

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 828**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2003 E 03700693 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015 EP 1476469**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales contra bucles extracelulares de C5aR**

30 Prioridad:

25.01.2002 US 350961 P

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

01.03.2016

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Novo Allé

2880 Bagsværd, DK

72 Inventor/es:

MACKAY, CHARLES REAY

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 561 828 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 monoclonales contra bucles extracelulares de C5aR

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a anticuerpos que se fijan a C5aR y que son útiles en métodos diagnósticos y terapéuticos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La proteólisis de cada una de las proteínas C3-C5 del complemento da lugar a fragmentos catiónicos aminoterminal con moléculas de señalización denominadas anafilatoxinas (6-9). La más potente de éstas, C5a, provoca las respuestas más amplias. Considerando los componentes de la respuesta inflamatoria como marginación e infiltración de leucocitos, liberación proteolíticas fijadas a gránulos, producción de radicales activados derivados de oxígeno y nitrógeno, cambios en el flujo sanguíneo y fuga de capilares, junto con la posibilidad de contraer la musculatura lisa, la molécula C5a es el mediador pro-inflamatorio "completo". A niveles sub-nanomolares hasta nanomolares, la molécula C5a provoca quimiotaxis de todos los linajes mieloides (neutrófilos, eosinófilos y basófilos, macrófagos y monocitos), y causa permeabilidad vascular que está potenciada acusadamente por prostaglandinas y leucocitos circulantes. Las concentraciones nanomolares mayores provocan la desgranulación y activación de la NADPH-oxidasa. La amplitud de la bioactividad contrasta con otros mediadores inflamatorios. C5a se ha visto implicada en la patogénesis de artritis reumatoide, psoriasis, sepsis, lesión de reperfusión, y síndrome de dificultad respiratoria de los adultos [1,2].

25 Las actividades de C5a están mediadas por la fijación de C5a a su receptor (C5aR). C5aR pertenece a la familia de receptores 7-transmembranales acoplados a proteína G. C5aR es un receptor de afinidad alta para C5a, con un Kd de ~ 1 nM, y está localizado en varios tipos de células diferentes que incluyen los leucocitos. El número de receptores por célula es extremadamente alto, hasta 200.000 sitios por leucocito. La activación biológica del receptor ocurre a lo largo del intervalo que satura la fijación.

30 C5aR comprende un dominio extracelular N-terminal extendido. Este amplio dominio N-terminal es típico de los receptores acoplados a proteína G que fijan péptidos que incluyen las familias de receptores de IL-8 y fMet-Leu-Phe (FMLP). La estructura de C5aR está adaptada para la familia de receptores 7-transmembranales, yendo seguido el término N extracelular por 7 hélices transmembranales conectadas con dominios interhelicoidales que alternan como bucles intracelulares y extracelulares, y terminan con un dominio intracelular C-terminal.

35 La inhibición de las respuestas de C5a con antagonistas de C5aR debería reducir la respuesta inflamatoria aguda mediada por C5a sin afectar a otros componentes del complemento. A este fin, se han descrito previamente [3-7] antagonistas del péptido C5aR y anticuerpos receptores de anti-C5a. Por ejemplo, WO 95/00164 describe anticuerpos dirigidos contra un péptido N-terminal (residuos 9-29) del receptor C5a. Actualmente, sin embargo, son deseables antagonistas de C5aR alternativos y/o mejorados.

40 Oppermann et al. describen que mAb y anticuerpos policlonales con especificidades para secuencias hidrófilas deducidas de la proteína receptora se emplearon para determinar la expresión y la topografía de C5aR en PBL (Oppermann et al. The Journal of Immunology: 1993; 151 (7); 3785-3794).

SUMARIO DE LA INVENCION

45 Los autores de la presente invención han desarrollado ahora nuevos anticuerpos monoclonales que son reactivos con regiones de C5aR distintas del dominio N-terminal y que son sumamente eficaces en la inhibición de la fijación de C5a a C5aR. Estos anticuerpos monoclonales han sido designados 7F3, 6C12 y 12D4.

50 De acuerdo con ello, en un aspecto la presente invención proporciona un anticuerpo que es reactivo con el segundo bucle extracelular, residuos 175 a 206, de C5aR, en donde el anticuerpo inhibe sustancialmente la fijación de C5a a C5aR.

55 El anticuerpo puede ser reactivo con el mismo epítipo de C5aR que MAb 7F3.

El anticuerpo puede ser reactivo con el mismo epítipo de C5aR que MAb 6C12.

60 El anticuerpo puede ser reactivo con el mismo epítipo de C5aR que MAb 12D4.

El anticuerpo puede inhibir competitivamente la fijación de MAb 7F3 a C5aR.

El anticuerpo puede inhibir competitivamente la fijación de MAb 6C12 a C5aR.

65 El anticuerpo puede inhibir competitivamente la fijación de MAb 12D4 a C5aR.

En una realización preferida de estos aspectos de la invención, la especificidad comparativa de fijación se determina por ensayos de competición anticuerpo-anticuerpo en presencia de C5aR o de un polipéptido que comprende un bucle extracelular de C5aR.

5 El anticuerpo puede comprender sustancialmente las mismas secuencias de cadena ligera y/o pesada que se muestran en SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 21, respectivamente.

10 El anticuerpo puede comprender al menos una secuencia de bucle CDR que es sustancialmente la misma que una secuencia de bucle variable de cadena pesada CDR1, CDR2 o CDR3 como se muestra en SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 28 respectivamente.

15 En una realización preferida, el anticuerpo comprende al menos dos, más preferiblemente al menos tres secuencias de bucle CDR que son sustancialmente iguales que las secuencias de bucle variables de cadena pesada CDR1, CDR2 o CDR3 que se muestran en SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28 respectivamente.

20 En una realización preferida adicional, el anticuerpo comprende al menos una secuencia de bucle CDR sustancialmente como se define por los residuos de aminoácido 24 a 39, 55 a 61 y 94 a 102 de la secuencia variable de cadena ligera que se muestra en SEQ ID NO: 19. Preferiblemente, el anticuerpo comprende al menos dos, más preferiblemente al menos tres secuencias de bucle CDR sustancialmente como se definen por los residuos de aminoácido 24 a 39, 55 a 61 y 94 a 102 de la secuencia variable de la cadena ligera que se muestra en SEQ ID NO: 19.

...
El anticuerpo puede comprender sustancialmente las mismas secuencias de cadena ligera y/o pesada que se muestran en SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 17, respectivamente.

25 El anticuerpo puede comprender al menos una secuencia de bucle CDR que es sustancialmente la misma que una secuencia de bucle variable de cadena pesada CDR1, CDR2 o CDR3 que se muestra en SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 o SEQ ID NO: 31 respectivamente.

30 En una realización preferida, el anticuerpo comprende al menos dos, más preferiblemente al menos tres secuencias de bucle CDR que son sustancialmente iguales que las secuencias de bucle variables de cadena pesada CDR1, CDR2 o CDR3 que se muestran en SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31 respectivamente.

35 En una realización preferida adicional, el anticuerpo comprende al menos una secuencia de bucle CDR sustancialmente como se define por los residuos de aminoácido 24 a 39, 55 a 61 y 94 a 102 de la secuencia variable de cadena ligera que se muestra en SEQ ID NO: 15. Preferiblemente, el anticuerpo comprende al menos dos, más preferiblemente al menos tres secuencias de bucle CDR sustancialmente como se definen por los residuos de aminoácido 24 a 39, 55 a 61 y 94 a 102 de la secuencia variable de la cadena ligera que se muestra en SEQ ID NO: 15.

40 El anticuerpo puede comprender sustancialmente las mismas secuencias de cadena ligera y/o pesada que se muestran en SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 25 respectivamente.

45 El anticuerpo puede comprender al menos una secuencia de bucle CDR que es sustancialmente igual que una secuencia de bucle variable de cadena pesada CDR1, CDR2 o CDR3 como se muestra en SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34 respectivamente.

50 En una realización preferida, el anticuerpo comprende al menos dos, más preferiblemente al menos tres secuencias de bucle CDR que son sustancialmente iguales que las secuencias de bucle variable de cadena pesada CDR1, CDR2 o CDR3 que se representan en SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34 respectivamente.

55 En una realización preferida adicional, el anticuerpo comprende al menos una secuencia de bucle CDR sustancialmente como se define por los residuos de aminoácido 24 a 39, 55 a 61 o 94 a 102 de la secuencia variable de cadena ligera representada en SEQ ID NO: 23. Preferiblemente, el anticuerpo comprende al menos dos, más preferiblemente al menos tres secuencias de bucle CDR sustancialmente como se definen por los residuos de aminoácido 24 a 39, 55 a 61 y 94 a 102 de la secuencia variable de cadena ligera representada en SEQ ID NO: 23.

En una realización preferida de la presente invención, el C5aR es C5aR humano.

60 En una realización de la presente invención, el anticuerpo inhibe también la activación de los neutrófilos por otros quimioatrayentes de los neutrófilos, particularmente los ligandos CXCR1 y CXCR2 tales como IL-8.

En una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o recombinante. Preferiblemente, el anticuerpo monoclonal o recombinante es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

65 El anticuerpo puede ser de cualquier isotipo. En una realización preferida adicional de la presente invención, sin

embargo, el anticuerpo es un anticuerpo de clase IgG2a o anticuerpo de clase IgG3.

En otra realización preferida de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo constituido por MAb 7F3, MAb 6C12 y MAb 12D4.

5 Se tendrá en cuenta que pueden producirse también diversos derivados químicos de los anticuerpos de la invención. Por ejemplo, pueden producirse inmunoconjugados constituidos por un anticuerpo de la presente invención fijado a un marcador tal como un radioisótopo u otra molécula trazadora o métodos conocidos en la técnica. Alternativamente, el anticuerpo puede estar unido a una molécula terapéuticamente útil que está direccionada a su
10 sitio de acción deseado en virtud de la especificidad de fijación del anticuerpo.

De acuerdo con ello, en todavía otro aspecto, la presente invención proporciona un conjugado que comprende un anticuerpo de la presente invención y un agente terapéutico.

15 Se tendrá en cuenta que pueden ser utilizados una gama de agentes terapéuticos en el contexto de la presente invención. Agentes terapéuticos preferidos incluyen agentes que median la muerte celular o desactivación de las proteínas. El agente terapéutico puede ser cualquiera de un gran número de toxinas conocidas en la técnica. La toxina puede ser exotoxina de *Pseudomonas* o un derivado de la misma. En una realización preferida, la toxina es PE40.
20

En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona un conjugado que comprende un anticuerpo de la presente invención y un marcador detectable.

25 El marcador detectable puede ser cualquier marcador adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, el marcador puede ser un radiomarcador, un marcador fluorescente, un marcador enzimático o medios de contraste.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada, comprendiendo la molécula de ácido nucleico una secuencia que codifica un anticuerpo de la presente invención.

30 En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención para uso como medicamento.
35

Será apreciado por los expertos en la técnica que los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse también para detectar, cuantificar y/o localizar células que expresan C5aR.

40 Conforme a lo anterior, en un aspecto adicional la presente invención proporciona un método para diagnosticar un trastorno que implica migración de neutrófilos en un individuo, comprendiendo el método poner en contacto una muestra obtenida del individuo con un conjugado de la presente invención, y detectar la fijación inmunespecífica entre el conjugado y la muestra.

45 En los métodos de diagnosis pueden utilizarse una diversidad de inmunoensayos. Tales inmunoensayos incluyen sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que utilizan técnicas tales como radioinmunoensayos, ELISA, inmunoensayos "sándwich", reacciones de precipitina, reacciones de precipitina con difusión de gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunorradiométricos, inmunoensayos fluorescentes y análogos. Pueden utilizarse ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*.

50 La muestra obtenida del individuo puede comprender cualquier fluido corporal, tal como sangre periférica, plasma, fluido linfático, fluido peritoneal, fluido cerebroespinal, o fluido pleural, o cualquier tejido del cuerpo. La fijación *in vitro* puede realizarse utilizando especímenes histológicos o subfracciones de tejido o fluido. La fijación *in vivo* puede conseguirse por administración del conjugado por cualquier medio conocido en la técnica (tal como intravenoso, intraperitoneal, intraarterial, etc.) tal que pueda detectarse una fijación inmunespecífica.
55

Adicionalmente, pueden utilizarse técnicas de producción de imagen, en las cuales un anticuerpo del primer aspecto está fijado a un marcador de producción de imagen adecuado. El anticuerpo marcado puede administrarse *in vivo* para determinar la localización de C5aR en un individuo.

60 En una realización preferida de la presente invención, el trastorno que implica migración de los neutrófilos es un trastorno mediado por C5aR. Preferiblemente, el trastorno es un trastorno inmunopatológico.

En una realización preferida, las células que presentan C5aR se seleccionan del grupo constituido por granulocitos, leucocitos, tales como monocitos, macrófagos, basófilos y eosinófilos, mastocitos y linfocitos que incluyen células T, células dendríticas, y células no mieloides tales como células endoteliales y células de la musculatura lisa.
65

Los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse en métodos adicionales de identificación de ligandos u otras sustancias que fijan C5aR, con inclusión de inhibidores y/o promotores de la función de C5aR de mamífero. Por ejemplo, agentes que tienen la misma o similar especificidad de fijación que la de un anticuerpo de la presente invención o fragmento funcional del mismo pueden identificarse por un ensayo de competición con dicho anticuerpo o fragmento. Así, el método puede utilizarse para identificar ligandos u otras sustancias que fijan C5aR, con inclusión de inhibidores (v.g. antagonistas) o promotores (v.g., agonistas) de la función del receptor. En una realización, células que expresan naturalmente C5aR o células hospedadoras adecuadas se han diseñado para expresar C5aR o una variante codificada por un ácido nucleico introducido en dichas células se utilizan en un ensayo para identificar y evaluar la eficacia de ligandos, inhibidores o promotores de la función del receptor. Tales células son también útiles en la evaluación de la función de la proteína o polipéptido receptor expresada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra los resultados del análisis por citometría de flujo del anticuerpo monoclonal 7F3. Estos resultados muestran que 7F3 reacciona específicamente con las células L1.2 transfectadas con C5aR.

La Figura 2 muestra los resultados de ensayos de fijación de ligandos ¹²⁵I C5a que implican una gama de anticuerpos monoclonales que incluyen 7F3.

La Figura 3 muestra la inhibición de la respuesta a la dosis de fijación de ligando ¹²⁵I C5a por el anticuerpo monoclonal 7F3.

La Figura 4 muestra los resultados de experimentos de quimiotaxis realizados utilizando células L1.2 transfectadas con C5aR y una gama de anticuerpos monoclonales que incluyen 7F3, 6C12 y 12D4.

La Figura 5 muestra la inhibición completa de la quimiotaxis de transfectantes L1.2 C5aR por el anticuerpo monoclonal 7F3.

La Figura 6 muestra la inhibición completa de la quimiotaxis de neutrófilos dirigida a C5a por el anticuerpo monoclonal 7F3.

La Figura 7 muestra la inhibición de la quimiotaxis de los neutrófilos dirigida a C5a por los anticuerpos monoclonales 7F3, 6C12 y 12D4.

La Figura 8 muestra la inhibición de la quimiotaxis de los neutrófilos dirigida a IL-8 por los anticuerpos monoclonales 7F3, 6C12 y 12D4.

La Figura 9 presenta resultados de un experimento para medir la inhibición competitiva de la fijación de MAb AntiC5aR a células L1.2 transfectadas con C5aR humano por el péptido N-terminal de C5aR, PEPI.

La Figura 10 presenta los resultados de un experimento que mide la tinción con FACS de neutrófilos purificados con MAb 7F3 en presencia y ausencia del péptido N-terminal de C5aR, PEPI.

La Figura 11 muestra un alineamiento de las secuencias de DNA variables de cadena ligera para MAbs 7F3, 6C12 y 12D4.

La Figura 12 muestra un alineamiento de las secuencias de DNA variables de cadena pesada para MAbs 7F3, 6C12 y 12D4.

La Figura 13 muestra un alineamiento de las secuencias de proteína variable de cadena ligera para MAbs 7F3, 6C12 y 12D4.

La Figura 14 muestra un alineamiento de las secuencias de proteína variable de cadena pesada para MAbs 7F3, 6C12 y 12D4.

CLAVE PARA LOS LISTADOS DE SECUENCIAS

- SEQ ID NO:1 Secuencia de la proteína humana C5aR
- SEQ ID NO:2 Cebador PCR para la cadena ligera variable 6C12
- SEQ ID NO:3 Cebador PCR para la cadena ligera variable 6C12
- SEQ ID NO:4 Cebador PCR para la cadena pesada variable 6C12
- SEQ ID NO:5 Cebador PCR para la cadena pesada variable 6C12
- SEQ ID NO:6 Cebador PCR para la cadena ligera variable 7F3
- SEQ ID NO:7 Cebador PCR para la cadena ligera variable 7F3
- SEQ ID NO:8 Cebador PCR para la cadena pesada variable 7F3
- SEQ ID NO:9 Cebador PCR para la cadena pesada variable 7F3

5 SEQ ID NO:10 Cebador PCR para la cadena ligera variable 12D4
 SEQ ID NO:11 Cebador PCR para la cadena ligera variable 12D4
 SEQ ID NO:12 Cebador PCR para la cadena pesada variable 12D4
 SEQ ID NO:13 Cebador PCR para la cadena pesada variable 12D4
 SEQ ID NO:14 Secuencia (DNA) de la cadena ligera variable 6C12
 SEQ ID NO:15 Secuencia (proteína) de la cadena ligera variable 6C12
 SEQ ID NO:16 Secuencia (DNA) de la cadena pesada variable 6C12
 SEQ ID NO:17 Secuencia (proteína) de la cadena pesada variable 6C12
 SEQ ID NO:18 Secuencia (DNA) de la cadena ligera variable 7F3
 10 SEQ ID NO:19 Secuencia (proteína) de la cadena ligera variable 7F3
 SEQ ID NO:20 Secuencia (DNA) de la cadena pesada variable 7F3
 SEQ ID NO:21 Secuencia (proteína) de la cadena pesada variable 7F3
 SEQ ID NO:22 Secuencia (DNA) de la cadena ligera variable 12D4
 SEQ ID NO:23 Secuencia (proteína) de la cadena ligera variable 12D4
 15 SEQ ID NO:24 Secuencia (DNA) de la cadena pesada variable 12D4
 SEQ ID NO:25 Secuencia (proteína) de la cadena pesada variable 12D4
 SEQ ID NO:26 Bucle CDR1 de la cadena pesada variable 7F3
 SEQ ID NO:27 Bucle CDR2 de la cadena pesada variable 7F3
 SEQ ID NO:28 Bucle CDR3 de la cadena pesada variable 7F3
 20 SEQ ID NO:29 Bucle CDR1 de la cadena pesada variable 6C12
 SEQ ID NO:30 Bucle CDR2 de la cadena pesada variable 12D4
 SEQ ID NO:31 Bucle CDR3 de la cadena pesada variable 12D4
 SEQ ID NO:32 Bucle CDR1 de la cadena pesada variable 12D4

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Estructura de C5aR

30 La secuencia de aminoácidos de C5aR humana se proporciona en SEQ ID NO:1.

Los diversos dominios de C5aR humana se definen como sigue:

aminoácidos 1-37 dominio extracelular – término N
 35 aminoácidos 38-61 dominio transmembranal
 aminoácidos 62-71 dominio intracelular
 aminoácidos 72 - 94 dominio transmembranal
 aminoácidos 95 - 110 dominio extracelular - bucle extracelular1
 aminoácidos 111 - 132 dominio transmembranal
 aminoácidos 133.-.149 dominio intracelular
 40 aminoácidos 150.-.174 dominio transmembranal
 aminoácidos 175.-.206 dominio extracelular - bucle extracelular 2
 aminoácidos 207.-.227 dominio transmembranal
 aminoácidos 228.-.242 dominio intracelular
 aminoácidos 243.-.264 dominio transmembranal
 45 aminoácidos 265.-.283 dominio extracelular - bucle extracelular 3
 aminoácidos 284.-.307 dominio transmembranal
 aminoácidos 308.-.350 dominio intracelular – término C

50 Anticuerpos monoclonales y recombinantes

Anticuerpos monoclonales murinos específicos para C5aR, designados 7F3, 6C12 y 12D4, han sido producidos por los presentes inventores como se describe en esta memoria. Sorprendentemente, estos anticuerpos monoclonales (MAbs) son capaces de bloquear sustancial o completamente la fijación de C5a a C5aR. En particular, MAb 7F3 es totalmente neutralizante.

55 En contraste con otros anticuerpos anti-C5aR conocidos, los MAbs 7F3, 6C12 y 12D4 son reactivos con regiones de C5aR distintas de la región N-terminal. Se cree que MAbs 7F3, 6C12 y 12D4 son principalmente reactivos con el segundo bucle extracelular (residuos 175 a 206) de C5aR. Por ejemplo, la reactividad de MAb 12D4 con C5aR es casi totalmente anulada por mutación de los residuos 181 y 192 del segundo bucle extracelular de tirosina a fenilalanina. Esta inhibición fue observada en estudios de fijación que implicaban el mutante de C5aR L2-FF (Farzan et al., J. Exp. Med., 193: 1059-1065, 2001).

60 Debido a la probable conformación y la proximidad íntima de los bucles extracelulares y el dominio N-terminal, los MAbs pueden fijarse también simultáneamente a una región de uno de los otros bucles extracelulares del dominio N-terminal.

Sorprendentemente, se ha observado que los MAbs 7F3, 6C12 y 12D4 son capaces también de inhibir la activación de los neutrófilos por otros ligandos quimioatrayentes. Ejemplos de estos otros ligandos quimioatrayentes incluyen los ligandos de CXCR1 y CXCR2 IL-8, ENA-78 y GPC-2. Esta capacidad para inhibir la función de diferentes receptores quimioatrayentes proporciona una ventaja inusual e inesperada sobre otras moléculas anti-C5aR conocidas. En particular, las moléculas anti-C5aR que son capaces de inhibir la función de receptores quimioatrayentes múltiples de neutrófilos son probablemente muy eficientes como agentes terapéuticos en el tratamiento de trastornos inmunopatológicos.

En un aspecto, la presente invención proporciona anticuerpos que se fijan al segundo bucle extracelular, residuos 175 a 206, de C5aR, sea solos o en conjunción con otros bucles o dominios. En un aspecto preferido, la invención proporciona anticuerpos que se fijan a C5aR y tienen especificidad de epítipo igual o similar a la de uno cualquiera de los MAbs 7F3, 6C12 o 12D4.

El término "anticuerpo", como se utiliza en esta invención incluye moléculas intactas así como fragmentos de las mismas, tales como Fab, F(ab')₂, y Fv que son capaces de fijar el determinante epitépico. Estos fragmentos de anticuerpo tienen cierta capacidad para fijarse selectivamente con su antígeno o receptor y se definen como sigue:

(1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento monovalente de fijación de antígeno de una molécula de anticuerpo puede producirse por digestión del anticuerpo entero con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada;

(2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo puede obtenerse por tratamiento del anticuerpo entero con pepsina, seguido por reducción, para proporcionar una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo;

(3) F(ab')₂, el fragmento del anticuerpo que puede obtenerse por tratamiento del anticuerpo entero con la enzima pepsina sin reducción subsiguiente; F(ab)₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' que se mantienen unidos por dos puentes disulfuro;

(4) Fv, definido como un fragmento diseñado genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas; y

(5) anticuerpo monocatenario ("SCA"), definido como una molécula manipulada genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, unidas por un enlazador polipeptídico adecuado como una molécula monocatenaria fusionada genéticamente.

Métodos para producción de estos fragmentos se conocen en la técnica. (Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1988)).

Como se utiliza en esta invención, el término "epítipo" significa cualquier determinante antigénico en un antígeno al cual se fija el paratopo de un anticuerpo. Los determinantes epitépicos consisten usualmente en agrupaciones de moléculas químicamente tensioactivas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tienen usualmente características estructurales tridimensionales específicas, así como características específicas de carga.

Pueden prepararse anticuerpos contra C5aR utilizando células que expresan C5sR, C5aR intacto o fragmentos que contienen uno o más bucles extracelulares como el antígeno inmunizador. Un péptido utilizado para inmunizar un animal puede derivarse de cDNA traducido o síntesis química y se purifica y conjuga a una proteína portadora, en caso deseado. Tales portadores utilizados comúnmente que están acoplados químicamente al péptido incluyen hemocianina de lapa bocallave (KLH), tiroglobulina, seroalbúmina bovina (BSA), y toxoide del tétanos. El péptido acoplado puede utilizarse luego para inmunizar el animal (v.g., un ratón o un conejo).

Si se desea, los anticuerpos policlonales pueden purificarse ulteriormente, por ejemplo, por fijación a y elución de una matriz a la cual está unido el péptido para el que se generan más anticuerpos. Las personas con experiencia en la técnica conocerán diversos métodos comunes en las técnicas de inmunología para purificación y/o concentración de anticuerpos policlonales, así como anticuerpos monoclonales (véase por ejemplo, Coligan, et al., *Unit 9, Current Protocols in Immunology*, Wiley Interscience, 1991).

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales utilizando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por linajes de células continuos en cultivo, tales como, por ejemplo, la técnica del hibridoma, la técnica del hibridoma de las células B humanas, y la técnica del hibridoma EBW (Kohler et al. *Nature* 256, 495-497, 1975; Kozbor et al., *J. Immunol. Methods* 81, 31-42, 1985; Cote et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2026-2030, 1983; Cole et al., *Mol. Cell Biol.* 62, 109-120, 1984).

Métodos conocidos en la técnica permiten que anticuerpos que exhiben fijación para un bucle extracelular de C5aR sean identificados y aislados a partir de bibliotecas de expresión de anticuerpos. Por ejemplo, un método para la identificación y aislamiento de un dominio de fijación de anticuerpo que exhibe fijación a un bucle extracelular de

C5aR es el sistema vector del bacteriófago. Este sistema vector ha sido utilizado para expresar una biblioteca combinatoria de fragmentos Fab a partir del repertorio de anticuerpos de ratón en *Escherichia coli* (Huse, et al., *Science*, 246: 1275-1281, 1989) y del repertorio de anticuerpos humanos (Mullinax et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:8095-8099, 1990). Esta metodología puede aplicarse también a linajes de células de hibridoma que expresan anticuerpos monoclonales con fijación para un ligando preseleccionado. Hibridomas que secretan un anticuerpo monoclonal deseado pueden producirse de diversas maneras utilizando métodos bien comprendidos por quienes poseen experiencia ordinaria en la técnica, y no se repetirán aquí. Detalles de estas técnicas se describen en referencias tales como *Monoclonal Antibodies-Hybridomas: A New Dimension in Biological Analysis*, editado por Roger H. Kennett, et al., Plenum Press, 1980; y U.S. 4,172,124.

Adicionalmente, métodos de producción de películas químicas de anticuerpo con diversas combinaciones de anticuerpos "humanizados" se conocen en la técnica e incluyen combinar regiones variables murinas con regiones constantes humanas (Cabily, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 3273, 1984), o por injerto de las regiones determinantes de la complementariedad de (CDRs) de anticuerpos murinos en el entramado humano (Riechmann, et al., *Nature* 332:323, 1988).

Esta invención proporciona además anticuerpos quiméricos de los anticuerpos anti-C5aR de la presente invención o fragmentos biológicamente activos de los mismos. Como se utiliza en esta memoria, el término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el cual las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie se combinan con las regiones constantes de anticuerpos derivados de una especie diferente o, alternativamente, se refiere a anticuerpos injertados en CDR. Los anticuerpos quiméricos se construyen por tecnología de DNA recombinante, y se describen en Shaw, et al., *J. Immun.*, 138:4534 (1987), Sun, LK., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:214-218 (1987), por ejemplo.

Cualquiera de los anticuerpos arriba descritos o fragmentos de anticuerpo biológicamente activos pueden utilizarse para generar anticuerpos injertados en CDR y quiméricos. "CDR" o "región determinante de la complementariedad" o "región hipervariable" se define como las secuencias de aminoácidos en las cadenas ligera y pesada del anticuerpo que forman la estructura del bucle tridimensional que contribuye a la formación del sitio de fijación del antígeno.

Como se utiliza en esta memoria, el término anticuerpo de "injertado en CDR" se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos en la cual al menos parte de una o más secuencias CDR del dominio ligero y/o variable han sido reemplazadas por partes análogas de secuencias CDR de un anticuerpo que tiene una especificidad de fijación diferente para un antígeno o receptor dado.

Los términos "región variable de cadena ligera" y "región variable de cadena pesada" se refieren a las regiones o dominios en la porción N-terminal de las cadenas ligera y pesada respectivamente que tienen una secuencia primaria de aminoácidos variada para cada anticuerpo. La región variable del anticuerpo está constituida por el dominio amino-terminal de las cadenas ligera y pesada tales como se pliegan las mismas unidas para formar un sitio de fijación tridimensional para un anticuerpo. Se dice que las secuencias CDR análogas están "injertadas" en el sustrato o anticuerpo receptor. El anticuerpo "donante" es el anticuerpo que proporciona la secuencia CDR, y el anticuerpo que recibe las secuencias sustituidas es el anticuerpo "sustrato". Una persona con experiencia en la técnica puede producir fácilmente estos anticuerpos injertados en CDR utilizando la doctrina proporcionada en esta memoria en combinación con métodos bien conocidos en la técnica (véase Borrebaeck, C.A., *Antibody Engineering: A Practical Guide*, W.H. Freeman and Company, Nueva York, 1992).

La invención proporciona también linajes de células que producen anticuerpos monoclonales de la invención. El aislamiento de linajes de células que producen anticuerpos monoclonales de la invención puede realizarse utilizando técnicas rutinarias de cribado, que permiten la determinación del patrón de reacción elemental del anticuerpo monoclonal de interés. Así, si un anticuerpo monoclonal que se ensaya se fija al segundo bucle extracelular de C5aR y bloquea la actividad biológica mediada por C5a, entonces el anticuerpo monoclonal que se ensaya y el anticuerpo monoclonal producido por los linajes de células de la invención son equivalentes.

Anticuerpos con una especificidad epitópica que es igual que o similar a la de MAbs 7F3, 6C12 y 12D4 pueden identificarse por su capacidad para competir con dicho MAb particular para fijarse a C5aR (v.g., a células portadoras de C5aR, tales como transfectantes portadores de C5aR, monocitos, células dendríticas, macrófagos y basófilos). Utilizando quimeras receptoras (Rucker et al., *Cell* 87:437-446 (1996)) u otros métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, puede mapearse el sitio de fijación de uno cualquiera de los MAbs 7F3, 6C12 o 12D4.

Es posible también determinar, sin experimentación excesiva, si un anticuerpo monoclonal tiene la misma especificidad que un anticuerpo monoclonal de la invención averiguando si el primero evita la fijación del último a un péptido que comprende el segundo bucle extracelular de C5aR. Si el anticuerpo monoclonal que se ensaya compite con el anticuerpo monoclonal de la invención, como se muestra por una disminución en la fijación por el anticuerpo monoclonal de la invención, entonces los dos anticuerpos monoclonales se fijan al mismo epítipo, o un epítipo estrechamente afín.

Otra vía adicional para determinar si un anticuerpo monoclonal tiene la especificidad de un anticuerpo monoclonal de la invención consiste en pre-incubar el anticuerpo monoclonal que se ensaya con un péptido al cual se supone que el anticuerpo es reactivo, y añadir luego el anticuerpo monoclonal de la invención para determinar si el anticuerpo monoclonal de la invención es inhibido en su capacidad para fijar el péptido. Si el anticuerpo monoclonal de la invención es inhibido entonces, con toda probabilidad, el anticuerpo monoclonal que se ensaya tiene la misma especificidad epitópica, o una especificidad funcionalmente equivalente, que el anticuerpo monoclonal de la invención. El cribado de anticuerpos monoclonales de la invención puede realizarse también utilizando péptidos adecuados y determinando si el anticuerpo monoclonal bloquea la fijación de C5a a C5aR.

Utilizando los anticuerpos monoclonales de la invención, es posible producir anticuerpos anti-idiotípicos que pueden utilizarse para cribar los anticuerpos monoclonales a fin de identificar si el anticuerpo tiene la misma especificidad de fijación que un anticuerpo monoclonal de la invención. Estos anticuerpos pueden utilizarse también para propósitos de inmunización (Herlyn, et al., Science, 232:100, 1986). Tales anticuerpos anti-idiotípicos pueden producirse utilizando técnicas de hibridoma bien conocidas (Kohler y Milstein, Nature, 256:495, 1975). Un anticuerpo anti-idiotípico es un anticuerpo que reconoce determinantes singulares presentes en el anticuerpo monoclonal producido por el linaje de células de interés. Estos determinantes están localizados en la región hipervariable del anticuerpo. Es esta región (paratopo) la que se fija a un epítipo dado y, por tanto, es responsable de la especificidad del anticuerpo. Un anticuerpo anti-idiotípico se puede preparar por inmunización de un animal con el anticuerpo inmunizador de interés. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizador y producirá un anticuerpo para estos determinantes idiotípicos. Por utilización de los anticuerpos anti-idiotípicos del animal inmunizado, que son específicos para un anticuerpo monoclonal de la invención producido por un linaje de células que se utilizó para inmunizar el segundo animal, es posible identificar otros clones con el mismo idiotipo que el anticuerpo del hibridoma utilizado para inmunización. La identidad idiotípica entre anticuerpos monoclonales de dos linajes de células demuestra que los dos anticuerpos monoclonales son iguales con respecto a su reconocimiento del mismo determinante epitópico. Así, por utilización de anticuerpos anti-idiotípicos, es posible identificar otros hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales que tienen la misma especificidad epitópica.

Es posible también utilizar la tecnología anti-idiotipo para producir anticuerpos monoclonales que mimetizan un epítipo. Por ejemplo, un anticuerpo anti-idiotípico monoclonal producido a partir de un primer anticuerpo monoclonal tendrá un dominio de fijación en la región hipervariable que es la "imagen" del epítipo fijado por el primer anticuerpo monoclonal. Así, el anticuerpo anti-idiotípico monoclonal puede utilizarse para inmunización, dado que el dominio de fijación del anticuerpo anti-idiotípico monoclonal actúa de hecho como antígeno. Fragmentos de anticuerpo que contienen sitios de fijación epitópicos de uno cualquiera de los MAbs de la presente invención pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, el DNA que codifica la región hipervariable puede clonarse, utilizando procedimientos estándar de DNA recombinante tales como los descritos en esta memoria, es un hospedador adecuado.

Anticuerpos preferidos de la presente invención comprenden regiones variables de uno o más bucles CDR que son sustancialmente iguales que los de los MAbs 7F3, 6C12 o 12D4. Se comprenderá que las regiones variables o los bucles de CDR que se muestran en los listados de secuencia pueden modificarse para uso en la presente invención. Típicamente, se hacen modificaciones que mantienen la especificidad de fijación de la secuencia. Pueden hacerse sustituciones conservadoras, por ejemplo, sin afectar a la especificidad de fijación del anticuerpo. Así, en una realización, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos, por ejemplo de 1, 2 ó 3 a 10, 20 ó 30 sustituciones con tal que la secuencia codificada retenga sustancialmente la misma especificidad de fijación. No obstante, en una realización alternativa, pueden hacerse modificaciones de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de la invención intencionalmente para reducir la actividad biológica del anticuerpo. Por ejemplo, anticuerpos modificados que se mantienen capaces de fijarse a C5aR pero carecen de dominios secretores funcionales pueden ser útiles como inhibidores de la actividad biológica de C5aR.

Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir también el uso de análogos no existentes naturalmente, por ejemplo para aumentar la semivida en plasma sanguíneo de un anticuerpo administrado terapéuticamente.

En general, preferiblemente menos de 20%, 10%, o 5% de los residuos de aminoácido o de una variante o derivado están alterados en comparación con las regiones variables o los bucles CDR correspondientes representados en los listados de secuencias.

En el contexto de la presente invención, una secuencia "sustancialmente igual" que una de las regiones variables representadas en el listado de secuencias puede incluir una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85% o 90% idéntica, preferiblemente al menos 95 ó 98% idéntica al nivel de aminoácidos en al menos 20, preferiblemente al menos 50 aminoácidos con dicha región variable. La homología debería considerarse típicamente con respecto a aquellas regiones de la secuencia que se sabe son esenciales para la especificidad de fijación más bien que a secuencias no esenciales vecinas.

Las comparaciones de homología pueden realizarse a simple vista, o más usualmente, con ayuda de programas de comparación de secuencia disponibles fácilmente. Estos programas de computadora disponibles comercialmente pueden calcular el porcentaje de homología entre dos o más secuencias.

El porcentaje de homología puede calcularse con respecto a secuencias contiguas, es decir, una secuencia está alineada con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia compararse directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un residuo cada vez. Esto se conoce como un alineamiento "sin lagunas".
 5 Típicamente, tales alineaciones sin lagunas se realizan sólo a lo largo de un número relativamente corto de residuos (por ejemplo menos de 50 aminoácidos contiguos).

Aunque éste es un método muy simple y consistente, no tiene en cuenta que, por ejemplo, en un par de secuencias idénticas por lo demás, una inserción o delección puede hacer que los residuos de aminoácido siguientes queden desalineados, dando así potencialmente como resultado una gran reducción en el % de homología cuando se realiza una alineamiento global. Por consiguiente, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineaciones óptimas que tienen en consideración las posibles inserciones y delecciones sin penalización excesiva del registro de homología global. Esto se logra por inserción de "lagunas" en el alineamiento de secuencias para intentar maximizar la homología local.
 10

La mayoría de los programas de alineamiento permiten modificar las penalidades por laguna. Sin embargo, se prefiere utilizar los valores por defecto cuando se utiliza dicho software para comparaciones de secuencias. Por ejemplo, cuando se utiliza el paquete Wisconsin Bestfit de GCG (véase más adelante) la penalidad de laguna por defecto para secuencias de aminoácidos es -12 por laguna y -4 por cada extensión.
 15

El cálculo del % máximo de homología requiere por tanto en primer lugar la producción de un alineamiento óptimo, teniendo en consideración las penalidades por laguna. Un programa de computadora adecuado para realización de un alineamiento de este tipo es el paquete Wisconsin Bestfit de GCG (Universidad de Wisconsin, EE.UU.; Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12: 387). Ejemplos de otro software que puede realizar comparaciones de secuencia incluyen, pero sin carácter limitante, el paquete BLAST (véase Ausubel et al., 1999 ibid – Capítulo 18), FASTA (Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 403-410) y el conjunto de herramientas de comparación de GENWORKS. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para búsquedas en línea y fuera de línea (véase Ausubel et al., 1999 ibid, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, se prefiere utilizar el programa Bestfit de GCG.
 20

Aunque el % final de homología puede medirse en términos de identidad, el proceso de alineamiento propiamente dicho no está basado típicamente en una comparación por pares de tipo "todo-o-nada". En lugar de ello, se utiliza generalmente una matriz de registro de semejanza en escala que asigna registros para cada comparación por pares basados en semejanza química o distancia evolutiva. Un ejemplo de una matriz de este tipo utilizada comúnmente es la matriz BLOSUM62 - la matriz por defecto para el conjunto de programas BLAST. Los programas Wisconsin de GCG utilizan generalmente los valores públicos por defecto o una tabla de comparación de símbolos habitual si está suministrada (véase el manual de usuario para detalles adicionales). Se prefiere utilizar los valores públicos por defecto para el paquete GCG, o en el caso de otro software, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.
 25

Una vez que el software ha producido un alineamiento óptimo., es posible calcular el % de homología, preferiblemente % de identidad de secuencia. El software hace esto típicamente como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.
 30

Humanización de anticuerpos

Se prefiere que un anticuerpo de la presente invención esté humanizado, es decir, sea un anticuerpo producido por técnicas de modelización molecular en las cuales el contenido humano del anticuerpo se maximiza al tiempo que causa poca o ninguna pérdida de afinidad de fijación atribuible a la región variable del anticuerpo murino. Así, en una realización, la invención proporciona un anticuerpo quimérico que comprende la secuencia de aminoácidos de una región de entramado humana y de una región constante de un anticuerpo humano a fin de humanizar o hacer no inmunógena la región hipervariable de un anticuerpo monoclonal de ratón tal como 7F3, 6C12 o 12D4.
 35

Los métodos descritos a continuación son aplicables a la humanización de una gran diversidad de anticuerpos animales. Puede utilizarse un enfoque de dos pasos que implica (a) seleccionar secuencias de anticuerpo humanas que se utilizan como entramados humanos para humanización, y (b) determinar qué residuos de región variable del anticuerpo monoclonal animal debería seleccionarse para inserción en el entramado humano seleccionado.
 40

El primer paso implica selección de las secuencias de entramado humano mejores disponibles para las cuales está disponible información de secuencia. Este proceso de selección está basado en los criterios de selección siguientes.
 45

(1) Porcentajes de Identidad

Las secuencias de las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo monoclonal animal que debe humanizarse se alinean óptimamente y se comparan preferiblemente con todas las secuencias de región variable de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpos humanos conocidas.
 50

Una vez que las secuencias se han comparado de este modo, se anotan las identidades de residuos y se
 55

determinan los porcentajes de identidad. Siendo iguales todos los restantes factores, es deseable seleccionar un anticuerpo humano que tenga la máxima identidad porcentual con el anticuerpo animal.

(2) Ambigüedades de Secuencia

Las secuencias de cadena de anticuerpo humana conocidas se evalúan luego en cuanto a la presencia de residuos no identificados y/o ambigüedades, que son incertidumbre de secuencia. Las más comunes de dichas incertidumbres son identificación equivocada de un aminoácido de carácter ácido por un aminoácido amídico debida a la pérdida de amoníaco durante el procedimiento de secuenciación, v.g., identificación incorrecta de un residuo ácido glutámico, cuando el residuo presente realmente en la proteína era un residuo glutamina. Siendo iguales todos los factores restantes, es deseable seleccionar una cadena de anticuerpo humana que tenga el número menor posible de tales ambigüedades.

(3) Espaciamiento de la Región Pin

Las regiones variables de cadena de anticuerpos contienen puentes disulfuro intra-dominio. La distancia (número de residuos) entre los residuos cisteína que comprenden estos puentes se conoce como el espaciamiento de la región Pin [Chothia et al., J. Mol. Biol. 126: 901 81987]. Siendo iguales todos los factores restantes, es muy deseable que el espaciamiento de la región Pin de un anticuerpo humano seleccionado sea similar o idéntico al del anticuerpo animal. Es deseable también que el espaciamiento de la región Pin de la secuencia humana sea similar al de una estructura tridimensional de anticuerpo conocida, a fin de facilitar la modelización por computadora.

Basándose en los criterios que anteceden, el anticuerpo (o anticuerpos) humano(s) que tiene la mejor combinación global de características deseables se selecciona como el entramado para humanización del anticuerpo animal. Las cadenas pesada y ligera seleccionadas pueden ser del mismo o diferentes anticuerpos humanos.

El segundo paso en los métodos de la esta invención implica la determinación de cuál de las secuencias de reacción variable del anticuerpo animal debería seleccionarse para injertar en el entramado humano. Este proceso de selección está basado en los criterios de selección siguientes:

(1) Selección de Residuos

Se evalúan dos tipos de región variable potencial en las secuencias de anticuerpos animales, los primeros de los cuales se conocen como "residuos mínimos". Estos residuos mínimos comprenden bucles estructurales CDR más cualesquiera residuos adicionales requeridos, como se muestra por modelización por computadora, que soportan y/u orientan los bucles estructurales CDR.

El otro tipo de residuos potenciales de región variable se conocen como "residuos máximos". Estos comprenden los residuos mínimos más cualesquiera residuos adicionales que, como se determina mediante modelización por computadora, caen dentro de aproximadamente 10 / de los residuos de bucle estructural CDR y poseen una superficie accesible al disolvente agua [Lee et al, J. Biol. Chem. 55:379 (1971)].

(2) Modelización por Computadora

Para identificar residuos de región variables potenciales, se realiza modelización por computadora sobre (a) las secuencias de región variable del anticuerpo animal que deben humanizarse, (b) las secuencias de entramado de anticuerpos humanos seleccionadas, y (c) todos los anticuerpos recombinantes posibles que comprenden las secuencias de entramado de anticuerpo humano en las cuales se han injertado los diversos residuos de anticuerpo animal mínimos y máximos.

La modelización por computadora se realiza utilizando software adecuado para modelización de proteínas e información estructural obtenida a partir de un anticuerpo que (a) tiene secuencias de aminoácido de la región variable que son las más aproximadamente idénticas a las del anticuerpo animal y (b) tiene una estructura tridimensional conocida. Un ejemplo de software que puede utilizarse es el software SYBYL Biopolymer Module (Tripos Associates). El anticuerpo del que puede obtenerse información estructural puede ser, pero sin carácter necesario, un anticuerpo humano.

Basándose en los resultados obtenidos en el análisis que antecede, se seleccionan para humanización las cadenas recombinantes que contienen las regiones variables animales que producen una estructura de modelización por computadora que se aproximan más de cerca a la del anticuerpo animal.

Isotipos de Anticuerpos

En ciertas circunstancias, los anticuerpos monoclonales de un isotipo podrían ser más preferibles que los de otro en términos de su eficacia diagnóstica o terapéutica. Por ejemplo, por estudios de citólisis mediada por anticuerpos se sabe que los anticuerpos monoclonales de ratón sin modificar de los isotipos gamma-2a y gamma-3 son

generalmente más eficaces en lo que se refiere al lisado de células diana que los anticuerpos del isotipo gamma-1. Se cree que esta eficacia diferencial es debida a la capacidad de los isotipos gamma-2a y gamma-3 para participar más activamente en la destrucción citolítica de las células diana. Isotipos particulares de un anticuerpo monoclonal pueden prepararse en segundo lugar, a partir de un hibridoma parental que secreta anticuerpos monoclonales de isotipo diferente, por utilización de la técnica de selección de parientes para aislar variantes de cambio de clase (Steplewski, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:8653,1985; Spira, et al., J. Immunol. Methods, 74:307, 1984). Así, los anticuerpos monoclonales de la invención podrían incluir variantes de cambio de clase que tengan la especificidad de uno cualquiera de los MAbs 7F3, 6C12 y 12D4.

10 Ensayos in vitro

Los anticuerpos monoclonales de la invención son adecuados para uso in vitro, por ejemplo, en inmunoensayos en los cuales pueden utilizarse los mismos en fase líquida o fijados a un portador en fase sólida. Los anticuerpos pueden ser útiles para monitorización del nivel de C5aR en una muestra. De manera análoga, anticuerpos anti-idiotipo son útiles para medida del nivel de C5a en una muestra. Adicionalmente, los anticuerpos monoclonales en estos inmunoensayos pueden marcarse detectablemente de diversas maneras. Ejemplos de tipos de inmunoensayos que pueden utilizar anticuerpos monoclonales de la invención son inmunoensayos competitivos y no competitivos en formato directo o indirecto. Ejemplos de tales inmunoensayos son el radioinmunoensayo (RIA) y el ensayo sándwich (inmunométrico). La detección de los antígenos que utilizan los anticuerpos monoclonales de la invención puede realizarse utilizando inmunoensayos que se ejecutan en modos directo, inverso, o simultáneo, con inclusión de ensayos inmunohistoquímicos sobre muestras fisiológicas. Los expertos en la técnica conocerán, o podrán averiguar fácilmente, otros formatos de inmunoensayo sin experimentación excesiva.

Los anticuerpos de la invención pueden fijarse a muchos portadores diferentes y utilizarse para detectar la presencia de C5aR. Ejemplos de portadores bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble para los propósitos de la invención. Los expertos en la técnica conocerán otros portadores adecuados para fijación de anticuerpos monoclonales, o serán capaces de averiguar los mismos, utilizando experimentación de rutina.

Células que expresan naturalmente C5aR o células que comprenden una secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica un C5aR o variante del mismo pueden utilizarse en ensayos de fijación. Las células se mantienen en condiciones apropiadas para la expresión del receptor. Las células se ponen en contacto con un anticuerpo o fragmento en condiciones adecuadas para fijación (v.g., en un tampón de fijación adecuado), y la fijación se detecta por técnicas estándar. Para determinar la fijación, puede determinarse la extensión de fijación con relación a un control adecuado (v.g., comparada con el ruido de fondo determinado en ausencia de anticuerpo, comparada con la fijación de un segundo anticuerpo (a saber, un estándar), comparada con la fijación del anticuerpo a células no transfectadas). Una fracción celular, tal como una fracción de membrana, que contiene receptor, o liposomas que comprenden receptor pueden utilizarse en lugar de células enteras.

Pueden utilizarse también ensayos de inhibición de la fijación para identificar anticuerpos o fragmentos de los mismos que fijan C5aR e inhiben la fijación de C5a a C5aR o una variante funcional. Por ejemplo, puede realizarse un ensayo de fijación en el cual se detecta o mide una reducción en la fijación de C5a (en presencia del anticuerpo), comparada con la fijación de C5a en ausencia del anticuerpo. Una composición que comprende un C5aR de mamífero aislado y/o recombinante o variante funcional del mismo puede ponerse en contacto con C5a y anticuerpo simultáneamente, o uno después del otro, en cualquier orden. Una reducción en la extensión de la fijación del ligando en presencia del anticuerpo es indicativa de inhibición de la fijación por el anticuerpo. Por ejemplo, la fijación del ligando podría disminuirse o anularse.

Están disponibles otros métodos de identificación de la presencia de un anticuerpo que fija C5aR, tales como otros ensayos de fijación adecuados, o métodos que monitorizan eventos que son desencadenados por fijación de receptores, con inclusión de la función de señalización y/o estimulación de una respuesta celular (v.g. tráfico de leucocitos). Los anticuerpos que se identifican de esta manera pueden evaluarse luego para determinar si, subsiguientemente a la fijación, los mismos actúan para inhibir otras funciones de C5aR y/o para evaluar su utilidad terapéutica.

Ensayos de señalización

La fijación de un ligando o promotor, tal como un agonista, a C5aR puede dar como resultado la señalización por este receptor acoplado a proteína G, y se estimula la actividad de las proteínas G así como otras moléculas de señalización intracelular. La inducción de la función de señalización por un compuesto (v.g., un anticuerpo o fragmento del mismo) puede monitorizarse utilizando cualquier método adecuado. Un ensayo de este tipo puede utilizarse para identificar agonistas de anticuerpos de C5aR. La actividad inhibitoria de un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo puede determinarse utilizando un ligando o promotor en el ensayo, y evaluando la capacidad del anticuerpo para inhibir la actividad inducida por el ligando o promotor.

La actividad de proteína G, tal como hidrólisis de GTP a GDP, o eventos de señalización posteriores desencadenados por fijación de receptores, tales como inducción de aumento rápido y transitorio en la concentración de calcio libre intracelular (citósólico) pueden ensayarse por métodos conocidos en la técnica u otros métodos adecuados (véase, por ejemplo, Neote, K. et al., Cell, 72: 415-425, 1993; Van Riper et al., J. Exp. Med., 177: 851-856, 1993; Dahinden, C. A. et al., J. Exp. Med., 179: 751-756, 1994).

Por ejemplo, el ensayo funcional de Sledziewski et al., utilizando receptores híbridos acoplados a proteína G puede utilizarse para monitorizar la capacidad de un ligando o promotor para fijarse al receptor y activar una proteína G (Sledziewski et al., Patente U.S. No. 5.284.746).

Tales ensayos pueden realizarse en presencia del anticuerpo o fragmento del mismo a evaluar, y la capacidad del anticuerpo o fragmento para inhibir la actividad inducida por el ligando promotor se determina utilizando métodos conocidos y/o métodos descritos en esta memoria.

15 Quimiotaxis y Ensayos de Estimulación Celular

Pueden utilizarse también ensayos de quimiotaxis para evaluar la capacidad de un anticuerpo o fragmento funcional del mismo para bloquear la fijación de un ligando C5aR y/o inhibir la función asociada con la fijación de ligando al receptor. Estos ensayos están basados en la migración funcional de células in vitro o in vivo inducida por un compuesto. La quimiotaxis puede ser evaluada por cualquier medio adecuado, por ejemplo, en un ensayo que utiliza una placa de quimiotaxis de 96 pocillos, o utilizando otros métodos reconocidos en la técnica para evaluación de la quimiotaxis. Por ejemplo, el uso de un ensayo de quimiotaxis transendotelial in vitro ha sido descrito por Springer et al. (Springer et al., WO 94/20142, publicado el 15 de septiembre de 1994; véase también Berman et al., Immunol. Invest. 17:625-677 (1988)). La migración a través del endotelio a geles de colágeno ha sido descrita también (Kavanaugh et al., J. Immunol. 146: 4149-4156 (1991)). Transfectantes estables de células (pre-B) de ratón LI-1 o de otras células hospedadoras adecuadas susceptibles de quimiotaxis pueden utilizarse en ensayos de quimiotaxis.

Generalmente, los ensayos de quimiotaxis monitorizan el movimiento direccional o migración de una célula adecuada (tal como un leucocito (v.g., linfocito, eosinófilo, basófilo)) en o a través de una barrera (v.g., endotelio, un filtro), hacia niveles incrementados de un compuesto, desde una primera superficie de la barrera hacia una segunda superficie opuesta. Las membranas o filtros proporcionan barreras convenientes, de tal modo que se monitoriza el movimiento o migración direccional de una célula adecuada hacia o a través de un filtro, hacia niveles incrementados de un compuesto, desde una primera superficie del filtro hacia una segunda superficie opuesta del filtro. En algunos ensayos, la membrana está recubierta con una sustancia para facilitar la adhesión, tal como ICAM-1, fibronectina o colágeno. Tales ensayos proporcionan una aproximación in vitro de "regreso" de los leucocitos.

Por ejemplo, es posible detectar o medir la inhibición de la migración de las células en un recipiente adecuado (un medio de contención), desde una primera cámara a o a través de una membrana microporosa a una segunda cámara que contiene un anticuerpo a ensayar, y que está separada de la primera cámara por la membrana. Se selecciona una membrana adecuada, que tiene un tamaño de poro adecuado para monitorización de la migración específica en respuesta al compuesto, con inclusión, por ejemplo, de nitrocelulosa o policarbonato. Por ejemplo, pueden utilizarse tamaños de poro de aproximadamente 3-8 micrómetros, y con preferencia aproximadamente 5-8 micrómetros. El tamaño de poro puede ser uniforme en un filtro o estar comprendido dentro de una gama de tamaños de poro adecuados.

Para evaluar la migración y la inhibición de la migración, la distancia de migración en el filtro, el número de células que atraviesan el filtro que pueden quedar adherentes a la segunda superficie del filtro, y/o el número de células que se acumulan en la segunda cámara pueden determinarse utilizando técnicas estándar (v.g., microscopía). En una realización, las células se marcan con un marcador detectable (v.g. radioisótopo, marcador fluorescente, marcador de antígeno o epítipo), y la migración puede evaluarse en presencia y ausencia del anticuerpo o fragmento por determinación de la presencia del marcador adherente a la membrana y/o presente en la segunda cámara utilizando un método apropiado (v.g., por detección de radiactividad, fluorescencia, inmunoensayo). Puede determinarse la extensión de migración inducida por un agonista de anticuerpo con relación a un control adecuado (v.g., comparada con la migración de ruido de fondo determinada en ausencia del anticuerpo, comparada con la extensión de migración inducida por un segundo compuesto (a saber, un estándar), comparada con la migración de células no transfectadas inducida por el anticuerpo). En una realización, particularmente para células T, monocitos o células que expresan C5aR, puede monitorizarse la migración transendotelial. En esta realización, se evalúa la transmigración a través de una capa de células endoteliales. Para preparar la capa de células, las células endoteliales pueden cultivarse sobre un filtro microporoso o membrana, recubierto opcionalmente con una sustancia tal como colágeno, fibronectina, u otras proteínas de la matriz extracelular, a fin de facilitar la fijación de las células endoteliales. Preferentemente, las células endoteliales se cultivan hasta que se forma una monocapa confluyente. Pueden estar disponibles una diversidad de células endoteliales de mamífero para formación de la monocapa, con inclusión, por ejemplo, de endotelio venoso, arterial o microvascular, tales como células endoteliales de la vena umbilical humana (Clonetics Corp. San Diego, Calif.). Para ensayar la quimiotaxis en respuesta a un receptor particular de mamífero, se prefieren células endoteliales del mismo mamífero; sin embargo, pueden utilizarse también células endoteliales de una especie o género de mamífero heterólogo.

Generalmente, el ensayo se realiza por detección de la migración direccional de células en o a través de una membrana o filtro, en dirección hacia los niveles aumentados de un compuesto, desde una primera superficie del filtro hacia una segunda superficie opuesta del filtro, en donde el filtro contiene una capa de células endoteliales en una primera superficie. La migración direccional ocurre desde el área adyacente a la primera superficie, a o a través de la membrana, hacia un compuesto situado en el lado opuesto del filtro. La concentración de compuesto presente en el área adyacente a la segunda superficie, es mayor que la existente en el área adyacente a la primera superficie.

En una realización utilizada para ensayar un inhibidor de anticuerpo, una composición que comprende células capaces de migración y que expresan C5aR puede ponerse en la primera cámara. Una composición que comprende uno o más ligandos o promotores capaces de inducir quimiotaxis de las células en la primera cámara (que tiene función quimioatrayente) se coloca en la segunda cámara. Preferentemente, poco antes de disponer las células en la primera cámara, o simultáneamente con las células, se dispone una composición que comprende el anticuerpo a testar, preferiblemente, en la primera cámara. Los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que pueden fijarse al receptor e inhibir la inducción de quimiotaxis, por un ligando o promotor, de las células que expresan C5aR en este ensayo son inhibidores de la función del receptor (v.g., inhibidores de la función estimulante). Una reducción en la extensión de la migración inducida por el ligando o promotor en presencia del anticuerpo o fragmento es indicativa de actividad inhibitoria. Estudios separados de fijación podrían realizarse para determinar si la inhibición es resultado de la fijación del anticuerpo al receptor u ocurre por un mecanismo diferente.

A continuación se describen ensayos in vivo que monitorizan la infiltración de leucocitos de un tejido, en respuesta a la inyección de un compuesto (v.g., quimiocina o anticuerpo) en el tejido, (véase Modelos de Inflamación). Estos modelos de retorno in vivo miden la capacidad de las células para responder a un ligando o promotor por emigración y quimiotaxis a un sitio de inflamación y para evaluar la capacidad de un anticuerpo o fragmento del mismo para bloquear esta emigración.

Además de los métodos descritos, los efectos de un anticuerpo o fragmento sobre la función estimuladora de C5aR pueden evaluarse por monitorización de las respuestas celulares inducidas por el receptor activo, utilizando células hospedadoras adecuadas que contienen el receptor.

Identificación de Ligandos, Inhibidores y/o Promotores de C5aR Adicionales

Los ensayos arriba descritos, que pueden utilizarse para evaluar la fijación y función de los anticuerpos y fragmentos de la presente invención, pueden adaptarse para identificar ligandos u otras sustancias adicionales que fijan C5aR o variantes funcionales del mismo, así como inhibidores y/o promotores de la función de C5aR. Por ejemplo, agentes que tienen la misma o similar especificidad de fijación que la de un anticuerpo de la presente invención o porción funcional del mismo pueden identificarse por un ensayo de competición con dicho anticuerpo o porción del mismo. Así, los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse en métodos de identificación de ligandos del receptor u otras sustancias que fijan C5aR, así como inhibidores (v.g., antagonistas) o promotores (v.g., agonistas) de la función del receptor. En una realización, células que llevan una proteína C5aR o variante funcional de la misma (v.g., leucocitos, líneas de células o células hospedadoras adecuadas que han sido diseñadas por ingeniería para expresar una proteína C5aR de mamífero o variante funcional codificada por un ácido nucleico introducido en dichas células) se utilizan en un ensayo para identificar y evaluar la eficacia de ligandos u otras sustancias que se fijan al receptor, con inclusión de inhibidores o promotores de la función del receptor. Tales células son útiles también en el ensayo de la función de la proteína o polipéptido receptor expresada.

Ligandos y otras sustancias que se fijan al receptor, inhibidores y promotores de la función del receptor pueden identificarse en un ensayo adecuado, y evaluarse ulteriormente en cuanto a efecto terapéutico. Pueden utilizarse antagonistas de la función del receptor para inhibir (reducir o prevenir) la actividad del receptor, y pueden utilizarse ligandos y/o agonistas para inducir (desencadenar o aumentar) la función normal del receptor en caso indicado. Así, un antagonista de la función del receptor, identificado en un método que utiliza anticuerpos de la presente invención, puede utilizarse en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, con inclusión de enfermedad autoinmune y rechazo de injertos. Adicionalmente, un nuevo ligando o agonista de la función del receptor, identificado en un método que utiliza anticuerpos de la presente invención, puede proporcionar un nuevo enfoque para la estimulación selectiva de la función de los leucocitos, lo cual es útil, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades infecciosas y cáncer.

Como se utiliza en esta memoria, un "ligando" de una proteína C5aR hace referencia a una clase particular de sustancias que se fijan a una proteína C5aR de mamífero, con inclusión de ligandos naturales y formas sintéticas y/o recombinantes de ligandos naturales. En una realización preferida, la fijación de ligando de una proteína C5aR ocurre con afinidad alta.

Como se utiliza en esta memoria, un "antagonista" es una sustancia que inhibe (reduce o evita) al menos una función característica de una proteína C5aR tal como una actividad de fijación (v.g., fijación de ligando, fijación de promotor, fijación de anticuerpo), una actividad de señalización (v.g., activación de una proteína G de mamífero, inducción de aumento rápido y transitorio en la concentración de calcio libre citosólico) y/o función de respuesta

celular (v.g., estimulación de quimiotaxis, exocitosis o liberación de mediadores inflamatorios por los leucocitos). El término antagonista abarca sustancias que se fijan al receptor (v.g., un anticuerpo, un mutante de ligando natural, moléculas orgánicas de bajo peso molecular, otros inhibidores competitivos de la fijación de ligandos), y sustancias que inhiben la función del receptor sin fijarse al mismo (v.g., un anticuerpo anti-idiotípico).

5 Como se utiliza en esta memoria, un "agonista" es una sustancia que promueve (induce, causa, mejora o aumenta) al menos una función característica de una proteína C5aR tal como una actividad de fijación (v.g., fijación de ligando, inhibidor y/o promotor), una actividad de señalización (v.g., activación de una proteína G de mamífero, inducción de aumento rápido y transitorio en la concentración de calcio libre citosólico) y/o una función de respuesta celular (v.g., estimulación de la quimiotaxis, exocitosis o liberación de mediadores inflamatorios por los leucocitos). El término agonista abarca sustancias que se fijan al receptor (v.g., un anticuerpo, un homólogo de un ligando natural de otra especie), y sustancias que promueven la función del receptor sin fijarse al mismo (v.g., por activación de una proteína asociada). En una realización preferida, el agonista es distinto de un homólogo de un ligando natural.

15 Así pues, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse también en un método de detección o identificación de un agente que se fija a C5aR o variante de fijación de ligando del mismo, con inclusión de ligandos, antagonistas, agonistas, y otras sustancias que se fijan a C5aR o variante funcional. De acuerdo con el método, puede combinarse un agente a testar, un anticuerpo o fragmento de fijación de antígeno de la presente invención (v.g., un anticuerpo que tiene una especificidad epitópica que es la misma que o similar a la de 7F3, y fragmentos de fijación de antígeno del mismo) y una composición que comprende un C5aR o una variante de fijación de ligando del mismo. Los componentes que anteceden se combinan en condiciones adecuadas para fijación del anticuerpo o fragmento de fijación de antígeno a C5aR, y la fijación del anticuerpo o fragmento a C5aR se detecta o mide, directa o indirectamente, conforme a métodos descritos en esta memoria u otros métodos adecuados. Una disminución en la cantidad de complejo formada con relación a un control adecuado (v.g., en ausencia del agente a testar) es indicativa de que el agente se fija a dicho receptor o variante. La composición que comprende C5aR puede ser una fracción de membrana de una célula portadora de la proteína C5aR recombinante o variante de fijación de ligando de la misma. El anticuerpo o fragmento del mismo puede estar marcado con un marcador tal como un radioisótopo, marcador de espín, marcador de antígeno o epitopo, marcador enzimático, grupo fluorescente y grupo quimioluminiscente.

30 Modelos de Inflamación

Están disponibles modelos de inflamación in vivo que pueden utilizarse para evaluar los efectos de los anticuerpos y fragmentos de la invención in vivo como agentes terapéuticos. Por ejemplo, la infiltración de leucocitos después de fracción intradérmica de una quimiocina y un anticuerpo o fragmento del mismo reactivo con C5aR en un animal adecuado, tal como conejo, ratón, rata, cobayo o macaco Rhesus puede monitorizarse (véase v.g., Van Damme, J. et al., J. Exp. Med., 176: 59-65 (1992); Zachariae, C. O. C. et al., J. Exp. Med. 171: 2177-2182 (1990); Jose, P. J. et al., J. Exp. Med. 179: 881-887 (1994)). En una realización, se evalúan histológicamente biopsias de piel respecto a infiltración de leucocitos (v.g., eosinófilos, granulocitos). En otra realización, se administran al animal células marcadas (v.g., células transfectadas de manera estable que expresan C5aR) susceptibles de quimiotaxis y extravasación. Un anticuerpo o fragmento a evaluar puede administrarse, sea antes, simultáneamente a o después de administrar las células marcadas al animal de test. Una disminución de la magnitud de infiltración en presencia de anticuerpo en comparación con la magnitud de infiltración en ausencia de inhibidor es indicativa de inhibición.

45 Aplicaciones Diagnósticas y Terapéuticas

Los anticuerpos y fragmentos de la presente invención son útiles en una diversidad de aplicaciones, que incluyen aplicaciones de investigación, diagnósticas y terapéuticas. En una realización, los anticuerpos se marcan con un marcador adecuado (v.g. marcador fluorescente, marcador quimioluminiscente, marcador isotópico, marcador antigénico o epitópico o marcador enzimático). Por ejemplo, los mismos pueden utilizarse para aislar y/o purificar un receptor o porciones del mismo, y para estudiar la estructura (v.g. conformación) del receptor y función del receptor.

Adicionalmente, los diversos anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse para detectar C5aR o para medir la expresión del receptor, por ejemplo, en células T (v.g., células CD8+, células CD45RO+), monocitos y/o en células transfectadas con un gen del receptor. Así, aquéllos tienen también utilidad en aplicaciones tales como clasificación de células (v.g., citometría de flujo, clasificación de células activadas por fluorescencia), para propósitos diagnósticos o de investigación.

Los anticuerpos anti-C5aR de la presente invención tienen valor en aplicaciones diagnósticas. Típicamente, los ensayos diagnósticos implican detección de la formación de un complejo resultante de la fijación de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo a C5aR. Para propósitos diagnósticos, los anticuerpos o fragmentos de fijación de antígeno pueden estar marcados o sin marcar. Los anticuerpos o fragmentos pueden marcarse directamente. Pueden emplearse una diversidad de marcadores, que incluyen, pero sin carácter limitante, radionucleidos, agentes de fluorescencia, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos y ligandos (v.g., biotina, haptenos). Numerosos inmunoensayos apropiados son conocidos por el profesional experto (véanse, por ejemplo, las Patentes U.S. Núms. 3.817.827; 3.850.752; 3.901.654 y 4.098.876). La inmunohistoquímica de

muestras de tejidos puede utilizarse también en los métodos de diagnóstico de la presente invención. Cuando están sin marcar, los anticuerpos o fragmentos pueden detectarse utilizando medios adecuados, tales como ensayos de aglutinación, por ejemplo. Los anticuerpos o fragmentos sin marcar pueden ser utilizados también en combinación con otro (a saber, uno o más) reactivo(s) adecuado(s) que pueden utilizarse para detectar un anticuerpo, tal como un anticuerpo marcado (es decir, un segundo anticuerpo) reactivo con el primer anticuerpo (v.g., anticuerpos anti-idiotípicos u otros anticuerpos que son específicos para la inmunoglobulina sin marcar) u otro reactivo adecuado (v.g., proteína A marcada).

Pueden prepararse también kits para uso en la detección de la presencia de una proteína C5aR en una muestra biológica. Tales kits incluirán un anticuerpo o fragmento funcional del mismo que se fija a C5aR, así como uno o más reactivos auxiliares adecuados para detectar la presencia de un complejo entre el anticuerpo o fragmento y C5aR. Las composiciones de anticuerpos de la presente invención pueden proporcionarse en forma liofilizada, sea solos o en combinación con anticuerpos adicionales específicos para otros epítomos. Los anticuerpos, que pueden estar marcados o sin marcar, pueden incluirse en los kits con ingredientes adyuvantes (v.g., tampones, tales como Tris, fosfato y carbonato, estabilizadores, excipientes, biocidas y/o proteínas inertes, v.g., seroalbúmina bovina). Por ejemplo, los anticuerpos pueden proporcionarse como una mezcla liofilizada con los ingredientes adyuvantes, o los ingredientes adyuvantes pueden proporcionarse por separado para combinación por el usuario. Generalmente, estos materiales adyuvantes estarán presentes en cantidades menores que aproximadamente 5% en peso basadas en la cantidad de anticuerpo activo, y usualmente estarán presentes en una cantidad total de al menos aproximadamente 0,001% en peso basada en la concentración de anticuerpo. En el caso de que se emplee un segundo anticuerpo capaz de fijarse al anticuerpo monoclonal, dicho anticuerpo puede proporcionarse en el kit, por ejemplo en un vial o recipiente separado. El segundo anticuerpo, si está presente, está marcado típicamente, y puede formularse de manera análoga con las formulaciones de anticuerpo descritas anteriormente.

De modo análogo, los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse en un método de detección y/o cuantificación de la expresión de C5aR por una célula, en el cual una composición que comprende una célula o fracción de la misma (v.g., fracción de membrana) se pone en contacto con un anticuerpo o fragmento funcional del mismo que se fija a C5aR en condiciones apropiadas para fijación al mismo del anticuerpo o fragmento, y se monitoriza la fijación. La detección del anticuerpo, indicativa de la formación de un complejo entre anticuerpo y C5aR, indica la presencia del receptor. La fijación del anticuerpo a la célula puede detenerse como se ha descrito arriba bajo el encabezamiento "Ensayos de Fijación", por ejemplo. El método puede utilizarse para detectar la expresión de C5aR en células de un individuo (v.g., en una muestra, tal como un fluido corporal, tal como sangre, saliva u otra muestra adecuada). El nivel de expresión de C5aR en la superficie de las células T o monocitos puede determinarse también, por ejemplo, por citometría de flujo, y el nivel de expresión (v.g., intensidad de tinción) puede correlacionarse con la susceptibilidad, progreso o riesgo de enfermedad.

Los receptores quimioatrayentes actúan en la migración de los leucocitos a través del cuerpo, particularmente a sitios inflamatorios. La emigración de las células inflamatorias desde la vasculatura está regulada por un proceso de tres pasos que implica interacciones de leucocitos y proteínas de adhesión de células endoteliales y sustancias quimioatrayentes específicas y factores de activación (Springer, T. A., *Cell*, 76:301-314 (1994); Butcher, E. C., *Cell*, 67:1033-1036 (1991); Butcher, E. C. y Picker, L. J., *Science* (Wash. D.C.), 272:60-66 (1996)). Éstas son: (a) una interacción de afinidad baja entre la selección de leucocitos y carbohidratos de células endoteliales; (b) una interacción de afinidad alta entre receptores quimioatrayentes de leucocitos y factores quimioatrayentes/activadores; y (c) una fijación fuerte entre las integrinas leucocitarias y proteínas de adhesión de células endoteliales de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Subconjuntos de leucocitos diferentes expresan repertorios diferentes de selectinas, receptores de quimioatrayentes e integrinas. Adicionalmente, la inflamación altera la expresión de proteínas de adhesión endoteliales y la expresión de factores de activación quimioatrayentes y leucocitos. Como consecuencia, existe una gran diversidad para regulación de la selectividad del reclutamiento de leucocitos a sitios extravasculares. El segundo paso es crucial en el sentido de que se cree que la activación de los receptores quimioatrayentes de leucocitos causa la transición desde el balanceo celular mediado por selectinas a la fijación fuerte mediada por integrinas. Esto da como resultado que los leucocitos estén listos para transmigrar a sitios perivasculares. La interacción quimioatrayente/receptor del quimioatrayente es crucial también para la migración transendotelial y localización en un tejido (Campbell, J.J., et al., *J. Cell Biol.*, 134: 255-266 (1996); Carr, M.W., et al., *Immunity*, 4: 179-187 (1996)). Esta migración está dirigida por un gradiente de concentración del quimioatrayente que se dirige hacia el foco de inflamación.

C5aR tiene un papel importante en el tráfico de leucocitos. Es probable que C5aR sea un receptor de quimioatrayentes fundamental para neutrófilos, eosinófilos, células T o subconjunto de células T o migración de los monocitos a ciertos sitios de inflamación, y por tanto puedan utilizarse mAbs anti-C5aR para inhibir (reducir o prevenir) la migración de leucocitos, particularmente la asociada con lesiones de tejido neutrófilo tales como lesión de reperfusión e ictus, disfunción de las células T, tal como enfermedad autoinmune, o reacciones alérgicas o con trastornos mediados por monocitos tales como aterosclerosis.

De acuerdo con ello, los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la presente invención pueden utilizarse también para modular la función de receptores en aplicaciones de investigación y terapéuticas. Por ejemplo, los anticuerpos y fragmentos funcionales descritos en esta memoria pueden actuar como inhibidores para inhibir (reducir o prevenir)

(a) la fijación (v.g., de un ligando, un inhibidor o un promotor) al receptor, (b) una función de señalización de receptores, y/o (c) una función estimuladora. Los anticuerpos que actúan como inhibidores de la función de receptores pueden bloquear la fijación de ligandos o promotores directa o indirectamente (v.g. por causar un cambio de conformación). Por ejemplo, los anticuerpos pueden inhibir la función de receptores por inhibición de la fijación de un ligando, o por desensibilización (con o sin inhibición de la fijación de un ligando). Los anticuerpos que se fijan a un receptor pueden actuar también como agonistas de la función del receptor, desencadenando o estimulando una función de receptor, tal como una señalización y/o función estimuladora de un receptor (v.g., tráfico de leucocitos) por fijación al receptor.

Así, un anticuerpo o fragmento funcional de la presente invención puede utilizarse en un método de inhibición del tráfico de leucocitos en un mamífero (v.g. un paciente humano). Los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse también en un método de inhibición de otros efectos asociados con la actividad de C5aR tales como migración de histamina por basófilos y liberación de gránulos por eosinófilos, basófilos y neutrófilos. La administración de un anticuerpo o fragmento de la presente invención puede dar como resultado mejora o eliminación del estado de enfermedad.

Los anticuerpos monoclonales pueden utilizarse también inmunoterapéuticamente para enfermedad inmunopatológica asociada. El término "inmunoterapéuticamente" o "inmunoterapia", como se utiliza en esta memoria en asociación con los anticuerpos monoclonales de la invención denota administración tanto profiláctica como terapéutica. Así, los anticuerpos monoclonales pueden administrarse a pacientes de alto riesgo con objeto de reducir la probabilidad y/o gravedad de enfermedad inmunopatológica o ser administrados a pacientes que evidencian ya enfermedad activa, por ejemplo sepsis debida a infección por bacterias gram-negativas.

Los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos pueden utilizarse para tratar alergia, aterogénesis, anafilaxis, enfermedad maligna, inflamación crónica y aguda, reacciones alérgicas mediadas por histamina e IgE, choque, y artritis reumatoide, aterosclerosis, esclerosis múltiple, rechazo de aloinjertos, enfermedad fibrótica, asma, glomerulopatías inflamatorias o cualquier trastorno relacionado con el complejo inmune.

Enfermedades o afecciones de humanos u otras especies que pueden ser tratadas con inhibidores de la función del receptor C5aR (con inclusión de anticuerpos o fragmentos adecuados de los mismos), incluyen, pero sin carácter limitante:

(a) enfermedades y afecciones inflamatorias o alérgicas, que incluyen enfermedades alérgicas respiratorias tales como asma, rinitis alérgica, enfermedades de hipersensibilidad pulmonar, neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades intersticiales del pulmón (ILD) (v.g., fibrosis pulmonar idiopática, o ILD asociada con artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, esclerosis sistémica, síndrome de Sjogren, polimiositis o dermatomiositis); anafilaxis o respuestas de hipersensibilidad, alergias a fármacos (v.g., a penicilina, cefalosporinas), alergias por picaduras de insecto; enfermedades inflamatorias intestinales, tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; espondiloartropatías; escleroderma; psoriasis y dermatosis inflamatorias tales como dermatitis, eccema, dermatitis atópica, dermatitis alérgica por contacto, urticaria; vasculitis (v.g. vasculitis necrotizante, cutánea, y de hipersensibilidad);

(b) enfermedades autoinmunes, tales como artritis (v.g., artritis reumatoide, artritis psoriásica), esclerosis múltiples, lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, diabetes de aparición juvenil, nefritis tales como glomerulonefritis, tiroiditis autoinmune, y enfermedad de Behcet;

(c) rechazo de injertos (v.g., en los trasplantes), con inclusión de rechazo de aloinjertos o enfermedad del injerto frente al hospedador;

(d) aterosclerosis;

(e) cánceres con infiltración de leucocitos de la piel u órganos;

(f) pueden tratarse otras enfermedades o afecciones (que incluyen enfermedades o afecciones mediadas por C5aR) en las cuales deben inhibirse las respuestas inflamatorias indeseables, incluyendo, pero sin carácter limitante, lesión de reperfusión, ictus, síndrome de dificultad respiratoria de los adultos, ciertas enfermedades malignas hematológicas, toxicidad inducida por citocinas, (v.g., choque séptico, choque endotóxico), polimiositis, dermatomiositis, penfigoide, Enfermedad de Alzheimer y enfermedades granulomatosas que incluyen sarcoidosis.

Los anticuerpos anti-C5aR de la presente invención pueden bloquear la fijación de uno o más ligandos, bloqueando con ello la cascada aguas abajo de uno o más eventos que conducen a los trastornos anteriores.

Los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse en el tratamiento de sepsis, ictus o síndrome de fatiga respiratoria de los adultos.

Enfermedades o afecciones de humanos u otras especies que pueden tratarse con promotores de la función de C5aR (con inclusión de anticuerpos o fragmentos de los mismos), incluyen, pero sin carácter limitante, inmunosupresión, tal como la de individuos con síndromes de inmunodeficiencia tales como SIDA, individuos sometidos a terapia de radiación, quimioterapia, terapia por enfermedad autoinmune u otra terapia con fármacos (v.g., terapia con corticosteroides), que causa inmunosupresión; e inmunosupresión debida a deficiencia congénita en la función de receptores u otras causas.

Modos de Administración

Un método inmunoterapéutico puede implicar la administración de un agente terapéutico de la invención por inyección o infusión antes de (profilaxis) o después de (terapia) del comienzo de la enfermedad inmunopatológica.

Uno o más anticuerpos o fragmentos de la presente invención pueden administrarse a un individuo por una ruta apropiada, sea solo o en combinación con (antes, simultáneamente, o después) otro fármaco o agente. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse también en combinación con otros anticuerpos monoclonales o policlonales (v.g., en combinación con anticuerpos que se fijan a receptores de quimiocinas, con inclusión, pero sin carácter limitante, de CCR2 y CCR3) o con agentes anti-TNF u otros agentes antiinflamatorios o con productos existentes en el plasma sanguíneo, tales como gamma-globulina disponible comercialmente y productos de inmunoglobulinas utilizados para tratamientos profilácticos o terapéuticos. Los anticuerpos o fragmentos de la presente invención pueden utilizarse como composiciones administradas por separado dadas en conjunción con antibióticos y/o agentes antimicrobianos.

Se administra una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento (es decir, uno o más anticuerpos o fragmentos). Una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para alcanzar el efecto terapéutico deseado (con inclusión del efecto profiláctico), en las condiciones de administración, tal como una cantidad suficiente para inhibición de una función de C5aR, y por tanto, la inhibición de una respuesta inflamatoria.

Son posibles una diversidad de rutas de administración que incluyen, pero sin carácter necesariamente limitante, la administración oral, dietética, tópica, parenteral (v.g., intravenosa, intraarterial, intramuscular, inyección subcutánea), inhalación (v.g., inhalación intrabronquial, intraocular, intranasal u oral, gotas intranasales), dependiendo de la enfermedad o afección a tratar. Otros métodos adecuados de administración pueden incluir también dispositivos recargables o biodegradables y dispositivos polímeros de liberación lenta. Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse también como parte de una terapia de combinación con otros agentes. La formulación de un anticuerpo o fragmento a administrar variará conforme a la ruta de administración y la formulación (v.g., solución, emulsión, cápsula) seleccionada. Una composición farmacéutica apropiada que comprende un anticuerpo o fragmento funcional del mismo a administrar puede prepararse en un vehículo o portador fisiológicamente aceptable. Puede utilizarse también una mezcla de anticuerpos y/o fragmentos. Para soluciones o emulsiones, portadores adecuados incluyen, por ejemplo, soluciones, emulsiones o suspensiones acuosas o alcohólico/acuosas, con inclusión de solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales pueden incluir solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer's lactados o aceites fijos. Una diversidad de portadores acuosos apropiados son conocidos por el profesional experto, que incluyen agua, agua tamponada, solución salina tamponada, polioles (v.g., glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido), solución de dextrosa y glicina. Vehículos intravenosos pueden incluir diversos aditivos, conservantes, o restablecedores de fluidos, nutrientes o electrolitos (véase, en general, Remington's Pharmaceutical Science, Edición 16ª, Mack editores, 1980). Las composiciones pueden contener opcionalmente sustancias adyuvantes farmacéuticamente aceptables en caso requerido para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste del pH y agentes tampón así como agentes de ajuste de la toxicidad, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio y lactato de sodio. Los anticuerpos y fragmentos de esta invención pueden liofilizarse para almacenamiento y reconstituirse en un portador adecuado antes de su utilización conforme a métodos de liofilización y reconstitución conocidos en la técnica. La concentración óptima del o los ingredientes activos en el medio seleccionado puede determinarse empíricamente, conforme a procedimientos bien conocidos por el profesional experto, y dependerá de la formulación farmacéutica final deseada. Para inhalación, el anticuerpo o fragmento puede solubilizarse y cargarse en un dosificador adecuado para administración (v.g., un atomizador, nebulizador o dispensador de aerosoles presurizados).

Los intervalos de dosificación para la administración de los anticuerpos monoclonales de la invención son aquéllos que son suficientemente amplios para producir el efecto deseado en el cual se mejoran los síntomas de la enfermedad inmunopatológica o se reduce la posibilidad de infección o sobre-estimulación del sistema inmunitario. La dosificación no debería ser tan grande que cause efectos secundarios adversos, tales como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva, y análogos. Generalmente, la dosificación variará con la edad, la afección, el sexo y la extensión de la enfermedad en el paciente y puede ser determinada por una persona con experiencia en la técnica. La dosificación puede ser ajustada por el médico individual en el supuesto de cualquier complicación. La dosificación puede variar desde aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, con preferencia desde aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, con gran preferencia desde aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, en una o más administraciones diarias, durante uno o varios días.

Será apreciado por los expertos en la técnica que los anticuerpos de la presente invención pueden introducirse en un individuo por administración de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el anticuerpo. La molécula de ácido nucleico puede encontrarse en la forma de DNA o RNA o una molécula quimérica que comprende a la vez DNA o RNA. Una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo puede clonarse en un vector de expresión en el que la secuencia de codifica el agente está ligado operativamente a elementos de control de la expresión. Los elementos de control de la expresión son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo,

promotores, intensificadores y codones de comienzo y parada apropiados.

5 Pueden utilizarse una diversidad de métodos para introducir un ácido nucleico que codifica el anticuerpo en una célula diana in vivo. Por ejemplo, el ácido nucleico desnudo puede inyectarse en el sitio diana, puede encapsularse en liposomas, o puede ser introducido por un vector viral.

10 La inyección directa de una molécula de ácido nucleico sola o encapsulada, por ejemplo, en liposomas catiónicos puede utilizarse para transferencia estable de genes de un ácido nucleico que codifica TSP-1 en células que se encuentran o no en división in vivo (Ulmer et al., Science 259: 1745-1748 (1993)). Adicionalmente, el ácido nucleico puede transferirse a una diversidad de tejidos in vivo utilizando el método de bombardeo de partículas (Williams et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2726-2730 (1991)).

15 Los vectores virales son útiles para la transferencia de genes de moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo a un tipo de célula específico in vivo. Los virus son agentes infecciosos especializados que pueden infectar y propagarse en tipos de células específicos y propagarse en ellas. Esta especificidad para infectar tipos de células particulares es especialmente adecuada para direccionamiento del anticuerpo a las células seleccionadas in vivo. La sección de un vector viral dependerá, en parte, del tipo de célula a direccionar.

20 ...

Cinta No. 19

25 Vectores virales especializados son bien conocidos en la técnica y pueden direccionarse a tipos de células específicos. Tales vectores incluyen, por ejemplo, vectores virales recombinantes adeno-asociados que tienen promotores generales la ventaja añadida de que el virus recombinante puede integrarse de manera estable en la cromatina o incluso ... no proliferantes en reposo (Ledkowski et al., Mol. Cell. Biol. 8: 3988-3996 (1988)).

30 Pueden construirse vectores virales para controlar adicionalmente el tipo de célula que expresa el anticuerpo codificado por incorporación de un promotor o intensificador específico de tejido en el vector (Dai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10892-10895 (1992)).

35 Los vectores retrovirales son adecuados también para los métodos de suministro de moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo in vivo. Tales vectores pueden construirse sea para funcionar como partículas infecciosas o como partículas no infecciosas que sufren únicamente una sola tanda de infección inicial.

40 Pueden utilizarse también enfoques de suministro de DNA mediados por receptores para suministrar una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo en una célula de una manera específica de tejido utilizando un ligando específico de tejido o un anticuerpo que está complejado de modo no covalente con la molécula de ácido nucleico por una molécula formadora de puente (Currier et al., Hum. Gene Ther, 3:147-154 (1992); Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987)).

45 La transferencia de genes para obtener la expresión del anticuerpo en un individuo puede realizarse también mediante, por ejemplo, transfección ex vivo de células autólogas. Las células adecuadas para dicha transferencia ex vivo incluyen células de la sangre, dado que estas células son fácilmente accesibles para manipulación y reintroducción de nuevo en el individuo por métodos bien conocidos en la técnica.

50 La transferencia de genes por transfección de células ex vivo puede realizarse por una diversidad de métodos, que incluyen, por ejemplo, precipitación con fosfato de calcio, dietilaminoetil-dextrano, electroporación, lipofección, o infección viral. Tales métodos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Springs Harbour Laboratory Press (1989)). Una vez que se transfectan las células, las mismas se trasplantan luego o se injertan de nuevo en un individuo a tratar. Las células una vez introducidas en el cuerpo pueden producir el anticuerpo, el cual puede entrar en la circulación e inhibir la agregación plaquetaria en el sitio de la enfermedad o afección.

55 A lo largo de esta memoria descriptiva, el término "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende(n)", se entenderá que implican la inclusión de un elemento, número entero o paso establecido, o grupo de elementos, números enteros o pasos, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o paso, o grupo de elementos, números enteros o pasos.

60 En la presente invención se ilustrará a continuación por los ejemplos que siguen, que no deben interpretarse como limitantes en modo alguno.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

65 Materiales y Métodos

1. Producción de anticuerpos monoclonales y citometría de flujo

Los anticuerpos monoclonales (MAbs) reactivos con C5aR se generaron por inmunización de ratones C57BL/6 con 10^7 células L1.2 transfectadas con C5aR [8], intraperitonealmente, 5 a 6 veces a intervalos de dos semanas. La inmunización final se inyectó por vía intravenosa. Cuatro días después, se extirpó el bazo y las células se fusionaron con el linaje de células SP2/0 como se ha descrito [9]. Los MAbs reactivos con C5aR se identificaron utilizando células L1.2 transfectadas con C5aR y células L1.2 no transfectadas, o células L1.2 transfectadas con receptores no afines tales como CXCR2 o CX3CR1 (V28) utilizando tinción inmunofluorescente y análisis utilizando un FACScan® (Becton Dickinson & CO., Mountain View, CA). La tinción MAb de las células se realizó utilizando procedimientos estándar, como se ha descrito previamente [10].

2. Ensayo de fijación de ligandos

Se obtuvo C5a humano recombinante de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). C5a del complemento marcado con ^{125}I -Bolton-Hunter se adquirió de NEN-Dupont (Boston, MA), con una actividad específica de 2200 Ci/mM. La fijación de C5a a los transfectantes L1.2 C5aR se llevó a cabo como se ha descrito previamente [9, 11]. Resumidamente, las células se lavaron una sola vez en PBS y se resuspendieron en tampón de fijación (Hepes 50 mM, pH 7,5, CaCl 1 mM, MgCl₂ 5 mM, 0,5% BSA y 0,05% azida) a una concentración de 10^7 /ml. Se dispensaron partes alícuotas de 50 ml (5×10^5 células) en tubos de microcentrífuga, seguido por la adición de competidor frío y 1 nM de C5a radiomarcado. El volumen de reacción final era 200 μL . Después de una incubación de 60 min a la temperatura ambiente, las células se lavaron 3 veces con 1 mL de tampón de fijación que contenía NaCl 0,5 M. Los sedimentos de células se sometieron luego a recuento. Se obtuvo la fijación de ruido de fondo por incubación de células C5a radiomarcado y al menos un exceso de 400 veces de C5a sin marcar. Se utilizaron duplicados a lo largo de los experimentos y las detecciones estándar eran siempre $< 10\%$ del valor medio.

3. Ensayo de quimiotaxis de transfectantes

Las células L1.2 transfectadas con C5aR se centrifugaron y se lavaron en medio de migración (MM = RPMI 1640, 0,5% BSA) y se resuspendieron a 10^7 células/ml. Las inserciones de cultivo de tejido (Becton Dickinson & Co., Mountain View, CA) se pusieron en cada uno de los pocillos de placas de cultivo de tejido de 24 pocillos, formando una cámara superior e inferior separada por una membrana de poli(etileno- tereftalato) que contenía poros de 3 mm de diámetro. Se añadió C5a quimiotáctico (diluido en medio de ensayo) a 600 μL de medio de ensayo en las placas de cultivo de tejido de 24 pocillos para una concentración final de 1 nM. Un millón de células en 100 TI se preincubaron durante 30 min con los sobrenadantes de los hibridomas que contenían el anticuerpo. La mixtura células-sobrenadante de MAb purificado se añadió a la cámara superior de los pocillos y las células se dejaron migrar a su través a la cámara inferior en una incubadora con 5% de CO₂ a 37°C durante 18 horas. Las inserciones se eliminaron después de la migración y las células se contaron mediante el FACScan®. Se obtuvieron los recuentos relativos de células por adquisición de los eventos durante un periodo de tiempo fijado de 30 segundos. Se encontró que el método era altamente reproducible, y hacía posible la discriminación de los leucocitos y la exclusión de residuos.

4. Ensayos de quimiotaxis de los neutrófilos

Preparación de las células: los neutrófilos se aislaron de la sangre periférica por obtención en primer lugar de la fracción de leucocitos por un paso de sedimentación en dextrano durante 40 min a la temperatura ambiente. Las células se estratificaron luego en Ficoll-Paque (Amersham Biosciences) para centrifugación en gradiente de densidad a 2500 rpm durante 15 min a la temperatura ambiente. Después de la lisis hipotónica de células de glóbulos rojos residuales, los neutrófilos se resuspendieron en volúmenes iguales de RPMI 1640 (Invitrogen Inc.), M199 (Invitrogen Inc.) y 2% FCS (Hyclone).

Ensayo de quimiotaxis: se añadieron MAbs anti-C5aR, 6C12, 7F3 y 12D4 a neutrófilos (1×10^7 /ml) a concentraciones comprendidas entre 0,5 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las células se cargaron luego en la capa superior de inserciones de 24 pocillos (Corning Inc., NY) con una membrana de policarbonato de porosidad 3,0 μm y se incubaron durante 10 min a la temperatura ambiente. Las inserciones se pusieron luego en cámaras inferiores que contenían quimioatrayentes de neutrófilos humanos tales como C5a (0,1 a 100 nM) e IL-8 (ambos de 1,12 ng/ml a 11,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Los extractos se incubaron luego durante 30 min a 37°C. El número de neutrófilos que migraban a través de la membrana a la cámara inferior se cuantificó por citometría de flujo (FACSCalibur; BC Biosciences).

5. Ensayo de Inhibición Competitiva

Se añadieron MAbs anti-C5aR a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, a un péptido C5aR N-terminal producido por síntesis (residuos 9-29) conocido como "PEPI" (procedencia biológica: Eldridge) a concentraciones comprendidas entre 1 y 100 μM . Células L1.2 de ratón transfectadas con el receptor de C5a humano y resuspendidas en seroalbúmina bovina al 1% (BSA; GibcoBRL) (1×10^7 /ml) se añadieron luego para dar un volumen total de 100 μL . Las células se incubaron durante 30 min a 4°C y se lavaron una sola vez con BSA al 0,1%. Se utilizó IgG anti-ratón de oveja conjugado con fluoresceína (FITC), F(ab')₂ (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.) como Ab secundario (1:200) y se incubó

durante 15 min a 4°C, seguido por un paso de lavado adicional con 0,1% BSA. Las células se resuspendieron en 0,1 BSA y se analizaron por citometría de flujo.

6. Ensayos ELISA

Los ELISAs se realizaron como se describe en

Resumidamente, placas ELISA de 96 pocillos con fondo plano (Maxisorp; Nunc) se recubrieron con un Tg/ml de proteína (PEPI u OPG) en PBS a 37°C durante 1 hora, y se bloquearon luego con BSA a 4°C durante una noche. Las placas se lavaron luego, se incubaron con anticuerpo, se lavaron y se incubaron con anticuerpo IgG anti-ratón de oveja conjugado con peroxidasa. El sustrato utilizado era el reactivo sustrato TMB (PharMingen).

EJEMPLO 1: Producción de MAb y citometría de flujo

Transfectantes L1.2 que expresaban niveles altos de C5aR [8] se utilizaron para inmunizar ratones, y se identificaron 10 MAbs por citometría de flujo que reaccionaban específicamente con las células L1.2 transfectadas con C5aR, pero no con células L1.2 transfectadas con CX3CR1 (V28) o CXCR2. Estos 10 MAbs se designaron

La Figura 1 es un conjunto de histogramas que muestran que MAb 7F3 reacciona con los transfectantes C5aR (L1.2C5aR) y con los neutrófilos humanos pero no con células transfectadas con CX3CR1 (L1.2 V28) o con células transfectadas con CXCR2 (L1.2 CXCR2). Estos resultados de MAb 7F3 son representativos de los 10 MAbs identificados.

EJEMPLO 2: Inhibición de la fijación de C5a a células transfectadas con C5aR

La capacidad de los MAbs para inhibir la fijación de C5a marcado con ¹²⁵I a los transfectantes C5aR se ensayó. La Figura 2 muestra que MAb 7F3 inhibía completamente la fijación de C5a marcado con ¹²⁵I a los transfectantes, y que esta inhibición era mayor que la obtenida con C5a 400 nM frío. Esto indica que MAb 7F3 es capaz de bloquear completamente la fijación de C5a a C5aR. Los MAbs 6C12 y 12D4 exhibían también una inhibición sustancial de la fijación de C5a marcado con ¹²⁵I a los transfectantes C5aR. La inhibición de respuesta a la dosis de la fijación de C5a a los transfectantes C5aR por MAb 7F3 se muestra en la Figura 3.

EJEMPLO 3: Inhibición de la migración de los transfectantes C5aR dirigida por C5a humano por MAb 7F3

Se realizaron experimentos de quimiotaxis como se ha descrito arriba utilizando células L1.2 transfectadas con C5aR. La Figura 4 muestra que los MAbs 7F3, 6C12 y 12D4 inhibían completa o sustancialmente la quimiotaxis de las células C5aR-L1.2 a C5a. La Figura 5 muestra la inhibición de la respuesta a la dosis de la quimiotaxis de las células C5aR-L1.2 a C5a por MAb 7F3.

EJEMPLO 4: Inhibición de la migración de los neutrófilos dirigida por C5a humano por MAb 7F3

Se dializaron MAbs anti- C5aR en 1 x PBS (5BRL), y los MAbs 7F3 tanto dializados como no dializados se añadieron a neutrófilos (1 x 10⁷/ml a 5 µg/ml). Se incluyen controles negativos (sin adición alguna de Ab, y con adición de 1 x PBS). Las células se cargaron luego en la cámara superior de inserciones de 24 pocillos (Corning Inc., NY) una membrana de policarbonato de porosidad 3,0 µm y se incubaron durante 10 min a la temperatura ambiente. Las inserciones se pusieron luego en cámaras inferiores que contenían el C5a quimioatrayente de los neutrófilos humanos (0,1 a 100 nM). Los neutrófilos se incubaron luego durante 30 min a 37°C. El número de neutrófilos que migraban a través de la membrana a la cámara inferior se cuantificó por citometría de flujo (FACSCalibur; BD Biosciences).

La Figura 6 muestra que la adición de MAb 7F3 (dializado o no dializado) daba como resultado la inhibición de la dilución de los neutrófilos comparada con los dos controles negativos.

EJEMPLO 5: Inhibición de la migración de los neutrófilos dirigida por C5a humano por MAbs 7F3, 6C12 y 12D4

Los tres MAbs anti-C5aR, 7F3, 12D4, y 6C12 se añadieron a neutrófilos (1 x 10⁷/ml) a razón de 5 µg/ml. Se incluyeron controles negativos (sin adición alguna de Ab, y con adición de 1 x PBS). Las células se cargaron luego en la cámara superior de inserciones de 24 pocillos (Corning Inc., NY) con una membrana de policarbonato de porosidad 3,0 µm y se incubaron durante 10 min a la temperatura ambiente. Las inserciones se pusieron luego en cámaras inferiores que contenían el quimioatrayente de los neutrófilos humanos C5a (0,11 a 1120 ng/ml). Los neutrófilos se incubaron luego durante 30 min a 37°C. El número de neutrófilos

El número de neutrófilos que migraba a través de la membrana a la cámara inferior se cuantificó por citometría de flujo; (FACSCalibur; BD Biosciences).

Los resultados presentados en la Figura 7 demuestran que los 3 MABs exhibían inhibición de la migración de neutrófilos hacia C5a comparados con los dos controles negativos. En particular, el MAb 7F3 exhibía la inhibición más eficaz, dando como resultado una reducción de 140 veces en los números de migración de neutrófilos respecto a los niveles de ruido de fondo.

EJEMPLO 6: Inhibición de la migración de neutrófilos dirigida por IL-8 humano por los MABs 7F3, 12D4 y 6C12

Los tres 3MABS anti-C5aR, 7F3, 12D4 y 6C12; y la muestra dializada de 7F3 se añadieron a neutrófilos purificados (1×10^7 /ml) a 5 µg/ml y se cargaron en la cámara superior de inserciones de 24 pocillos. Se incluyeron nuevamente controles negativos (sin adición alguna de Ab, y con adición de 1x PBS). Después de 10 minutos de incubación a la temperatura ambiente, se pusieron luego las inserciones en cámaras inferiores que contenían IL-8 (1,12 a 1120 ng/ml), un quimioatrayente de neutrófilos humanos que fija los receptores CXCR1 y CXCR2 expresados en la superficie de los neutrófilos. Los neutrófilos se incubaron luego durante 30 minutos a 37° de. El número de neutrófilos que migraban a través de la membrana a la cámara inferior se cuantificó por citometría de flujo (FACSCalibur; BD Biosciences).

La Figura 8 (a) muestra que los tres MABs exhibían inhibición de la migración de neutrófilos hacia IL-8. MAb 7F3 (tanto dializado como no dializado) era el inhibidor más eficaz, dando como resultado una reducción de 5 veces en los números de migración de neutrófilos.

Se testó también MAb 7F3 respecto a su capacidad para inhibir otros quimioatrayentes de neutrófilos, particularmente los ligandos CXCR1 y CXCR2. La Tabla 1 muestra la inhibición sustancial de la migración de neutrófilos a varios quimioatrayentes de neutrófilos, en particular los ligandos CXCR1 y CXCR2, en ensayos de quimiotaxis de neutrófilos.

Tabla 1

Quimioatrayente (112 ng/ml)	% Inhibición
C5a	98
IL-8	81
GCP-2	91
ENA-78	83

EJEMPLO 7: inhibición competitiva de la fijación de los MABs 7F3, 12D4 y 6C12 a transfectantes de C5aR por un péptido C5aR (9-29) N-terminal

La fijación de los MABs 7F3, 12D4 y 6C12 a células transfectadas con C5aR se midió por tinción con IgG anti-ratón de oveja conjugado con fluoresceína (FITC). La capacidad de un péptido N terminal C5aR (residuos 9-29) para inhibir la fijación se evaluó luego conforme a la metodología arriba descrita. Este péptido N-terminal C5aR tiene la secuencia PDYGHYDDKDTLDLNTVPDKT y se hace referencia al mismo en esta memoria como "PEPI".

La Figura 9(a) muestra que las concentraciones crecientes de PEPI no inhibían la tinción por fluorescencia de los 3MABs anti-C5aR. La tinción por fluorescencia se mantenía estable, incluso a concentraciones de PEPI de 100 TM.

La Figura 9(b) muestra que PEPI (a una concentración de 50 TM) no lograba inhibir la tinción por FACS de los neutrófilos purificados con MAb 7F3.

EJEMPLO 8: Reactividad de MABs 7F3, 12D4 y 6C12 con el péptido N terminal 9-29 de C5aR ("PEPI") y OPG

Se realizaron ensayos ELISA como se ha descrito arriba para medir la reactividad de los MABs 6C12, 12D4, y 7F3 con PEPI y OPG. OPG es un miembro de la superfamilia de receptores de TNF que se fijan específicamente a su ligando TNFSF11/OPG. Más específicamente, OPG es un receptor de reclamo secretado por los osteoblastos que funciona como regulador negativo de la resorción ósea.

Se utilizaron los MABs 6C12, 12D4 y 7F3 en el ELISA como proteínas purificadas a una concentración de 1 Tg/ml. Como controles positivos se utilizaron MAb 9C1 (que es específico para OPG) y MAb 11B9 (que reconoce PEPI). Estos MABs de control se utilizaron en la forma de sobrenadantes de cultivo de tejidos sin diluir.

La Figura 10 muestra que MAbs 6C12, 12D4 y 7F3 no eran reactivos con PEPI. MAb 7F3 exhibía un pequeño grado de reactividad cruzada con OPG.

EJEMPLO 9: Determinación de la secuencia de los MAbs anti-C5aR 7F3, 12D4 y 6C12

La secuencia de nucleótidos de los anticuerpos anti-C5aR 7F3, 12D4 y 6C12 se determinó a partir de RNA extraído de células de hibridoma que expresaban los anticuerpos. Para determinar los cebadores utilizados para amplificar las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, la secuencia de proteínas de la región variable de los 3 anticuerpos fue determinada por Biogen Inc. y se determinó el isotipo de los anticuerpos utilizando el kit de determinación del isotipo Mouse Monoclonal Antibody - IsoStrip (Roche Cat. No. 1493027). Para ello, se derivó el cebador 5' Framework 1 de la secuencia de proteínas de Biogen Inc. y se basó el cebador 3' en el isotipo de los anticuerpos.

El isotipo de cada uno de los anticuerpos anti-C5aR es como sigue:

6C12: Kappa de cadena ligera
 6C12: IgG3 de cadena pesada
 7F3: Kappa de cadena ligera
 7F3: IgG2a de cadena pesada
 12D4: Kappa de cadena ligera
 12D4: IgG3 de cadena pesada

Se aisló el RNA total de las células de hibridoma utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen, Cat. No. 15.596-018). Se aisló el RNA como se describe por el fabricante. De manera resumida, se lisaron aproximadamente 5×10^6 células en 1 ml de reactivo Trizol. Los residuos celulares se aclararon con 200 T1 de cloroformo y centrifugación. La capa acuosa que contenía RNA se separó y el RNA se precipitó con 250 T1 de isopropanol.

Se utilizó el RNA total (2Tg) para producir cDNA utilizando la transcriptasa inversa AMV (Promega Cat. No. M5101). El cDNA se utilizó luego como molde para amplificar la secuencia codificante de la región variable utilizando los cebadores siguientes:

Cebadores para la cadena ligera variable de 6C12:

mlgkapFR15': GATGTTTTGATGACCCAACTCC (SEQ ID NO:2)
 mlgkapcon3': AACTCATTCTGTTGAAGCTCTTG (SEQ ID NO:3)

Cebadores para la cadena pesada variable de 6C12:

mlgVh2 5' SAGGTCCAGCTGCARCAGTC (SEQ ID NO:4) Familia FR1 VhIIA
 mlgG3con3' TGGGCATGAAGAACCCTGG (SEQ ID NO:5) Región bisagra

Cebadores para la cadena ligera variable de 7F3:

mlgkapFR15': GATGTTTTGATGACCCAACTCC (SEQ ID NO:6)
 mlgkapcon3': AACTCATTCTGTTGAAGCTCTTG (SEQ ID NO:7)

Cebadores para la cadena pesada variable de 7F3:

mlgVh2 5': SAGGTCCAGCTGCARCAGTC (SEQ ID NO:8) Familia FR1 VhIIA
 mlgG2acon3': TTTGCATGGAGGACAGGG (SEQ ID NO:9)

Cebadores para la cadena ligera variable de 12D4:

mlgkapFR15': GATGTTTTGATGACCCAACTCC (SEQ ID NO:10)
 mlgkapcon3': AACTCATTCTGTTGAAGCTCTTG (SEQ ID NO 11)

Cebadores para 12D4 la cadena pesada variable de 12D4 :

mlgVh1 5': CAGGTGCAGCTGAAGSAGTC (SEQ ID NO:12) Familia FR1 VhIB
 mlgG3con3': TGGGCATGAAGAACCCTGG (SEQ ID NO:13) Región bisagra

Se llevó a cabo la reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando la polimerasa Pfu de alta fidelidad (Promega Cat. No. M7741) con una temperatura de reasociación de 60 °C y una extensión de cebadores a 72 °C durante 3 minutos. El fragmento PCR de aproximadamente 700 pares de bases resultante se clonó en pGEM-Teasy (Promega Cat. No. A1360). Las colonias simples se aislaron y se secuenciaron por medio de un equipo comercial de secuenciación ((SUPAMAC).

Las secuencias resultantes se proporcionan a continuación como sigue:

Secuencia variable de cadena ligera (DNA) de 6C12: SEQ ID NO:14
 Secuencia variable de cadena ligera (proteína) de 6C12: SEQ ID NO:15
 Secuencia variable de cadena pesada (DNA) de 6C12: SEQ ID NO: 16
 Secuencia variable de cadena pesada (proteína) de 6C12: SEQ ID NO:17
 Secuencia variable de cadena ligera (DNA) de 7F3: SEQ ID NO:18
 Secuencia variable de cadena ligera (proteína) de 7F3: SEQ ID NO:19
 Secuencia variable de cadena pesada (DNA) de 7F3: SEQ ID NO:20
 Secuencia variable de cadena pesada (proteína) de 7F3: SEQ ID NO:21
 Secuencia variable de cadena ligera (DNA) de 12D4: SEQ ID NO:22
 Secuencia variable de cadena ligera (proteína) de 12D4: SEQ ID NO:23
 Secuencia variable de cadena pesada (DNA) de 12D4: SEQ ID NO:24
 Secuencia variable de cadena pesada (proteína) de 12D4: SEQ ID NO:25

5
 10
 15 EJEMPLO 10: Análisis de la identidad y semejanza de secuencias de DNA y proteínas para los MAbs 7F3, 12D4 y 6C12

Las secuencias de DNA y proteínas de los 3 anticuerpos anti-C5aR (7F3, 12D4 y 6C12) se compararon utilizando MacVector 6.5.3. Para este análisis se utilizó el programa de alineamiento múltiple ClustalW (1.4).

20 (i) Análisis de las secuencias de DNA variable de cadena ligera :

El alineamiento de las secuencias de DNA variables de cadena ligera para 7F3, 12D4 y 6C12 se muestra en la Figura 11.

25 El análisis de alineamiento de secuencia múltiple ClustalW (1.4) proporcionó los resultados siguientes:

30 3 Secuencias Alineadas Registro de Alineamiento = 6612
 Lagunas Insertadas = 0 Identidades Conservadas = 315

Modo de Alineamiento por Pares: Lento
 Parámetros de Alineamiento por Pares:

35 Penalidad por Laguna Abierta = 10,0 Penalidad por Extensión de Laguna = 5,0

Parámetros de alineamiento múltiple:

40 Penalidad por Laguna Abierta = 10,0 Penalidad por Extensión de Laguna = 5,0
 Divergencia de Demora = 40% Transiciones: Ponderadas

Tiempo de procesamiento: 0,4 segundos

1. 7F3 Vk frente a 6c12 Vk

45 Longitud Alineada = 336 Lagunas = 0
 Identidades = 320 (95%)

2. 7F3 Vk frente a 12d4 Vk

50 Longitud Alineada = 336 Lagunas = 0
 Identidades = 320 (95%)

3. 6c12 Vk frente a 12d4 Vk

55 Longitud Alineada = 336 Lagunas = 0
 Identidades = 326 (97%)

60 (ii) Análisis de la secuencia de DNA variable de cadena pesada:

El alineamiento de las secuencias de DNA variable de cadena pesada para 7F3, 12D4 y 6C12 se muestra en la Figura 12.

65

ES 2 561 828 T3

El análisis de alineamiento de secuencia múltiple ClustalW (1.4) proporcionó los resultados siguientes:

5 3 Secuencias Alineadas Registro de Alineamiento = 5346
 Lagunas Insertadas = 3 Identidades Conservadas = 200

Modo de Alineamiento por Pares: Lento
Parámetros de Alineamiento por Pares:

10 Penalidad por Laguna Abierta = 10,0 Penalidad por Extensión de Laguna = 5,0

Parámetros de alineamiento múltiple:

15 Penalidad por Laguna Abierta = 10,0 Penalidad por Extensión de Laguna = 5,0
 Divergencia de Demora = 40% Transiciones: Ponderadas

Tiempo de procesamiento: 0,5 segundos

1. 7F3 Vh frente a 6c12 Vh

20 Longitud Alineada = 363 Lagunas = 0
 Identidades = 333 (91%)

2. 7F3 Vh frente a 12d4 Vh

25 Longitud Alineada = 363 Lagunas = 3
 Identidades = 210 (57%)

3. 6c12 Vh frente a 12d4 Vh

30 Longitud Alineada = 363 Lagunas = 3
 Identidades = 210 (57%)

35 (iii) Análisis de la secuencia de proteínas de la cadena ligera variable

El alineamiento de las secuencias variable de cadena ligera de proteínas para 7F3, 12D4 and 6C12 se muestra en la
40 Figura 13.

El análisis del alineamiento Clustal W (1.4) de secuencias múltiples proporcionó los resultados siguientes:

45 3 Secuencias Alineadas. Registro de Alineamiento = 1902
 Lagunas Insertadas = 0 Identidades Conservadas = 99

Modo de Alineamiento por Pares: Parámetros de Alineamiento Lento por Pares:
Penalidad por Laguna Abierta = 10,0 Penalidad por Extensión de Laguna = 0.1

50 Matriz de Semejanza: blosum

Parámetros de Alineamiento Múltiple:

55 Penalidad por Laguna Abierta = 10,0 Penalidad por Extensión de Laguna = 0,1
 Divergencia de Demora = 40% Distancia de Laguna = 8
 Matriz de Semejanza: blosum

Tiempo de procesamiento: 0,1 segundos

60 1. 7F3 Vk frente a 6c12 Vk
 Longitud Alineada =112 Lagunas = 0
 Identidades = 102 (91 %) Semejanzas= 5 (4%)

65 2. 7F3 Vk frente a 12d4 Vk

Longitud Alineada = 112 Lagunas = 0

Identities = 103 (91%) Similarities = 4 (3%)

5

3. 6c12 Vk frente a 12d4 Vk

Longitud Alineada = 112 Lagunas = 0

10

Identities = 104 (92%) Similarities = 4 (3%)

(iv) Análisis de la secuencia de proteínas de la cadena pesada variable

15

El alineamiento de las secuencias de proteínas de la cadena pesada variable para 7F3, 12D4 y 6C12 se muestra en la Figura 14.

El análisis del alineamiento Clustal W (1.4) de secuencias múltiples proporcionó los resultados siguientes:

20

3 Secuencias Alineadas. Registro de Alineamiento = 1432
Lagunas Insertadas = 2 Identities Conservadas = 51

Modo de Alineamiento por Pares: Lento
Parámetros de Alineamiento por Pares:

25

Penalidad por Laguna Abierta = 10,0 Penalidad por Extensión de Laguna = 0,1
Matriz de Semejanza: blosum

Parámetros de Alineamiento Múltiple:

30

Penalidad por Laguna Abierta = 10,0 Penalidad por Extensión de Laguna = 0,1
Divergencia de Demora = 40% Distancia de Laguna = 8
Matriz de Semejanza: blosum

35

Tiempo de Procesamiento: 0,1 segundos

1. 7F3 Vh frente a 6c12 Vh

Longitud Alineada = 121 Lagunas = 0

40

Identities = 107 (88%) Similarities = 6 (4%)

2. 7F3 Vh frente a 12d4 Vh

Longitud Alineada = 121 Lagunas = 2

45

Identities = 52 (42%) Similarities = 25 (20%)

3. 6c12 Vh frente a 12d4 Vh

50

Longitud Alineada = 121 Lagunas = 2

Identities = 54 (44%) Similarities = 25 (20%)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> G2 Therapies Ltd
 <120> Anticuerpos Anti-C5aR y usos de los mismos
 <130> 501129
 <150> USSN 60/350,961
 < 151> 2002-01-25
 <160> 34
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 <211> 350
 <212> PRT
 < 213> Homo sapiens

<400> 1

Met Asn Ser Phe Asn Tyr Thr Thr Pro Asp Tyr Gly His Tyr Asp Asp
 1 5 10 15

Lys Asp Thr Leu Asp Leu Asn Thr Pro Val Asp Lys Thr Ser Asn Thr
 20 25 30

Leu Arg Val Pro Asp Ile Leu Ala Leu Val Ile Phe Ala Val Val Phe
 35 40 45

Leu Val Gly Val Leu Gly Asn Ala Leu Val Val Trp Val Thr Ala Phe
 50 55 60

ES 2 561 828 T3

Glu Ala Lys Arg Thr Ile Asn Ala Ile Trp Phe Leu Asn Leu Ala Val
 65 70 75 80
 Ala Asp Phe Leu Ser Cys Leu Ala Leu Pro Ile Leu Phe Thr Ser Ile
 85 90 95
 Val Gln His His His Trp Pro Phe Gly Gly Ala Ala Cys Ser Ile Leu
 100 105 110
 Pro Ser Leu Ile Leu Leu Asn Met Tyr Ala Ser Ile Leu Leu Leu Ala
 115 120 125
 Thr Ile Ser Ala Asp Arg Phe Leu Leu Val Phe Lys Pro Ile Trp Cys
 130 135 140
 Gln Asn Phe Arg Gly Ala Gly Leu Ala Trp Ile Ala Cys Ala Val Ala
 145 150 155 160
 Trp Gly Leu Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Ser Phe Leu Tyr Arg Val
 165 170 175
 Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr
 180 185 190
 Ser His Asp Lys Arg Arg Glu Arg Ala Val Ala Ile Val Arg Leu Val
 195 200 205
 Leu Gly Phe Leu Trp Pro Leu Leu Thr Leu Thr Ile Cys Tyr Thr Phe
 210 215 220
 Ile Leu Leu Arg Thr Trp Ser Arg Arg Ala Thr Arg Ser Thr Lys Thr
 225 230 235 240
 Leu Lys Val Val Val Ala Val Val Ala Ser Phe Phe Ile Phe Trp Leu
 245 250 255
 Pro Tyr Gln Val Thr Gly Ile Met Met Ser Phe Leu Glu Pro Ser Ser
 260 265 270
 Pro Thr Phe Leu Leu Leu Asn Lys Leu Asp Ser Leu Cys Val Ser Phe
 275 280 285
 Ala Tyr Ile Asn Cys Cys Ile Asn Pro Ile Ile Tyr Val Val Ala Gly

ES 2 561 828 T3

290		295		300											
Gln	Gly	Phe	Gln	Gly	Arg	Leu	Arg	Lys	Ser	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Arg
305					310					315					320
Asn	Val	Leu	Thr	Glu	Glu	Ser	Val	Val	Arg	Glu	Ser	Lys	Ser	Phe	Thr
				325					330					335	
Arg	Ser	Thr	Val	Asp	Thr	Met	Ala	Gln	Lys	Thr	Gln	Ala	Val		
			340					345					350		

<210> 2

< 211> 23
 < 212> DNA
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Cebador PCR

<400> 2
 gatgttttga tgacccaaac tcc 23
 <210> 3
 < 211> 25
 < 212> DNA
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Cebador PCR

<400> 3
 acactcattc ctgtgaagc tcttg 25
 <210> 4
 < 211> 20
 < 212> DNA
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Cebador PCR

<400> 4
 saggtccagc tgcarcagtc 20
 <210> 5
 < 211> 18
 < 212> DNA
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Cebador PCR

<400> 5
 tgggcatgaa gaacctgg 18
 <210> 6
 < 211> 23
 < 212> DNA
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Cebador PCR

<400> 6
 gatgttttga tgacccaaac tcc 23
 <210> 7
 < 211> 25
 < 212> DNA
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Cebador PCR

<400> 7
 acactcattc ctgttgaagc tcttg 25
 <210> 8
 < 211> 20
 < 212> DNA
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Cebador PCR

<400> 8
 saggtccagc tgcarcagtc 20
 <210> 9
 < 211> 18
 < 212> DNA
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Cebador PCR

<400> 9
 ttgcatgga ggacaggg 18
 <210> 10
 < 211> 23
 < 212> DNA
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Cebador PCR

<400> 10
 gatgtttga tgacccaac tcc 23
 <210> 11
 < 211> 25
 < 212> DNA
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Cebador PCR

<400> 11
 acactcattc ctgttgaagc tcttg 25
 <210> 12
 < 211> 20
 < 212> DNA
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Cebador PCR

<400> 12
 caggtgcagc tgaagsagtc 20
 <210> 13
 < 211> 18
 < 212> DNA
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Cebador PCR

<400> 13
 tgggcatgaa gaacctgg 18
 <210> 14
 < 211> 336
 < 212> DNA
 < 213> Mus musculus

<400> 14

ES 2 561 828 T3

gatgttgta tgacccaaat tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaaacctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagccttata cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggggcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tatgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttctc 300
ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 15
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 15

Asp Val Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Thr Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ile His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Met Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 16
<211> 363
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 16

caggttcagc tgacagcagtc tggacctgag gtggtgaagc ctggggcctc agtgaagatt 60
tcctgcaagg ctctctggcta cgcattcagt aggtcctgga tgaactgggt gaagcagagg 120
cctggaaagg gtcttgagtg gattggacgg attgatgctg gagatggaga tactaaatac 180
aatgggaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct acttctgtgc aagccttctc 300
attactacgg tagtgggagc tatggactac tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 17
<211> 121

ES 2 561 828 T3

< 212> PRT
 < 213> Mus musculus

<400> 17

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Arg Ser
 20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Arg Ile Asp Ala Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Ser Leu Leu Ile Thr Thr Val Val Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 18
 < 211> 336
 < 212> DNA
 < 213> Mus musculus

<400> 18

gatgttgatga tgaccaaatc tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaaa tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcagga cagatttctc actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acttgttccg 300
 ctcacgttcg gtgctgggac caagctggaa ctgaaa 336

<210> 19
 < 211> 112
 < 212> PRT
 < 213> Mus musculus

<400> 19

ES 2 561 828 T3

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

<210> 22
 < 211> 336
 < 212> DNA
 < 213> Mus musculus

<400> 22
 gatgttgta tgaccctaac tccactctcc ctgctgtca gtctggaga tcaagcctcc 60
 atctcttgta gatctagtca ggccttgta cacagtagtg gaaacaccta tttacattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtctc caaccgattt 180
 tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cacatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggaatt tatttctgct ctcaaagtac acttgttcct 300
 cgcacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 23
 < 211> 112
 < 212> PRT
 < 213> Mus musculus

<400> 23

ES 2 561 828 T3

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

<210> 24
 < 211> 357
 < 212> DNA
 < 213> Mus musculus

<400> 24

caggTgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggTggcgc cctcacagag cctgtccatc 60
 acatgcactg tctctggggt ctcattaacc agctatggTg tagactgggt tcgccagtct 120
 ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagta atatggggTg ttggaagcac aaattataat 180
 tcagctctca aatccagact gagcatcagc aaggacaact ccaagagcca agttttctta 240
 aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacgca gccatgtact actgtgccag ccactatggT 300
 tacgacggTc tggggtttgc ttactggggc caagggactc tggTcactgt ctctgta 357

<210> 25
 < 211> 119
 < 212> PRT
 < 213> Mus musculus

<400> 25

ES 2 561 828 T3

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Val Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Ala Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Ser His Tyr Gly Tyr Asp Gly Leu Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Val
 115

<210> 26
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 26

Asn Ser Trp Asn Asn
 1 5

<210> 27
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 27

Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 28

Phe Leu Leu Ile Ser Thr Val Thr Ala Val Asp Tyr
 1 5 10

<210> 29
 <211> 5
 <212> PRT

ES 2 561 828 T3

< 213> Mus musculus
<400> 29

Arg Ser Trp Met Asn
1 5

<210> 30
< 211> 17
< 212> PRT
< 213> Mus musculus

<400> 30

Arg Ile Asp Ala Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 31
< 211> 12
< 212> PRT
< 213> Mus musculus

<400> 31

Leu Leu Ile Thr Thr Val Val Gly Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 32
< 211> 5
< 212> PRT
< 213> Mus musculus

<400> 32

Ser Tyr Gly Val Asp
1 5

<210> 33
< 211> 16
< 212> PRT
< 213> Mus musculus

<400> 33

Val Ile Trp Gly Val Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 34
< 211> 11
< 212> PRT
< 213> Mus musculus

<400> 34

His Tyr Gly Tyr Asp Gly Leu Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo que es reactivo con el segundo bucle extracelular, residuos 175 a 206, de C5aR, en el cual el anticuerpo inhibe la fijación de C5a a C5aR.
2. Un anticuerpo conforme a la reivindicación 1 que es reactivo con el mismo epítipo de C5aR como un anticuerpo que comprende:
- 10 (i) la secuencia variable de cadena ligera que se muestra en SEQ ID NO 19 y la secuencia variable de cadena pesada que se muestra en: SEQ ID NO:21;
- (ii) la secuencia variable de cadena ligera que se muestra en SEQ ID NO 15 y la secuencia variable de cadena pesada que se muestra en: SEQ ID NO:17; o
- 15 (iii) la secuencia variable de cadena ligera que se muestra en SEQ ID NO 23 y la secuencia variable de cadena pesada que se muestra en: SEQ ID NO:25.
3. Un anticuerpo conforme a la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende:
- 20 (i) las secuencias de bucle de cadena pesada variables CDR1, CDR2 y CDR3 como se muestran en SEQ id NO:26, SEQ id NO:27 y SEQ id NO:28 respectivamente y las secuencias de bucle de la cadena ligera variable CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen los residuos de aminoácido 24 a 39, 55 a 61 y 94 a 102 respectivamente de la secuencia variable de cadena ligera que se muestra en SEQ id NO:19;
- 25 (ii) la secuencia de bucle de cadena pesada variable CDR1, CDR2 o CDR3 como se muestra en SEQ id NO:29, SEQ id NO:30 y SEQ id NO:31 respectivamente y las secuencias de bucle variable de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen los residuos de aminoácido 24 a 39, 55 a 61 y 94 a 102 respectivamente de la secuencia variable de cadena ligera que se muestra en SEQ id NO:15; o
- 30 (iii) la secuencia de bucle de cadena pesada variable CDR1, CDR2 o CDR3 como se muestra en SEQ id NO:32 SEQ id NO:33 y SEQ id NO:34 respectivamente y las secuencias de bucle variable de cadena ligera CDR1, CDR2 y CDR3 que tienen los residuos de aminoácido 24 a 39, 55 a 61 y 94 a 102 respectivamente de la secuencia variable de cadena ligera que se muestra en SEQ id NO:23.
4. Un anticuerpo conforme a la reivindicación 1 que comprende:
- 35 (i) una secuencia de cadena ligera que comparte al menos 80% de identidad con la secuencia que se muestra en SEQ id NO:19 y una secuencia de cadena pesada que comparte al menos 80% de identidad con la secuencia que se muestra en SEQ id NO:21;
- (ii) una secuencia de cadena ligera que comparte al menos 80% de identidad con la secuencia que se muestra en SEQ id NO:15 y una secuencia de cadena pesada que comparte al menos 80% de identidad con la secuencia que se muestra en SEQ id NO:17; o
- 40 (iii) una secuencia de cadena ligera que comparte al menos 80% de identidad con la secuencia que se muestra en SEQ id NO:23 y una secuencia de cadena pesada que comparte al menos 80% de identidad con la secuencia que se muestra en SEQ id NO:25.
5. Un anticuerpo conforme a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o recombinante.
- 45 6. Un anticuerpo conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.
7. Un conjugado que comprende un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un agente terapéutico.
- 50 8. Un conjugado que comprende un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un marcador detectable.
9. Una molécula de ácido nucleico aislada, comprendiendo la molécula de ácido nucleico una secuencia que codifica un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 55 10. Una composición que comprende un anticuerpo conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 60 11. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso como medicamento.
12. Un método para diagnosticar un trastorno que implica migración de neutrófilos en un individuo, comprendiendo el método poner en contacto una muestra obtenida del individuo in vitro con un conjugado de la reivindicación 8, y detectar la fijación inmuno-específica entre el conjugado y la muestra.
- 65

13. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o alérgica, una enfermedad autoinmune, rechazo de injerto, aterosclerosis o cánceres con infiltración de leucocitos de la piel o los órganos.

5

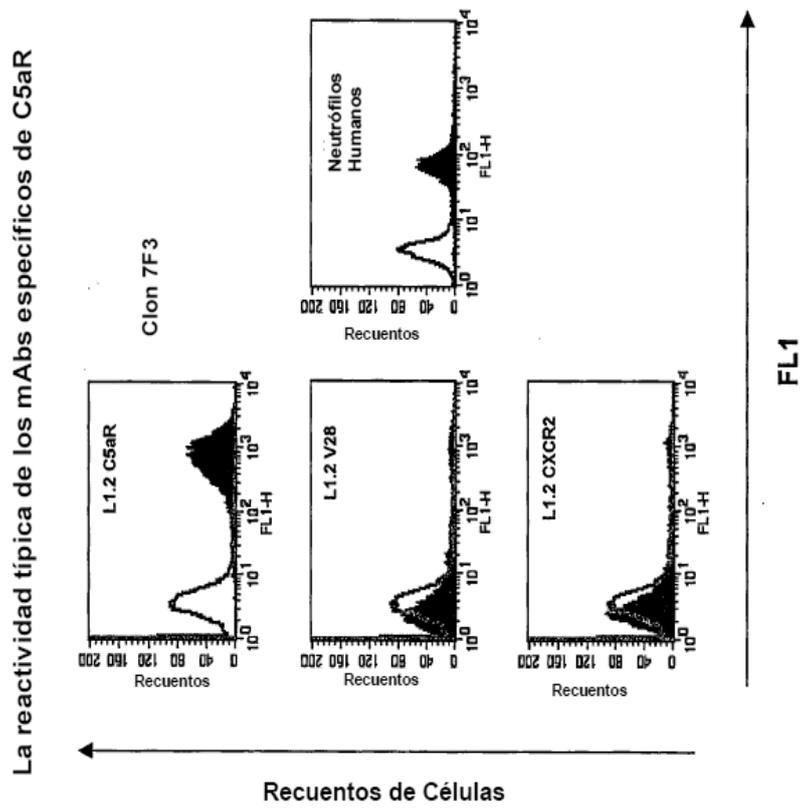


Figura 1

Ciertos mAbs para C5aR inhiben la fijación de ligandos

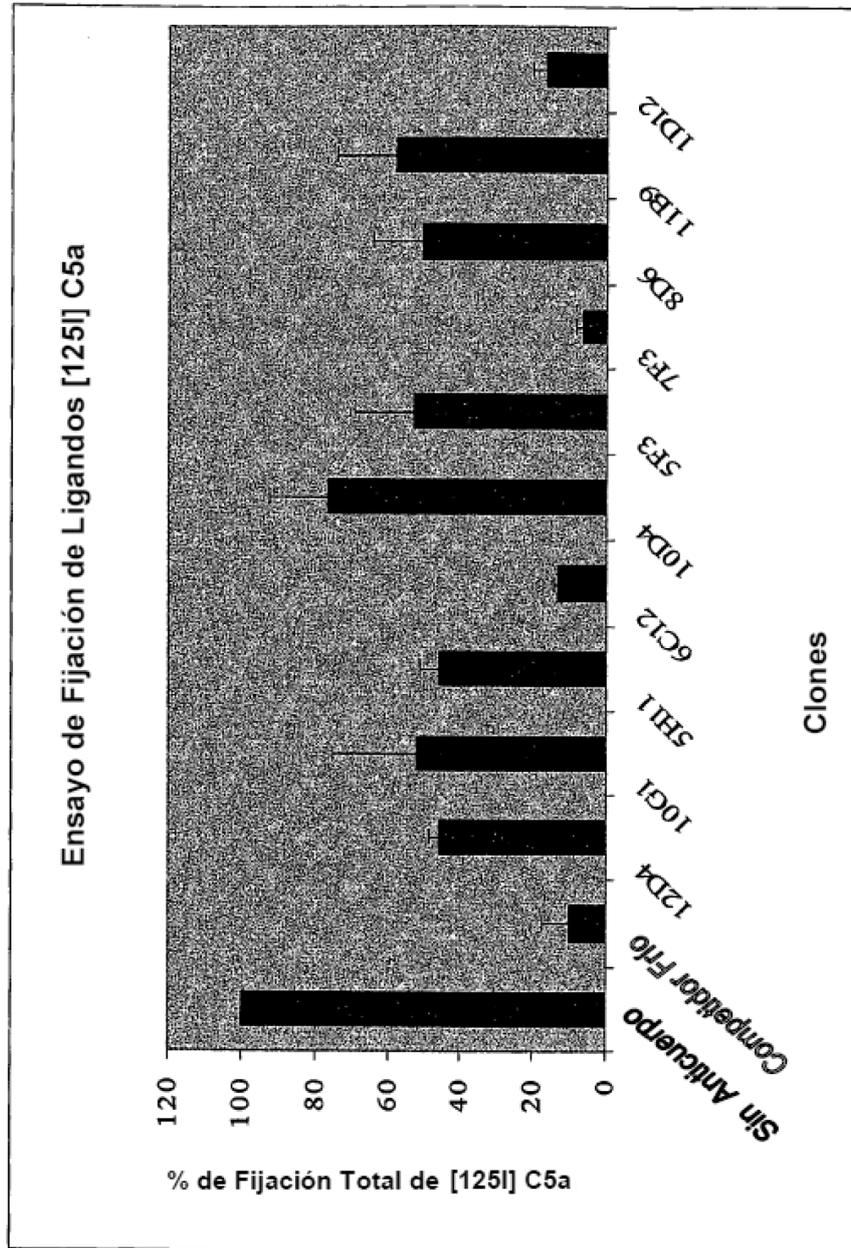


Figura 2

Inhibición por MAb 7F3 de la respuesta a la dosis de fijación de ligando

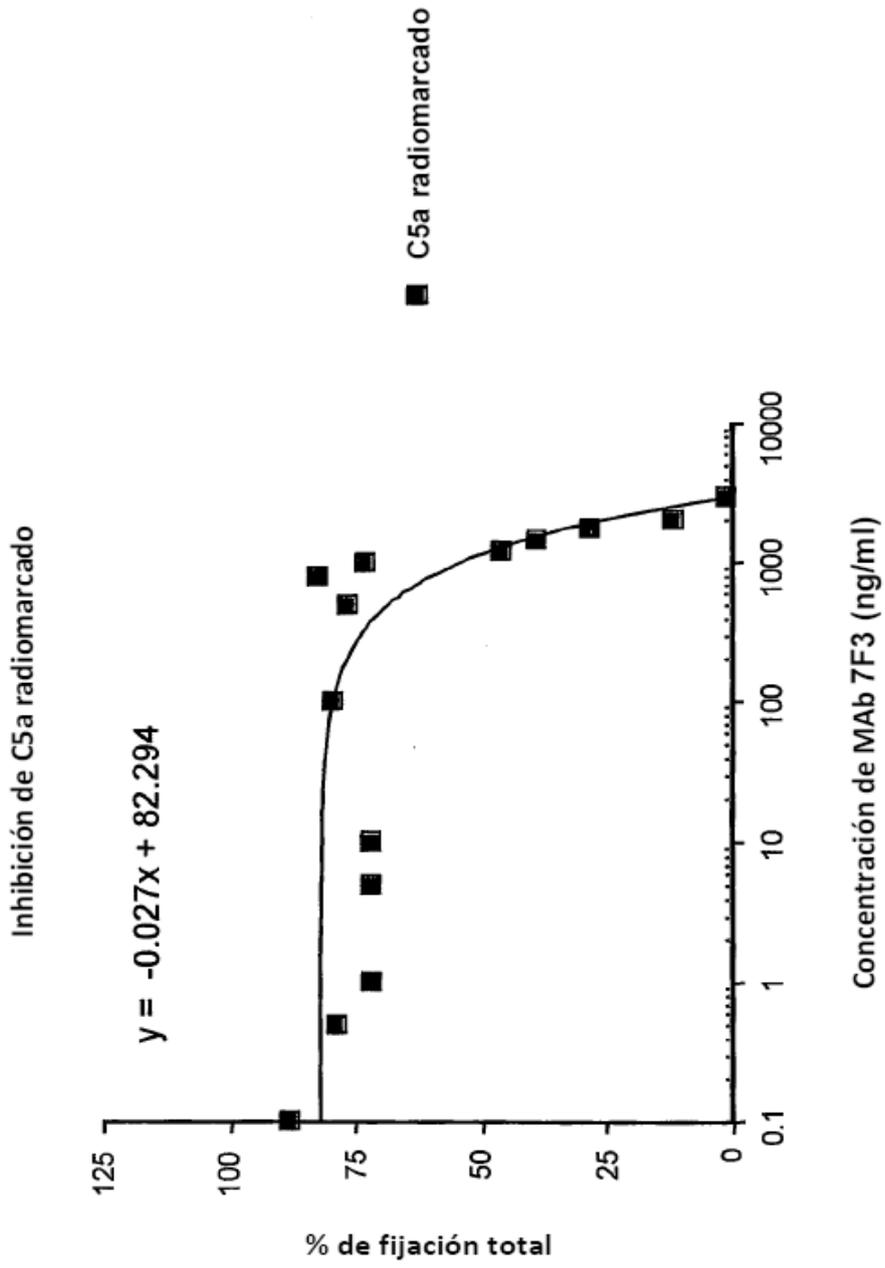


Figura 3

Inhibición completa de la quimiotaxis del transfectante C5aR por anticuerpos seleccionados

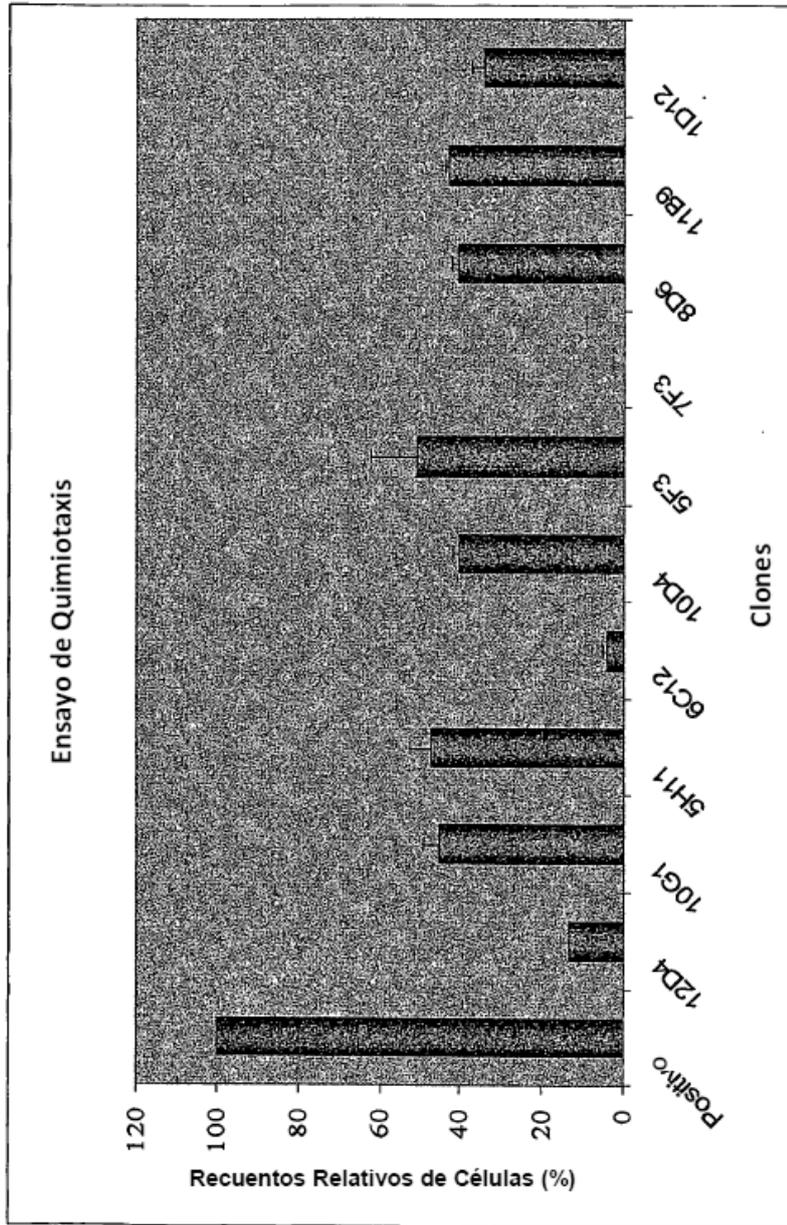


Figura 4

Inhibición completa de la quimiotaxis del transfectante C5aR L1.2

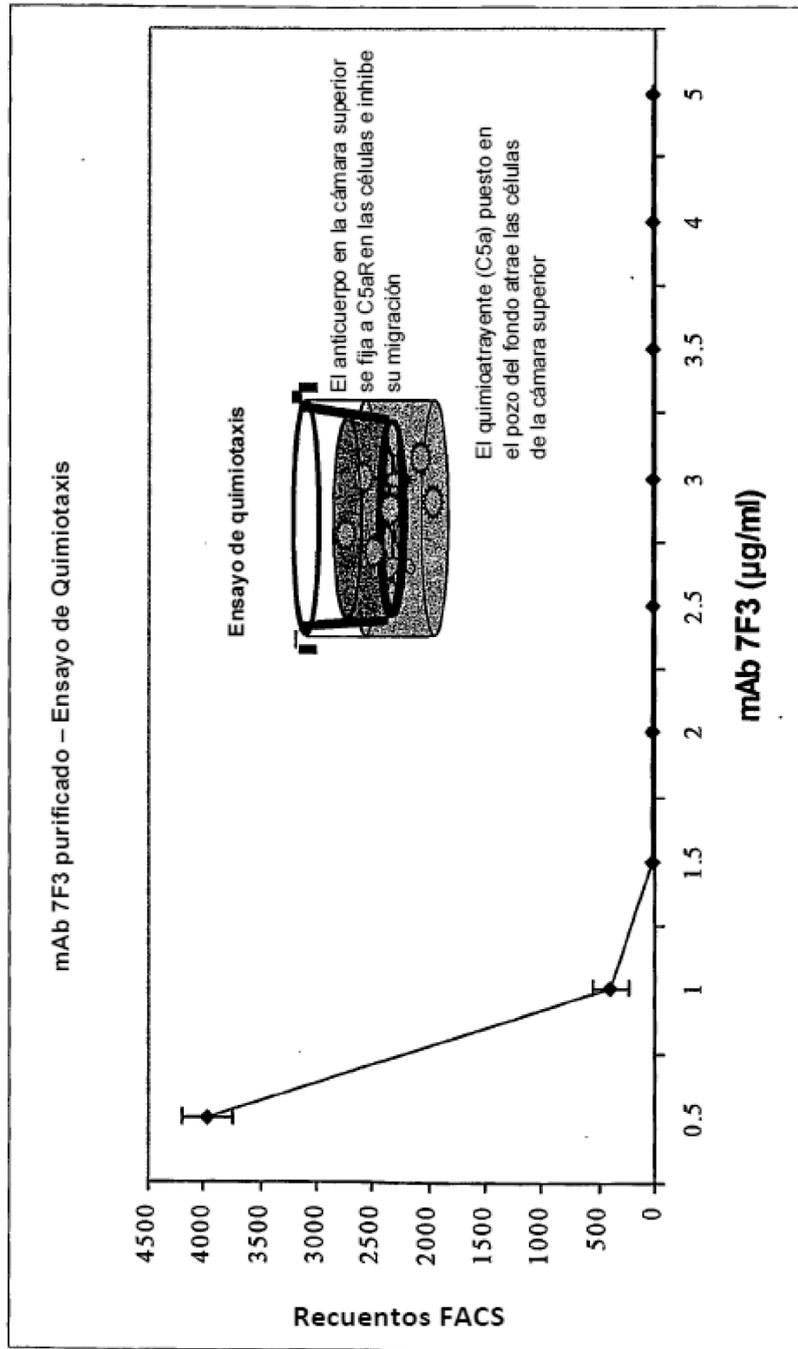


Figura 5

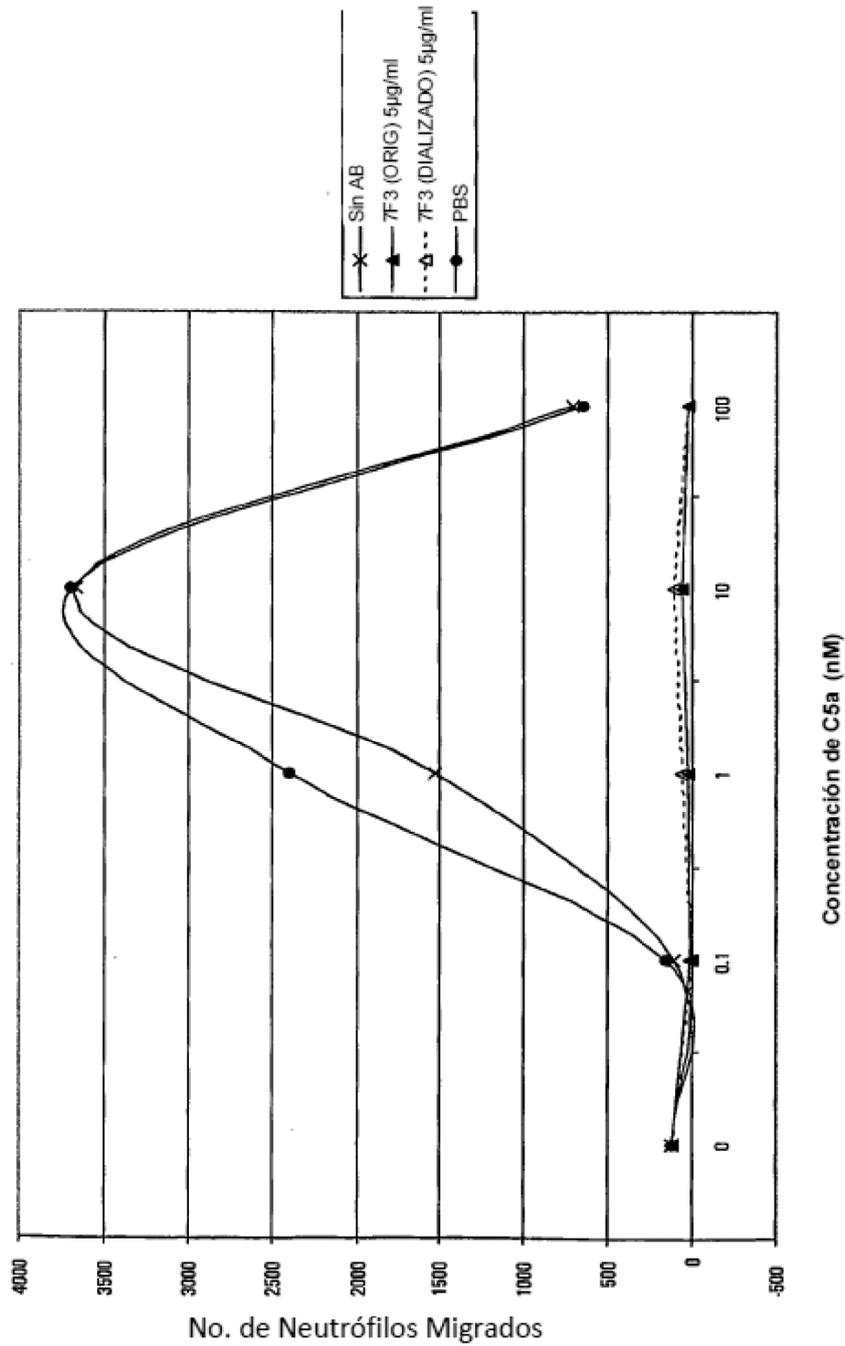


Figura 6

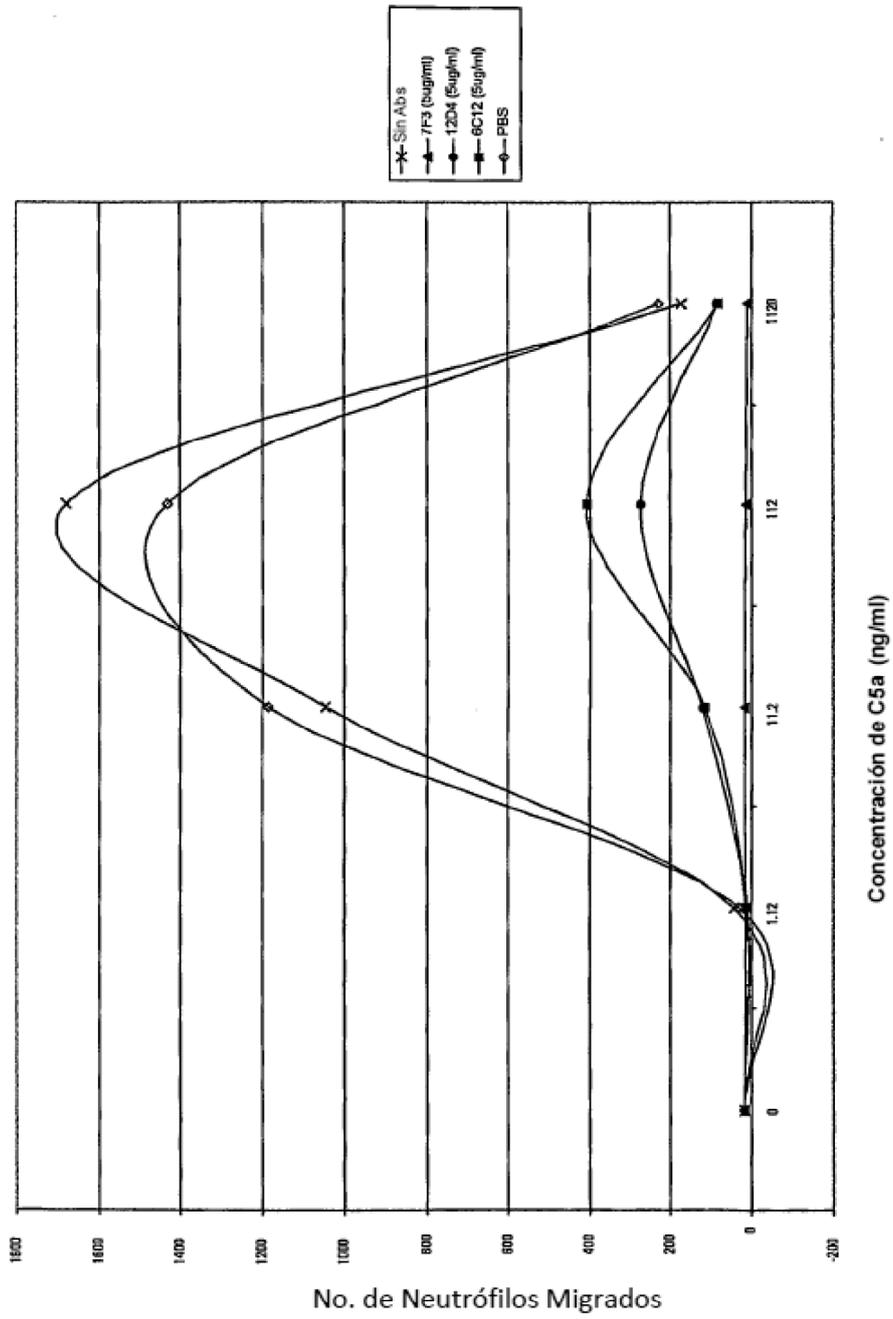


Figura 7

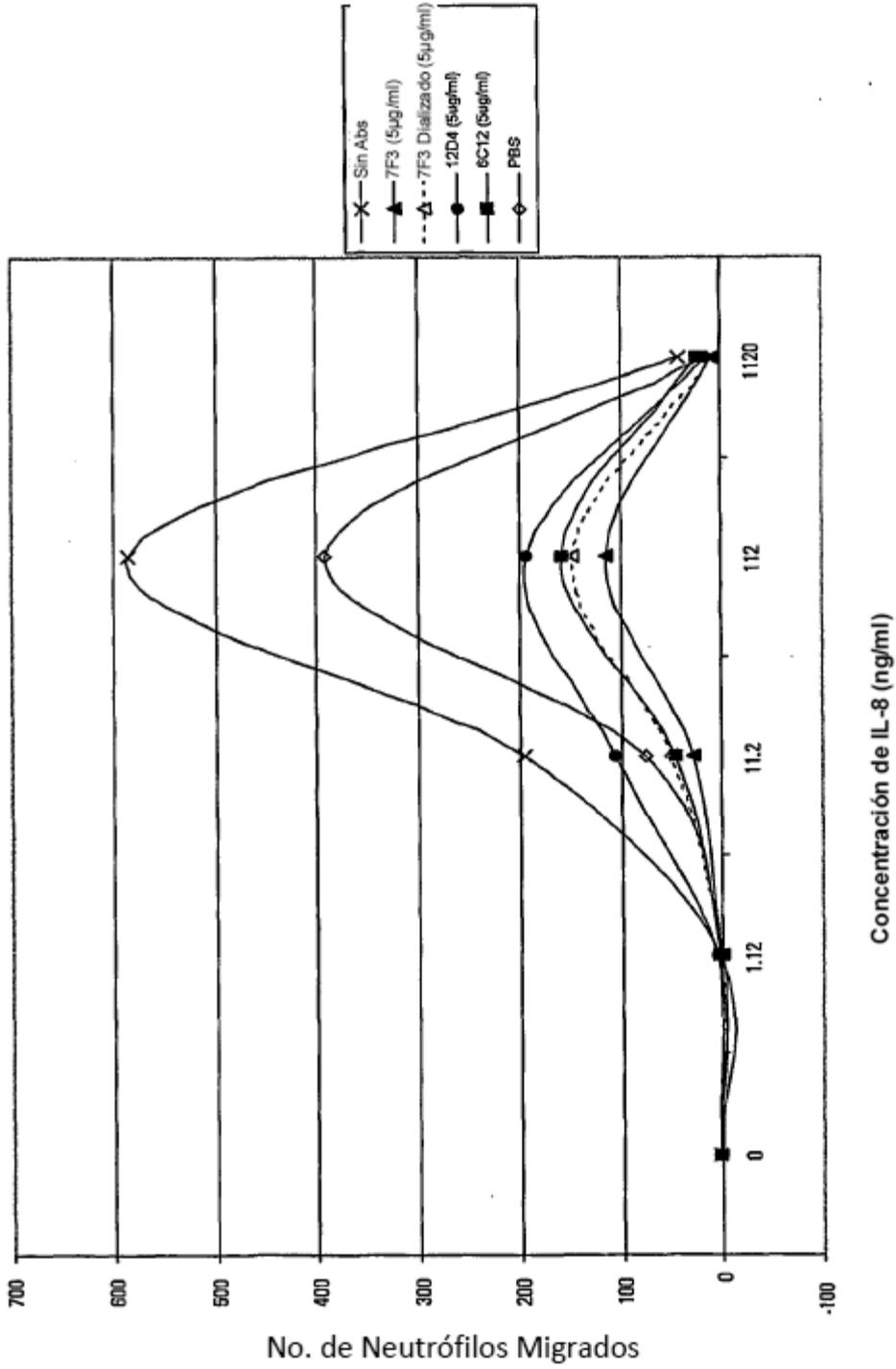


Figura 8

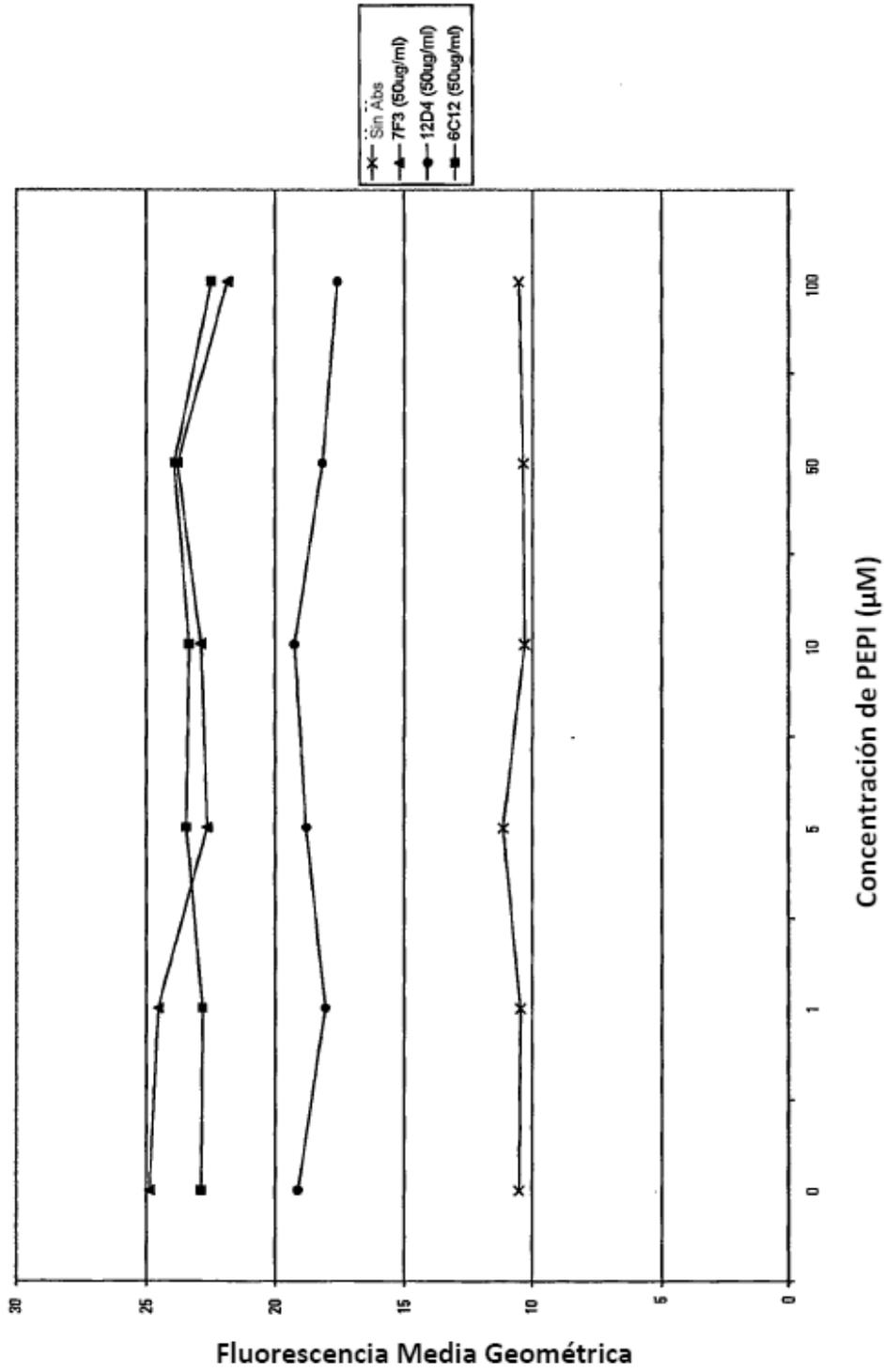


Figura 9a

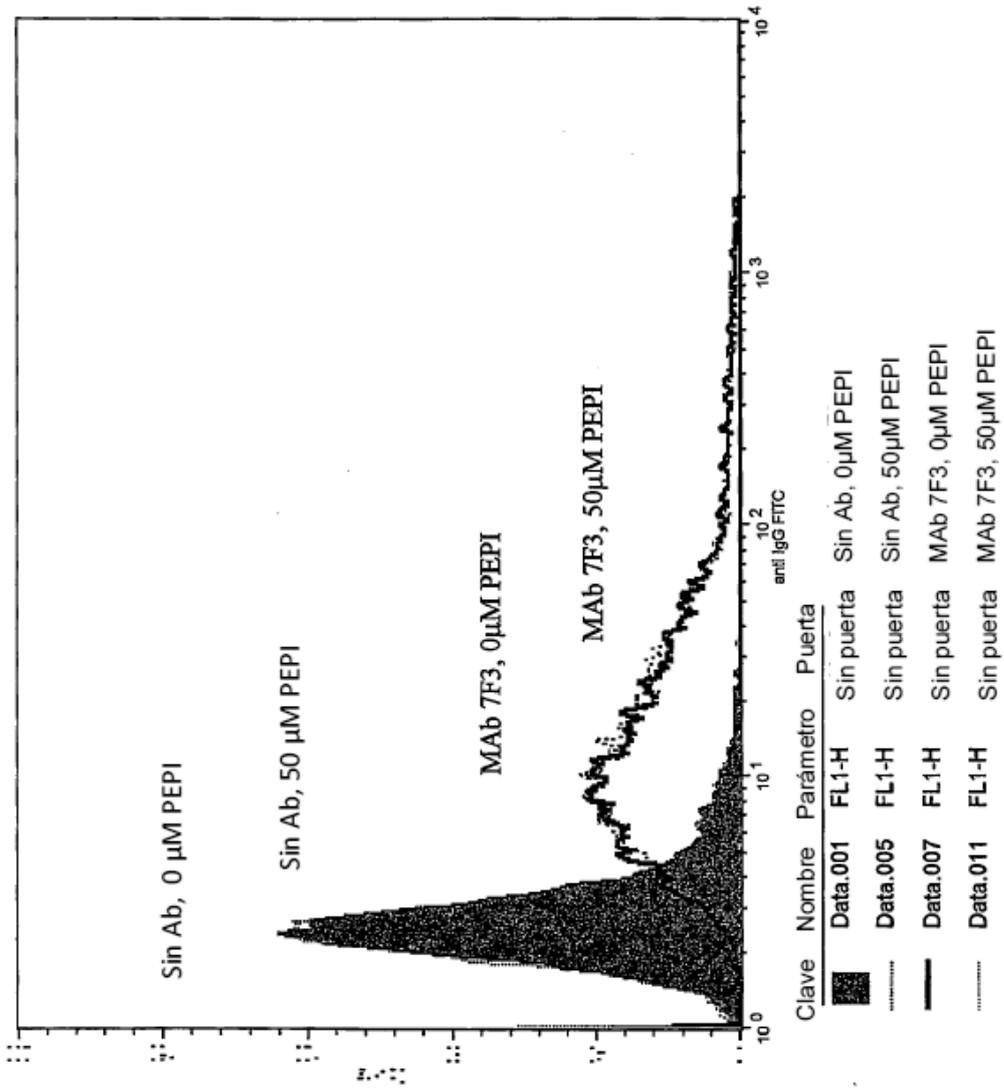


Figura 9b

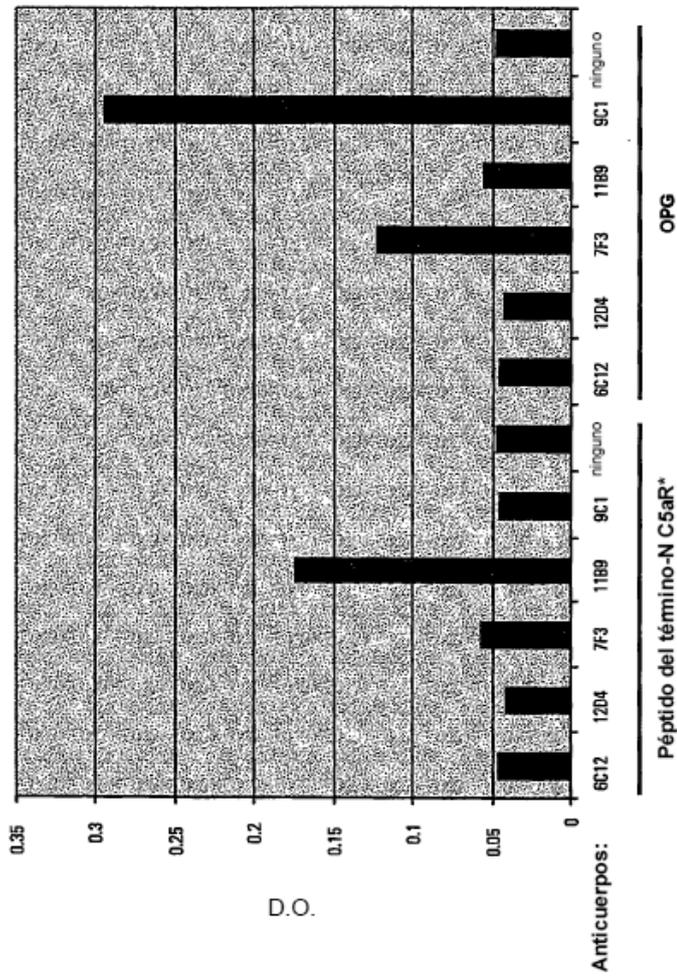


Figura 10

Secuencias de DNA de cadena ligera variable de MAb Anti-C5aR

```

              10         20         30         40         50
7F3 Vk      GATGTTGTGATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAAA
6c12 Vk     GATGTTGTGATGACCCAATTCCTACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGA
12d4 Vk     GATGTTGTGATGACCCAATTCCTACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGA
*****

              60         70         80         90         100
7F3 Vk      TCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATG
6c12 Vk     TCAAACCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTATAACACAGTAATG
12d4 Vk     TCAAGCCTCCATCTCTTGTAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAGTG
****

              110        120        130        140        150
7F3 Vk      GAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAG
6c12 Vk     GAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAG
12d4 Vk     GAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAG
*****

              160        170        180        190        200
7F3 Vk      CTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT
6c12 Vk     CTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT
12d4 Vk     CTCCTGATCTACAAAGTCTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT
*****

              210        220        230        240        250
7F3 Vk      CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCTCACTCAAGATCAGCAGAGTGG
6c12 Vk     CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGG
12d4 Vk     CAGTGGCAGTGGATCAGGGACACATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGG
*****

              260        270        280        290        300
7F3 Vk      AGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACTTGTTCGG
6c12 Vk     AGGCTGAGGATATGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTTCT
12d4 Vk     AGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACTTGTTCCT
*****

              310        320        330
7F3 Vk      CTCACGTTTCGGTCTGGGACCAAGCTGGAACTGAAA
6c12 Vk     CCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
12d4 Vk     CCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA
* ***** ** ***** * ****

```

Figura 11

Secuencias de proteínas de cadena ligera variable de MAb Anti-C5aR

	FR1		CDR1		FR2		
	10	20	30	40	50		
7F3 Vk	DVVM	TQSP	LSL	PLVSLGNQASISC	RSSQ	SLVHSNGNTYLH	WYLQKPGQSPK
6c12 Vk	DVVM	TQIPL	SLVSLGDQTSISC	RSSQ	SLIHSNGNTYLH	WYLQKPGQSPK	
12d4 Vk	DVVM	TQTPL	SLVSLGDQASISC	RSSQ	SLVHSSGNTYLH	WYLQKPGQSPK	
	*****	*****	*.*****	*****	.**	*****	*****

	CDR2		FR3		CDR3	
	60	70	80	90	100	
7F3 Vk	LLIY	KVSNRFS	GVPDR	FSGSGSGTDFSLKISRVEADLGVYFC	SQSTLVP	
6c12 Vk	LLIY	KVSNRFS	GVPDR	FSGSGSGTDFTLKISRVEADMGVYFC	SQSTHVP	
12d4 Vk	LLIY	KVSNRFS	GVPDR	FSGSGSGTHFTLKISRVEADLGIYFC	SQSTLVP	
	****	*****	*****	*****	.*.*****	****

	FR4	
	110	
7F3 Vk	LT	FGAGTKLELK
6c12 Vk	PT	FGGGTKLEIK
12d4 Vk	PT	FGGGTKLEIK
	*	** ***** *

Figura 13

