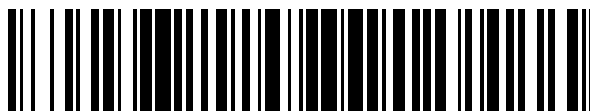


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 483 991**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2001 E 09167955 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2113516**

54 Título: **Anticuerpos contra C5 que inhibe la activación de las células endoteliales de tipo II**

30 Prioridad:

10.10.2000 US 239309 P

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

08.08.2014

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US

72 Inventor/es:

FUNG, MICHAEL S. C.;
SUN, BILL N.C. y
SUN, CECILY

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 483 991 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra C5 que inhibe la activación de las células endoteliales de tipo II

Antecedentes de la invención

5 El aumento de la escasez de órganos de donantes ha provocado un interés mundial en los xenotransplantes, es decir, el reemplazo de órganos humanos o tejidos con los de un donante de una especie diferente, tal como cerdos. Los recientes progresos ofrecen motivos para el optimismo, pero hay obstáculos que se deben superar.

10 Los xenotransplantes han sido clasificados en dos grupos, concordantes y discordantes, según la distancia filogenética entre las especies. Los animales que están evolutivamente cerca y no tienen anticuerpos naturales específicos entre sí son llamados concordantes. Los animales que son filogenéticamente distantes y rechazan órganos de una manera hiperaguda son llamados discordantes. Hay muchas gradaciones en medio y excepciones a la regla.

15 Los primates no humanos serían la fuente lógica de órganos para los seres humanos porque son los más estrechamente relacionados. Sin embargo, debido a consideraciones del tamaño de los órganos, carencia de disponibilidad y la probabilidad de transmisión de enfermedades infecciosas, la mayor parte de los investigadores han determinado que los primates no son la fuente preferida de órganos. En cambio, los cerdos son la opción más probable como fuente de órganos, debido a su fácil disponibilidad, semejanzas en el tamaño de los órganos, sus características de cría y la semejanza de los sistemas orgánicos respecto a los seres humanos. Sin embargo, los cerdos son una especie discordante respecto a los seres humanos.

20 Los xenoinjertos son objeto de cuatro mecanismos de rechazo: (1) rechazo hiperagudo mediado por anticuerpos preformados, (2) rechazo precoz o acelerado mediado por anticuerpos inducidos, (3) rechazo de xenoinjerto retrasado o rechazo vascular agudo (DXR/AVR) mediado por células T, y (4) rechazo crónico mediado por mecanismos de células T y células B. La inducción de los cuatro mecanismos puede ser atribuida a un mayor número de antígenos foráneos presentes que en el tejido del aloinjerto (uno de la misma especie, es decir, ser humano). Además, los receptores inhibitorios humanos a menudo no interactúan con otras moléculas MHC de clase I de la especie, permitiendo así la activación de varios mecanismos de rechazo que proceden sin inhibición.

25 Se ha descrito el trasplante de islotes pancreáticos porcinos y de un hígado de cerdo en pacientes humanos, (Makowka, et al., 1993; Satake, et al., 1993; Tibell, et al., 1993), pero los resultados no fueron positivos. Una mejor inhibición del rechazo de trasplantes con terapia farmacológica puede conducir a mejores resultados.

30 El rechazo hiperagudo (HAR) de xenoinjertos se inicia por la unión de anticuerpos xeno-reactivos a las células endoteliales del donante seguido de la activación del complemento, predominantemente mediante la ruta clásica. Los cerdos, por ejemplo, expresan un determinante de hidrato de carbono endotelial, gal $\alpha(1,3)$ gal, que no se expresa en seres humanos, y que es considerado un nuevo antígeno del grupo sanguíneo respecto al sistema inmunológico humano. La activación del complemento induce una activación del tipo I de las células endoteliales, un proceso que es rápido e independiente de la síntesis de proteínas. Se caracteriza por la retracción celular reversible, la translocación de selectina P a la superficie apical y la elaboración de diversas sustancias vasoactivas.

35 Además, se liberan proteoglicanos de sulfato de heparina desde la superficie de las células endoteliales dejando que la célula quede susceptible a daños procoagulantes y mediados por complemento. Las funciones críticas de las células endoteliales se pierden y el resultado final es una hemorragia intersticial, una trombosis difusa y daños del órgano irreversibles que aparecen en los pocos minutos o varias horas después del trasplante. Éstos son los rasgos característicos del HAR. El HAR puede prevenirse reduciendo la actividad del complemento o el nivel de los anticuerpos anti-xenoinjerto que aparecen de forma natural.

40 Incluso si se reduce o elimina el HAR, el xenoinjerto será rechazado después de unos días por el proceso denominado rechazo de xenoinjerto retrasado o rechazo vascular agudo (DXR/AVR). El DXR/AVR se caracteriza por una activación de las células endoteliales del tipo II, que depende de la síntesis de proteínas. Aunque se piense que DXR/AVR es, en gran parte, independiente del complemento, algunos estudios indican que el complemento todavía puede estar implicado en DXR/AVR. La inhibición del complemento por el receptor del complemento soluble tipo I (sCR1) combinado con la inmunodepresión retrasó la aparición de DXR/AVR de corazones porcinos trasplantados en monos cynomolgus (Davis, EA et al., Transplantation 62: 1018-23 (1996)). El trasplante de riñones de cerdo que expresan el factor acelerador de la degradación humano respecto a monos cynomolgus también tuvo algún efecto protector contra DXR/AVR (Zaidi A et al. Transplantation 65: 1584-90 (1998); Loss M et al., Xenotransplantation 7: 186-9 (2000)). La adición de anticuerpos anti-células endoteliales y complemento en dosis subclínica indujo la expresión del factor de tejido (Saadi S et al., J. Exp. Med. 182: 1807-14 (1995)). Las células endoteliales porcinas expuestas a suero humano expresaron el inhibidor del activador de plasminógeno (Kalady MF et al., Mol. Med. 4: 629-37 (1998)) y aumentaron la expresión de varios genes de quimioquina (Selvan RS et al., J. Immunol. 161: 4388-95 (1998)). Se encontró que el aumento de la expresión de varios genes de quimioquina dependía del complemento. Sin embargo, se demostró que un anticuerpo monoclonal anti-C5 era eficaz en la prevención del HAR, pero no del DXR/AVR (Wang, H. et al., Transplantation 68: 1643-51 (1999)).

La selectina E (también conocida como ELAM-1, CD62 y CD62E) es una molécula de adhesión celular glicoproteica de la superficie celular inducible por citoquinas que se encuentra exclusivamente en las células endoteliales. La selectina E media la adhesión de varios leucocitos, incluyendo neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos T citotóxicos, y un subconjunto de células T, frente al endotelio activado (Bevilacqua, et al., Science 243: 1160 (1989); Shimizu, et al., Nature 349: 799 (1991); Graber, et al., J. Immunol. 145: 819 (1990); Carlos, et al., Blood 77: 2266 (1991); Hakker, et al., Blood 78: 2721 (1991); y Picker, et al., Nature 349: 796 (1991)). La expresión de selectina E se induce en el endotelio humano en respuesta a las citoquinas IL-1 y TNF, así como lipopolisacáridos bacterianos (LPS), por la sobre-regulación transcripcional (Montgomery, et al., Proc Natl Acad Sci 88: 6523 (1991)).

Se ha identificado el receptor de leucocitos humano para la selectina E humana (Berg, et al., J. Biol. Chem. 23: 14869 (1991) y Tyrrell, et al., Proc Natl Acad Sci 88: 10372 (1991)). Estructuralmente, la selectina E pertenece a una familia de moléculas de adhesión llamadas "selectinas" que también incluyen a la selectina P y la selectina L (véanse las revisiones en Lasky, Science 258: 964 (1992) y Bevilacqua y Nelson, J. Clin. Invest. 91: 379 (1993)). Estas moléculas se caracterizan por propiedades estructurales comunes tales como un dominio tipo lectina del extremo amino-terminal, un dominio del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y un pequeño número de módulos de repetición del complemento (aproximadamente 60 aminoácidos cada uno) similares a los encontrados en ciertas proteínas de unión del complemento.

Clínicamente, el aumento de la expresión de la selectina E en el endotelio tiene que ver con una variedad de reacciones inflamatorias agudas y crónicas mediadas por los leucocitos, incluyendo el rechazo de aloinjertos (Allen, et al., Circulation 88: 243 (1993); Brockmeyer, et al., Transplantation 55: 610 (1993); Ferran, et al., Transplantation 55: 605 (1993); y Taylor, et al., Transplantation 54: 451 (1992)). Los estudios en los cuales se ha investigado la expresión de la selectina E humana en aloinjertos cardíacos y renales que sufren un rechazo celular agudo han demostrado que la expresión de selectina E está sobre-regulada selectivamente en el endotelio vascular del tejido renal y cardíaco durante el rechazo agudo. Además, el aumento de la expresión de la selectina E guarda correlación con el curso precoz del rechazo celular y corresponde a la migración de células inflamatorias en el tejido del injerto. Tomados juntos, estos estudios proporcionan pruebas de que la expresión inducida por citoquina de la selectina E por el endotelio del órgano del donante contribuye a la unión y la subsecuente transmigración de células inflamatorias en el tejido del injerto y así desempeña un papel importante en el rechazo de aloinjertos celulares agudos.

El bloqueo de la sobre-regulación de la selectina E, que es un indicativo principal de la activación de células endoteliales del tipo II característica de DXR/AVR, sería una potencial estrategia para tratar y prevenir DXR/AVR.

Resumen de la invención

La invención se define por las reivindicaciones. La descripción se refiere a inhibidores de C5 que se unen a C5 e inhiben la activación de células endoteliales del tipo II, así como la supresión de la sobre-regulación de selectina E en células endoteliales. Los inhibidores de C5 descritos son útiles para el tratamiento y la prevención del rechazo de xenoinjertos, y en particular DXR/AVR. Los inhibidores de C5 descritos también pueden inhibir la formación de C5a, inhibir la formación del complejo del complemento terminal ("TCC") y/o bloquear la lisis de células mediadas por complemento. La invención proporciona anticuerpos monoclonales ("MAb") así como homólogos, análogos y sus formas modificadas o derivadas, incluyendo fragmentos de inmunoglobulina como Fab, F(ab')₂, Fv y anticuerpos de cadena sencilla.

Se mostró que era útil un ejemplo de MAb que se unía a C5, generado en un modelo in vitro, en el tratamiento del rechazo de xenoinjertos y DXR/AVR, como se describe más abajo y que se denomina 137-76. La invención incluye también anticuerpos monoclonales que se unen al mismo epítipo que MaAb 137-76.

El tratamiento del rechazo de xenoinjertos retrasado o el rechazo vascular agudo implican la administración de un inhibidor de C5 como se describe en este documento que inhibe la activación de células endoteliales del tipo II y que puede manifestarse por la depresión de la expresión de la selectina E.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la unión de los anticuerpos anti-C5 al C5 humano en ELISA como una función de la concentración de anticuerpos (véase el Ejemplo 1). MAb 137-76 mostró una fuerte unión con el C5 humano.

La figura 2 muestra la inhibición de la hemólisis por ruta clásica por anticuerpos anti-C5 (véase el Ejemplo 2). Los MABs anti-C5 137-10, 137-21, 137-30, 137-50 y 137-76 inhiben fuertemente la hemólisis por la ruta clásica. MAB 166-32 se une al factor D, que está implicado en la ruta del complemento alternativa y actúa como un control en ésta, y por lo tanto, no muestra inhibición de la hemólisis por la ruta clásica.

La figura 3 muestra la inhibición de la activación de C5 por el MAB anti-C5 137-76 en suero humano (10 %) activado con zimosan (véase el Ejemplo 3). El eje Y representa valores dados en unidades arbitrarias (UA) usando un estándar de suero activado por zimosan al 100 % definido para contener 1000 UA/ml. El eje X representa la concentración de la prueba y los anticuerpos de control negativos. MAB 137-76 inhibe la formación de C5a y TCC (marcadores para la activación de C5), pero no C3bBbP (un marcador de la ruta alternativa), mientras que MAB G3-

519, una proteína del VIH-1 sin participación en la activación del complemento, no inhibe la formación de C5a, TCC o C3bBbP.

La figura 4 muestra la inhibición de la expresión de selectina E en células endoteliales aórticas porcinas. Las células endoteliales aórticas porcinas aisladas fueron tratadas con suero humano (25 %) (véase el Ejemplo 4). El Mab anti-C5 137-76, representado por círculos rellenos, inhibe completamente la sobre-regulación de la selectina E de una manera dependiente de la dosis. El MAb control coincidente con isotipo irrelevante G3-519, representado por círculos vacíos, no inhibe la expresión de selectina E. Los triángulos vacíos representan la expresión de selectina E en células incubadas con suero inactivado con calor (HIS). Los cuadrados vacíos representan la expresión de selectina E en células incubadas en ausencia de suero humano (IMC). El eje Y representa el nivel de expresión de la selectina E en relaciones OD normalizadas para la cantidad de células endoteliales en cada pocillo.

Datos del depósito biológico

Fecha del depósito: 11 de octubre del 2000

Vigencia del depósito: 30 años

Colección de Cultivos Tipo Americana

10801 University Blvd.

Manassas, Virginia 20110-2209

Estados Unidos

Tlfno.: 703-365-2700

Fax: 703-365-2745

Número de Entrada de Depósito: PTA-2581

Descripción del Depósito: Hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal denominado 137-76.

Número de Entrada de Depósito: PTA-2582

Descripción del Depósito: Hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal denominado 137-30.

Descripción detallada

El sistema del complemento desempeña un papel central en la aclaración de complejos inmunes y en respuestas inmunes. La excesiva activación del sistema del complemento por un xenoinjerto puede conducir a consecuencias dañinas, y que hasta potencialmente ponen en juego la vida, debido a la inflamación severa y a la destrucción del tejido resultante.

La activación de la ruta del complemento genera fragmentos biológicamente activos de proteínas del complemento, por ejemplo las anafilatoxinas C3a, C4a y C5a y complejos de ataque de la membrana C5b-9 (MAC), que median respuestas inflamatorias por la implicación de la quimiotaxis de los leucocitos, la activación de macrófagos, neutrófilos, plaquetas, mastocitos y células endoteliales, permeabilidad vascular, citólisis y daño a tejidos. El complemento C5a es uno de los mediadores proinflamatorios más potentes del sistema del complemento. El C5a es la forma activada de C5.

La invención incluye MAbs que se unen e inhiben la activación de C5. Además de los anticuerpos monoclonales, la invención incluye homólogos, análogos y sus formas modificadas o derivadas, incluyendo fragmentos de inmunoglobulina tales como Fab, F(ab')₂, Fv y anticuerpos de cadena sencilla.

El término análogo se usa comúnmente para referirse a Fab, ScFv u otros fragmentos con las mismas regiones de unión, por lo tanto con la misma funcionalidad respecto a un antígeno definido, como el anticuerpo para el cual es un análogo. El antígeno en este caso es C5. El término homólogo se usa comúnmente para referirse a entidades con secuencias de aminoácidos similares o estructuras, por ejemplo diferentes isotipos de inmunoglobulinas IgA, IgG, IgE, etc.

Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando el método del hibridoma descrito primeramente por Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975), o por otros métodos conocidos, posteriormente desarrollados.

En el método del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado se inmuniza para que genere linfocitos que produzcan, o sean capaces de producir, anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. O bien, los linfocitos pueden ser inmunizados in vitro. Los linfocitos entonces se fusionan con células

de mieloma usando a un agente de fusión adecuado, tal como el polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o varias sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parenterales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parenterales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias previenen el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, ayudan a la producción estable a alto nivel de anticuerpos por las células que producen anticuerpos seleccionados, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre estas líneas de células de mieloma están las líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE.UU., y células SP2/0 o X63-Ag8-653 disponibles de la Colección de Cultivos Tipo Americana, Rockville, Md. EE.UU. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol. 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pps. 51-63 (Marcel Dekker, Inc, Nueva York, 1987)). También puede usarse la línea celular de mieloma de ratón NSO (Colección Europea de Cultivos Celulares, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido).

El medio de cultivo en el cual las células de hibridoma son cultivadas se analiza para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma puede ser determinada por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión in vitro, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA).

Después de que sean identificadas las células del hibridoma que producen los anticuerpos de especificidad deseada, afinidad y/o actividad, pueden ser subclonados los clones por procedimientos de dilución limitantes y pueden ser cultivados por métodos estándares (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células del hibridoma pueden ser cultivadas in vivo como tumores de ascitos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones son separados apropiadamente del medio de cultivo, líquido ascético o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía de proteína A-Sepharose, hidroxilapatito, electroforesis de gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencía por procedimientos convencionales (Innis M. et al. En "PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications", Academic, San Diego, CA (1990), Sanger, F. S. et al. Proc. Nat. Acad. Sci. 74: 5463-5467 (1977)). Las células del hibridoma sirven como una fuente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede ser colocado en vectores de expresión, que son entonces transfectados en células huésped tales como células de E. coli, células COS simicas, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen, por otra parte, la proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. La producción recombinante de anticuerpos será descrita más detalladamente más abajo.

Pueden aislarse anticuerpos o fragmentos de anticuerpos a partir de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty, et al., Nature 348: 552-554 (1990). Clackson, et al., Nature 352: 624-628 (1991) y Marks, et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Las siguientes publicaciones describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (rango nM) por intercambio de cadenas (Marks, et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación in vivo como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse, et al., Nuc. Acids. Res. 21: 2265-2266 (1993)). Así, estas técnicas son alternativas viables respecto a técnicas tradicionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también puede ser modificado, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de codificación por dominios constantes humanos de cadena ligera y pesada en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de EE.UU. Nº. 4.816.567; Morrison, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81: 6851 (1984)).

Otra alternativa es usar la fusión eléctrica en vez de la fusión química para formar hibridomas. Esta técnica está bien establecida. En vez de la fusión, también se puede transformar una célula B para hacerla inmortal usando, por ejemplo, un Virus de Epstein Barr, o un gen transformante. (Véase, por ejemplo, "Continuously Proliferating Human Cell Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity", Zurawaki, V. R. et al., en Monoclonal Antibodies, ed. por Kennett R. H. et al., Plenum Press, N. Y. 1980, pps. 19-33.) Los MAbs anti-C5 pueden generarse inmunizando a roedores (por ejemplo ratones, ratas, hámsteres y conejillos de indias) con C5 natural purificado de plasma humano o suero, C5 recombinante o sus fragmentos expresados por sistemas eucarióticos o procarióticos. Pueden usarse

otros animales para la inmunización, por ej. primates no humanos, ratones transgénicos que expresan inmunoglobulinas humanas y ratones inmunodeficientes (SCID), por sus siglas en inglés ratones que sufren una mutación severa combinada, trasplantados con linfocitos B humanos. Los hibridomas pueden ser generados por procedimientos convencionales fusionando linfocitos B de los animales inmunizados con células de mieloma (por ejemplo Sp2/0 y NSO), como se ha descrito anteriormente (Köhler G et al., *Nature* 256: 495-7 (1975)). Además, pueden generarse anticuerpos anti-C5 examinando bibliotecas de Fv o Fab recombinantes de cadena sencilla de linfocitos B humanos en sistemas de expresión de fagos. La especificidad de MAbs frente a C5 humano puede analizarse por ensayo inmunsorbente unido a enzima (ELISA), como se muestra en la Fig. 1, inmunotransferencia Western, u otras técnicas inmunoquímicas. La actividad inhibitoria de los anticuerpos sobre la activación del complemento puede ser evaluada por ensayos hemolíticos, usando RBC de pollo sensibilizados o de oveja para la ruta del complemento clásica. Los hibridomas en los pocillos positivos se clonan por dilución limitante. Los anticuerpos se purifican para determinar la caracterización de la especificidad frente a C5 humano por los ensayos descritos anteriormente.

Anticuerpos humanizados y humanos

Se diseña un anticuerpo humanizado para que tenga mayor homología respecto a una inmunoglobulina humana que los anticuerpos monoclonales derivados del animal. Los residuos de aminoácidos no humanos de un dominio variable de "importación" (de animal) son transfectados en una "estructura" humana. La humanización puede realizarse esencialmente de acuerdo con el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332: 323-327 (1988); Verhoeven, et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo las regiones determinantes de complementariedad ("CDR") del roedor o secuencia CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, en tales anticuerpos "humanizados", las partes CDR del dominio variable humano se han sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. Así, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales algunos residuos CDR, y posiblemente algunos residuos marco, son sustituidos por residuos de sitios análogos en los anticuerpos del roedor.

La elección de dominios variables humanos, ambos ligeros y pesados, que se usan en la preparación de los anticuerpos humanizados es importante para reducir la antigenicidad. Según el llamado método "que mejor se ajusta", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se examina respecto a la biblioteca entera de secuencias del dominio variable humano conocidas. La secuencia humana que es la más cercana a la del roedor es aceptada entonces como el marco humano (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método usa un marco particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco puede ser usado para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

Es importante además que los anticuerpos humanizados retengan una afinidad alta respecto al antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parenterales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parenterales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Hay programas de ordenador disponibles que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidato seleccionadas. La inspección de estas representaciones permite el análisis del papel probable de ciertos residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidato, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidato para unirse a su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse y combinarse residuos FR del receptor y secuencias de importación de modo que la característica del anticuerpo deseada, tal como una mayor afinidad para el(los) antígeno(s) objetivo(s), sea maximizada, aunque sean los residuos CDR los que directamente y más considerablemente influyan en la unión del antígeno.

También se pueden producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, bajo la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de la producción de inmunoglobulina endógena. Tales ratones transgénicos están disponibles en Abgenix, Inc, Fremont, California, y Medarex, Inc, Annandale, Nueva Jersey. Se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada (JH) del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal causa una completa inhibición de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en tales ratones mutantes de la línea germinal causará la producción de anticuerpos humanos bajo la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol.* 7: 33 (1993); y Duchosal et al. *Nature* 355: 258 (1992). Los anticuerpos humanos también pueden ser derivados de bibliotecas de exposición a fagos (Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.* 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991); Vaughan, et al., *Nature Biotech* 14: 309 (1996)).

Los anticuerpos quiméricos son producidos por procesos recombinantes muy conocidos en la técnica, y tienen una región variable animal y una región constante humana. Los anticuerpos humanizados tienen un mayor grado de

secuencias peptídicas humanas que hacen anticuerpos quiméricos.

También se pueden crear moléculas de unión de cadena peptídica sencilla en las que están conectadas las regiones Fv de cadena pesada y ligera. Los anticuerpos de cadena sencilla ("scFv") y el método de su construcción son descritos en la patente de EE.UU. N°. 4.946.778. O bien, pueden construirse Fab y expresarse por medios similares (Evans MJ et al. "Rapid expression of an anti-human C5 chimeric Fab utilizing a vector that replicates in COS and 293 células". J. Immunol. Meth. 184: 123-38 (1995)). Todos los anticuerpos totalmente y parcialmente humanos son menos inmunogénicos que los MAbs totalmente murinos, y los fragmentos y los anticuerpos de cadena sencilla son también menos inmunogénicos.

Anticuerpos Desinmunizados™

Los anticuerpos desinmunizados™ son anticuerpos en los que han sido eliminados los potenciales epítomos de células T, como se describe en la solicitud de patente internacional PCT/GB98/01473 (documento WO 98/52976). Por lo tanto, se espera que la inmunogenicidad en seres humanos sea eliminada o reducida considerablemente cuando se aplican in vivo. Además, los anticuerpos pueden ser modificados por medios químicos mediante conjugación covalente a un polímero para aumentar su período de semivida circulante, por ejemplo. Los polímeros preferidos, y los métodos para unirlos a péptidos, se muestran en las patentes de EE.UU. Nos. 4.766.106; 4.179.337; 4.495.285; y 4.609.546. Los polímeros preferidos son polialcoholes polioxietilados y polietilenglicol (PEG). El PEG es soluble en agua a temperatura ambiente y tiene un peso molecular promedio preferido entre 1000 y 40.000, más preferentemente entre 2000 y 20.000, lo más preferentemente entre 3.000 y 12.000.

De ser usado en el tratamiento del rechazo de xenoinjertos, en particular DXR/AVR en seres humanos, los anticuerpos anti-C5 serían preferentemente usados como anticuerpos quiméricos, desinmunizados™, humanizados o humanos. Tales anticuerpos pueden reducir la inmunogenicidad y así evitar la respuesta del anticuerpo anti-ratón humano (HAMA). Es preferible que el anticuerpo sea IgG4, IgG2, u otro IgG genéticamente modificado o IgM que no aumente la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (Canfield SM et al., J. Exp. Med. 173: 1483-91 (1991)) y la citólisis mediada por complemento (Xu Y et al., J. Biol. Chem. 269: 3468-74 (1994); Pulito VL et al., J. Immunol. 156: 2840-2850 (1996)).

Según las estructuras moleculares de las regiones variables de los anticuerpos anti-C5, se podría usar el modelado molecular y un diseño molecular racional para generar y examinar pequeñas moléculas que imiten las estructuras moleculares de la región de unión de los anticuerpos e inhiban las actividades de C5. Estas pequeñas moléculas pueden ser péptidos, peptidomiméticos, oligonucleótidos o compuestos orgánicos. Las moléculas imitantes pueden usarse como inhibidores de la activación del complemento en indicaciones inflamatorias y enfermedades autoinmunes. O bien, podrían usarse procedimientos de examen a gran escala comúnmente usados en el campo para aislar pequeñas moléculas adecuadas a partir de bibliotecas de compuestos combinatorios.

Preparación de otros inhibidores de C5.

Se describen bibliotecas que contienen miméticos de la presente descripción. Una vez ensambladas, las bibliotecas de la presente descripción pueden ser examinadas para identificar miembros individuales que tienen bioactividad.

Tal examen de las bibliotecas para buscar miembros bioactivos puede implicar, por ejemplo, evaluar la actividad de unión de los miembros de la biblioteca o evaluar el efecto que los miembros de la biblioteca tienen en un ensayo funcional. El examen normalmente se lleva a cabo poniendo en contacto los miembros de la biblioteca (o un subconjunto de los miembros de la biblioteca) con una diana de interés, tal como, por ejemplo, un anticuerpo, una enzima, un receptor o una línea celular. Los miembros de la biblioteca que sean capaces de interactuar con C5 se denominan en este documento "miembros de la biblioteca bioactivos" o "miméticos bioactivos". Por ejemplo, un mimético bioactivo puede ser un miembro de la biblioteca que sea capaz de unirse e inhibir a C5 o que sea capaz de antagonizar una respuesta funcional asociada con C5. En otras palabras, el examen de las bibliotecas de la presente descripción determina qué miembros de la biblioteca son capaces de interactuar con C5.

Además, cuando ocurre realmente la interacción, el mimético (o miméticos) bioactivos puede ser identificado entonces a partir de los miembros de la biblioteca. La identificación de uno solo (o un número limitado) de mimético(s) bioactivo(s) de la biblioteca proporciona miméticos que son por sí mismos biológicamente activos, y de este modo útiles como agentes terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico y pueden usarse además para avanzar considerablemente en la identificación de compuestos ventajosos en estos campos.

La síntesis de los miméticos peptídicos de la biblioteca se puede conseguir usando conocidas técnicas de síntesis de péptidos. Los miméticos pueden ser sintetizados en un soporte sólido (tal como poliestireno utilizando 4 como enlazante) mediante técnicas conocidas (véase, por ejemplo, John M. Stewart y Janis D. Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", 1984, Pierce Chemical Comp., Rockford, Ill.; Atherton, E., Shepard, R. C. "Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach"; IRL:Oxford, 1989) o en una resina unida a sílice por unión del alcohol (véase Randolph et al., J Am. Chem. Soc. 117: 5712-14, 1995).

Además, una combinación de técnicas de síntesis tanto en disolución como en fase sólida puede ser utilizada para sintetizar los miméticos de péptido.

Por ejemplo, se puede utilizar un soporte sólido para sintetizar la secuencia del péptido lineal hasta el punto de que se añade a la secuencia la rotación inversa conformacionalmente restringida. La química combinatoria tradicional (véase, por ejemplo, "The Combinatorial Index Bunin", Academic Press, New York, 1998; Gallop et al., J. Med. Chem. 37: 1233-1251, 1994) y técnicas de síntesis en paralelo permiten que se preparen fácilmente un enorme número de compuestos por combinación secuencial de reactivos en una estructura molecular básica. Por ejemplo, la anterior síntesis descrita se puede llevar a cabo usando la técnica de clasificación dirigida de Nicolaou y colaboradores. (Nicolaou et al., Angew. Chem. Int'l. Ed. 34: 2289-2291, 1995).

Actualmente, el equipo para esta técnica está comercialmente disponible en IRORI (La Jolla, California.). O bien, la anterior síntesis descrita se puede llevar a cabo mediante síntesis en paralelo usando un formato de placa de 48 ó 98 pocillos en el que cada pocillo contiene una salida fritada para drenar los disolventes y reactivos ("A Practical Guide to Combinatorial Chemistry", Czarnik y DeWitt, Eds., American Chemical Society, Washington, D.C., 1997). Robbins (Sunnyvale, California), Charybdis (Carlsbad, California) y Bohdan (Chicago, Ill.) actualmente ofrecen el equipo adecuado para esta técnica.

Se describen métodos para examinar las bibliotecas según la bioactividad y aislar miembros de la biblioteca bioactivos. Las bibliotecas de la presente descripción se pueden examinar según la bioactividad por una variedad de técnicas y métodos. Generalmente, el ensayo de examen se puede realizar (1) poniendo en contacto una biblioteca con C5, o uno de sus fragmentos, y permitir que ocurra la unión entre los miméticos de la biblioteca y la diana, y (2) detectar el suceso de unión mediante un ensayo apropiado, tal como por el ensayo colorimétrico descrito por Lam et al. (Nature 354: 8284, 1991) o Griminski et al. (Biotechnology 12: 1008-1011, 1994). Los miembros de la biblioteca pueden estar en disolución y la diana inmovilizada sobre una fase sólida.

Alternativamente, la biblioteca se puede inmovilizar en una fase sólida y se puede sondear poniéndola en contacto con la diana en disolución.

Un sistema automatizado para generar y examinar una biblioteca de compuestos se describe en las patentes de EE.UU. Nos. 5.901.069 y 5.463.564. Los intentos más focalizados implican un examen competitivo frente a MAb 137-76, o preparar un modelo tridimensional del sitio de unión, y a continuación preparar una familia de moléculas que encajen en el modelo. Estas son examinadas entonces para ver aquellas con óptimas características de unión. Además, se pueden identificar otras moléculas por ensayo de competición, o un examen funcional para inhibidores con las mismas propiedades que MAb 137-76.

Aplicación de moléculas anti-C5

Los anticuerpos anti-C5, y fragmentos de esta invención se pueden administrar a pacientes en una formulación farmacéutica apropiada por una variedad de rutas, que incluyen, pero no están limitadas a, infusión intravenosa, inyección de bolo intravenoso y rutas intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, subcutánea, intranasal, intratraqueal, intraespinal, intracraneal y oral.

Tal administración les permite unirse al C5 endógeno y de este modo inhibir la activación de C5.

La dosis preferida estimada de tales anticuerpos y moléculas está entre 10 y 500 µg/ml de suero. La dosis real se puede determinar en ensayos clínicos siguiendo la metodología convencional para determinar dosis óptimas, es decir, administrando varias dosis y determinando cuál es la más eficaz.

Las moléculas anti-C5 pueden funcionar para inhibir la activación del complemento in vivo y manifestaciones inflamatorias que la acompañan, tales como el reclutamiento y la activación de macrófagos, neutrófilos, plaquetas, mastocitos y células endoteliales, edema y daño a tejidos. Estos inhibidores se pueden usar para la prevención del rechazo de xenoinjertos, incluyendo la respuesta de DXR/AVR a xenoinjertos.

Las moléculas de anti-C5 también se pueden usar mediante diagnóstico para averiguar, o medir, la presencia de C5 en una muestra de tejido o una muestra de fluido corporal, tal como suero, plasma, orina o fluido espinal. En esta solicitud, se pueden usar formatos de ensayo comunes, tales como inmunohistoquímica o ELISA, respectivamente.

Tales pruebas diagnósticas podrían ser útiles para determinar si ciertos individuos son deficientes en C5 o producen demasiado.

Modelos animales de la eficacia terapéutica de inhibidores de C5

La actividad terapéutica de inhibidores de C5 para el tratamiento y la prevención de DXR/AVR en xenotransplantes se puede probar en modelos animales establecidos (Davis EA et al., Transplantation 62: 1018-23 (1996); Wang H et al., Transplantation 68: 1644-51 (1999); Loss M et al., Xenotransplantation 7: 186-96 (2000)).

Ejemplo 1: Generación de MABs anti-C5

Se les inyectó a ratones macho A/J (Harlan, Houston, TX) de 8-12 semanas subcutáneamente 20 µg de C5 en adyuvante completo de Freund (Laboratorios Difco, Detroit, MI) en 200 µl de disolución salina tamponada de fosfato (PBS) pH 7,4. El C5 purificado de plasma humano se compró en Advanced Research Technologies, Inc (San Diego,

CA). En intervalos de dos semanas, a los ratones se les inyectó dos veces subcutáneamente 20 µg de C5 en adyuvante de Freund incompleto en dos ocasiones. Entonces, dos semanas más tarde y tres días antes del sacrificio, a los ratones se les inyectó otra vez intraperitonealmente 20 µg del mismo antígeno en PBS. Para cada fusión, se prepararon suspensiones de células individuales de bazo de un ratón inmunizado y se usaron para la fusión con células de mieloma Sp2/0. 5×10^8 de las Sp2/0 y 5×10^8 de células de bazo fueron fusionadas en un medio que contenía polietilenglicol al 50% (P.M. 1450) (Kodak, Rochester, NY) y dimetilsulfóxido al 5% (Sigma Chemical Co., San Louis, MO). Las células se ajustaron a continuación a una concentración de $1,5 \times 10^5$ de células de bazo por 200 µl de suspensión en medio Iscove (Gibco, Grand Island, NY), se complementaron con suero bovino fetal del 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, hipoxantina 0,1 mM, aminopterina 0,4 µM y timidina 16 µM. Doscientos microlitros de la suspensión celular se añadieron a cada pocillo de aproximadamente cincuenta placas de microcultivo de 96 pocillos. Después de aproximadamente diez días, los sobrenadantes del cultivo fueron retirados para examinar la reactividad con C5 purificado en ELISA.

Se revistieron los pocillos de placas de microensayo de Immulon 2 (Laboratorios Dynatech, Chantilly, VA) añadiendo 50 µl de C5 humano purificado en 0,1 µg/ml durante la noche a temperatura ambiente. Después de retirar la disolución de revestimiento sacudiendo la placa, se añadieron 200 µl de BLOTTO (leche seca sin grasa) en disolución salina tamponada de fosfato (PBS) a cada pocillo durante una hora para bloquear los sitios no específicos. Una hora más tarde, los pocillos se lavaron entonces con tampón PBST (PBS que contiene Tween 20 al 0,05%). Se recuperaron cincuenta microlitros de sobrenadantes del cultivo de cada pocillo de fusión, se mezclaron con 50 µl de BLOTTO y luego se añadieron a los pocillos individuales de las placas de microensayo. Después de una hora de incubación, los pocillos se lavaron con PBST. Los anticuerpos murinos ligados fueron detectados entonces por reacción con IgG antiratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Fc específico) (Laboratorios Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) y se diluyeron a 1:2.000 en BLOTTO. La disolución de sustrato de peroxidasa que contiene 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina al 0,1% (Sigma) y agua oxigenada al 0,0003% (Sigma) fue añadida a los pocillos para el desarrollo del color durante 30 minutos. La reacción fue terminada por la adición de 50 µl de H₂SO₄ 2M por pocillo. La OD a 450 nm de la mezcla de reacción fue leída con un Lector ELISA de BioTek (Instrumentos BioTek, Winooski, VT).

Los sobrenadantes del cultivo de los pocillos positivos fueron probados entonces para detectar la inhibición de la hemólisis por la ruta clásica de RBC sensibilizados de pollo mediante suero humano pretitulado (2%) por el método descrito a continuación. Las células en los pocillos positivos fueron clonadas por dilución limitante. Se analizaron los MABs otra vez para detectar la reactividad con C5 en el ELISA. Los hibridomas seleccionados fueron cultivados en matraces de agitación y el sobrenadante del cultivo gastado se recuperó para la purificación del anticuerpo por cromatografía de afinidad de proteína A. Se probó que cinco MABs eran reactivos con C5 humano en ELISA. Estos MABs se denominan 137-10, 137-21, 137-30, 137-50, 137-76 (Fig. 1). Entre ellos, el MAb 137-76 es el más reactivo con el C5 humano en fase sólida, mientras que el 137-30 es el menos reactivo con el C5 humano en fase sólida. Se probó que estos MAB anti-C5 no eran reactivos con el C5a humano en ELISA. El MAB 137-76 no compite con la unión de MAB 137-30 a C5 humano en ELISA, indicando que estos dos anticuerpos se unen a epítomos distintos en el C5 humano.

Ejemplo 2: Inhibición de hemólisis activada por el complemento por MABs anti-C5

Los MABs anti-C5 fueron probados según la inhibición del complemento clásico en ensayos hemolíticos. En los ensayos, fueron sensibilizados glóbulos rojos de pollo (RBC) (5×10^7 células/ml) en gelatina/disolución salina tamponada con veronal (GVB++) que contenía MgCl₂ 0,5 mM y CaCl₂ 0,15 mM con inmunoglobulinas de RBC antipollo de conejo purificado a 8 µg/ml (Inter-Cell Technologies, Hopewell, NJ) durante 15 minutos a 4°C. Las células fueron lavadas entonces con GVB++. Las células lavadas fueron suspendidas de nuevo en el mismo tampón a $1,7 \times 10^8$ células/ml. En cada pocillo de una placa de microensayo de 96 pocillos de fondo redondo, se mezclaron 50 µl de suero humano normal (2%) con 50 µl de GVB++ o se diluyó en serie el MAB de ensayo, después se añadieron 30 µl de suspensión de RBC de pollo sensibilizado lavado a los pocillos que contenían las mezclas. Fueron mezclados cincuenta microlitros de suero humano normal (2%) con 80 µl de GVB++ para dar el fondo de color del suero. La mezcla final fue incubada a 37°C durante 30 minutos. La placa fue sacudida entonces en un agitador de placas de microensayo durante 15 segundos. La placa fue centrifugada entonces a 300 x g durante 3 minutos. Los sobrenadantes (80 µl) fueron recuperados y se trasladaron a pocillos en placas de microensayo de fondo plano de 96 pocillos para la medida de OD a 405 nm. La inhibición en tanto por ciento de la hemólisis se define como $100 \times [(OD_{\text{sin MAB}} - OD_{\text{fondo de color del suero}}) / (OD_{\text{con MAB}} - OD_{\text{fondo de color del suero}})] / (OD_{\text{sin MAB}} - OD_{\text{fondo de color del suero}})$.

La figura 2 muestra los datos que los MABs anti-C5 137-10, 137-21, 137-30, 137-50, 137-76 inhiben fuertemente la hemólisis por la ruta clásica. El MAB antifactor D 166-32 que es específico para la inhibición de la ruta del complemento alternativa, no inhibe la hemólisis de la ruta clásica, como se esperaba.

Ejemplo 3: Inhibición de la activación de C5 por MABs anti-C5 en suero humano activado con zimosan

Para estudiar los efectos de MAB anti-C5 137-76 en la activación de C5, se mide la inhibición de la formación de C5a y TCC (complejo del complemento terminal de C5b-9) en suero humano activado con zimosan (partícula de levadura) vía la ruta del complemento alternativa. Se añadieron concentraciones diferentes de MAB anti-C5 137-76 a suero humano (10%) activado con zimosan (1 mg/ml). Se usó un MAB G3-519 control coincidente con isotipo como

control negativo. MAb G3-519 es específico respecto a la glicoproteína gp120 de cubierta externa del VIH-1 y no tiene ningún efecto en la actividad del complemento. Los productos de activación C5a, TCC y C3bBbP fueron medidos por ELISA cuantitativo. El C5a y TCC son los marcadores específicos para la activación de C5, mientras que C3bBbP, la convertasa C3/C5 alternativa, para la activación de la ruta del complemento alternativa. Los ELISA para la determinación de C5a y TCC han sido descritos detalladamente anteriormente (Bergh K et al., J. Immunol. Meth. 152: 79-97 (1992); Mollnes TE et al., Scand. J. Immunol. 22: 197-202 (1985)). El ELISA para la convertasa C3bBbP alternativa fue realizado como sigue: Mab de captura inmovilizado en placas de plástico de microensayo de 96 pocillos era anticuerpo properdina antihumano monoclonal de ratón (clon N° 2) diluido 1:1000 (Quidel, San Diego, CA). Las muestras de ensayo fueron diluidas 1:25. La detección se hizo usando C3c antihumano de conejo policlonal diluido 1:1000 (Behringwerke A/G, Marburg, Alemania), y luego Ig anticonejo conjugado con peroxidasa de rábano picante diluido 1:1000 (Amersham Internacional, Little Chalfont, Reino Unido).

Los resultados muestran que el MAb 137-76 inhibe completamente la activación de C5, como se prueba por la inhibición de la producción de los productos de activación de C5, C5a y TCC (Fig. 3). Por el contrario, el anticuerpo no tiene ningún efecto en la formación de la convertasa C3/C5 alternativa C3bBbP, que está corriente arriba de la etapa de C5 en la cascada del complemento.

Ejemplo 4: Inhibición de la sobre-regulación inducida por suero humano de selectina E en células endoteliales aórticas porcinas

La activación de células endoteliales del tipo II es una característica de DXR/AVR.

La sobre-regulación de la selectina E en células endoteliales es una de las características de la activación de células endoteliales del tipo II. Los inventores examinaron los efectos del MAb anti-C5 137-76 en la sobre-regulación humana inducida por suero de la selectina E en células endoteliales aórticas porcinas aisladas (PAEC).

a. Preparación del cultivo PAEC

Fueron obtenidas aortas porcinas de un matadero local (Felleslakteriet, Økern, Oslo, Noruega). El vaso fue cortado distal respecto al arco aórtico con unas tijeras quirúrgicas estériles e inmediatamente fue colocado en un matraz estéril que contenía tampón de células endoteliales, 2,5 µg/ml de anfotericina β y 50 µg/ml de gentamicina. Las aortas fueron transportadas al laboratorio a los 30 minutos, y se transfirieron a un segundo matraz que contenía tampón de célula endotelial recién preparado con antibióticos a 4°C. Los vasos intercostales fueron sujetados con pinzas con LigaClip (Compañía Johnson and Johnson, Ethicon, Cincinnati, OH) antes de que PAEC fueran aisladas por tratamiento con collagenasa (collagenasa A al 0,1% (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania), a 37°C, durante 4-8 minutos). Se suspendieron PAEC aislados en medio endotelial-SFM (Life Technologies, Paisley, Escocia), que contienen suero de ternero fetal al 5% y antibióticos, y se pusieron en placas en matraces de cultivo (1 %) revestidos de gelatina (25 cm²). El contenido de suero y anfotericina β fue reducido al 1% y 0,5 µg/ml después de uno y siete días en cultivo, respectivamente. Los cultivos primarios subconfluentes se tripsinizaron y se cultivaron hasta la confluencia en la primera etapa antes de ser congelados para el almacenaje en alícuotas.

b. Modelo de xenotransplante de porcino a humano in vitro.

Las PAEC se depositaron en placas de plástico de microcultivo de 96 pocillos y se cultivaron hasta la confluencia en Endotelial-SFM que contiene 1% de suero de ternera fetal al, 0,5 µg/ml de anfotericina β y 50 µg/ml de gentamicina. Las células se expusieron a 100 µl/pocillo de suero AB humano combinado al 25-50% (como una fuente de anticuerpos xeno-reactivos y complemento) y concentraciones diferentes de MAb anti-C5 137-76 durante 4 horas a 37°C. Las células se lavaron con PBS y se fijaron en tampón de peryodato-lisina-paraformaldehído al 0,5% durante 10 minutos a 20°C. Se analizaron diferentes marcadores de activación por medio de un ELISA basado en células (CELISA). Para medir la expresión de selectina E, se usó un MAb frente a selectina E humana (clon 1.2B6, Endogen, Woburn, MA). El anticuerpo reaccionó específicamente con la selectina E porcina (Tsang YT et al. "Porcine E-selectin: cloning and functional characterization". Immunology 85: 140-5 (1995)). Las células fueron incubadas con 50 µl del MAb anti-selectina E durante 45 minutos con agitación constante a 20°C, seguido de tres lavados con PBS. La Ig antiraton de conejo secundaria (Dako, Glostrup, Dinamarca) y la Ig anticonejo de cerdo conjugada con HRP final (Dako) fueron aplicadas secuencialmente después de lavar de la misma manera. La disolución de sustrato de peroxidasa (1 µg/ml o-fenilendamina en tampón de citrato, pH 5,0, que contiene H₂O₂ del 0,015%) fue añadida (100 µl/pocillo) y se desarrolló en la oscuridad a 37°C durante 10-30 minutos. La reacción del color de detuvo con 100 µl de HCl 1 M, y la OD se leyó con un Contador Multiabel 1420 (Victor, Wallac, Turku, Finlandia) a 490 nm. Las placas de microtítulo se lavaron posteriormente en agua del grifo, y se incubaron con violeta cristalino del 0,1% en PBS durante 5 minutos. Después de un lavado final cuidadoso en agua del grifo, se usaron 100 µl de ácido acético del 33% para solubilizar la tinción nuclear y el OD se determinó a 550 nm, representando el recuento de células real por pocillo. Los datos se representaron como relaciones de OD a fin de normalizar el número de células presentes en cada pocillo. Los siguientes controles negativos se incluyeron en los ensayos: (i) células incubadas con medio solo y teñidas con antiselectina E y (ii) células incubadas con suero humano y teñidas con un isotipo y la concentración coincidente con el MAb control. Las células estimuladas con TNFα fueron usadas como control positivo.

Los resultados muestran que el MAb anti-C5 137-76 es muy eficaz en la inhibición de la activación de células endoteliales de tipo II como se manifiesta por la supresión de la expresión de selectina E en células endoteliales aórticas porcinas expuestas a suero humano (Fig. 4).

5 Realizaciones preferidas de la presente descripción se describen a continuación y se designan como realización E1 a realización E17.

E1] Un inhibidor de activación del complemento, que se une a C5 e inhibe la activación celular endotelial de tipo II.

E2] El inhibidor de E1, en el que la inhibición de la activación celular endotelial de tipo II se manifiesta por la supresión de la expresión de selectina E.

E3] El inhibidor de E1, en el que la inhibición de la activación del complemento se determina in vitro.

10 E4] El inhibidor de E1, que bloquea la lisis celular mediada por el complemento.

E5] El inhibidor de E1, que inhibe la formación de C5a.

E6] Un inhibidor de E1, que inhibe la formación del complejo del complemento terminal ("TCC").

E7] El inhibidor de cualquiera de E1 a E6 que es un anticuerpo o un homólogo, análogo o uno de sus fragmentos, un péptido, un oligonucleótido, un peptidomimético o un compuesto orgánico.

15 E8] El inhibidor de E7, en el que los fragmentos de anticuerpo son Fab, F(ab')₂, Fv o Fv de una sola cadena.

E9] El inhibidor de E7, en el que el anticuerpo es monoclonal y es anticuerpo quimérico, desimmunizadoTM, humanizado o humano.

E10] Un anticuerpo monoclonal 137-76 o MAb 137-30.

E11] Un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de E10.

20 E12] Un anticuerpo monoclonal o un fragmento, análogo o uno de sus homólogos, o un péptido, oligonucleótido, peptidomimético o un compuesto orgánico que se une al mismo epítipo que MAb 137-76 o MAb 137-30.

E13] El fragmento de E12 que es un Fab, F(ab')₂, Fv o Fv de una sola cadena.

E14] El fragmento de E13, en el que el fragmento es quimérico, DesimmunizadoTM, humanizado, o humano.

25 E15] Una línea celular que produce el anticuerpo monoclonal o uno de sus fragmentos de E12, que se une al mismo epítipo que MAb 137-76 o 137-30.

E16] Un método para tratar el rechazo xenográfico retrasado o el rechazo vascular agudo que comprende administrar, in vivo o ex vivo, un inhibidor de activación del complemento que se une a C5 e inhibe la activación celular endotelial de tipo II.

30 E17] El método de E16, en el que la inhibición de la activación celular endotelial de tipo II se manifiesta por la supresión de la expresión de selectina E.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal o uno de sus fragmentos, que inhibe la expresión de selectina E y se une al mismo epítipo en C5 que el anticuerpo monoclonal 136-76, obtenible del hibridoma que tiene el número de acceso al depósito ATCC PTA-2581.
2. El anticuerpo monoclonal 137-76, obtenible del hibridoma que tiene el número de acceso del depósito de ATCC PTA-2581, o uno de sus fragmentos.
3. El anticuerpo monoclonal o fragmento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
4. El anticuerpo monoclonal o fragmento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo desinmunizado.
5. El anticuerpo monoclonal o fragmento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
6. El anticuerpo monoclonal o fragmento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano.
7. El fragmento de la reivindicación 1 o reivindicación o la reivindicación 2, en el que el fragmento es Fab, F(ab')₂, Fv, o un anticuerpo de una sola cadena.
8. El fragmento de la reivindicación 7, que es un Fv de una sola cadena.
9. El anticuerpo monoclonal o fragmento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que está conjugado con un polialcohol polioxietilado o un polietilenglicol.
10. Una línea celular que produce el anticuerpo monoclonal o fragmento de la reivindicación 1.
11. Un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 2.
12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para uso en el método de diagnóstico de la presencia de C5 en una muestra de tejido o una muestra de fluido corporal.
13. El anticuerpo para uso como se define en la reivindicación 12, en el que dicha muestra de fluido corporal es suero, plasma, orina o fluido espinal.
14. El anticuerpo para uso como se define en la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en el que dicha presencia de C5 está por debajo del nivel normal.
15. El anticuerpo para uso como se define en la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en el que dicha presencia de C5 está por encima del nivel normal.

Fig. 1 Reactividad de MAb anti-C5 humano en ELISA

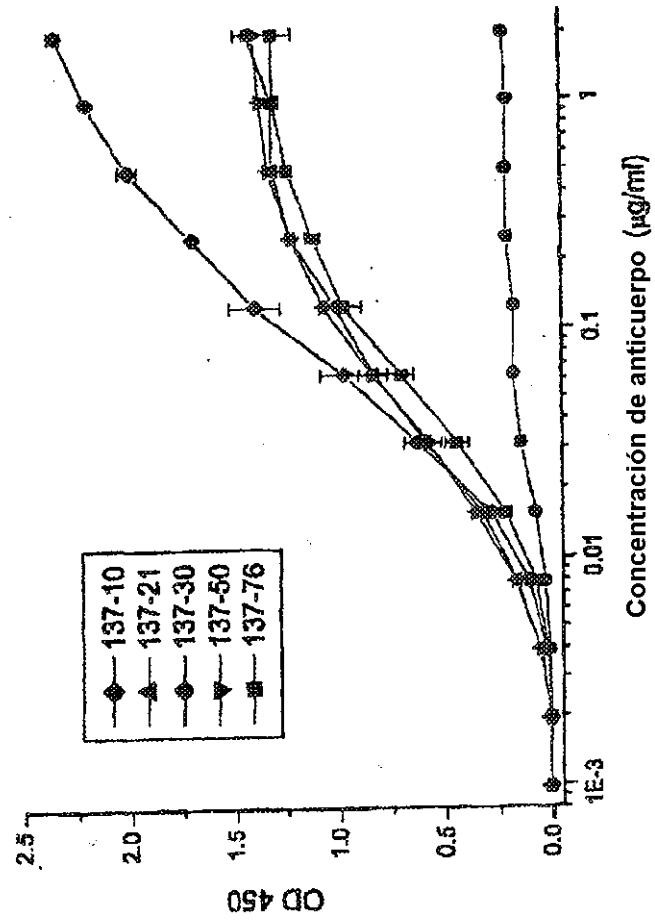


Fig. 2 Inhibición de la hemólisis por la ruta clásica por MAb anti-C5

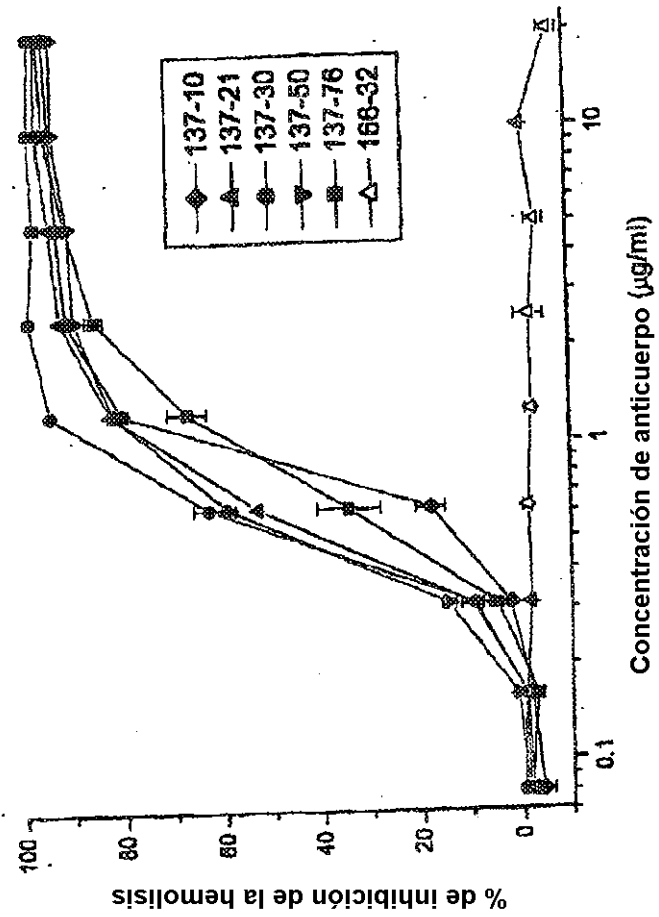


Fig. 3 El MAb anti-C5 137-76 inhibe la producción de C5a y TCC de suero humano activado con zimosan

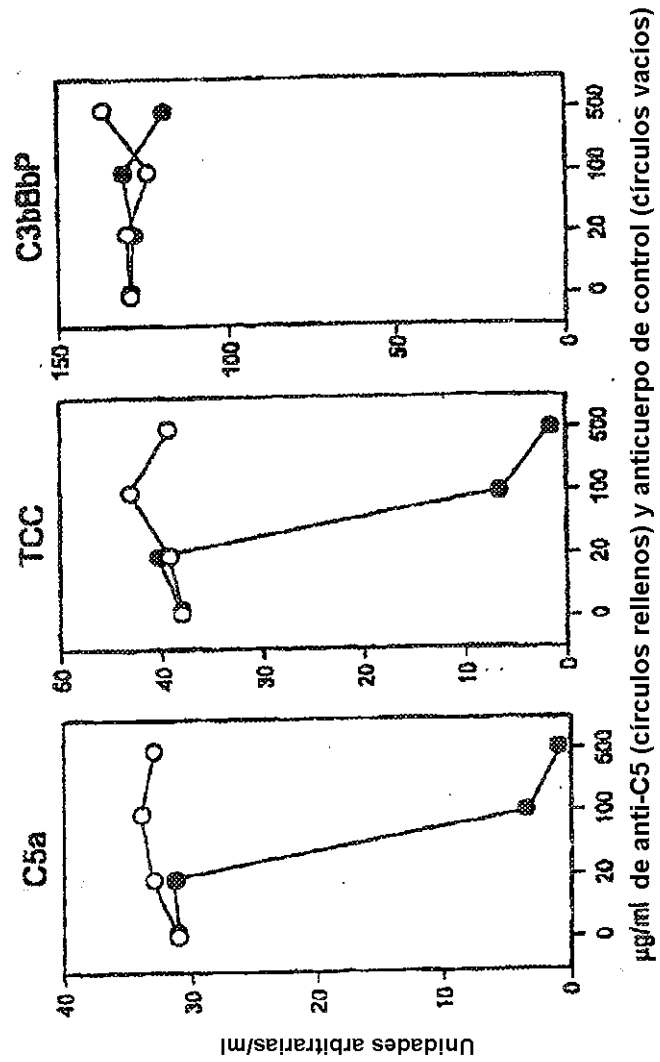


Fig. 4 El MAb 137-76 inhibe la expresión de selectina E en células endoteliales aórticas porcinas expuestas a suero humano

