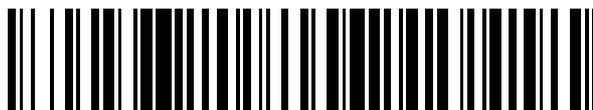


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 493**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/24** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2009 E 09782017 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 2328930**

54 Título: **Anticuerpos dirigidos contra la proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1 N1pE) de piroglutamato**

30 Prioridad:

**20.08.2008 US 90264 P**

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

**10.04.2015**

73 Titular/es:

**PROBIODRUG AG (100.0%)  
Weinbergweg 22  
06120 Halle/Saale, DE**

72 Inventor/es:

**CYNIS, HOLGER;  
DEMUTH, HANS-ULRICH;  
GANS, KATHRIN;  
KAMPFER, SONJA;  
RAHFELD, JENS-ULRICH y  
SCHILLING, STEPHAN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 533 493 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 dirigidos contra la proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1 N1pE) de piroglutamato

**Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a la citocina proinflamatoria piroglutamato MCP-1 (MCP-1 N1pE).

**Estado de la técnica relacionado**

- 10 Las citocinas quimiotácticas (quimiocinas) son proteínas que atraen y activan leucocitos y se cree que desempeñan una función fundamental en la inflamación. Las quimiocinas se dividen en cuatro grupos clasificados por la aparición de residuos de cisteína del extremo N ("C"-; "CC"-; "CXC"- y "CX3C"-quimiocinas). Las "CXC"-quimiocinas actúan preferencialmente sobre neutrófilos. A diferencia, las "CC"-quimiocinas atraen preferencialmente monocitos a sitios de inflamación. La infiltración de monocitos se considera que es un acontecimiento clave en varias condiciones de enfermedad (Gerard, C. y Rollins, B. J. (2001) *Nat. Immunol* 2, 108-115; Bhatia, M. y col., (2005) *Pancreatol.* 5, 132-144; Kitamoto, S., Egashira, K., y Takeshita, A. (2003) *J Pharmacol Sci.* 91, 192-196).

- 15 La familia de MCP, como una familia de las quimiocinas, consiste en cuatro miembros (MCP-1 a 4), que muestran preferencia por atraer monocitos, pero que muestran diferencias en su potencial (Luini, W. y col., (1994) *Cytokine* 6, 28-31; Ugucioni, M. y col., (1995) *Eur J Immunol* 25, 64-68).

- 20 MCP-1 es un miembro de la subfamilia  $\beta$  (C-C) de quimiocinas. En esta familia, las 2 cisteínas más próximas al extremo amino están adyacentes entre sí (así las proteínas C-C). Como con muchas otras C-C-quimiocinas, el gen MCP-1 está localizado sobre el cromosoma 17 en seres humanos. Los receptores de la superficie celular que se unen a MCP-1 son CCR2 y CCR5.

A continuación se indican ambos ADNc, además de secuencias de aminoácidos de MCP-1:

**MCP-1 humana (CCL2) (Acceso de GeneBank: M24545)**

ADNc (300 pb) SEQ ID NO: 2

- 1 atgaaagtct ctgccgcctct tetgtgctg ctgctcatag cagccacctt cattccccaa  
 61 gggctcgctc agccagatgc aatcaatgcc ccagtcacct gctgttataa cttcaccaat  
 121 aggaagatct cagtgcagag gctcgcgagc tatagaagaa tcaccagcag caagtgtccc  
 181 aaagaagctg tgatcttcaa gaccattgtg gccaaaggaga tctgtgctga cccaagcag  
 25 241 aagtgggttc aggattccat ggaccacctg gacaagcaaa cccaaactcc gaagacttga

Proteína (Secuencia señal en negrita: 23 aa; MCP-1 madura: 76 aa) SEQ ID NO: 1

**KVSAALLCLLLIAATFIPOGLA**QPDAINAPVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCP  
 KEAVIFKTIVAKEICADPKQKWWQDSMDHLDKQTQTPKT

- 30 De acuerdo con que es un miembro de la familia de las quimiocinas  $\beta$ , se ha mostrado que MCP-1 quimioatrae y activa monocitos *in vitro* a concentraciones subnanomolares. Se ha detectado elevada expresión de MCP-1 en una variedad de afecciones patológicas que implican la acumulación y activación de monocitos, que incluyen varios estados de enfermedad inflamatoria y no inflamatoria, como artritis reumatoide, aterosclerosis, asma y reacciones de hipersensibilidad retardada.

- 35 Varios estudios han enfatizado en particular la función crucial de MCP-1 para el desarrollo de aterosclerosis (Gu, L. y col., (1998) *Mol. Cell* 2, 275-281; Gosling, J. y col., (1999) *J Clin. Invest* 103, 773-778); artritis reumatoide (Gong, J. H. y col., (1997) *J Exp. Med* 186, 131-137; Ogata, H. y col., (1997) *J Pathol.* 182, 106-114); pancreatitis (Bhatia, M. y col., (2005) *Am. J Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 288, G1259-G1265); enfermedad de Alzheimer (Yamamoto, M. y col., (2005) *Am. J Pathol.* 166, 1475-1485); fibrosis pulmonar (Inoshima, I. y col., (2004) *Am. J Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 286, L1038-L1044); fibrosis renal (Wada, T. y col., (2004) *J Am. Soc. Nephrol.* 15, 940-948) y rechazo del injerto (Saiura, A. y col., (2004) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1886-1890). Además, MCP-1 también podría desempeñar una función

en la gestosis (Katabuchi, H. y col., (2003) *Med Electron Microsc.* 36, 253-262), como factor paracrino en el desarrollo de tumores (Ohta, M. y col., (2003) *Int. J Oncol.* 22, 773-778; Li, S. y col., (2005) *J Exp. Med* 202, 617-624), dolor neuropático (White, F. A. y col., (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*) y SIDA (Park, I. W., Wang, J. F. y Groopman, J. E. (2001) *Blood* 97, 352-358; Coll, B. y col., (2006) *Cytokine* 34, 51-55).

- 5 La forma madura de MCP-1 humana y de roedor se modifica postraduccionalmente por glutaminil ciclasa (QC) para poseer un residuo piroglutamilo (pGlu) del extremo N.

La glutaminil ciclasa (QC, EC 2.3.2.5) cataliza la ciclación intramolecular de residuos glutaminilo del extremo N en ácido piroglutámico (5-oxo-prolina, pGlu\*) bajo liberación de amoníaco y la ciclación intramolecular de residuos glutaminilo del extremo N en ácido piroglutámico bajo liberación de agua.

- 10 La modificación de pGlu del extremo N hace la proteína resistente contra la degradación del extremo N por aminopeptidasas, que es de importancia, ya que la potencia quimiotáctica de MCP-1 está mediada por su extremo N (Van Damme, J. y col., (1999) *Chem Immunol* 72, 42-56). El alargamiento o degradación artificial conduce a una pérdida de función aunque MCP-1 todavía se une a su receptor (CCR2) (Proost, P. y col., (1998), *J Immunol* 160, 4034-4041; Zhang, Y. J. y col., 1994, *J Biol. Chem* 269, 15918-15924; Masure, S. y col., 1995, *J Interferon Cytokine Res.* 15, 955-963; Hemmerich, S. y col., (1999) *Biochemistry* 38, 13013-13025).

Debido a la función importante de MCP-1 en varias condiciones de enfermedad, se requiere una potente herramienta de diagnóstico y una estrategia anti-MCP-1.

- 20 Como se ha mencionado anteriormente, pruebas convincentes señalan a una función de MCP-1 en enfermedad de Alzheimer (EA) (Xia, M.Q. y Hyman, B.T. (1999) *J Neurovirol.* 5, 32-41). Se ha observado la presencia de MCP-1 en placas seniles y en microglía reactiva, los macrófagos residenciales del SNC, en cerebros de pacientes que padecen EA (Ishizuka, K. y col., (1997) *Psychiatry Clin. Neurosci.* 51, 135-138). La estimulación de monocitos y microglía con proteína amiloide- $\beta$  ( $A\beta$ ) induce la secreción de quimiocinas *in vitro* (Meda, L. y col., (1996) *J Immunol* 157, 1213-1218; Szczepanik, A. M. y col., (2001) *J Neuroimmunol.* 113, 49-62) y la infusión intracerebroventricular de  $A\beta$  (1-42) en hipocampo murino aumenta significativamente MCP-1 *in vivo*. Además, los depósitos de  $A\beta$  atraen y activan células de la microglía y las obligan a producir mediadores inflamatorios tales como MCP-1, que a su vez conducen a una retroalimentación para inducir adicionalmente quimiotaxis, activación y daño del tejido. En el sitio de depósito de  $A\beta$ , la microglía activada también fagocita péptidos  $A\beta$ , conduciendo a una amplificación de la activación (Rogers, J. y Lue, L.F. (2001) *Neurochem. Int.* 39, 333-340).

- 30 El examen de la expresión de quimiocinas en el modelo de ratón 3xTg para EA reveló que la inflamación neuronal precede a la formación de placas y la MCP-1 está regulada por incremento por un factor de 11. Además, la regulación por incremento de MCP-1 parece correlacionarse con la aparición de los primeros depósitos de  $A\beta$  intracelulares (Janelsins, M.C. y col., (2005) *J Neuroinflammation.* 2, 23). El cruce del modelo de ratón Tg2575 para EA con un modelo de ratón que expresa en exceso MCP-1 ha mostrado una elevada acumulación de microglía alrededor de los depósitos de  $A\beta$  y que esta acumulación iba acompañada de elevada cantidad de placas difusas en comparación con compañeros de camada Tg2576 transgénicos simples (Yamamoto, M. y col. (2005) *Am. J Pathol.* 166, 1475-1485).

Los niveles de MCP-1 son elevados en CSF de pacientes con EA y pacientes que muestran deterioro cognitivo leve (DCL) (Galimberti, D. y col., (2006) *Arch. Neurol.* 63, 538-543). Además, MCP-1 muestra un elevado nivel en suero de pacientes con DCL y EA temprana (Clerici, F. y col., (2006) *Neurobiol. Aging* 27, 1763-1768).

- 40 Las lesiones ateroscleróticas, que limitan u obstruyen la circulación sanguínea coronaria, son una causa importante de mortalidad relacionada con la enfermedad cardíaca isquémica, produciendo 500.000-600.000 muertes anualmente. La angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA) para abrir la arteria obstruida se realizó en más de 550.000 pacientes en los EE.UU. y más de 945.000 pacientes en el mundo en 1996 (Lemaitre y col., 1996). Una limitación importante de esta técnica es el problema del cierre posterior a la PTCA del vaso, tanto inmediatamente después de la PTCA (oclusión aguda) como a largo plazo (reestenosis): el 30 % de los pacientes con lesiones subtotales y el 50 % de los pacientes con lesiones totales crónicas continuarán con la reestenosis después de la angioplastia. Adicionalmente, la reestenosis es un problema significativo en pacientes que reciben injerto para la derivación de la vena safena. El mecanismo de oclusión aguda parece implicar varios factores y puede resultar de la retracción vascular con cierre resultante de la arteria y/o depósito de plaquetas de sangre a lo largo de la longitud dañada del vaso sanguíneo recientemente abierto, seguido de la formación de un trombo de fibrina/glóbulos rojos.

- 50 La reestenosis después de angioplastia es un proceso más gradual e implica formación inicial de una trombosis subcrítica con liberación de plaquetas adherentes de factores de crecimiento derivados de células con proliferación posterior de células de músculo liso de la íntima e infiltración local de células inflamatorias, contribuyendo a hiperplasia vascular. Es importante observar que múltiples procesos, entre ellos la trombosis, proliferación celular, migración celular e inflamación, parecen cada uno contribuir al proceso reestenótico.

En los EE.UU., una tasa de reestenosis del 30-50 % se traduce en 120.000-200.000 estadounidenses en riesgo de reestenosis. Si solo el 80 % de tales pacientes eligen angioplastia repetida (eligiendo el 20 % restante el injerto para derivación de las arterias coronarias) y esto se añade al coste del injerto para la derivación de las arterias coronarias para el 20 % restante, el coste total para la reestenosis alcanza fácilmente billones de dólares. Así, la prevención satisfactoria de la reestenosis podría producir no solo un beneficio terapéutico significativo, sino también ahorros significativos en la asistencia sanitaria.

Aunque no está claro si la elevada expresión de MCP-1 es la causa o consecuencia de las enfermedades anteriores, el beneficio terapéutico resultó de la aplicación de anticuerpos neutralizantes en varios modelos animales.

El documento WO 2004/016769 describe anticuerpos dirigidos a MCP-1 y usos de los mismos. Gong Jiang-Hong y col. (1995) *Journal of Experimental Medicine* 181 (2), 631-640 describen antagonistas de MCP-1 identificados por la modificación de residuos del extremo NH<sub>2</sub> funcionalmente críticos. El documento WO 2006/125201 describe anticuerpos anti-biotina-muteína MCP-1 PEGilada y composiciones, métodos y usos de los mismos. Yoshimura y col. (1991) *Journal of Immunology* 147(7), 2229-2233, describen la producción y caracterización de anticuerpos monoclonales de ratón contra MCP-1 humana. Kesavan Prabakaran y col. (2004) *Journal of Immunotherapy* 27(6), S11-S12, describen actividad antiangiogénica y antineoplásica de anticuerpos monoclonales para CCL-2/MCP-1. Jamagin Kurt y col. (1999) *Biochemistry* 38(49), 16167-16177, describen la identificación de residuos de superficie de MCP-1 que afectan la señalización mediante el receptor CCR2. Zhou Yan y col. (2007) *Journal of Neurochemistry* 102(3), 667-678, describen que la dexametasona suprime la producción de MCP-1 mediante la proteína cinasa fosfatasa-1 activada con mitógeno dependiente de la inhibición de cinasa del extremo N Jun y proteína cinasa activada por mitógeno p38 en microglía de rata activada.

Hasta la fecha, se cribaron anticuerpos monoclonales del estado de la técnica para su capacidad para actuar de antagonistas de receptores. Ninguno de aquellos elige como diana el extremo amino inmediato que lleva piroglutamato de MCP-1 (=MCP1 N1pE). En este contexto, es importante observar que la delección de los aminoácidos 1-8 de la región del extremo N destruyó completamente la actividad de MCP-1, sugiriendo que la región del extremo amino es esencial para la actividad.

Por consiguiente, se deduce que los anticuerpos dirigidos contra MCP-1 N1pE pueden desempeñar una función no solo cuando se investiga la expresión y función de MCP-1, sino también en aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico a propósito de enfermedades o alteraciones en las que también podría participar MCP-1.

En vista de lo anterior, un objetivo subyacente a la presente invención es proporcionar anticuerpos que se unen selectivamente a MCP-1 N1pE.

### Resumen de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen selectivamente a MCP-1 N1pE, es decir, MCP-1 de piroglutamato.

Preferentemente, se proporcionan anticuerpos monoclonales.

La presente invención se refiere en particular a anticuerpos o variantes de los mismos, que se caracterizan porque se unen al péptido MCP-1 N1pE con una alta afinidad. Dicha alta afinidad significa en el contexto de la presente invención una afinidad de un valor de  $K_D$  de  $10^{-6}$  M o mejor, preferentemente un valor de  $K_D$  de  $10^{-7}$  M o mejor, e incluso más preferentemente un valor de  $K_D$  de  $10^{-8}$  M -  $10^{-12}$  M.

Los anticuerpos monoclonales de este tipo se producen preferentemente por células de hibridoma. Las células de hibridoma de este tipo se depositaron el 6 de mayo de 2008 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares) GmbH, DSMZ, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, según el Tratado de Budapest, concretamente

DSM	ACC	2905	(Clon de células de hibridoma 348/1D4)
		2906	(Clon de células de hibridoma 348/2C9)
		2907	(Clon de células de hibridoma 332/4B8) y
		2908	(Clon de células de hibridoma 332/4F8).

En particular, se prefieren anticuerpos monoclonales, en los que la unión selectiva significa una unión al extremo amino que lleva piroglutamato de MCP-1.

Incluso se prefieren anticuerpos monoclonales, en los que la unión selectiva significa que los anticuerpos no muestran

ninguna reactividad cruzada con los epítomos fuera del extremo amino que lleva piroglutamato de MCP-1 N1pE.

El extremo amino de MCP-1 N1pE se define aquí como los primeros 1 a 10 aminoácidos del extremo amino de MCP-1 N1pE, preferentemente los primeros 1 a 8 aminoácidos del extremo amino de MCP N1pE, lo más preferentemente los primeros 1 a 4 aminoácidos del extremo amino de MCP N1pE.

- 5 La invención se refiere adicionalmente a los clones de células de hibridoma anteriores en sí mismos que poseen la capacidad para producir y liberar tales anticuerpos.

10 Por medio de los anticuerpos 332-4B8 (DSM ACC 2907), 332-4F8 (DSM ACC 2908), 348-2C9 (DSM ACC 2906) y 348-1D4 (DSM ACC 2905), los inventores de la presente solicitud han puesto, por primera vez, a disposición anticuerpos monoclonales, además de células de hibridoma que producen y liberan estos anticuerpos, que hacen posible reconocer y unirse selectivamente, y por consiguiente influyen en MCP-1 N1pE. Por consiguiente, los anticuerpos proporcionan al profesional y científico investigador un medio versátil, que hasta la fecha es único, para, por una parte, detectar MCP-1 N1pE, tanto en cultivo celular como en la muestra obtenida de un paciente, y, por otra parte, para la posible manipulación de MCP-1 N1pE, cuando corresponda, tanto usando el propio anticuerpo como usando reactivos específicos que se acoplan a él.

- 15 A este respecto, los inventores de la presente solicitud han determinado que los anteriores anticuerpos 332-4B8, 332-4F8, 348-2C9 y 348-1D4 se unen selectivamente a polipéptidos de MCP-1 N1pE que empiezan con aminoácidos pE-P-D es decir, piroglutamato-prolina-ácido aspártico.

20 Los inventores han sido capaces de demostrar que MCP-1 N1pE también se detecta en muestras de sangre (suero, plasma) de mamíferos, especialmente de ratones, ratas y seres humanos, y que los niveles de MCP-1 N1pE son elevados después de estímulos inflamatorios, que pueden invertirse por la aplicación de inhibidores selectivos de la glutaminil ciclasa (QC) (por ejemplo, clorhidrato de 1-(3-(1H-imidazol-1-il)propil)-3-(3,4-dimetoxifenil)tiourea (véanse particularmente los inhibidores de la glutaminil péptido ciclasa como se desvelan en el documento WO 2008/104580).

Por consiguiente, estos anticuerpos son extraordinariamente adecuados para fines de diagnóstico y terapéuticos, siendo posible lograr una amplia variedad de investigaciones y efectos terapéuticos.

- 25 Por consiguiente, otra realización de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende uno de los anticuerpos novedosos anteriores. Preferentemente, dicho anticuerpo novedoso se acopla a una agente terapéutico o agente de diagnóstico dirigido a células.

30 Un anticuerpo según la invención, que se acopla a un medio para la detección y así indirectamente a las células relevantes, hace así posible detectar estas células directamente, por ejemplo, usando métodos de diagnóstico de rayos X/escintigráficos. De una manera correspondiente, el acoplamiento a un agente terapéuticamente activo también puede hacer posible ejercer un efecto directo y selectivo sobre células que llevan MCP-1 N1pE.

Ventajas adicionales serán evidentes a partir de la siguiente descripción facilitada más adelante.

- 35 Se entenderá que las características que se mencionan anteriormente, y aquellas que todavía van a explicarse más adelante, pueden usarse no solo en las combinaciones que se especifican en cada caso, sino también en otras combinaciones, o solas, sin apartarse del alcance de la presente invención.

### Descripción detallada de realizaciones preferidas

#### Definiciones

40 El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y específicamente cubre anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos, mientras que presenten la actividad biológica deseada. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, una IgM, IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), IgD, IgA o IgE. Preferentemente, sin embargo, el anticuerpo no es un anticuerpo IgM.

45 "Fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, generalmente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; diabodies; moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

50 El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio

antigénico. Además, a diferencia de preparaciones de “anticuerpo policlonal”, que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales pueden frecuentemente ser ventajosos porque se sintetizan por el cultivo de hibridomas, sin contaminar por otras inmunoglobulinas. “Monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiera la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención pueden prepararse por el método de hibridoma descrito por primera vez por Köhler y col., *Nature*, 256:495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante generalmente muy conocidos. Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fago usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson y col., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991).

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos quiméricos (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, además de fragmentos de tales anticuerpos, mientras que presenten la actividad biológica deseada.

Formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión al antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor están sustituidos con residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana están sustituidos con residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que ni se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las CDR importadas o secuencias de la región estructural.

Estas modificaciones se hacen para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR se corresponden con aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente aquella de una inmunoglobulina humana. Para más detalles véase Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986), Reichmann y col., *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo Primatized<sup>TM</sup>, en el que la región de unión al antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido inmunizando monos macaco con el antígeno de interés.

Fragmentos de anticuerpos “Fv monocatenario” o “sFv” comprenden los dominios de la cadena pesada variable (VH) y la cadena ligera variable (VL) de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptidos. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite a sFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pág. 269-315 (1994).

El término “diabodies” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VD) en la misma cadena de polipéptidos (VH - VD). Usando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena, los dominios son obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Se describen diabodies más completamente en Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

Un anticuerpo “aislado” es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con el diagnóstico o usos terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95 % en peso del anticuerpo como se ha determinado por el método de Lowry, y lo más preferentemente a más del 99 % en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos del extremo N o interna por el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) a homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Generalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Como se usa en el presente documento, las expresiones “célula”, “línea celular” y “cultivo celular” se usan indistintamente y todas aquellas designaciones incluyen progenie. Así, las palabras “transformantes” y “células transformadas” incluyen la célula objeto primaria y el cultivo derivado de la misma sin considerar el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Está incluida la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la cribada en la célula originalmente transformada. Si se prevén designaciones distintas, esto será evidente del contexto.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína”, como se usan en el presente documento, son intercambiables y se define que significan una biomolécula compuesta de aminoácidos ligados por un enlace peptídico.

La “homología” entre dos secuencias se determina por la identidad de secuencias. Si dos secuencias que van a compararse entre sí se diferencian en la longitud, la identidad de secuencias se refiere preferentemente al porcentaje de residuos de nucleótidos de la secuencia más corta que son idénticos con los residuos de nucleótidos de la secuencia más larga. La identidad de secuencias puede determinarse convencionalmente con el uso de programas informáticos tales como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). Bestfit utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489, con el fin de encontrar el segmento que tiene la mayor identidad de secuencias entre dos secuencias. Si se usa Bestfit u otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular tiene, por ejemplo, el 95 % de identidad con una secuencia de referencia de la presente invención, los parámetros se ajustan preferentemente de manera que el porcentaje de identidad se calcule con respecto a la longitud entera de la secuencia de referencia y se permiten huecos de homología de hasta el 5 % del número total de los nucleótidos en la secuencia de referencia. Si se usa Bestfit, los llamados parámetros opcionales se dejan preferentemente en sus valores prefijados (“por defecto”). Las desviaciones que aparecen en la comparación entre una secuencia dada y las secuencias anteriormente descritas de la invención pueden producirse, por ejemplo, mediante adición, delección, sustitución, inserción o recombinación. Una comparación de secuencias puede también llevarse a cabo preferentemente con el programa “fasta20u66” (versión 2.0u66, septiembre de 1998 por William R. Pearson y la Universidad de Virginia; véase también W.R. Pearson (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98, ejemplos adjuntos y <http://workbench.sdsc.edu/>). Para este fin, pueden usarse los ajustes de parámetros “por defecto”.

Como se usa en el presente documento, un “cambio conservativo” se refiere a alteraciones que son de forma sustancial conformacionalmente o antigénicamente neutras, que producen cambios mínimos en la estructura terciaria de los polipéptidos mutantes, o que producen cambios mínimos en los determinantes antigénicos de los polipéptidos mutantes, respectivamente, en comparación con la proteína nativa. Cuando se refiere a los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la invención, un cambio conservativo significa una sustitución de aminoácidos que no convierte el anticuerpo en incapaz de unirse al receptor objeto. Un experto habitual en la materia podrá predecir qué sustituciones de aminoácidos pueden hacerse mientras que se mantiene una alta probabilidad de ser conformacionalmente y antigénicamente neutras. Tal orientación se proporciona, por ejemplo, en Berzofsky, (1985) *Science* 229:932-940 y Bowie y col. (1990) *Science* 247: 1306-1310. Factores que van a considerarse que afectan la probabilidad de mantener neutralidad conformacional y antigénica incluyen, pero no se limitan a: (a) es menos probable que la sustitución de aminoácidos hidrófobos afecte la antigenicidad debido a que es más probable que los residuos hidrófobos se localicen en un interior de la proteína; (b) es menos probable que la sustitución de aminoácidos fisiológicamente similares afecte la conformación debido a que el aminoácido sustituido imita estructuralmente el aminoácido nativo; y (c) es probable que la alteración de secuencias evolutivamente conservadas afecte la conformación, ya que tal conservación sugiere que las secuencias de aminoácidos pueden tener importancia funcional. Un experto habitual en la materia podrá evaluar alteraciones en la conformación de proteínas usando ensayos bien conocidos, tales como, pero no se limitan a, métodos de fijación de microcomplementos (véase, por ejemplo Wasserman y col. (1961) *J. Immunol.* 87:290-295; Levine y col. (1967) *Meth. Enzymol.* 11 :928-936) y mediante estudios de unión usando anticuerpos monoclonales dependientes de la conformación (véase, por ejemplo, Lewis y col. (1983) *Biochem.* 22:948-954).

Los términos “un”, “una”, “el” y “la” como se usan en el presente documento se define que significan “uno o más” e incluyen el plural, a menos que el contexto sea inapropiado.

La invención se explica más abajo en más detalle con la ayuda de ejemplos de aplicación y ejemplos de implementación, además de las siguientes figuras que muestran:

**Figura 1A:** Características de unión del anticuerpo monoclonal 332-4B8 a MCP-1 N1pE-38 humano determinadas con análisis de SPR (Biacore 3000). La medición se realizó usando HBS-EP como tampón de electroforesis. La asociación tuvo lugar durante 180 s, seguido de una fase de disociación de 180 s y 5 s de regeneración con HCl 0,1 M.

**Figura 1B:** Características de unión del anticuerpo monoclonal 332-4F8 a MCP-1 N1pE-38 humano determinadas con análisis de SPR (Biacore 3000). La medición se realizó usando HBS-EP como tampón de electroforesis. La asociación tuvo lugar durante 180 s, seguido de una fase de disociación de 180 s y 5 s de regeneración con HCl 0,1 M.

**Figura 1C:** Características de unión del anticuerpo monoclonal 348-2C9 a MCP-1 N1pE-38 humano determinadas con

análisis de SPR (Biacore 3000). La medición se realizó usando HBS-EP como tampón de electroforesis. La asociación tuvo lugar durante 180 s, seguido de una fase de disociación de 180 s y 5 s de regeneración con HCl 0,1 M.

5 **Figura 1D:** Características de unión del anticuerpo monoclonal 348-1D4 a MCP-1 N1pE-38 humano determinadas con análisis de SPR (Biacore 3000). La medición se realizó usando HBS-EP como tampón de electroforesis. La asociación tuvo lugar durante 180 s, seguido de una fase de disociación de 180 s y 5 s de regeneración con HCl 0,1 M.

**Figura 2A:** Análisis de transferencia puntual del anticuerpo monoclonal 322-4B8 para MCP-1 N1pE-38 humano y MCP-1 3-38.

**Figura 2B:** Análisis de transferencia puntual del anticuerpo monoclonal 322-4F8 para MCP-1 N1pE-38 humano y MCP-1 3-38.

10 **Figura 2C:** Análisis de transferencia puntual del anticuerpo monoclonal 348-1D4 para MCP-1 N1pE-38 humano y MCP-1 3-38.

**Figura 2D:** Análisis de transferencia puntual del anticuerpo monoclonal 348-2C9 para MCP-1 N1pE-38 humano y MCP-1 3-38.

**Figura 3:** Análisis PepSpot de los anticuerpos monoclonales 322-4B8, 322-4F8, 348-1D4 y 348-2C9.

15 **Figura 4:** Detección cuantitativa de MCP-1 N1pE humano recombinante en un ELISA usando los anticuerpos monoclonales anti-MCP-1 322-4B8, 348-2C9 y 348-1D4.

**Figura 5:** Detección de MCP-1 N1pE humano de suero humano por los anticuerpos monoclonales 322-4B8, 348-1D4 y 348-2C9 en ELISA.

**Figura 6:** Expresión dependiente del tiempo de hMCP-1 N1pE en células NHDF, estimuladas por OSM y IL1 $\beta$ .

20 **Figura 7:** Reducción dependiente de la concentración de hMCP-1 N1pE en el sobrenadante de cultivo celular de células THP1 inducidas por LPS después de la aplicación de QCI.

**Figura 8:** Detección cuantitativa de MCP-1 N1pE de ratón recombinante en un ELISA usando los anticuerpos monoclonales anti-MCP-1 322-4B8, 348-2C9 y 348-1D4

25 **Figura 9:** Detección cuantitativa de MCP-1 N1pE de ratón nativa en el sobrenadante de cultivo celular de células RAW 264.7 sin tratar e inducidas por LPS.

**Figura 10:** Reducción dependiente de la concentración de mMCP-1 N1pE en el sobrenadante de cultivo celular de células RAW 264.7 inducidas por LPS después de la aplicación de QCI.

**Figura 11:** Detección cuantitativa de mMCP-1 N1pE en suero de ratón después de diferentes momentos de tiempo de tratamiento con LPS.

30 **Figura 12:** Linealidad de dilución de la detección cuantitativa de mMCP-1 N1pE en líquido de lavado peritoneal de ratones tratados por tioglicolato por ELISA.

**Figura 13:** Comparación de señales de transferencia Western obtenidas para MCP1 N1pE murina (**A**) y MCP1 murina total (**B**) con los datos de ELISA correspondientes para MCP1 N1pE murina (**C**).

**Figura 14:** Detección cuantitativa de MCP-1 N1pE de rata por el anticuerpo anti-MCP-1 N1pE 348-2C9 en un ELISA.

35 **Figura 15:** Tinción de MCP-1 N1pE en secciones de cerebro de ratas con los anticuerpos 322-4B8, 348-1D4 y 348-2C9 después de la microinyección de A $\beta$  (3-49), LPS o NaCl.

**Figura 16:** Curvas de ajuste del calor de unión desprendido por la valoración del antígeno hMCP-1 N1pE-38 para los anticuerpos monoclonales **A** - 348-1D4 y **B** - 322-4B8.

40 Para aplicaciones de diagnóstico, el anticuerpo normalmente se marcará con un resto detectable. Están disponibles numerosas marcas que pueden generalmente agruparse en las siguientes categorías:

(a) Radioisótopos, tales como <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C, <sup>125</sup>I, <sup>3</sup>H y <sup>131</sup>I. El anticuerpo puede marcarse con el radioisótopo usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Current Protocols in Immunology, volúmenes 1 y 2, Gütingen y col., Ed., Wiley-Interscience. New York, New York. Pubs., (1991) y la radiactividad puede medirse usando recuento por centelleo.

45 (b) Están disponibles marcas fluorescentes tales como quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, Lissamina, ficoeritrina y Texas Red. Las marcas fluorescentes pueden

conjugarse con el anticuerpo usando las técnicas desveladas en, por ejemplo, *Current Protocols in Immunology*, arriba. La fluorescencia puede cuantificarse usando un fluorímetro.

(c) Están disponibles diversas marcas de enzima-sustrato. Tal enzima generalmente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse usando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse espectrofotométricamente. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se han descrito anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente por una reacción química y puede entonces emitir luz que puede medirse (usando, por ejemplo, un quimioluminómetro) o dona energía a un aceptor fluorescente. Ejemplos de marcas enzimáticas incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; patente de EE.UU. n° 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, O-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Técnicas para conjugar enzimas con anticuerpos se describen en O'Sullivan y col., *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, en *Methods in Enzym* (ed Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73: 147-166 (1981).

Ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

(i) Peroxidasa de rábano picante (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, en la que la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortofenilendiamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB));

(ii) fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de para-nitrofenilo como sustrato cromogénico; y

(iii)  $\beta$ -D-galactosidasa ( $\beta$ -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosidasa) o el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactosidasa.

Están disponibles numerosas otras combinaciones de enzima-sustrato para aquellos expertos en la materia.

Algunas veces, la marca está indirectamente conjugada con el anticuerpo. El experto conocerá diversas técnicas para conseguir esto. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de las tres amplias categorías de marcas mencionadas anteriormente puede conjugarse con avidina, o viceversa. La biotina se une selectivamente a avidina y así la marca puede conjugarse con el anticuerpo en esta manera indirecta. Alternativamente, para lograr la conjugación indirecta de la marca con el anticuerpo, el anticuerpo se conjuga con un pequeño hapteno (por ejemplo, digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcas mencionados anteriormente se conjuga con un anticuerpo anti-hapteno (por ejemplo, anticuerpo anti-digoxina). Así, puede lograrse la conjugación indirecta de la marca con el anticuerpo.

Los anticuerpos inventivos no necesitan marcarse, y la presencia de los mismos puede detectarse usando un anticuerpo marcado, que se une a los anticuerpos inventivos.

Los anticuerpos de la presente invención pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación (Zola, *Monoclonal Antibodies A Manual of Techniques*, pág. 147-158 (CRC Press. Inc., 1987).

Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un patrón marcado para competir con el analito de la muestra de prueba para la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de péptido MCP-1 en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar determinar la cantidad de patrón que se une, los anticuerpos generalmente se insolubilizan antes o después de la competición, de manera que el patrón y el analito que se unen a los anticuerpos pueden separarse convenientemente del patrón y analito que sigue sin unir.

Los ensayos de sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno de los cuales puede unirse a una porción inmunogénica diferente, o epítipo, de la proteína que va a detectarse. En un ensayo de sándwich, el analito de la muestra de prueba se une por un primer anticuerpo que se inmoviliza sobre un soporte sólido, y después un segundo anticuerpo se une al analito, formando así un complejo de tres partes insoluble. El segundo anticuerpo puede él mismo marcarse con un resto detectable (ensayos de sándwich directos) o puede medirse usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que se marca con un resto detectable (ensayo de sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo preferible de ensayo de sándwich es un ensayo de ELISA, en cuyo caso el resto detectable es una enzima.

Para el análisis inmunohistoquímico, la muestra de tejido puede ser fresca o congelada o puede incorporarse en parafina y fijarse con un conservante tal como, por ejemplo, formalina.

Kits de diagnóstico

5 Como una cuestión de conveniencia, el anticuerpo de la presente invención puede proporcionarse en un kit, es decir, una combinación envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico. Si el anticuerpo se marca con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, pueden incluirse otros aditivos tales como estabilizadores, tampones (por ejemplo, un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variarse ampliamente para proporcionar concentraciones en disolución de los reactivos que sustancialmente optimizan la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, normalmente liofilizados, que incluyen excipientes que tras la disolución proporcionarán una disolución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

10 El kit de diagnóstico según la invención puede contener otra sustancia biológicamente activa como se describe más adelante. Especialmente preferido para el uso en el kit de diagnóstico son inhibidores de glutaminil ciclasa.

El kit de diagnóstico de la invención es especialmente útil para la detección y diagnóstico de enfermedades y afecciones relacionadas con MCP-1 seleccionadas del grupo que consiste en enfermedades inflamatorias seleccionadas de

- 15 a. enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), enfermedad de Alzheimer, neurodegeneración en síndrome de Down, demencia familiar británica, demencia familiar danesa, esclerosis múltiple,
- b. inflamaciones crónicas y agudas, por ejemplo, artritis reumatoide, aterosclerosis, reestenosis, pancreatitis,
- c. fibrosis, por ejemplo, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, fibrosis renal,
- d. cáncer, por ejemplo, proliferación de cáncer/hemangioendotelioma, carcinomas gástricos,
- e. enfermedades metabólicas, por ejemplo, hipertensión,
- 20 f. y otras enfermedades inflamatorias, por ejemplo, dolor neuropático, rechazo del injerto/fallo del injerto/vasculopatía del injerto, infecciones por el VIH/SIDA, gestosis, esclerosis tuberosa.

25 Preferentemente, el anticuerpo según la presente invención es especialmente útil en un método de diagnóstico para detectar enfermedad relacionada con MCP-1, por ejemplo, aterosclerosis, artritis reumatoide, asma, reacciones de hipersensibilidad retardada, pancreatitis, enfermedad de Alzheimer, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, gestosis, rechazo del injerto, dolor neuropático, SIDA y tumores.

Lo más preferentemente, el kit de diagnóstico de la invención es útil para la detección y diagnóstico de enfermedad de Alzheimer, o también lo más preferentemente una enfermedad seleccionada de aterosclerosis, artritis reumatoide, reestenosis y pancreatitis, en particular enfermedad de Alzheimer o artritis reumatoide.

Según la presente invención se prefiere un anticuerpo monoclonal.

30 Más preferentemente según la presente invención es un anticuerpo monoclonal, en el que la parte variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 33, 37 y 41, o una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 34, 38 y 42.

35 Alternativamente, según la presente invención se prefiere un anticuerpo monoclonal, en el que la parte variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 35, 39 y 43, o una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 36, 40 y 44.

Alternativamente, según la presente invención se prefiere el anticuerpo monoclonal, en el que la parte variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 33 o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34, y en el que la parte variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 35, o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

40 También se prefiere según la presente invención el anticuerpo monoclonal, en el que la parte variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 37 o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, y en el que la parte variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 39, o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40.

45 Incluso se prefiere según la presente invención el anticuerpo monoclonal, en el que la parte variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 41 o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42, y en el que la parte variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 43, o la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44.

En particular se prefiere un anticuerpo monoclonal, que se produce por una línea celular de hibridoma seleccionada del siguiente grupo

348/1D4	(Depósito nº DSM ACC 2905)
348/2C9	(Depósito nº DSM ACC 2906)
332/4B8	(Depósito nº DSM ACC 2907)
332/4F8	(Depósito nº DSM ACC 2908)

Según otra realización preferida, el anticuerpo puede ser humanizado o es un anticuerpo quimérico o es un anticuerpo humano.

Además, el anticuerpo como se ha seleccionado del grupo anteriormente mencionado también puede ser una variante funcional de dicho grupo.

- 5 En el contexto de la presente invención, una "variante funcional" del anticuerpo inventivo es un anticuerpo que retiene las capacidades de unión, en particular capacidades de unión con alta afinidad a MCP-1 N1pE-38 o variante funcional de la misma. La provisión de tales variantes funcionales se conoce en la técnica y engloba las posibilidades anteriormente mencionadas, que se indicaron bajo la definición de anticuerpos y fragmentos de los mismos.

En una realización preferida, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, como se ha definido anteriormente.

- 10 En otra realización preferida, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo que tiene las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de los anticuerpos anteriormente definidos. Preferentemente, el anticuerpo puede marcarse; posibles marcas son aquellas que se han mencionado anteriormente y todas aquellas conocidas para un experto en la materia de los usos de diagnóstico de anticuerpos en particular.

- 15 La presente invención se refiere además a una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de ácido nucleico que es el 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 33, 37 ó 41, o una parte funcional de la misma.

La presente invención se refiere además a una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de ácido nucleico que es el 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 35, 39 ó 43, o una parte funcional de la misma.

- 20 Adicionalmente se prefiere según la presente invención un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es el 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 34, 38 ó 42.

- 25 Incluso se prefiere según la presente invención un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es el 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 36, 40 ó 44.

- 30 Además, la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o partes funcionales del mismo, en el que la parte variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 34, 38 y 42 y/o en el que la parte variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 36, 40 y 44, en el que el anticuerpo ha sido alterado introduciendo al menos uno, al menos dos, o al menos 3 o más sustituciones conservativas en al menos una de las secuencias de SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42 y 44, en el que el anticuerpo mantiene su funcionalidad completa.

- 35 La presente invención se refiere además a un polinucleótido aislado que codifica la región variable de la cadena ligera de los anticuerpos monoclonales presentados en el presente documento, en el que dicho polinucleótido aislado comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada de SEQ ID NO: 33, 37 y 41.

- 40 La presente invención también se refiere a un polinucleótido aislado que codifica la región variable de la cadena pesada de los anticuerpos monoclonales presentados en el presente documento, en el que dicho polinucleótido aislado comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada de SEQ ID NO: 35, 39 y 43.

Además, la presente invención se refiere a un péptido aislado de la región variable de la cadena ligera de los anticuerpos monoclonales presentados en el presente documento, en el que dicho péptido aislado comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 34, 38 y 42.

- 45 Además, la presente invención se refiere a un péptido aislado de la región variable de la cadena pesada de los anticuerpos monoclonales presentados en el presente documento, en el que dicho péptido aislado comprende una secuencia de

aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 36, 40 y 44.

Preferentemente, el anticuerpo está inmovilizado sobre una fase sólida.

5 La presente invención también se refiere a una composición que comprende el anticuerpo como se ha definido anteriormente. En particular, dicha composición es una composición para un uso de diagnóstico, especialmente para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con MCP-1, en particular por la detección de MCP-1 N1pE en una muestra biológica.

10 En otra realización, el anticuerpo según la invención y como se describe en el presente documento antes o un fragmento del mismo, presenta una afinidad de unión a MCP-1 N1pE, que es al menos 2 veces, particularmente al menos 4 veces, particularmente al menos 10 veces, particularmente al menos 15 veces, más particularmente al menos 20 veces, pero especialmente al menos 25 veces superior a la afinidad de unión de anticuerpos convencionales.

En otra realización adicional, se proporciona un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, como se describe en el presente documento antes, anticuerpo que se une sustancialmente a MCP-1 N1pE en el cerebro de mamífero, particularmente humano, pero, preferentemente, no muestra ninguna reactividad cruzada significativa con MCP-1 N1pE, en particular con MCP-1 N1pE 3-38.

15 La presente invención también se refiere a formas humanizadas de los anticuerpos como se han definido anteriormente, composiciones que comprenden dichos anticuerpos humanizados y el uso de dichas composiciones para el tratamiento de enfermedades relacionadas con MCP-1, especialmente para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer en un mamífero, en particular en un ser humano.

La presente invención también se refiere a las siguientes líneas celulares de hibridoma

DSM	ACC	2905	(Clon de células de hibridoma 348/1D4)
DSM	ACC	2906	(Clon de células de hibridoma 348/2C9)
DSM	ACC	2907	(Clon de células de hibridoma 332/4B8) y
DSM	ACC	2908	(Clon de células de hibridoma 332/4F8).

20 La presente invención también se refiere al uso del anticuerpo o la composición que comprende el anticuerpo, ambos como se han definido anteriormente, en un método de diagnóstico *in vitro*. En particular, este método de diagnóstico se refiere al diagnóstico de enfermedades relacionadas con MCP-1, especialmente detectando MCP-1 N1pE en una muestra biológica.

Preferentemente, dicha muestra es una muestra de suero.

25 Según otra realización preferida, dicha muestra es una muestra de líquido, líquido cefalorraquídeo (CSF) o de líquido sinovial.

En una realización particularmente preferida, la presente invención se refiere al siguiente método:

Método de diagnóstico *in vitro* o *in situ* para el diagnóstico de una enfermedad o afección relacionada con MCP-1, que comprende las siguientes etapas:

- 30 a) poner en contacto un anticuerpo según la invención con una muestra, seleccionada preferentemente de una muestra de suero, líquido o CSF, lo más preferentemente una muestra de suero; o una parte del cuerpo específica o área del cuerpo de un sujeto que se sospecha que está afectado con dicha afección o enfermedad, y
- b) detectar la unión del anticuerpo a un péptido MCP-1 N1pE, de la muestra.

35 Más particularmente, la invención se refiere a un método de diagnóstico de una enfermedad o afección relacionada con MCP-1, que comprende detectar la unión inmunespecífica de un anticuerpo o un fragmento activo del mismo a un péptido MCP-1 N1pE, en una muestra o *in situ* que incluye las etapas de

- 40 (a) poner la muestra o una parte del cuerpo específica o área del cuerpo que se sospecha que contiene el péptido MCP-1 en contacto con un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal según la presente invención, o un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se describe en el presente documento antes, y/o una parte funcional del mismo;
- (b) dejar que el anticuerpo y/o una parte funcional del mismo se una al péptido MCP-1 N1pE para formar un complejo inmunológico;

(c) detectar la formación del complejo inmunológico; y

(d) correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de péptido MCP-1 N1pE en la muestra o parte o área del cuerpo específica.

5 Los métodos de diagnóstico anteriormente mencionados son especialmente útiles para la detección y diagnóstico de enfermedades y afecciones relacionadas con MCP-1 seleccionadas del grupo que consiste en enfermedades inflamatorias seleccionadas de

a. enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), enfermedad de Alzheimer, neurodegeneración en síndrome de Down, demencia familiar británica, demencia familiar danesa, esclerosis múltiple,

b. inflamaciones crónicas y agudas, por ejemplo, artritis reumatoide, aterosclerosis, reestenosis, pancreatitis,

10 c. fibrosis, por ejemplo, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, fibrosis renal,

d. cáncer, por ejemplo, proliferación de cáncer/hemangioendotelioma, carcinomas gástricos,

e. enfermedades metabólicas, por ejemplo, hipertensión,

f. y otras enfermedades inflamatorias, por ejemplo, dolor neuropático, rechazo del injerto/fallo del injerto/vasculopatía del injerto, infecciones por VIH/SIDA, gestosis, esclerosis tuberosa.

15 Preferentemente, los métodos de diagnóstico anteriormente mencionados son útiles para detectar enfermedad relacionada con MCP-1, por ejemplo, aterosclerosis, artritis reumatoide, asma, reacciones de hipersensibilidad retardada, pancreatitis, enfermedad de Alzheimer, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, gestosis, rechazo del injerto, dolor neuropático, SIDA y tumores.

20 Lo más preferentemente, los métodos de diagnóstico anteriormente mencionados son útiles para la detección y diagnóstico de enfermedad de Alzheimer, o también lo más preferentemente una enfermedad seleccionada de aterosclerosis, artritis reumatoide, reestenosis y pancreatitis, en particular enfermedad de Alzheimer o artritis reumatoide.

25 En otra realización adicional, la invención se refiere a una composición que comprende el anticuerpo según la invención, o un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se describe en el presente documento antes, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o cualquier derivado o partes funcionales del mismo, en una cantidad terapéuticamente eficaz, en particular una composición que es una composición farmacéutica que opcionalmente comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización de la invención, dicha composición comprende el anticuerpo en una cantidad terapéuticamente eficaz.

30 Adicionalmente comprendido por la invención es una mezcla que comprende un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal según la invención, o un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se describe en el presente documento antes, que incluye cualquier anticuerpo funcionalmente equivalente o cualquier derivado o partes funcionales del mismo, en una cantidad terapéuticamente eficaz y, opcionalmente, otra sustancia biológicamente activa y/o un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 En particular, la invención se refiere a una mezcla, en la que la sustancia biológicamente activa adicional es un compuesto usado en la medicación de un grupo de enfermedades y trastornos asociados a MCP-1, tal como una enfermedad inflamatoria seleccionada de

a. enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), enfermedad de Alzheimer, neurodegeneración en síndrome de Down, demencia familiar británica, demencia familiar danesa, esclerosis múltiple,

40 b. inflamaciones crónicas y agudas, por ejemplo, artritis reumatoide, aterosclerosis, reestenosis, pancreatitis,

c. fibrosis, por ejemplo, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, fibrosis renal,

d. cáncer, por ejemplo, proliferación de cáncer/hemangioendotelioma, carcinomas gástricos,

e. enfermedades metabólicas, por ejemplo, hipertensión, y

45 f. otras enfermedades inflamatorias, por ejemplo, dolor neuropático, rechazo del injerto/fallo del injerto/vasculopatía del injerto, infecciones por VIH/SIDA, gestosis, esclerosis tuberosa.

La otra sustancia o compuesto biológicamente activo puede ejercer su efecto biológico por el mismo mecanismo o uno

similar al del anticuerpo según la invención o por un mecanismo de acción no relacionado o por una multiplicidad de mecanismos de acción relacionados y/o no relacionados.

5 Generalmente, el otro compuesto biológicamente activo puede incluir potenciadores de la transmisión de neutrones, fármacos psicoterapéuticos, inhibidores de la acetilcolina esterasa, bloqueantes de los canales de calcio, aminas biogénicas, tranquilizantes de benzodiazepina, potenciadores de la síntesis, almacenamiento o liberación de acetilcolina, agonistas del receptor postsináptico de acetilcolina, inhibidores de la monoamina oxidasa A o B, antagonistas del receptor de N-metil-D-aspartato glutamato, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, antioxidantes, antagonistas de receptores serotonérgicos, antagonistas del receptor CCR2 y anticuerpos para MCP-1. Con anticuerpos para MCP-1 como otro agente biológicamente activo se indican aquellos anticuerpos que están uniéndose a MCP-1 nativa, es decir, si el residuo de Glu del extremo N no está ciclado con pGlu.

10 Más particularmente, la invención se refiere a una mezcla que comprende al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en compuestos eficaces contra el estrés oxidativo, compuestos antiapoptóticos, quelantes de metal, inhibidores de la reparación de ADN tales como pirenzepina y metabolitos, ácido 3-amino-1-propanosulfónico (3-APS), 1,3-propanodisulfonato (1,3PDS), activadores de la  $\alpha$ -secretasa, inhibidores de la  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa, proteínas tau, neurotransmisor, interruptores de hojas  $\beta$ , atrayentes para la eliminación de amiloide beta/agotamiento de componentes celulares, inhibidores de péptidos de amiloide beta truncados en el extremo N que incluyen amiloide beta 3-42 piroglutamado, tales como inhibidores de la glutaminil ciclasa, moléculas antiinflamatorias o inhibidores de la colinesterasa (ChEI) tales como tacrina, rivastigmina, donepezilo y/o galantamina, agonistas de M1 y otros fármacos que incluyen cualquier fármaco modificador de amiloide o de tau y suplementos nutritivos, y suplementos nutritivos, junto con un anticuerpo según la presente invención y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención se refiere además a una mezcla, en la que el compuesto es un inhibidor de la colinesterasa (ChEI), particularmente una mezcla, en la que el compuesto es uno seleccionado del grupo que consiste en tacrina, rivastigmina, donepezilo, galantamina, niacina y memantina.

25 En otra realización, las mezclas según la invención pueden comprender niacina o memantina junto con un anticuerpo según la presente invención y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 En otra realización, las mezclas según la invención pueden comprender un inhibidor de la glutaminil ciclasa junto con un anticuerpo según la presente invención y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Inhibidores preferidos de glutaminil ciclasa se describen en el documento WO 2005/075436, en los ejemplos particulares 1-141 como se muestra en las pág. 31-40. La síntesis de los ejemplos 1-141 se muestra en las pág. 40-48 del documento WO 2005/075436.

35 Inhibidores preferidos adicionales de la glutaminil ciclasa se describen en el documento WO 2008/055945, en los ejemplos particulares 1-473 como se muestra en las pág. 46-155. La síntesis de los ejemplos 1-473 se muestra en las pág. 156-192 del documento WO 2008/055945.

Inhibidores preferidos adicionales de la glutaminil ciclasa se describen en el documento WO 2008/055947, en los ejemplos particulares 1-345 como se muestra en las pág. 53-118. La síntesis de los ejemplos 1-345 se muestra en las pág. 119-133 del documento WO 2008/055947.

40 Inhibidores preferidos adicionales de la glutaminil ciclasa se describen en el documento WO 2008/055950, en los ejemplos particulares 1-212 como se muestra en las pág. 57-120. La síntesis de los ejemplos 1-212 se muestra en las pág. 121-128 del documento WO 2008/055950.

Inhibidores preferidos adicionales de la glutaminil ciclasa se describen en WO2008/065141, en los ejemplos particulares 1-25 como se muestra en las pág. 56-59. La síntesis de los ejemplos 1-25 se muestra en las pág. 60-67 of WO2008/065141.

45 Inhibidores preferidos adicionales de la glutaminil ciclasa se describen en el documento WO 2008/110523, en los ejemplos particulares 1-27 como se muestra en las pág. 55-59. La síntesis de los ejemplos 1-27 se muestra en las pág. 59-71 del documento WO 2008/110523.

50 Inhibidores preferidos adicionales de la glutaminil ciclasa se describen en el documento WO 2008/128981, en los ejemplos particulares 1-18 como se muestra en las pág. 62-65. La síntesis de los ejemplos 1-18 se muestra en las pág. 65-74 del documento WO 2008/128981.

Inhibidores preferidos adicionales de la glutaminil ciclasa se describen en el documento WO 2008/128982, en los ejemplos particulares 1-44 como se muestra en las pág. 61-67. La síntesis de los ejemplos 1-44 se muestra en las pág.

68-83 del documento WO 2008/128982.

Inhibidores preferidos adicionales de la glutaminil ciclasa se describen en el documento WO 2008/128983, en los ejemplos particulares 1-30 como se muestra en las pág. 64-68. La síntesis de los ejemplos 1-30 se muestra en las pág. 68-80 del documento WO 2008/128983.

- 5 Inhibidores preferidos adicionales de la glutaminil ciclasa se describen en el documento WO 2008/128984, en los ejemplos particulares 1-36 como se muestra en las pág. 63-69. La síntesis de los ejemplos 1-36 se muestra en las pág. 69-81 del documento WO 2008/128984.

- 10 Inhibidores preferidos adicionales de la glutaminil ciclasa se describen en el documento WO 2008/128985, en los ejemplos particulares 1-71 como se muestra en las pág. 66-76. La síntesis de los ejemplos 1-71 se muestra en las pág. 76-98 del documento WO 2008/128985.

Inhibidores preferidos adicionales de la glutaminil ciclasa se describen en el documento WO 2008/128986, en los ejemplos particulares 1-7 como se muestra en las pág. 65-66. La síntesis de los ejemplos 1-7 se muestra en las pág. 66-73 del documento WO 2008/128986.

- 15 En otra realización adicional de la invención se proporcionan mezclas que comprenden "antipsicóticos atípicos" tales como, por ejemplo, clozapina, ziprasidona, risperidona, aripiprazol u olanzapina para el tratamiento de síntomas psicóticos positivos y negativos que incluyen alucinaciones, ideas delirantes, trastornos del pensamiento (manifestados por una marcada incoherencia, descarrilamiento, tangencialidad) y comportamiento extraño o desorganizado, además de anhedonia, afecto aplanado, apatía y aislamiento social, junto con un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal según la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo, según la invención y como se describe en el presente documento y, opcionalmente, un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20

En una realización específica de la invención, las composiciones y mezclas según la invención y como se describen en el presente documento antes comprenden el anticuerpo y la sustancia biológicamente activa, respectivamente, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

- 25 Otros compuestos que pueden usarse adecuadamente en mezclas en combinación con el anticuerpo según la presente invención se describen en el documento WO 2008/065141 (véanse especialmente las páginas 37/38), que incluye inhibidores de PEP (pág. 43/44), LiCl, inhibidores de dipeptidil aminopeptidasas, preferentemente inhibidores de enzimas similares a DP IV o DP IV (véanse las pág. 48/49); inhibidores de la acetilcolinesterasa (ACE) (véase la pág. 47), potenciadores de PIMT, inhibidores de beta secretasas (véase la pág. 41), inhibidores de gamma secretasas (véanse las pág. 41/42), inhibidores de endopeptidasa neutra, inhibidores de fosfodiesterasa-4 (PDE-4) (véanse las pág. 42/43), inhibidores de TNFalfa, antagonistas de receptores muscarínicos M1 (véase la pág. 46), antagonistas del receptor NMDA (véanse las pág. 47/48), inhibidores del receptor sigma-1, antagonistas de la histamina H3 (véase la pág. 43), agentes inmunomoduladores, agentes inmunosupresores o un agente seleccionado del grupo que consiste en Antegren (natalizumab), Neurelan (fampridina-SR), Campath (alemtuzumab), IR 208, NBI 5788/MSP 771 (tiplimotida), paclitaxel, Anergix.MS (AG 284), SH636, Differin (CD 271, adapaleno), BAY 361677 (interleucina-4), inhibidores de las metaloproteinasas de matriz (por ejemplo, BB 76163), interferón-tau (trofoblastina) y SAIK-MS; anticuerpos para beta-amiloide (véase la pág. 44), inhibidores de la cisteína proteasa (véase la pág. 44); antagonistas de MCP-1 (véanse las pág. 44/45), inhibidores del depósito de proteína amiloide (véase la pág. 42) e inhibidores de la síntesis de beta-amiloide (véase la pág. 42).
- 30
- 35

- 40 En otra realización, la invención se refiere a una mezcla que comprende el anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal según la invención, o un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se describe en el presente documento antes y/o la sustancia biológicamente activa en una cantidad terapéuticamente eficaz.

- 45 La invención se refiere además al uso de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal según la invención, pero particularmente a un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se describe en el presente documento antes y/o una parte funcional del mismo y/o una composición farmacéutica, o una mezcla que comprende dicho anticuerpo, para la preparación de un medicamento para tratar o aliviar los efectos de un grupo de enfermedades y trastornos asociados a MCP-1 tales como enfermedades que incluyen, pero no se limitan a, trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer (EA), demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis (tipo holandés); el complejo de Parkinson-demencia de Guam; además de otras enfermedades que se basan o asocian a proteínas similares a amiloides tales como parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, enfermedad de Parkinson, demencia relacionada con el VIH, ELA (esclerosis lateral amiotrófica), diabetes de tipo 2; amiloidosis cardíaca senil; tumores endocrinos y otros, que incluyen degeneración macular.
- 50

Más preferentemente, la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal según la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se describe en el presente documento antes y/o una parte funcional del mismo y/o una composición farmacéutica, o una mezcla que comprende dicho anticuerpo, para la preparación de un medicamento para tratar o aliviar los efectos de una enfermedad inflamatoria seleccionada de

- a. enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), enfermedad de Alzheimer, neurodegeneración en síndrome de Down, demencia familiar británica, demencia familiar danesa, esclerosis múltiple,
- b. inflamaciones crónicas y agudas, por ejemplo, artritis reumatoide, aterosclerosis, reestenosis, pancreatitis,
- c. fibrosis, por ejemplo, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, fibrosis renal,
- d. cáncer, por ejemplo, proliferación de cáncer/hemangioendotelioma, carcinomas gástricos,
- e. enfermedades metabólicas, por ejemplo, hipertensión, y
- f. otras enfermedades inflamatorias, por ejemplo, dolor neuropático, rechazo del injerto/fallo del injerto/vasculopatía del injerto, infecciones por VIH/SIDA, gestosis, esclerosis tuberosa.

También comprende la presente invención un método para la preparación de un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal según la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención y como se describe en el presente documento antes y/o una parte funcional del mismo y/o una composición farmacéutica, o una mezcla que comprende dicho anticuerpo y/o una parte funcional del mismo, particularmente en una cantidad terapéuticamente eficaz, para su uso en un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de un grupo de enfermedades y trastornos asociados a MCP-1 como se han definido anteriormente que comprende formular un anticuerpo, particularmente un anticuerpo monoclonal según la invención, pero particularmente un anticuerpo quimérico o un fragmento del mismo, o un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo según la invención en una forma farmacéuticamente aceptable.

Adicionalmente, la presente invención comprende un método para prevenir, tratar o aliviar los efectos de un grupo de enfermedades y trastornos asociados a MCP-1 como se ha definido anteriormente administrando un anticuerpo y/o una parte funcional del mismo, pero particularmente un anticuerpo humanizado y/o una parte funcional del mismo, o una composición o mezcla que comprende un anticuerpo tal y/o una parte funcional del mismo, a un animal o un ser humano afectado por un trastorno tal que comprende administrar el anticuerpo en una cantidad terapéuticamente eficaz.

#### Administración y dosificación

El anticuerpo se administra preferentemente a un mamífero en un vehículo; preferentemente un vehículo farmacéuticamente aceptable. Vehículos adecuados y sus formulaciones se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; y Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20ª ed. Mack Publishing, 2000. Normalmente, una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable se usa en la formulación para convertir la formulación en isotónica. Ejemplos del vehículo incluyen solución salina, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. El pH de la disolución es preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, y más preferentemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. Vehículos adicionales incluyen preparaciones de liberación sostenida tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, liposomas o micropartículas. Será evidente para aquellos expertos en la materia que ciertos vehículos pueden ser más preferibles dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración y concentración del anticuerpo que se administra.

El anticuerpo puede administrarse al mamífero mediante inyección (por ejemplo, sistémica, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intraportal, intracerebral, intracerebroventricular e intranasal), o por otros métodos, tales como infusión, que garantizan su administración a la circulación sanguínea de una forma eficaz. El anticuerpo también puede administrarse por técnicas de perfusión aislada, tales como perfusión de tejido aislado, para ejercer efectos terapéuticos locales. Se prefiere inyección intravenosa.

Dosificaciones eficaces y programas para administrar el anticuerpo pueden determinarse empíricamente, y el hacer tales determinaciones está dentro de la experiencia en la materia. Aquellos expertos en la materia entenderán que la dosificación de anticuerpo que debe administrarse variará dependiendo de, por ejemplo, el mamífero que recibirá el anticuerpo, la vía de administración, el tipo particular de anticuerpo usado y otros fármacos que se administran al mamífero. La orientación en la selección de dosis apropiadas de anticuerpo se encuentra en la bibliografía sobre usos terapéuticos de anticuerpos, por ejemplo, Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone y col., eds., Nokes Publications, Park Ridge, N. J., 1985, Cap. 22 y pág. 303-357; Smith y col., Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber y col., eds., Raven Press, New York, 1977, pág. 365-389. Una dosificación diaria típica del anticuerpo usado solo podría oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a hasta 100 mg/kg de peso corporal o más por día, dependiendo de los factores

- mencionados anteriormente. Generalmente, puede usarse cualquiera de las siguientes dosis: se administra una dosis de al menos aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 750 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 500 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 250 µg/kg de peso corporal; al menos aproximadamente 100 µg /kg de peso corporal; al menos aproximadamente 50 µg /kg de peso corporal; al menos aproximadamente 10 µg /kg de peso corporal; al menos aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal, o más. Pueden administrarse anticuerpos a dosis menores o menos frecuentes al principio del tratamiento para prevenir el posible efecto secundario.
- En algunas realizaciones, más de un anticuerpo puede estar presente. Tales composiciones pueden contener al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco anticuerpos diferentes (incluyendo polipéptidos) de la invención.
- El anticuerpo también puede administrarse al mamífero en combinación con cantidades eficaces de uno o varios de otros agentes terapéuticos. El anticuerpo puede administrarse secuencialmente o simultáneamente con el uno o varios de otros agentes terapéuticos. Las cantidades de anticuerpo y agente terapéutico dependen, por ejemplo, de qué tipo de fármacos se usan, la afección patológica que está tratándose y el programa y vías de administración, pero generalmente serían inferiores a si cada uno se usara individualmente.
- Tras la administración del anticuerpo al mamífero, la condición fisiológica del mamífero puede monitorizarse de diversas formas muy conocidas para el médico habitual. Los principios de administración anteriores y la dosificación pueden adaptarse para los polipéptidos descritos en el presente documento.
- Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o un polipéptido descrito en el presente documento también puede usarse para la administración y expresión del anticuerpo o el polipéptido en una célula deseada. Es evidente que puede usarse un vector de expresión para dirigir la expresión del anticuerpo. El vector de expresión puede administrarse sistémicamente, intraperitonealmente, intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente, intratecalmente, intraventricularmente, por vía oral, enteralmente, parenteralmente, intranasalmente, dérmicamente, o por inhalación. Por ejemplo, la administración de vectores de expresión incluye administración local o sistémica, que incluye inyección, administración por vía oral, administración por pistola de partículas o cateterizada, y administración tópica. Un experto en la materia está familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener expresión de una proteína exógena *in vivo*. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 6.436.908; 6.413.942; y 6.376.471.
- También puede usarse la administración elegida como diana de composiciones terapéuticas que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención. Se describen técnicas de administración de ADN mediada por receptor en, por ejemplo, Findeis y col., Trends Biotechnol. (1993) 11 :202; Chiu y col., Gene Therapeutics: Methods and Applications of Direct Gene Transfer (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu y col., J. Biol. Chem. (1988) 263:621; Wu y col., J. Biol. Chem. (1994) 269:542; Zenke y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1990) 87:3655; Wu y col., J. Biol. Chem. (1991) 266:338. Las composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido se administran en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para la administración local en un protocolo de terapia génica. También pueden usarse intervalos de concentración de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg y aproximadamente 20 µg a aproximadamente 100 µg de ADN durante un protocolo de terapia génica. Los polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos de la presente invención pueden administrarse usando vehículos de administración génica. El vehículo de administración génica puede ser de origen vírico o no vírico (véanse, generalmente, Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1 :51; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185; y Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6:148). La expresión de tales secuencias codificantes puede inducirse usando promotores endógenos de mamífero o heterólogos. La expresión de la secuencia codificante puede ser tanto constitutiva como regulada.
- Los vectores basados en virus para la administración de un polinucleótido deseado y expresión en una célula deseada son muy conocidos en la técnica. Vehículos basados en virus a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, retrovirus recombinantes (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT nº WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; las patentes de EE.UU. nº 5.219.740; 4.777.127; patente de GB nº 2.200.651; y documento EP 0 345 242), vectores basados en alfavirus (por ejemplo, vectores del virus de Sindbis, virus del bosque de Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR- 1247), virus del río Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) y virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)) y vectores de virus adeno-asociados (AAV) (véase, por ejemplo, las publicaciones PCT nº WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655). También puede emplearse la administración de ADN ligada a adenovirus muertos como se describe en Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147.
- También pueden emplearse vehículos y métodos de administración no víricos que incluyen, pero no se limitan a, ADN policondensado policatiónico ligado a o sin ligar a adenovirus muerto solo (véase, por ejemplo, Curiel, Hum. Gene Ther.

(1992) 3:147); ADN ligado a ligando (véase, por ejemplo, Wu, J Biol. Chem. (1989) 264: 16985); células vehículo de administración de células eucariotas (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.814.482; publicaciones PCT nº WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; y WO 97/42338) y neutralización o fusión de cargas nucleicas con membranas celulares. También puede emplearse ADN desnudo. Métodos de introducción de ADN desnudo a modo de ejemplo se describen en la publicación PCT nº WO 90/11092 y la patente de EE.UU. nº 5.580.859. Liposomas que pueden actuar de vehículos de administración génica se describen en la patente de EE.UU. nº 5.422.120; publicaciones PCT nº WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; y EP 0 524 968. Enfoques adicionales se describen en Philip, Mol Cell Biol (1994) 14:2411, y en Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91 :1581.

**Ejemplos**

10 *Ejemplo 1: Preparación y caracterización de anticuerpos monoclonales que están dirigidos contra MCP-1 N1pE*

El objetivo fue la generación de anticuerpos monoclonales reactivos con pE-P-D-A (SEQ ID NO: 3) que contienen la secuencia de aminoácidos en el extremo amino del péptido MCP-1 N1pE-38 (SEQ ID NO: 4) (que es MCP-1 N1pE empezando los primeros 38 aminoácidos en el extremo N), pero no reactivos con el péptido MCP-1 D3-38 (SEQ ID NO: 5) que es la misma molécula que MCP-1 N1pE-38, pero que carece de pE y P en el extremo amino.

15 Para las inmunizaciones se usó el péptido pE-P-D-A-I-N-A-P-V-C-amida (MCP-1 N1pE-9 humano (SEQ ID NO: 6)). Este antígeno de bajo peso molecular se conjugó con albúmina de suero bovino (BSA de fracción V purificada; Pierce) como proteína transportadora usando sulfo-MBS (Pierce) como reticulador.

Para generar los anticuerpos monoclonales se inmunizaron ratones BALB/c hembra de 8 semanas de edad con el conjugado de péptido-BSA en dos procedimientos de inmunización diferentes como se muestra en la Tabla 1:

20 **Tabla 1:** Protocolo de inmunización para la generación de anticuerpos monoclonales MCP-1 N1pE

Tiempo de inmunización largo (Día)	Tiempo de inmunización corto (Día)	Inyección	Dosis (µg/ratón)	Adyuvante
1	1	Sensibilización (i.p.)	100	Adyuvante TiterMax Gold (Sigma Aldrich, St. Louis, EE.UU.)
30	14	Refuerzo (i.p.)	100	Adyuvante TiterMax Gold (Sigma)
60	21	Refuerzo (i.p.)	50	Adyuvante incompleto de Freund (Sigma)
90	28	Refuerzo (i.p.)	50	Adyuvante incompleto de Freund (Sigma)
126	35	Refuerzo (i.v.)	50	PBS
129	38	Fusión		

Por ejemplo, 100 µg de péptido se corresponden con 50 µl de conjugado de péptido-BSA disuelto en PBS. El conjugado de péptido-BSA se emulsionó en un volumen igual de adyuvante TiterMax Gold (Sigma) o adyuvante incompleto de Freund y se inyectó como emulsión estable intraperitonealmente (i.p.). Tres días antes se realizó el experimento de fusión, cada ratón recibió una dosis total de 50 µg de péptido (25 µl de conjugado de péptido-BSA) disuelto en 25 µl de PBS administrado como inyección i.v.

La presencia del anticuerpo deseado se detectó en los sueros del receptor antes de la dosis de refuerzo final usando el enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) con MCP-1 N1pE-9 humano como antígeno inmovilizado. Los títulos de anticuerpo específico fueron superiores a 1:200000.

30 Para los procedimientos de fusión, 6 x 10<sup>7</sup> células del bazo de los ratones inmunizados y 2 x 10<sup>7</sup> células de la línea de células de mieloma de ratón SP2/0 se incubaron con 1,2 ml de polietilenglicol al 50 % (Sigma) durante 30 segundos a 37 °C. Después de lavar, las células se sembraron en cuatro placas de cultivo celular de 96 pocillos. Se seleccionaron clones híbridos cultivando en medio HAT [medio de cultivo RPMI 1640 (Biochrom, Berlín, DE) complementado con 20 % de suero bovino fetal (PAN Biotech GmbH, Aigenbach, DE) y suplemento HAT (50x; PAN)].

35 Los sobrenadantes de cultivo se cribaron principalmente para anticuerpos IgG específicos de antígeno dos semanas después de la fusión. La presencia de un anticuerpo específico de antígeno en los sobrenadantes de cultivo se midió por su unión a los siguientes péptidos:

- MCP-1 1-9 humano,

- MCP-1 N1pE-38 humano o
- MCP-1 D3-38 humano,

especialmente, unidos directamente a los pocillos de una placa de 96 pocillos. La unión del anticuerpo se cuantificó añadiendo la inmunoglobulina anti-especie relevante (anticuerpo específico de Fc IgG de conejo anti-ratón (HRP), Pierce, Rockford, EE.UU.) a la que está unida una enzima, seguido de un sustrato cromogénico para esa enzima. Se usaron medio de cultivo fresco y una dilución del antisuero de ratón policlonal como controles negativos o positivos.

Las colonias de hibridoma productoras de anticuerpo específico se transfirieron a placas de 24 pocillos para la propagación de células y se probaron de nuevo. Los hibridomas positivos repetidos para MCP-1 N1pE-38 humano y negativo para MCP-1 D3-38 humano se probaron adicionalmente por análisis de SPR (Biacore 3000).

Entonces, los mejores clones que se seleccionaron de aquellos que muestran alta asociación y baja disociación de hMCP1 N1pE-38 unido y que adicionalmente no muestran unión al péptido de control negativo MCP1 D3-38 se clonaron y reclonaron por la técnica de dilución limitante, se caracterizaron y se congelaron. Para la caracterización del isotipo se usó el kit de isotipado de anticuerpo monoclonal de ratón (Roche).

Dos semanas después de la fusión de esplenocitos de un ratón inmunizado Balb/c con el conjugado de MCP-1 N1pE-9 humano-BSA (protocolo de tiempo de inmunización corto), 44 sobrenadantes de cultivo celular dieron principalmente positivo para el péptido MCP-1 N1pE-38 humano, además de para IgG, y negativo para el péptido MCP-1 D3-38 humano. 33 de los 44 híbridos fueron positivos repetidos después de la transferencia a placas de 24 pocillos y también se probaron por análisis de SPR (Biacore 3000). Se clonaron 8 hibridomas por dilución limitante dando 18 clones específicos de los que 8 se volvieron a clonar. Así, se establecieron dos líneas celulares que produjeron anticuerpos con fuerte reactividad por el péptido MCP-1 N1pE-38 humano y buenas características de unión como se demuestra por análisis de SPR (Biacore 3000). Los anticuerpos resultantes se designaron 332-4B8 y 332-4F8 y ambos monoclonales 332-4B8 y 332-4F8 pertenecen a la clase de IgG con el isotipo IgG1.

La fusión de las células del bazo de los ratones Balb/c inmunizados de tiempo largo con células de la línea de células de mieloma de ratón SP2/0 produjo 35 sobrenadantes de cultivo que celular dieron principalmente positivo para MCP-1 N1pE-38 humano, además de para IgG. De de estos 35 hibridomas positivos primarios 15 fueron positivos repetidos después de la transferencia a placas de 24 pocillos y se probaron adicionalmente por análisis de SPR (Biacore 3000). Se clonaron 4 hibridomas dando 8 clones específicos de los que se reclonaron 4. Finalmente, se establecieron dos líneas celulares con una reactividad para el péptido MCP-1 N1pE-38 humano, pero no MCP-1 D3-38 humano, como se demuestra por análisis de SPR (Biacore 3000). Estas dos líneas celulares 348-1D4 y 348-2C9 pertenecen a la clase IgG con el isotipo IgG2b.

De cada uno de los clones anteriores se produjeron 10 mg de anticuerpo purificado en proteína G y se sometieron a experimentos de caracterización adicionales. Las propiedades de los diversos anticuerpos monoclonales para MCP-1 N1pE que se prepararon pueden tomarse a partir de los siguientes ejemplos.

*Ejemplo 2: Análisis de SPR (Biacore 3000) de anticuerpos monoclonales generados dirigidos contra MCP-1 N1pE*

Se caracterizaron los anticuerpos monoclonales purificados en proteína G 332-4B8, 332-4F8, 348-1D4 y 348-2C9 con respecto a sus características de unión a MCP1 N1pE-38 humano por análisis de SPR. Estos análisis se realizaron en un Biacore 3000. Para este uso, un chip CM5 se recubrió con aproximadamente 100 unidades de respuesta (UR) del péptido MCP1 N1pE-38 humano sobre célula de flujo (Fc) 2. Fc 4 se recubrió con 100 UR del péptido MCP1 D3-38 humano. Fc1 y Fc3 se prepararon para la resta del blanco. Los anticuerpos monoclonales se diluyeron en tampón de electroforesis HBS-EP (solución salina tamponada con HEPES + EDTA 3 mM + 0,005 % (v/v) de tensioactivo P20, Biacore, Friburgo, DE) a concentraciones que oscilan de 20 µg/ml a 1 µg/ml. Primero, se determinó una señal basal con HBS-EP, seguido de 180 segundos de aplicación de dilución de anticuerpo, para determinar la asociación de anticuerpo a antígeno. Entonces se inyectó de nuevo HBS-EP puro durante otros 180 s para determinar la velocidad de disociación del anticuerpo correspondiente. Finalmente, el chip CM5 de Biacore se regeneró por una inyección corta de HCl 0,1 M, para eliminar todo el anticuerpo residente.

Las señales del blanco de Fc 1 y Fc 3 se restaron de las señales de Fc 2 y Fc 4, respectivamente.

**Resultados:**

Todos los anticuerpos monoclonales probados dejaron de asociarse a MCP-1 D3-38 humano (datos no mostrados). Con respecto a la asociación a MCP-1 N1pE-38 humano, los anticuerpos monoclonales presentaron diferentes características de unión.

La asociación más fuerte a MCP-1 N1pE-38 humano se demostró por 332-4B8. A una concentración de 20 µg/ml pudieron monitorizarse casi 2000 UR. La disociación fue casi 0 a una concentración de 5 µg/ml, demostrando una unión

extremadamente fuerte de 332-4B8 a su antígeno (Figura 1A).

Por tanto, el anticuerpo monoclonal 332-4F8 mostró una unión muy estable a MCP-1 N1pE-38 humano. Sin embargo, este clon de anticuerpo solo logró aproximadamente 150 UR dentro de 180 segundos de tiempo de asociación. Por otra parte, no se produjo disociación a todas las concentraciones probadas (Figura 1B).

- 5 Los clones de anticuerpo monoclonal 348-2C9 y 348-1D4 mostraron características de unión casi iguales. A 20 µg/ml se monitorizó una señal de asociación de aproximadamente 500 UR para ambos clones. La velocidad de asociación disminuyó con concentraciones menores de anticuerpo. Aunque la disociación también fue observable a 1 µg/ml de anticuerpo, las señales medidas permanecieron muy por encima de la línea basal (Figura 1C + Figura 1D).

- 10 Tomados conjuntamente, los resultados proporcionan evidencia de que todos los anticuerpos monoclonales probados pueden interactuar con su antígeno MCP-1 N1pE correspondiente.

*Ejemplo 3: Análisis de transferencia puntual de anticuerpos monoclonales generados dirigidos contra MCP-1 N1pE*

A continuación se probó si las diferencias en la cinética de unión, como se han determinado por análisis de SPR, también son evidentes en una situación experimental en la que un anticuerpo empleado se deja interactuar con su antígeno durante un periodo prolongado de tiempo.

- 15 Se llevó a cabo un simple protocolo de transferencia puntual para obtener una idea general sobre la sensibilidad de los clones del anticuerpo MCP-1 N1pE hacia el péptido nativo respectivo. Los péptidos MCP-1 N1pE-38 humano y MCP-1 D3-38 humano en concentraciones descendentes (1000 ng – 20 ng) se aplicaron como manchas sobre pequeños trozos de membranas de nitrocelulosa. Para el análisis, las membranas se bloquearon durante dos horas con TBST-M (=TBST (solución salina tamponada con Tris + 0,05 % de Tween-20) + 5 % de leche desnatada) a temperatura ambiente con  
20 agitación suave. Las membranas se incubaron durante la noche a 4 °C sobre una plataforma de balanceo con los clones de anticuerpo para MCP-1 N1pE individuales diluidos a 1 µg/ml en volúmenes iguales de TBST-M. Se usó anticuerpo anti-ratón secundario conjugado con fosfatasa alcalina para la detección de señales, siguiendo procedimientos convencionales.

Resultados:

- 25 Como se observa en la Figura 2A - 2D, todos los clones de anticuerpo probados revelaron resultados casi iguales en el análisis de transferencia puntual. Las concentraciones del péptido MCP-1 N1pE-38 de hasta 20 ng fueron claramente detectadas por los anticuerpos monoclonales purificados por proteína G 332-4B8, 332-4F8, 348-1D4 y 348-2C9. Ninguno de los clones de anticuerpo generó reactividad cruzada con MCP-1 D3-38.

*Ejemplo 4: Análisis PepSpot de anticuerpos monoclonales generados dirigidos contra MCP-1 N1pE*

- 30 Para determinar la especificidad y selectividad de los clones de anticuerpo para MCP-1 N1pE en más detalle, se realizó análisis PepSpot.

Se prepararon membranas PepSpot correspondientes por JPT Peptide Technologies GmbH, Berlín (JPT). Sobre estas membranas, se inmovilizaron péptidos con las secuencias de aminoácidos indicadas (véase la Figura 3; Z representa pE) a una concentración de 1 µg / mancha.

- 35 Para el análisis, las membranas se bloquearon durante dos horas con TBST-M (=TBST + 5 % de leche desnatada) a temperatura ambiente con agitación suave. Las membranas se incubaron durante la noche a 4 °C sobre una plataforma de balanceo con los clones de anticuerpo MCP-1 N1pE individuales diluidos a 1 µg/ml en volúmenes iguales de TBST-M. Se usó anticuerpo anti-ratón secundario conjugado con fosfatasa alcalina para la detección de señales, siguiendo procedimientos convencionales.

- 40 Resultados:

Como se observa en la Figura 3, los cuatro clones del anticuerpo probados fueron altamente selectivos para péptidos MCP-1 N1pE. Se obtuvieron fuertes señales sobre manchas que contenían los péptidos MCP-1 N1pE a partir de los 4 primeros aminoácidos de MCP-1 N1pE (secuencias subrayadas).

- 45 Además, las manchas con péptidos a partir de los tres primeros aminoácidos de MCP-1 N1pE (manchas 10, 13 y 14) fueron claramente reconocidas por los cuatro clones del anticuerpo. Los anticuerpos dejaron de reconocer un péptido a partir de solo dos de los aminoácidos del extremo amino de MCP-1 N1pE (mancha 12). Los anticuerpos también dejaron de reconocer manchas de péptidos a partir de aminoácidos diferentes de pE (Z). En el caso de la mancha 3, no puede excluirse la formación espontánea de pE de Q. Por tanto, las señales obtenidas con este péptido reflejan lo más probablemente la unión del anticuerpo a pE espontáneamente formado.

Tomados conjuntamente, los resultados demuestran que los cuatro clones del anticuerpo para MCP-1 N1pE requieren los 3 - 4 primeros aminoácidos de MCP-1 N1pE para unirse al antígeno correspondiente.

*Ejemplo 5: Examen de la reactividad cruzada con otros péptidos que poseen residuos N1pE por análisis de SPR*

5 Con el fin de determinar la selectividad de los anticuerpos anti-MCP-1 N1pE, se analizó la reactividad cruzada con otros péptidos humanos, que poseen un residuo pE del extremo N por resonancia de plasmones superficiales.

Por tanto, los siguientes péptidos o las regiones del extremo N se inmovilizaron sobre la superficie de chips CM5: MCP-1, MCP-2, gastrina grande, gonadoliberina, neurotensina, orexina A, fibronectina, colágeno 1 y TRH. Como control positivo también se analizó la unión a MCP-1 N1pE-38. Los anticuerpos monoclonales 332-4B8, 332-4F8, 348-1D4 y 348-2C9 se diluyeron en HBS-EP (Biacore) hasta 25 µg/ml. Se observó reactividad cruzada usando Biacore 3000 con varios chips 10 CM5, sobre los que se inmovilizaron los péptidos respectivos. El sistema se ejecutó con 20 µl/min. Los efectos del volumen medidos y las reacciones inespecíficas con la superficie del chip se corrigieron por resta de la señal de la celda de flujo 2, 3 ó 4, en la que se inmovilizaron los péptidos probados, con la celda de flujo vacía 1. La asociación (9 min) se obtuvo mediante la inyección de 180 µl de los clones de anticuerpo. La disociación se observó durante 9 min. El resto de las moléculas de anticuerpo se eliminó mediante inyección de 5 µl de HCl 0,1 M. Para cada interacción del anticuerpo con 15 los diferentes péptidos se registró la asociación y disociación. Se determinó la reactividad cruzada por evaluación de la fase de asociación referente a la tasa y señal al final.

La Tabla 2 muestra que los anticuerpos monoclonales son específicos para el epítipo MCP-1 N1pE. No se observó reactividad cruzada con los péptidos analizados.

20 **Tabla 2:** Investigación de la reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales 332-4B8, 332-4F8, 348-1D4 y 348-2C9 con varios péptidos humanos que cubren un residuo pGlu del extremo N (pE) por análisis de SPR.

Péptidos de pGlu	% de reactividad cruzada
MCP-1 (1-38)	100
MCP-2	<1
MCP-1 (2-38)	<1
MCP-1 (3-38)	<1
Abeta pE3-40	<1
Gastrina grande	<1
Gonadoliberina	<1
Neurotensina	<1
Orexina A	<1
Fibronectina	<1
Colágeno 1	<1
TRH	<1

*Ejemplo 6: Determinación de valores de  $K_D$  de anticuerpos monoclonales dirigidos contra MCP-1 N1pE*

Con el fin de analizar la cinética de unión de los clones del anticuerpo MCP-1 N1pE a hMCP-1 N1pE-38, se han determinado la constante de asociación K, constante de disociación  $K_D$ , entalpía de reacción  $\Delta H$ , además de la entropía de reacción  $\Delta S$ .

25 Las afinidades de unión de los anticuerpos anti-MCP1 N1pE 348-1D4 y 332-4B8 por el antígeno hMCP-1 N1pE-38 se determinaron usando el microcalorímetro VP-ITC (MicroCal). Ambos clones del anticuerpo, además del péptido hMCP-1 N1pE-38, se dializaron contra NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM, EDTA 2 mM a pH 7,4 durante la noche a 4 °C para garantizar las mismas condiciones de tampón y evitar calor de fondo por acontecimientos de protonación. Después, la concentración de los anticuerpos y el péptido se calculó a partir de la absorbancia a 280 nm y el coeficiente 30 de extinción respectivo. Para el experimento de valoración con el clon 348-1D4, se usaron anticuerpo y hMCP-1 N1pE-38 a concentraciones de 4,38 µM y 147 µM, respectivamente. Para el experimento de valoración con el clon 332-4B8, el anticuerpo y hMCP-1 N1pE-38 se usaron a concentraciones de 1,86 µM y 64,3 µM, respectivamente. El calor de unión se registró a 20 °C por la valoración de 29 inyecciones de 10 µl de antígeno en la disolución de anticuerpo. Con el fin de 35 evaluar el desarrollo de calor originado por la dilución del péptido hMCP-1 N1pE-38, este valor se determinó por valoración en el tampón de diálisis usando condiciones y parámetros del instrumento definidos. La representación de datos se produjo por el software MicroCal ORIGIN. El calor de unión calculado se corrigió por el calor originado por dilución del antígeno. La curva resultante se ajustó por el modelo de unión "One Set of Sites". Con este modelo pueden

calcularse la estequiometría, constante de asociación, entalpía de reacción y entropía de reacción.

Resultados:

La Figura 16 muestra las curvas de ajuste resultantes y los valores calculados para la estequiometría, constante de asociación, entalpía de reacción y entropía de reacción. Además, la Tabla 3 da una visión general sobre los datos obtenidos.

**Tabla 3:** Parámetro obtenido para la estequiometría, constante de asociación y de disociación, entalpía de reacción y entropía de reacción después de la valoración del antígeno hMCP-1 N1pE-38 para los anticuerpos monoclonales 348-1D4 y 332-4B8.

	<b>348-1D4</b>	<b>332-4B8</b>
<b>Estequiometría (N)</b>	1,98	1,60
<b>Constante de asociación (K) en M<sup>-1</sup></b>	$3,81 \times 10^6$	$4,27 \times 10^6$
<b>Constante de disociación (K<sub>D</sub>) en M</b>	$2,6 \times 10^{-7}$	$2,34 \times 10^{-7}$
<b>Entalpía de reacción (<math>\Delta H</math>) en cal/mol</b>	$-1,123 \times 10^4$	$-1,823 \times 10^4$
<b>Entropía de reacción (<math>\Delta S</math>) en cal/mol*K</b>	-8,20	-31,8

*Ejemplo 7: Detección de MCP-1 N1pE humano recombinante en un ELISA usando anticuerpos monoclonales dirigidos contra MCP-1 N1pE*

Con las técnicas presentadas hasta la fecha, podría demostrarse claramente la detección selectiva de MCP-1 N1pE. Por tanto los clones del anticuerpo presentados también se probaron para su aplicabilidad en herramientas para posibles implicaciones de diagnóstico, como ELISA.

Por consiguiente, se llevó a cabo un protocolo de ELISA que permitió la detección de hMCP-1 N1pE recombinante.

Para capturar MCP-1 humana, se inmovilizó antisuero policlonal comercialmente disponible (anti-hMCP1-AF de cabra (R&D Systems, Mineápolis, EE.UU.)) como anticuerpo de captura que se une específicamente a MCP-1 humana en placas de microtitulación de 96 pocillos de poliestireno. El anticuerpo de captura no unido se eliminó lavando de la placa. Después de una etapa de bloqueo, hMCP-1 N1pE recombinante diluido en tampón de bloqueo se añadió a los pocillos. Después de un periodo de incubación de 2 horas a temperatura ambiente, las placas se lavaron al menos tres veces con TBS-T. Para la detección, clones del anticuerpo para MCP-1 N1pE (332-4B8, 348-1D4, 348-2C9, respectivamente), junto con anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP, se diluyeron en tampón de bloqueo, se añadieron a la placa de microtitulación y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras varios lavados con TBS-T se realizó una reacción de color con el sustrato de HRP comercialmente disponible TMB (SureBlue Reserve TMB Microwell Peroxidase Substrate (1 componente) (KPL, Gaithersburg, EE.UU.)) (incubación de 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad) y posteriormente se detuvo mediante la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2 N. La absorción se determinó por un lector de placas Tecan Sunrise.

Resultados:

Los anticuerpos anti-MCP-1 332-4B8, 348-1D4 y 348-2C9 pueden detectar MCP-1 humana recombinante en un modo dependiente de la concentración. Así, los clones del anticuerpo 348-2C9 y 348-1D4 resultaron ser mucho más sensibles en comparación con 332-4B8 (Figura 4).

*Ejemplo 8: Detección de MCP-1 N1pE por ELISA en suero humano usando anticuerpos monoclonales dirigidos contra MCP-1 N1pE*

Como hMCP-1 N1pE recombinante puede detectarse cuantitativamente en un ELISA usando los anticuerpos anti-MCP-1 N1pE monoclonales de la presente invención, se probó la detección de hMCP-1 N1pE nativo en suero humano.

El protocolo de ELISA se corresponde con el Ejemplo 7, excepto el uso de SBF, 0,05 % de Tween, 10 % de SBF para etapas de bloqueo y de dilución.

Resultados:

Todos los clones del anticuerpo para MCP-1 N1pE probados generaron señales muy fuertes en el sistema de ELISA establecido. Las señales disminuyeron con el factor de dilución de la muestra de suero (Figura 5; Tabla 4).

**Tabla 4:** Detección de MCP-1 N1pE humano de suero humano por anticuerpos monoclonales 332-4B8, 348-1D4 y 348-2C9 en ELISA

Dilución de suero humano			Clon de anticuerpo para MCP-1 N1pE
1:5	1:10	1:20	
Absorción/DE	Absorción/DE	Absorción/DE	
2,1 / 0,054	1,5 / 0,048	0,9 / 0,008	<b>332-4B8</b>
2,4 / 0,012	2,1 / 0,048	1,4 / 0,033	<b>348-1D4</b>
2,5 / 0,036	2,2 / 0,042	1,4 / 0,034	<b>348-2C9</b>

Aunque el clon 332-4B8 demostró características de unión más favorables en el análisis de SPR (Biacore), los clones 348-1D4 y 348-2C9 dieron mayores señales en el ELISA. Según los datos obtenidos, todos los clones de anticuerpo probados son muy adecuados para aplicaciones de ELISA.

Adicionalmente, estos datos demuestran que MCP-1 N1pE es detectable también en suero humano de individuos sanos.

5 *Ejemplo 9: Enriquecimiento y recuperación de hMCP-1 N1pE en suero humano*

Se realizaron experimentos de enriquecimiento y de recuperación con el fin de validar la detección cuantitativa de hMCP1 N1pE en suero humano.

10 El protocolo de ELISA se corresponde con el Ejemplo 8, para la detección de hMCP-1 N1pE se usó el anticuerpo 348-2C9. Para la validación del enriquecimiento y la recuperación, se enriquecieron diversos niveles de hMCP-1 N1pE recombinante en suero humano. La recuperación se calculó restando el valor de hMCP-1 N1pE medido en la muestra de suero sin enriquecer de las muestras enriquecidas.

Resultados:

La Tabla 5 muestra datos de enriquecimiento y de recuperación en suero humano obtenidos con el anticuerpo 348-2C9. Se encontró una recuperación péptidos nMCP-1 N1pE enriquecidos del 66 %-79,4 %.

15 **Tabla 5:** Enriquecimiento y recuperación de hMCP-1 N1pE en suero humano. Esta tabla muestra el nivel de enriquecimiento esperado en comparación con las concentraciones de hMCP-1 N1pE observadas.

Nivel de enriquecimiento esperado de hMCP1 N1pE [ng/ml]	Nivel de enriquecimiento observado de hMCP1 N1pE [ng/ml]	Nivel de enriquecimiento observado de hMCP1 N1pE en %
6	4,76	79,37
3	2,09	69,80
1,5	1,05	69,81
0,75	0,50	66,00
0,38	0,26	69,89

Estos datos confirman que el anticuerpo monoclonal 348-2C9 puede usarse para la detección cuantitativa de hMCP1 N1pE en suero humano.

20 *Ejemplo 10: Detección de MCP-1 N1pE humano en sobrenadantes de cultivo celular de células NHDF estimuladas por ELISA*

Tras un estímulo inflamatorio, la expresión de hMCP-1 se potencia en fibroblastos dérmicos normales humanos (NHDF). Por tanto, puede suponerse que también el nivel de MCP-1 N1pE es elevado. Si esto es cierto, la cantidad de MCP-1 N1pE debe aumentar después de la aplicación de oncostatina M (OSM) e interleucina 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) a NHDF.

25 Para demostrar esto, los sobrenadantes de cultivo celular de NHDF estimulados con OSM e IL1 $\beta$  se sometieron a un análisis de ELISA como se describe en el Ejemplo 7. El anticuerpo 348-1D4 se usó para la detección de hMCP1 N1pE. Los NHDF se han estimulado durante 14 días y se analizaron en diferentes momentos de tiempo con el fin de examinar la dependencia del tiempo de la secreción de hMCP-1 N1pE.

Resultados:

30 Tras el estímulo inflamatorio de la aplicación de OSM e IL1 $\beta$ , la cantidad de hMCP1 N1pE aumenta de una manera dependiente del tiempo (Figura 6). Estos datos muestran que hMCP-1 N1pE también puede detectarse cuantitativamente

en sobrenadante de cultivo celular de NHDF.

*Ejemplo 11: Detección de MCP-1 N1pE humano en sobrenadante de cultivo celular de la línea celular de leucemia monocítica aguda humana (THP1) estimulada con LPS en presencia del inhibidor de QC QCI*

5 Como se demuestra en los Ejemplos 8-10, hMCP-1 N1pE nativo puede detectarse cuantitativamente en suero humano, además de en sobrenadantes de cultivo celular por ELISA, usando los anticuerpos anti-hMCP-1 N1pE monoclonales de la presente invención. Como la glutaminil ciclasa (QC) es un requisito previo para la formación de MCP-1 N1pE al nivel celular, la inhibición de QC debe producir, por consiguiente, la disminución del nivel de MCP-1 N1pE.

10 Para demostrar esto, la línea celular de leucemia monocítica aguda humana (THP1) se estimuló 24 h con LPS en ausencia o presencia de concentraciones crecientes del inhibidor de QC QCI. Los sobrenadantes de cultivo celular se sometieron a análisis de ELISA como se describe en el Ejemplo 7. El anticuerpo 348-1D4 se usó para la detección de hMCP1 N1pE.

Resultados:

La Figura 7 muestra que la cantidad de hMCP-1 N1pE disminuye con concentraciones crecientes de inhibidor de QC en sobrenadante de cultivo celular de células THP1.

15 *Ejemplo 12: Detección de MCP-1 N1pE de ratón recombinante en un ELISA usando anticuerpos monoclonales dirigidos contra MCP-1 N1pE*

El Ejemplo 7 muestra la detección dependiente de la concentración de MCP-1 N1pE humano recombinante por los anticuerpos anti-MCP-1 332-4B8, 348-1D4 y 348-2C9. Como los cuatro aminoácidos del extremo N de MCP-1 de ratón y humana son homólogos, se analizó adicionalmente la detección cuantitativa de MCP-1 de ratón recombinante.

20 Por consiguiente, se llevó a cabo un protocolo de ELISA que permitió la detección de MCP-1 N1pE de ratón recombinante.

25 Para capturar MCP-1 de ratón, antisuero policlonal comercialmente disponible (anti-mJE de conejo (Peprotech, Rocky Hill, EE.UU.) como anticuerpo de captura que se une específicamente a MCP-1 de ratón se inmovilizó en placas de microtitulación de 96 pocillos de poliestireno. El anticuerpo de captura no unido se eliminó lavando de la placa. Después de una etapa de bloqueo, mMCP-1 N1pE recombinante diluido en tampón de bloqueo se añadió a los pocillos. Después de un periodo de incubación de 2 horas a temperatura ambiente, las placas se lavaron al menos tres veces con TBS-T. Para la detección, clones del anticuerpo para MCP-1 N1pE (332-4B8, 348-1D4, 348-2C9, respectivamente) junto con anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP se diluyeron en tampón de bloqueo, se añadieron a la placa de microtitulación y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras varias etapas de lavado con TBS-T se realizó una reacción de color con el sustrato de HRP comercialmente disponible TMB (SureBlue Reserve TMB Microwell Peroxidase Substrate (1 componente) (KPL, Gaithersburg, EE.UU.) (incubación de 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad) y posteriormente se detuvo mediante la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2 N. La absorción se determinó por un lector de placas Tecan Sunrise.

Resultados:

35 Los anticuerpos anti-MCP-1 332-4B8, 348-1D4 y 348-2C9 pueden detectar MCP-1 de ratón recombinante en un modo dependiente de la concentración. Similar a los resultados obtenidos con hMCP-1 humana, los clones de anticuerpo 348-2C9 y 348-1D4 resultaron ser mucho más sensibles en comparación con 332-4B8 (Figura 8).

*Ejemplo 13: Detección de MCP-1 N1pE de ratón en sobrenadantes de cultivo celular de una línea celular de macrófagos murinos estimulados RAW 264.7 por ELISA*

40 Tras un estímulo inflamatorio, la expresión de mMCP-1 se potencia en células RAW 264.7. Por tanto, puede asumirse que también es elevado el nivel de MCP-1 N1pE. Si esto es cierto, la cantidad de mMCP-1 N1pE debe aumentar después de la aplicación de LPS.

45 Para demostrar esto, los sobrenadantes de cultivo celular de RAW 264.7 estimulado con LPS se sometieron a un análisis de ELISA como se describe en el Ejemplo 12. El anticuerpo 348-2C9 se usó para la detección de mMCP1 N1pE. Células RAW 264.7 se han estimulado durante 24 h con 10 ng de LPS.

Resultados:

Tras el estímulo inflamatorio de la aplicación de LPS, la cantidad de mMCP1 N1pE aumenta tremendamente (Figura 9). Estos datos muestran que mMCP-1 N1pE también puede detectarse cuantitativamente en sobrenadante de cultivo celular de células RAW 264.7.

*Ejemplo 14: Detección de MCP-1 N1pE murino por ELISA en sobrenadantes de cultivo celular de la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados con LPS en presencia del inhibidor de QC QCI usando anticuerpo monoclonal 348-2C9*

5 Como se demuestra en el Ejemplo 13, el nivel de mMCP-1 N1pE aumenta respectivamente después de un estímulo inflamatorio como LPS. Podría mostrarse adicionalmente en el Ejemplo 11 que los anticuerpos anti-MCP-1 N1pE pueden usarse para demostrar que el nivel de MCP-1 N1pE humano disminuye con concentraciones crecientes de QCI. Ahora se ha examinado adicionalmente si este efecto también puede detectarse en la línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7.

10 Se estimuló la línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7 con LPS en ausencia o presencia de concentraciones crecientes del inhibidor de QC QCI. Los sobrenadantes de cultivo celular se sometieron a análisis de ELISA como se describe en el Ejemplo 12. Para la detección se usó el anticuerpo 348-2C9.

Resultados:

15 Como se ha propuesto antes, el nivel de mMCP-1 N1pE disminuye en presencia del inhibidor de QC QCI en macrófagos de ratón estimulados con LPS. La disminución de la señal es estrictamente dependiente de la concentración de QCI (véase Figura 10).

*Ejemplo 15: Detección de MCP-1 N1pE murino en suero de ratones sanos frente a ratones tratados con LPS por ELISA*

20 Los Ejemplos 12-14 muestran la detección cuantitativa de mMCP1 N1pE recombinante, además de mMCP1 N1pE nativo en sobrenadante de cultivo celular por ELISA. Como se ha presentado en los Ejemplos 8-9, los anticuerpos anti-MCP-1 N1pE también pueden usarse para la detección de MCP-1 N1pE en suero humano. Además, el nivel de MCP-1 N1pE se ha determinado ahora en suero de ratón.

El protocolo de ELISA se corresponde con el Ejemplo 12, excepto el uso de SBF, 0,05 % de Tween, 10 % de SBF para las etapas de bloqueo y de dilución y el uso del anticuerpo 348-2C9 para la detección.

Resultados:

25 El nivel de mMCP-1 N1pE en suero de ratón aumenta por estimulación con LPS, dependiendo del periodo de tiempo de estimulación de 400 pg/ml hasta 900 ng/ml (Figura 11). Este experimento muestra que el anticuerpo 348-2C9 también puede usarse para la detección cuantitativa de mMCP-1 N1pE en suero murino.

*Ejemplo 16: Examen de linealidad de la dilución para la detección de mMCP-1 N1pE en líquido de lavado peritoneal murino por ELISA*

30 Con el fin de examinar la aplicabilidad de los anticuerpos anti-MCP-1 N1pE en el ELISA establecido, se analizó la linealidad de la dilución de muestras de lavado peritoneal de ratones tratados con tioglicolato.

El protocolo de ELISA se corresponde con el Ejemplo 12. Para la detección, se usó el anticuerpo 348-2C9. Para determinar la linealidad del ensayo, cada muestra se diluyó en serie con bloqueante de ELISA para producir valores que están dentro del intervalo de ensayo.

Resultados:

35 La Figura 12 representa que el análisis de diferentes diluciones de muestra produce niveles de mMCP-1 N1pE similares con desviaciones de cómo máximo el 15 %. Este experimento demuestra que los anticuerpos anti-MCP-1 N1pE pueden usarse para el análisis del nivel de MCP-1 N1pE en líquido de lavado peritoneal de ratón.

*Ejemplo 17: Uso de anticuerpos anti-MCP-1 N1pE en análisis de transferencia Western y comparación con datos obtenidos por ELISA*

40 Los Ejemplos 3-4 revelan que los anticuerpos 332-4F8, 332-4B8, 348-1D4 y 348-2C9 reconocen al menos los 4 primeros aminoácidos de MCP-1 N1pE en análisis de transferencia puntual y PepSpot. En este experimento, debe probarse si los anticuerpos pueden usarse para la detección de MCP-1 N1pE de ratón nativo en sobrenadante de cultivo celular de RAW 264.7. Además, debe probarse si los datos de transferencia Western obtenidos pueden confirmar los datos obtenidos por ELISA.

45 Para el análisis de transferencia Western, se sometieron sobrenadantes de cultivo celular de células RAW 264.7 a electroforesis en gel de SDS. Las proteínas separadas se transfirieron eléctricamente a una membrana de nitrocelulosa. Después de bloquear la membrana durante dos horas con TBST-M a temperatura ambiente, se produjo la incubación del anticuerpo durante la noche a 4 °C con el clon anti-MCP-1 N1pE 332-4B8 y un anticuerpo que reconoce MCP-1 total (anti-MCP-1 de cabra, R&D Systems) diluido a 1 µg/ml en TBST-M. Se usó anticuerpo de cabra anti-ratón secundario

conjugado con peroxidasa de rábano picante para la detección de señales, siguiendo procedimientos convencionales. El protocolo de ELISA se corresponde con el Ejemplo 14.

Resultados:

5 Como se muestra en la Figura 13B, no hay cambio en la intensidad de señales de transferencia Western generadas por el anticuerpo de cabra anti-MCP-1 de ratón para la detección de mMCP-1 total. Sin embargo, la señal de transferencia Western de mMCP-1 N1pE es dependiente de la concentración (Figura 13A) y se correlaciona con los datos de ELISA correspondientes (Figura 13C), que muestran la cantidad de mMCP-1 N1pE. Estos datos muestran, por una parte, que el anticuerpo anti-MCP-1 N1pE 332-4B8 puede usarse para análisis de transferencia Western. Además, se confirmó la exactitud de los datos de ELISA por análisis de transferencia Western.

10 *Ejemplo 18: Detección de MCP-1 N1pE de rata recombinante en un ELISA usando anticuerpos monoclonales dirigidos contra MCP-1 N1pE*

El Ejemplo 12 muestra la detección dependiente de la concentración de MCP-1 N1pE de ratón recombinante por los anticuerpos anti-MCP-1 332-4B8, 348-1D4 y 348-2C9. Las secuencias del extremo N de MCP-1 de ratón y de rata son homólogos. Por tanto, se analizó la detección cuantitativa de MCP-1 de rata recombinante.

15 Por consiguiente, se llevó a cabo un protocolo de ELISA que permitió la detección de MCP-1 N1pE de rata recombinante.

Para capturar MCP-1 de rata, se diluyó antisuero policlonal comercialmente disponible (policlonal de conejo para MCP-1 [LS-C54182/13136], LifeSpan Biosciences, Seattle, EE.UU.) como anticuerpo de captura que se une específicamente a MCP-1 de rata con PBS a 250 ng/ml y se inmovilizó en placas de microtitulación de 96 pocillos de poliestireno. El anticuerpo de captura no unido se eliminó lavando la placa. Después de una etapa de bloqueo, se añadió rMCP-1 N1pE recombinante diluido en PBS, 0,05 % de Tween, 10 % de FBS a los pocillos. Después de un periodo de incubación de 2 horas a temperatura ambiente, las placas se lavaron al menos tres veces con TBS-T. Para la detección, el clon del anticuerpo para MCP-1 N1pE 348-2C9, junto con anticuerpo anti-ratón conjugado con HRP, se diluyeron en PBS, se añadieron a la placa de microtitulación 0,05 % de Tween, 10 % de SBF y se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Tras varios lavados con TBS-T se realizó una reacción de color con el sustrato de HRP comercialmente disponible TMB (SureBlue Reserve TMB Microwell Peroxidase Substrate (1 componente) (KPL, Gaithersburg, EE.UU.) (incubación de 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad) y posteriormente se detuvo mediante la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,2 N. La absorción se determinó por un lector de placas Tecan Sunrise.

Resultados:

30 El anticuerpo anti MCP-1 348-2C9 puede detectar MCP-1 de rata recombinante en un modo dependiente de la concentración en un ELISA (Figura 14).

*Ejemplo 19: Enriquecimiento y recuperación de rMCP-1 N1pE en suero de rata*

El Ejemplo 18 muestra la detección cuantitativa de MCP-1 de rata recombinante por el anticuerpo 348-2C9 en un ELISA. Con el fin de demostrar si rMCP-1 N1pE también puede detectarse en suero de rata y para validar este método de ELISA, se realizaron experimentos de enriquecimiento y de recuperación.

35 El protocolo de ELISA se corresponde con el Ejemplo 18; para la validación del enriquecimiento y recuperación se enriquecieron diversos niveles de MCP-1 N1pE de rata recombinante en suero de ratas tratadas con LPS. La recuperación se calculó restando el valor de rMCP-1 N1pE medido en la muestra de suero sin enriquecer de las muestras enriquecidas.

Resultados:

40 La Tabla 6 muestra datos de enriquecimiento y de recuperación en suero de rata obtenidos con el anticuerpo 348-2C9. Se encontró una recuperación de péptidos rMCP-1 N1pE enriquecidos del 65,5 %-96,2 %.

**Tabla 6:** Enriquecimiento y recuperación de rMCP-1 N1pE en suero de ratas estimuladas con LPS. Esta tabla muestra el nivel de enriquecimiento esperado en comparación con concentraciones de rMCP-1 N1pE observadas.

Nivel de enriquecimiento esperado de rMCP1 N1pE [ng/ml]	Nivel de enriquecimiento observado de rMCP1 N1pE [ng/ml]	Nivel de enriquecimiento observado de rMCP1 N1pE en %
2000	1485	74,23 %
1000	962	96,20 %
500	327	65,49 %
250	212	84,83 %

Estos datos confirman que el anticuerpo monoclonal 348-2C9 puede usarse para la detección cuantitativa de MCP1 N1pE de rata en suero de rata.

*Ejemplo 20: Secuenciación de regiones variables del anticuerpo*

Cultivo de células de hibridoma:

- 5 Se cultivaron células de hibridoma en D-MEM (+ L-glutamina, + piruvato de Na, 4,5 g/l de glucosa, Gibco) con la adición de 15 % de SBF, 1 % de MEM-NEA (aminoácidos no esenciales, Gibco), 50 µg/ml de gentamicina (Gibco) y β-mercaptoetanol 50 µM a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. El subcultivo se produjo después de 3-4 días dependiendo de la densidad celular. Las células se sembraron a una concentración de 0,5 x 10<sup>6</sup> células/ml, el fraccionamiento se produjo a una densidad celular de 2-5 x 10<sup>6</sup> células/ml.

- 10 Síntesis de ADNc y transcripción inversa:

Se aisló ARN total de 2 x 10<sup>6</sup> células según el kit de aislamiento NucleospinRNA (Macherey-Nagel). Se aplicaron 100 ng de ARN para la síntesis de ADNc usando el cebador Oligo (dT)<sub>15</sub> (Promega) y transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen).

Amplificación por PCR de regiones variables de la cadena pesada y ligera:

- 15 Se amplificaron regiones variables de la cadena pesada del ADNc de molde usando la ADN polimerasa Phusion™ High-Fidelity (NEW ENGLAND BioLabs) con el cebador MHCG1 (en el caso del clon 5-5-6 y 6-1-6) y MHCG2b (clon 17-4-3 y 24-2-3) en combinación con cebadores MHV1-12. Para la amplificación de regiones variables de la cadena ligera se usaron el cebador MKC en combinación con los cebadores MKV1-MKV11.

Clonación de productos de PCR en pJET1.2:

- 20 Se clonaron regiones variables de la cadena pesada y ligera, se amplificaron por PCR, en pJET1.2/vector como según el protocolo de CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas). La secuenciación se produjo con cebadores de secuenciación pJET1.2. Las secuencias de cebadores se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7:** Secuencias de cebadores

Cebador	Secuencia	SEQ ID NO.
MKV1	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTG	7
MKV2	ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGTG	8
MKV3	ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCTGGS GTT G	9
MKV4	ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGMWTC TT G	10
MKV5	ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTTC	11
MKV6	ATGAGGTKCYTYGYTSAGYTYCTGRGG	12
MKV7	ATGGGCWTC AAGATGGAGTCACAKWYYCWGG	13
MKV8	ATGTGGGGAYCTKTTYCMMTTTTTCAATTG	14
MKV9	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG	15
MKV10	ATGTATATATGTTTGTTGTCTATTTCT	16

(continuación)

Cebador	Secuencia	SEQ ID NO.
MKV11	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC	17
MKC	ACTGGATGGTGGGAAGATGG	18
MHV1	ATGAAATGCAGCTGGGGATOSTTCTTC	19
MHV2	ATGGGATGGAGCTRTATGATOSYTCTT	20
MHV3	ATGAAGWTGTGGTTAAACTGGGTTTTT	21
MHV4	ATGRACCTTGGGYTCAGCTTGRITTT	22
MHV5	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCCCTT	23
MHV6	ATGGCTTGTCYTRGSGCTRCTCTTCTGC	24
MHV7	ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT	25
MHV8	ATGAGAGTGCTGATTCTTTTTGTG	26
MHV9	ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATTCCTG	27
MHV10	ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCCTG	28
MHV11	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG	29
MHV12	ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCTG	30
MHCG1	CAGTGGATAGACAGATGGGGG	31
MHCG2b	CAGTGGATAGACTGATGGGGG	32

Resultados:

Se identificaron las siguientes secuencias:

Clon 1D4

5 *Parte variable de la cadena ligera, secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 33)*

ATGGAGTCACAGTTTCTGTTTCTGTTAGTGCTCTGGATTTCGGGAAACCAACGGTGATGTTGTGA  
 TGACCCAGACTCCCCTCAGTTTGTTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTC  
 AAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGCTGGAAAGACATATTTGAGTTGGTTGTTACAGAGGCCAGGC  
 CAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCA  
 CTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGG  
 AGTTTATTACTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAA  
 ATCAAACGGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGT

*Parte variable de la cadena ligera, secuencia de proteínas (SEQ ID NO: 34)*

MESQFLFLVLVWIRETNGDVVMTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSAGKTYLSWLL  
 QRPQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGFHPWT  
 FGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSS

10 *Parte variable de la cadena pesada, secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 35)*

ATGGAATGGAGCGGGTCTTTCTCTTCCTCTTGTTCAGGAACTGCAGGTGTCCACTCTGAG  
 GTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCC  
 TGTAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACTACTACATGGACTGGGTGAAGCAGAGCCAT  
 GGAGAAAAGCTTTGAGTGCATTGGACGTGTTAATCCTTACAATGGTGGTACTAGCTACAAC  
 CAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTTGACAAGTCCCTCCAGCACAGCCTACATG  
 GAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGGCTCGGTAGT  
 AGCTACCGCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACAACACCCCCA  
 TCAGTCT

*Parte variable de la cadena pesada, secuencia de proteínas (SEQ ID NO: 36)*

MEWSGVFLFLLSGTAGVHSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFDDYMDWVKQSH  
GESFECIGRVNPNYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARLGS  
SYRWGQGTTLTVSSAKTTPPSV

**Clon 2C9**

*Parte variable de la cadena ligera, secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 37)*

ATGGTGTCCCTCAGCTCAGTTCCTGTTTCTGTTAGTGCTCTGGATTCGGGAAACCAACGGT  
GATGTTGTGATGACCCAGACTCCCCCTCAGTTTGTTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTCC  
ATCTCTTGCAAGTCAAGTCAAGTCAAGCCTCTTAGATAGTGCTGGAAAAGACATATTTGAGTTGG  
TTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGAC  
TCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTGAAAATC  
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTACTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCG  
TGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGAAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTA  
TCCATCTTCCCACCATCCAGT

5

*Parte variable de la cadena ligera, secuencia de proteínas (SEQ ID NO: 38)*

MVSSAQFLFLLVLWIRETNQDVMVTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLDGKTYLSW  
LLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGHFP  
WTFGGGKLEIKRADAAPTVSIFPPSS

*Parte variable de la cadena pesada, secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 39)*

ATGGAATGGAGCGGGATCTTTATCTTCCTCTTGTTCAGGAAGTGCAGGTGTCCACTCTGAG  
GTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCC  
TGTAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACTACTACATGGACTGGGTGAAGCAGAGCCAT  
GGAGAAAGCTTTGAGTGCATTGGACGTGTTAATCCTTACAATGGTGGTACTAGCTACAAC  
CAGAAGTTCAGGGCAAGGCCACATGACTGTTGACAAGTCTCCAGCACAGCCTACATG  
GAGCTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGGCTCGGTAGT  
AGCTACCGCTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACAACACCCCA  
TCAGTCTATCCACTG

10

*Parte variable de la cadena pesada, secuencia de proteínas (SEQ ID NO: 40)*

MEWSGIFIFLLSGTAGVHSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFDDYMDWVKQSH  
GESFECIGRVNPNYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCARLGS  
SYRWGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPL

**Clon 4B8**

*Parte variable de la cadena ligera, secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 41)*

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCTGCTTCCAGCAGTGATGTTT  
TGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAA  
ATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGAAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCA  
GGCCAGTCTCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTTCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGT  
TCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCT  
GGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTG  
GAAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGT

15

*Parte variable de la cadena ligera, secuencia de proteínas (SEQ ID NO: 42)*

MKLPVRLVLMFWIPASSSDVLMTQTPLSLPVS LGDQASISCKSSQSI VHSNGNTYLEWY  
LQKPGQSPKLLIYKVFNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLG VYYCFQGSHPY  
TFGGGTKLEIKRADAAPT VSI FPPSS

*Parte variable de la cadena pesada, secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 43)*

ATGGGATGGAGCGGGGTCTTTATTTTAATCCTGT CAGTAACTACAGGTGTCCACTCTGAG  
GTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGAGAAGCCTGGCGCTTCAGTGAAGATATCC  
TGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACAACATGAACTGGGTGAAGCAGAACAAT  
GGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAAATATTACTCCTTACTATGGTAGTACTAGCTACAAC  
CAGAAGTTCAAGGGCAGGGTCACATTGACTGTGGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG  
CAGCTCAAGAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGCCTCCTATGGTTACGA  
CGGGGGGACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCC  
AAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTG

5 *Parte variable de la cadena pesada, secuencia de proteínas (SEQ ID NO: 44)*

MGWSGVFILILSVTTGVHSEVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWKQNN  
GKSLEWIGNITPYYGSTSYNQKFKGRVTLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYFCLLWLR  
RGDYAMDYWGQGSVTVSSAKTTPPSVYPL

*Ejemplo 21: Aplicación de clones del anticuerpo MCP-1 N1pE para inmunohistoquímica*

10 Con los anticuerpos de la presente invención, MCP-1 N1pE se tiñó en secciones de cerebro de ratas después de la microinyección de A $\beta$  (3-49), LPS o NaCl. Las secciones de cerebro teñidas se muestran en la Figura 15. La Figura 15 muestra que los anticuerpos 332-4B8, 348-1D4 y 348-2C9 de la presente invención son adecuados para inmunohistoquímica. Los anticuerpos detectan específicamente MCP-1 N1pE en cerebro de ratas.

*Depósitos*

15 Se generaron anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente MCP-1 N1pE. Actualmente, todos los anticuerpos monoclonales correspondientes que expresan clones de células de hibridoma 348/1D4, 348/2C9, 332/4B8 y 332/4F8 se han depositado según el Tratado de Budapest y están disponibles en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares) GmbH, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, con una fecha de depósito de 6 de mayo de 2008, y con los números de depósito respectivos.

DSM	ACC	2905	(Clon de células de hibridoma 348/1D4)
DSM	ACC	2906	(Clon de células de hibridoma 348/2C9)
DSM	ACC	2907	(Clon de células de hibridoma 332/4B8) y
DSM	ACC	2908	(Clon de células de hibridoma 332/4F8).

20 Podría confirmarse la especificidad de aquellos anticuerpos por sus secuencias diana respectivas. Para MCP-1 N1pE, podrían identificarse clones de anticuerpos de alta afinidad que deben dar señales fuertes en un sistema de ELISA con un límite de detección esperado en el intervalo de pg bajo.

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo que se une selectivamente al extremo amino que lleva piroglutamato de MCP-1 (MCP-1N1pE), en el que unión selectiva significa que no muestra ninguna reactividad cruzada con epítopos fuera del extremo amino que lleva piroglutamato de MCP-1N1pE.
- 5 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal y/o quimérico.
3. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la parte variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo está codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 33, 37 y 41, o es una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 34, 38 y 42
- y/o
- 10 en el que la parte variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo está codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO: 35, 39 y 43, o es una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 36, 40 y 44.
4. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se produce por células de hibridoma, en el que dichas células de hibridoma están seleccionadas del grupo que consiste en las células de hibridoma depositadas en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ, como DSM ACC 2905, DSM ACC 2906, 15 DSM ACC 2907 y DSM ACC 2908.
5. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, anticuerpo que comprende una región variable de la cadena ligera codificada por una secuencia de ácido nucleico que es el 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 33, 37 ó 41
- y/o
- 20 anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada codificada por una secuencia de ácido nucleico que es el 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 35, 39 ó 43, o una parte funcional de la misma.
6. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es el 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 34, 38 ó 42 25
- y/o
- anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es el 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica a una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 36, 40 ó 44.
- 30 7. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la parte variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 34, 38 y 42 y/o en el que la parte variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 36, 40 y 44, y en el que el anticuerpo ha sido alterado introduciendo al menos una, al menos dos, o al menos 3 o 35 más sustituciones conservativas en al menos una de las secuencias de SEQ ID NO: 34, 36, 38, 40, 42 y 44, y en el que el anticuerpo mantiene su funcionalidad completa.
8. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
9. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, que retiene la alta afinidad por MCP-1N1pE.
- 40 10. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en la detección de MCP1 N1pE en un mamífero.
11. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un diabody o un anticuerpo monocatenario que retiene la alta afinidad por MCP-1 N1pE.
- 45 12. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene las regiones determinantes de la complementariedad de los anticuerpos como se definen en la reivindicación 4.
13. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se marca y/o que se inmoviliza sobre una fase sólida.

14. Una línea celular de hibridoma seleccionada del grupo que consiste en DSM ACC 2905, DSM ACC 2906, DSM ACC 2907 y DSM ACC 2908, todas depositadas en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, DSMZ.

15. Una composición, que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

5 16. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en una cantidad terapéuticamente eficaz y, opcionalmente, otra sustancia biológicamente activa y/o un vehículo y/o un diluyente y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 17. La composición farmacéutica de la reivindicación 17, en la que dicho compuesto biológicamente activo adicional está seleccionado de potenciadores de la transmisión de neutrones, fármacos psicoterapéuticos, inhibidores de la acetilcolina esterasa, bloqueantes de los canales de calcio, aminas biogénicas, tranquilizantes de benzodiazepina, potenciadores de la síntesis, almacenamiento o liberación de acetilcolina, agonistas del receptor postsináptico de acetilcolina, inhibidores de la monoamina oxidasa A o B, antagonistas del receptor de N-metil-D-aspartato glutamato, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, antioxidantes, antagonistas de receptores serotoninérgicos, antagonistas del receptor CCR2 y anticuerpos para MCP-1;

15 o

20 en la que dicho compuesto biológicamente activo adicional está seleccionado de compuestos eficaces contra el estrés oxidativo, compuestos antiapoptóticos, quelantes de metal, inhibidores de la reparación de ADN activadores de la  $\alpha$ -secretasa, proteínas tau, neurotransmisor, interruptores de hojas  $\beta$ , atrayentes para la eliminación de amiloide beta/agotamiento de componentes celulares, inhibidores de péptidos de amiloide beta truncados en el extremo N que incluyen amiloide beta 3-42 piroglutamado, inhibidores de glutaminil ciclasa, moléculas antiinflamatorias e inhibidores de la colinesterasa (ChE), y otros fármacos que incluyen cualquier fármaco modificador de amiloide o de tau y suplementos nutritivos;

o

25 en la que dicho compuesto biológicamente activo adicional está seleccionado de inhibidores de PEP, LiCl, inhibidores de enzimas similares a DP IV o DP IV; inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE), potenciadores de PIMT, inhibidores de beta secretasas, inhibidores de gamma secretasas, inhibidores de endopeptidasa neutra, inhibidores de la fosfodiesterasa-4, inhibidores de TNFalfa, antagonistas de receptores muscarínicos M1, antagonistas del receptor NMDA, inhibidores del receptor sigma-1, antagonistas de la histamina H3, agentes inmunomoduladores, agentes inmunosupresores o un agente seleccionado de Antegren (natalizumab), Neurelan (fampridina-SR), Campath (alemzumab), IR 208, NBI 5788/MSP 771 (tiplimotida), paclitaxel, Anergix.MS (AG 284), SH636, Differin (CD 271, adapaleno), BAY 361677 (interleucina-4), inhibidores de las metaloproteinasas de matriz (por ejemplo, BB 76163), interferón-tau (trofoblastina) y SAIK-MS; anticuerpos para beta-amiloide, inhibidores de la cisteína proteasa; antagonistas de MCP-1, inhibidores del depósito de proteína amiloide e inhibidores de la síntesis de beta-amiloide.

35 18. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 para su uso en un método de diagnóstico o terapéutico.

19. El anticuerpo o la composición de la reivindicación 18 para su uso en el tratamiento, prevención o retraso de enfermedades y afecciones relacionadas con MCP-1 seleccionadas del grupo que consiste en enfermedades inflamatorias seleccionadas de

40 a. enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), enfermedad de Alzheimer, neurodegeneración en síndrome de Down, demencia familiar británica, demencia familiar danesa, esclerosis múltiple,

b. inflamaciones crónicas y agudas, por ejemplo, artritis reumatoide, aterosclerosis, reestenosis, pancreatitis,

c. fibrosis, por ejemplo, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, fibrosis renal,

d. cáncer, por ejemplo, proliferación de cáncer/hemangioendotelioma, carcinomas gástricos,

45 e. enfermedades metabólicas, por ejemplo, hipertensión,

f. y otras enfermedades inflamatorias, por ejemplo, dolor neuropático, rechazo del injerto/fallo del injerto/vasculopatía del injerto, infecciones por VIH/SIDA, gestosis, esclerosis tuberosa.

20. Un método para detectar MCP-1 N1pE, que comprende la etapa de poner en contacto una muestra biológica que se supone que contiene dicho péptido con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, y detectar la unión

específica del anticuerpo a MCP-1 N1pE en la muestra.

21. Un método de diagnóstico *in vitro* o *in situ* para el diagnóstico de una enfermedad o afección relacionada con MCP-1, que comprende la detección de MCP-1 N1pE en una muestra biológica.

22. El método de la reivindicación 21, que comprende las siguientes etapas:

- 5 a. poner en contacto un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, con una muestra, o una parte del cuerpo específica o área del cuerpo de un sujeto que se sospecha que está afectado con dicha afección o enfermedad, y
- b. detectar la unión del anticuerpo a un péptido MCP-1 N1pE de la muestra.

10 23. El método de la reivindicación 21, que comprende detectar la unión inespecífica de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, a un péptido MCP-1 N1pE en una muestra o *in situ*, que incluye las etapas de:

- a. poner la muestra o una parte del cuerpo específica o área del cuerpo que se sospecha que contiene el péptido MCP-1 en contacto con el anticuerpo;
- b. permitir que el anticuerpo se una al péptido MCP-1 N1pE para formar un complejo inmunológico;
- c. detectar la formación del complejo inmunológico; y

15 d. correlacionar la presencia o ausencia del complejo inmunológico con la presencia o ausencia de péptido MCP-1 N1pE en la muestra o parte o área del cuerpo específica.

24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en el que dicha muestra biológica está seleccionada de una muestra de suero, líquido, líquido cefalorraquídeo (CSF) o líquido sinovial.

20 25. Uso del método de cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24 para la detección y diagnóstico de enfermedades y afecciones relacionadas con MCP-1 seleccionadas del grupo que consiste en enfermedades inflamatorias seleccionadas de

- a. enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo, deterioro cognitivo leve (DCL), enfermedad de Alzheimer, neurodegeneración en síndrome de Down, demencia familiar británica, demencia familiar danesa, esclerosis múltiple,
- 25 b. inflamaciones crónicas y agudas, por ejemplo, artritis reumatoide, aterosclerosis, reestenosis, pancreatitis,
- c. fibrosis, por ejemplo, fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, fibrosis renal,
- d. cáncer, por ejemplo, proliferación de cáncer/hemangioendotelioma, carcinomas gástricos,
- e. enfermedades metabólicas, por ejemplo, hipertensión,
- 30 f. y otras enfermedades inflamatorias, por ejemplo, dolor neuropático, rechazo del injerto/fallo del injerto/vasculopatía del injerto, infecciones por VIH/SIDA, gestosis, esclerosis tuberosa.

26. Kit de diagnóstico, que comprende el anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, e instrucciones para su uso, y - opcionalmente - (una) sustancia(s) biológicamente activa(s) adicional(es).

35 27. Un polinucleótido aislado que codifica la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 3, en el que dicho polinucleótido aislado comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada de SEQ ID NO: 33, 37 y 41;

o

un polinucleótido aislado que codifica la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 3, en el que dicho polinucleótido aislado comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada de SEQ ID NO: 35, 39 y 43;

40 o

un péptido aislado de la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 3, en el que dicho péptido aislado comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 34, 38 y 42;

o

un péptido aislado de la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 3, en el que dicho péptido aislado comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 36, 40 y 44.

Figura 1A

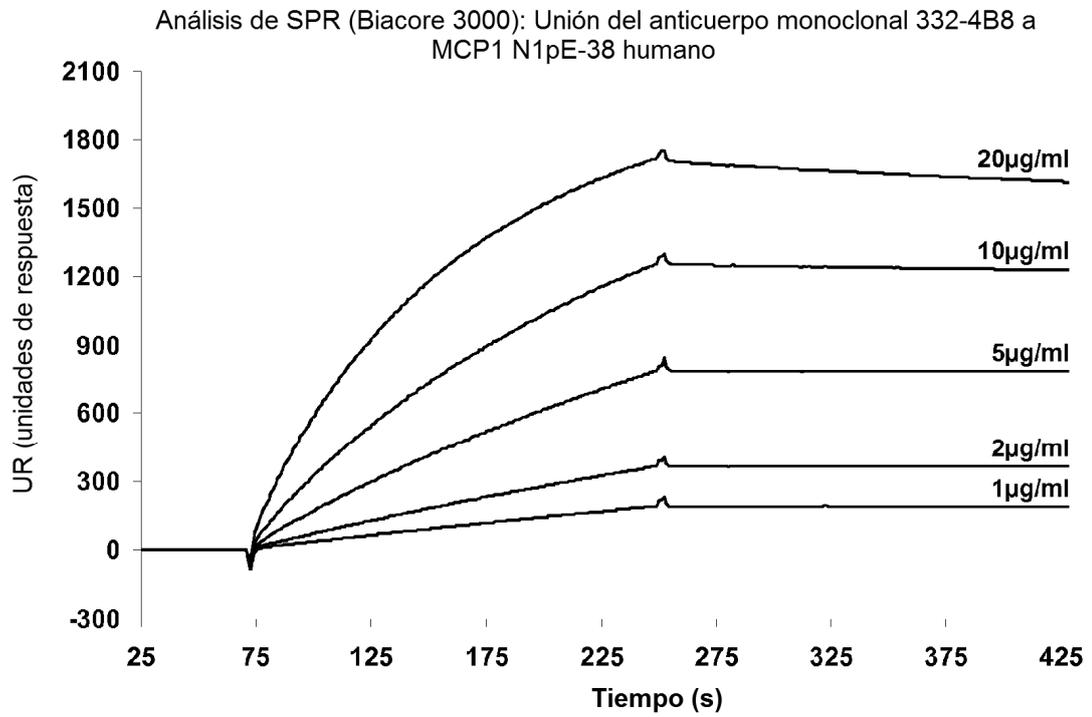


Figura 1B

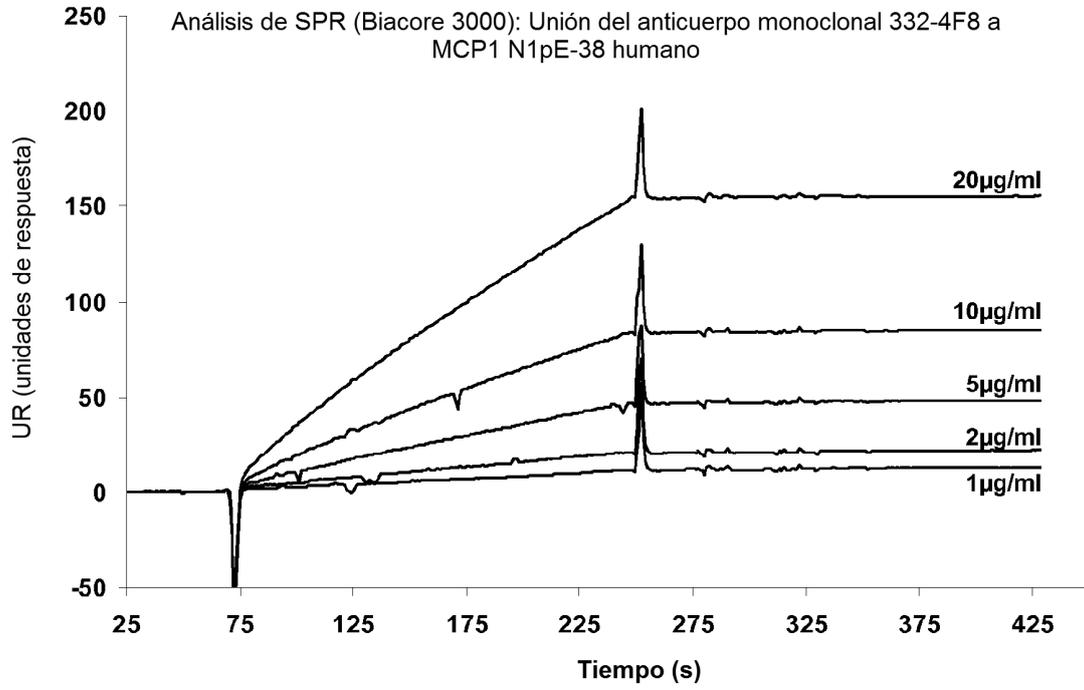


Figura 1C

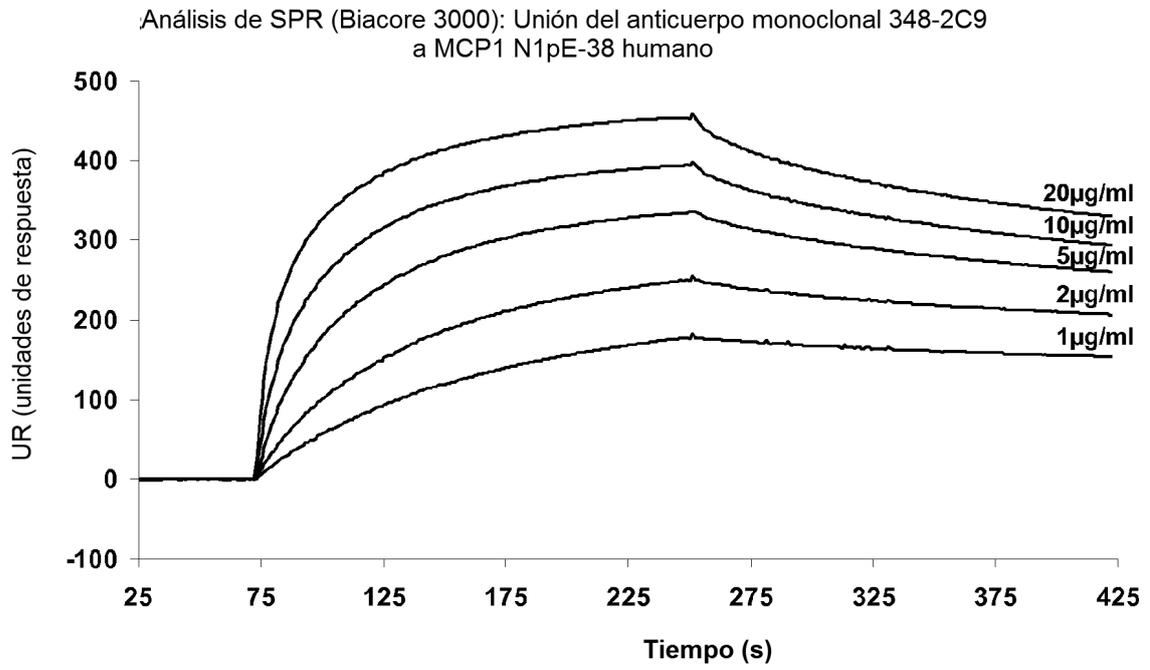


Figura 1D

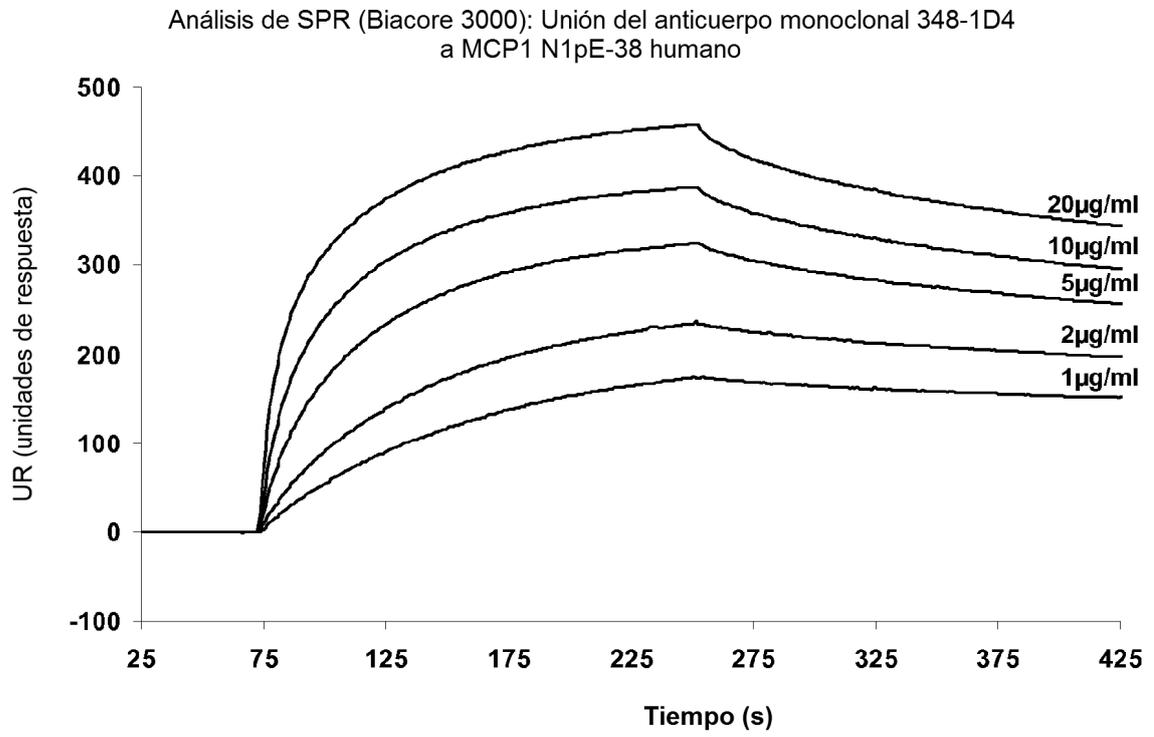


Figura 2A

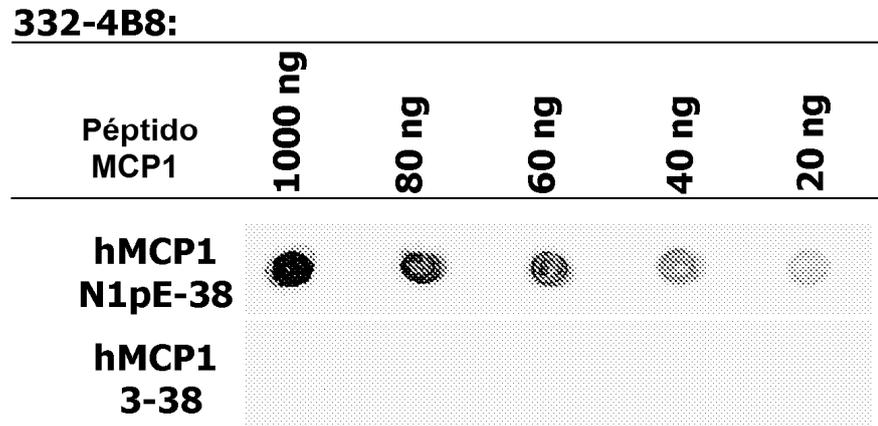


Figura 2B

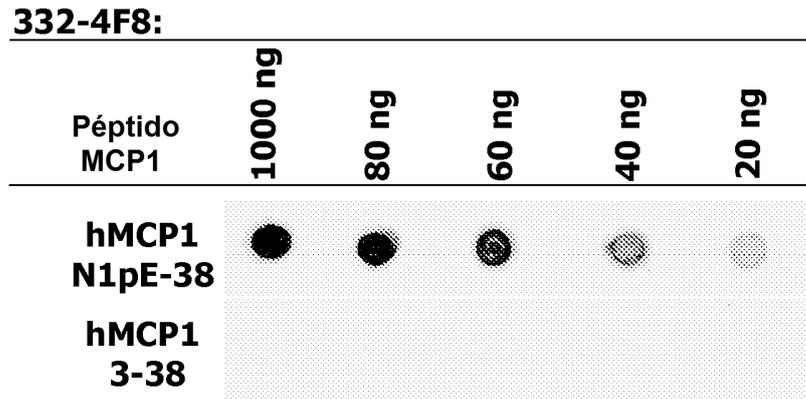


Figura 2C

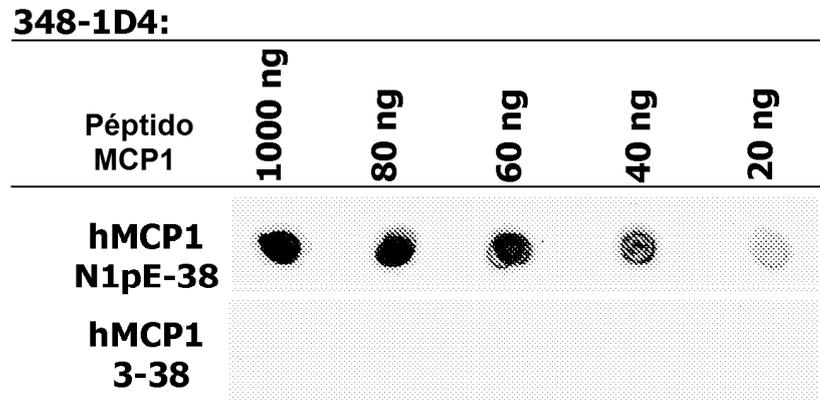


Figura 2D

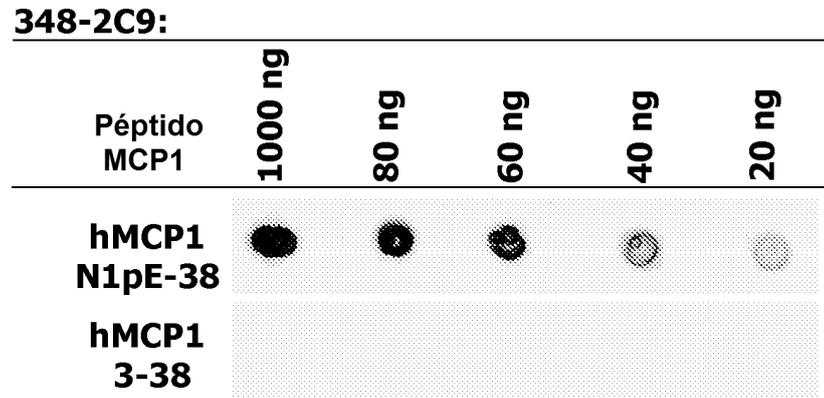


Figura 3

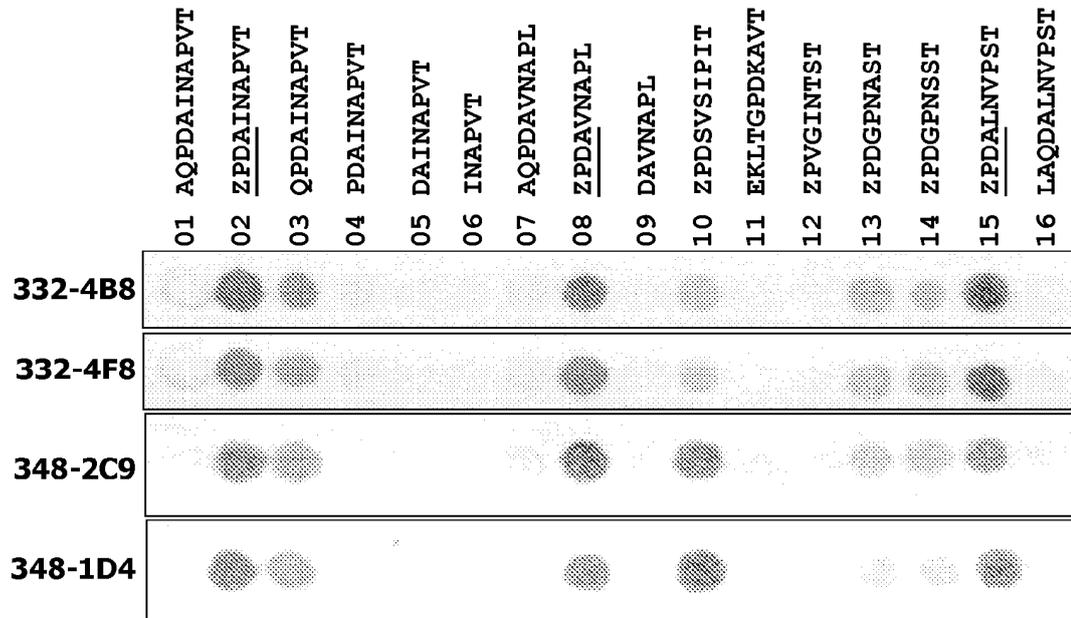


Figura 4

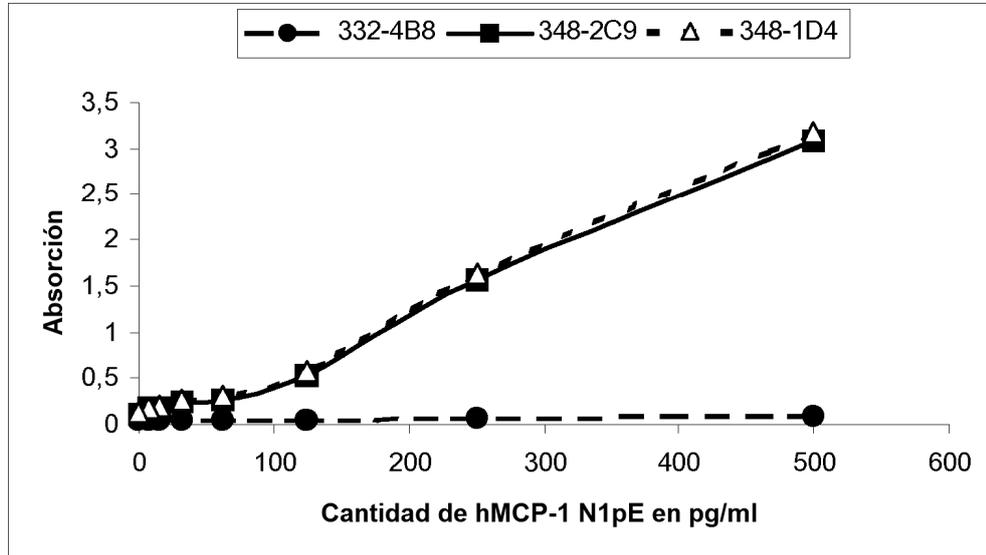


Figura 5

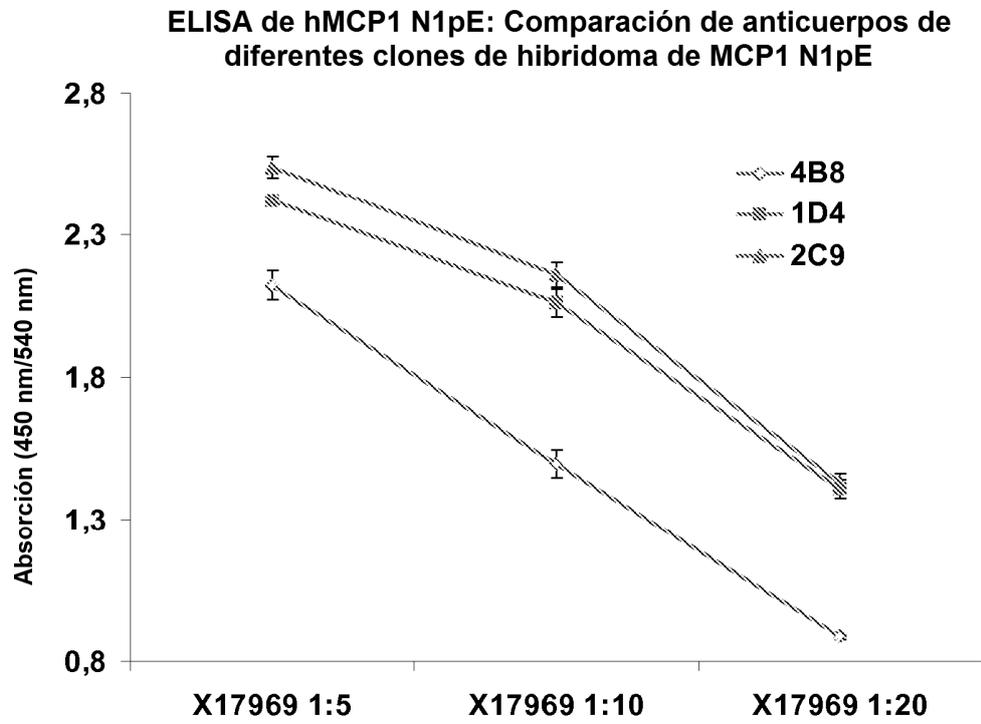


Figura 6

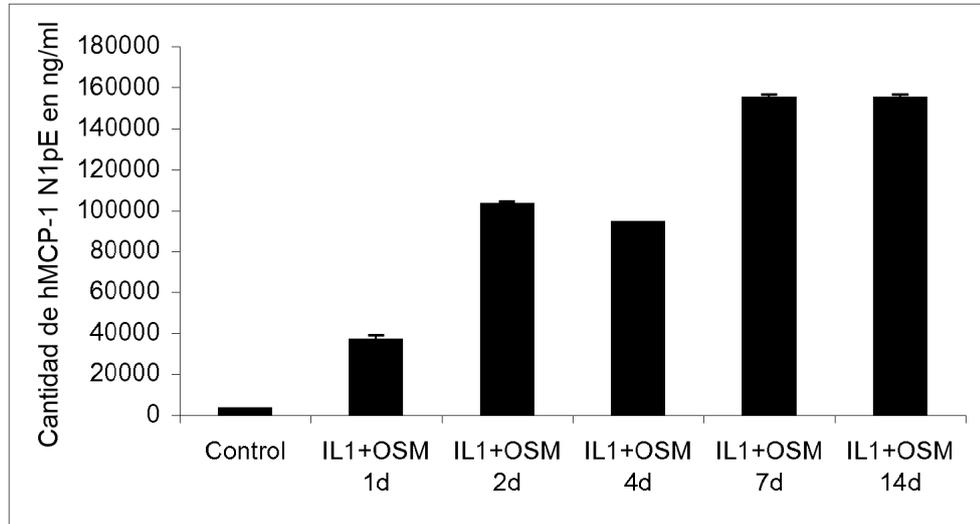


Figura 7

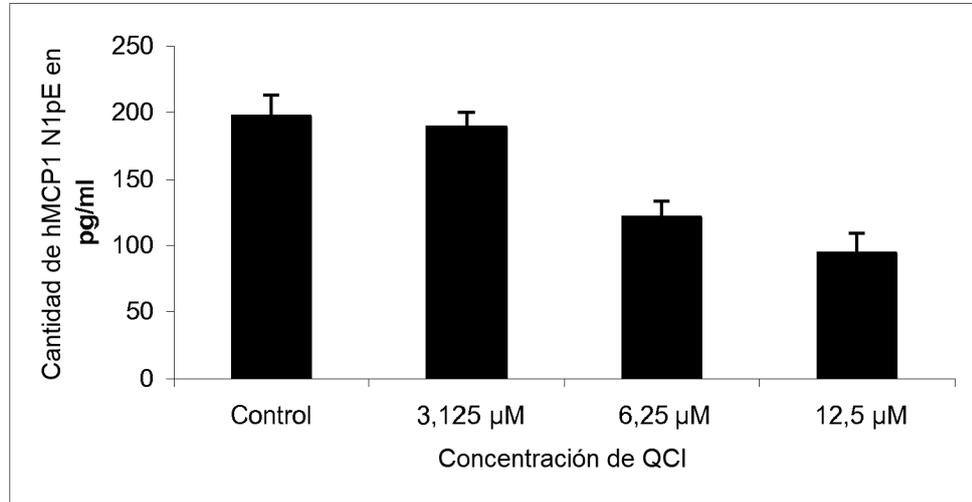


Figura 8

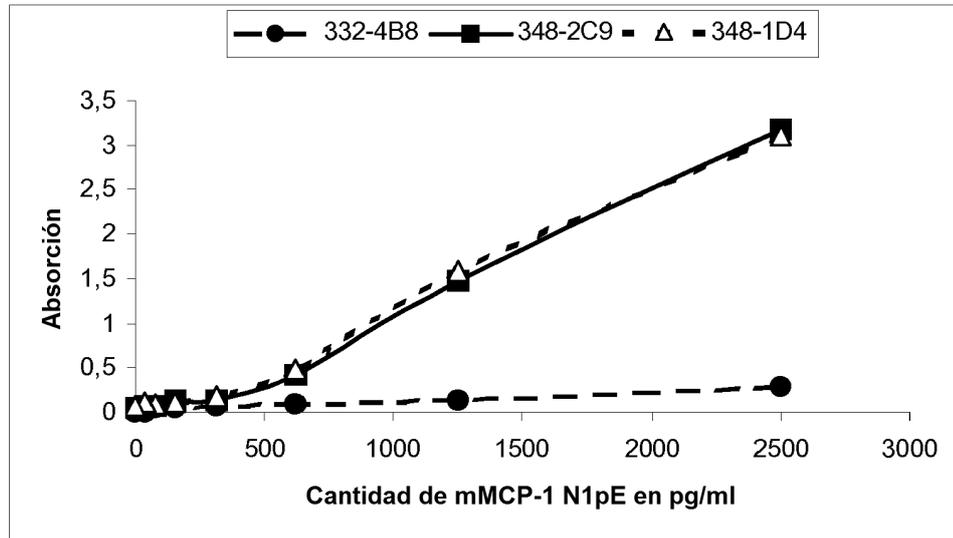


Figura 9

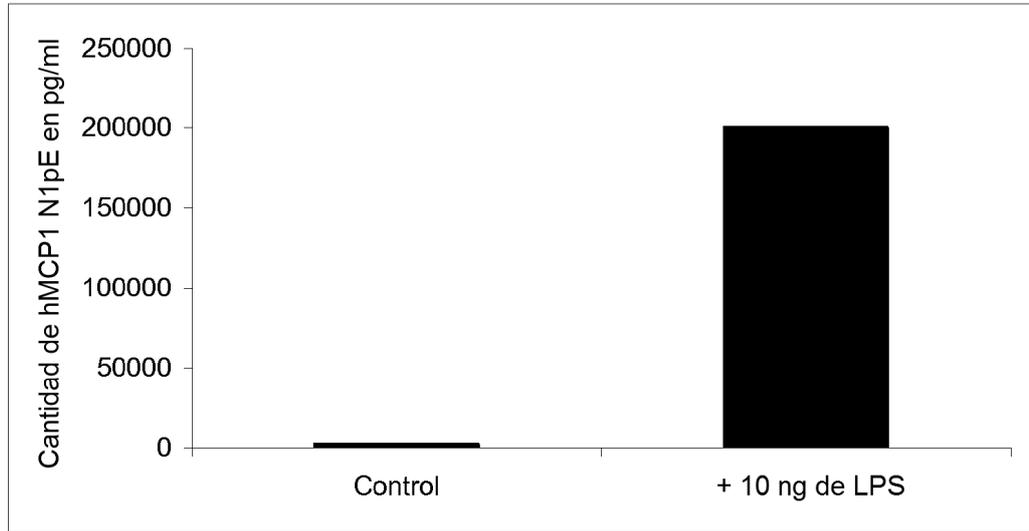


Figura 10

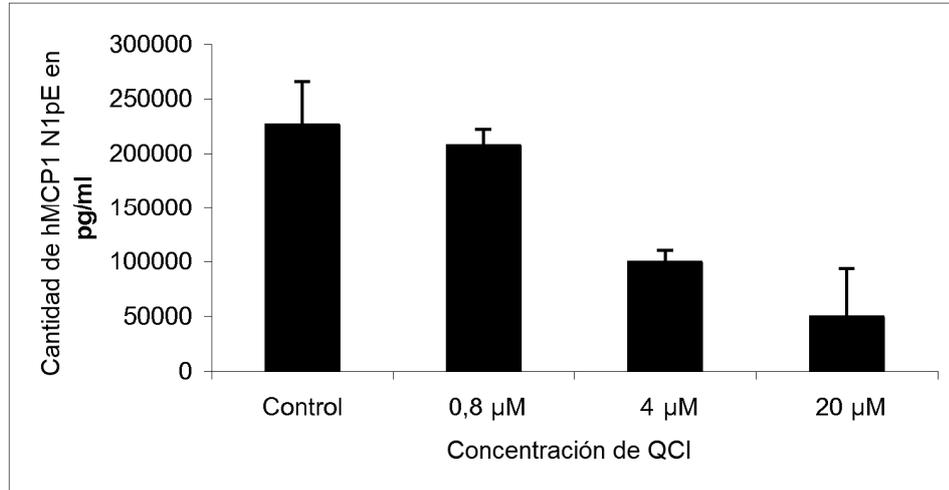


Figura 11

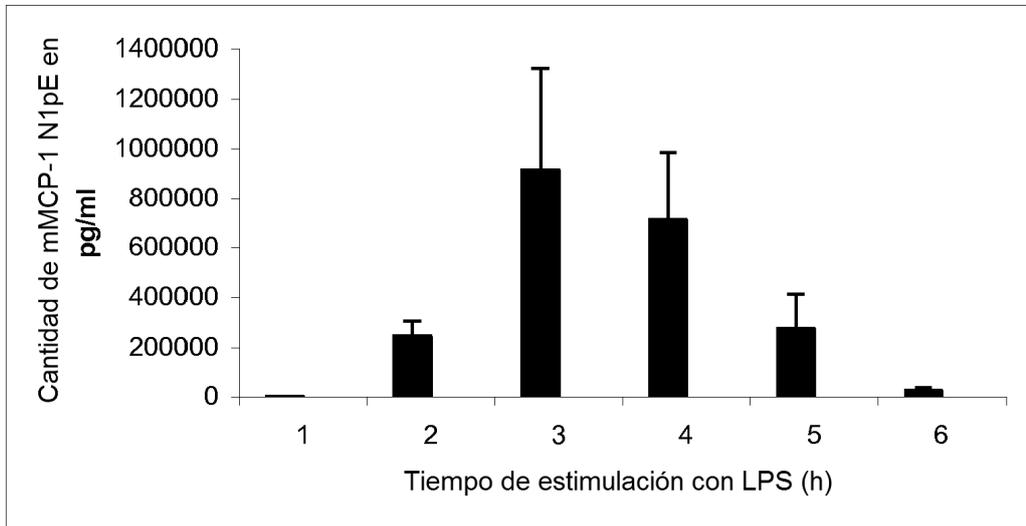


Figura 12

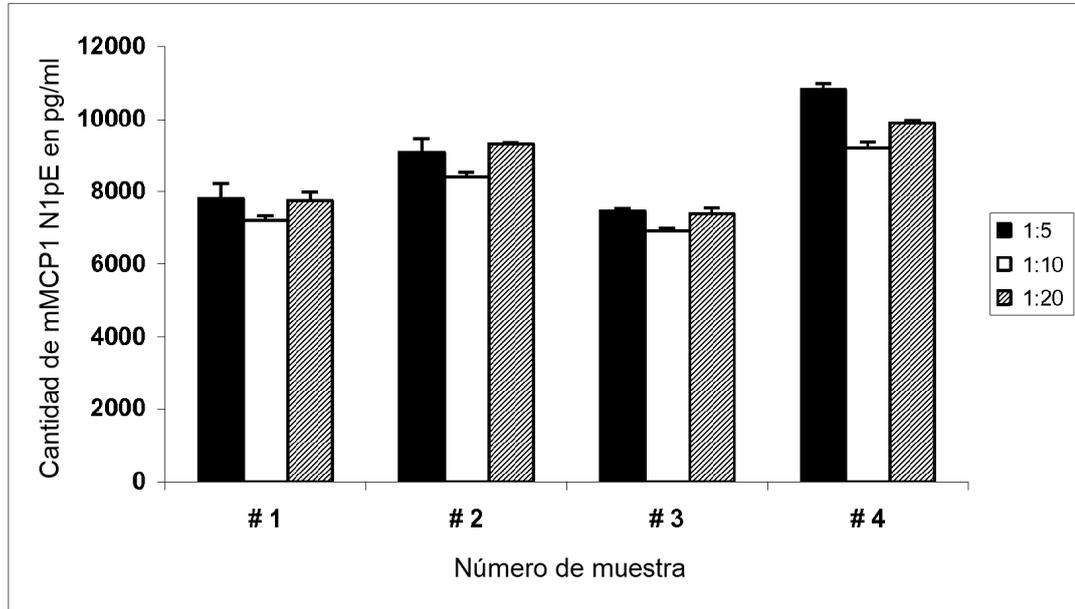


Figura 13

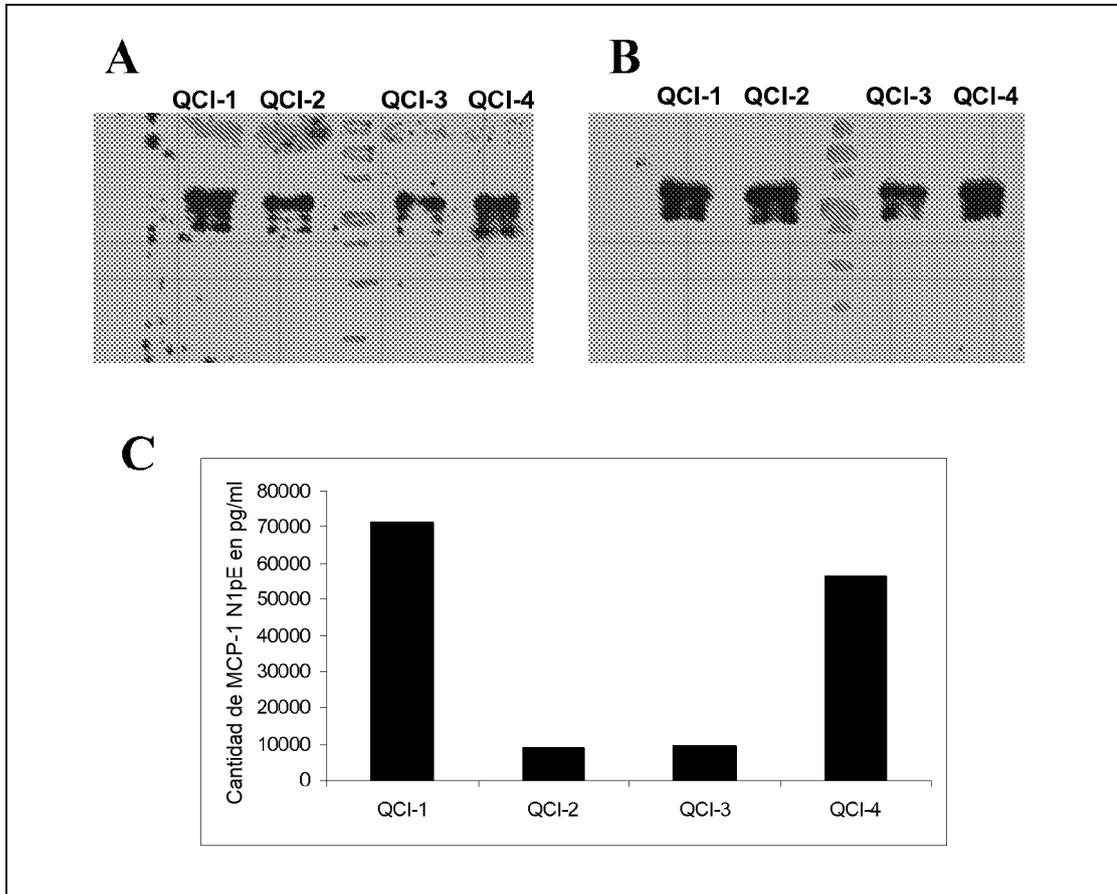


Figura 14

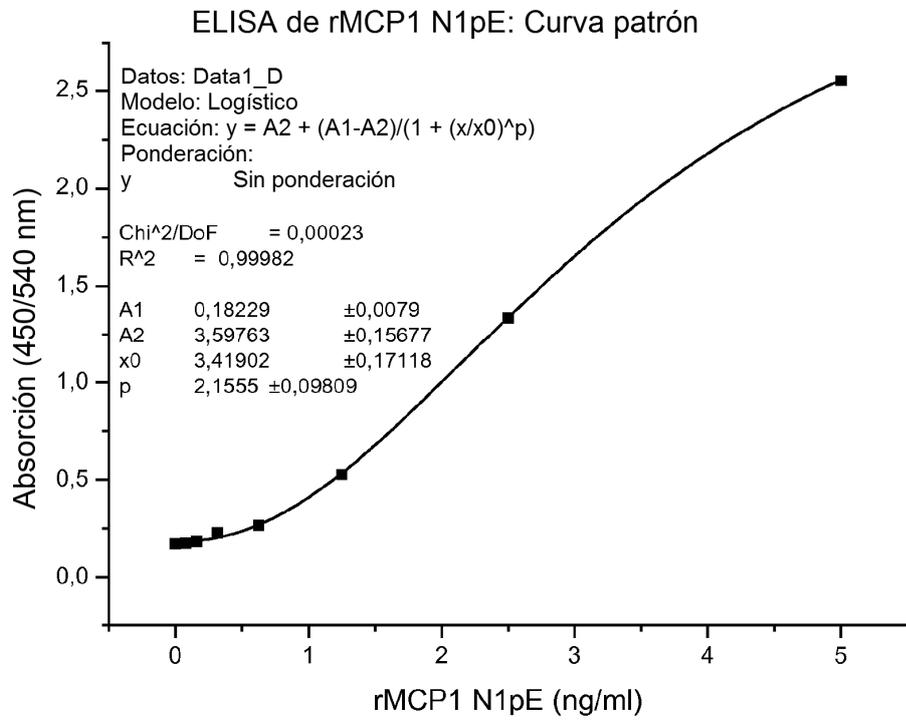


Figura 15

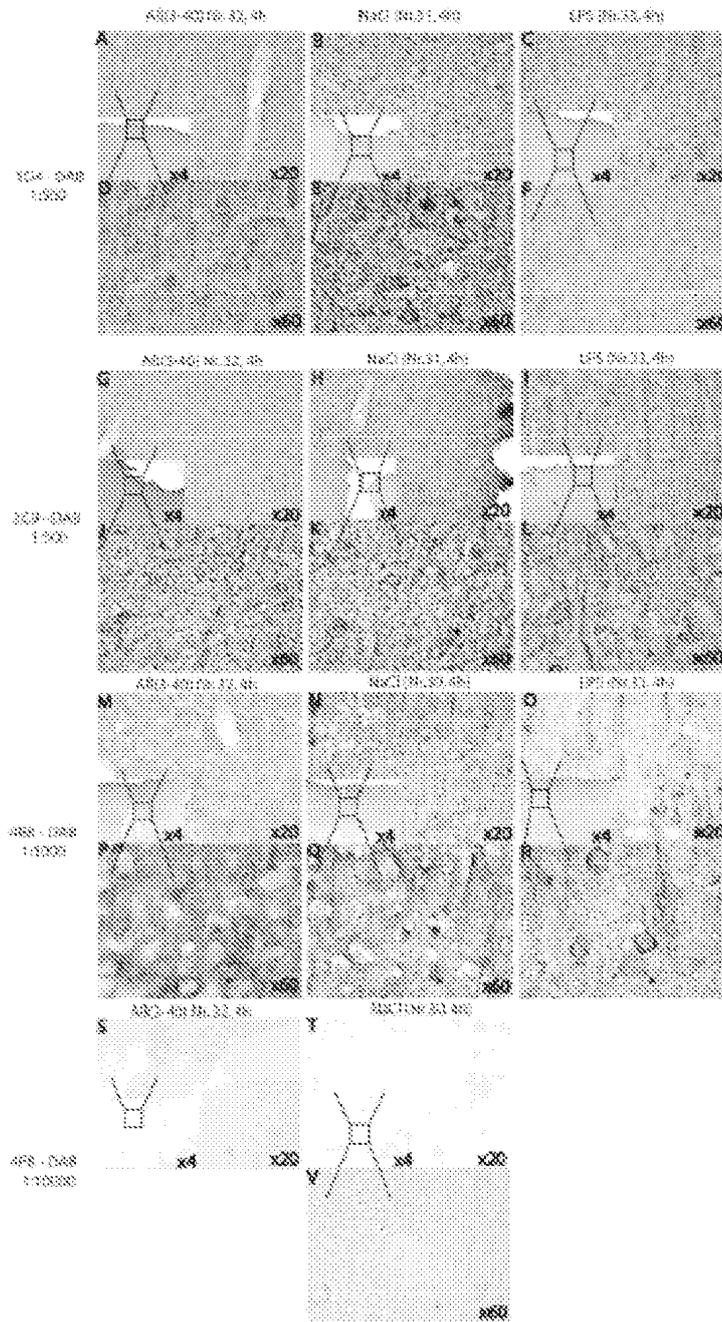


Figura 16

