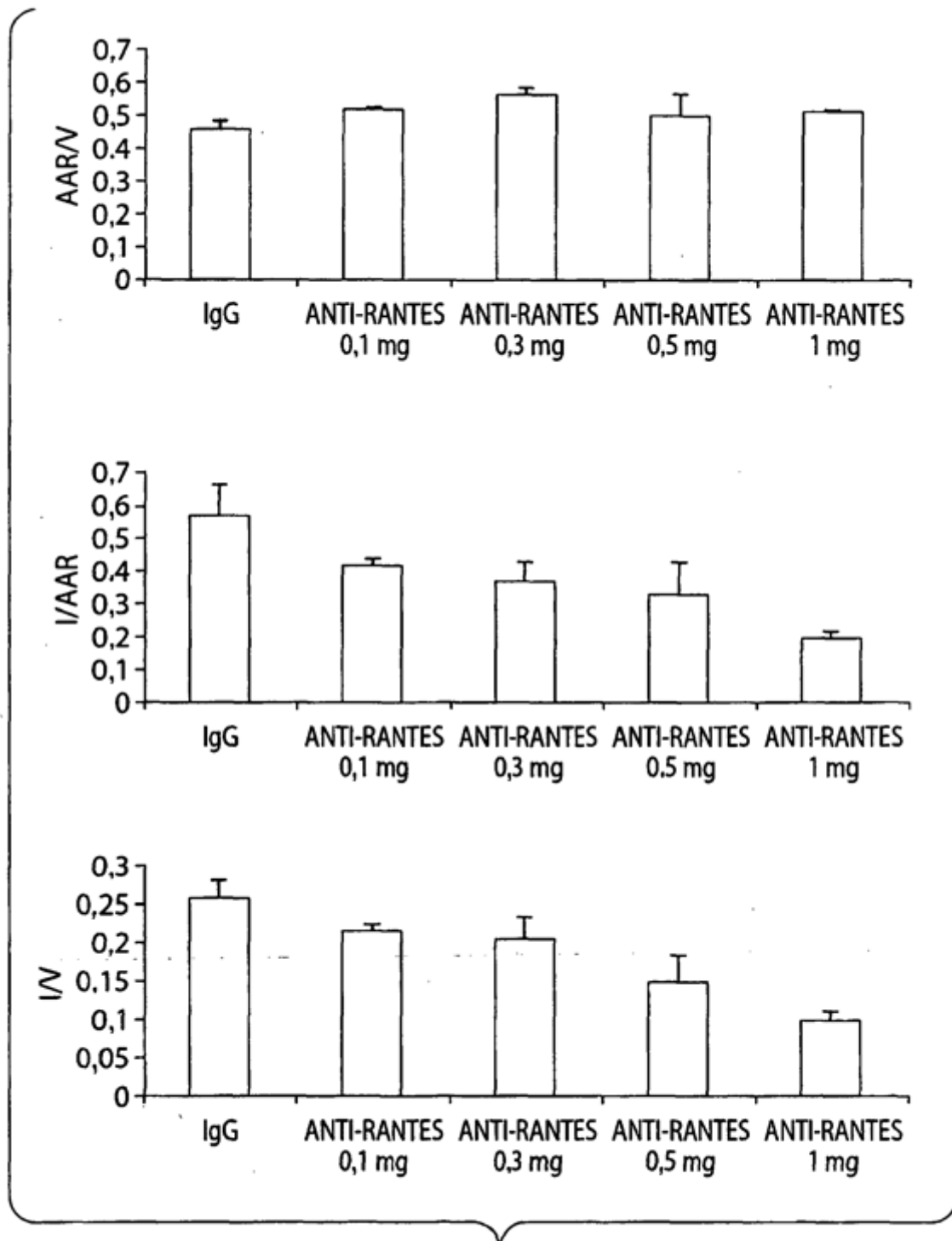


Fig. 10

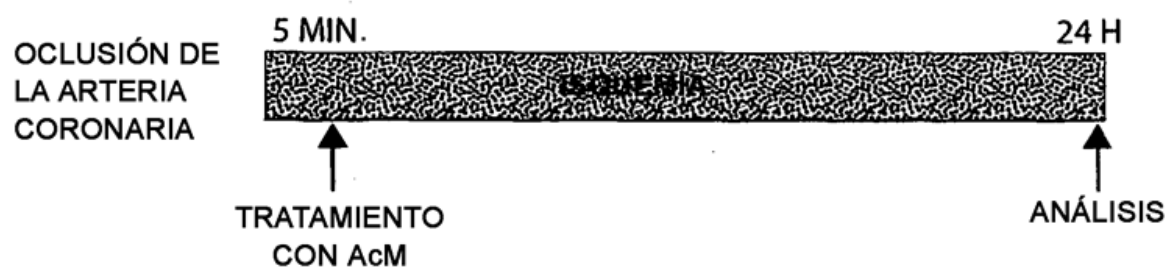


Fig. 11

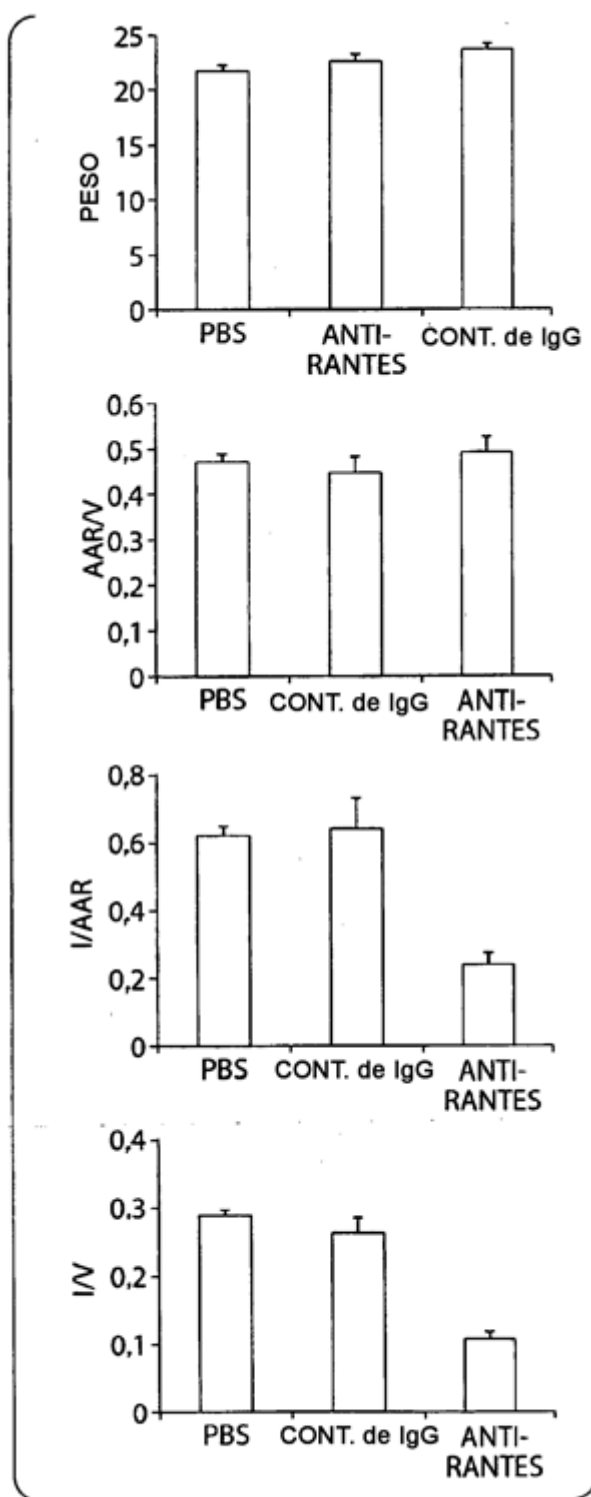


Fig. 12

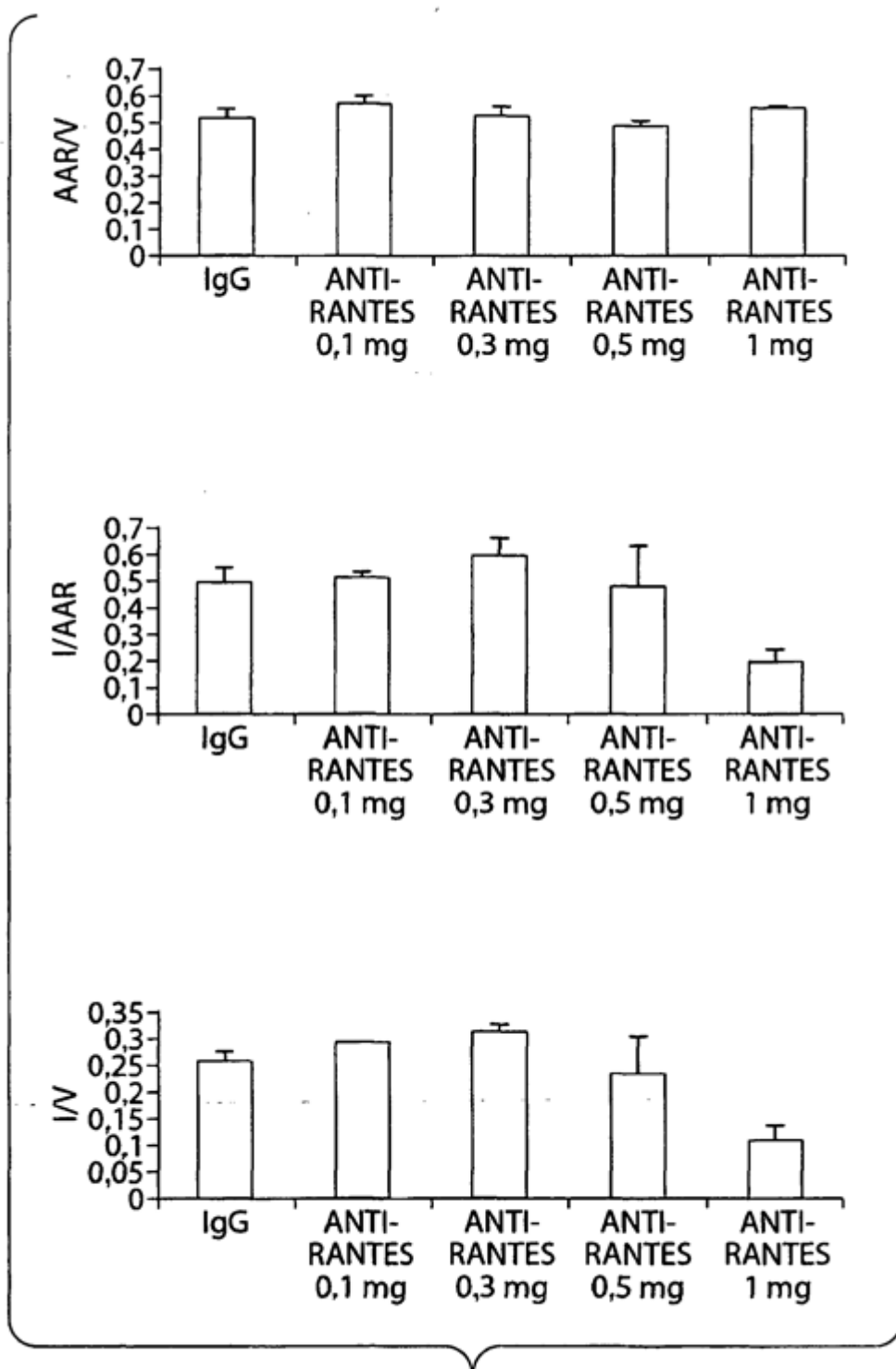


Fig. 13