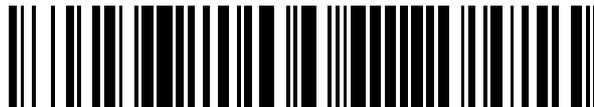


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 627**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2009 E 09713373 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2015 EP 2254911**

54 Título: **Anticuerpos anti-C5aR humanizados**

30 Prioridad:

20.02.2008 US 66539 P

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

07.03.2016

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Novo Allé

2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:

WHITFELD, PETER;

ZAHRA, DAVID y

MACKAY, CHARLES

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 562 627 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-C5aR humanizados

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se dirige a anticuerpos humanizados que se unen al receptor de C5a humano y a su uso como agentes terapéuticos y de diagnóstico. La presente invención se dirige además a secuencias de ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos humanizados, y a su expresión en células hospedadoras recombinantes. En particular, la presente invención se dirige a anticuerpos humanizados obtenidos a partir del anticuerpo murino 7F3 que se une específicamente al receptor de C5a humano.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La proteólisis de cada una de las proteínas del complemento C3-C5 da lugar a fragmentos catiónicos amino-terminales con moléculas de señalización denominadas anafilotoxinas. La más potente de ellas, C5a, provoca las respuestas más amplias. Teniendo en cuenta los componentes de la respuesta inflamatoria como la marginación y la infiltración de leucocitos, la liberación de enzimas proteolíticas unidas a gránulos, la producción de oxígeno activo y radicales derivados de nitrógeno, los cambios en el flujo sanguíneo y la fuga capilar, junto con la capacidad para
15 contraer el músculo liso, la molécula C5a es el mediador proinflamatorio "completo". Desde el nivel subnanomolar a nanomolar, la molécula C5a provoca una quimiotaxis de todos los linajes mieloides (neutrófilos, eosinófilos y basófilos, macrófagos y monocitos), y causa una permeabilidad vascular que está potenciada marcadamente por las prostaglandinas y los leucocitos circulantes. Concentraciones nanomolares más altas provocan la desgranulación y la activación de la NADPH oxidasa. Esta amplitud de la bioactividad contrasta con otros mediadores inflamatorios.
20 C5a está implicada en la patogénesis de diversos trastornos, incluyendo artritis reumatoide, psoriasis, sepsis, lesión por reperfusión y síndrome de dificultad respiratoria del adulto (Gerard y Gerard, 1994; Murdoch y Finn, 2000).

Las actividades de C5a están mediadas por la unión de la C5a a su receptor (C5aR). C5aR pertenece a la familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a la proteína G. C5aR es un receptor de alta afinidad
25 hacia C5a, con una Kd de ~1 nM, y se encuentra localizado en una variedad de diferentes tipos de células incluyendo los leucocitos. El número de receptores por célula es extremadamente alto, hasta de 200.000 sitios por leucocito. La activación biológica del receptor se produce por encima del rango que satura la unión.

La estructura de C5aR se ajusta a la familia de receptores de siete dominios transmembranales, estando seguido el extremo N-terminal extracelular por siete hélices transmembranales conectadas por dominios interhelicoidales que se alternan como bucles intracelulares y extracelulares, y terminando con un dominio C-terminal intracelular. C5aR
30 contiene un dominio extracelular N-terminal extendido. Este gran dominio N-terminal es típico de los receptores acoplados a la proteína G que se unen a péptidos que incluyen las familias de receptores de IL-8 y fMet-Leu-Phe (FMLP).

La inhibición de las respuestas de C5a con antagonistas de C5aR reduce la respuesta inflamatoria aguda mediada a través de C5a, sin afectar a otros componentes del complemento. Con este fin, se han descrito previamente
35 antagonistas del péptido C5aR y anticuerpos anti-receptor de C5a (Watanabe et al., 1995; Pellas et al., 1998; Konteatis et al., 1994; Kaneko et al., 1995; Morgan et al., 1993; Monk et al., 2007; Lee et al., 2006; Robinson et al., 2004; Wu H., 2003; Proctor et al., 2006; Whitfeld et al., 2007; Rudikoff et al., 1982; documento WO2005/060739). Por ejemplo, el documento WO 95/00164 describe anticuerpos dirigidos contra un péptido N-terminal (residuos 9-29) de C5aR.

40 Los documentos WO 03/062278 y WO2008/022239 también describen anticuerpos dirigidos contra C5aR. Tres de estos anticuerpos de ratón en el documento WO 03/062278 se denominaron 7F3, 6C12 y 12D4. Estos anticuerpos mostraron tener excelentes propiedades, tales como ser muy eficaces en el bloqueo de la unión de C5a a su receptor, detener la migración dirigida por C5a de los neutrófilos *in vitro*, y prevenir la inflamación en modelos animales. Para controlar enfermedades crónicas, puede ser necesario administrar el anticuerpo en sucesivas
45 ocasiones durante meses o años. Sin embargo, un inconveniente de la administración de anticuerpos de ratón es que el sistema inmunológico humano puede generar sus propios anticuerpos dirigidos contra el anticuerpo de ratón (la respuesta HAMA). La respuesta HAMA puede neutralizar los anticuerpos de ratón, aclarándolos rápidamente de la sangre, impidiendo así que el anticuerpo de ratón se una a su diana.

Para evitar el desarrollo de una respuesta HAMA, una estrategia que se ha adoptado es la de "humanizar" el anticuerpo de ratón, mediante la sustitución de tantos residuos "ajenos" como sea posible en las regiones que se unen a no epítomos, con secuencias humanas. Sin embargo, este proceso da frecuentemente como resultado la pérdida de antigenicidad. Por otra parte, los investigadores en la técnica de humanización de anticuerpos se han esforzado para caracterizar unas directrices apropiadas para producir de forma fiable anticuerpos humanizados que tengan todos los requisitos necesarios para el uso en la terapia humana.
50

Un problema importante de los procedimientos de humanización ha sido una pérdida de la afinidad hacia el antígeno (Jones et al., 1986), en algunos casos tanto como 10 veces o más, especialmente cuando el antígeno es una proteína (Verhoeyen et al., 1988). La pérdida de afinidad es, por supuesto, altamente indeseable. Como mínimo,
55

esto significa que se tendrá que inyectar más anticuerpo humanizado al paciente, con mayores costes y un mayor riesgo de efectos adversos. Incluso de manera más decisiva, un anticuerpo con afinidad reducida puede tener unas funciones biológicas peores, tales como lisis del complemento, citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo o neutralización de virus. Por lo tanto, la estructura de cualquier anticuerpo final que es útil para aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico, basada en la humanización, es actualmente impredecible, siendo necesarias frecuentemente varias repeticiones y el empleo de diversas técnicas para obtener un anticuerpo humanizado útil.

Existe una necesidad de antagonistas de C5aR alternativos y/o mejorados que se puedan utilizar en métodos de diagnóstico y/o terapéuticos. En particular, existe una necesidad de desarrollar anticuerpos anti-C5aR humanizados, adecuados para dichos métodos de diagnóstico y/o terapéuticos en los seres humanos.

10 **COMPENDIO DE LA INVENCIÓN**

Se ha producido un gran número de anticuerpos humanizados que se unen a C5aR pero que tienen bajas especificidades de unión y/u otras características no deseables. Sin embargo, los presentes inventores han producido unos pocos anticuerpos humanizados relacionados que tienen actividades adecuadas para ser utilizados en métodos de diagnóstico y/o terapéuticos en seres humanos.

15 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo humanizado que se une a C5aR humano, que comprende

i) una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, y

20 ii) una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.

En una realización, el anticuerpo humanizado inhibe la unión de C5a a C5aR humano.

En una realización, el anticuerpo humanizado comprende

i) la cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una región constante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a una o a varias de SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 41, y

25 ii) la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una región constante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a una o a varias de SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45.

En una realización preferida, el anticuerpo humanizado comprende

30 i) una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una región constante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO: 41, y

ii) una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una región constante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO: 45.

35 En una realización, el anticuerpo humanizado es una estructura de cadena de cuatro polipéptidos que consiste en dos cadenas pesadas y dos ligeras, un anticuerpo de cadena sencilla, un diacuerpo, un triacuerpo o un tetracuerpo, o un fragmento de anticuerpo que se une a C5aR humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un polinucleótido aislado y/o exógeno que codifica un anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención o una cadena del mismo.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la presente invención.

40 En un aspecto adicional, la invención proporciona una célula hospedadora que comprende un polinucleótido y/o un vector de acuerdo con la presente invención.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo, un polinucleótido, un vector y/o una célula hospedadora de acuerdo con la presente invención, y un vehículo.

45 En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo de acuerdo con la presente invención para uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno en un sujeto. En una realización, el trastorno es un trastorno inmunopatológico o una enfermedad inflamatoria.

50 En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula hospedadora y/o una composición de acuerdo con la presente invención en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir un trastorno en un sujeto. En una realización, el trastorno es un trastorno inmunopatológico o una enfermedad inflamatoria.

Los ejemplos de trastornos que se pueden tratar o prevenir incluyen, pero no se limitan a, rinitis alérgica, enfermedades pulmonares por hipersensibilidad, neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades pulmonares intersticiales, respuestas anafilácticas, respuestas de hipersensibilidad, alergias a fármacos, alergias a picaduras de insectos, enfermedades inflamatorias del intestino, espondiloartropatías, esclerodermia, psoriasis, dermatitis, eczema, dermatitis atópica, dermatitis alérgica de contacto, urticaria, vasculitis, artritis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, diabetes juvenil, nefritis, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Behcet, rechazo de injerto, aterosclerosis, cánceres con infiltración de leucocitos de la piel u órganos, lesión por reperfusión, accidente cerebrovascular, síndrome de distrés respiratorio del adulto, neoplasias malignas hematológicas, toxicidad inducida por citocinas, polimiositis, dermatomiositis, pénfigo, enfermedad de Alzheimer, enfermedades granulomatosas, sinovitis hemofílica, gota, reacciones inflamatorias adversas asociadas con infecciones, SAR, sepsis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), artritis reumatoide, síndrome anti-fosfolípido, degeneración macular relacionada con la edad, glomerulonefritis membranoproliferativa y enfermedad por depósitos densos.

Como el experto correspondiente apreciará, cuando un polinucleótido de la invención, un vector de la invención y/o una célula hospedadora se administran al sujeto, será en condiciones adecuadas de modo que el anticuerpo o el conjugado se exprese *in vivo*.

La invención se describe a continuación por medio de los siguientes Ejemplos no limitantes y haciendo referencia a las figuras adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS ACOMPAÑANTES

Figura 1. Alineación ClustalW de secuencias de la cadena ligera de Ig humana con mayor homología con la región Vk de la cadena ligera de 7F3 de ratón. Las CDRs tal como se definen para 7F3 están encuadradas. Se muestra la secuencia marco de consenso, hVkJFW Cons.

Figura 2. Alineación ClustalW de secuencias de la región V de la cadena pesada de Ig humana (A) y secuencias de la región J (B) con mayor homología con la secuencia Vh de la cadena pesada de 7F3 de ratón. Las CDRs tal y como se definen para 7F3 están encuadradas. Las secuencias marco de consenso para la región V (hVhVFW Cons) y la región J (hVhJFW Cons) tal y como se muestran, se unieron para crear una secuencia de consenso (hVhFW Cons) para injertar las CDRs de 7F3 (nota: la región D está contenida dentro de CDR-H3).

Figura 3. Una alineación de la secuencia marco de Vk humana de consenso de la Figura 1 con la secuencia Vk de 7F3 de ratón se utilizó para crear la secuencia de la cadena ligera Vk humanizada de 7F3, h7Vk. Las CDRs de 7F3 de ratón (encuadradas) se injertaron en la secuencia marco de consenso hVkJFW. Los tres aminoácidos marcados con un asterisco se retromutaron a la secuencia marco de 7F3 de ratón.

Figura 4. Una alineación de la secuencia RNOK203VL humanizada con una secuencia Vk de 7F3 de ratón se utilizó para crear la secuencia de la cadena ligera Vk humanizada de 7F3, h7aVk. Las CDRs de 7F3 de ratón (encuadradas) se injertaron en la secuencia marco RNOK203VL.

Figura 5. Una alineación de la secuencia VLCD18-Q obtenida a partir de KV2F-HUMAN con la secuencia Vk de 7F3 de ratón, se utilizó para crear la secuencia de la cadena ligera Vk de 7F3 humanizada, h7bVk. Las CDRs de 7F3 de ratón (encuadradas) se injertaron en la secuencia marco VLCD18-Q.

Figura 6. Una alineación de la secuencia Vk de 7F3 humanizada con secuencias Vk de 7F3 de ratón. La secuencia de consenso h7F3VkJFW Cons es un consenso de las tres secuencias humanizadas. Las CDRs están encuadradas. Las diferencias entre las secuencias Vk de 7F3 humanizadas se indican por letras blancas sobre fondo negro.

Figura 7. Una alineación de la secuencia marco Vh de consenso humana de la Figura 2A y 2B con la secuencia Vh de 7F3 de ratón se utilizó para crear la secuencia de la cadena pesada Vh de 7F3 humanizada, h7Vh. Las CDRs de 7F3 de ratón (encuadradas) se injertaron en la secuencia marco de consenso hVhVFW. Los aminoácidos marcados con un asterisco (*) se retromutaron a la secuencia marco de 7F3 de ratón. Los aminoácidos marcados con # se mutaron a residuos alternativos tal y como se describe en el texto.

Figura 8. Una alineación de la secuencia SGI-VH humana con la secuencia Vh de 7F3 de ratón se utilizó para crear la secuencia de la cadena pesada Vh de 7F3 humanizada, h7aVh. Las CDRs de 7F3 de ratón (encuadradas) se injertaron en la secuencia marco SGI-VH. Los aminoácidos marcados con un asterisco (*) se retromutaron a la secuencia marco de 7F3 de ratón.

Figura 9. Una alineación de la secuencia HG3 humana con la secuencia Vh de 7F3 de ratón se utilizó para crear la secuencia de la cadena pesada Vh de 7F3 humanizada, h7bVh. Las CDRs de 7F3 de ratón (encuadradas) se injertaron en la secuencia marco HG3. El aminoácido marcado con un asterisco (*) se retromutó a la secuencia marco de 7F3 de ratón.

Figura 10. Una alineación de las secuencias Vh de 7F3 humanizadas con secuencias Vh de 7F3 de ratón. La secuencia de consenso h7F3VhVFW Cons es un consenso de las tres secuencias humanizadas. Las CDRs están

encuadradas. Las diferencias entre las secuencias Vh de 7F3 humanizadas se indican por letras blancas sobre fondo negro.

Figura 11. Ensayos de unión competitiva de ligandos que comparan el desplazamiento de ^{125}I -C5a por anticuerpos 7F3 humanizados y 7F3 de ratón, desde hC5aR en neutrófilos humanos.

5 **Figura 12.** Ensayos de unión competitiva de ligandos que comparan el desplazamiento de ^{125}I -C5a por anticuerpos 7F3 humanizados y 7F3 de ratón, desde hC5aR en transfectantes L1.2/hC5aR.

Figura 13. Unión por saturación de anticuerpos anti-C5aR a neutrófilos humanos a 4°C en un gráfico con escala en \log_{10} (panel superior) y lineal (panel inferior) en el eje x.

10 **Figura 14.** ELISAs de péptidos: Unión de anticuerpos anti-C5aR humanizados hAb-J (panel A) y hAb-Q (panel B) a una serie de péptidos solapantes (n° 1-22) que comprenden una secuencia de 12 meros (cada uno desfasado por uno) desde el segundo bucle extracelular del C5aR humano y un 33 mero que comprende los residuos 173-205 de SEQ ID NO: 37 (n° 23). La unión de hAb-J (panel C) y hAb-Q (panel D) a una secuencia de 12 meros desde el segundo bucle extracelular del C5aR humano (n° A1) una serie de péptidos mutados (n° A2-A13) que comprende el 12 mero con una sola mutación de Ala, y un péptido desorganizado (n° A14).

15 **Figura 15.** Unión de los mAbs anti-C5aR humanizados hAb-J y Q o el mAb anti-C5aR S5/1 (a $5\ \mu\text{g/ml}$) con el péptido PEP1 (residuos 9-29 de SEQ ID NO: 37) que recubren una placa de ELISA con diferentes diluciones.

Figura 16. Ensayo de quimiotaxis: migración de neutrófilos humanos hacia C5a $1\ \text{nM}$ en presencia de $5\ \mu\text{g/ml}$ de 7F3 y diversos anticuerpos 7F3 humanizados.

20 **Figura 17.** Inhibición de la quimiotaxis inducida con C5a, de neutrófilos humanos a través de anticuerpos anti-C5aR hAb-Q (rombos) y 7F3 (cuadrados). Se muestran los resultados promedio ($\pm\text{sem}$) de 4 experimentos distintos como el porcentaje de la migración máxima de una muestra de control sin anticuerpos (panel superior) o como el número promedio de células que migran (panel inferior). Las unidades en el eje x son el \log_{10} de la concentración de Ab en $\mu\text{g/ml}$.

25 **Figura 18.** Inhibición de la migración celular del transfectante hC5aR/L1.2 dirigida por C5a, a través del anticuerpo parental de ratón 7F3 y los anticuerpos humanizados J y Q.

Figura 19. La quimiotaxis inducida por C5a de neutrófilos humanos se inhibió después de la preincubación con altas concentraciones de anticuerpo anti-C5aR humanizado hAb-Q.

30 **Figura 20.** Relación inversa observada entre el nivel de C5aR libre y ligado al anticuerpo antiC5aR hAb-Q unido sobre neutrófilos humanos antes y después de la quimiotaxis inducida por C5a de células preincubadas con diversas concentraciones de anticuerpo anti-C5aR humanizado hAb-Q.

Figura 21. Relación observada entre el nivel de anticuerpo anti-C5aR hAb-Q unido sobre neutrófilos humanos (antes y después de la quimiotaxis inducida por C5a) y la inhibición de la migración de células preincubadas con diversas concentraciones de anticuerpo anti-C5aR humanizado hAb-Q.

35 **Figura 22.** Inhibición de la expresión inducida por C5a de CD11b en neutrófilos humanos preincubados con varias concentraciones de anticuerpo anti-C5aR humanizado hAb-Q.

Figura 23. Inhibición de la regulación a la baja de CD62L inducida por C5a en neutrófilos humanos preincubados con varias concentraciones de anticuerpo anti-C5aR humanizado hAb-Q.

40 **Figura 24.** Expresión de CD11b (panel A) y CD62L (panel B) sobre los neutrófilos después de incubar durante 1 hora sangre humana completa con anticuerpos anti-C5aR humanizados hAb-Q y hAb-J, PBS o el activador de granulocitos fMLP.

Figura 25. Expresión de CD11b (panel A) y CD62L (panel B) sobre los neutrófilos en relación con el control PBS después de incubar durante 20 min sangre humana completa con anticuerpos anti-C5aR humanizados hAb-G o hAb-J, o C5a.

45 **Figura 26.** Activación de los neutrófilos como se ha indicado mediante cambios en la expresión relativa de CD11b (panel A) y la expresión de CD62L (panel B) en sangre humana completa incubada con hAb-Q, anticuerpo de control del isotipo hIgG solo o anticuerpo hIgG más C5a humana $100\ \text{nM}$.

Figura 27. hAb-Q (denominado Ab anti-C5aR) que no estimula por sí mismo los neutrófilos humanos unidos a un soporte sólido para producir superóxido, pero contrarresta la producción inducida por C5a.

50 **Figura 28.** Número promedio ($\pm\text{de}$) de linfocitos B, monocitos y neutrófilos por ml de sangre humana después de incubar durante 4 h *ex vivo* con anticuerpo anti-C5aR humanizado hAb-Q o controles (rituximab, IgG4 humana irrelevante, PBS).

Figura 29. Tanto por ciento de agotamiento promedio (\pm de) en relación con el control PBS de linfocitos B, monocitos y neutrófilos por ml de sangre humana, después de incubar durante 4 h *ex vivo* con anticuerpo anti-C5aR humanizado hAb-Q o anticuerpos control (rituximab, IgG4 humana irrelevante).

5 **Figura 30.** CDC específica (% de células Ramos E2 ToPro3+ve (lisadas)) tras la incubación con 100 μ g/ml de hAb-Q, rituximab e hlgG4 o 20 μ g/ml de anticuerpo anti-C5aR policlonal en presencia de 1 % de complemento de conejo.

Figura 31. CDC específica (% de células Ramos E2 no viables) después de la incubación con 1-100 μ g/ml de hAb-Q, rituximab e hlgG4 en presencia de 10 % de suero humano. Se ha restado la lisis no específica para cada muestra incubada con 10 % de suero bovino termoinactivado.

10 **Figura 32.** ADCC específica (% de lisis de células diana en muestras "Diana + Efector" después de restar el ruido de fondo de "Solo Medio" y "Solo Diana"): % de células diana Ramos E2 no viables (TP3 +ve) después de la incubación con células efectoras humanas PBMCs más 100 μ g/ml de anticuerpo en medio con 10 % de suero de ternera fetal termoinactivado.

15 **Figura 33.** ADCC específica (% de lisis de células diana en muestras "Diana + Efector" después de restar el ruido de fondo de "Solo Medio" y "Solo Diana"): % de células diana Ramos E2 no viables (TP3 +ve) después de la incubación con células efectoras humanas PBMCs del donante más 1-100 μ g/ml de anticuerpo en medio con 10 % de suero de donante humano.

20 **Figura 34.** Progresión de la enfermedad en un modelo de artritis inflamatoria. La reversión de la inflamación inducida con suero K/BxN en ratones hC5aR con inserción de secuencias génicas (n = 6 por grupo) después de la administración i.p. de 10 mg/kg de anticuerpos anti-hC5aR G, M y N el día 5, se muestra por un cambio en las puntuaciones clínicas promedio del grupo.

Figura 35. Progresión de la enfermedad en un modelo de artritis inflamatoria. La reversión de la inflamación inducida con suero K/BxN en ratones hC5aR con inserción de secuencias génicas (n = 4-5 por grupo) después de la administración i.p. de 1-10 mg/kg de anticuerpos anti-hC5aR C y J el día 5, se muestra por un cambio en las puntuaciones clínicas promedio del grupo.

25 **Figura 36.** Progresión de la enfermedad en un modelo de artritis inflamatoria. La reversión de la inflamación inducida con suero K/BxN en ratones hC5aR con inserción de secuencias génicas (n = 10+ por grupo) después de la administración i.p. de 1-10 mg/kg de hAb-Q el día 5, se muestra por un cambio en las puntuaciones clínicas (B) del tamaño de la pata promedio del grupo (A).

30 **Figura 37.** Nivel de C5aR ocupado a lo largo del tiempo después de la administración *in vivo* de varias dosis de anticuerpo anti-C5aR humanizado, anticuerpo control o PBS.

Figura 38. Nivel de C5aR libre a lo largo del tiempo después de la administración *in vivo* de varias dosis de anticuerpo anti-C5aR humanizado, anticuerpo control o PBS.

Figura 39. Concentración sérica a lo largo del tiempo de hAb-Q administrado terapéuticamente el día 5 a ratones con inflamación de las articulaciones.

35 **Figura 40.** Relación entre la puntuación clínica (nivel de inflamación en las patas y las articulaciones), el nivel de receptor de C5a ocupado y la concentración sérica de hAb-Q en ratones inyectados con suero K/BxN los días 0 y 2, y 10 mg/kg de anticuerpo anti-C5aR humanizado el día 5.

40 **Figura 41.** Relación entre la puntuación clínica (nivel de inflamación en las patas y las articulaciones), el nivel de receptor de C5a ocupado y la concentración sérica de hAb-Q en ratones inyectados con suero K/BxN los días 0 y 2, y 3 mg/kg de anticuerpo anti-C5aR humanizado el día 5.

Figura 42. Relación entre la puntuación clínica (nivel de inflamación en las patas y las articulaciones), el nivel de receptor de C5a ocupado y la concentración sérica de hAb-Q en ratones inyectados con suero K/BxN los días 0 y 2, y 1 mg/kg de anticuerpo anti-C5aR humanizado el día 5.

45 **Figura 43.** Representación esquemática del modelo PK/PD integrado para hAb-Q en un estudio toxicológico y un estudio farmacológico en ratones transgénicos.

50 **Figura 44.** Modelo previsto y concentración observada (izquierda) y ocupación (derecha) en función del tiempo para diferentes dosis i.v., s.c. e i.p. de hAb-Q (referido como Ab anti-C5aR) en un estudio toxicológico (denominado Tox en la leyenda) y un estudio farmacológico (denominado KRN en la leyenda). Para el estudio toxicológico se toman muestras PK después de la dosis el día 1 y después de la dosis el día 43. Los datos del día 43 se suponía que estaban en estado estacionario, e implementados para continuar con la 6ª dosis. Valores promedio del grupo: rombos, ratones individuales: círculos blancos, ajuste del modelo a través del compartimiento diana: línea gruesa.

Figura 45. Representación esquemática del modelo PK/PD para el efecto de hAb-Q sobre la inhibición de la artritis inducida experimentalmente en el estudio farmacológico. Este modelo incorpora la ocupación calculada en el modelo

PK/PD ilustrado en la Figura 43.

Figura 46. Ocupación (izquierda) y cambio en el tamaño de la pata (derecha) en función del tiempo después de una estimulación inflamatoria el día 0, con diferentes dosis i.p. de hAb-Q administradas el día 5 a ratones transgénicos. Mediciones promedio de grupo: rombos negros. Valores de ratones individuales: círculos negros. Ajuste del modelo en cada grupo: línea de color.

Figura 47. Representación esquemática del modelo PK/PD aplicado a predicciones en humanos. El modelo se compone de un modelo de dos compartimentos que emplea parámetros típicos de IgG, aumentados con una disposición mediada por la diana. V_1 = volumen central. V_2 = volumen periférico. CL = aclaramiento. Q = aclaramiento de la distribución. k_{off}/k_{on} = constante de la tasa de asociación/disociación. Renovación = Tiempo que se necesita para renovar la diana y eliminar los anticuerpos unidos. Dos compartimentos de diana se utilizaron para reflejar aquella diana que se cree que se distribuye tanto dentro como fuera de la sangre.

Figura 48. Predicciones modelo para la farmacocinética (izquierda) y la ocupación (derecha) después de una dosificación i.v. de anti-C5aR (hAb-Q). El límite inferior de la cuantificación se indica con una línea horizontal.

Figura 49. Predicciones modelo para la farmacocinética (izquierda) y la ocupación (derecha) después de una dosificación s.c. de anti-C5aR (hAb-Q). El límite inferior de la cuantificación se indica con una línea horizontal.

CLAVE PARA EL LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 - Secuencia de la proteína de la cadena ligera variable de 7F3.

SEQ ID NO: 2 - Secuencia de la proteína de la cadena pesada variable de 7F3.

SEQ ID NO: 3 - Secuencia que codifica la cadena ligera variable de 7F3.

SEQ ID NO: 4 - Secuencia que codifica la cadena pesada variable de 7F3.

SEQ ID NO: 5 - Región variable de la cadena ligera humana de KV2F_human.

SEQ ID NO: 6 - Región variable de la cadena ligera humana de KV2E_human.

SEQ ID NO: 7 - Región variable de la cadena ligera humana de KV2D_human.

SEQ ID NO: 8 - Región variable de la cadena ligera humana de KV2B_human.

SEQ ID NO: 9 - Región variable de la cadena ligera humana de KV2A_human.

SEQ ID NO: 10 - Región variable de la cadena ligera humana de X12691.

SEQ ID NO: 11- Región variable de la cadena ligera humana de U41645.

SEQ ID NO: 12 - Región variable de la cadena ligera humana de U41644.

SEQ ID NO: 13 - Región variable de la cadena ligera humana de M31952.

SEQ ID NO: 14 - Secuencia de consenso hVhFW Cons de secuencias variables de la cadena ligera humana conforme a lo dispuesto en la Figura 1.

SEQ ID NO: 15 - Región variable de la cadena pesada humana de Hv1Av_human.

SEQ ID NO: 16 - Región variable de la cadena pesada humana de Hv1Bv_human.

SEQ ID NO: 17 - Región variable de la cadena pesada humana de Hv1Cv_human.

SEQ ID NO: 18 - Región variable de la cadena pesada humana de Hv1Gv_human.

SEQ ID NO: 19 - Región variable de la cadena pesada humana de M99641.aa.

SEQ ID NO: 20 - Región variable de la cadena pesada humana de M99642.aa.

SEQ ID NO: 21 - Región variable de la cadena pesada humana de X62109.aa.

SEQ ID NO: 22 - Región variable de la cadena pesada humana de X92343.aa.

SEQ ID NO: 23 - Región variable de la cadena pesada humana de Z12305.aa.

SEQ ID NO: 24 - Secuencia de consenso hVhFW Cons de secuencias de la región variable (V) de la cadena pesada humana conforme a lo dispuesto en la Figura 2A.

ES 2 562 627 T3

- SEQ ID NO: 25 - Región que se une a la cadena pesada humana de Hv1Cj_human.
- SEQ ID NO: 26 - región que se une a la cadena pesada humana de Hv2lj_human.
- SEQ ID NO: 27 - Región que se une a la cadena pesada humana de Hv3Hj_human.
- SEQ ID NO: 28 - Región que se une a la cadena pesada humana de Hv3Kj_human.
- 5 SEQ ID NO: 29 - Región que se une a la cadena pesada humana de Hv3Tj_human.
- SEQ ID NO: 30 - Secuencia de consenso hVhjFW Cons de secuencias de la región (J) que se une a la cadena pesada humana conforme a lo dispuesto en la Figura 2B.
- SEQ ID NO: 31 - Secuencia de aminoácidos h7Vk de la cadena ligera de la región V humanizada de 7F3.
- SEQ ID NO: 32 - Secuencia de aminoácidos h7aVk de la cadena ligera de la región V humanizada de 7F3.
- 10 SEQ ID NO: 33 - Secuencia de aminoácidos h7bVk de la cadena ligera de la región V humanizada de 7F3.
- SEQ ID NO: 34 - Secuencia de aminoácidos h7Vh de la cadena pesada de la región V humanizada de 7F3.
- SEQ ID NO: 35 - Secuencia de aminoácidos h7aVh de la cadena pesada de la región V humanizada de 7F3.
- SEQ ID NO: 36 - Secuencia de aminoácidos h7bVh de la cadena pesada de la región V humanizada de 7F3.
- SEQ ID NO: 37 - C5aR humano.
- 15 SEQ ID NO: 38 - Epítipo en el segundo bucle extracelular de C5aR humano.
- SEQ ID NO: 39 - Secuencia de consenso h7F3VhCons de las regiones variables de la cadena pesada humanizada de 7F3 de la invención según lo dispuesto en la Figura 10.
- SEQ ID NO: 40 - Región constante de la cadena ligera humana hCk-R.
- SEQ ID NO: 41 - Región constante de la cadena ligera humana hCk.
- 20 SEQ ID NO: 42 - Región constante de la cadena pesada humana hCy4.
- SEQ ID NO: 43 - Región constante de la cadena pesada humana hCy4_{PE}.
- SEQ ID NO: 44 - Región constante de la cadena pesada humana hCy1.
- SEQ ID NO: 45 - Región constante de la cadena pesada humana hCy4_P.
- SEQ ID NO: 46 - Secuencia RNOK203VL humanizada.
- 25 SEQ ID NO: 47 - Secuencia VLCD18-Q obtenida a partir de KV2F-HUMAN.
- SEQ ID NO: 48 - Secuencia de consenso h7F3VkCons de las regiones variables de la cadena ligera humanizada de 7F3 de la invención según lo dispuesto en la Figura 6.
- SEQ ID NO: 49 - Secuencia marco VJ de la cadena pesada humana de consenso hVhFW Cons.
- SEQ ID NO: 50 - Secuencia humana SGI-VH.
- 30 SEQ ID NO: 51- Secuencia HG3 de la línea germinal humana.
- SEQ ID NO: 52 - Secuencia de polinucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos h7Vk de la cadena ligera de la región V humanizada de 7F3.
- SEQ ID NO: 53 - Secuencia de polinucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos h7aVk de la cadena ligera de la región V humanizada de 7F3.
- 35 SEQ ID NO: 54 - Secuencia de polinucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos h7bVk de la cadena ligera de la región V humanizada de 7F3.
- SEQ ID NO: 55 - Secuencia de polinucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos h7Vh de la cadena pesada de la región V humanizada de 7F3.
- 40 SEQ ID NO: 56 - Secuencia de polinucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos h7aVh de la cadena pesada de la región V humanizada de 7F3.

SEQ ID NO: 57 - Secuencia de polinucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos h7bVh de la cadena pesada de la región V humanizada de 7F3.

SEQ ID NO: 58 - Fragmento del segundo bucle extracelular de C5aR humano.

SEQ ID NO: 59 - Fragmento del dominio extracelular N-terminal de C5aR humano.

5 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Técnicas generales

Salvo que se defina específicamente de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento se entenderá que tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto ordinario en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, tecnología de anticuerpos, inmunología, inmunohistoquímica, química de proteínas y bioquímica).

A menos que se indique de otro modo, la proteína recombinante, el cultivo celular y las técnicas inmunológicas utilizadas en la presente invención son procedimientos convencionales, bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales técnicas se describen y se explican en publicaciones en fuentes tales como, J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (compilador), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, volúmenes 1 y 2, IRL Press (1991), D.M. Glover y B.D. Hames (compiladores), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 y 1996), y F.M. Ausubel et al. (compiladores), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, Ed Harlow y David Lane (compiladores) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), y J.E. Coligan et al. (compiladores) Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (incluyendo todas las actualizaciones hasta la actualidad).

Definiciones seleccionadas

Tal como se emplea en el presente documento, "receptor de C5a", "C5aR", "C5aR1" o "C5aR humano" y variaciones de los mismos se refieren al receptor 1 del componente 5 del complemento humano que también se conoce en la técnica como el receptor de la anafilatoxina C5a y el antígeno CD88. C5aR pertenece a la familia de receptores acoplados a la proteína G con 7 dominios transmembranales, y se une a C5a (Gerard y Gerard, 1991). Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de un C5aR humano se proporciona en SEQ ID NO: 37, sin embargo, como el experto en la materia será consciente, existen variantes alélicas naturales de esta molécula, que también están incluidas en el término "C5aR". Los diversos dominios de C5aR humano se definen del modo siguiente:

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

El término "sujeto" tal y como se usa en el presente documento, se entiende que significa cualquier animal, en particular mamíferos, tales como seres humanos, caballos, vacas, gatos y perros, y se puede emplear, en su caso, de forma intercambiable con el término "paciente". Preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "tratando", "tratar" o "tratamiento" y variaciones de los mismos incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención que es suficiente para reducir o eliminar al menos un síntoma del trastorno.

5 Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "evitando", "prevenir" o "prevención" o variaciones de los mismos se refieren a proteger un sujeto del desarrollo de al menos un síntoma de una enfermedad, o reducir la gravedad de un síntoma de un trastorno.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "exponer la célula" se refiere a proporcionar el anticuerpo de modo que sea capaz de ponerse en contacto con/unirse a C5aR humano siempre que C5aR esté presente en la célula.

10 La expresión "concentración eficaz del 50 %" (abreviado como "CE₅₀") representa la concentración de un anticuerpo de la invención que se requiere para un 50 % de un efecto dado de la molécula a la que se dirige el anticuerpo (por ejemplo, inhibición/desplazamiento de la unión de C5a humano a C5aR humano). Un experto en la técnica entenderá que un valor menor de CE₅₀ se corresponde con un anticuerpo más potente.

15 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "inhibición" se refiere a la reducción, y posiblemente la anulación por completo, de la actividad definida. Preferiblemente, la actividad definida se reduce en al menos un 50 %, más preferiblemente al menos un 75 % e incluso más preferiblemente al menos un 90 %.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "aproximadamente" se refiere a un intervalo de +1-5 % del valor especificado.

20 A lo largo de esta memoria descriptiva, la palabra "comprenden" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un elemento declarado, número entero o una etapa, o un grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de ningún otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas. En una realización, una molécula "consiste esencialmente en" la secuencia definida. En otra realización, una molécula "consiste en" la secuencia definida.

Anticuerpos anti-C5aR humanizados

25 El término inmunoglobulina se refiere a una clase de glicoproteínas relacionadas estructuralmente que consisten en dos parejas de cadenas polipeptídicas, una pareja de cadenas ligeras de bajo peso molecular (L) y una pareja de cadenas pesadas (H), las cuatro interconectadas por enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas ha sido bien caracterizada, véase por ejemplo Fundamental Immunology cap. 7 (Paul, W., compilador, 2ª ed. Raven Press, NY (1989)). Brevemente, cada cadena pesada normalmente se compone de una región variable de la cadena pesada (abreviada en este documento como V_H) y una región constante de la cadena pesada (abreviada en este documento como C_H). La región constante de la cadena pesada normalmente se compone de tres dominios, C_H1, C_H2 y C_H3. Cada cadena ligera está compuesta normalmente por una región variable de la cadena ligera (abreviada en este documento como V_L) y una región constante de la cadena ligera (abreviada en este documento como C_L). La región constante de la cadena ligera normalmente se compone de un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables que pueden ser hipervariables en la secuencia y/o en la forma de bucles definidos estructuralmente), también denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDRs), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FRs). Cada V_H y V_L se compone normalmente de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas desde el extremo amino-terminal al extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (véase también Chothia y Lesk, 1987). Normalmente, la numeración de los residuos de aminoácidos en esta región se realiza por el método descrito en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) (expresiones tales como numeración de los residuos del dominio variable, como en Kabat o de acuerdo con Kabat, se refieren en este documento a este sistema de numeración para dominios variables de la cadena pesada o dominios variables de la cadena ligera). Empleando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real de un péptido puede contener menos o más aminoácidos correspondientes a un acortamiento o a una inserción en una FR o CDR del dominio variable.

35 La expresión "anticuerpo humanizado", tal y como se emplea en esta memoria, se refiere en la presente memoria a un anticuerpo obtenido a partir de un anticuerpo no humano, normalmente murino, que conserva o conserva sustancialmente las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo parental, pero que es menos inmunogénico en los seres humanos. Debido a que los anticuerpos de la invención se han definido por características estructurales y funcionales, la expresión "anticuerpo humanizado" se usa de manera intercambiable con "anticuerpo".

40 La expresión región determinante de la complementariedad (CDR), tal y como se usa en esta memoria, se refiere a secuencias de aminoácidos que definen conjuntamente la afinidad de la unión y la especificidad de una región de fragmento variable (Fv) de un sitio que se une a inmunoglobulina.

55 La expresión región marco (FR), tal y como se usa en esta memoria, se refiere a secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDRs. Estas porciones del anticuerpo sirven para mantener las CDRs en una orientación apropiada (permite que las CDRs se unan al antígeno). Una región variable, ya sea ligera o pesada, comprende un marco y normalmente tres CDRs.

La expresión región constante (CR), tal y como se usa en esta memoria, se refiere a la porción de la molécula de anticuerpo que confiere funciones efectoras. Las regiones constantes de los anticuerpos humanizados objeto se obtienen a partir de inmunoglobulinas humanas. La región constante de la cadena pesada se puede seleccionar a partir de cualquiera de los cinco isotipos: alfa, delta, épsilon, gamma o mu. Además, las cadenas pesadas de diferentes subclases (tales como las subclases de IgG de las cadenas pesadas) son responsables de diferentes funciones efectoras y por lo tanto, con la elección de la región constante de la cadena pesada deseada, se pueden producir anticuerpos con una función efectora deseada. Las regiones constantes de la cadena pesada preferidas son gamma 1 (IgG1), gamma 2 (IgG2), gamma 3 (IgG3) y gamma 4 (IgG4), más preferiblemente gamma 4 (IgG4). Más preferida es una región cristalizante de un fragmento (Fc) del isotipo gamma 4 (IgG4) con mutaciones Ser228Pro (referida como mutación "P") y/o Leu235Glu (referida como mutación "E"). Las secuencias de la región constante de la cadena pesada particularmente preferidas se proporcionan como SEQ ID NOs 42 a 45. La región constante de la cadena ligera puede ser de tipo kappa o lambda, preferiblemente de tipo kappa. Las secuencias de la región constante de la cadena ligera particularmente preferidas se proporcionan como SEQ ID NOs 40 y 41.

En una realización preferida, una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina descrita en este documento se une directamente a una región constante de la cadena ligera de inmunoglobulina descrita en este documento. Del mismo modo, en una realización preferida adicional, una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina descrita en este documento se une directamente a una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina descrita en este documento. Por lo tanto, el extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos proporcionada como SEQ ID NO: 31 se puede unir directamente al extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos proporcionada como SEQ ID NO: 41, y el extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos proporcionada como SEQ ID NO: 36 se une directamente al extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos proporcionada como SEQ ID NO: 45.

Un experto en la materia entenderá que las regiones variables y constantes de una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina se pueden unir como se describe, mediante el uso de tecnología de ADN recombinante convencional para crear un polinucleótido (que codifica los dominios variables y constantes unidos) que se puede expresar en un hospedador adecuado (para producir dicha(s) cadena(s) de inmunoglobulina) o mediante el uso de la química de péptidos para la síntesis de los dominios variables y constantes unidos.

Los anticuerpos humanizados de la invención conservan una proporción significativa de las propiedades de unión del anticuerpo parental, es decir, el anticuerpo monoclonal denominado 7F3, producido por el hibridoma depositado el 6 de noviembre 2000 en la ECACC con el número de orden 00110609. En particular, los anticuerpos humanizados de la invención conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno reconocido por el anticuerpo parental utilizado para producir tal anticuerpo humanizado. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado muestra la misma o sustancialmente la misma afinidad de unión al antígeno y la misma avidéz que el anticuerpo parental. Idealmente, la afinidad (K_D) del anticuerpo no será más de 10 veces superior a la afinidad del anticuerpo parental, más preferiblemente no más de aproximadamente 5 veces y más preferiblemente la afinidad no será más de tres veces superior a la del anticuerpo parental. Los métodos para someter a ensayo la afinidad de la unión al antígeno son bien conocidos en la técnica e incluyen ensayos de unión media-máxima, ensayos de competición y análisis de Scatchard. Ensayos de unión a antígeno adecuados se describen en esta solicitud (véase, por ejemplo, el Ejemplo 3).

Como una persona experta apreciará, "avidéz" se refiere a la fuerza total de la interacción entre dos moléculas, tales como un anticuerpo y antígeno. La avidéz depende tanto de la afinidad como de la valencia de las interacciones. Además, "afinidad" se refiere a la fuerza de la unión entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y un ligando (por ejemplo, un antígeno). La afinidad de una molécula X hacia un ligando Y está representada por la constante de disociación (K_d), que es la concentración de Y que se requiere para ocupar los sitios de combinación de la mitad de las moléculas de X presentes en una solución. Una K_d más baja indica que se requiere una interacción de la afinidad más fuerte o más alta, y una menor concentración de ligando para ocupar los sitios.

La expresión "anticuerpo humanizado" o "anticuerpo" tal y como se usa en esta invención incluye moléculas intactas, así como fragmentos de las mismas, tales como Fab, F(ab')₂ y Fv, que son capaces de unirse al determinante epitópico. Estos fragmentos de anticuerpo conservan cierta capacidad para unirse selectivamente a C5aR humano, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:

(1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento monovalente que se une a antígeno de una molécula de anticuerpo puede ser producido por digestión de un anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de cadena pesada;

(2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo se puede obtener tratando un anticuerpo completo con pepsina, seguido por reducción, para producir una cadena ligera intacta y una porción de cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo;

(3) (Fab')₂, el fragmento del anticuerpo que se puede obtener tratando un anticuerpo completo con la enzima pepsina sin una reducción posterior; F(ab)₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos juntos con dos

enlaces disulfuro;

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

5 (5) anticuerpo de cadena sencilla ("SCA"), definido como una molécula modificada genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, unidas a través de un enlazador polipeptídico adecuado, tal como una molécula de cadena sencilla fusionada genéticamente; tales anticuerpos de cadena sencilla pueden estar en forma de multímeros, tales como diacuerpos, triacuerpos y tetracuerpos, etc., que pueden ser o no poliespecíficos (véanse, por ejemplo, los documentos WO 94/07921 y WO 98/44001) y

10 (6) anticuerpo de dominio sencillo, normalmente un dominio pesado variable que carece de una cadena ligera.

15 Los fragmentos de anticuerpos humanizados incluyen distintas cadenas pesadas, cadenas ligeras, Fab, Fab', F(ab')₂, Fc, un dominio ligero carente de cualquier cadena pesada, un dominio pesado variable carente de una cadena ligera y Fv. Los fragmentos se producen mediante técnicas de ADN recombinante, o por separación enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

20 Un "anticuerpo humanizado" o un anticuerpo también puede ser un anticuerpo heteroconjugado. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos unidos covalentemente. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune hacia células no deseadas (documento US 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360; WO 92/200373; EP 586505). Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* usando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que implican agentes de reticulación.

25 Puede ser deseable modificar un anticuerpo con respecto a la función efectora, a fin de mejorar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento de un trastorno descrito en este documento, como la artritis. Por ejemplo, se puede(n) introducir un residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo humanizado homodímero así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una mejora de la capacidad para destruir células mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Caron et al., 1992; Shopes, 1992). Los anticuerpos homodímeros con actividad mejorada también se pueden preparar usando reticuladores heterobifuncionales, como se describe en Wolff et al. (1993). Alternativamente, un anticuerpo se puede modificar por ingeniería genética de modo que tenga regiones Fc duales y de este modo puede tener capacidades de lisis del complemento y ADCC mejoradas (Stevenson et al., 1989).

30 Tal y como se emplea en este documento, un "anticuerpo no reductor" se refiere a un anticuerpo que se une a su diana, pero que no recluta las funciones efectoras del sistema inmune que efectúan la lisis de las células diana. Las funciones efectoras del sistema inmune dependen de interacciones del dominio Fc con C1q, el primer componente de la cascada del complemento, y/o receptores (FcR). La citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) es iniciada por múltiples dominios Fc que interaccionan con C1q, que en última instancia puede dar lugar a la lisis de las células diana a través de la formación del complejo de ataque a la membrana (MAC). Además, las células del sistema inmune, tales como granulocitos, macrófagos y células NK, pueden interaccionar a través de los FcRs con mAbs unidos a las células diana. La lisis de las células diana se activa a través de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o la fagocitosis. Los anticuerpos no reductores incluyen fragmentos de anticuerpo sin un dominio Fc, incluyendo por ejemplo, los formatos monovalente (por ejemplo, Fab, scFv, nanocuerpos y dAb), bivalente (por ejemplo, F(ab')₂ y diacuerpos) y multivalentes (por ejemplo, triacuerpos y pentacuerpos). Además, los anticuerpos no reductores incluyen anticuerpos que se han modificado para eliminar las funciones efectoras sin una farmacocinética impactante, por ejemplo, se podrían modificar los residuos de aminoácidos en el dominio Fc que tienen un papel dominante en la interacción con C1q y FcRs, o el sitio de glicosilación ligado a N en el dominio CH₂ se podría eliminar. Como una persona experta conoce, las posibilidades de modificar genéticamente un anticuerpo no reductor están ligadas a la región constante utilizada para producir el anticuerpo. Una región constante de IgG3 es más probable que produzca un anticuerpo reductor que una región constante de IgG1 que a su vez es más probable que produzca un anticuerpo reductor que una región constante de IgG2, mientras que una región constante de IgG4 generalmente significará que el anticuerpo no es reductor. Una persona experta también entenderá que las modificaciones de una región constante podrían convertir un anticuerpo reductor en un anticuerpo no reductor y viceversa.

35 Tal como se usa en el presente documento, un "anticuerpo desactivante" se refiere a anticuerpos que se unen a receptores de la superficie de células y anulan o bloquean la acción de ligandos endógenos

55 Los anticuerpos humanizados de la invención se producen con intervención humana. Por lo tanto, no se espera que se produzcan en la naturaleza. No obstante, en una realización preferida, un anticuerpo o una cadena de inmunoglobulina de la invención está "sustancialmente purificado" o "purificado". Por "sustancialmente purificado" o "purificado" nos referimos a un anticuerpo que ha sido separado de uno o varios lípidos, ácidos nucleicos, otros

- polipéptidos u otras moléculas contaminantes con las que está asociado en su estado natural. Se prefiere que el polipéptido sustancialmente purificado esté al menos 60 % exento, más preferiblemente al menos 75 % exento y más preferiblemente al menos 90 % exento de otros componentes con los que está asociado de forma natural. En otra realización, "sustancialmente purificado" o "purificado" significa que la molécula es la especie predominante en la composición en la que se encuentra con respecto a la clase de moléculas a la que pertenece (es decir, se compone de al menos aproximadamente el 50 % del tipo de molécula en la composición y por lo general se compondrá de al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 85 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 % o más de la especie de la molécula, por ejemplo, un péptido, en la composición).
- El término "recombinante" en el contexto de un anticuerpo o una cadena de inmunoglobulina se refiere al anticuerpo o a la cadena de inmunoglobulina cuando es producida por una célula, o en un sistema de expresión exento de células, en una cantidad alterada o con una tasa alterada, en comparación con su estado natural. En una realización, la célula es una célula que no produce naturalmente el anticuerpo o la cadena de inmunoglobulina. Sin embargo, la célula puede ser una célula que comprende un gen no endógeno que causa una cantidad alterada, preferiblemente aumentada, del polipéptido que se va a producir. Un anticuerpo o una cadena de inmunoglobulina recombinante incluye polipéptidos que no se han separado de otros componentes de la célula transgénica (recombinante) o del sistema de expresión exento de células, en los que se produce, y un anticuerpo o una cadena de inmunoglobulina producida en tales células o sistemas exentos de células que posteriormente se purifican lejos de al menos algunos otros componentes.
- El % de identidad de un polipéptido (cadena de inmunoglobulina) está determinado por un análisis GAP (Needleman y Wunsch, 1970) (programa GCG) con una penalización por creación de hueco = 5, y una penalización por extensión de hueco = 0,3. La secuencia de consulta tiene una longitud de al menos 50 aminoácidos, y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 50 aminoácidos. Incluso más preferiblemente, la secuencia de consulta tiene una longitud de al menos 100 aminoácidos y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 100 aminoácidos. Más preferiblemente, las dos secuencias se alinean en toda su longitud.
- Con respecto a una cadena de inmunoglobulina definida, se apreciará que cifras del % de identidad superiores a las proporcionadas anteriormente, abarcarán realizaciones preferidas. Por lo tanto, en su caso, a la luz de las cifras del % de identidad mínimo, se prefiere que la cadena de inmunoglobulina comprenda una secuencia de aminoácidos que sea al menos 94 %, más preferiblemente al menos 95 %, más preferiblemente al menos 96 %, más preferiblemente al menos 97 %, más preferiblemente al menos 98 %, más preferiblemente al menos 99 %, más preferiblemente al menos 99,1 %, más preferiblemente al menos 99,2 %, más preferiblemente al menos 99,3 %, más preferiblemente al menos 99,4 %, más preferiblemente al menos 99,5 %, más preferiblemente al menos 99,6 %, más preferiblemente al menos 99,7 %, más preferiblemente al menos 99,8 %, e incluso más preferiblemente al menos 99,9 % idéntica a la SEQ ID NO nombrada relevante.
- En otra realización, un residuo se añade a la SEQ ID NO nombrada, un residuo se elimina de la SEQ ID NO nombrada, un residuo se añade y un residuo se elimina en comparación con la SEQ ID NO nombrada, dos residuos se añaden a la SEQ ID NO nombrada, dos residuos se eliminan de la SEQ ID NO nombrada, un residuo se cambia de la SEQ ID NO nombrada, dos residuos se cambian de la SEQ ID NO nombrada, un residuo se cambia y un residuo se elimina de la SEQ ID NO nombrada, o un residuo se cambia y un residuo se añade a la SEQ ID NO nombrada, o cualquier combinación de los mismos.
- Puede que no haya huecos en la alineación. Más específicamente, el algoritmo no necesita crear un hueco en un tramo contiguo de aminoácidos para obtener una alineación óptima (el % de identidad más alto).
- Mutantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo y/o de la cadena de inmunoglobulina se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en un ácido nucleico, o por síntesis *in vitro* del polipéptido deseado. Tales mutantes incluyen, por ejemplo, deleciones, inserciones o sustituciones de residuos dentro de la secuencia de aminoácidos. Una combinación de deleción, inserción y sustitución se puede realizar para llegar a la estructura artificial final, siempre que el producto polipeptídico final posea las características deseadas.
- Los polipéptidos mutantes (alterados) se pueden preparar utilizando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, un polinucleótido se puede someter a mutagénesis *in vitro*. Tales técnicas de mutagénesis *in vitro* incluyen subclonar el polinucleótido en un vector adecuado, transformar el vector en una cepa "mutadora", tal como XL-1 red de *E. coli* (Stratagene) y propagar las bacterias transformadas durante un número adecuado de generaciones. Los productos obtenidos a partir de ADN mutado/alterado se pueden escrutar fácilmente, utilizando técnicas descritas en este documento para determinar si tienen actividad de unión al receptor y/o actividad inhibitoria.
- En el diseño de mutantes de secuencias de aminoácidos, la ubicación del sitio de la mutación y la naturaleza de la mutación dependerán de la(s) característica(s) que se va(n) a modificar. Los sitios para la mutación se pueden modificar individualmente o en serie, por ejemplo, (1) sustituyendo primero con elecciones de aminoácidos conservadores y luego con selecciones más radicales dependiendo de los resultados logrados, (2) eliminando el residuo diana o (3) insertando otros residuos adyacentes al sitio localizado.

Las deleciones de la secuencia de aminoácidos varían generalmente desde aproximadamente 1 a 15 residuos, más preferiblemente desde aproximadamente 1 a 10 residuos y normalmente desde aproximadamente 1 a 5 residuos contiguos.

5 Los mutantes por sustitución tienen al menos un residuo de aminoácido eliminado en el anticuerpo y/o en la molécula de la cadena de inmunoglobulina y un residuo diferente se inserta en su lugar. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen los sitios identificados como importantes para la unión al antígeno. Estos sitios, especialmente los comprendidos dentro de una secuencia de al menos otros tres sitios conservados de forma idéntica de anticuerpos humanos y/o cadenas de inmunoglobulina, se sustituyen preferiblemente de una manera relativamente conservadora. Tales sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 bajo el título "sustituciones ejemplares". Ejemplos específicos de sustituciones se proporcionan en las Figuras 6 y 10, en donde un aminoácido en un sitio dado puede estar sustituido con otro aminoácido presente en el mismo sitio en otra cadena humanizada.

Tabla 1. Sustituciones ejemplares

Residuo original	Sustituciones ejemplares
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro, ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala

15 Además, si se desea, los aminoácidos no naturales o análogos de aminoácidos químicos se pueden introducir como una sustitución o adición en el anticuerpo y/o la cadena de inmunoglobulina. Tales aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, los D-isómeros de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido α-amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 2-aminobutírico, ácido 6-amino hexanoico, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β-alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos de diseño tales como β-metil aminoácidos, Ca-metil aminoácidos, Na-metil aminoácidos y análogos de aminoácidos en general.

20 Los polipéptidos se pueden producir por una variedad de modos, incluyendo la producción y la recuperación de polipéptidos recombinantes, y la síntesis química de los polipéptidos. Un polipéptido aislado se produce mediante el cultivo de una célula capaz de expresar el polipéptido en condiciones eficaces para producir el polipéptido, y recuperar el polipéptido. Una célula preferida para cultivar es una célula recombinante. Las condiciones de cultivo eficaces incluyen, pero no se limitan a, condiciones de medios eficaces, biorreactor, temperatura, pH y oxígeno que permiten la producción de polipéptidos. Un medio eficaz se refiere a cualquier medio en el que se cultiva una célula para producir un polipéptido. Tal medio comprende normalmente un medio acuoso que tiene fuentes de carbono,

25

nitrógeno y fosfato asimilables, y sales, minerales, metales y otros nutrientes apropiados, tales como vitaminas. Las células se pueden cultivar en biorreactores de fermentación convencionales, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microtitulación y placas de Petri. El cultivo se puede llevar a cabo a una temperatura, pH y contenido en oxígeno apropiados para una célula recombinante. Tales condiciones de cultivo están dentro de la pericia de un experto normal en la técnica.

Polinucleótidos y expresión de los mismos

Por "polinucleótido aislado", que incluye ADN, ARN o una combinación de estos, monocatenarios o bicatenarios, con una orientación sentido o antisentido o una combinación de ambas, ARNds o de otro modo, nos referimos a un polinucleótido que está al menos parcialmente separado de las secuencias de polinucleótidos con las que está asociado o ligado en su estado natural. Preferiblemente, el polinucleótido aislado está exento al menos en un 60 %, preferiblemente al menos en un 75 % y lo más preferiblemente en al menos un 90 % de otros componentes con los que está asociado de forma natural. Además, el término "polinucleótido" se emplea indistintamente en este documento con las expresiones "ácido nucleico" y "material genético".

El término "exógeno" en el contexto de un polinucleótido se refiere al polinucleótido cuando está presente en una célula, o en un sistema de expresión exento de células, en una cantidad alterada en comparación con su estado natural. La célula puede ser una célula que no comprende el polinucleótido de forma natural. Sin embargo, la célula puede ser una célula que comprende un polinucleótido no endógeno que da como resultado una cantidad alterada, aumentada preferiblemente, de la producción del polipéptido codificado. Un polinucleótido exógeno incluye polinucleótidos que no han sido separados de otros componentes de la célula transgénica (recombinante), o del sistema de expresión exento de células, en el que está presente, y los polinucleótidos producidos en tales células o sistemas exentos de células se purifican posteriormente apartados de al menos algunos otros componentes. El polinucleótido exógeno (ácido nucleico) puede ser un tramo contiguo de nucleótidos existentes en la naturaleza, o comprender dos o más tramos contiguos de nucleótidos de diferentes fuentes (que se producen en la naturaleza y/o sintéticos) unidos para formar un solo polinucleótido. Normalmente, tales polinucleótidos quiméricos comprenden al menos un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido ligado funcionalmente a un promotor adecuado para conducir la transcripción del marco de lectura abierto en una célula de interés.

El % de identidad de un polinucleótido se determina mediante el análisis GAP (Needleman y Wunsch, 1970) (programa GCG) con una penalización por creación de hueco = 5, y una penalización por extensión de hueco = 0,3. A menos que se indique lo contrario, la secuencia de consulta tiene al menos 45 nucleótidos de longitud, y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 45 nucleótidos. Preferiblemente, la secuencia de consulta tiene al menos 100 nucleótidos de longitud, y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 100 nucleótidos. Más preferiblemente, las dos secuencias se alinean a lo largo de toda su longitud.

En cuanto a los polinucleótidos definidos, se apreciará que cifras del % de identidad superiores a las previstas anteriormente, abarcarán realizaciones preferidas. Por lo tanto, en su caso, a la luz de las cifras del % de identidad mínimo, se prefiere que un polinucleótido comprenda una secuencia que tiene al menos 91 %, más preferiblemente al menos 92 %, más preferiblemente al menos 93 %, más preferiblemente al menos 94 %, más preferiblemente al menos 95 %, más preferiblemente al menos 96 %, más preferiblemente al menos 97 %, más preferiblemente al menos 98 %, más preferiblemente al menos 99 %, más preferiblemente al menos 99,1 %, más preferiblemente al menos 99,2 %, más preferiblemente al menos 99,3 %, más preferiblemente al menos 99,4 %, más preferiblemente al menos 99,5 %, más preferiblemente al menos 99,6 %, más preferiblemente al menos 99,7 %, más preferiblemente al menos 99,8 %, e incluso más preferiblemente al menos 99,9 % de identidad con la SEQ ID NO nombrada relevante.

La expresión "condiciones de hibridación rigurosas" o "condiciones rigurosas" y similares, tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a parámetros con los que está familiarizada la técnica, que incluyen la variación de la temperatura de hibridación con la longitud de un polinucleótido u oligonucleótido. Los parámetros de la hibridación de ácidos nucleicos se pueden encontrar en referencias que recopilan tales métodos, Sambrook, et al., (*supra*) y Ausubel, et al., (*supra*). Por ejemplo, unas condiciones de hibridación rigurosas, tal y como se emplean en esta memoria, se pueden referir a la hibridación a 65°C en tampón de hibridación (3,5xSSC, 0,02 % de Ficoll, 0,02 % de polivinilpirrolidona, 0,02 % de albúmina de suero bovino, NaH₂PO₄ 2,5 mM (pH 7), 0,5 % de SDS, EDTA 2 mM) y el lavado dos veces en 0,2 x SSC, 0,1 % de SDS a 65°C, siendo la duración de cada etapa de lavado de aproximadamente 30 min.

Los anticuerpos y las cadenas de inmunoglobulina se producen normalmente mediante expresión recombinante. Los ácidos nucleicos que codifican regiones variables de la cadena ligera y pesada, opcionalmente ligadas a regiones constantes, se insertan en vectores de expresión. Las cadenas ligera y pesada se pueden clonar en el mismo o en diferentes vectores de expresión. Los segmentos de ADN que codifican las cadenas de inmunoglobulina están ligados funcionalmente a secuencias de control en el(los) vector(es) de expresión lo que asegura la expresión de los polipéptidos de inmunoglobulina. Las secuencias de control de la expresión incluyen, pero no se limitan a, promotores (por ejemplo, promotores asociados naturalmente o heterólogos), secuencias señal, elementos potenciadores y secuencias de terminación de la transcripción. Preferiblemente, las secuencias de control de la expresión son sistemas de promotores eucariotas en vectores, capaces de transformar o transfectar células hospedadoras eucariotas. Una vez que el vector se ha incorporado en el hospedador apropiado, el hospedador se

mantiene en condiciones adecuadas para una expresión de alto nivel de las secuencias de nucleótidos, y la recogida y la purificación de los anticuerpos y/o las cadenas de inmunoglobulina.

5 Estos vectores de expresión se pueden replicar normalmente en las células hospedadoras ya sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico del hospedador. Comúnmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección (por ejemplo, resistencia a la ampicilina, resistencia a la higromicina, resistencia a la tetraciclina, resistencia a la neomicina, resistencia a G418, DHFR (dihidrofolato reductasa), ADA (adenosina desaminasa), GS (glutamina sintetasa)) para permitir la detección de las células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, por ejemplo, el documento EE.UU. 4.704.362).

10 *E. coli* es un hospedador procariota particularmente útil para clonar los polinucleótidos (por ejemplo, secuencias de ADN). Otros hospedadores microbianos adecuados para uso incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias, tales como *Salmonella*, *Serratia*, y varias especies de *Pseudomonas*. En estos hospedadores procariotas, también se pueden preparar vectores de expresión, que normalmente contendrán secuencias de control de la expresión compatibles con la célula hospedadora (por ejemplo, un origen de replicación). Además, estará presente cualquier cantidad entre una variedad de promotores bien conocidos, como el sistema promotor de lactosa, 15 un sistema promotor de triptófano (trp), un sistema promotor de beta-lactamasa, un promotor T7 o un sistema promotor del fago lambda. Los promotores controlarán normalmente la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tienen secuencias con sitio de unión al ribosoma y similares, para iniciar y completar la transcripción y la traducción.

20 Otros microbios, tales como la levadura, también son útiles para la expresión. *Saccharomyces* es un hospedador de levadura preferido, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de la expresión (por ejemplo, promotores), un origen de replicación, secuencias de terminación y similares como se desee. Los promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato cinasa y otras enzimas glucolíticas. Los promotores inducibles de levadura incluyen, entre otros, promotores de la alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Otro ejemplo de levadura útil para la expresión es *Pichia pastoris*.

25 Además de los microorganismos, el cultivo de células de tejidos de mamíferos también se puede utilizar para expresar y producir los anticuerpos y/o las cadenas de inmunoglobulina (por ejemplo, polinucleótidos que codifican inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas) (véase, Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, NY, NY (1987)). Las células eucariotas se prefieren realmente, porque se ha desarrollado en la técnica una serie de líneas de células hospedadoras adecuadas, capaces de secretar proteínas heterólogas (por ejemplo, inmunoglobulinas 30 intactas), e incluyen líneas de células CHO, diversas líneas celulares COS, células NSO, células HEK293, células PerC6, células HeLa, preferiblemente, líneas celulares de mieloma o linfocitos B transformados o hibridomas. Preferiblemente, las células no son humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador (Queen et al., 1986), y sitios de información necesarios para el procesamiento, tales como sitios de unión al ribosoma, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras de la transcripción. Las secuencias de control de la expresión preferidas son promotores obtenidos a partir de genes de inmunoglobulina, SV40, 35 adenovirus, virus del papiloma bovino, citomegalovirus y similares (véase, Co et al., 1992).

40 Alternativamente, las secuencias que codifican anticuerpos se pueden incorporar en transgenes para la introducción en el genoma de un animal transgénico y la expresión posterior en la leche del animal transgénico (véanse, por ejemplo, los documentos EE.UU. 5.741.957, EE.UU. 5.304.489 y EE.UU. 5.849.992). Los transgenes adecuados incluyen secuencias codificadoras de las cadenas ligeras y/o pesadas ligadas funcionalmente con un promotor y un potenciador procedentes de un gen específico de la glándula mamaria, tal como caseína o beta lactoglobulina.

45 Los vectores que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés (por ejemplo, las secuencias que codifican la cadena pesada y ligera y las secuencias de control de la expresión) se pueden transferir a la célula hospedadora mediante métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, la transfección de cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio, electroporación, lipofección, biolística o la transfección basada en virus se puede utilizar para otros hospedadores celulares (véase en general Sambrook et al., supra). Otros métodos utilizados para transformar células de mamífero incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación y 50 microinyección. Para la producción de animales transgénicos, los transgenes se pueden microinyectar en oocitos fertilizados, o se pueden incorporar en el genoma de células madre embrionarias, y los núcleos de tales células se transfieren a oocitos desnucleados.

55 Cuando las cadenas pesada y ligera se clonan en vectores de expresión distintos, los vectores se cotransfectan para obtener una expresión y un ensamblaje de inmunoglobulinas intactas. Una vez expresados, los anticuerpos completos, sus dímeros, las cadenas ligeras y pesadas individuales, u otras formas de inmunoglobulinas, se pueden purificar de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, que incluyen la precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, purificación por HPLC, electroforesis en gel y similares (véase, en general Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, (1982))).

Modelos de Inflamación

5 Los modelos de inflamación *in vivo* están disponibles, los cuales se pueden utilizar para evaluar los efectos de los anticuerpos *in vivo* como agentes terapéuticos. Por ejemplo, se puede supervisar la infiltración de leucocitos después de una inyección intradérmica de una quimiocina y un anticuerpo reactivo con C5aR en un animal adecuado, tal como conejo, ratón, rata, cobaya o macaco Rhesus (véase, por ejemplo, Van Damme et al., 1992; Zachariae et al., 1990; Jose et al., 1994).

10 Las biopsias de piel se evalúan histológicamente para estudiar la infiltración de leucocitos (por ejemplo, eosinófilos, granulocitos). Las células marcadas (por ejemplo, células transfectadas de forma estable que expresan C5aR) capaces de una quimiotaxis y extravasación, se pueden administrar al animal. Un anticuerpo que se va a evaluar, se puede administrar, ya sea antes, simultáneamente o después de que las células marcadas se administren al animal del ensayo. Una disminución del grado de infiltración en presencia de anticuerpo, en comparación con el grado de infiltración en ausencia de inhibidor, es indicativa de inhibición.

Usos

Los anticuerpos son útiles en una variedad de aplicaciones, que incluyen la investigación, el diagnóstico y las aplicaciones terapéuticas.

15 C5aR tiene un papel importante en el tráfico de leucocitos. C5aR es un receptor quimioatrayente para las células del sistema inmune innato, que incluyen neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, macrófagos, células dendríticas, monocitos y microglía, y también se pueden utilizar anticuerpos anti-C5aR para inhibir (reducir o evitar) la migración de leucocitos, en particular la asociada con una lesión de los tejidos con neutrófilos, tal como una lesión por reperfusión y accidente cerebrovascular, o con trastornos mediados con monocitos tales como la aterosclerosis.

20 Los anticuerpos descritos en este documento pueden actuar como inhibidores para inhibir (que puede ser reduciendo o previniendo) (a) la unión (por ejemplo, de un ligando, un inhibidor) al receptor, (b) la función de señalización de un receptor, y/o (c) una función estimuladora. Los anticuerpos que actúan como inhibidores de la función del receptor pueden bloquear la unión de un ligando de forma directa o indirecta (por ejemplo, provocando un cambio conformacional). Por ejemplo, los anticuerpos pueden inhibir la función del receptor inhibiendo la unión de un ligando, o mediante desensibilización (con o sin inhibición de la unión de un ligando).

25 En la presente memoria, un "trastorno" es una interrupción o una interferencia de la función normal.

En una realización, el trastorno es un trastorno inmunopatológico.

30 La inmunopatología es el estudio de una enfermedad que tiene una causa inmunológica y una enfermedad inmunológica es cualquier alteración causada por las reacciones de anticuerpos con antígenos. Por lo tanto, un "trastorno inmunopatológico" se puede definir como un trastorno que surge de la reacción de anticuerpos con antígenos - este incluye enfermedades autoinmunes y respuestas de hipersensibilidad (por ejemplo, de Tipo I: anafilaxis, urticaria, alergias alimentarias, asma; de Tipo II: anemia hemolítica autoinmune, reacciones a transfusiones sanguíneas; de Tipo III: enfermedad del suero, vasculitis necrotizante, glomerulonefritis, artritis reumatoide, lupus; de Tipo IV: dermatitis de contacto, rechazo de injerto).

35 Una enfermedad autoinmune surge cuando el sistema inmune falla en la eliminación de los linfocitos autoreaccionantes durante el desarrollo y un fallo posterior de la regulación conduce a la activación de clones de linfocitos T o B autoreaccionantes, generando respuestas humorales o mediadas por células contra antígenos propios, lo que causa graves daños a las células y órganos.

En otra realización, el trastorno es una enfermedad inflamatoria.

40 La inflamación es una respuesta protectora de los tejidos corporales frente a una irritación o lesión - y puede ser aguda o crónica. Por tanto, los trastornos inflamatorios incluyen enfermedades que implican neutrófilos, monocitos, mastocitos, basófilos, eosinófilos, macrófagos en donde se produce una liberación de citocinas, liberación de histaminas, estallido oxidativo, fagocitosis, liberación de otras enzimas granulares y quimiotaxis. Las respuestas de hipersensibilidad (definidas anteriormente en trastornos inmunopatológicos) también se pueden considerar como enfermedades inflamatorias (agudas o crónicas), ya que implican frecuentemente la activación del complemento y el reclutamiento/infiltración de diversos leucocitos tales como neutrófilos, mastocitos, basófilos, etc.

45 Por ello, los trastornos de seres humanos o de otras especies que se pueden tratar o prevenir empleando la invención incluyen, pero no se limitan a:

50 i) trastornos relacionados con la migración de leucocitos y/o la activación de leucocitos, tales como isquemia/lesión por reperfusión, lesión por reperfusión, accidente cerebrovascular, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (ARDS), asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), aterosclerosis, artritis reumatoide, psoriasis, rechazo de injerto, cánceres con infiltración de leucocitos de la piel u órganos, penfigoide bulloso, síndrome antifosfolipídico (SAF);

ii) inflamación aguda, tal como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), choque séptico,

choque endotóxico, choque anafiláctico, anafilaxis, alergia a fármacos, respuestas de hipersensibilidad, lesión pulmonar aguda;

iii) inflamación crónica tal como psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma;

5 iv) enfermedades autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (EM), síndrome de Sjogren, espondilitis anquilosante, esclerodermia, glomerulonefritis, tiroiditis autoinmune (tiroiditis de Hashimoto), síndrome de Goodpasture, artritis psoriásica, penfigoide bulloso, miastenia grave, enfermedad de Grave, diabetes de tipo I/de inicio juvenil/dependiente de insulina, anemias autoinmunes (por ejemplo, anemia perniciosa, anemia hemolítica autoinmune) (que incluye ejemplos en los
10 que hay un solapamiento con i));

v) enfermedades inflamatorias, que incluyen trastornos no incluidos en i) o ii), así como enfermedades inflamatorias intersticiales, espondiloartropatías, espondilitis, vasculitis (por ejemplo, necrotizante, cutánea, de hipersensibilidad, alérgica), dermatomiositis, dermatitis (por ejemplo, alérgica de contacto, atópica, eccema), rinitis alérgica;

15 vi) trastornos inmunopatológicos, que incluyen trastornos que no están incluidos en i)-iii), tales como rechazo de injerto (por ejemplo, después de un trasplante, aloinjerto, xenoinjerto), enfermedad de injerto contra hospedador (EICH);

vii) otros tipos de trastornos no mencionados anteriormente que incluyen la degeneración macular relacionada con la edad, sepsis, glomerulonefritis membranoproliferativa, enfermedad por depósitos densos y
20 enfermedad de Alzheimer.

Por lo general, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo. La expresión "una cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para promover, inducir y/o mejorar el tratamiento u otro efecto terapéutico en un sujeto. Un ejemplo de "una cantidad terapéuticamente eficaz" tal y como se describe en la sección de Ejemplos, es de 10 mg/kg.

25 Composiciones y modos de administración

La formulación de un anticuerpo de la invención que se va a administrar variará según la vía de administración y la naturaleza de la composición (por ejemplo, solución, emulsión, cápsula) seleccionada. Una composición farmacéutica apropiada que comprende un anticuerpo de la invención que se va a administrar, se puede preparar en un vehículo fisiológicamente aceptable. Una mezcla de anticuerpos también se puede utilizar. Para soluciones o
30 emulsiones, los vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas o alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales pueden incluir solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato o aceites fijos. Una variedad de vehículos acuosos adecuados son conocidos por el experto en la técnica, incluyendo agua, agua tamponada, solución salina tamponada, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido), solución de dextrosa y glicina. Los vehículos intravenosos pueden incluir varios aditivos, conservantes o líquido, nutrientes o reponedores de electrolitos (véase, en general, Remington's Pharmaceutical Science, 16ª edición, Mack, Ed. 1980). Las composiciones pueden contener opcionalmente sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a condiciones fisiológicas, tales como ajuste del pH y agentes tamponadores y agentes de ajuste de la toxicidad, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio y lactato de sodio.
40

Los anticuerpos se pueden liofilizar para el almacenamiento y reconstituir en un vehículo adecuado antes del empleo de acuerdo con las técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la técnica. La concentración óptima del(de los) ingrediente(s) activo(s) en el medio elegido se puede determinar empíricamente, de acuerdo con procedimientos bien conocidos por el experto en la materia, y dependerá de la formulación farmacéutica final deseada. Para la inhalación, el anticuerpo o el fragmento se pueden solubilizar y cargar en un dispensador adecuado para la administración (por ejemplo, un atomizador, nebulizador o dispensador de aerosol presurizado).
45

Son posibles una variedad de vías de administración que incluyen, pero no se limitan necesariamente a, oral, dietética, tópica, parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea), inhalación (por ejemplo, intrabronquial, intraocular, intranasal o inhalación oral, gotas intranasales), dependiendo de la enfermedad o la afección a tratar. Otros métodos adecuados de administración también pueden incluir dispositivos recargables o biodegradables y dispositivos poliméricos de liberación lenta.
50

Las composiciones farmacéuticas también se pueden administrar como parte de una terapia combinatoria con otros agentes. Otras terapias/agentes de este tipo son bien conocidos por los expertos en la técnica. El trastorno puede ser artritis reumatoide y el otro agente terapéutico se selecciona a partir de fármacos antirreumáticos de clase M01C código ATC y clase L04 código ATC de inmunosupresores que incluyen, pero no se limitan a, azatioprina, cloroquina, hidroxiclороquina, ciclosporina, D-penicilamina, sales de oro (aurotiomalato de sodio, auranofina), leflunomida, metotrexato, minociclina, sulfasalazina y ciclofosfamida y glucocorticosteroides. El trastorno puede ser
55

lupus eritematoso sistémico y el otro agente terapéutico se selecciona a partir de fármacos antirreumáticos de clase M01C código ATC y clase L04 código ATC de inmunosupresores, que incluyen, pero no se limitan a, azatioprina, cloroquina, hidroxiclороquina, ciclosporina, D-penicilamina, sales de oro (aurotiomalato de sodio, auranofina), leflunomida, metotrexato, minociclina, sulfasalazina y ciclofosfamida, glucocorticosteroides, ácido micofenólico o micofenolato y tacrolimus. En otro ejemplo, los anticuerpos también se pueden usar en combinación con otros anticuerpos (por ejemplo, en combinación con anticuerpos que se unen a receptores de quimiocinas, que incluyen, pero no limitan a, CCR2 y CCR3) o con anti-TNF u otros agentes antiinflamatorios o con productos de plasma sanguíneo existentes, tales como gammaglobulina disponible comercialmente y productos de inmunoglobulina utilizados en los tratamientos profilácticos o terapéuticos. Los anticuerpos se pueden utilizar como composiciones administradas por separado, proporcionadas en combinación con antibióticos y/o agentes antimicrobianos.

Los intervalos de dosificación para la administración de los anticuerpos son lo suficientemente grandes como para producir el efecto deseado con el que se mejoran los síntomas de la enfermedad inmunopatológica o la probabilidad de infección o se disminuye la sobreestimulación del sistema inmune. La dosificación no debe ser tan grande como para causar efectos secundarios adversos, tales como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva y similares. Generalmente, la dosificación variará con la edad, el estado, el sexo y la extensión de la enfermedad en el paciente y puede estar determinada por un experto en la técnica. La dosificación puede estar ajustada por el propio médico en el caso de que no haya ninguna complicación. La dosificación puede variar desde aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, y más preferiblemente de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg. La administración de la dosis puede ser diaria, semanal o quincenal, o con cualquier otra frecuencia que se determine necesaria, así como una o varias veces al día, y la dosificación puede continuar durante muchos meses (o incluso años) en el caso de enfermedades crónicas.

Los expertos en la técnica apreciarán que los anticuerpos se pueden introducir en un sujeto mediante la administración de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el anticuerpo. La molécula de ácido nucleico puede estar en forma de ADN o ARN o una molécula quimérica que comprende tanto ADN como ARN. Una(s) secuencia(s) de nucleótidos que codifica el anticuerpo se puede clonar en un vector de expresión en donde la secuencia que codifica el agente está ligada funcionalmente con elementos de control de la expresión. Los elementos de control de la expresión son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, promotores, potenciadores y codones de inicio y de parada adecuados.

Se puede utilizar una variedad de métodos para introducir un ácido nucleico que codifica el anticuerpo en una célula diana *in vivo*. Por ejemplo, el ácido nucleico desnudo se puede inyectar en el sitio diana, se puede encapsular en liposomas o se puede introducir por medio de un vector vírico.

La inyección directa de una molécula de ácido nucleico sola o encapsulada, por ejemplo, en liposomas catiónicos, se puede emplear para una transferencia génica estable de un ácido nucleico que codifica TSP-1 en células que no se dividen o que están en división *in vivo* (Ulmer et al., 1993). Además, el ácido nucleico se puede transferir a una variedad de tejidos *in vivo* utilizando el método de bombardeo de partículas (Williams et al., 1991).

Los vectores víricos son útiles para la transferencia génica de moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo en un tipo específico de célula *in vivo*. Los virus son agentes infecciosos especializados que pueden infectar y propagarse en tipos celulares específicos. Esta especificidad para infectar tipos de células particulares es especialmente adecuada para dirigir el anticuerpo a las células seleccionadas *in vivo*. La selección de un vector vírico dependerá, en parte, del tipo de célula a la que se dirige.

Los vectores víricos especializados son bien conocidos en la técnica que se puede dirigir a tipos de células específicas. Tales vectores incluyen, por ejemplo, vectores víricos adenoasociados recombinantes que tienen promotores generales o específicos de tejido (documento de EE.UU. 5.354.678). Los vectores víricos adenoasociados recombinantes tienen la ventaja añadida de que el virus recombinante se puede integrar de forma estable en la cromatina de incluso las células quiescentes no proliferativas (Lebkowski et al., 1988).

Los vectores víricos se pueden construir para controlar adicionalmente el tipo de célula que expresa el anticuerpo codificado mediante la incorporación de un promotor o un potenciador específico del tejido en el vector (Dai et al., 1992).

Los vectores retrovíricos son también adecuados para los métodos de entrega de moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo *in vivo*. Tales vectores se pueden construir o bien para actuar como partículas infecciosas o como partículas no infecciosas que se someten solo a una ronda inicial de infección.

Los enfoques para la administración de ADN mediada por receptor también se pueden usar para administrar una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo en una célula, de una manera específica de tejido, usando un ligando específico de tejido o un anticuerpo que no forma complejos covalentes con la molécula de ácido nucleico a través de una molécula puente (Curiel et al., 1992; Wu y Wu, 1987).

La transferencia de genes para obtener una expresión del anticuerpo en un sujeto también se puede realizar mediante, por ejemplo, la transfección *ex vivo* de células autólogas. Las células adecuadas para tal transfección *ex*

vivo incluyen células sanguíneas, ya que estas células son fácilmente accesibles para la manipulación e introducción de nuevo en el sujeto por métodos bien conocidos en la técnica.

La transferencia de genes a través de la transfección de células *ex vivo* se puede realizar por una variedad de métodos, que incluyen, por ejemplo, precipitación con fosfato de calcio, dietilaminoetil dextrano, electroporación, lipofección o infección vírica. 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 las células se han transfectado, a continuación se trasplantan o se injertan en un sujeto que se va a tratar. Las células, una vez introducidas en el cuerpo, pueden producir el anticuerpo que puede entrar en la circulación e inhibir la agregación plaquetaria en el sitio de la enfermedad o la afección.

10 **EJEMPLOS**

Ejemplo 1 - Proceso de humanización

Definición de CDR y residuos estructurales

Las regiones CDRs y marco de un anticuerpo, por lo general se han definido de acuerdo con diversos esquemas de numeración tales como Kabat, Chothia o IMGT (ImMunoGeneTics information system® <http://imgt.cines.fr>). La definición de Kabat se basa en la variabilidad de las secuencias y es la empleada más comúnmente. Sin embargo, las CDRs de un anticuerpo dado tal como se definen por Kabat no son necesariamente idénticas a las CDRs definidas por los otros sistemas de numeración. Las CDRs definidas por dos sistemas de numeración se pueden superponer, o una se puede extender unos pocos residuos a ambos lados de la otra.

Los inventores han utilizado una combinación de los sistemas de numeración de Kabat e IMGT para definir las CDRs y las regiones marco en el dominio (V) variable. Los inventores querían maximizar la extensión de las secuencias de CDRs de ratón que se injertaron en el marco humano con el fin de preservar la estructura del sitio de unión al antígeno. Por lo tanto, las CDRs del anticuerpo de C5aR incluyen todos los residuos clasificados como CDR por los sistemas de numeración de Kabat e IMGT. Las secuencias restantes comprendían el marco del dominio V.

Selección de secuencias marco de anticuerpos humanos adecuados

Para seleccionar secuencias marco de anticuerpos humanos adecuados en las que se injertaban las CDRs de ratón, los inventores utilizaron una serie de estrategias:

i) Búsquedas Blast en bases de datos de secuencias identificaron secuencias de la cadena ligera y pesada de la región V de Ig humana con la mayor homología con anticuerpos de C5aR de ratón. Las secuencias con mayor homología se alinearon y se generaron secuencias marco de consenso para las cadenas ligeras y pesadas.

ii) Anticuerpos humanos conocidos con alta homología con una cadena ligera o pesada del anticuerpo de C5aR de ratón, se identificaron y se empleó el marco de la región V (o una versión modificada) para injertar las CDRs de anticuerpos de C5aR de ratón.

iii) Otros anticuerpos humanizados con éxito que empleaban secuencias marco similares a los anticuerpos de C5aR de ratón, se identificaron y las CDRs de ratón se injertaron en estos marcos.

Selección de anticuerpos homólogos a partir de las bases de datos de secuencias

El anticuerpo de C5aR de ratón, secuencias de aminoácidos de la región variable de 7F3 (ambas cadenas pesadas y ligeras, véanse SEQ ID NOs 1 y 2) se utilizaron individualmente como secuencia de consulta en las búsquedas Blastp de las secuencias de inmunoglobulina humana en las bases de datos SWISSPROT y GenBank.

Las secuencias de ADN de la región variable de 7F3 de ratón (que codificaban tanto las cadenas pesadas como las ligeras, véanse las SEQ ID NOs 3 y 4) se utilizaron individualmente como secuencia de consulta en búsquedas Blast de la base de datos IMGT, de genes de inmunoglobulina humana.

Una lista de las secuencias con la mayor homología con la secuencia de consulta se generó a partir de cada búsqueda (Tablas 2 y 3).

Tabla 2: Secuencias humanas homólogas a mAb de C5aR de ratón de la cadena ligera variable

Consulta	Base de datos	ID de la secuencia	Descripción	Puntuación
aminoácido de Vk de 7F3 de ratón	SIWSS_PROT	KV2F HUMAN	Cadena kappa de Ig V-II: RPMI6410	181,0
		KV2D HUMAN	Cadena kappa de Ig V-II:	181,0

Consulta	Base de datos	ID de la secuencia	Descripción	Puntuación
			TEW	
		KV2E HUMAN	Cadena kappa de Ig V-II: GM607	176,0
		KV2B HUMAN	Cadena kappa de Ig V-II: FR	173,0
		KV2A HUMAN	Cadena kappa de Ig V-II: CUM	169,0
		KV2C HUMAN	Cadena kappa de Ig V-II: MIL	166,0
		KV4C HUMAN	Cadena kappa de Ig V-IV: B17	150,0
		KV4A HUMAN	Cadena kappa de Ig V-IV: LEN	150,0
		KV4B HUMAN	Cadena kappa de Ig V-IV: JI	148,0
		KV3D HUMAN	Cadena kappa de Ig V-III: TI	138,0
ADN de Vk de 7F3 de ratón	genes V de Ig humana de IMGT	U416644	IGKV2D-29*02	993
		M31952	IGKV2D-29*01	984
		X63396	IGKV2-29*01	984
		U41645	IGKV2-29*02	975
		X12691	IGKV2D-28*02	975

Secuencia marco de consenso - Cadena ligera de 7F3

5 Una secuencia de consenso marco humana de la cadena ligera para injertar las CDRs de la cadena ligera de 7F3, se generó usando ClustalW alineando las siguientes secuencias de la Tabla 2: KV2F_HUMAN, KV2D_HUMAN, KV2E_HUMAN, KV2B_HUMAN, KV2A_HUMAN y la traducción en aminoácidos de las secuencias de ADN X12691, U41645, U41644, M31952. Esta alineación y la secuencia de consenso se muestran en la Figura 1. El marco de consenso humano era 86 % idéntico a la secuencia marco de la cadena ligera de 7F3 del anticuerpo de C5aR murino.

Tabla 3: Secuencias humanas homólogas a la cadena pesada variable del mAb de C5aR de ratón

Consulta	Base de datos	ID de la secuencia	Descripción	Puntuación
Aminoácido de Vh de 7F3 de ratón (región del gen V)	SWISS_PROT	HV1C HUMAN	Cadena pesada de Ig V-I: ND	142,0
		HV1B HUMAN	Cadena pesada de Ig VI: HG3	138,0
		HV1G HUMAN	Cadena pesada de Ig VI: V35	134,0
		HV3J HUMAN	Cadena pesada de Ig V-III: HIL	130,0
		HV1A HUMAN	Cadena pesada de Ig VI: EU	127,0
		HV3G HUMAN	Cadena pesada de Ig V-III: CAM	123,0
		HV3K HUMAN	Cadena pesada de Ig V-III: KOL	122,0

Consulta	Base de datos	ID de la secuencia	Descripción	Puntuación
		HV3H HUMAN	Cadena pesada de Ig V-III: GA	122,0
		HV1H HUMAN	Cadena pesada de Ig VI: DOT	120,0
		HV1F HUMAN	Cadena pesada de Ig VI: MOT	120,0
Aminoácido de Vh de 7F3 de ratón (región del gen J)	SWISS-PROT	HV3K HUMAN	Cadena pesada de Ig V-III: KOL	29,0
		HV2I HUMAN	Cadena pesada de Ig V-II: ARH-77	28,2
		HV1C HUMAN	Cadena pesada de Ig VI: ND	28,2
		HV3T HUMAN	Cadena pesada de Ig V-III: GAL	27,8
		HV3H HUMAN	Cadena pesada de Ig V-III: GA	27,8
ADN de Vk de 7F3 de ratón (región del gen V)	genes V de Ig humana de IMGT	Z12305	IGHV1-f*01	777
		M99642	IGHV1-24*01	768
		L06612	IGHV1-46*03	750
		J00240	IGHV1-46*02	750
		X92343	IGHV1-46*01	750

Secuencia marco de consenso - cadena pesada de 7F3

Una secuencia marco humana de consenso para injertar las CDRs de la cadena pesada de 7F3, se generó del modo siguiente:

- 5 a) secuencias de aminoácidos de la región V, HV1C_HUMAN, HV1B_HUMAN, HV1G_HUMAN y HV1A_HUMAN y las traducciones en aminoácidos de las secuencias de los genes V, X92343, X62109, M99641, M99642 y Z12305 se alinearon utilizando CLUSTALW para generar una secuencia marco de la región V de consenso.
- 10 b) secuencias de aminoácidos de la región J, HV3K_HUMAN, HV2I_HUMAN, HV1C_HUMAN, HV3H_HUMAN y HV3T_HUMAN se alinearon utilizando CLUSTALW para generar la secuencia marco de la región J de consenso.

Estas alineaciones y las secuencias de consenso se muestran en la Figura 2.

Selección de anticuerpos humanizados homólogos

- 15 Otras secuencias marco adecuadas se seleccionaron mediante una búsqueda en publicaciones de anticuerpos humanizados con éxito con la mayor coincidencia con las secuencias de anticuerpos murinos.

Se identificaron dos secuencias marco de la cadena ligera para injertar las CDRs de la cadena ligera de 7F3:

- Secuencia basada en KV2F descrita en Caldas et al. (2003).
- Secuencia basada en HuVL-19 descrita en Nisihara et al. (2001).

Las secuencias marco de la cadena pesada identificadas para injertar las CDRs de la cadena pesada de 7F3 eran:

- Secuencia basada en HG3 descrita en Caldas et al. (2000).
- Secuencia basada en SGI-VH descrita en Nishihara et al. (2001).

Injerto de CDRs en secuencias marco y creación de secuencias humanizadas de la cadena ligera y pesada

5 *Cadena ligera de 7F3 humanizada*

Se crearon tres versiones de una región variable de la cadena ligera humanizada de 7F3.

La primera fue diseñada tomando la secuencia marco humana de consenso de la Figura 1, comparando esta secuencia con la secuencia marco de 7F3 de ratón, cambiando los aminoácidos seleccionados en el marco humano de nuevo al original, al residuo de ratón y luego injertando en las CDRs de la cadena ligera de 7F3 de ratón (Figura 3). Los residuos en el marco humano seleccionados para cambiar de nuevo a la secuencia de ratón eran: n° 2 de Ile a Val, n° 15 de Pro a Leu y n° 92 de Tyr a Phe. Los dos primeros cambios se realizaron porque el residuo encontrado en el ratón se correspondía con el aminoácido en la secuencia humana más homóloga a 7F3 de ratón, es decir, KV2F_HUMAN. El tercer cambio se realizó debido a su proximidad con CDR3 y a la necesidad de minimizar los cambios en la estructura de la región que se une con el anticuerpo. Las CDRs de la cadena ligera de 7F3 de ratón se injertaron en la secuencia marco de consenso modificada para crear la secuencia h7Vk (Figura 3) (SEQ ID NO: 31).

La segunda región variable de la cadena ligera humanizada de 7F3 se creó injertando las CDRs de la cadena ligera de 7F3 de ratón en la secuencia marco humanizada de HuVL-19, RNOK203VL, descrita anteriormente (Figura 4). Esto proporcionó la secuencia h7aVk (Figura 4) (SEQ ID NO: 32).

La tercera región variable de la cadena ligera humanizada de 7F3 se creó injertando las CDRs de la cadena ligera de 7F3 de ratón en la secuencia marco obtenida a partir de KV2F, VLCD18-Q descrita anteriormente (Figura 5). En comparación con la secuencia marco KV2F_HUMAN (véase la Figura 1 y SEQ ID NO: 5), se cambiaron 2 aminoácidos de nuevo al original, a la secuencia de 7F3 de ratón: el n° 51 de Arg a Leu para eliminar un 2° residuo cargado, en donde solo había uno en el ratón y el n° 109 de Val a Leu. Una diferencia adicional fue un cambio en el residuo n° 105 de Gln a Gly para eliminar una cadena lateral voluminosa. Esto proporcionó la secuencia h7bVk (Figura 5) (SEQ ID NO: 33).

Una comparación de las 3 secuencias humanizadas de Vk de 7F3 creadas se muestra en la Figura 6. Estas secuencias difieren de una secuencia de consenso h7F3VkCons en las posiciones 2 - 5 en las regiones marco, es decir, todas tienen una identidad entre sí superior al 93 %. Los datos presentados a continuación muestran que los anticuerpos humanizados 7F3 que contienen determinadas cadenas ligeras, son preferidos sobre otros. En particular, los residuos entre los bucles de CDR L1 y L2 son decisivos y ciertos cambios en esta región pueden tener efectos perjudiciales (por ejemplo, la introducción de un residuo Cys en el residuo n° 41). Otros cambios, tales como la introducción de residuos cargados adicionales tuvieron muy poco efecto relativo. Es posible que se hubieran podido hacer otros cambios en las secuencias humanizadas de Vk de 7F3 que no serían perjudiciales para las propiedades de un anticuerpo que contiene estos cambios.

Cadena pesada humanizada de 7F3

Se crearon tres versiones de una región variable de la cadena pesada humanizada de 7F3.

La primera fue diseñada tomando la secuencia marco humana de consenso de la Figura 2, comparando esta secuencia con la secuencia marco de 7F3 de ratón, cambiando aminoácidos seleccionados en el marco humano y luego injertando en las CDRs de la cadena pesada de 7F3 de ratón (Figura 7). Los residuos en el marco de consenso humano que se alteraron eran: n° 20 a Ile, n° 43 a Lys (para conservar un residuo cargado), n° 72 a Ala (para eliminar un residuo cargado), n° 91 a Ser y n° 95 a Phe. Estos residuos son los mismos que en el marco de ratón, pero también se encuentran en al menos una secuencia de Ig humana. Además, una región relativamente ambigua en F3 se resolvió seleccionando la secuencia HV1Av en este punto, incorporando por tanto Ile en el residuo n° 70 y Glu en el n° 74. Con el injerto de las CDRs de la cadena pesada de 7F3 de ratón en la secuencia marco de consenso modificada, se creó la secuencia h7Vh (Figura 7) (SEQ ID NO: 34).

La segunda región variable de la cadena pesada humanizada de 7F3 se creó injertando las CDRs de la cadena pesada de 7F3 de ratón en la secuencia marco obtenida a partir de SGI-VH descrita anteriormente (Figura 8). En seis posiciones en el marco de SGI-VH, se cambió el residuo humano por el residuo de 7F3 ratón. Estos cambios se realizaron en los residuos n° 38 (Arg a Lys), n° 48 (Val a Ile), n° 67 (Arg a Lys), n° 68 (Val a Ala), n° 72 (Leu a Ala) y n° 77 (Asn a Ser). Estos cambios se realizaron ya que los residuos se encuentran en proximidad de las CDRs H1 o H2 y se cree que son importantes en la formación de un sitio de unión. Por ejemplo, las retromutaciones en estas posiciones en SGI-VH para crear la secuencia RNOK203VH, habían mostrado que mejoraban la actividad neutralizante de un anticuerpo anti-FasL humanizado (Nishihara et al., 2001). Esto proporcionó la secuencia h7aVh (Figura 8) (SEQ ID NO: 35).

La tercera región variable de la cadena pesada humanizada de 7F3 se creó injertando las CDRs de la cadena ligera de 7F3 de ratón en la secuencia marco obtenida a partir de HG3 descrita anteriormente (Figura 9). Una posición en el marco HG3, residuo nº 71 (Arg), se retromutó al residuo de 7F3 de ratón (Ala) para eliminar un residuo cargado positivamente. Esto proporcionó la secuencia h7bVh (Figura 9) (SEQ ID NO: 36).

5 Una comparación de las 3 secuencias Vh humanizadas de 7F3 creadas, se muestra en la Figura 10. Estas secuencias varían de una secuencia de consenso h7F3VhCons, en las posiciones 1 - 8 en las regiones marco, es decir, todas tienen una identidad entre sí superior al 90 %. Algunas diferencias significativas entre las secuencias incluyen Lys frente a Gln en el residuo nº 43 y Glu frente a Thr en el nº 74. Sin embargo, los datos presentados a continuación muestran que los anticuerpos 7F3 humanizados que contienen cualquiera de las 3 cadenas pesadas, son eficaces en el bloqueo de la unión de C5a a C5aR humano. Parece, por tanto, que las diferencias entre las secuencias Vh no son decisivas y que sería posible realizar otros cambios en las secuencias humanizadas Vh de 7F3 que no serían perjudiciales para las propiedades de un anticuerpo que contenga tal secuencia modificada. Sin embargo, es probable que ciertas sustituciones realizadas en una secuencia Vh humanizada de 7F3 podrían mejorar las propiedades del anticuerpo, y que otras sustituciones probablemente serían perjudiciales.

15 Formación de modelos moleculares

Antecedentes

La formación de modelos de sitios de unión de anticuerpos es una combinación de la formación de modelos por homología de proteínas, en donde un gran número de estructuras de anticuerpos puede servir como base de datos de conocimientos, y una formación de modelos desde el principio que se debe utilizar para aquellas partes del anticuerpo que son demasiado variables para aplicar los métodos de homología. La mayoría de la región marco (FW) del fragmento variable (Fv) está bien conservada en relación con la estructura entre distintos anticuerpos. Después de tener en cuenta las variaciones que se producen en cadenas β en particular, se puede formar un modelo de marco mediante la selección de una estructura conocida que está más próxima a la secuencia que el Fv del que se va a formar un modelo.

25 La mayoría de la variabilidad de las secuencias y estructural en los anticuerpos se limita a las regiones hipervariables (CDRs) que se unen a antígeno. Estos seis bucles (L1, L2, L3, H1, H2 y H3) están situados en la superficie del anticuerpo y la formación de modelos de estas CDRs es lo que plantea el mayor desafío. Todas las CDRs excepto H3, generalmente se encuentran en una entre 2 y 6 clases estructurales (canónicas) (Chothia y Lesk, 1987; Chothia et al., 1989). Todos los miembros de una clase canónica tienen aproximadamente la misma conformación de cadena principal. Por lo tanto, para crear un modelo de una CDR desconocida, se examina la secuencia, se asigna la clase canónica apropiada y se emplea la CDR conocida con más homología de secuencia. El bucle H3 es más difícil de crear como modelo ya que su conformación varía considerablemente entre las estructuras.

35 Los métodos actuales para la formación de modelos de anticuerpos han empleado generalmente el enfoque de homología (véase, por ejemplo, Pulito et al., 1996; Eigenbrot et al., 1993; Barry et al., 1994). El algoritmo utilizado por WAM (Web Antibody Modelling, véase <http://antibody.bath.ac.uk>) utiliza los marcos con mayor homología de secuencia y bucles canónicos de CDRs para la secuencia que está siendo utilizada en el modelo, elegidos a partir de una base de datos de estructuras de anticuerpos conocidas.

40 Para los bucles no canónicos, se utiliza un método diferente. Este es el CAMAL (Combined Modelling Antibody Algorithm) de Martin et al. (1989), y consiste en una búsqueda combinada en base de datos/conformación.

Generación de modelos

WAM se utilizó para generar modelos de las regiones Fv de 7F3 de ratón (con ambas cadenas pesadas y ligeras), así como modelos de las regiones humanizadas Fv de 7F3.

45 Se generó una serie de modelos de las regiones humanizadas Fv (conteniendo cada uno una cadena ligera de la región V y una cadena pesada de la región V) ya que los inventores habían producido varias variantes de secuencias para cada cadena pesada y ligera humanizada de 7F3. Cada modelo de Fv humanizado se comparó con la estructura Fv de 7F3 de ratón, comparándose las estructuras de las CDRs en detalle utilizando DeepView/SWISS-PdbViewer. Se pusieron de relieve diferencias entre las dos estructuras. Por ejemplo, cuando la estructura h7Vk-h7Vh se comparaba con la estructura Fv de 7F3, la cadena ligera h7Vk se ajustaba a Vk de 7F3 muy bien, siendo casi idénticas, pero las CDRs de la cadena pesada H2 y H3 no se alineaban tan estrechamente. Por el contrario, en otro modelo, que comprendía las secuencias h7aVk-h7aVh, la alineación de la cadena pesada con Vh de 7F3 era mejor que con h7Vh, pero la alineación de la cadena ligera era considerablemente diferente en las CDRs. Basándose en este análisis se especuló que la combinación de h7Vk y h7aVh podría producir un anticuerpo más similar a 7F3. El análisis del anticuerpo que comprendía las secuencias h7bVk-h7bVh reveló que las CDRs L1, H1, H2 y H3 eran estructuralmente más diferentes de las CDRs de 7F3 equivalentes que las otras cadenas pesadas y ligeras de h7F3, lo que sugiere que los anticuerpos que contienen las secuencias h7bVk o h7bVh no pueden ser tan eficaces como los anticuerpos 7F3 o 7F3 humanizados, que no contienen estas secuencias. Teniendo en cuenta esto, fue sorprendente e inesperado que un anticuerpo que contenía la secuencia h7bVh mostrara tener una

actividad superior a 7F3 (véase el Ejemplo 5, Figura 17).

El siguiente paso fue convertir las secuencias humanizadas de la cadena pesada y ligera de 7F3 descritas anteriormente, en anticuerpos para las pruebas *in vitro* e *in vivo*.

Ejemplo 2 - Expresión y producción de anticuerpos humanizados

5 Clonación de genes de la región variable de anticuerpos en vectores con el gen de la región constante

Las secuencias de aminoácidos variables de la cadena pesada y ligera se diseñaron tal y como se ha descrito anteriormente. Para producir anticuerpos que contenían estos dominios se sintetizó una secuencia de ADN que codificaba cada región variable (Genescript Corp.). Se añadieron los sitios EcoRI y HindIII al extremo 5' o 3' para facilitar la clonación en el vector pUC18. Además, el gen variable de la cadena ligera tenía sitios de restricción únicos para BsmB1 en cada extremo. El gen de la cadena pesada tenía un sitio BsmB1 en el extremo 5' y un sitio Nhe1 en el extremo 3'.

Para construir un gen del anticuerpo de longitud completa, se subclonó un gen de la región variable en un vector que codificaba una señal de secreción y el dominio constante. Para la cadena ligera, este vector contenía la secuencia señal de secreción y el gen de la región kappa constante (C_k) humana separados por dos sitios BsmB1 únicos. Los vectores de la cadena pesada contenían la señal de secreción y un gen de la región gamma constante (C_γ) humana separados por sitios BsmB1 y Nhe1. Los vectores de la cadena pesada contenían el gen gamma 1 (C_{γ1}), gamma 2 (C_{γ2}), gamma 3 (C_{γ3}), gamma 4 (C_{γ4}), gamma 4_{PE} mutante (C_{γ4PE}) o gamma 4_P mutante (C_{γ4P}).

El proceso de clonación implicaba la preparación del ADN plasmídico por métodos convencionales, la digestión del ADN plasmídico con BsmB1 (vector de la cadena ligera y gen de la región V_k) o BsmB1 y Nhe1 (vector de la cadena pesada y gen de la región V_h) según lo recomendado por el fabricante (New England Biolabs y Promega), la separación de los fragmentos de ADN por electroforesis en gel de agarosa, la recuperación de los fragmentos de ADN a partir del gel usando un kit de extracción del gel (Jetquick, GenoMed), la ligación del fragmento génico variable con el fragmento del vector (ADN ligasa de T4, Promega), la transformación del ADN en células de *E. coli* competentes (TOP10, Invitrogen). El ADN plasmídico procedente de las células transformadas se analizó por digestión de restricción y el gen del anticuerpo en el plásmido se secuenció para confirmar que la región variable se había subclonado en el marco de lectura correcto.

Subclonación de genes del anticuerpo en el vector de expresión

Después de confirmar que el gen del anticuerpo de longitud completa tenía la secuencia correcta, se subclonó en un vector de expresión. Ejemplos de vectores de expresión que se podrían utilizar incluyen cualquiera de los vectores de expresión de mamífero pcDNA, pLENTI, pT-REX, pAd, pREP o pCEP (Invitrogen), los vectores pTriEx1 o pBac (Novagen), los vectores de expresión ZAP y pCMV (Stratagene), los vectores del sistema de expresión GS, por ejemplo, pEE12.4 y pEE6.4 (Lonza), los vectores del sistema de expresión cumate pCMV5 (Qbiogene), los plásmidos del sistema expresión UCOE (ML Laboratories) o los plásmidos de expresión MARtech (Selexis). En este caso, los genes de la cadena pesada (con el sitio HindIII en extremo 5' y el sitio EcoRI en el extremo 3') se subclonaron en los sitios HindIII-EcoRI aguas abajo del promotor de CMV, en un vector obtenido a partir de pcDNA3 (Invitrogen) que contenía el gen DHFR de ratón y/o en un vector de expresión GS (Lonza). Los genes de la cadena ligera (con el sitio SpeI en extremo 5' y el sitio EcoRI en el extremo 3') se subclonaron en los sitios Nhe1-EcoRI de pTracer-CMV/BSD (Invitrogen). Los genes de la cadena ligera con el sitio HindIII en el extremo 5' y un sitio EcoRI en el extremo 3', también se subclonaron en los sitios HindIII-EcoRI de un vector de expresión GS (Lonza). En algunos casos, el casete de expresión de la cadena pesada (promotor, secuencia codificadora de la cadena ligera y señal de poliadenilación) se subclonó en el vector de la cadena ligera para crear un único vector que expresaba tanto las cadenas pesadas como las ligeras.

Expresión del anticuerpo humanizado en células de mamífero

Para expresar un anticuerpo humanizado, un vector de la cadena pesada y ligera se cotransfectó en células CHO utilizando lipofectamina (Invitrogen). Alternativamente, el ADN del vector se pudo transfectar mediante electroporación, precipitación con fosfato de calcio, inyección directa, pistola de genes u otro método conocido por los expertos en la técnica. Alternativamente, el ADN del vector se pudo transfectar en cualquier cantidad de líneas celulares de mamífero, por ejemplo, CHOK1SV, HEK293, PerC6 o NS0. En algunas ocasiones, un vector único que codificaba tanto las cadenas pesadas como las ligeras se transfectó en las células mediante electroporación o usando lipofectamina.

Un día antes de la transfección, 4×10^5 células CHO dhfr⁻ (ATCC) se sembraron en un matraz T175 en 15 ml de medio no selectivo (alfa-MEM con nucleósidos (Invitrogen), L-glutamina 2 mM, 10 % de FBS) y se incubaron a 37°C en 5 % de CO₂. Inmediatamente antes de la transfección, se añadió ADN plasmídico (15 µg) en 800 µl de medio de crecimiento a 100 µl de lipofectamina (Invitrogen) en 800 µl de medio de crecimiento y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. La monocapa celular se lavó con PBS y la mezcla de ADN/lipofectamina se añadió al matraz con 5 ml de medio de crecimiento. Después de 16 horas de incubación a 37°C en 5 % de CO₂, se añadieron otros 10 ml de medio. Un día después, las células se lavaron con PBS y se añadieron 15 ml de medio selectivo

- (nucleósidos alfa-MEM menos y 5 % de FBS dializado). Después de 2 días, las células adherentes se volvieron a sembrar en placas de cultivo tisular de 96 pocillos con una densidad promedio de ~2-5 células por pocillo. Después de 2 - 3 semanas de crecimiento, se midió la producción de anticuerpos usando un ELISA específico de IgG humana. Las células que expresaban anticuerpos se expandieron en frascos T para la producción. El medio de cultivo se recogió y el anticuerpo se purificó tal y como se describe a continuación. Los vectores de expresión del sistema GS se transfectaron en células CHOK1SV y líneas celulares secretoras de anticuerpos aisladas y expandidas para la producción, según lo recomendado por el fabricante (Lonza).

Purificación del anticuerpo humanizado

- Las células transfectadas secretan anticuerpo en el medio de crecimiento. El anticuerpo se purificó mediante cromatografía de afinidad hacia la proteína A o la proteína G. Las fracciones que contenían el anticuerpo, identificadas por SDS-PAGE o por ELISA específico de IgG humana, se agruparon. Un ELISA específico de IgG humana se utilizó para determinar la cantidad de anticuerpo recuperado y su concentración. La pureza del anticuerpo se estimó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

Lista de anticuerpos humanizados producidos y sometidos a ensayo.

- La Tabla 4 presenta los diferentes anticuerpos producidos, mostrando las secuencias de la cadena pesada y ligera presentes en el anticuerpo.

Tabla 4: Anticuerpos humanizados producidos

Anticuerpo	Cadena ligera		Cadena pesada	
	hAb	Variable (V)	Constante	Variable (V)
A	7Vk	hCk-R	7VH	hCy4
B	7aVk	hCk-R	7VH	hCy4
C	7bVk	hCk-R	7VH	hCy4
D	7Vk	hCk-R	7VH	hCy4 _{PE}
E	7aVk	hCk-R	7VH	hCy4 _{PE}
F	7bVk	hCk-R	7VH	hCy4 _{PE}
G	7Vk	hCk-R	7aVh	hCy4 _{PE}
H	7aVk	hCk-R	7aVh	hCy4 _{PE}
I	7bVk	hCk-R	7aVh	hCy4 _{PE}
J	7Vk	hCk-R	7bVh	hCy4 _{PE}
K	7aVk	hCk-R	7bVh	hCy4 _{PE}
L	7bVk	hCk-R	7bVh	hCy4 _{PE}
M	7Vk	hCk-R	7aVh	hCy4
N	7Vk	hCk-R	7aVh	hCy1
O	7bVk	hCk-R	7VH	hCy1
P	7Vk	hCk	7bVh	hCy1
Q	7Vk	hCk	7bVh	hCy4 _P
R	7Vk	hCk	7aVh	hCy4 _P
S	7Vk	hCk	7bVh	hCy4 _{PE}
T	7Vk	hCk	7aVh	hCy4 _{PE}
U	7Vk	hCk	7aVh	hCy1
V	7Vk	hCk	7aVh	hCy4 _P

Ejemplo 3 - Estudios de unión con anticuerpos anti-C5aR humanizados.

- Para caracterizar la cinética de la unión de los anticuerpos anti-C5aR humanizados con el receptor de C5a humano (hC5aR), en este ejemplo se describen dos tipos de estudios de unión. El primero comparaba la unión de los

anticuerpos y C5a a C5aR humano en ensayos de unión competitiva-ligando. El segundo implicaba la unión por saturación en células que expresaban C5aR humano.

A. Anti-C5aR humanizado desplaza la unión de C5a a C5aR - Ensayo de unión competitiva por el ligando

5 La capacidad de los Abs humanizados para inhibir la unión de C5a marcada con ^{125}I a células L1.2 transfectadas con el gen de hC5aR o neutrófilos humanos, se sometió a ensayo tal y como se describe a continuación. C5a humana recombinante se obtuvo de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). C5a del complemento marcada con ^{125}I -Bolton-Hunter, se adquirió de NEN-Dupont (Boston, MA), con una actividad específica de 2200 Ci/mM. Brevemente, transfectantes estables L1.2/hC5aR se cultivaron durante varios días antes de un experimento, después se trataron durante una noche con ácido butírico 5 mM, para estimular la expresión de hC5aR antes del ensayo de la unión. Los neutrófilos humanos se purificaron a partir de sangre venosa recogida de voluntarios sanos. Los neutrófilos se separaron de otros leucocitos por centrifugación en gradiente de densidad con Percoll, seguida por una etapa de lisis de los glóbulos rojos. Ambos tipos de células se lavaron una vez en PBS y se resuspendieron en tampón de unión (Hepes 50 mM, pH 7,5, CaCl_2 1 mM, MgCl_2 5 mM, 0,5 % de BSA) a una concentración de $1 \times 10^7/\text{ml}$. Partes alícuotas de 40 μl (4×10^5 células) se dispensaron en placas de microtitulación de 96 pocillos, seguido de la adición de competidor frío (anticuerpo o C5a humana). Las células y el competidor frío se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente, antes de añadir C5a radiomarcada a una concentración final de 0,4 nM. El volumen final de la reacción era de 120 μl . Después de 60 min de incubación a temperatura ambiente, las células se lavaron tres veces con 150 μl de tampón de ligación que contenía NaCl 0,15 M. A continuación se hizo un recuento de los sedimentos celulares en un contador de centelleo TopCount (Packard). Las muestras se analizaron por triplicado en cada una de las 6-8 concentraciones. Cada anticuerpo se sometió a ensayo en al menos 3 ensayos distintos. El número de cuentas en cada muestra se expresó como un porcentaje de la unión máxima de ^{125}I -C5a, observada en los pocillos sin añadir competidor frío, después de la sustracción del ruido de fondo.

25 Los resultados de este análisis (las curvas de desplazamiento) para cada uno de los anticuerpos humanizados, en comparación con el anticuerpo 7F3 de ratón, en neutrófilos humanos y transfectantes L1.2/hC5aR se proporcionan en las Figuras 11 y 12, respectivamente. La Tabla 5 muestra los valores de CE_{50} para cada anticuerpo. Estos valores se obtuvieron usando el programa informático GraphPad Prism, ajustando los datos a la ecuación no lineal para una competición por un sitio. Los datos muestran que no todos los anticuerpos humanizados eran igualmente eficaces en el desplazamiento de C5a radiomarcada desde el receptor. Los anticuerpos humanizados O y N eran tan eficaces como 7F3 de ratón en los neutrófilos humanos, mientras que los anticuerpos C, J, M, N, O y Q no eran significativamente diferentes de 7F3 en los transfectantes L1.2/hC5aR.

Tabla 5: Valores de CE_{50} para cada anticuerpo mostrado en las Figuras 11 y 12.

Anticuerpo o ligando	CE_{50} (neutrófilos humanos) nM	95 % de CI	CE_{50} (transfectantes L1.2/hC5aR) nM	95 % de CI
C5a humana	0,5	0,37 - 0,88		
m7F3	0,54	0,39 - 0,75	0,51	0,35 - 0,75
A	nd		2,78	1,81 - 4,27
C	2,48	1,49 - 4,12	0,90	0,56 - 1,47
F	2,55	1,51 - 4,31	1,26	0,88 - 1,80
G	3,52	1,95 - 6,35	1,53	0,92 - 2,52
J	4,11	2,14 - 7,91	0,93	0,63 - 1,31
M	4,05	2,53 - 6,49	0,95	0,60 - 1,48
N	0,65	0,45 - 0,94	1,03	0,56 - 1,90
O	0,48	0,32 - 0,70	0,68	0,39 - 1,17
Q	3,50	2,42 - 5,05	0,86	0,52 - 1,46
S	2,69	1,46 - 4,96	nd	

B. Saturación de la unión de anticuerpos anti-C5aR sobre neutrófilos humanos purificados

35 Los neutrófilos humanos, aislados tal y como se ha descrito anteriormente, se resuspendieron en dPBS y 1×10^5 células (en 25 μl) se dispensaron en los pocillos de una placa de 96 pocillos. Un volumen igual (25 μl) de 2x anticuerpo (diluido en PBS) se añadió a cada pocillo. La concentración final de anticuerpo empleando una dilución 2 veces en serie, variaba de 40 a 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (usando hAb-Q, hAb-J y 7F3 sin marcar). Las células y el anticuerpo se incubaron durante 20 min a 4°C. Después de la incubación, se añadieron 100 μl de PBS + 1 % de BCS a cada

- pocillo y la placa se centrifugó a 2000 rpm durante 3 min. Las células se lavaron 3 veces en PBS + 1 % de BCS y se resuspendieron en IgG anti-humana-FITC (Sigma F1641) o IgG anti-ratón-FITC (Jackson 195-115-003) diluida 1/300 en PBS y se incubaron durante 20 min sobre hielo. Las células se lavaron una vez como se ha descrito anteriormente y se resuspendieron en PBS + 1 % de FCS para un análisis por citometría de flujo. La dispersión FSC v SSC se utilizó para identificar los neutrófilos, con la intensidad media de la fluorescencia (MFI) determinada para cada muestra. Los valores de CE₅₀ se determinaron ajustando los datos (MFI - ruido de fondo frente a log₁₀ [concentración de anticuerpo]) para la dosis-respuesta sigmoidea (pendiente variable), es decir, una ecuación logística de 4 parámetros utilizando el programa informático GraphPad Prism (v4.0). La B_{máx} y la K_D se determinaron mediante el ajuste de los datos a la ecuación de la hipérbola de la unión de un sitio.
- La Figura 13 muestra dos gráficos de unión por saturación, con el eje x a escala de log₁₀ (para calcular la CE₅₀) y lineal (para calcular la B_{máx} y la K_D). Los datos muestran que los valores de la K_D y de CE₅₀ de los anticuerpos humanizados anti-C5aR N y Q que se unen a los neutrófilos humanos a 4°C, eran aproximadamente 2-3 veces mayores que 7F3. La K_D y CE₅₀ para los anticuerpos humanizados son similares, cada una de aproximadamente 20 - 25 nM (~3 ug/ml), mientras que la K_D y CE₅₀ para 7F3 estaban en el intervalo ~8 - 10 nM en las condiciones de este ensayo.

Ejemplo 4 - Anticuerpos anti-C5aR humanizados se unen al epítipo EEYFPP (SEQ ID NO: 38) en el segundo bucle extracelular de C5aR humano

Métodos

Unión del anticuerpo a receptores quiméricos

- Se construyeron una serie de receptores quiméricos que comprendían segmentos de C5aR humano y de ratón para identificar la región del receptor de C5a a la que se unen los anticuerpos. Estos receptores se generaron utilizando técnicas moleculares convencionales (Lee et al., 2006). Cada vector recombinante (5 µg diluidos en DMEM) que codificaba un receptor quimérico diferente se transfeció en 5x10⁵ células L1.2 de ratón utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Las células se cultivaron en DMEM o RPMI (Invitrogen) más 10 % de suero bovino fetal (Hyclone). Después de 24 horas o 48 horas, las células se recogieron por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min y se resuspendieron en tampón FACS (solución salina tamponada con fosfato más 2 % de albúmina de suero bovino). Para la tinción con hAb-Q, 0,5x10⁵ células transfectadas se incubaron con 5 o 10 µg/ml de anticuerpo en un volumen de 50 µl por pocillo a 4°C durante 20 minutos. Las células se sedimentaron como se ha descrito anteriormente y se lavaron 3 veces con 150 µl de tampón FACS antes de la adición de 50 µl de IgG anti-humana conjugada con FITC diluida 1:200 o 1:300 (Sigma, F1641). Esta mezcla se incubó durante 20 min a 4°C antes de que se sedimentaron las células, se lavaron con tampón FACS 3 veces y finalmente se resuspendieron en 150 - 200 µl de tampón FACS. Las muestras se analizaron en un FACS Calibur (BD Biosciences).

Unión del anticuerpo a péptidos del segundo bucle extracelular

- Se sintetizó un conjunto de 22 péptidos solapantes (12 meros), cada uno desfasado del siguiente por 1 residuo, que abarcaba el segundo bucle extracelular (3^{er} dominio extracelular) del C5aR humano (Mimotopes, Melbourne). Cada péptido se preparó con un grupo de biotina y el enlazador de 4 aminoácidos (SGSG) en su extremo N-terminal. Un péptido sintetizado, n° 23, era un 33 mero, que representaba la longitud total del segundo bucle extracelular de hC5aR (residuos 173-205 de SEQ ID NO: 37), también tenía biotina-SGSG en el extremo N-terminal. Los péptidos utilizados en este experimento se describen en Lee et al. (2006).

- El experimento se llevó a cabo mediante la unión de los péptidos a una placa recubierta con estreptavidina de 384 pocillos, a continuación incubando los anticuerpos con los péptidos y detectando el anticuerpo unido con una IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) del modo siguiente. Cada péptido se disolvió en 200 µl de 60 % de DMSO a una concentración de 10 mg/ml. Los péptidos se diluyeron adicionalmente 1:1000 hasta una concentración de trabajo de 10 µg/ml con PBS/Tween 20/solución de azida (0,1 % p/v de azida de sodio en PBS/0,05 % de Tween 20).

- Una placa de 384 pocillos recubiertos con estreptavidina (Nunc) se bloqueó con 20 µl de tampón de bloqueo (1 % p/v de BSA en PBS) por pocillo. La placa se lavó 4 veces con tampón de PBS/Tween 20 (0,1 % v/v de Tween 20 en PBS). Se transfirieron 20 µl de solución de péptido diluido a un pocillo y la placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar la placa 4 veces (como arriba) se añadieron 20 µl de anticuerpo (0,5, 1, 1,25, 2,5 o 5 µg/ml) al pocillo y la placa se incubó durante 1 hora a 20°C. La placa se lavó 4 veces como anteriormente, a continuación, se añadieron 20 µl de IgG anti-ratón conjugada con HRP (dilución 1:5000 en PBS/Tween 20) a cada pocillo. Después de incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, la placa se lavó 3 veces (como anteriormente) y luego dos veces con PBS para eliminar las trazas de Tween. La presencia de peroxidasa se detectó mediante la adición de 20 µl de reactivo de Sustrato TMB (BD Opt EIA) recién preparado a cada pocillo e incubando a temperatura ambiente durante 20 min. Por último, la placa se leyó a 650 nm/450 nm.

Identificación de aminoácidos decisivos dentro del 2º bucle extracelular: barrido con alanina de péptidos mutantes.

Para definir aún más los residuos decisivos para la unión en el epítipo EEYFPP (residuos 179-184 de SEQ ID NO:

37) (SEQ ID NO: 38), una serie de péptidos cortos (12 meros) que comprendían la secuencia del 2º bucle extracelular de C5aR humano VREEYFPPKVL (residuos 177-188 de SEQ ID NO: 37) (SEQ ID NO: 58) sustituidos con alanina en diferentes posiciones en el motivo de unión, fueron sintetizados como anteriormente con un grupo de biotina y un enlazador de 4 aminoácidos (SGSG) en su extremo N-terminal (Lee et al., 2006). El péptido A1 no tenía ninguna sustitución de Ala y el péptido A14 era una versión desorganizada del péptido A1. Los péptidos A2-A13 contenían una sola sustitución de alanina en cada posición de los aminoácidos desde 12 a 1, respectivamente. La unión de los anticuerpos a los péptidos que recubrían las placas de ELISA, se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente.

ELISA del péptido N-terminal (PEP1)

Una placa MaxiSorp de 384 pocillos (Nunc) se recubrió con un péptido correspondiente a los residuos 9-29 de C5aR humano (PEP1), a concentraciones de 1 - 15 µg/ml en PBS/0,01 % de Tween-20 a 37°C durante 1,5 horas, después se lavó 3 veces. La placa fue bloqueada con 20 µl de tampón de bloqueo (1 % p/v de BSA en PBS) por pocillo durante una noche a 4°C. La placa se lavó 3 veces con tampón PBS/Tween (0,05 % v/v de Tween-20 en PBS). Se añadieron 20 µl de anticuerpo (concentración final 5 µg/ml) a cada pocillo y la placa se incubó durante 2 horas a 37°C. La placa se lavó 3 veces como anteriormente, a continuación se añadieron 20 µl de IgG kappa anti-humana conjugada con HRP (dilución 1:8000 en PBS/Tween 20) o IgG anti-ratón conjugada con HRP (dilución 1:7500) a cada pocillo. Después de una incubación de 2 horas a temperatura ambiente, la placa se lavó 4 veces (como anteriormente). La presencia de peroxidasa se detectó mediante la adición de 20 µl de reactivo de Sustrato TMB (BD Opt EIA) recién preparado a cada pocillo e incubando a temperatura ambiente durante 20 min. Finalmente, después de detener la reacción con 20 µl de H₂SO₄ 1 M por pocillo, la placa se leyó a 450 nm (referencia 620 nm) en un lector de placas.

Resultados

Para confirmar que los anticuerpos anti-C5aR humanizados reconocían el mismo sitio de unión en C5aR humano que el anticuerpo parental 7F3, se realizaron cuatro experimentos. En primer lugar, se utilizó hAb-Q para teñir células que expresaban diferentes C5aR quiméricos humano/ratón. En segundo lugar, hAb-J y Q se incubaron con una serie de péptidos solapantes (12 meros) que comprendían el 2º bucle extracelular de hC5aR. En tercer lugar, hAb-J y Q se incubaron con una serie de péptidos mutantes que comprendían un motivo de 12 aminoácidos desde el 2º bucle extracelular del C5aR humano, con una sustitución de Ala en cada posición. En cuarto lugar, hAb-J y Q se incubaron con un péptido que comprendía los residuos 9-29 del dominio extracelular N-terminal de C5aR humano.

El anticuerpo anti-C5aR humanizado se une a receptores quiméricos que contienen el segundo bucle extracelular de C5aR humano

Una serie de receptores quiméricos que comprendían secuencias de C5aR humano o de ratón en cada uno de los dominios extracelulares: el dominio N-terminal, y el 1^{er}, 2º y 3^{er} bucle extracelular (ECL), se construyó como se ha descrito anteriormente. El origen de cada dominio extracelular, así como los segmentos transmembranales e intracelulares se detallan en la Tabla 6. El origen de los dominios extracelulares de cada estructura artificial se definió por un código de 4 letras: por ejemplo mHHH define un receptor quimérico con el extremo N-terminal de C5aR de ratón y el 1^{er}, 2º y 3^{er} ECLs de C5aR humano.

Tabla 6: Estructuras artificiales de receptor quimérico: Tinción con hAb-Q

Código del dominio EC*	Residuos del receptor quimérico	Origen de la secuencia	Tinción con hAb-Q
1. HHHH	1-350	1-350 de C5aR ^a humano	+++
	351-360	GTETSQVAPA (marcador de rodopsina bovina)	
2. mHHH	1-39	1-39 de C5aR ^d de ratón	+++
	40-350	40-350 de C5aR ^a humano	
	351-360	GTETSQVAPA (marcador de rodopsina bovina)	
3. mmHH	1-111	1-111 de C5aR ^d de ratón	+++
	112-350	112-350 de C5aR ^a humano	
	351-360	GTETSQVAPA (marcador de rodopsina bovina)	
4. mmmH	1-206	1-206 de C5aR ^d de ratón	-

ES 2 562 627 T3

Código del dominio EC*	Residuos del receptor quimérico	Origen de la secuencia	Tinción con hAb-Q
	207-351	206-350 de C5aR ^a humano	
	352-361	GTETSQVAPA (marcador de rodopsina bovina)	
5. mmmm	1-351	1-351 de C5aR ^b de ratón	-
	352-361	GTETSQVAPA (marcador de rodopsina bovina)	
6. HmHH	1-92	1-92 de C5aR ^a humano	+++
	93-111	93-111 de C5aR ^b de ratón	
	112-350	112-350 de C5aR ^a humano	
	351-360	GTETSQVAPA (marcador de rodopsina bovina)	
7. HHmH	1-172	1-172 de C5aR ^a humano	-
	173-206	173-206 de C5aR ^b de ratón	
	207-351	206-350 de C5aR ^a humano	
	352-361	GTETSQVAPA (marcador de rodopsina bovina)	
8. HHHm	1-262	1-262 de C5aR ^a humano	+++
	263-282	264-283 de C5aR ^b de ratón	
	283-350	283-350 de C5aR ^a humano	
	351-360	GTETSQVAPA (marcador de rodopsina bovina)	
9. Hmmm	1-92	1-92 de C5aR ^a humano	-
	93-283	93-283 de C5aR ^b de ratón	
	284-351	283-350 de C5aR ^a humano	
	352-361	GTETSQVAPA (marcador de rodopsina bovina)	
10. mHmm	1-90	1-90 de C5aR ^b de ratón	-
	91-111	91-111 de C5aR ^a humano	
	112-351	112-351 de C5aR ^b de ratón	
	352-361	GTETSQVAPA (marcador de rodopsina bovina)	
11. mmHm	1-111	1-111 de C5aR ^b de ratón	+++
	112-262	112-262 de C5aR ^a humano	
	263-350	264-351 de C5aR ^b de ratón	
	351-360	GTETSQVAPA (marcador de rodopsina bovina)	

* Los receptores quiméricos se designan por sus dominios extracelulares (EC): HHHH es C5aR humano, Hmmm designa una quimera con el extremo N-terminal de C5aR humano y el primer, segundo y tercer bucle extracelular de C5aR de ratón, etc.
a: C5aR humano: SEQ ID NO: 37
b: C5aR de ratón: n° de orden de GenPept NP_031603

El mAb parental anti-C5aR 7F3 mostraba un patrón de tinción de las células que expresaban C5aR quimérico lo que sugería que reconoce un epítipo en el 2º bucle extracelular (3º dominio extracelular) del C5aR humano. Para confirmar que el anticuerpo humanizado hAb-Q, que se había obtenido a partir del mAb 7F3 de ratón mediante

injerto de CDR, y que por lo tanto debía contener el mismo sitio de unión al antígeno, tenía el mismo patrón de tinción que 7F3, se tiñeron células transfectadas transitoriamente que expresaban los diferentes C5aR quiméricos humano/ratón, con hAb-Q y se analizaron mediante citometría de flujo. Los receptores quiméricos que se tiñeron positivamente se indican en la Tabla 6. El patrón de la tinción con hAb-Q era idéntico al observado con 7F3. No hubo tinción con el anticuerpo secundario (anti-hIgG-FITC) solo. Los receptores quiméricos 1, 2, 3, 6, 8 y 11 se tiñeron con hAb-Q lo que indica que este anticuerpo reconoce un epítipo en el 2º bucle extracelular de C5aR humano.

Unión del anticuerpo a péptidos del segundo bucle extracelular

Para definir aún más el epítipo en el 2º bucle extracelular que se une a los anticuerpos anti-C5aR humanizados, se sintetizó un conjunto de 22 péptidos solapantes (12 meros), cada uno desfasado por 1 residuo del siguiente, que abarcaba el segundo bucle extracelular de C5aR humano. La unión de los anticuerpos a estos péptidos se analizó mediante ELISA peptídico.

El patrón de la unión de péptidos mediante 7F3 era similar al de los anticuerpos 7F3 humanizados hAb-Q y hAb-J. Los anticuerpos humanizados se unían más fuertemente a los péptidos 4 y 5 y al péptido 23 (Figura 14A y 14B). El péptido 23 es el 2º bucle extracelular completo del C5aR humano (residuos 173-205 de SEQ ID NO: 37). Había una unión más débil a los péptidos 1-3 y 6-7. Por el contrario, 7F3 se unía fuertemente a los péptidos 1-7. Los péptidos 1-7 contienen un elemento común: el motivo de 6 aminoácidos: EEYFPP. Los anticuerpos no se unían a los péptidos 13-22 que carecen de este motivo, o los péptidos 8-12 que contienen una versión truncada del motivo. Los anticuerpos anti-C5aR reconocen y se unen a un epítipo lineal (EEYFPP; residuos 179-184 de SEQ ID NO: 37) en el 2º bucle extracelular del receptor de C5a humano. Los anticuerpos humanizados no se unen a péptidos que contienen el motivo EEYFPP próximos a un extremo u otro, sino más bien a péptidos en donde el motivo se encuentra localizado de forma central.

Residuos decisivos para la unión dentro del motivo EEYFPP del segundo bucle extracelular

Para definir aún más los residuos decisivos para la unión en el epítipo EEYFPP que se unen a los anticuerpos anti-C5aR humanizados, se sintetizó una serie de péptidos cortos (12 meros) que comprendían la secuencia del 2º bucle extracelular de C5aR humano VREEYFPPKVLK (residuos 177-188 de SEQ ID NO: 37) con alanina sustituida en diferentes posiciones en el motivo de unión. La unión de los anticuerpos a estos péptidos se analizó mediante ELISA peptídico.

En este experimento, se encontró que los aminoácidos decisivos para la unión del mAb 7F3 murino anti-C5aR eran Y₃ y F₄ en el epítipo E₁E₂Y₃F₄P₅P₆ (Lee et al., 2006). Como en 7F3, los anticuerpos humanizados hAb-J y Q (Figura 14C y D, respectivamente) no se unían a péptidos con sustituciones de Ala en las posiciones Y₃ o F₄. Además, las sustituciones en E₁, E₂ y P₅ también redujeron la unión de hAb-J y Q.

El anticuerpo principal hAb-Q no se une al péptido 9-29 N-terminal (PEP1)

El presente Ejemplo muestra que los anticuerpos anti-C5aR humanizados se unen a un epítipo en el 2º bucle extracelular de C5aR. Por otra parte, no se unían a estructuras artificiales quiméricas de C5aR de ratón/humano nº 7 y nº 9, que comprendían el dominio N-terminal humano y el 2º bucle extracelular de ratón (véase la Tabla 6).

Para confirmar que los anticuerpos anti-C5aR no se unían a un péptido lineal desde el dominio N-terminal de C5aR humano, se sintetizó el péptido PEP1 que tenía la secuencia PDYGHYDDKDTLDLNTVDK (residuos 9-29 de SEQ ID NO: 37) (SEQ ID NO: 59) y se analizó la unión de los anticuerpos al péptido mediante ELISA peptídico.

Estudios anteriores demostraron que los mAbs anti-C5aR 7F3, 12D4 y 6C12 no competían con PEP1 en la unión a C5aR humano en transfectantes, y estos mAbs tampoco se unían a PEP1 recubierto sobre una placa de ELISA (documento WO 03/062278). La Figura 15 muestra que los anticuerpos humanizados anti-C5aR, hAb-J y Q (a 5 µg/ml) no se unían a PEP1 unido a una placa de ELISA con 3 concentraciones diferentes (1/100, 1/500 y 1/1000, es decir, 10 µg/ml, 2 µg/ml y 1 µg/ml, respectivamente). Sin embargo, el mAb S5/1 anti-C5aR (CD88) (AbD Serotec, nº de Cat. MCA1283) que se produjo contra el péptido N-terminal de C5aR humano 1-31, se unía a PEP1 a 5 µg/ml, tal y como se esperaba.

Ejemplo 5 - Bloqueo de la migración de células que expresan C5aR humano

A. Los anticuerpos humanizados bloquean la migración de neutrófilos humanos

Los neutrófilos humanos se aislaron a partir de sangre periférica obteniendo primero la fracción leucocitaria a través de una etapa de sedimentación con dextrano durante 40 min a temperatura ambiente. A continuación, las células se extendieron en capas sobre Ficoll-Paque (GE Healthcare) para una centrifugación en gradiente de densidad a 2500 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. Después de la lisis hipotónica de los glóbulos rojos residuales, los neutrófilos se resuspendieron en tampón de quimiotaxis (49 % de RPMI 1640 (Invitrogen), 49 % de medio 199 (Invitrogen), FBS dializado al 2 % (Invitrogen)). Los anticuerpos anti-C5aR se añadieron a los neutrófilos (1x10⁷/ml) a una concentración de 5 µg/ml. Un control negativo (sin adición de Ab, pero con 1x PBS añadido) estaba incluido.

A continuación, las células se cargaron en la cámara superior de la inserción en la placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos (Corning Inc.) con una membrana de policarbonato de 3,0 µm de porosidad y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Las inserciones se colocaron después en las cámaras inferiores que contenían C5a humana recombinante que atraía los neutrófilos humanos (Sigma) a una concentración de 0,1 a 100 nM. La migración máxima de neutrófilos tuvo lugar cuando C5a 1-10 nM estaba presente en la cámara inferior. Los neutrófilos se incubaron después durante 30 min a 37°C. 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 recuentos relativos de células se obtuvieron mediante la adquisición de eventos durante un período de tiempo establecido de 30 segundos. Este método se encontró que era altamente reproducible, y permitía regular las células vivas y la exclusión de los desechos.

Los resultados presentados en la Figura 16 muestran que los anticuerpos humanizados inhibían la migración de neutrófilos humanos hacia C5a, en comparación con los controles negativos (sin anticuerpo). A una concentración de 5 µg/ml de anticuerpo de ratón 7F3, se bloqueaba un 97 % de la migración de neutrófilos humanos. Los anticuerpos humanizados G y J, bloqueaban un 84 % y 82 % de la migración, respectivamente, a 5 µg/ml, mientras que los anticuerpos C y K eran menos eficaces bloqueando solamente un 75 % y 55 % de la migración de neutrófilos, respectivamente.

B. La migración inducida con C5a de células que expresan C5aR humano se evita con anticuerpos humanizados anti-C5aR *in vitro* en una forma dependiente de la dosis

Métodos

Migración de neutrófilos humanos

Se recogió sangre venosa humana de voluntarios sanos en tubos que contenían EDTA como anticoagulante (BD Vacutainer nº 366457). Los neutrófilos se purificaron de la sangre por centrifugación en gradiente de densidad con Percoll seguido por una etapa de lisis de glóbulos rojos (Lee et al., 2006). Los neutrófilos purificados se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min y se resuspendieron en tampón de quimiotaxis (49 % de RPMI 1640, 49 % de medio 199, 2 % de FBS dializado GIBCO) a 2×10^7 células/ml de tampón de quimiotaxis. El anticuerpo (diluido en tampón de quimiotaxis, concentración final 0,003 - 10 µg/ml) y las células (2×10^6 células/pocillo) en un volumen total de 200 µl, se incubaron a 37°C en 5 % de CO₂ durante ~20 min. Estos se dividieron después en 2 x 100 µl de muestras y se añadieron a 2 pocillos en la cámara superior de una placa transwell de 24 pocillos (HTS Transwell, 3,0 micras de tamaño de poro; Corning). El tampón de quimiotaxis (600 µl total) que contenía C5a (concentración final 0 - 100 nM) se colocó en la cámara inferior. Las placas se incubaron a 37°C en 5 % de CO₂ durante ~1 hora para permitir la migración celular. Los pocillos de control contenían células sin anticuerpo, o tampón sin C5a. La curva estándar para este ensayo se estableció en la placa de 96 pocillos con el colorante CyQUANT como se describe a continuación.

Migración de las células del transfectante L1.2/hC5aR

Las células L1.2/hC5aR que crecían en medio RPMI 1640, 10 % de FBS, 0,5 mg/ml de G418 (Invitrogen) y que se estimularon durante una noche con ácido butírico 5 mM, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min y se lavaron en tampón de quimiotaxis (49 % de RPMI 1640, 49 % de medio 199, 2 % de FBS dializado; Gibco), después se centrifugaron de nuevo y finalmente se resuspendieron en 2×10^6 células/ml de tampón de quimiotaxis. El anticuerpo (diluido en tampón de quimiotaxis, concentración final de 0,005 - 5 µg/ml) mezclado con las células (1×10^5 células/pocillo) en un volumen total de 200 µl, se añadió a una placa de 96 pocillos y se incubó a 37°C en 5 % CO₂ durante ~20 min. Esto se dividió en 2 x 100 µl de muestras, y se añadió a 2 pocillos en la cámara superior de una placa transwell de 96 pocillos (HTS Transwell-96 Sistema, tamaño de poro 5,0 micras; Corning). El tampón de quimiotaxis (150 µl total) que contenía C5a humana recombinante (Sigma), concentración final de 0,1 - 100 nM, se colocó en la cámara inferior. Las placas se incubaron a 37°C en 5 % de CO₂ durante ~1 hora para permitir la migración celular. Los pocillos de control contenían células sin anticuerpo, o tampón sin C5a. Una dilución en serie de células hC5aR/L1.2 en tampón de quimiotaxis se preparó para crear una curva estándar para el ensayo de detección CyQUANT®. El tampón (150 µl), que contenía un número fijo de células (0, 150, 450, 1350, 4050, 12150 por pocillo) se añadió directamente a cada uno de los dos pocillos en la cámara inferior antes de la etapa de incubación durante 1 h.

Cuantificación empleando el colorante CyQUANT®

Después de la incubación, el tampón más las células que habían migrado en la cámara inferior del transwell, se transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo plano (Nunc) y se centrifugaron durante 5 min a 200x g (~1.500 rpm). El sedimento celular se lavó con 150 µl de PBS para eliminar las trazas de rojo de fenol, que interfieren con la fluorescencia de CyQUANT. Después de la segunda etapa de centrifugación, el sobrenadante se retiró cuidadosamente y la placa se congeló durante una noche a -80°C para lisar las células. La placa se descongeló a temperatura ambiente y se añadieron 200 µl de colorante CyQUANT GR diluidos en tampón de lisis (kit del ensayo de proliferación celular de CyQUANT®, Invitrogen) a cada pocillo.

Para el ensayo que empleaba las células L1.2/hC5aR se estableció primero una curva estándar en la placa transwell tal y como se ha descrito anteriormente y las células se transfirieron a la placa de 96 pocillos para marcar con el

colorante CyQUANT. Para el ensayo que empleaba neutrófilos, la curva estándar se estableció directamente en la placa de 96 pocillos con el colorante CyQUANT de la siguiente manera: un sedimento que contenía 1×10^6 neutrófilos se congeló durante una noche a -80°C y luego se descongeló y se resuspendió 1 ml de colorante CyQUANT, a continuación, se añadieron 2×10^5 células en 200 μl a cada uno de los 2 pocillos de la placa de 96 pocillos que contenía 200 μl de colorante CyQUANT y se diluyeron en serie de 1 a 2, para establecer una curva estándar (por duplicado) en el intervalo desde 100.000 hasta $\sim 48,8$ células/pocillo.

La placa se incubó a temperatura ambiente durante 2 - 5 min envuelta en papel de aluminio (para protegerla de la luz), luego se colocó en el fluorímetro (FLUOstar Galaxy, BMG Labtechnologies) y se leyó con una excitación máxima (A1) ajustada a 485 nm y una emisión máxima (B1) ajustada a 520 nm. La intensidad de la fluorescencia se registró y los datos se procesaron utilizando el programa informático FLUOstar Control. La intensidad de la fluorescencia se convirtió al número de células utilizando la curva estándar, con los datos analizados utilizando regresión lineal o una ecuación logarítmica de 4 parámetros no lineal (GraphPad Prism v4.0).

Resultados

Se investigó la capacidad de los anticuerpos humanizados 7F3 para bloquear la migración inducida por C5a de los neutrófilos humanos y de los transfectantes de células hC5aR/L1.2 en un intervalo de concentraciones.

Los neutrófilos procedentes de 4 donantes voluntarios sanos, diferentes se preincubaron con diversas concentraciones de anticuerpo anti-C5aR, hAb-Q o 7F3 o anticuerpos de control del isotipo, antes de la exposición a C5a 10 nM en el ensayo de transwell. Las muestras se analizaron por duplicado. Se calculó el número de células que migraban después de sustraer la fluorescencia de fondo de la curva estándar, usando un análisis de regresión. Para cada experimento la curva estándar ajustada al valor r^2 de la ecuación era $>0,99$.

Se observó una relación dosis-respuesta en los anticuerpos anti-C5aR. A una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ tanto hAb-Q como 7F3 bloqueaban completamente la migración de neutrófilos humanos, inducida por C5a 10 nM. Como la concentración de anticuerpo disminuía, el número de células que migraban aumentó. La preincubación de neutrófilos con hAb-Q o 7F3 a una concentración inferior a 0,1 $\mu\text{g/ml}$ no era eficaz para evitar la migración. Los anticuerpos de control del isotipo no bloqueaban la quimiotaxis inducida por C5a de los neutrófilos humanos. La Figura 17 muestra los datos promedio de los 4 experimentos trazados con la línea de regresión no lineal de ajuste óptimo mostrada para hAb-Q y 7F3. El anticuerpo anti-C5aR humanizado era más eficaz en el bloqueo de la migración de neutrófilos humanos inducida por C5a que 7F3, con una CI_{50} ~ 6 - 8 veces menor.

Las células transfectadas que expresaban C5aR humano también fueron sometidas a un ensayo de migración después de la preincubación con diversas concentraciones de anticuerpos anti-C5aR, hAb-Q, hAb-J o 7F3 o un anticuerpo de control del isotipo. La Figura 18 muestra que la migración del transfectante hC5aR/L1.2 estaba completamente inhibida por los anticuerpos anti-C5aR humanizados, J y Q así como 7F3, a 5 $\mu\text{g/ml}$. El análisis de los datos mediante regresión no lineal con una ecuación de dosis-respuesta sigmoidea (programa informático GraphPad Prism) proporcionó valores de CI_{50} de 0,5, 0,6 y 0,7 $\mu\text{g/ml}$ para 7F3, J y Q, respectivamente, lo que sugería que los anticuerpos eran cada uno muy eficaces para neutralizar la migración de las células hC5aR/L1.2 inducida con C5a.

C. El anticuerpo humanizado anti-C5aR bloquea eficazmente la migración de neutrófilos humanos *in vitro* con bajos niveles de ocupación de los receptores

Se ha mostrado anteriormente que los anticuerpos anti-C5aR humanizados inhibían la migración inducida por C5a (quimiotaxis) de células que expresaban C5aR humano. Para caracterizar mejor esta inhibición, se determinó el nivel de ocupación del receptor de C5a con el anticuerpo anti-C5aR humanizado requerido para inhibir la migración de neutrófilos humanos *in vitro*, del modo siguiente.

Métodos

Marcado con FITC de hAb-Q

El isotiocianato de fluoresceína (FITC) se conjugó covalentemente con hAb-Q. Brevemente, $\sim 2,2$ mg de hAb-Q se intercambiaron en "Tampón de Reacción" (Na_2CO_3 160 mM, NaHCO_3 340 mM, pH 9,5) y los 1,8 mg recuperados se añadieron a 144 μg de FITC (Molecular Probes, n° de Cat. F1906) disuelto en DMSO. La reacción se realizó en la oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente ($\sim 21^\circ\text{C}$). El FITC sin conjugar se eliminó usando una columna PD-10, pre-equilibrada y eluida con "Tampón de Almacenamiento" (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8,2). hAb-Q-FITC conjugado se concentró hasta alcanzar una concentración final de 5,7 mg/ml usando un filtro giratorio de Centricon YM-30 (Amicon, n° de Cat. 4208) y se almacenó a 4°C en la oscuridad.

Unión de hAb-Q a C5aR sobre neutrófilos humanos

Los neutrófilos humanos, preparados como se ha descrito anteriormente, pero sin etapa de lisis de glóbulos rojos, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min y se resuspendieron a 2×10^7 células/ml en tampón de quimiotaxis (49 % de RPMI 1640, 49 % de medio 199, 2 % de FBS dializado; Gibco). El anticuerpo hAb-Q se diluyó en tampón de quimiotaxis hasta 2x la concentración final requerida. Se prepararon concentraciones de 0,002, 0,006, 0,02, 0,06,

0,2, 0,6, 2, 6, 20, 60, 200 y 600 µg/ml. Un volumen igual de células (125 µl) y de anticuerpo (125 µl) se mezcló y se incubó a 37°C durante 10 min para permitir que hAb-Q se uniera a C5aR.

Ensayo de quimiotaxis de neutrófilos humanos

5 Resumiendo, después de la incubación de los neutrófilos y hAb-Q, 100 µl de partes alícuotas de cada mezcla que contenía 2×10^6 células y 0 a 100 µg/ml de hAb-Q, se colocaron (por duplicado) en la cámara superior de una placa transwell de 24 pocillos (6,5 mm de inserción, 3,0 micras de membrana de policarbonato; Corning Costar, nº de Cat. 3415). El tampón de quimiotaxis (600 µl total) que contenía C5a humana recombinante (concentración final 0, 0,1, 1, 10 o 100 nM) se colocó en la cámara inferior. Las placas se incubaron a 37°C en 5 % de CO₂ durante 30 min para permitir la migración celular. Los pocillos de control contenían células sin anticuerpo, o tampón sin C5a. Después de 10 la incubación se contó el número de células en la cámara inferior por citometría de flujo en un FACSCalibur (BD Biosciences).

Medición de hAb-Q unido

15 La cantidad de hAb-Q unido a los neutrófilos humanos se calculó en 2 muestras: una muestra de las células más mezcla de anticuerpos antes de la quimiotaxis (muestra A) y una muestra de las células de la cámara inferior de la placa transwell después de la quimiotaxis (muestra BL). Esto era para determinar si había alguna diferencia en la ocupación de los receptores de las células que habían migrado o si la ocupación de los receptores cambiaba entre el inicio y el final de la quimiotaxis. El hAb-Q unido se detectó mediante la incubación de las células con anti-hlgG-FITC. En algunos ensayos se midió la cantidad de anticuerpo unido en una tercera muestra - una muestra de células más la mezcla de anticuerpos de la cámara superior de la placa transwell después de la quimiotaxis (muestra BU).

20 La muestra A (10 µl de células más anticuerpo antes de la migración) se añadió a un pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo en U (por duplicado) y se centrifugó a 1200 rpm durante 2 min a temperatura ambiente en una centrífuga de mesa (Beckmann Coulter Allegra X-15R). El sedimento celular se lavó dos veces con 200 µl de PBS antes de ser resuspendido en 50 µl de anti-hlgG-FITC (1/300, diluido en dPBS) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Las muestras se centrifugaron a 2000 rpm durante 2 min, el sobrenadante se retiró y el sedimento celular se resuspendió en 150 µl de tampón FACS (PBS, 1 % de BCS) para el análisis por citometría de flujo 25 (FACSCalibur, BD Biosciences).

30 Las muestras BL (200 µl de células de la cámara inferior de la placa transwell después de la migración) y BU (50 µl de células + mezcla de anticuerpos de la cámara superior de la placa transwell después de la migración) se colocaron en los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo en U (por duplicado) y se procesaron tal y como se ha descrito para la muestra A.

Medición del Receptor exento de C5a

35 La cantidad de receptor libre sobre los neutrófilos humanos se calculó en 2 muestras: una muestra de las células más una mezcla de anticuerpos antes de la quimiotaxis (muestra C) y una muestra de las células de la cámara inferior de la placa transwell después de quimiotaxis (muestra D). El receptor libre se detectó mediante la incubación de las células con hAb-Q (hAb-Q-FITC) marcado con FITC.

40 La muestra C (10 µl de células más anticuerpo antes de la migración) se añadió a un pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo en U (por duplicado) y se centrifugó a 2000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente. El sedimento celular se lavó dos veces con 200 µl de PBS antes de ser resuspendido en 50 µl de hAb-Q-FITC (100 µg/ml, diluido en dPBS) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Las muestras se centrifugaron a 2000 rpm durante 2 min, se retiró el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en tampón FACS (PBS, 1 % de BCS) para el análisis por citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences).

45 La muestra D (200 µl de células de la cámara inferior de la placa transwell después de la migración) se colocó en un pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo en U (por duplicado) y se procesó como se ha descrito para la muestra C.

Análisis por citometría de flujo de la ocupación del receptor de C5a en neutrófilos

50 El citómetro de flujo FACSCalibur se configuró con parámetros de compensación establecidos para el canal FL-1. Las muestras fueron adquiridas de modo que se excluyeran las células muertas y los desechos. Los neutrófilos se identificaron basándose en FSC y SSC. El nivel de hAb-Q unido (anti-hlgG-FITC) o de C5aR libre (hAb-Q-FITC) se determinó mediante la determinación de la intensidad media de la fluorescencia (del inglés, MFI) de FITC (FL-1) de los neutrófilos en una muestra.

El porcentaje de hAb-Q unido se cuantificó mediante la determinación de la MFI de cada muestra A y B, como un porcentaje de la MFI de la muestra incubada con 300 µg/ml de hAb-Q (después de sustraer el ruido fondo no específico (NSB) que era la MFI de las muestras sin hAb-Q) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Receptor ocupado} = [MFI (\text{muestra}) - MFI (\text{NSB})] / [MFI \text{ máx} (300 \mu\text{g/ml de muestra de hAb-Q}) -$$

MFI (NSB)] x 100

5 El porcentaje de receptor exento de C5a se cuantificó determinando la MFI de cada muestra C y D, como un porcentaje de la MFI máxima de las muestras incubadas sin hAb-Q (después sustraer el ruido de fondo no específico (NSB) que era la MFI de la muestra incubada con 300 µg/ml de hAb-Q sin marcar) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Receptor libre} = \frac{[MFI (\text{muestra}) - MFI (\text{NSB})]}{[MFI \text{ máx} (\text{muestra de hAb-Q sin marcar}) - MFI (\text{NSB})]} \times 100$$

Resultados

10 Se realizaron cuatro experimentos. Brevemente, los neutrófilos purificados aislados a partir de la sangre venosa de un voluntario sano se preincubaron durante 10 min con hAb-Q a concentraciones en el intervalo de 0,001 a 100 µg/ml. Se tomó una pequeña parte alícuota de esta mezcla para determinar la cantidad de anticuerpo unido al receptor (% de ocupación del receptor) y el resto se colocó en la cámara superior de una placa transwell. C5a (10 nM) se colocó en la cámara inferior. Después de 30 min de incubación, el número de células que había migrado a la
15 cámaras inferior y superior al final de la migración, también se determinó empleando anti-hlgG marcado con FITC y citometría de flujo. El nivel de receptores libres (sin anticuerpo unido) se determinó en un experimento incubando los neutrófilos con hAb-Q marcado con FITC, antes y después de la migración.

La migración de los neutrófilos fue bloqueada por hAb-Q

20 La Figura 19 muestra el gráfico de la concentración de hAb-Q frente al número total de células que migran, generado a partir de los datos combinados de los cuatro experimentos. Había una relación dosis-respuesta entre la concentración de hAb-Q y la migración. A concentraciones $\geq 0,1$ µg/ml, hAb-Q bloqueaba completamente la migración de neutrófilos humanos, inducida por C5a 10 nM. A medida que disminuía la concentración de anticuerpos, el número de células que migraban aumentó. Este resultado era similar al descrito anteriormente (Figura 17).

La ocupación del receptor aumentaba con el aumento de la concentración de anticuerpo

25 Los datos de la ocupación del receptor procedentes de los 4 experimentos, se combinaron. La cantidad promedio de anticuerpo unido (receptor ocupado) sobre los neutrófilos con cada concentración de hAb-Q en las muestras de la cámara transwell inferior antes de la quimiotaxis y después de la quimiotaxis, se muestra gráficamente en la Figura 20. La diferencia en el nivel de receptores ocupados entre la muestras antes de la quimiotaxis y después de la migración de la cámara transwell inferior (valores CE_{50} de 0,3 y 1,1 µg/ml, respectivamente). Con cualquier concentración dada de hAb-Q, había menos anticuerpo unido a las células después de la quimiotaxis que antes de la quimiotaxis. Esta diferencia podría deberse a que las células que migraban preferentemente podrían tener, como promedio, menos hAb-Q que bloqueaba el receptor que las células que no migraban. Una explicación alternativa de la diferencia podría ser que las células premezcladas más la solución de anticuerpo (100 µl) se diluyó esencialmente
35 ~7 veces cuando se colocó en la placa transwell que contenía 600 µl de tampón en la cámara baja. Como los anticuerpos podían cruzar libremente la membrana transwell de 3 µm, con la dilución el equilibrio de la reacción de unión cambiaría.

40 La cantidad de receptor libre después de la unión del hAb-Q sin marcar, se midió en un experimento. Estos datos también se muestran gráficamente en la Figura 20. Se observó una relación inversa entre receptor unido y libre en las muestras tanto anteriores a la quimiotaxis como posteriores a la misma.

Relación entre la ocupación del receptor y la inhibición de la quimiotaxis

45 Los datos de la migración de neutrófilos mostrados en la Figura 19 se transformaron mediante la expresión del número de células que migran como un porcentaje del número de células promedio que migran con C5a 10 nM en las muestras sin anticuerpo. A continuación, este porcentaje se restó del 100 % para obtener el porcentaje de inhibición de la migración. Por tanto, el número de células que migraban en la muestra sin anticuerpo se convirtió en 0 % de inhibición, y 0 células que migraban se convirtió en el 100 % de inhibición. Estos datos se analizaron después utilizando GraphPad Prism, usando una regresión no lineal (ecuación de dosis-respuesta sigmoidea (pendiente variable)). A continuación, la curva obtenida después de este análisis se representó gráficamente con los datos de ocupación del receptor de la Figura 20 para generar la Figura 21.

50 La Figura 21 muestra que el aumento de la ocupación del receptor se correlacionaba con el aumento de la inhibición de la migración de neutrófilos. El valor CE_{50} para la inhibición de la migración era de 0,03 µg/ml, y para la ocupación del receptor era de 0,3 µg/ml para las muestras antes de la quimiotaxis y 1,1 µg/ml para las muestras después de la quimiotaxis, procedentes de la cámara transwell inferior. Los datos sugieren que una ocupación muy baja del receptor estaba asociada con un bloqueo significativo de la migración. Solo el 10 % de los receptores se habían
55 unido al anticuerpo con 0,03 µg/ml de hAb-Q, pero esta dosis causaba una caída del 50 % de la migración. La migración estaba completamente bloqueada a una concentración de 0,3 µg/ml cuando la ocupación del receptor era

del ~15-45 %. En conclusión, hAb-Q era muy eficaz en el bloqueo de la migración mediada por C5a de neutrófilos humanos *in vitro*, con bajos niveles de ocupación del receptor.

Ejemplo 6 - Anticuerpos humanizados bloquean la liberación de iones de calcio inducida por C5a desde neutrófilos humanos

- 5 La movilización de calcio es uno de los primeros eventos que tienen lugar después de que C5a se une a su receptor, C5aR, en la superficie de los neutrófilos. La unión de C5a provoca un aumento inmediato (al cabo de segundos) de Ca^{2+} libre citosólico que se libera de los almacenes internos, seguido de un efecto más sostenido (durante minutos) debido a la entrada desde el medio extracelular. Este aumento transitorio de Ca^{2+} libre actúa como un mensajero secundario para diversas respuestas biológicas observadas en los neutrófilos después de la unión de C5a a C5aR.
- 10 Para determinar si los anticuerpos humanizados 7F3 eran eficaces en el bloqueo de la liberación de Ca^{2+} libre inducida por C5a, se llevó a cabo un ensayo de "flujo de calcio" del modo siguiente. En resumen, los neutrófilos humanos se aislaron a partir de un voluntario sano y se purificaron como se ha descrito anteriormente. Para cada muestra, se requerían 1×10^6 neutrófilos. Los neutrófilos se centrifugaron y se lavaron en PBS y luego se resuspendieron hasta 1×10^7 células/ml en Cell Dye (MGB completo [KCl 5 mM, NaCl 140 mM, MgSO_4 300 μM , MgCl_2 1 mM, KH_2PO_4 220 μM , NaHPO_4 1,1 mM, HEPES 10 mM, glucosa 5,5 mM] con sulfonpirazona 250 μM y Fluo3-AM 1,7 μM (Calbiochem, n° de Cat. 343242) o Fluo4-AM (Invitrogen)) y se incubaron a temperatura ambiente durante 40 min en la oscuridad. Las células se centrifugaron y se lavaron con MGB completo más sulfonpirazona 250 μM para eliminar el exceso de colorante, se centrifugó de nuevo y se resuspendió hasta 2×10^6 células/ml con MGB completo más sulfonpirazona 250 μM . Las células (0,5 ml) se dividieron en partes alícuotas en tubos FACS de vidrio no estériles - un tubo para cada muestra - y se utilizaron al cabo de una hora. Varios reactivos (C5a, ionomicina, anticuerpo) se prepararon con una concentración final de 10x en MGB incompleto (MGB completo menos HEPES y glucosa). El citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson) se configuró y los neutrófilos se regularon usando dispersión frontal del eje x, dispersión lateral del eje y. Se utilizó el canal FL-1 del eje y (FITC) para comprobar la respuesta de los neutrófilos. La fluorescencia de las muestras se midió continuamente y los datos se almacenaron en un archivo de CellQuest. Se realizaron varias pruebas de control antes de otras muestras - células sin tratamiento se utilizaron para establecer la valor inicial de la fluorescencia. C5a se añadió a las células (50 μl de C5a 10 nM humana recombinante (Sigma): concentración final de 1 nM) para someter a ensayo la respuesta. Sin un pretratamiento con anticuerpos, las células respondían de inmediato a hC5a si eran funcionales; si no se obtenía respuesta, las células no eran adecuadas. La ionomicina (0,1 - 1 $\mu\text{g/ml}$ de concentración final en el tubo) se utilizó para determinar si las células se habían cargado con colorante.

- Para determinar si los anticuerpos humanizados 7F3 eran eficaces en el bloqueo de la liberación de Ca^{2+} inducida por C5a, neutrófilos cargados con colorante se preincubaron con anticuerpo antiC5aR (0,1 - 50 $\mu\text{g/ml}$ de concentración final en el tubo) durante 10 - 25 min. A continuación, las células más anticuerpo pasaron a través del citómetro de flujo para obtener una lectura del valor inicial, seguido por la adición de hC5a 1 nM (concentración final). Si hC5a no producía un aumento de la fluorescencia, entonces se añadió ionomicina (Sigma, 0,1 - 1 $\mu\text{g/ml}$ de concentración final) para comprobar que las células eran capaces de responder (viables).

- La capacidad del mAb original de ratón anti-C5aR humano 7F3 para bloquear la liberación de Ca^{2+} inducida por C5a, se investigó. Una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de 7F3 bloqueaba completamente el flujo de Ca^{2+} inducido por C5a, 1 $\mu\text{g/ml}$ era parcialmente eficaz, mientras que concentraciones más bajas (0,01 y 0,1 $\mu\text{g/ml}$) no bloqueaban la liberación de Ca^{2+} . Las células incubadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de 7F3 todavía eran capaces de liberar Ca^{2+} tal y como se muestra por el aumento de la intensidad media de la fluorescencia (MFI) cuando se añadía 1 $\mu\text{g/ml}$ de ionomicina ~30 s después de C5a (datos no mostrados).

- Los anticuerpos humanizados 7F3 (F, G, J, M, N y O) se sometieron a ensayo para determinar su capacidad para neutralizar la liberación de calcio inducida por C5a en neutrófilos humanos a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, cuando se incubaban con neutrófilos, aproximadamente 10 min antes de añadir C5a 1 nM. Los anticuerpos N y O bloqueaban completamente el flujo de Ca^{2+} , mientras que los anticuerpos F, G, J y M bloqueaban parcialmente la liberación de Ca^{2+} tal y como se sugería por los valores más bajos de la fluorescencia media observada, en comparación con las células control no preincubadas con anticuerpo. Cuando se añadía ionomicina a las células preincubadas con anticuerpo N u O, se producía un aumento inmediato de la MFI lo que demuestra que los neutrófilos seguían siendo capaces de liberar Ca^{2+} en presencia del anticuerpo de bloqueo (datos no mostrados).

- La relación dosis-respuesta para los anticuerpos G, J, M, N y Q se examinó preincubando neutrófilos humanos con diversas concentraciones de anticuerpo antes de añadir C5a y medir la liberación de Ca^{2+} . Una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo G bloqueaba completamente la liberación de Ca^{2+} inducida por C5a, mientras que concentraciones más bajas (0,1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$) no eran eficaces. Los resultados eran iguales para el anticuerpo M. En ambos casos, las células tratadas con 30 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo todavía eran capaces de liberar Ca^{2+} como se mostraba cuando se añadía 1 $\mu\text{g/ml}$ de ionomicina, aproximadamente 90 segundos después de C5a. El anticuerpo J mostró un bloqueo completo a concentraciones de 30 y 10 $\mu\text{g/ml}$, aunque en el experimento anterior, 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo J eran solo parcialmente eficaces en el bloqueo del flujo de Ca^{2+} . El anticuerpo N era el anticuerpo más eficaz, bloqueando completamente la liberación de Ca^{2+} inducida por C5a a 10 y 1 $\mu\text{g/ml}$ en 2 experimentos distintos. En todos los casos, cuando C5a no lograba causar un flujo de Ca^{2+} , se añadió 1 $\mu\text{g/ml}$ de ionomicina y se

5 produjo un gran aumento de la MFI, lo que indicaba que las células todavía eran capaces de responder. Con el anticuerpo Q, la liberación de Ca²⁺ inducida por C5a de los neutrófilos humanos se evitaba cuando las células se preincubaban con 5 o 50 µg/ml de anticuerpo Q, como se evidenciaba por la falta de un pico en la fluorescencia después de la adición de C5a 1 nM. La adición de ionomicina a estas muestras, poco tiempo después generaba un incremento habitual en la fluorescencia, lo que sugería que los neutrófilos todavía eran capaces de responder. La preincubación con 0,5 µg/ml de anticuerpo Q no era eficaz y se observó un gran aumento de la fluorescencia después de añadir C5a 1 nM a la muestra, similar al efecto observado cuando las células fueron tratadas solamente con C5a 1 nM (sin anticuerpo añadido). Estos resultados se resumen en la Tabla 7.

10 **Tabla 7:** Resultados del ensayo de flujo de calcio que muestra las concentraciones de cada anticuerpo eficaces para bloquear la liberación de Ca²⁺ inducida por C5a.

Anticuerpo	Conc. de Ab eficaz para bloquear el flujo de Ca ²⁺ inducido por C5a	Conc. de Ab analizado pero no eficaz en el bloqueo del flujo de Ca ²⁺
F [^]	-	10 µg/ml
G	30 µg/ml	0,1, 1 & 10 µg/ml
J	10 [#] & 30 µg/ml	0,1 & 1 µg/ml
M	30 µg/ml	1 & 10 µg/ml
N	1 & 10 µg/ml	0,01 & 0,01 µg/ml
O [^]	10 µg/ml	-
Q	5 & 50 µg/ml	0,5 µg/ml
7F3	1 [#] & 10 µg/ml	0,01 & 0,1 µg/ml

esta concentración fue neutralizada en parte en un experimento, pero completamente neutralizada en otro.
[^] solo se analizó una única concentración de Ab.

15 La Tabla 7 muestra que los anticuerpos 7F3 humanizados más eficaces para el bloqueo eran los anticuerpos N y Q. Curiosamente, el anticuerpo N tiene isotipo IgG1 y puede ser más eficaz que los anticuerpos con isotipo IgG4 debido a la unión a receptores de Fcγ (R de Fc gamma) sobre los neutrófilos. La IgG1 humana tiene mayor afinidad hacia el R de Fc gamma que hIgG4. Para determinar si el R de Fc gamma que se une al anticuerpo N u O contribuía a la neutralización de la liberación de Ca²⁺ inducida por C5a, se preincubaron neutrófilos humanos cargados previamente con Fluo3-AM durante 10 min con solo el anticuerpo O o N, o con el anticuerpo N más 50 µl de bloqueo de Fc [suero humano preparado a partir de la misma muestra de sangre a partir de la cual se aislaron los neutrófilos], o anticuerpo O más bloqueo de Fc, o bloqueo de Fc solo. Los cambios de los niveles intracelulares de Ca²⁺ como respuesta a C5a (e ionomicina si era necesario) fueron medidos en el citómetro de flujo. No había diferencias en la capacidad de los anticuerpos N u O para neutralizar el flujo de Ca²⁺ inducido por C5a en presencia o ausencia de bloqueo de Fc. Estas células todavía eran capaces de liberar Ca²⁺ tal y como se muestra por el efecto de añadir ionomicina. La preincubación de los neutrófilos con bloqueo de Fc solo no impidió la liberación de Ca²⁺ inducida por C5a. Estos datos sugieren que los anticuerpos N y O ejercen su efecto protector mediante la unión a C5aR y bloquean la señalización de C5a, no a través de la interacción con el R de Fc gamma.

Ejemplo 7 - Influencia de los anticuerpos humanizados anti-C5aR sobre la activación de neutrófilos

A. Los anticuerpos anti-C5aR humanizados evitan la activación inducida con C5a de neutrófilos humanos *in vitro*

30 C5a es un potente activador de los neutrófilos humanos, que induce una regulación al alza del antígeno de superficie CD11b (la cadena alfa de la integrina MAC-1, media en la quimiotaxis e interacciona con el endotelio), y la pérdida de la molécula de adhesión CD62L (L-selectina). La capacidad de los anticuerpos anti-C5aR humanizados para evitar la activación de neutrófilos mediada por C5a se investigó en un ensayo de activación de sangre completa.

Métodos

35 La sangre de voluntarios humanos sanos (2 donantes) se recogió en tubos que contenían el anticoagulante ácido citrato dextrosa (ACD) y se añadió a pocillos que contenían H₂DCFDA (50 µM final) durante 10 min a temperatura ambiente (23°C), seguido de 0,3 - 300 µg/ml de hAb-Q, 0,3 - 300 µg/ml de control de isotipo IgG4, o solo dPBS. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente (23°C) durante 20 min. C5a (100 nM final), PMA (0,2 - 400 ng/ml) o dPBS se añadió a cada muestra y se incubó de nuevo a temperatura ambiente (23°C) durante 20 min. Los anticuerpos anti-CD11b y anti-CD62L (1/400 final) se añadieron a todas las muestras durante 15 min. Los eritrocitos fueron eliminados empleando el tampón de lisis RBC y los leucocitos se resuspendieron en dPBS + 1 % de FCS.

40 Los niveles de expresión de CD11b y CD62L en los neutrófilos se midieron del modo siguiente. El citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) se ajustó con parámetros de compensación establecidos para los canales FL-2 y FL-

4. Las muestras fueron adquiridas de modo que excluyeran células muertas y desechos. Los neutrófilos se identificaron por tener FSC y SSC elevadas y se midió la intensidad de la fluorescencia media (MFI) de PE (F-2) y APC (FL-4) de estas células.

5 Los niveles de expresión de CD11b y CD62L (MFI) se describieron como el % de la expresión máxima usando la fórmula:

$$100 \times \frac{\% \text{ de expresión máxima} = [(muestra) - \text{expresión mínima}]/(\text{expresión máxima} - \text{expresión mínima})}{100}$$

10 Nota. La expresión máxima era ausencia de anticuerpo (solo dPBS) + muestra de C5a 100 nM para CD11b y ausencia de anticuerpo (dPBS) + muestra de C5a 0 nM (dPBS) para CD62L (ya que CD62L se reduce sobre los neutrófilos activados).

Los valores de CI_{50} para la neutralización con hAb-Q de los cambios mediados por C5a en la expresión de CD11b y CD62L, se calcularon utilizando el programa informático GraphPad Prism (v4.0). Los datos se ajustaron empleando una regresión no lineal para una ecuación de dosis-respuesta sigmoidea (pendiente variable) para cada experimento, así como el promedio de los dos experimentos.

15 **Resultados**

El efecto del bloqueo de hAb-Q sobre la activación de neutrófilos inducida por C5a se evaluó en un ensayo de sangre completa, usando 2 donantes. En muestras activadas con C5a, la expresión de CD11b aumentaba en ausencia de hAb-Q. Pero este aumento en la expresión de CD11b estaba inhibido si hAb-Q estaba presente, de un modo dosis-respuesta con un valor de CI_{50} de ~10,7 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 22). El anticuerpo de control del isotipo no evitaba la regulación al alza inducida por C5a de la expresión de CD11b, incluso con >100 $\mu\text{g/ml}$ (datos no mostrados).

El anticuerpo humanizado anti-C5aR hAb-Q también evitaba la pérdida inducida por C5a de CD62L de una manera dependiente de la dosis, con un valor de CI_{50} de ~5,4 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 23). El anticuerpo de control del isotipo no evitaba la pérdida inducida por C5a de CD62L incluso con >100 $\mu\text{g/ml}$ (datos no mostrados).

25 B. Anticuerpos humanizados anti-C5aR no activaban los neutrófilos humanos en solución *in vitro*

La capacidad del anticuerpo anti-C5aR humanizado para neutralizar la activación inducida por C5a de los neutrófilos se ha descrito anteriormente. En el siguiente experimento, el anticuerpo anti-C5aR humanizado se incubó con neutrófilos humanos purificados en ausencia de C5a, lo que no cambiaba la expresión de los marcadores de la superficie celular, CD11b y CD62L. Estos experimentos mostraron que el anticuerpo anti-C5aR no activaba las células en solución por sí mismas.

30 **Métodos**

Ensayos de activación de neutrófilos humanos y medición de la expresión de CD11b y CD62L

La sangre completa venosa periférica humana se incubó *ex vivo* con anticuerpos humanizados anti-hC5aR, hAb-Q, hAb-J o hAb-G en una serie de experimentos. La activación de los neutrófilos se midió mediante la determinación de los niveles de expresión de CD11b y CD62L tal y como se describe a continuación. Disminuciones de los niveles de CD62L o aumentos de los niveles de CD11b son marcadores de la activación de los neutrófilos.

Experimento 1

Resumiendo, sangre humana completa heparinizada procedente de un donante sano se añadió a: 1, 10 o 100 $\mu\text{g/ml}$ de hAb-J o hAb-Q, fMLP 10 μM (péptido formil Met-Leu-Phe), o dPBS solamente. Las muestras se incubaron a 37°C en 5 % de CO_2 durante 1 hora antes de la adición de los anticuerpos anti-CD11b-PE y anti-CD62L-APC, con una dilución final de 1/100. Los eritrocitos se retiraron usando tampón de lisis RBC y los leucocitos se resuspendieron en dPBS + 1 % de FCS.

45 El citómetro de flujo FACSCalibur (BD) se ajustó con parámetros de compensación establecidos para los canales FL-2 y FL-4. Las muestras se regularon para excluir las células muertas y los desechos. Los neutrófilos se identificaron por tener FSC y SSC elevadas. La intensidad de la fluorescencia media (MFI) de estas células en los canales de FL-2 (CD11b-PE) y FL-4 (CD62L-APC), se calculó. El nivel de CD11b (PE) y CD62L (APC) se determinó para cada muestra y se describió como el número de veces de la expresión en relación con el control dPBS.

Experimento 2

50 Se añadió sangre heparinizada procedente de 4 voluntarios sanos en tubos que contenían: 0,1, 1, 10 o 100 $\mu\text{g/ml}$ de hAb-G, hAb-J, C5a humana 10 nM o 100 nM o solo dPBS. Después de 20 min a 37°C, se añadió 6 % de dextrano (conc. final 1 %) a cada tubo y se dejó reposar durante 30 min para sedimentar los eritrocitos. La capa superior del plasma rica en leucocitos se transfirió a una placa de 96 pocillos, en donde se lavaron las células en dPBS frío.

Después de la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en dPBS que contenía anti-CD11b-PE (1/50) y anti-CD62L-APC (1/50), después se incubaron sobre hielo durante 30 min. Las células se lavaron y se resuspendieron otra vez en dPBS + 1 % de FCS. Se midieron los niveles de expresión de CD11b y CD62L sobre los neutrófilos como se ha descrito anteriormente.

5 Experimento 3

La sangre procedente de voluntarios humanos sanos (2 donantes) se recogió en tubos que contenían el anticoagulante ácido citrato dextrosa (ACD) y se procesó tal y como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 7A, excepto que no se añadió C5a a las muestras. Los niveles de CD11b y CD62L sobre los neutrófilos se midieron por FACS tal y como se ha descrito en el Ejemplo 7A.

10 Resultados

La expresión de CD11b y CD62L sobre neutrófilos humanos no se alteró en un ensayo con sangre completa con anticuerpos anti-C5aR humanizados.

En el primer experimento, la sangre completa humana se incubó con 1, 10 o 100 µg/ml de hAb-Q o hAb-J, fMLP 10 µM o dPBS durante 1 hora a 37°C y la expresión de CD11b y CD62L se midió por citometría de flujo. No hubo un aumento de la expresión de CD11b o una disminución de la expresión de CD62L en las muestras que contenían hAb-Q o hAb-J a cualquier concentración desde 1 - 100 µg/ml (Figuras 24A y 24B). Por el contrario, el péptido fMLP, que se conoce por activar granulocitos, produjo un gran aumento de la expresión de CD11b y pérdida de CD62L.

En un segundo experimento, la sangre completa humana procedente de 4 donantes, se incubó con 0,1 - 100 µg/ml de anticuerpos humanizados anti-C5aR hAb-G o hAb-J; C5a humana 10-100 nM; o dPBS durante 20 minutos a 37°C. La expresión de CD11b y CD62L en los neutrófilos respecto a la expresión en el control dPBS después del tratamiento, se muestra en las Figuras 25A y 25B, respectivamente. Ni hAb-G ni hAb-J indujeron una regulación al alza de CD11b en los neutrófilos o una pérdida de la expresión de CD62L en ninguna de las muestras analizadas. Por el contrario, C5a 10 nM y 100 nM produjo incrementos de 2,5 y 3,0 veces en la expresión de CD11b en relación con dPBS respectivamente, mientras que la expresión de CD62L disminuyó a 0,33 y 0,14 del nivel en el control dPBS, respectivamente. Al igual que fMLP, C5a es conocida por activar los granulocitos.

En un tercer experimento, se añadió sangre completa procedente de 2 voluntarios sanos a 0,3-300 µg/ml de hAb-Q o un anticuerpo con isotipo de control, a continuación se añadió C5a 100 nM o dPBS a cada muestra. La expresión en los neutrófilos de CD11b y CD62L se midió por citometría de flujo y los resultados se muestran en las Figuras 26a y 26b. El nivel de expresión de CD11b no cambió (aumento) en las muestras que contenían hAb-Q o el anticuerpo con isotipo de control en PBS, lo que indica que no había activación con ninguna concentración de anticuerpo de hasta 300 µg/ml (Figura 26a). Sin embargo, cuando se añadió C5a 100 nM a las muestras que contenían el anticuerpo con isotipo de control, la expresión de CD11b aumentó hasta el nivel máximo medido en una muestra que contenía C5a 100 nM y sin anticuerpo. La expresión de CD62L estaba en su punto máximo (sin activación) en muestras sin C5a. La adición de hAb-Q o el anticuerpo con isotipo de control a concentraciones de hasta 300 µg/ml no redujo el nivel de expresión de CD62L, es decir, no activaba los neutrófilos (Figura 26b). Por el contrario, las muestras que contenían el anticuerpo con isotipo de control y C5a 100 nM perdieron la expresión de CD62L y se activaron al máximo.

En resumen, los resultados muestran que los anticuerpos anti-C5aR humanizados no activan los neutrófilos humanos, tal y como se indica por los niveles de expresión de CD62L y CD11b después de la incubación con sangre completa humana *ex vivo*.

C. hAb-Q no activa los neutrófilos humanos *in vitro* cuando se une a un soporte sólido

El superóxido es una de las especies de oxígeno reactivo producida por neutrófilos activados para combatir agentes patógenos. Sin embargo, el superóxido también puede tener efectos adversos sobre el tejido normal. Se investigó la posibilidad de que el anticuerpo anti-C5aR por sí mismo pudiera estimular la producción de superóxido en neutrófilos. Los experimentos descritos a continuación muestran que el anticuerpo anti-C5aR humanizado hAb-Q no estimula los neutrófilos humanos para producir superóxido, pero es capaz de contrarrestar su producción cuando los neutrófilos humanos son estimulados con C5a.

Métodos

*Medición de la producción de superóxido *in vitro* mediante neutrófilos humanos aislados*

El superóxido (O_2^-) es la primera sustancia que contiene oxígeno producida por la NADPH oxidasa cuando los neutrófilos se activan por mediadores de la inflamación, por ejemplo, C5a. Parte del O_2^- se excreta extracelularmente. El citocromo C (Fe^{3+}), que es impermeable a la membrana, es reducido por el superóxido a citocromo C (Fe^{2+}) que se puede detectar espectrofotométricamente a 550 nm. En el presente estudio, se utilizó una placa de 96 pocillos para determinar la reducción del citocromo C espectrofotométricamente, empleando un Wallac Victor² (Mayo y Cumutte, 1990).

Preparación de los neutrófilos humanos

Los neutrófilos humanos se purificaron tal y como se ha descrito en el Ejemplo 5B anterior. Placas de microtitulación de 96 pocillos se recubrieron durante una noche con fibrinógeno humano (1 mg/ml). A cada pocillo se añadieron 100 μ l de citocromo C (150 μ M) y 200.000 neutrófilos en 50 μ l de RM (mezcla de reacción que consiste en HBSS (nº de Cat. 14175 Gibco) más $MgSO_4$ 0,4 mM, $MgCl_2$ 0,5 mM, $CaCl_2$ 0,5 mM y HEPES 20 mM y pH ajustado a 7,4). La placa se insertó en el Wallac Victor² (Perkin-Elmer) a 37°C y la producción de O_2^- no estimulada, se midió cada min durante un período de 4 min. A continuación, se añadieron anticuerpos en 15 μ l de RM y los pocillos se midieron cada 2 min durante 10 min. Finalmente se añadió C5a y la placa se midió cada 2 min durante 30 min, seguido de mediciones cada 10 min durante 60 min. Los valores medidos después de 1,5 h se utilizaron como resultados. Se utilizaron cuatro pocillos para cada grupo.

Resultados

Los neutrófilos de 2-6 donantes sanos se utilizaron en este estudio. La Figura 27 muestra la producción de superóxido después de 1,5 h de incubación a 37°C. La mezcla de reacción (RM) se utilizó como control (6 donantes). El mediador inflamatorio C5a inducía una fuerte producción de O_2^- (6 donantes), que estaba contrarrestada por el anticuerpo anti-C5aR hAb-Q (5 donantes). En este estudio, se utilizó una alta concentración de anticuerpo para asegurar que cualquier efecto estimulante no fuera pasado por alto. Es evidente que hAb-Q a 1000 μ g/ml (4 donantes), 250 μ g/ml (3 donantes) y 100 μ g/ml (2 donantes), así como un control, anticuerpo IgG₄ irrelevante HzATNP (2 donantes), que es una versión humanizada del anticuerpo murino A-TNP, no tenían efectos estimulantes.

En resumen, los resultados descritos anteriormente muestran que el anticuerpo humanizado antiC5aR hAb-Q no estimulaba los neutrófilos humanos para producir el radical libre O_2^- . Por el contrario, era capaz de contrarrestar la producción inducida por C5a.

Ejemplo 8 - Anticuerpos humanizados anti-C5aR no reducen los glóbulos blancos en un ensayo ex vivo con sangre completa humana

Para determinar si hAb-Q era capaz de destruir o reducir otras células humanas que expresaban C5aR, en particular neutrófilos y monocitos de la sangre, se llevaron a cabo varios ensayos ex vivo de reducción de sangre completa. Los estudios de reducción de sangre completa utilizaban un anticoagulante, lepirudina (Refludan[®]), que no inactiva los mecanismos de destrucción del complemento o mediados por anticuerpos (CDC, ADCC). La lepirudina es un inhibidor directo de la trombina, altamente específico. Es un análogo recombinante del anticoagulante hirudina extraído de la sanguijuela.

Métodos

Extracción de sangre

La sangre venosa periférica se recogió a partir de voluntarios sanos en un tubo de polipropileno de 15 ml estéril que contenía una concentración final de 50 o 500 μ g/ml de lepirudina (Refludan[®], Pharmion Pty Ltd, Melbourne, Australia).

Incubación con anticuerpos

Partes alícuotas (50 μ l) de la sangre anticoagulada se distribuyeron en una placa de 96 pocillos y se incubaron con 25 μ l de anticuerpo diluido en dPBS con una concentración final de 100 μ g/ml, por duplicado, durante 3,5 horas a 37°C en 5 % de CO_2 . Las muestras de control comprendían 50 μ l de sangre más 25 μ l de dPBS. Un cóctel de tinción (25 μ l) que comprendía anti-hCD66b-FITC (1/100 final), anti-hCD19-APC (1/300 final) y anti-hCD14-PE (1/300 final) se añadió a cada muestra y la incubación continuó durante 30 min a 37°C en 5 % de CO_2 . A continuación, se añadieron las perlas de calibración (50 μ l, 980 perlas/ μ l; Flow-Count Fluorospheres; Beckman Coulter, EE.UU. nº de Cat. 7.547.053) a cada muestra. Los eritrocitos se lisaron mediante la adición de 100 μ l de 1x solución de lisis de FACS (10x solución de lisis de FACS; BD Biosciences, nº de Cat. 349202). La muestra completa se transfirió a un tubo de 1,5 ml, y se añadieron 500 μ l adicionales de 1x solución de lisis FACS. Los tubos se centrifugaron a 4000 rpm durante 3 min y se eliminó el sobrenadante. Las células y las perlas se volvieron a suspender en 150 μ l de tampón FACS (dPBS + 1 % de BCS).

Análisis FACS

Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). Se utilizó dispersión frontal y lateral para incluir todas las células pero excluir los desechos. Se establecieron puertas para contar las células positivas (neutrófilos) para CD66b-FITC (FL-1), las células positivas (linfocitos B) para CD19-APC (FL-4) o las células positivas (monocitos) para CD14-PE (FL-2). Se determinó el número de células por 5000 perlas.

El número total de cada tipo celular por mililitro de sangre se calculó de la siguiente manera:

$$N^{\circ} \text{ de células/ml} = n^{\circ} \text{ de células en 5000 perlas} \times (50 \times 980) / 5000 \times 1000 / 50$$

Se calculó el porcentaje de reducción de la siguiente manera:

% de reducción = $100 \times (1 - (\text{n}^\circ \text{ de células/ml de muestra tratada con Ab} / \text{n}^\circ \text{ de células/ml de muestra tratada con PBS}))$

Resultados

5 Se realizaron tres experimentos independientes utilizando sangre venosa periférica completa, procedente de 3 voluntarios sanos diferentes, recogida en tubos estériles que contenían lepirudina. La sangre se incubó con el anticuerpo anti-C5aR humanizado hAb-Q, rituximab (anticuerpo anti-CD20 de control positivo), hIgG4 (anticuerpo con isotipo de control negativo) o PBS (control de tampón, valor inicial para medir el grado de reducción de las células). Al final de la incubación, las células se tiñeron utilizando un cóctel de anticuerpos marcados para CD66b, 10 CD14 y CD19 para identificar granulocitos (neutrófilos: CD66b+ve), monocitos (CD66b-ve, CD14+ve) y linfocitos B (CD19+ve). Para determinar el número absoluto de cada tipo de célula, se añadió a cada muestra un volumen fijo de perlas de calibración con una concentración conocida. Por lo tanto, era posible determinar el número absoluto de neutrófilos (granulocitos), monocitos y linfocitos B en cada muestra (como células/ml), así como la reducción relativa de cada tipo celular después del tratamiento con el anticuerpo, expresada como un porcentaje del número total de 15 células en la muestra incubada con PBS.

Los datos de los 3 experimentos se promediaron y los resultados se presentan en las Figuras 28 y 29. La Figura 28 muestra el número promedio de células (\pm desviación estándar) calculado a partir de los 3 conjuntos de datos. La Figura 29 muestra el porcentaje de reducción promedio de cada tipo celular (\pm de) con respecto al número de células en la muestra tratada con PBS. Los datos muestran que no había reducción de neutrófilos o monocitos después de 4 20 horas de incubación con hAb-Q. Por el contrario, rituximab causaba un ~70 % de reducción de los linfocitos B (que expresan CD20, la diana de rituximab), pero no redujo el número de monocitos o neutrófilos, los tipos celulares que no expresan CD20.

Ejemplo 9 - Anticuerpo humanizado anti-C5aR hAb-Q no destruye las células que expresan C5aR a través de la lisis mediada por el complemento

25 Era deseable desarrollar un anticuerpo humanizado anti-C5aR que no destruyera las células que expresan C5aR (neutrófilos, monocitos, etc.). Los anticuerpos pueden iniciar la destrucción de células que expresan el antígeno diana a través de una serie de mecanismos. hAb-Q se producía como un isotipo IgG4 para evitar/reducir la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC). La destrucción mediada por el complemento se induce cuando los complejos antígeno-anticuerpo se unen a una proteína del complemento, C1q, a través del dominio Fc del anticuerpo, para iniciar la activación de una cascada de eventos proteolíticos que dan como resultado la liberación de C5a y la formación de un complejo de 30 ataque de la membrana que lisa las células diana.

Para demostrar que hAb-Q no inducía la actividad CDC, se llevaron a cabo los siguientes experimentos.

Métodos

35 *Generación del clon Ramos E2 que expresa niveles elevados de C5aR*

Una línea celular de linfocitos B humanos que expresa CD20 (obtenida a partir de linfoma de Burkitt), Ramos, se transfeció de forma estable con un plásmido con expresión de C5aR humano (pcDNA3.1-C5aR; 4 μ g de ADN/ 3×10^6 células) usando el reactivo LipofectaminaTM LTX (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. A las 40 horas de la transfección, se añadió geneticina (sulfato de G418, Gibco) al medio de crecimiento a 2 mg/ml. Las células (no 40 clónicas) se cultivaron en medios selectivos durante aproximadamente 3 semanas, momento en el cual se confirmó la expresión de C5aR y el porcentaje de transfectadas mediante citometría de flujo, utilizando un anticuerpo anti-C5aR. Las células se transfirieron a placas de 384 pocillos con densidad elevada para producir ~30-40 clones positivos/placa. Se seleccionaron colonias clónicas individuales y se transfirieron a una placa de 96 pocillos para la expansión. Después de un crecimiento suficiente, la expresión de C5aR en cada clon se determinó por citometría de 45 flujo, utilizando un anticuerpo anti-C5aR. El clon con mayor expresión, E2, se seleccionó y se expandió. Las células Ramos E2 se mantuvieron en RPMI, 10 % de FCS, 2 mg/ml de G418.

Ensayo CDC con complemento de conejo

Las células diana (células Ramos E2) se incubaron con anticuerpo o medio solo (RPMI + 10 % de BCS termoinactivado) durante 30 min a 37°C en 5 % de CO₂. Después de la incubación, se añadió complemento de 50 conejo (Cedarlane) diluido en RPMI, a las muestras para tener una concentración final de 1 % v/v. Las muestras se incubaron durante otras 2 horas a 37°C en 5 % de CO₂.

El colorante de viabilidad fluorescente, To-Pro-3 (Molecular Probes), se añadió a cada muestra antes de medir las células diana no viables, definidas como To-Pro-3 positivas, mediante citometría de flujo y expresadas como un porcentaje de las células diana totales.

La CDC específica para cada muestra se calculó restando el % promedio de “Solo Dianas” no viables (A) de las “Dianas y Complemento” (B) de las muestras correspondientes. A continuación, la muestra de “Solo Medio” de “Dianas y Complemento” (C) se restó de cada muestra para proporcionar un valor final para la CDC específica:

$$\text{CDC específica (\% de lisis)} = (B - A) - C$$

5 La fórmula anterior también se puede expresar del modo siguiente:

$$\text{CDC específica (\% de lisis)} = (T + CS - T + CMO) - (TOS - TOMO)$$

en donde: T + CS es el % promedio de células no viables en la muestra de Diana + Complemento con anticuerpo

T + CMO es el % promedio de células no viables en solo medio de Diana + Complemento (sin Ab)

TOS es el % promedio de células no viables en la muestra de Solo Diana con anticuerpo

10 TOMO es el % promedio de células no viables en solo medio de Solo Diana (sin Ab)

Ensayo CDC con suero humano

Los ensayos de ADCC que empleaban suero humano se llevaron a cabo como se describe a continuación en el Ejemplo 10. La actividad CDC de un anticuerpo se determinó restando el % promedio no viable de la muestra “Solo Dianas/Solo Medio” (A) de la muestra “Solo Dianas + Anticuerpo” (B) que contenía suero humano. A continuación, el % no viable de la muestra “Solo Dianas + Anticuerpo” (C) menos la muestra “Solo Dianas/Solo Medio” (D) en reacciones de suero bovino termoinactivado se restaba para proporcionar un valor final para la CDC específica:

$$\text{CDC específica (\% de lisis)} = (B - A) - (C - D)$$

Resultados

Ensayos de CDC de hAb-Q utilizando células diana Ramos E2

20 El potencial de hAb-Q para inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) se investigó inicialmente mediante la incubación de neutrófilos humanos con anticuerpo en presencia de complemento de conejo. No había esencialmente ninguna muerte específica (<0,5 % de muerte celular) de los neutrófilos en este ensayo (datos no mostrados).

25 Después del desarrollo de la línea celular Ramos E2 que expresaba niveles elevados de C5aR humano, así como CD20, se volvió a examinar la cuestión de si hAb-Q podría inducir CDC. Se realizaron dos series de experimentos con células Ramos E2 como diana. La primera serie utilizaba 1 % de complemento de conejo, con rituximab que servía como control positivo. La segunda serie comparaba la muerte celular en las muestras incubadas con 10 % de suero humano, con la muerte celular en muestras incubadas con suero bovino termoinactivado.

El anticuerpo hAb-Q no inducía CDC de células Ramos E2 en presencia de 1 % de suero de conejo

30 Se realizaron tres ensayos. El primero implicaba la incubación de los anticuerpos hAb-Q, rituximab (Roche) y el control del isotipo hIgG4 (Sigma) con 10 µg/ml de concentración final, con células Ramos E2 y 1 % de complemento de conejo. El segundo y el tercer ensayo se realizaron con anticuerpos a 100 µg/ml y se incluyó un control positivo adicional, anti-C5aR policlonal de conejo (US Biological).

35 En el primer experimento, el nivel de CDC específica en las muestras incubadas con 10 µg/ml de hAb-Q, rituximab y hIgG4 era del 0 %, 96 % y 0 %, respectivamente. En el segundo y en el tercer experimento la CDC promedio específica después de la incubación con 100 µg/ml de hAb-Q, rituximab y hIgG4 era de 1,5 %, 98 % y 1 %, respectivamente. La incubación de Ramos E2 con 20 µg/ml de anticuerpo policlonal y 1 % de complemento de conejo produjo 82 % de CDC específica (Figura 30). Se ha descrito que rituximab destruye las células que expresan CD20 mediante CDC. Los anticuerpos policlonales son también inductores eficaces de la activación del complemento y CDC. Estos controles positivos mostraron que el ensayo de CDC estaba funcionando y demostraron que el anticuerpo anti-C5aR humanizado hAb-Q no destruía las células mediante CDC.

El anticuerpo hAb-Q no inducía CDC de las células Ramos E2 en presencia de 10 % de suero humano

45 Se realizó una serie de ensayos de ADCC (véase el Ejemplo 10 más abajo) utilizando células efectoras (PBMcs) aisladas a partir de sangre humana para dirigir las células Ramos E2 incubadas con anticuerpos anti-C5aR humanizados o de control. Un conjunto de reacciones de control llevadas a cabo en paralelo, implicaba incubar las células Ramos E2 (“solo diana”) más anticuerpo en presencia de suero bovino termoinactivado o 10 % de suero humano procedente del mismo donante, lo que proporcionó las PBMcs.

50 Se consideró que las reacciones de control que contenían suero humano representaban ensayos de CDC, ya que imitaban el ensayo de CDC descrito anteriormente, excepto que con suero humano en lugar de complemento de conejo. Una diferencia, sin embargo, era que no había muestra de Diana + Anticuerpo incubada sin suero humano.

Por lo tanto, en los ensayos que empleaban suero humano, la CDC específica se calculó restando el "% de células diana no viables" en la muestra de Diana + Anticuerpo incubada con suero bovino termoinactivado, del "% de células diana no viables" en la muestra de Diana + Anticuerpo incubada con suero humano.

5 Se realizaron siete ensayos usando suero humano. Las células Ramos E2 se incubaron con hAb-Q, rituximab o anticuerpo de control del isotipo hlgG4 a 1, 10 o 100 µg/ml en presencia de 10 % de suero bovino termoinactivado o 10 % de suero humano durante 3 horas. Las células Ramos E2 se cargaron con el colorante PKH-26 antes de la incubación y con el colorante de viabilidad ToPro3 después de la incubación, para permitir la distinción entre las células no viables y viables. La CDC específica se calculó como se ha descrito anteriormente con medios solo de ruido de fondo restados de cada muestra en un ensayo. El % promedio de células diana no viables (Ramos E2) para cada tratamiento con suero humano menos muerte no específica observada en las muestras de suero de bovino termoinactivado, se equiparó a CDC específica y los resultados se muestran en la Figura 31.

10 La Figura 31 muestra que en las muestras que contenían hAb-Q había un nivel muy bajo de CDC específica (~1 - 2 %), sin diferencia entre las dosis. El nivel de lisis de Ramos E2 era similar para las muestras de suero bovino termoinactivado y de suero humano que contenía hAb-Q. Se observó un nivel similar de CDC específica (~0 - 4 %) en las muestras incubadas con el anticuerpo de control del isotipo. Es importante destacar que no había una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre las cantidades promedio de lisis observadas en las muestras incubadas con hAb-Q, en comparación con el anticuerpo de isotipo hlgG4. Estos datos sugieren que hAb-Q no media específicamente en la CDC. Por el contrario, la CDC específica en muestras que contenían rituximab era dependiente de la dosis y oscilaba entre el 72 % con 1 µg/ml de rituximab al 91 % con 100 µg/ml de rituximab. El alto nivel de muerte observado con rituximab en presencia de suero humano, indica que el ensayo estaba funcionando y por lo tanto se concluye que hAb-Q no media en la CDC. Si hAb-Q mediara en la CDC, se podría esperar un nivel similar de muerte con rituximab, dado que los clones de Ramos E2 expresan niveles elevados similares de CD20 y hC5aR.

25 **Ejemplo 10 - La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo inducida por anticuerpos humanizados antiC5aR depende del isotipo de la cadena pesada**

30 Era deseable desarrollar un anticuerpo humanizado anti-C5aR que no destruyera las células que expresan C5aR (neutrófilos, monocitos, etc.). Los anticuerpos pueden iniciar la destrucción de células que expresan el antígeno diana por una serie de mecanismos. Algunos anticuerpos humanizados antiC5aR (por ejemplo hAb-Q, hAb-J, hAb-G) se produjeron con isotipo IgG₄ para evitar/reducir la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC). Otros anticuerpos humanizados anti-C5aR (por ejemplo, hAb-N, hAb-O) se produjeron con isotipo IgG1 que se sabe que se une a C1q y FcγR y, por lo tanto, es más probable que induzcan CDC y ADCC. La ADCC está mediada cuando el dominio Fc de un anticuerpo unido a un antígeno - por ejemplo, un receptor en una "célula diana" - se entrelaza con receptores de Fc sobre células con potencial citotóxico ("células efectoras"), incluyendo las células T citolíticas (NK), macrófagos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos.

35 Para determinar el nivel de actividad ADCC inducida por anticuerpos anti-C5aR humanizados *in vitro*, se llevaron a cabo los siguientes experimentos.

Métodos

Protocolo del ensayo de ADCC

40 Resumiendo, el componente de la célula efectora se preparó mediante el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) procedentes de un donante sano, utilizando separación en gradiente de densidad con Ficoll o Percoll (GE Healthcare). Los monocitos se redujeron de la población de PBMCs mediante la adhesión a un matraz (1 hora, 37°C, 5 % de CO₂) en donde el resto, las células no adherentes (que contenían células NK) se incubaron durante una noche en medios que contenían 100 ng/ml de IL-2 humana recombinante (Peprotech) a 37°C en 5 % de CO₂. Al día siguiente, las células diana (células Ramos E2 que expresaban hC5aR - véase más arriba) se tiñeron con el colorante fluorescente de la membrana celular, PKH26 (Sigma), y 5x10⁴ células/muestra se incubaron con anticuerpo o medio solo durante 30 min a 37°C en 5 % de CO₂. Después de la incubación, las células efectoras en una proporción de 50:1 o solo medio, se añadieron a las células diana y las muestras se incubaron durante otras 3 horas a 37°C en 5 % de CO₂. El colorante fluorescente de viabilidad, To-Pro-3 (Molecular Probes), se añadió a cada muestra antes de que las células diana no viables, definidas como To-Pro-3 positivas, se midieran por citometría de flujo y se expresó como un porcentaje del total de células diana (células positivas PKH-26). El medio contenía o bien 10 % de suero humano del mismo donante a partir del cual se habían aislado las células "efectoras" PBMC, o 10 % de suero bovino termoinactivado.

55 La ADCC específica para cada muestra se calculó restando el % promedio no viable de "Dianas Solo" (A) de "Dianas y Efectores" (B) de las muestras correspondientes. A continuación, la muestra de "Medio Solo" de "Dianas y Efectores" (C) se restó de cada muestra para proporcionar un valor final para la ADCC específica:

$$\text{ADCC específica (\% de lisis)} = (B - A) - C$$

La fórmula anterior también se puede expresar de la siguiente manera:

$$\text{ADCC específica (\% de lisis)} = (T + ES - T + EMO) - (TOS - TOMO)$$

en donde: T + ES es el % promedio de células no viables en la muestra de Diana + Efector con anticuerpo

T + EMO es el % promedio de células no viables en medio solo de Diana + Efector (sin Ab)

5 TOS es el % promedio de células no viables en la muestra de Solo Diana con anticuerpo

TOMO es el % promedio de células no viables en medio solo de Solo Diana (sin Ab)

Resultados

10 El potencial del anticuerpo anti-C5aR humanizado hAb-Q para inducir la muerte celular a través de mecanismos de ADCC se examinó en una serie de ensayos que utilizaban células Ramos E2 como diana. Las células Ramos E2 expresan CD20 y C5aR lo que permite que rituximab, que se dirige a CD20 y destruye mediante ADCC, se utilice como un control positivo. La expresión de C5aR sobre Ramos E2 era ~7 veces mayor que sobre los neutrófilos humanos. Se ha informado de que el nivel de receptor diana expresado en la superficie celular puede influir en el grado de ADCC y CDC inducida por un anticuerpo (Preithener et al., 2006; van Meerten et al., 2006; Lowenstein et al., 2006).

15 Las células efectoras eran PBMCs humanas purificadas a partir de sangre venosa de voluntarios sanos, después se redujeron los monocitos y se incubaron durante una noche con IL-2 para estimular ("cebar") las células NK. Se consideró que este paso era necesario para maximizar la citotoxicidad de los efectores.

20 Las células diana se marcaron con el colorante PKH-26 de modo que se pudieran distinguir de las células efectoras durante la citometría de flujo. Para cada muestra de diana + anticuerpo, se dispusieron 2 tubos (cada uno por duplicado). Uno contenía células diana además de medio, el otro contenía efectores más dianas en una proporción de 50:1. La relación óptima de efector:diana de 50:1 se observó durante el desarrollo de un ensayo para producir la máxima destrucción. La viabilidad se midió añadiendo el colorante To-Pro-3 (TP3) a las muestras después de todas las etapas de incubación y el análisis por citometría de flujo. La reducción de las células diana era el número de células diana no viables (TP3+ve/PKH+ve) como un porcentaje del total de células diana (PKH+ve) después de restar el ruido de fondo (muestra sin anticuerpo).

Comparación de la actividad ADCC inducida por hAb-Q y hAb-N utilizando células Ramos E2 como células diana

30 En la primera serie de experimentos, el potencial de anticuerpos anti-C5aR humanizados hAb-Q (isotipo hlgG4 de la cadena pesada) y hAb-N (hlgG1) para inducir ADCC de las células Ramos E2, se comparó con la ADCC inducida por rituximab (hlgG1) y un anticuerpo para el control del isotipo (hlgG4). IgG1 humana tiene mayor afinidad hacia FcγR que hlgG4 y se espera que induzca ADCC de forma más eficaz.

35 Las células diana se incubaron con 100 µg/ml de hAb-Q, hAb-N, rituximab (Roche), anticuerpo hlgG4 (Sigma) o medios (RPMI) solo en presencia de 10 % de suero bovino fetal termoinactivado (FCS). Después de 30 min, o bien IL-2 estimulaba las PBMCs (en una proporción de 50:1 (E:T)) o se añadió solo medio a las células diana y la incubación continuó durante 3 horas. El número de células no viables, medido por citometría de flujo, era indicativo de la actividad ADCC. El ruido de fondo de solo el Medio y de solo Diana se restaron de cada muestra para determinar la actividad ADCC específica. Se realizaron tres experimentos idénticos. Los resultados (datos combinados de tres experimentos ± de) se muestran en la Figura 32.

40 Los anticuerpos IgG1, rituximab y hAb-N anti-C5aR eran eficaces en la mediación de una muerte de alto nivel (> 65 %) de las células Ramos E2. Por el contrario, el nivel de ADCC específica mediada por hAb-Q (lgG4) y el isotipo de control hlgG4 era significativamente menor, con solo 23 % de células Ramos E2 no viables después de la incubación con PBMCs y hAb-Q. No hubo muerte de las células Ramos E2 incubadas con el anticuerpo de control del isotipo. Estos resultados sugieren que el isotipo del anticuerpo es un determinante importante de la actividad ADCC y que se preferirían los anticuerpos anti-C5aR humanizados con isotipo hlgG4 para el tratamiento *in vivo* si no se desea una muerte celular dependiente de anticuerpo.

45 Comparación del efecto del suero sobre la actividad ADCC mediada por hAb-Q con células Ramos E2 como diana

50 Se llevó a cabo otra serie de ensayos de ADCC como anteriormente, con un conjunto de muestras incubadas en medio que contenía 10 % de suero humano aislado a partir del donante de las células efectoras PBMCs, y el conjunto duplicado de las muestras que contenían 10 % de suero bovino termoinactivado. La inactivación térmica del suero se diseñó para destruir la actividad del complemento. Por lo tanto se esperaba que la actividad CDC se pudiera observar en muestras incubadas con suero humano. El nivel de CDC se determinó a partir de las muestras de "solo diana". De hecho, en las muestras de "solo diana" que contenían rituximab, el número de células no viables (TP3+ve) era generalmente >90 %. Por lo tanto, la actividad ADCC específica inducida por rituximab en muestras que contenían suero humano, no se pudo determinar. Sin embargo, en las muestras paralelas que contenían 10 % de suero bovino termoinactivado, más 100 µg/ml de rituximab, un promedio de 60 % de células diana (Ramos E2)

fueron destruidas específicamente por las células efectoras. Esto era similar a los resultados presentados en la Figura 32 e indicaba que las células efectoras y el ensayo ADCC estaban funcionando.

Además, tal y como se muestra arriba en la Figura 31, los anticuerpos humanizados anti-C5aR (hAb-Q) y de control del isotipo hIgG4 no inducían la actividad CDC en este ensayo. Por lo tanto la ADCC específica debida a hAb-Q y al anticuerpo de control del isotipo se pudo calcular, como se ha descrito anteriormente, para las muestras que contenían suero humano. Los resultados se muestran en la Figura 33. Ni hAb-Q, ni el control del isotipo, a ninguna concentración de 1 - 100 µg/ml, causaban una muerte celular significativa mediante ADCC. Para hAb-Q, este resultado contrasta con la actividad ADCC observada en muestras que contenían suero bovino termoinactivado (Figura 32).

10 **Ejemplo 11- Estudios en ratón**

La línea de ratón transgénico KRN contiene un receptor de linfocitos T que reconoce el autoantígeno glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI) en un fondo C57BL/6. Cuando estos ratones se cruzan con ratones NOD, la descendencia F1 positiva para el transgén (K/BxN) desarrolla espontáneamente una enfermedad similar a autoinmune, mediada por anticuerpos circulantes contra GPI (Kouskoff et al., 1996). El suero procedente de ratones artríticos K/BxN se puede transferir a otras cepas en donde complejos inmunes autoantigénicos activan la vía alternativa del complemento, seguido por una activación de células mediada por C5aR y RIII de Fc gamma y la producción de citocinas inflamatorias (Ji et al., 2002). Los neutrófilos, los mastocitos y los macrófagos tienen un papel importante en el desarrollo de la patología en este modelo (Wipke y Allen, 2001; Lee et al., 2002; Solomon et al., 2005). El fenotipo inflamatorio observado caracteriza muchas de las características de la artritis reumatoide humana, además de ser una enfermedad progresiva crónica con destrucción de las articulaciones (Kyburz y Corr, 2003).

A. Anticuerpos humanizados contra C5aR revierten la inflamación en un modelo en ratón de artritis inflamatoria

Métodos

Animales

25 Ratones transgénicos con inserción de secuencias génicas de C5aR humano en un fondo C57BL/6 (Lee et al., 2006) de edad ~6-12 semanas, se obtuvieron a partir de la colonia de cría en el Instituto Garvan de Sidney. Se preferían los ratones machos para los experimentos, aunque también se utilizaron ratones hembra.

Preparación de suero K/BxN

30 Para producir suero para los experimentos, ratones machos KRN se cruzaron con hembras NOD. La descendencia F1 que era portadora del transgén KRN que desarrollaba articulaciones inflamadas, se sacrificó y la sangre se recogió por punción cardiaca. El suero se aisló después de 2 horas de incubación a 37°C y centrifugación durante 10 min a 4000 rpm. El suero de múltiples ratones se agrupó, se dividió en partes alícuotas y se almacenó a -80°C.

Inducción y medición de la artritis experimental

35 La artritis experimental se indujo en ratones receptores mediante la inyección de 100 - 150 µl de suero por vía i.p. los días 0 y 2. El progreso de la enfermedad se controló diariamente mediante la medición de cambios en el espesor del tobillo usando calibradores y la determinación de las puntuaciones clínicas. El espesor del tobillo se determinó diariamente promediando dos lecturas de cada una de las patas traseras. La puntuación clínica se calculó para cada ratón sumando las puntuaciones de las cuatro patas: 0, articulación normal; 1, hinchazón leve/moderada del tobillo y/o un dedo hinchado; 2, tobillo hinchado o hinchazón en dos o más dedos; 3, hinchazón grave a lo largo de todos los aspectos de la pata o los cinco dedos hinchados. El investigador que realizaba el seguimiento de los ratones no conocía el tratamiento que había recibido cada ratón.

Tratamientos

Anticuerpos anti-C5aR purificados o de control del isotipo (1-10 mg/kg en PBS) fueron inyectados i.p. el día 5 (régimen de tratamiento terapéutico). En algunos experimentos, el grupo de control recibió PBS en lugar de un anticuerpo de control del isotipo.

45 *Análisis estadístico*

La significación estadística de las diferencias entre los grupos independientes de control y de tratamiento en el modelo K/BxN, se determinó mediante la prueba de Mann-Whitney o el uso de la prueba de Kruskal-Wallis y un análisis a posteriori realizado con la prueba de comparación múltiple de Dunn.

Resultados

50 La capacidad de los anticuerpos humanizados 7F3 para revertir la inflamación establecida en el modelo K/BxN fue investigada y los resultados se presentan a continuación. La Tabla 8 muestra los anticuerpos sometidos a ensayo en este modelo, y las dosis administradas. Todos los anticuerpos se administraron mediante inyección i.p.

"terapéuticamente" el día 5 después de que la artritis había sido inducida por la inyección de suero K/BxN.

Tabla 8: Anticuerpos sometidos a ensayo y dosis administradas.

Anticuerpo	Dosis analizada	Tamaño del grupo	Número de resultados
G	10 mg/kg	6	34
M	10 mg/kg	6	34
N	10 mg/kg	6	34
J	1 mg/kg	4	35
J	3 mg/kg	5	35
J	10 mg/kg	5	35
C	3 mg/kg	5	35
C	10 mg/kg	4	35

5 Los resultados presentados en las Figuras 34 y 35 muestran que los anticuerpos humanizados eran eficaces para revertir los signos clínicos de inflamación cuando se administraban i.p. a 10 mg/kg el día 5, después de la inducción de la artritis inflamatoria. Las dosis más bajas de anticuerpos J y C eran menos eficaces que la dosis de 10 mg/kg, pero eran capaces en la mayoría de los casos de evitar cualquier aumento posterior de la inflamación, como se observó en los grupos de control (ratones que recibieron PBS o una IgG4 humana - un anticuerpo de control del isotipo contra un antígeno humano irrelevante).

10 B. Anticuerpos humanizados anti-C5aR reducen los signos y los síntomas de inflamación articular en un modelo de ratón de artritis reumatoide: relación entre la dosis de anticuerpo, la concentración de anticuerpo sérico, la ocupación de receptores y la eficacia

15 La artritis experimental fue inducida en ratones antes de la administración terapéutica de anticuerpo anti-C5aR humanizado. Se investigó la relación entre la dosis de anticuerpo, la concentración de anticuerpo en el suero, el nivel de ocupación de C5aR por el anticuerpo y el efecto sobre la inflamación articular en los ratones.

Métodos

Animales

20 Ratones machos y hembras transgénicos con inserción de secuencias génicas de C5aR humano sobre un fondo C57BL/6 (Lee et al., 2006) con edades comprendidas entre 8 a 16 (promedio ~12) semanas, se obtuvieron a partir de colonias de cría en el Instituto Garvan, Sídney o en el Centro de Recursos Animales, Perth.

Preparación del suero K/BxN

Todos los ratones en este estudio fueron inyectados con el mismo lote de suero K/BxN, preparado como se ha descrito anteriormente.

Marcado de hAb-Q con FITC

25 El isotiocianato de fluoresceína (FITC) se conjugó covalentemente con el anticuerpo hAb-Q del modo siguiente. Brevemente, ~1,5 mg de hAb-Q se intercambiaron en el "Tampón de Reacción" (Na₂CO₃ 160 mM, NaHCO₃ 340 mM, pH 9,5) y se añadieron a 120 µg de FITC (Molecular Probes) disuelto en DMSO, por mg de anticuerpo. La reacción se realizó en la oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente (23°C). El FITC sin conjugar se eliminó usando una columna PD-10, pre-equilibrada y eluida con "Tampón de Almacenamiento" (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 8,2).
30 hAb-Q-FITC conjugado se concentró hasta alcanzar una concentración final de 1,036 mg/ml usando un filtro giratorio de Centricon (YM-30) y se almacenó a 4°C en la oscuridad.

Inducción y medición de la artritis experimental

35 La artritis experimental se indujo en ratones receptores mediante la inyección de 150 µl de suero K/BxN por vía i.p. el día 0 y el día 2, como se ha descrito anteriormente. El día 5, se calculó una "Puntuación de AR" para cada ratón, multiplicando la puntuación clínica por el cambio en el tamaño de la pata desde el día 0 (en mm). Solamente los ratones que tenían una puntuación de AR >0,5 se introdujeron en la fase de tratamiento del estudio. La artritis inflamatoria se desarrolló en el ~90 % de los ratones machos y el 50 % de los ratones hembra.

Diseño del estudio - Información general y tamaño de los grupos

Este estudio fue diseñado para medir la inflamación, la ocupación de receptores *in vivo* y la concentración de anticuerpo en suero en el modelo de enfermedad K/BxN, en diversos momentos, antes y después de que hubiera comenzado el tratamiento con el anticuerpo anti-C5aR. El curso de la enfermedad en este modelo se resuelve generalmente al cabo de ~3 semanas. Los signos y los síntomas de la inflamación son evidentes al cabo de un día o dos de la inmunización con el suero de ratones K/BxN. La inflamación alcanza un máximo al cabo de 10-14 días y disminuye lentamente a partir de entonces.

En vista de estas circunstancias, se adoptó la siguiente pauta para el análisis:

- **Inflamación:** el tamaño de la pata y la puntuación clínica se midieron el día 0 (antes de la primera inyección de suero), d2 (antes de la segunda inyección de suero), 5 (antes de comenzar el tratamiento), a continuación d6, d7, d8, d9, d10, d11, d12, d14 y d16. La inflamación se determinó en al menos 10 ratones por grupo.

- **Concentración de anticuerpo en suero:** se tomaron muestras de sangre el día 5 (30 min y 12 horas después del tratamiento), d6 (24 horas después del tratamiento), d7 (48 h), d8 (72 h), d9 (96 h), d10 (120 h), d11 (144 h), d12 (168 h), d14 (192 h) y d16 (264 h). El suero se preparó a partir de sangre recogida por punción cardiaca los días 5,5 (12 horas después del tratamiento), 6, 8, 10, 12 y 16 y de extraer sangre de la vena de la cola el día 5 (30 min después del tratamiento) y los días 7, 9, 11 y 14. Grupos de 2-4 ratones proporcionaban sangre en cada momento para cada tratamiento, pero no se extrajo sangre más de 3 veces de cada ratón. Se recogieron aproximadamente 100 µl de sangre en tubos de 1,5 ml (sin anticoagulante) y se incubaron a 37°C durante 30 min para promover la coagulación, seguido de centrifugación a 13.000 rpm durante 10 min. El suero se distribuyó en tubos de nuevo aporte (2 por muestra de ratón) y se almacenó a -80°C antes de determinar la concentración de anticuerpo usando un ELISA.

- **Saturación del receptor:** los ratones (n = 4 por grupo) se sacrificaron el día 5,5 (12 horas después del tratamiento), 6, 8, 10, 12 y 16 y la sangre se recogió por punción cardiaca. Los leucocitos se tiñeron con hAb-Q marcado con FITC para determinar la cantidad de receptor de C5a libre o con IgG anti-humana marcada con FITC para determinar la cantidad de hAb-Q unido en comparación con los controles de PBS. Las células se tiñeron también con CD11b y Ly6G para distinguir los neutrófilos y los monocitos. Véase más abajo para más detalles.

Tratamientos

Los ratones seleccionados para entrar en el estudio fueron divididos aleatoriamente en 5 grupos para recibir uno de los 5 tratamientos el día 5:

1. PBS i.p.
2. anticuerpo de control hulgG i.p. @ 8 mg/kg
3. hAb-Q i.p. @ 1 mg/kg
4. hAb-Q i.p. @ 3 mg/kg
5. hAb-Q i.p. @ 10 mg/kg

El anticuerpo se disolvió en PBS de manera que el volumen total inyectado era de ~100 µl por ratón. El investigador que realizaba el seguimiento de los ratones no conocía el tratamiento que recibió cada ratón. Los grupos de tratamiento no fueron revelados hasta después de la recogida y el análisis de los datos, excepto que los animales que recibieron PBS fueron identificados para estudios de ocupación del receptor.

Grupo 1 (control de PBS) no fue tratado con el anticuerpo, se utilizó para establecer un valor inicial para la saturación del receptor, la activación y el análisis de PK. El Grupo 2 era el grupo de control negativo tratado con un anticuerpo IgG humano irrelevante. Los Grupos 3 - 5 recibieron el tratamiento anti-C5aR.

Análisis estadístico

La significación estadística de las diferencias entre los grupos de control y de tratamiento independientes se determinó como se ha descrito anteriormente.

Medición de hAb-Q unido

Las placas se prepararon para contener hAb-Q (200 µg/ml, [final]) o dPBS para cada muestra de la prueba. Se añadieron 25 µl de sangre heparinizada de cada ratón a los pocillos que contenían hAb-Q y dPBS que se incubaron durante 1,5 h a 37°C. Las células se lavaron 3 veces con dPBS para eliminar el hAb-Q no unido y se resuspendieron en dPBS que contenía anticuerpo anti-hIgG-FITC (1/50), anti-Ly-6G-PE y anti-CD11b-PerCP/Cy5.5 (1/400) durante 45 min a temperatura ambiente. Los eritrocitos se eliminaron con la adición de solución de lisis BD FACS (BD, 349202). La placa de la muestra se centrifugó a 2000 rpm durante 3 min, el sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron de nuevo en solución de lisis BD FACS para el análisis por citometría de flujo (BD FACSCanto).

Medición de receptor "exento" de C5a

Las placas se prepararon para contener hAb-Q (200 µg/ml, [final]), para un mínimo de C5aR libre o dPBS (para un máximo de C5aR libre y todas las muestras de la prueba). Se añadieron 25 µl de sangre heparinizada de cada ratón al pocillo correspondiente (es decir, ratones inyectados con dPBS solamente se añadieron a ambos pocillos que contenían +hAb-Q y dPBS (para el C5aR mín. y máx. libre)). Se añadieron todas las demás muestras de sangre de la prueba a los pocillos que contenían solamente dPBS y se incubaron durante 1,5 horas a 37°C. Las células se lavaron 3 veces con dPBS para eliminar el exceso de hAb-Q y se resuspendieron en dPBS que contenía hAb-Q-FITC a 25 µg/ml, anticuerpos anti-Ly-6G-PE y anti-CD11b-PerCP/Cy5.5 (1/400) durante 45 minutos a 37°C. Los eritrocitos se eliminaron con la adición de solución de lisis BD FACS (BD, 349202). La placa de la muestra se centrifugó a 2.000 rpm durante 3 min, el sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron de nuevo en solución de lisis BD FACS para el análisis por citometría de flujo (BD FACSCanto).

Análisis por citometría de flujo de la saturación del receptor de C5a de neutrófilos

El citómetro de flujo BD FACSCanto se configuró con parámetros de compensación establecidos para los canales FL-1, FL-2 y FL-3. Las muestras fueron adquiridas para excluir las células muertas y los desechos. Los neutrófilos fueron identificados como Ly-6G-PE alto, CD11b-PerCP/Cy5.5 bajo-alto. Los monocitos se identificaron como Ly-6G-PE negativo, CD11b-PerCP/Cy5.5 alto. El nivel de hAb-Q unido (α -IgG-FITC) y de C5aR libre (hAb-Q-FITC) se determinó midiendo la intensidad de la fluorescencia media (MFI) con FITC (FL-1) para cada muestra.

El porcentaje de unión a hAb-Q se cuantificó mediante la determinación de la MFI de cada muestra, incubada en dPBS, como un porcentaje de la MFI para la misma muestra incubada con 200 µg/ml de hAb-Q (después de restar el ruido de fondo calculado a partir de las muestras de ratones tratadas con PBS incubadas con PBS, después FITC-anti-hlgG), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\frac{[[MFI (\text{muestra+dPBS}) - MFI (\text{fondo, es decir, ratón control con PBS+dPBS})] / [MFI \text{ máx. (muestra+ hAb-Q frío) - MFI (fondo)}]] \times 100}$$

El porcentaje de receptor de C5a libre se cuantificó mediante la determinación de la MFI de cada muestra, incubada en dPBS, como un porcentaje de las muestras con un máximo de receptor libre, es decir, ratones a los que se administró solamente dPBS. C5aR con un mínimo libre, es decir, las muestras incubadas *ex vivo* con un exceso de hAb-Q, no se utilizaron en este cálculo, pero se utilizaron para fines comparativos.

Medición de la concentración de anticuerpos séricos

Las concentraciones séricas de hAb-Q se analizaron conforme a GLP, utilizando un método ELISA validado para detectar hAb-Q en suero de ratón. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) era de 4 ng/ml. Para el estudio de desaparición *in vitro*, el ensayo de ratón era capaz de detectar hAb-Q en plasma humano con EDTA. LLOQ era de 10 ng/ml, cuando el ensayo se aplicó al plasma.

Resultados

Se inmunizaron dos veces unos 200 ratones hC5aR KO/KI, con 2 días de diferencia (día 0 y 2) con suero procedente de ratones K/BxN, con el fin de inducir una artritis inflamatoria que se manifiesta como una hinchazón de las articulaciones y los dedos en las patas de los ratones receptores. Hacia el día 5, aproximadamente el 70 % de los ratones (~85 % de machos y ~60 % de hembras) había desarrollado cierta hinchazón y enrojecimiento de las patas y articulaciones. Los ratones con una "puntuación de AR" >0,5 se ordenaron al azar en 5 grupos de tratamiento con 11 - 12 ratones por grupo. A cada grupo se administró uno de los 5 tratamientos - hAb-Q en PBS con dosis de 1, 3 y 10 mg/kg, un anticuerpo de control (IgG humana para un antígeno irrelevante) en PBS con una dosis de 8 mg/kg y solo PBS. Los siguientes 11 días, los ratones fueron controlados regularmente asignando una puntuación clínica y midiendo el tamaño de la pata (espesor del tobillo). Las muestras de sangre se recogieron de la vena de la cola o por punción cardíaca los días 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 y 16 para determinar la ocupación del receptor y la concentración sérica de anticuerpo.

El anticuerpo humanizado anti-C5aR invierte la inflamación en el modelo K/BxN de artritis inflamatoria en una forma dependiente de la dosis

La puntuación clínica promedio y el cambio en el tamaño de la pata desde el día 0 para cada grupo de tratamiento se muestra en la Figura 36. Los datos muestran que hAb-Q era eficaz *in vivo* para reducir los signos y los síntomas de la inflamación. Se observó una relación dosis-respuesta, siendo la dosis de 10 mg/kg claramente más eficaz que las dosis de 3 y 1 mg/kg. En comparación con los 2 grupos de control, 10 mg/kg de hAb-Q reducía y controlaba la inflamación y la puntuación clínica durante una semana después de la administración, 3 mg/kg de hAb-Q impedía cualquier nuevo aumento de la inflamación durante unos 5 días, pero no era capaz de reducir la inflamación existente y 1 mg/kg de hAb-Q no era eficaz. En el transcurso de los últimos 3 - 5 días, había una tendencia al alza en las puntuaciones de la inflamación de los grupos de 10 mg/kg y de 3 mg/kg. Solo se proporcionó una dosis única de hAb-Q el día 5. Tal y como se muestra a continuación, la reducción o la nivelación (sin aumento adicional) de la inflamación estaba correlacionada con una saturación elevada de los receptores y una concentración de anticuerpo

en el suero. A medida que estas disminuyeron, la inflamación revertió.

El nivel y el grado de ocupación de los receptores de C5a con el anticuerpo humanizado anti-C5aR depende de la dosis

5 La ocupación de receptores se midió de dos maneras diferentes. Los leucocitos se tiñeron con hAb-Q-FITC para determinar la cantidad de receptor "libre", o con anti-hlgG-FITC para determinar la cantidad de hAb-Q unido *in vivo* (receptor "ocupado") y se tiñeron con CD11b y Ly6G para distinguir los neutrófilos y los monocitos. Debe haber una relación inversa entre la cantidad de anticuerpo unido a C5aR en los neutrófilos y la cantidad de receptor libre (vacío). En el cálculo de anticuerpo unido, la variación de ratón a ratón en el número de receptores se corrigió. Esto no se hizo cuando se determinaron los receptores libres. Los resultados se muestran en las Figuras 37 y 38.

10 La Figura 37 muestra la relación entre la dosis de anticuerpo administrada y el anticuerpo anti-C5aR unido en los neutrófilos. Con la dosis más alta, 10 mg/kg, el anticuerpo unido se mantuvo a niveles de saturación hasta ~120 horas después de la administración (día 10) y luego se redujo a ~20 % de la ocupación a las 264 h (día 16). Con 3 mg/kg, el anticuerpo unido estaba a niveles de saturación durante ~24 horas, a continuación se redujo a un 50 % a las 72 horas y 15 % a las 120 horas. La dosis de 1 mg/kg no era suficiente para producir una saturación de la unión del anticuerpo, con una ocupación del receptor de solo el 75 % 24 horas después de la dosificación. A las 72 horas no había prácticamente ningún hAb-Q unido a los neutrófilos. Se observaron resultados similares en los monocitos (no mostrados).

15 La Figura 38 muestra que el nivel de receptor "libre" estaba inversamente relacionado con el porcentaje de receptores "ocupados" (anticuerpo unido mostrado en la Figura 37). Había muy poco receptor libre sobre los neutrófilos en los ratones tratados con 10 mg/kg de hAb-Q hasta una semana después de la dosificación. En el grupo de 3 mg/kg, había pocos receptores libres después de 72 horas, y en el grupo de 1 mg/kg el receptor libre aumentó drásticamente 24 horas después de la dosificación. Se observaron resultados similares para los monocitos (no mostrados).

El nivel y el grado de concentración de anticuerpo humanizado anti-C5aR en suero dependen de la dosis

25 La concentración de anticuerpo anti-C5aR humanizado en el suero de animales se determinó a intervalos de entre 30 min y 11 días, después de la administración. Los resultados se muestran en la Figura 39. Después de la administración, la concentración de hAb-Q en el suero aumentó rápidamente. A la concentración máxima medida se llegó entre 30 minutos y 12 horas después de la administración y era dependiente de la dosis. Después de la administración de 1 mg/kg, la concentración de anticuerpo en suero alcanzó un máximo de 1,9 µg/ml después de 30 min, se mantuvo por encima de 1,5 µg/ml durante 12 horas y luego cayó a <0,1 µg/ml el día 7 (48 horas después de la administración). La concentración máxima de anticuerpos séricos en el grupo de 3 mg/kg era de 13,3 µg/ml 12 horas después de la administración. Los niveles de anticuerpo se mantuvieron elevados (>5 µg/ml) durante 2 días y luego cayeron rápidamente a <0,1 µg/ml el día 9 (96 horas después de la administración). La concentración de anticuerpo en suero en el grupo de 10 mg/kg alcanzó un máximo de 69,5 µg/ml, 12 horas después de la administración y disminuyó gradualmente durante los próximos 7 días a 5,5 µg/ml, y luego a <0,1 µg/ml el día 14.

La reducción o la estabilización de la inflamación se correlaciona con una ocupación elevada de los receptores y una concentración elevada de anticuerpos en suero

40 Los datos de las Figuras 36a (puntuación clínica), 37 (% de hC5aR ocupado por hAb-Q) y 39 (concentración de hAb-Q en suero) anteriores se han combinado en las Figuras 40, 41 y 42 para mostrar la relación entre la dosis de anticuerpo, la ocupación del receptor y la concentración de anticuerpo en suero.

45 Cuando la artritis experimental se induce en los ratones mediante una inyección de suero K/BxN, hay un aumento en la hinchazón y el enrojecimiento de la articulación y la pata, lo que se cuantifica (expresado como una puntuación clínica) utilizando un "índice de artritis" como se ha descrito anteriormente. Cuando se administraba anticuerpo anti-C5aR humanizado hAb-Q "terapéuticamente", es decir, el día 5 después de que se desarrollara la inflamación en ratones que recibieron suero K/BxN los días 0 y 2, se produjo una reducción sostenida de la gravedad de la inflamación en el grupo de ratones que recibieron la dosis más alta (10 mg/kg). La Figura 40 muestra que el nivel de inflamación (puntuación clínica) en este grupo disminuía entre los días 5 y 12, al mismo tiempo que la ocupación de los receptores era alta (>40 %) y de que se midieran niveles elevados de hAb-Q (>5 µg/ml) en el suero. Los ratones a los que se administraron 3 mg/kg de hAb-Q, registraron un ligero descenso de la inflamación en los siguientes 3 días, antes de comenzar con una tendencia al alza de nuevo, los siguientes 4 días. La Figura 41 muestra que la concentración de anticuerpo en suero era al mismo tiempo >5 µg/ml y la ocupación de receptores era ≥50 % en los ratones que recibieron 3 mg/kg de hAb-Q. Después del día 8, la concentración de anticuerpos en suero y la ocupación de receptores disminuyeron rápidamente, lo que se correspondía con el periodo en el que la inflamación comenzaba a tener una tendencia hacia arriba de nuevo. Cuando se administró a los ratones 1 mg/kg de hAb-Q, la dosis más baja era una pausa de aproximadamente 1 día en el nivel de inflamación cada vez mayor, como se evidenciaba por la puntuación clínica (Figura 42). Al mismo tiempo, los niveles de anticuerpo en suero fueron disminuyendo rápidamente, desde un máximo de 1,8 µg/ml, inmediatamente después de la inyección, y 1,5 µg/ml a las 12 horas. La ocupación de C5aR permaneció >50 % durante solo 1 día antes de disminuir rápidamente.

En conjunto, estos datos apoyan la propuesta de que la ocupación elevada de receptores depende de una concentración elevada de Ab en el suero y que la reducción de leucocitos en las articulaciones, tal y como se observa en las secciones histológicas y tal como se mide por la reducción en el tamaño de la pata y la puntuación clínica, depende de los altos niveles de ocupación del receptor (receptor "libre" bajo). Sin receptor libre, C5a no se puede unir a C5aR para causar una activación y migración de los leucocitos desde la sangre a los sitios de inflamación y la activación del complemento en los tejidos.

C. Relación entre PK/PD de hAb-Q en el modelo de ratón K/BxN

En este ejemplo, proporcionamos un modelo farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) válido que describe la relación cuantitativa entre la farmacocinética de un mAb anti-C5aR, la ocupación del receptor diana y el efecto sobre el modelo de ratón K/BxN de artritis inflamatoria. Los datos para crear el modelo se generaron a partir de dos estudios, un estudio farmacológico (descrito en el Ejemplo 11B anterior) y un estudio toxicológico. Este modelo constituye un método para la interpretación de los datos, para explorar la relación entre concentración-respuesta, y se puede utilizar para respaldar la selección de una dosis inicial segura en los seres humanos.

Métodos

15 Estudio farmacológico

Los detalles completos de los métodos del estudio farmacológico se han proporcionado anteriormente en el Ejemplo 11B. En resumen, los objetivos de este estudio fueron determinar, en primer lugar, si el tratamiento terapéutico con el anticuerpo humanizado anti-C5aR, hAb-Q, era eficaz para revertir los signos y los síntomas de la artritis inflamatoria en el modelo K/BxN; y en segundo lugar, para correlacionar la dosis con el efecto antiinflamatorio, el nivel de ocupación de los receptores (medido como hC5aR libre y hAb-Q unido), el estado de activación de los neutrófilos y la concentración de anticuerpos circulantes en el suero. La inflamación se determinó en al menos 10 ratones por grupo. El estudio de la saturación del receptor se realizó con 4 ratones por grupo, excepto que los grupos de control a los que se proporcionó PBS, incluían 2 ratones. Grupos de dosificación (1, 3, 10 mg/kg, i.p., y animales de control).

25 Estudio toxicológico

Estudio toxicológico mediante administración subcutánea e intravenosa (bolo) de hAb-Q a ratones transgénicos hC5aR, con dosis administradas en días alternos. Los datos toxicocinéticos se obtuvieron a partir de 18-21 machos y 18-21 hembras en cada uno de los cuatro grupos de dosificación de hAb-Q (5, 50, 500 mg/kg, i.v., y 100 mg/kg por vía subcutánea (s.c.)).

30 Farmacocinética

Las concentraciones séricas de hAb-Q se sometieron a ensayo tal y como se ha descrito anteriormente.

Ocupación de receptores

La unión a hC5aR sobre los neutrófilos y monocitos a través del mAb hAb-Q administrado, se determinó como se ha descrito anteriormente. Para el estudio farmacológico, la ocupación se calculó como,

$$35 \quad \text{Ocupación} = \% \text{ unido} = 100\% \frac{MFI_{\text{unida}} - MFI_{\text{pre unida}}}{MFI_{\text{unida máx}} - MFI_{\text{pre unida}}}$$

Los valores previos se restaron, ya que éstos fueron considerados para proporcionar la MFI de ruido de fondo.

Desarrollo del modelo

NONMEM VI (efectos mixtos no lineales del programa informático para la formación de modelos) con una estimación condicional de primer orden (FOCE) se utilizó para crear el modelo, y S-PLUS® 8.0 (Insightful) se utilizó para los gráficos y el manejo de datos. La evaluación de - y la discriminación entre - modelos intermedios se basaba en los valores de la función objetivo y los métodos convencionales de evaluación gráfica. En términos de valor de la función objetiva, se asumieron los cambios en este valor para una distribución chi-cuadrado (para los modelos anidados), y los criterios para expandir el modelo se definieron y se utilizaron en consecuencia.

Resultados

45 Relación entre PK/PD para la ocupación

La toxicocinética del estudio toxicológico en ratones transgénicos y los datos de PK/PD del estudio farmacológico se integraron para evaluar la relación entre la farmacocinética y la ocupación. Estos datos podrían estar bien descritos por un modelo de PK de un compartimiento con una disposición mediada por la diana, tal y como se ilustra en la Figura 43. El modelo de PK y de ocupación ajustado para cada grupo de dosificación se muestra en la Figura 44, mientras que los valores de los parámetros se proporcionan en la Tabla 9. Nótese también que se estimó un

aclaramiento mayor para el grupo de 500 mg/kg que para niveles de dosis más bajas en el estudio toxicológico. Esto es compatible con otros estudios, en los que se observa un aclaramiento mayor para dosis elevadas, debido a la saturación del receptor de Fc (Hansen y Baltasar, 2002).

Tabla 9: Parámetros farmacocinéticos de hAb-Q en transgénicos en un estudio toxicológico y un estudio farmacológico

	Unidad	Farmacológico	Toxicológico
V₁	mL/kg	74,3	74,3
CL	mL/h/kg	0,182	1,37-2,52*
ka.sc	1/h	-	0,0935
ka.ip	1/h	4,26	-
F.sc	1	-	0,438
F.ip	1	0,411	-
Kd	ng/mL	175	175
koff	1/h	0,1	0,1
Bmax.Targ	µg/kg	196	196
Renovación	h	14,2	14,2

* A partir de los ratones hC5aR KO/KI en el estudio Tox, un aclaramiento más alto se encontró en el grupo de 500 mg/kg. V₁ = volumen central, CL = aclaramiento, ka.sc/ka.ip son las constantes de la tasa de absorción para una administración s.c. o i.p. F.sc/F.ip son la biodisponibilidad para una administración s.c. o i.p. Kd = afinidad de la unión específica. koff = constante de la tasa de disociación. Bmax.Targ = capacidad de unión máxima a la diana para hAb-Q. Renovación = Tiempo que se necesita para renovar la diana y eliminar los anticuerpos unidos. (koff se fijó a 0,1 1/h).

Relación entre PK/PD para el efecto sobre la inflamación

Un modelo de PK/PD fue desarrollado para describir la relación entre la farmacocinética y el cambio en el tamaño de la pata después de estímulo inflamatorio en el estudio farmacológico (modelo K/BxN), utilizando ratones transgénicos. El curso natural del modelo K/BxN es un aumento gradual en el tamaño de la pata debido a la inducción de artritis experimental, con un retorno gradual posterior después de aproximadamente 12 días al tamaño normal de la pata, a medida que la inflamación va disminuyendo. El modelo de PK/PD ilustrado en la Figura 45 describe el efecto de hAb-Q a través de la inhibición de la inflamación inducida. El porcentaje de inhibición máxima se estableció en el nivel de ocupación obtenida a partir del modelo de PK/PD de ocupación. Como se observa en la Figura 46, se pudo obtener una concordancia razonable entre el tamaño de la pata medido y según el modelo a través de este enfoque, lo que ilustra una relación muy estrecha entre la ocupación de los receptores de C5a de los neutrófilos y el efecto sobre la inflamación.

Los ratones KO/KI hC5aR (n≥10/punto de tiempo/grupo) se sometieron a una inducción de la artritis experimental el día 0, y fueron inyectados con 1, 3, 10 o 0 mg/kg de anti-C5aR (hAb-Q) el día 5. Después de aproximadamente 12 días, el tamaño de la pata empezó a disminuir, ya que el aumento de la inflamación inducida fue disminuyendo. Del mismo modo, con una ocupación cerca del 100 %, el aumento inducido por la inflamación fue inhibido, y para el grupo de 10 mg/kg se observó una pequeña disminución en el tamaño de la pata. En el modelo, estos procesos están relacionados, ambos descritos por el retorno natural al tamaño normal de la pata.

El modelo predecía que la parte dominante del efecto de hAb-Q se obtiene con una concentración que conduce a una ocupación completa del receptor en los neutrófilos circulantes. Con 1 mg/kg, la ocupación era alta solo durante 1-2 días después de la dosificación, y en adelante el tamaño de la pata comenzó a aumentar de nuevo, véase la Figura 46. Del mismo modo, 3 mg/kg conduce a aproximadamente 72 horas de ocupación elevada, después de las cuales el tamaño de la pata comenzó a aumentar de nuevo. Con 10 mg/kg, se obtienen aproximadamente 10 días de ocupación que dan lugar a aproximadamente el mismo lapso de tiempo para la inhibición de la inflamación de la pata.

Usando el modelo plausible presentado, se observa que cuando la ocupación era superior al 50 %, el crecimiento del tamaño de la pata se inhibía, y cuando la ocupación disminuía por debajo del 50 %, por ejemplo, después del día 8 en el grupo de 3 mg/kg, el tamaño de la pata volvió a aumentar, impulsado por la inflamación. Dado que el modelo asocia una inhibición del 50 % con un 50 % de ocupación, el ajuste adecuado proporcionó una confirmación cuantitativa 1) de que la ocupación y el efecto sobre la inflamación están estrechamente conectados, y 2) que se espera que la ocupación máxima al 50 % proporcione un efecto mínimo sobre la inflamación.

Conclusiones

El modelo mostró una estrecha relación entre la concentración de mAb, la ocupación y el efecto sobre la inflamación, y se encontró un acuerdo satisfactorio entre los valores observados y los pronosticados. Las características más importantes de los datos fueron descritas por el modelo: 1) un efecto claramente beneficioso sobre la pata del ratón lo que motivaba un mayor desarrollo clínico. 2) un alto componente saturable de eliminación descrito por la disposición mediada por la diana, que puede conducir a una necesidad de niveles elevados de dosis para un efecto terapéutico a largo plazo, y 3) una unión relativamente fuerte al receptor *in vivo*, probablemente relacionada con una unión bivalente, que puede conducir a un máximo de ocupación con dosis bajas.

Este modelo fue utilizado como parte del paquete utilizado para construir un modelo de simulación humana basado en todos los datos preclínicos relevantes, para seleccionar una dosis inicial segura en el primer ensayo en humanos.

Ejemplo 12 - Actualización del modelo de PK/PD con datos de seres humanos

Los datos procedentes de un ensayo clínico en curso con hAb-Q se utilizaron para validar y actualizar el modelo de PK/PD preclínico descrito en el Ejemplo 11, empleando datos farmacocinéticos y de ocupación de C5aR. Las simulaciones de este modelo se utilizan para describir las predicciones actuales de PK/PD a niveles de dosis más altas. Este modelo constituye un método para la interpretación de datos para la toma de decisiones tempranas con respecto al nivel de dosis y al régimen de selección en estudios futuros.

Métodos

Datos clínicos

NN8209-1940 es un estudio aleatorizado, de doble ciego, controlado con placebo, con aumento de la dosis, de dosis solo i.v. y s.c. en paralelo 8 y 7 con niveles de dosis, respectivamente. Los sujetos se asignaron al azar a una sola dosis por vía i.v. o s.c. de anti-C5aR (hAb-Q). Los sujetos se asignaron al azar en una proporción de 3:1, en donde tres sujetos serán asignados al tratamiento activo en cada nivel de dosis y vía de administración y un sujeto al tratamiento con placebo. Anti-C5aR (hAb-Q) será administrado con niveles de dosis planificadas con un aumento real de la dosis de 3 o 3,3 veces desde el nivel de la dosis anterior. Los niveles de dosis actuales incluidos en la actualización del modelo de PK/PD: niveles de dosis i.v.: 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,2, 0,6 mg/kg; niveles de dosis s.c.: 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 mg/kg.

Los datos no incluidos en el modelo, en espera de la finalización del ensayo, incluyen niveles de dosis planificadas: 2 y 7 mg/kg i.v. y 1 y 3 mg/kg s.c.

Pautas de la toma de muestras

La toma de muestras PK para la medición de anti-C5aR (hAb-Q) está prevista antes de la dosificación a las 0 horas (máximo 60 minutos antes de la dosificación) y a los 5 minutos (después de solo la administración i.v.), 15 minutos (después de solo la administración i.v.) y 30 minutos, y 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 horas y 3, 7, 14, 21, 28, 42, 56 y 70 días después de la administración del fármaco. Los puntos de tiempo se refieren al comienzo de la inyección o la infusión a 0 minutos. Para los sujetos asignados al azar a la administración i.v., el tiempo de infusión es de 15 minutos y el punto de tiempo de 15 minutos de tiempo se refiere por lo tanto al final de la infusión.

La toma de muestras para la ocupación de C5aR en los neutrófilos y monocitos está planeada antes de la dosificación a las 0 horas (máximo 60 minutos antes de la dosificación) y a las 4, 24 y 48 horas y 3, 7, 14, 21, 42 y 70 días después de la administración del fármaco.

Cálculo de la ocupación

La unión a hC5aR sobre los neutrófilos y monocitos con el mAb hAbQ administrado se determinó usando tres métodos diferentes. Después del análisis por FACS, cada una de estas mediciones da lugar a una intensidad media de la fluorescencia corregida (MEF). Los tres métodos son: 1) un método directo que emplea un anticuerpo secundario anti-IgG₄ humana marcado con FITC para evaluar los receptores ocupados que se han unido a hAbQ *in vivo* (MEF_{unida}); 2) un método indirecto que mide los receptores de hC5a libres como resultado de la administración de hAb-Q *in vivo*, seguido de la adición de hAb-Q -FITC *ex vivo* (MEF_{libre}); y 3) una medida del número total de receptores, la incubación con exceso de hAb-Q *ex vivo* para ocupar todos los receptores y luego la adición de anticuerpo secundario anti-humano (MEF_{unida máx.}). La ocupación se obtuvo posteriormente de la siguiente manera:

$$\% \text{ Unido} = 100\% \frac{MEF_{unida} - MEF_{fondo unido}}{MEF_{unida máx} - MEF_{fondo unido}}$$

$$\% \text{ Libre} = 100\% \frac{MEF_{libre} - MEF_{fondo libre}}{MEF_{pre libre} - MEF_{fondo libre}}$$

$$\text{Ocupación} = 100\% \frac{\% \text{ unido}}{\% \text{ libre} + \% \text{ unido}}$$

Desarrollo del modelo

NONMEM VI con una estimación condicional de primer orden (FOCE) se utilizó para crear el modelo, y S-PLUS® 8.0 se utilizó para los gráficos y el manejo de datos. La evaluación de - y la discriminación entre - modelos intermedios se basaba en los valores de la función objetivo y los métodos convencionales de evaluación gráfica. En términos de valor de la función objetivo, los cambios en este valor se asumieron para una distribución chi-cuadrado (para los modelos anidados), y los criterios para expandir el modelo se definieron y se utilizaron en consecuencia.

El modelo actualizado se estimó a partir de los datos. Sin embargo, los datos actuales pueden ser insuficientes para una estimación firme de todos los parámetros. En este caso, algunos parámetros se fijaron a los valores de los parámetros típicos de IgG.

Resultados

El modelo actualizado actual de la PK humana y la ocupación se describe en la Figura 47. Las predicciones del modelo fueron, en general, que tenía una concordancia muy buena con la farmacocinética y la ocupación observadas hasta ahora en el experimento. Estas predicciones del modelo de PK/PD después de la administración de anti-C5aR (hAb-Q) se muestran en la Figura 48 para una dosificación i.v., y en la Figura 49 para una dosificación s.c. Se debe tener en cuenta que estas predicciones son propensas a cambiar después de la acumulación de datos.

El modelo es extremadamente no lineal, lo que hace que las predicciones sean más difíciles que para una farmacocinética lineal. Basándose en datos actuales, solo una información reducida contribuye a la semivida de eliminación a niveles elevados de dosis, lo que implica que se debe tomar en cuenta cierta incertidumbre, especialmente para la predicción de niveles elevados de dosis. Para la dosificación s.c., los datos farmacocinéticos disponibles están todavía cerca del límite inferior de cuantificación, lo que significa que los datos de la ocupación principal contribuyen a la estimación de la biodisponibilidad.

Conclusiones

En general, se encontró una buena concordancia entre la PK observada y prevista y la ocupación. Las principales características previstas a partir de los datos preclínicos también se observaron en los datos clínicos. Estas características incluyen un alto componente saturable de la eliminación, que es probablemente debido a la diana, y una ocupación relativamente alta a bajas concentraciones.

Las presentes realizaciones se consideran, por lo tanto, en todos los aspectos como ilustrativas y no restrictivas.

La presente solicitud reivindica la prioridad del documento de EE.UU. 61/066.539 presentado el 20 de febrero de 2008.

Cualquier exposición de documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o similares que haya sido incluida en la presente memoria descriptiva es únicamente con el propósito de proporcionar un contexto para la presente invención. No hay que tomarlo como una admisión de que alguna o todas esas cuestiones forman parte de la base de la técnica anterior o que sean de conocimiento general común en el campo correspondiente a la presente invención, ya que existían antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud

REFERENCIAS

- Barry et al. (1994) J. Biol. Chem. 269: 3623-32.
- Berman et al. (1998) Immunol. Invest. 17: 625-677.
- Caldas et al. (2000) Protein Eng. 13: 353-360.
- 40 Caldas et al. (2003) Mol. Immunol. 39: 941-952.
- Caron et al. (1992) J. Exp Med. 176: 1191-1195.
- Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-17.
- Chothia et al. (1989) Nature 342: 877-883.
- Co et al. (1992) J. Immunol. 148: 1149-54.
- 45 Curiel et al. (1992) Hum. Gene Ther. 3: 147-154.

- Dahinden et al. (1994) *J. Exp. Med.* 179: 751-756.
- Dai et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10892-10895.
- Eigenbrot et al. (1993) *J. Mol. Biol.* 229: 969-95.
- Gerard y Gerard (1991) *Nature* 349: 614-617.
- 5 Gerard y Gerard (1994) *Ann. Rev. Immunol.* 12: 775-808.
- Hansen y Balthasar (2002) *Thromb. Haemost.* 88: 898-899.
- Hendrickson et al. (1995) *Nucl. Acids Res.* 23: 522-529.
- Ji et al. (2002) *Immunity* 16: 157-168.
- Jones et al. (1986) *Nature* 321: 522-525.
- 10 Jose et al. (1994) *J. Exp. Med.* 179: 881-887.
- Kaneko et al. (1995) *Immunology* 86: 149-154.
- Kavanaugh et al. (1991) *J. Immunol.* 146: 4149-4156.
- Kontetatis et al. (1994) *Journal of Immunology* 153: 4200-4205.
- Kouskoff et al. (1996) *Cell* 87: 811-822.
- 15 Kozlov et al. (2004) *Biopolymers* 73: 621-630.
- Kyburg y Corr (2003) *Springer Semin Immunopathol.* 25: 79-90.
- Lebkowski et al. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8: 3988-3996.
- Lee et al. (2002) *Science* 297: 1689-1692.
- Lee et al. (2006) *Nat. Biotech.* 24: 1279-1284.
- 20 Lowenstein et al. (2006) *Transplant International* 19: 927-936
- Martin et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9268-72.
- Mayo y Curnutte (1990) *Methods Enzymol.* 186: 567-75.
- Monk et al. (2007) *British J. Pharmacol.* 152: 429-448.
- Morgan et al. (1993) *Journal of Immunology* 151: 377-388.
- 25 Murdoch y Finn (2000) *Blood* 95: 3032-3043.
- Needleman y Wunch (1970) *J. Mol Biol.* 48: 444-453.
- Neote et al. (1993) *Cell* 72: 415-425.
- Niemeyer et al. (2003) *Nucl. Acids Res.* 31: e90.
- Nisihara et al. (2001) *J. Immunol.* 167: 3266-3275.
- 30 Pellas et al. (1998) *J. Immunology* 160: 5616-5621.
- Preithener et al. (2006) *Mol Immunol* 43: 1183-1189.
- Proctor et al. (2006) *Expert opinion on therapeutic patents, informa healthcare GB* 16:445-458.
- Pulito et al. (1996) *J. Immunol.* 156: 2840-50.
- Robinson et al. (2004) *Drug development reaserch, New York* 16: 10: 1279-1284
- 35 Rudikoff et al. (1982) *PNAS* 79: 1979-1983.
- Queen et al. (1986) *Immunol. Rev.* 89: 49-68.
- Shopes (1992) *J. Immunol.* 148: 2918-2922.

- Solomon et al. (2005) Eur J Immunol. 35: 3064-3073.
Stevenson et al. (1989) Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230.
Ulmer et al. (1993) Science 259: 1745-1748.
Van Damme et al. (1992) J. Exp. Med. 176: 59-65.
- 5 Van Meerten et al. (2006) Clin Cancer Res 12: 4027-4035.
Van Riper et al. (1993) J. Exp. Med. 177: 851-856.
Verhoeyen et al. (1988) Science 239: 1534-1536.
Vitetta (1993) Immunol. Today 14: 252.
Vitetta et al. (1987) Science 238: 1098-1104.
- 10 Watanabe et al. (1995) J. Immunol. Meth. 185: 19-29.
Whitfeld et al. (2007) Inflammation Research 56: S401.
Williams et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2726-2730.
Wipke y Allen (2001) J Immunol. 167: 1601-1608.
Wolff et al. (1993) Cancer Research, 53: 2560-2565.
- 15 Wu H (2003) Methods in Mol. Biol. 207: 197-212.
Wu y Wu (1987) J. Biol. Chem. 262: 4429-4432.
Zachariae et al. (1990) J. Exp. Med. 171: 2177-2182.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> G2 Inflammation Pty Ltd
- 20 <120> Anticuerpos anti-C5aR humanizados
- <130> 507745
- <150> US 61/066,539
< 151> 2008-02-20
- <160> 59
- 25 <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
< 211> 112
< 212> PRT
< 213> Mus musculus

ES 2 562 627 T3

<400> 1

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asn Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val 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 Ser Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr Leu Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

5

<400> 2

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

10

<210> 3

<211> 336

<212> ADN

<213> Mus musculus

ES 2 562 627 T3

<400> 3
gatgttgtga tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaaa tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcagga cagatttctc actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acttgttccg 300
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggaa ctgaaa 336

5 <210> 4
< 211> 363
< 212> ADN
< 213> Mus musculus

<400> 4
caggttcagc tgacagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcctc agtgaagatt 60
tcctgcaagg cttctggcta cgcattcagt aactcctgga tgaactgggt gaagcagagg 120
cctggaagg gtcttgagtg gattggacgg atttattcctg gagatggaga tactaagtac 180
aatgggaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagattccta 300
cttattagta cggtaacagc cgttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 360
10 tca 363

<210> 5
< 211> 112
< 212> PRT
< 213> Homo sapiens

15 <400> 5
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30
Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95
Thr His Trp Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

20 <210> 6
< 211> 112
< 212> PRT
< 213> Homo sapiens

ES 2 562 627 T3

<400> 6

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

5

<210> 7
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

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

10

<210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 562 627 T3

<400> 8

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

5

<210> 9

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

10

Arg

<210> 10

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 10

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

ES 2 562 627 T3

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Leu Gln Thr Pro
 100

5

<210> 11
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Ser 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95
 Ile His Leu Pro
 100

10

<210> 12
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr pro Gly
 1 5 10 15

ES 2 562 627 T3

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
 85 90 95
 Ile Gln Leu Pro
 100

5 <210> 13
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
 85 90 95
 Ile Gln Leu Pro
 100

10 <210> 14
 <211> 83
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Consenso de las secuencias variables de la cadena ligera humana

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa = número variable de diferentes aminoácidos que se corresponden a distintas CDRs

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (40)..(40)
 <223> Xaa = número variable de diferentes aminoácidos que se corresponden a distintas CDRs

ES 2 562 627 T3

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (73)..(73)
 < 223> Xaa = número variable de diferentes aminoácidos que se corresponden a distintas CDRs

5 <400> 14
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Xaa Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 20 25 30
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Xaa Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 35 40 45
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala
 50 55 60
 Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 65 70 75 80
 Glu Ile Lys

<210> 15
 < 211> 98
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

10 <400> 15
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Arg Ser
 20 25 30
 Ala Ile Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Val Pro Met Phe Gly Pro Pro Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Gly

15 <210> 16
 < 211> 98
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

ES 2 562 627 T3

<400> 16

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

Ala Arg

<210> 17

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 17

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

Ala Lys

<210> 18

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

ES 2 562 627 T3

<400> 18

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

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 19

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 19

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 20

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

ES 2 562 627 T3

<400> 20

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
20 25 30

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

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Thr

<210> 21

< 211> 98

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

5

<400> 21

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 22

< 211> 98

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

10

ES 2 562 627 T3

<400> 22
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg

5

<210> 23
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

10

Ala Thr

<210> 24
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Consenso de secuencias variables de la cadena pesada humana

20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(26)
 <223> Xaa = número variable de diferentes aminoácidos que se corresponden a distintas CDRs

<220>
 <221> MISC_FEATURE

ES 2 562 627 T3

< 222> (41)..(41)
 < 223> Xaa = número variable de diferentes aminoácidos que se corresponden a distintas CDRs

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 5 < 222> (70)..(70)
 < 223> Xaa = número variable de diferentes aminoácidos que se corresponden a distintas CDRs

<400> 24
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro
 20 25 30
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Xaa Arg Val Thr Met Thr Arg Asp
 35 40 45
 Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu
 50 55 60
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 65 70

10

<210> 25
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

15

<400> 25
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

20

<210> 26
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

25

<400> 26
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

30

<210> 27
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

<400> 27
 Asp Tyr Trp Gly Glx Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser
 1 5 10

<210> 28
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

<400> 28
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

ES 2 562 627 T3

<210> 29
 < 211> 13
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

5 <400> 29
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr
 1 5 10

<210> 30
 < 211> 11
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

10

<220>
 < 223> Consenso de secuencias de unión de la cadena pesada humana

<400> 30
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

15 <210> 31
 < 211> 112
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

20 <220>
 < 223> Segmento de anticuerpo humanizado

<400> 31
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val 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 Gln 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 Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr Leu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

25 <210> 32
 < 211> 112
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Segmento de anticuerpo humanizado

ES 2 562 627 T3

<400> 32

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

<210> 33

< 211> 112
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

5

<220>

< 223> Segmento de anticuerpo humanizado

<400> 33

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

10

<210> 34

< 211> 121
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

15

<220>

< 223> Segmento de anticuerpo humanizado

ES 2 562 627 T3

<400> 34

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys 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 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp 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 Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 35

< 211> 121
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

5

<220>

< 223> Segmento de anticuerpo humanizado

<400> 35

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

10

<210> 36

< 211> 121
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

15

ES 2 562 627 T3

<220>

< 223> Segmento de anticuerpo humanizado

<400> 36

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

5

<210> 37

< 211> 350

< 212> PRT

< 213> Homo sapiens

ES 2 562 627 T3

<400> 37

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
 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
 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

ES 2 562 627 T3

<210> 38
 < 211> 6
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

5 <220>
 < 223> Epítoto de C5aR unido por anticuerpos de la invención

<400> 38
 Glu Glu Tyr Phe Pro Pro
 1 5

10 <210> 39
 < 211> 121
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Secuencia de consenso de regiones variables de la cadena pesada humana de la invención.

15 <400> 39
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Asn Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Phe Leu Leu Ile Ser Thr Val Thr Ala Val Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

20 <210> 40
 < 211> 106
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

ES 2 562 627 T3

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

5

<210> 41
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

10

<210> 42
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 562 627 T3

<400> 42

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

ES 2 562 627 T3

<210> 43
 < 211> 327
 < 212> PRT
 < 213> Homo sapiens

5

<400> 43
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

ES 2 562 627 T3

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 45
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 562 627 T3

<400> 45

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

5

<210> 46

<211> 112

ES 2 562 627 T3

< 212> PRT
< 213> Artificial

<220>
< 223> Secuencia RNOK203VL humanizada

5

<400> 46
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30
 Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Gly Trp Cys Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser
 85 90 95
 Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 47
< 211> 112
< 212> PRT
< 213> Artificial

10

<220>
< 223> Secuencia VLCD18-Q obtenida a partir de KV2F-HUMAN

<400> 47
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Arg Leu Val His Thr
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Phe His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Phe 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

15

<210> 48
< 211> 112
< 212> PRT
< 213> Artificial

ES 2 562 627 T3

<220>
 < 223> Secuencia de consenso h7F3vkcons

5 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (41)..(41)
 < 223> Xaa = Tyr, Cys o Phe

<400> 48
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Xaa Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr Leu Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 10 100 105 110

<210> 49
 < 211> 83
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

15 <220>
 < 223> Secuencia estructural-armazón de consenso hVhFW

20 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (26)..(26)
 < 223> Xaa = número variable de diferentes aminoácidos que se corresponden a distintas CDRs

<220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (41)..(41)
 < 223> Xaa = número variable de diferentes aminoácidos que se corresponden a distintas CDRs

25 <220>
 < 221> MISC_FEATURE
 < 222> (72)..(72)
 < 223> Xaa = número variable de diferentes aminoácidos que se corresponden a distintas CDRs

ES 2 562 627 T3

<400> 49

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

5

<210> 50
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia SGI-VH humana

<400> 50

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

15

<210> 51
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia HG3 de la línea germinal humana

ES 2 562 627 T3

<400> 51
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

5 <210> 52
 < 211> 336
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

10 <220>
 < 223> Ácido nucleico que codifica un segmento de anticuerpo humanizado

<400> 52
 gatgttgatga tgacccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctcttgagaga gccagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttgtc cacagtaatg gaaacaccta tttgcattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtttc caaccgcttt 180
 tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acttggtcct 300
 ctcaccttcg gtcaggggac caagctggaa atcaaa 336

15 <210> 53
 < 211> 336
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Ácido nucleico que codifica un segmento de anticuerpo humanizado

20 <400> 53
 gatgttgatga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca ctcttgagaga gccagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttgtc cacagtaatg gaaacaccta tttgcattgg 120

ES 2 562 627 T3

tgctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatct acaaagtttc caaccgcttt 180
 tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acttggtcct 300
 ctcaccttcg gtcaggggac caagctggaa atcaaa 336

 <210> 54
 < 211> 336
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> Ácido nucleico que codifica un segmento de anticuerpo humanizado

 <400> 54
 gatgttgga tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctcttgaca gccagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttgtc cacagtaatg gaaacaccta tttgcattgg 120
 ttccagcagc ggccaggcca gtctccacgg ctctgatct acaaagtttc caaccgcttt 180
 tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcagga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acttggtcct 300
 ctcaccttcg gtcaggggac caagctggaa atcaaa 336

 <210> 55
 < 211> 363
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> Ácido nucleico que codifica un segmento de anticuerpo humanizado

 <400> 55
 caggttcagc tggcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaagatt 60
 tcctgcaagg cttctggcta cgcattcagt aactcctgga tgaactgggt gaggcaggct 120
 cctggaaagg gtctagagtg gatgggacgg atttaccctg gagatggaga tactaagtac 180
 aatgggaagt tcaagggcag ggtcacaatc actgcagacg aatccaccag cacagcctac 240
 atggaactca gcagcctgag atctgaggac tctgccgtct atttctgtgc aagattcctg 300
 cttattagta ctgtgacagc cgtcgactac tggggccaag gcaccactgt cacagtctcc 360
 tca 363

 <210> 56
 < 211> 363
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> Ácido nucleico que codifica un segmento de anticuerpo humanizado

ES 2 562 627 T3

<400> 56
 caggttcagc tgggtcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggcta cgcattcagt aactcctgga tgaactgggt gaagcaggct 120
 cctggacagg gtctagagtg gataggacgg atttattcctg gagatggaga tactaagtac 180
 aatgggaagt tcaagggcaa ggccacaatg actgcagaca catccaccag cacagcctac 240
 atggaactca gcagcctgag atctgaggac actgccgtct attactgtgc aagattcctg 300
 cttattagta ctgtgacagc cgtcgactac tggggccaag gcacccttgt cacagtctcc 360
 tca 363

5

<210> 57
 < 211> 363
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Ácido nucleico que codifica un segmento de anticuerpo humanizado

<400> 57
 caggttcagc tgggtcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
 tcctgcaagg cttctggcta cgcattcagt aactcctgga tgaactgggt gaggcaggct 120
 cctggacagg gtctagagtg gatgggacgg atttattcctg gagatggaga tactaagtac 180
 aatgggaagt tcaagggcag ggtcacaatg actgcagaca catccaccag cacagtctac 240
 atggaactca gcagcctgag atctgaggac actgccgtct attactgtgc aagattcctg 300
 cttattagta ctgtgacagc cgtcgactac tggggccaag gcacccttgt cacagtctcc 360
 tca 363

10

<210> 58
 < 211> 12
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

15

<220>
 < 223> Segundo bucle extracelular de C5aR

<400> 58
 Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys
 1 5 10

20

<210> 59
 < 211> 21
 < 212> PRT
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Porción N-terminal de C5aR humano

ES 2 562 627 T3

<400> 59

Pro Asp Tyr Gly His Tyr Asp Asp Lys Asp Thr Leu Asp Leu Asn Thr
1 5 10 15

Pro Val Asp Lys Thr

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado que se une a C5aR humano, que comprende
 - i) una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31, y
 - 5 ii) una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 36.
2. El anticuerpo humanizado según la reivindicación 1, que inhibe la unión de C5a a C5aR humano.
3. El anticuerpo humanizado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que
 - 10 i) la cadena ligera de inmunoglobulina comprende una región constante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a una o a varias de SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 41, y
 - ii) la cadena pesada de inmunoglobulina comprende una región constante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a una o a varias de SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45.
- 15 4. El anticuerpo humanizado según la reivindicación 3, que comprende
 - i) una cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una región constante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO: 41, y
 - ii) una cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una región constante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO: 45.
- 20 5. El anticuerpo humanizado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es una estructura de cuatro cadenas polipeptídicas que consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, un anticuerpo de cadena sencilla, un diacuerpo, un triacuerpo o un tetracuerpo, o un fragmento de anticuerpo que se une a C5aR humano.
- 25 6. Un polinucleótido aislado y/o exógeno que codifica un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una cadena del mismo.
7. Un vector que comprende un polinucleótido según la reivindicación 6.
8. Una célula hospedadora que comprende un polinucleótido según la reivindicación 6 y/o un vector según la reivindicación 7.
- 30 9. Una composición que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, un polinucleótido según la reivindicación 6, un vector según la reivindicación 7 y/o una célula hospedadora según la reivindicación 8, y un vehículo.
10. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno en un sujeto.
- 35 11. El anticuerpo para uso en el tratamiento o la prevención según la reivindicación 10, en donde el trastorno es una trastorno inmunopatológico o una enfermedad inflamatoria.
12. Uso de un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, un polinucleótido según la reivindicación 6, un vector según la reivindicación 7, una célula hospedadora según la reivindicación 8 y/o una composición según la reivindicación 9, en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir un trastorno en un sujeto.
- 40 13. El uso según la reivindicación 12, en donde el trastorno es un trastorno inmunopatológico o una enfermedad inflamatoria.

	10	20	30	40	49
HV1AV_HUMAN	QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKKAS	GGTFRSRAII	WVRQAFQGQGLEWMMG		
HV1BV_HUMAN	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKKAS	GYTFNSIYMH	WVRQAFQGQGLEWMMG		
HV1CV_HUMAN	QVQLVQSGAEVKKPKGASVRVSKKAS	GYTFIDSYIH	WVRQAFGHGLEMVVG		
HV1GV_HUMAN	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKKAS	GYTFTGYIMH	WVRQAFQGQGLEWMMG		
M99641	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKKAS	GYTFTSYGIS	WVRQAFQGQGLEWMMG		
M99642	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKKVS	GYTLTFLSMH	WVRQAFCKGLEMWMMG		
X62109	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKKAS	GYTFTSYAMH	WVRQAFQQRLEWMMG		
X92343	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKKAS	GYTFTSYIMH	WVRQAFQGQGLEWMMG		
Z12305	EVQLVQSGAEVKKPKGATVKISKVVS	GYTFTDYIMH	WYQQAEGKQGLEWMMG		
hVhVFW Cons	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKKAS	-----	WVRQAFQGQGLEWMMG		
		CDR-H1			
	60	70	80	90	98
HV1AV_HUMAN	GIVPMFGPPNYAQKFKQG	RVTITADESTNTAYMELSSLRSEDTAFYFC			AG
HV1BV_HUMAN	IINPSGGSTSYAQKFKQG	RVTMTTRDSTSTVYMELESSLRSEDTAVYIC			AR
HV1CV_HUMAN	WINPNSGGTNYAPRFQG	RVTMTTRDASFSTAYMDLRLSLRSDSVAEYIC			AK
HV1GV_HUMAN	RINPNSGGTNYAQKFKQG	RVTSTTRDSTISITAYMELSLRSLRSDDTVYVYIC			AR
M99641	WISAYNGNTNYAQKFKQG	RVTMTTDTSTSTAYMELSLRSLRSDDTVYVYIC			AR
M99642	GEDEPDEGTIYKQKFKQG	RVTMTTDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYIC			AT
X62109	WINAGNGNTKYSQKFKQG	RVTITTRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYIC			AR
X92343	IINPSGGSTSYAQKFKQG	RVTMTTRDSTSTVYMELESSLRSEDTAVYIC			AR
Z12305	LVDPEDEGTIYKQKFKQG	RVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYIC			AT
hVhVFW Cons	-----	-----	-----	-----	---
		CDR-H2			CDR-H3>

Figura 2a

HV3Tj_HUMAN	DY	WGQGTLVTVST
HV3Kj_HUMAN	DY	WGQGTFTVSS
HV3Hj_HUMAN	DY	WGZGTLVTVSS
HV2Ij_HUMAN	DV	WGQGTFTVSS
HV1Cj_HUMAN	DV	WGQGTFTVSS
hVhJFW Cons	--	WGQGTFTVSS

10

<CDR-H3

Figura 2b

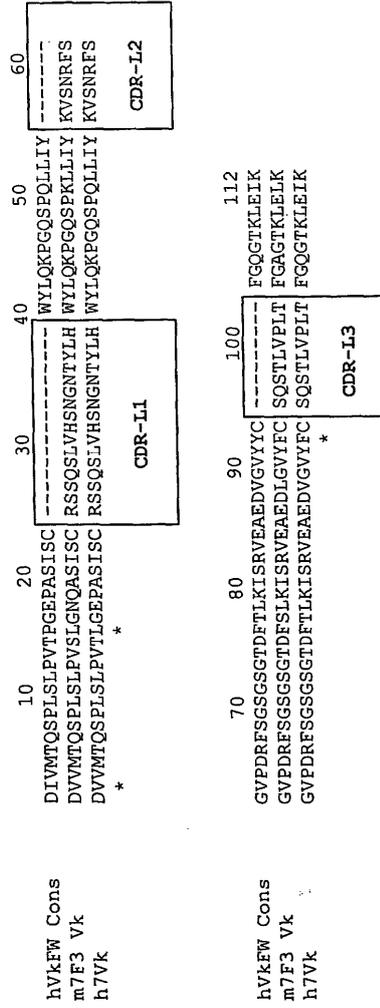


Figura 3

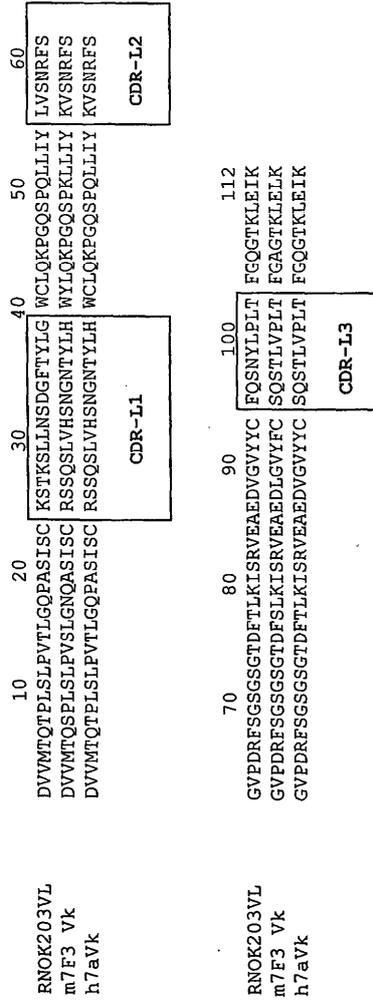


Figure 4

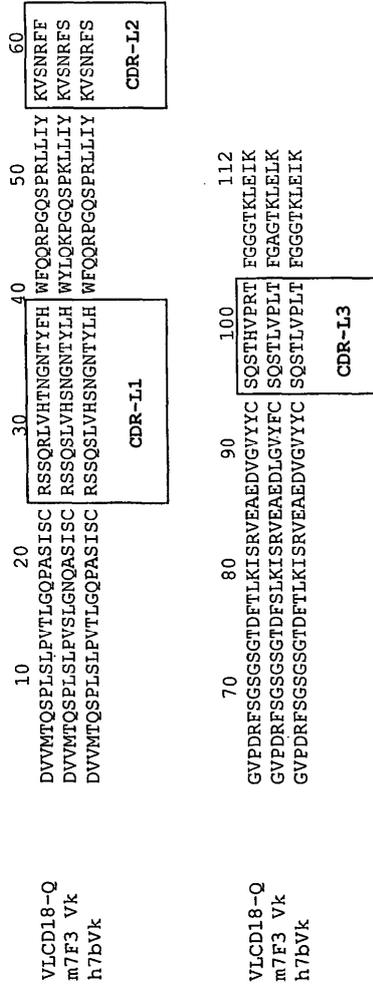


Figura 5

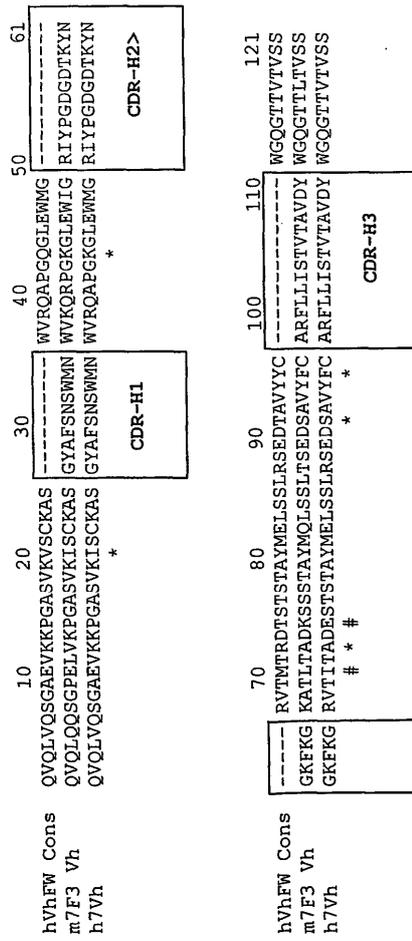


Figura 7

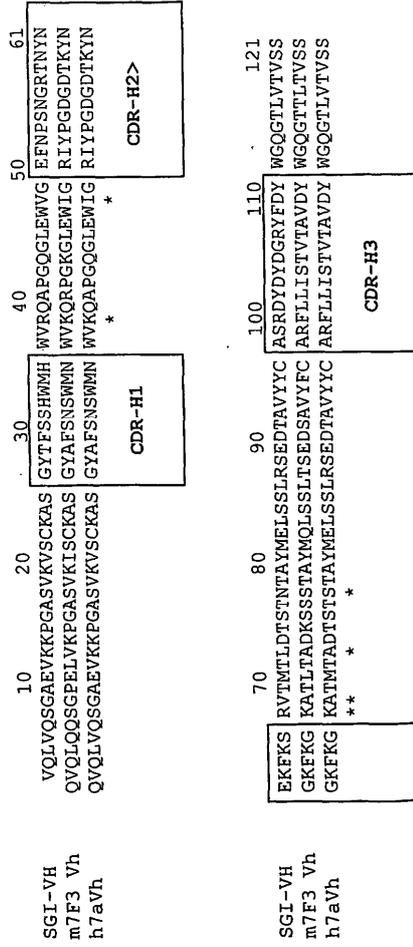


Figura 8

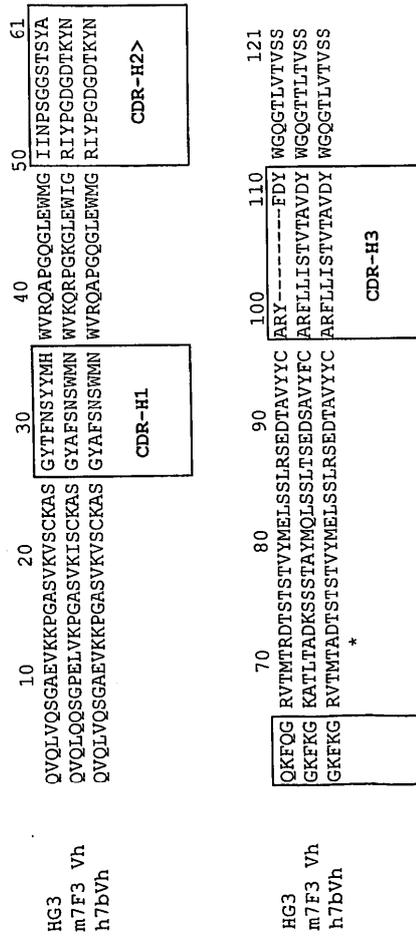


Figura 9

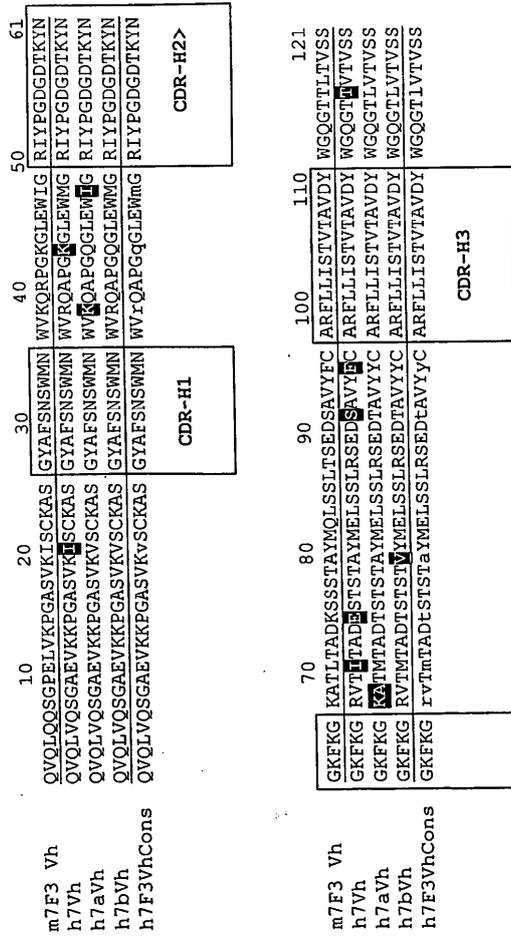


Figure 10

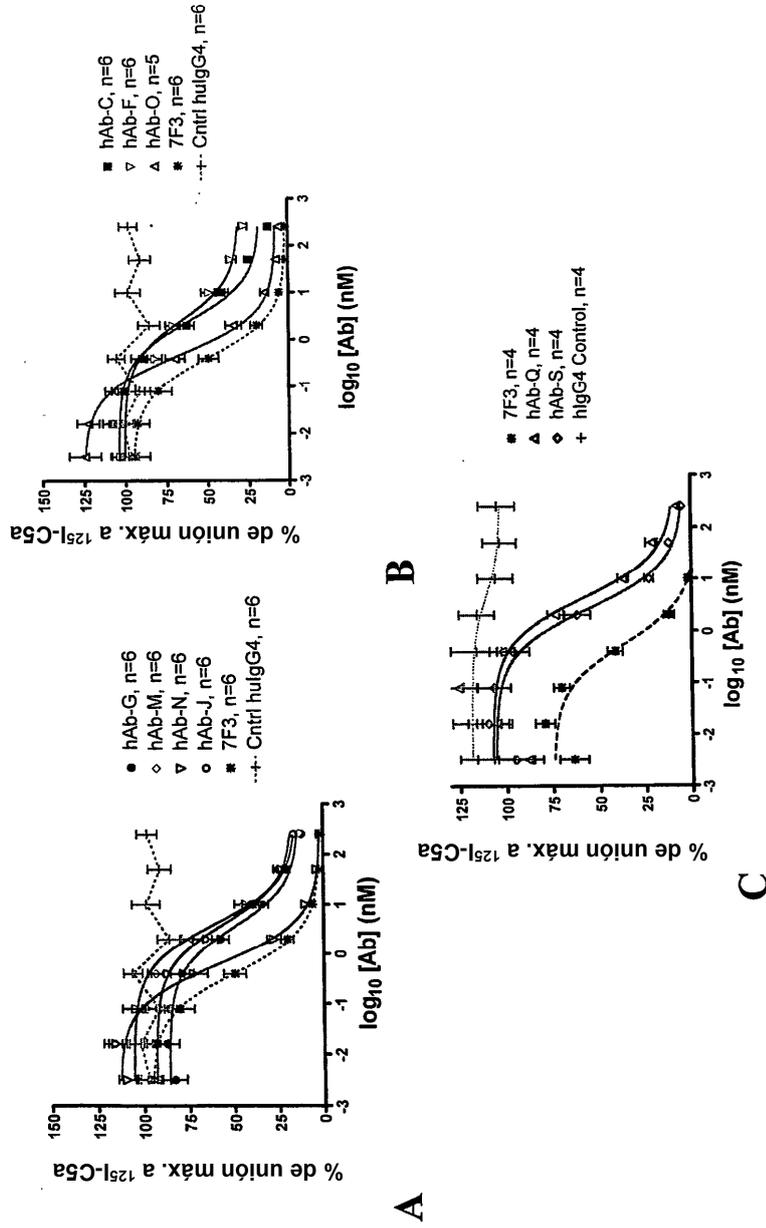


Figura 11

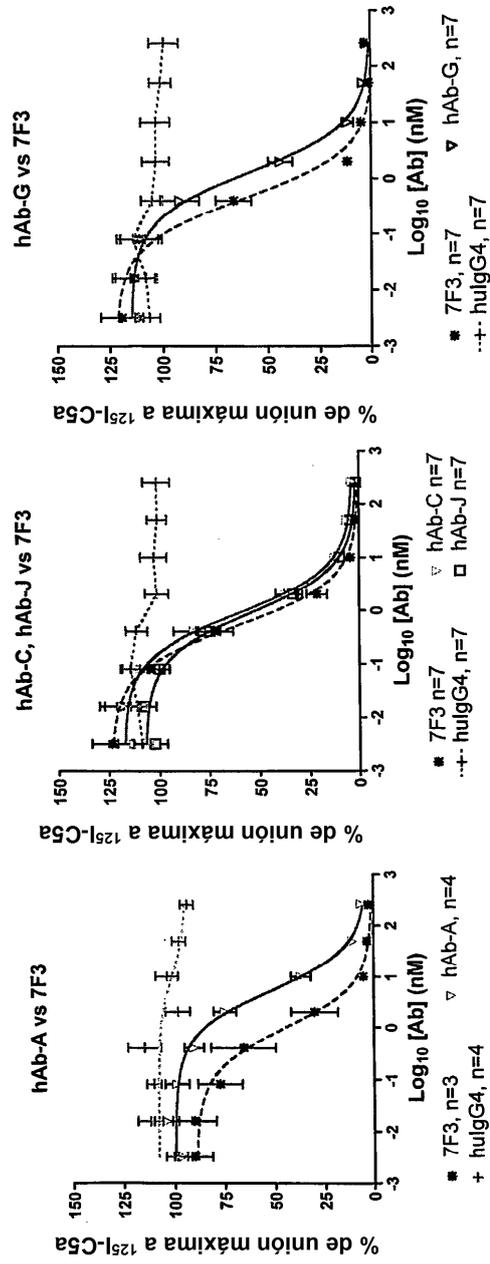


Figura 12a

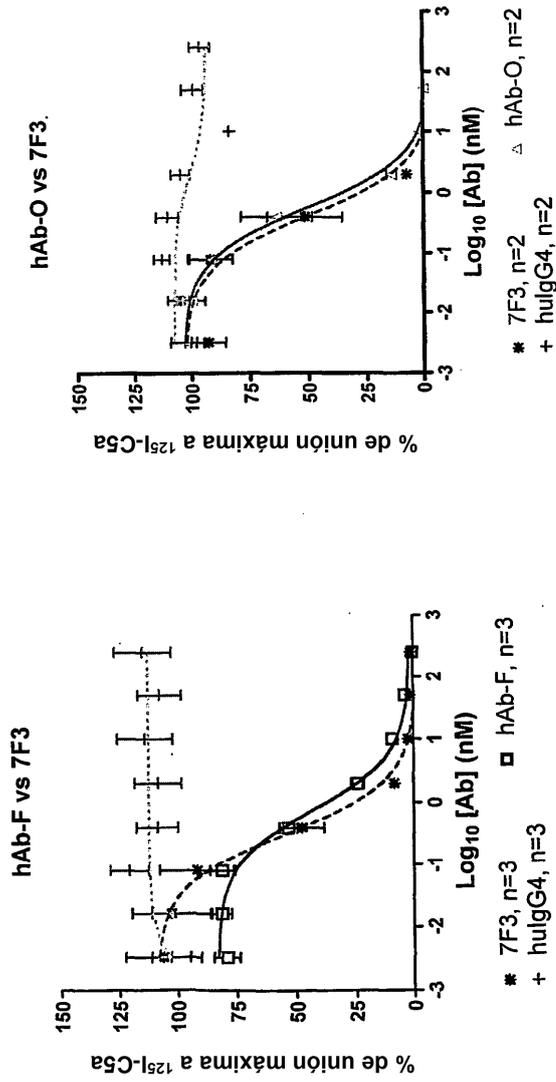


Figura 12b

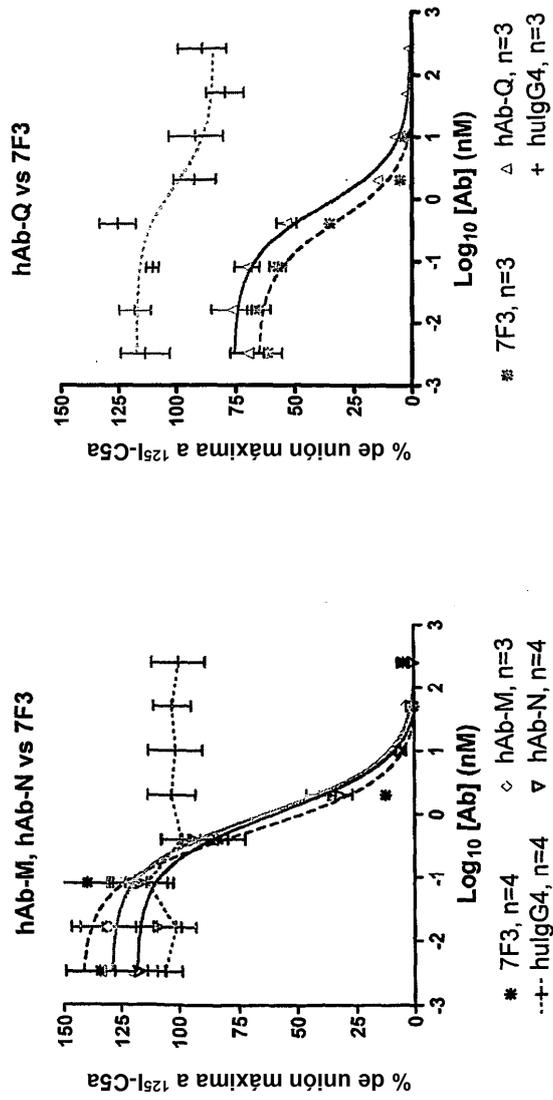


Figura 12c

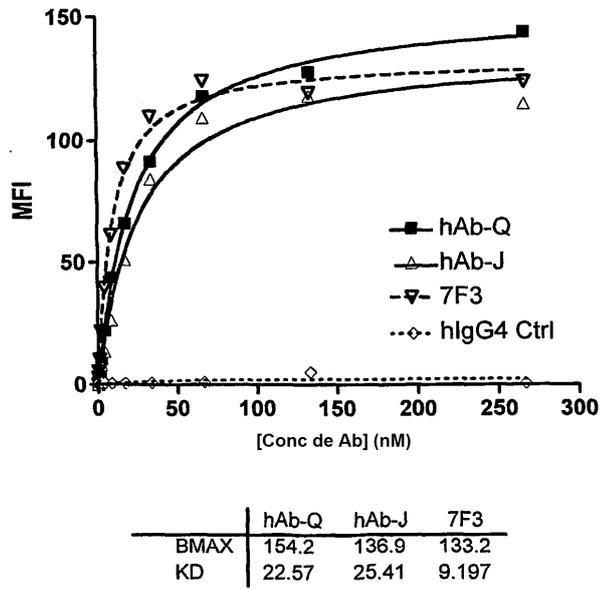
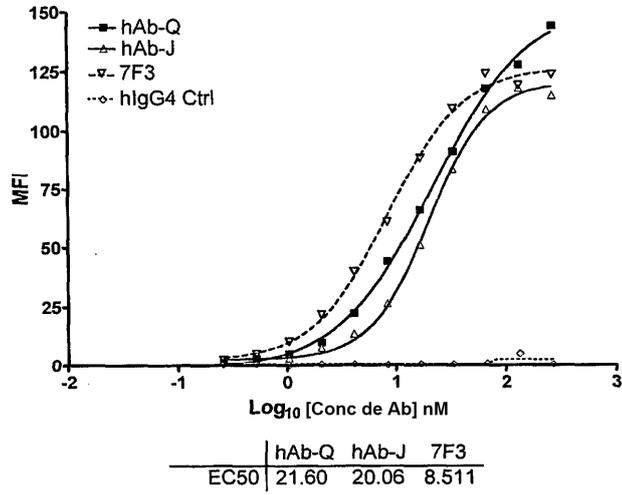
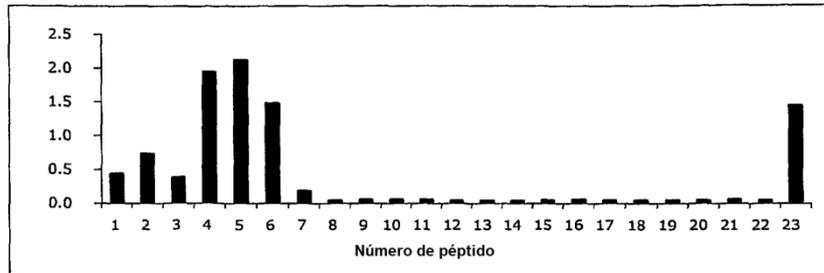
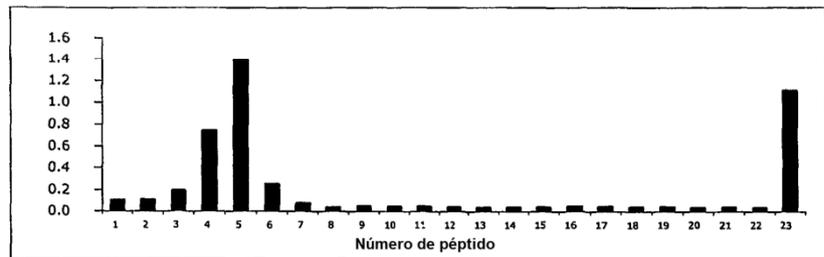


Figura 13

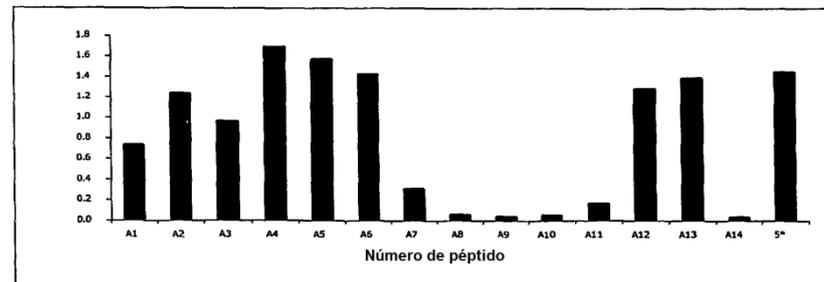
A



B



C



D

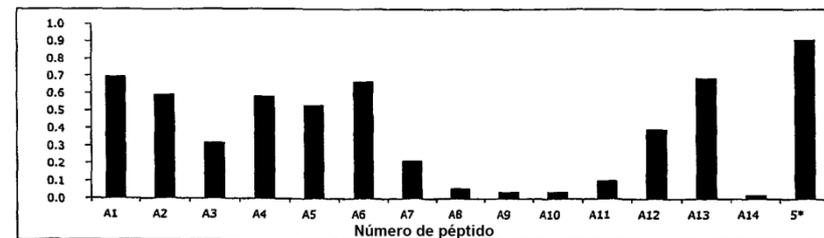


Figura 14

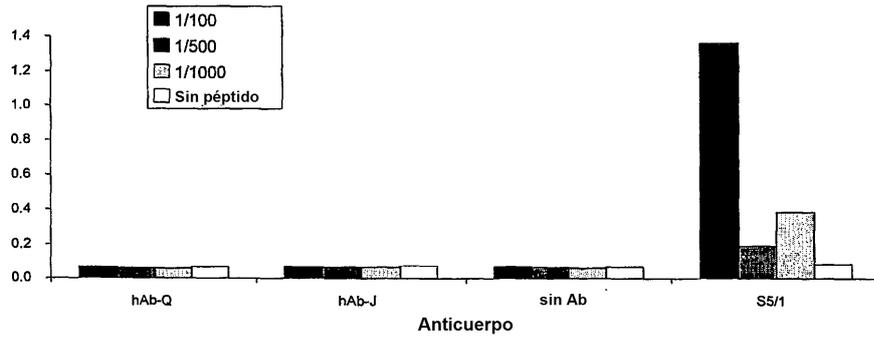


Figura 15

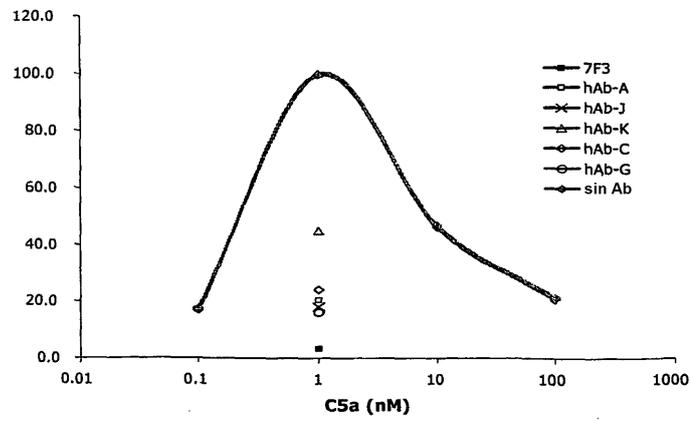


Figura 16

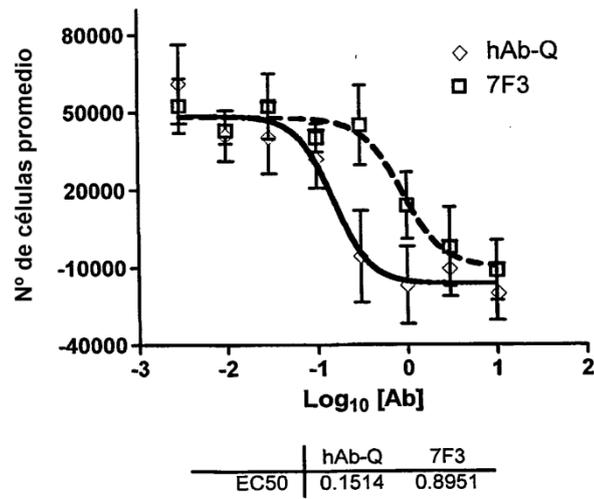
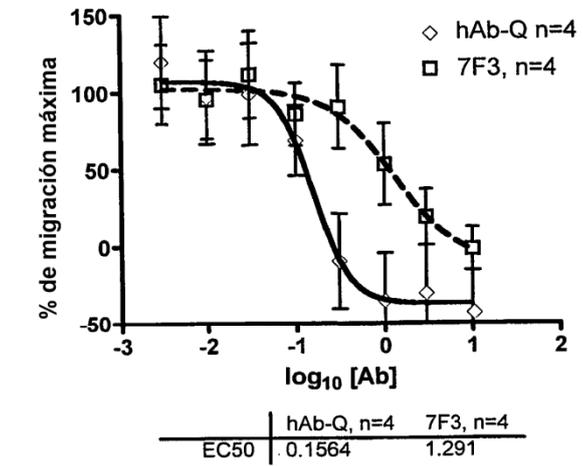


Figura 17

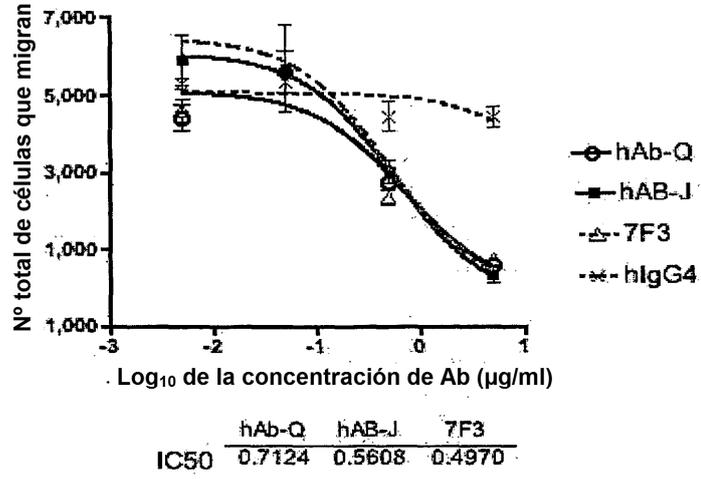


Figura 18

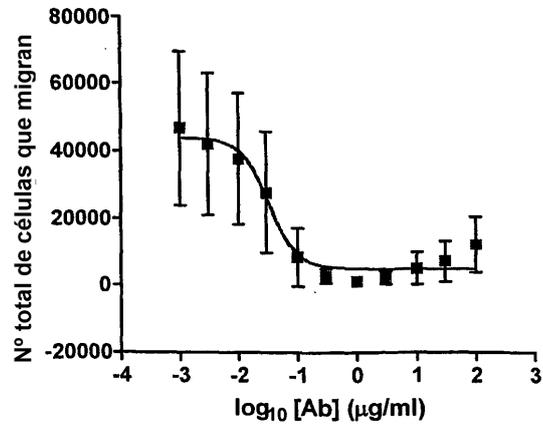


Figura 19

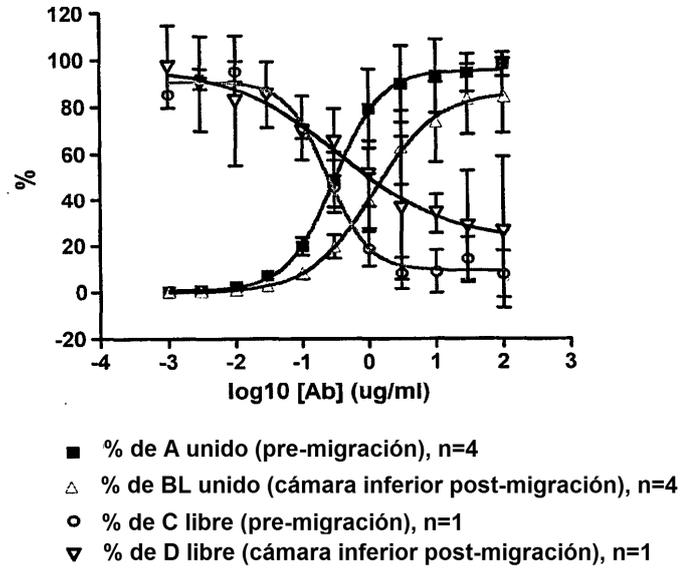


Figura 20

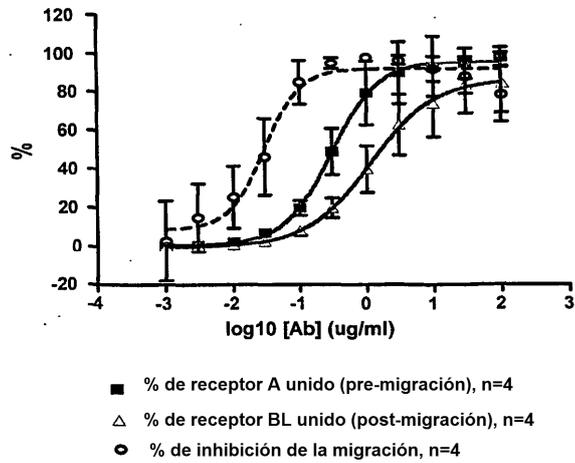


Figura 21

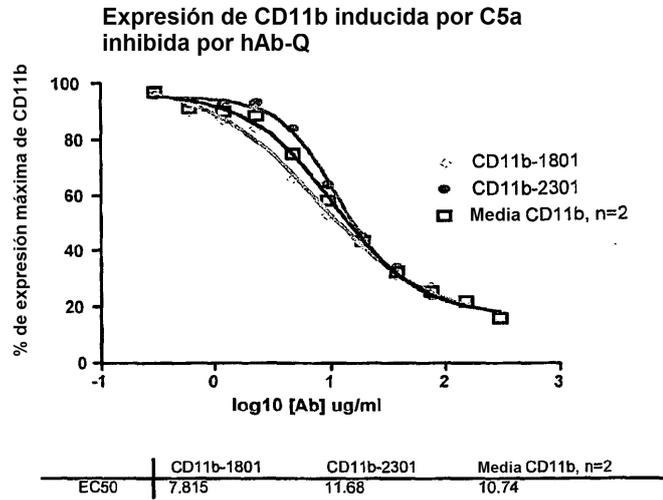


Figura 22

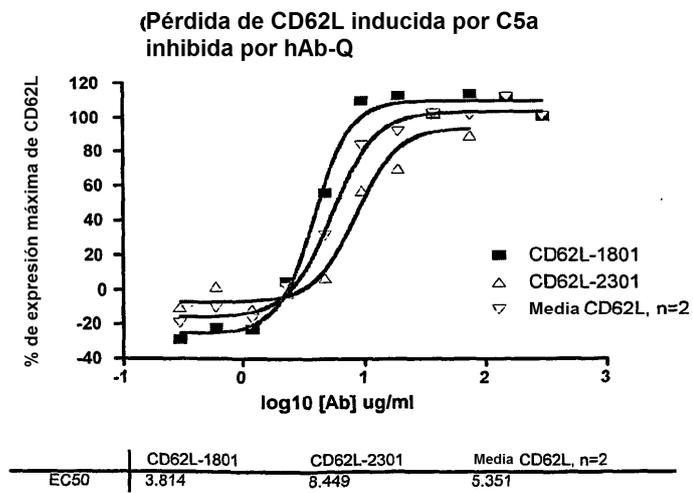


Figura 23

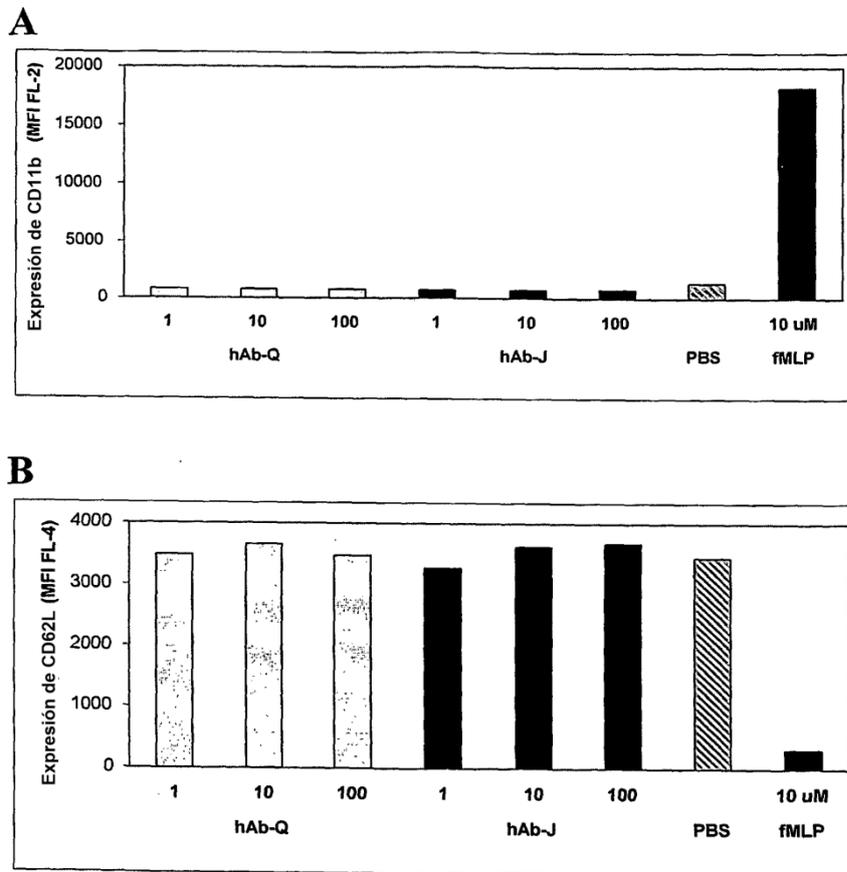
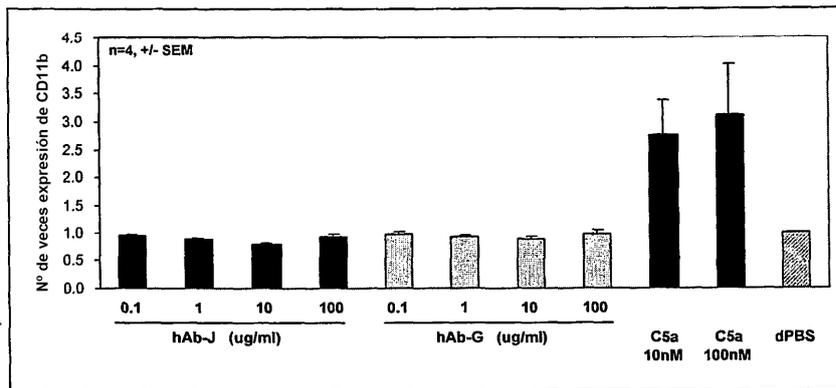


Figura 24

A



B

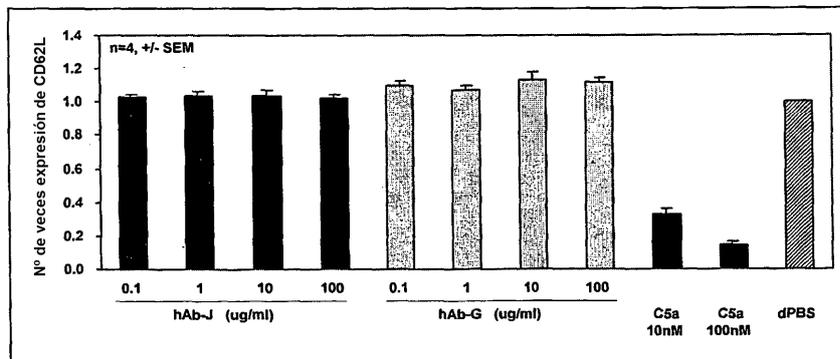


Figura 25

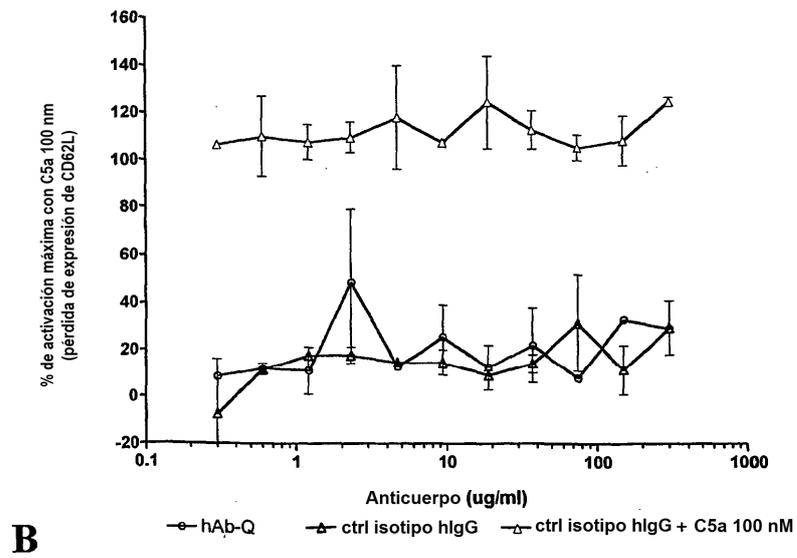
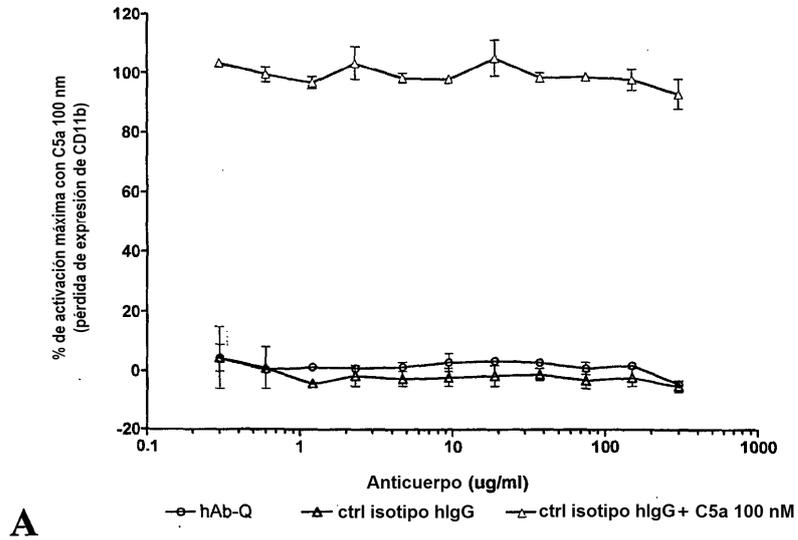


Figura 26

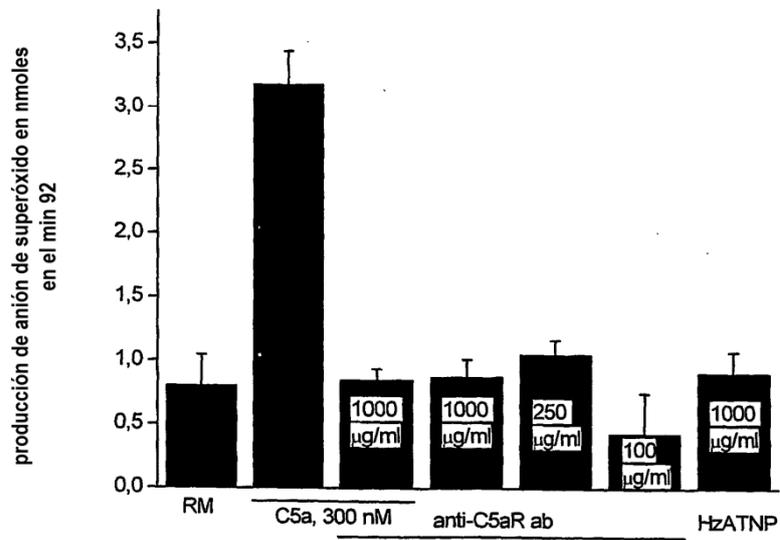


Figura 27

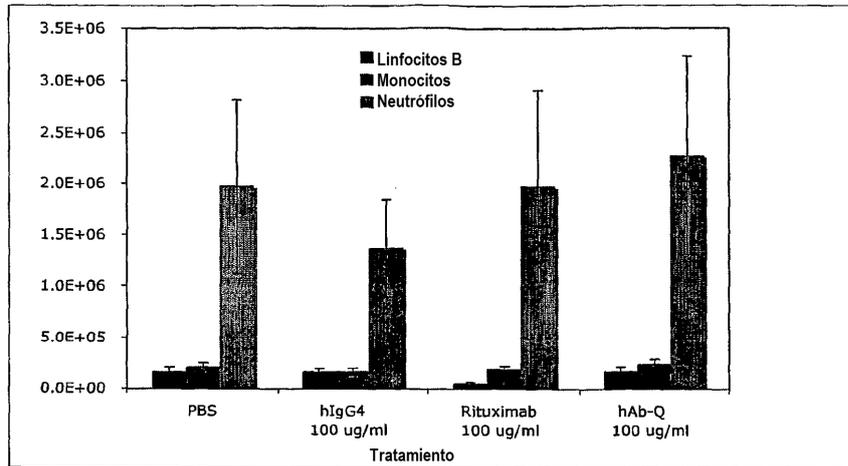


Figura 28

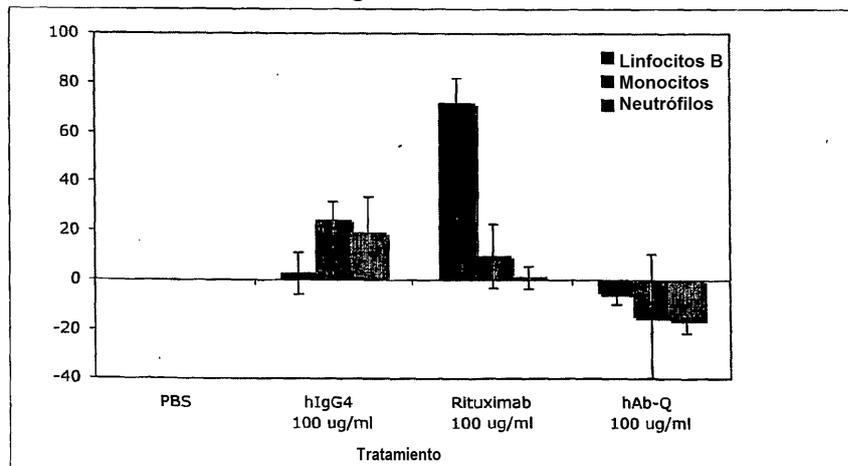


Figura 29

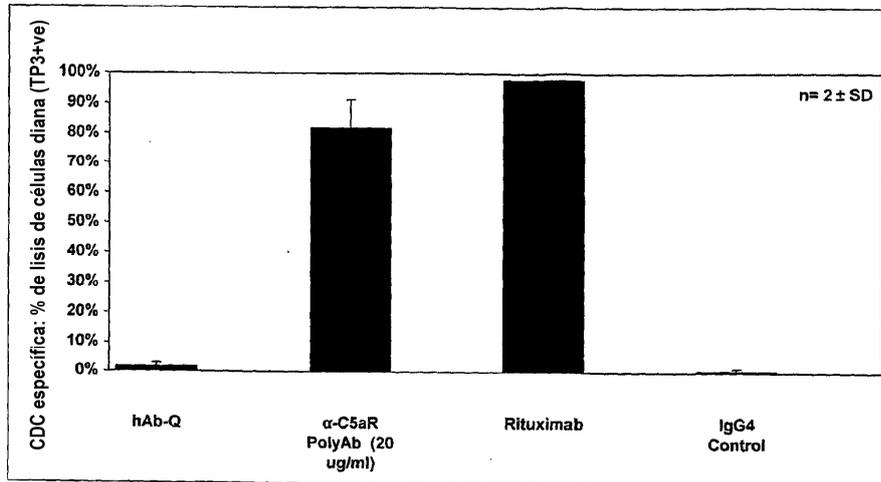


Figura 30

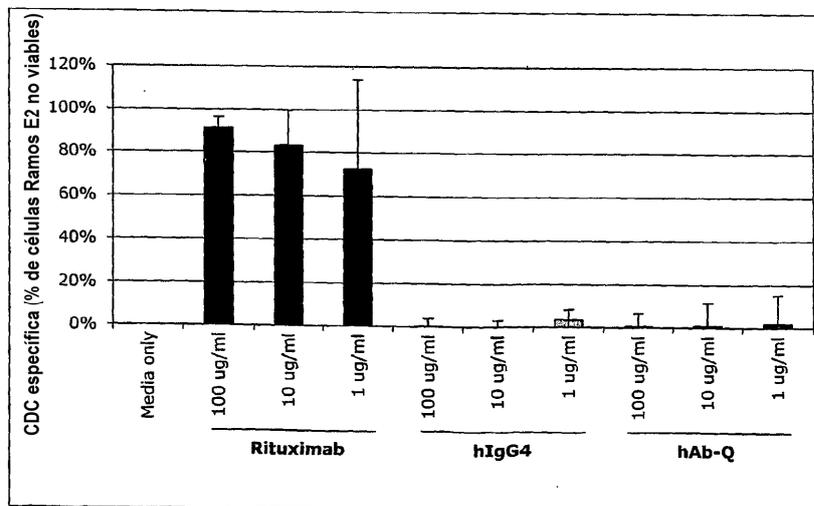


Figura 31

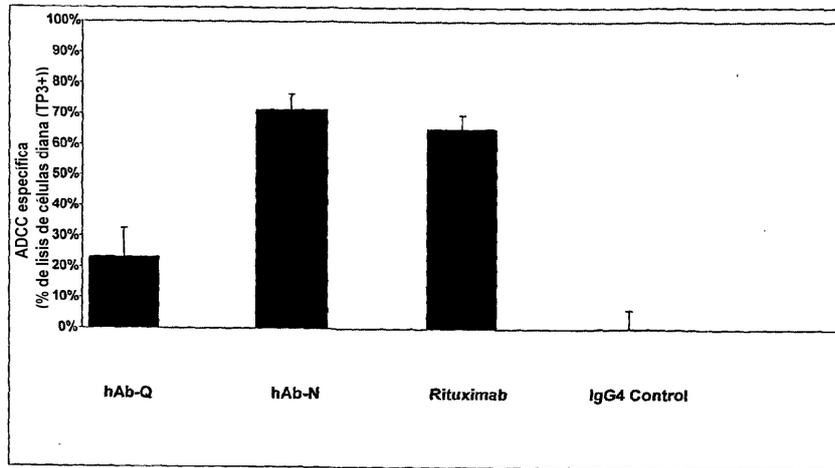


Figura 32

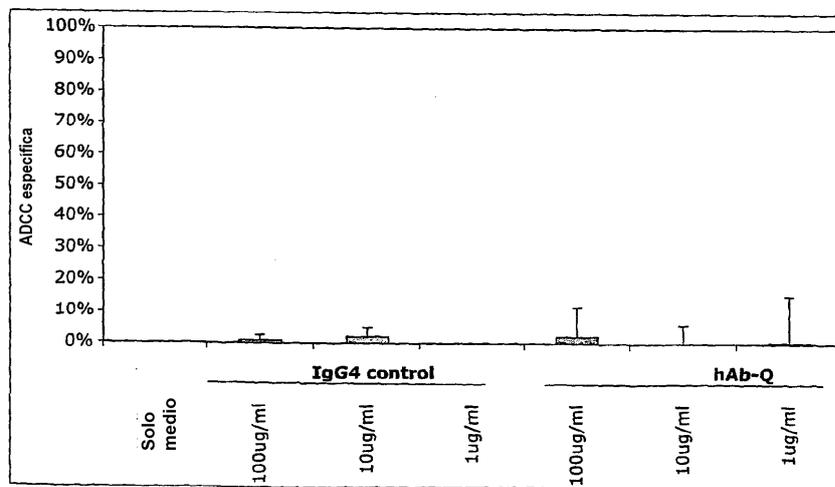


Figura 33

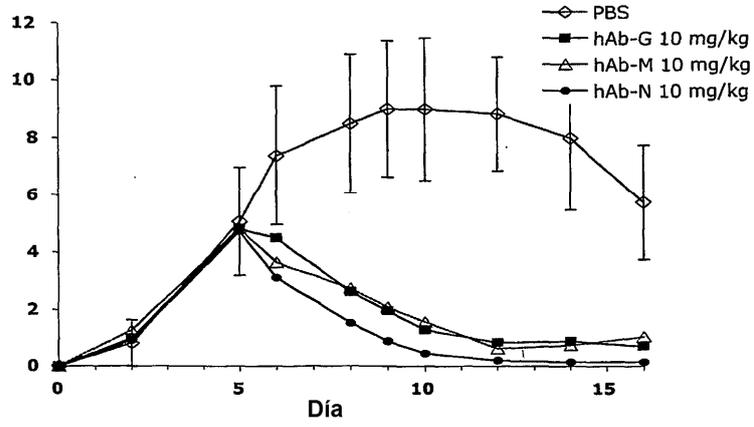


Figura 34

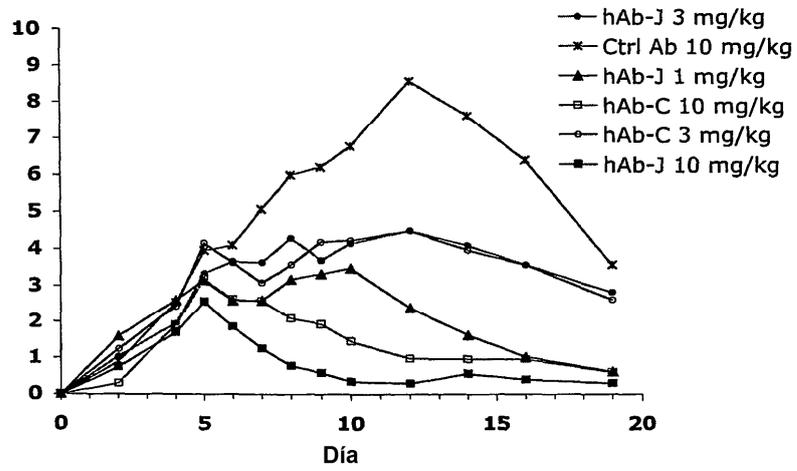


Figura 35

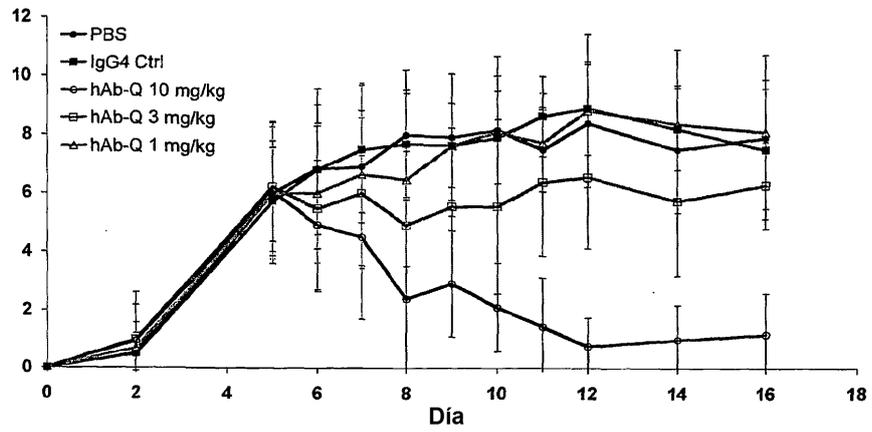


Figura 36a

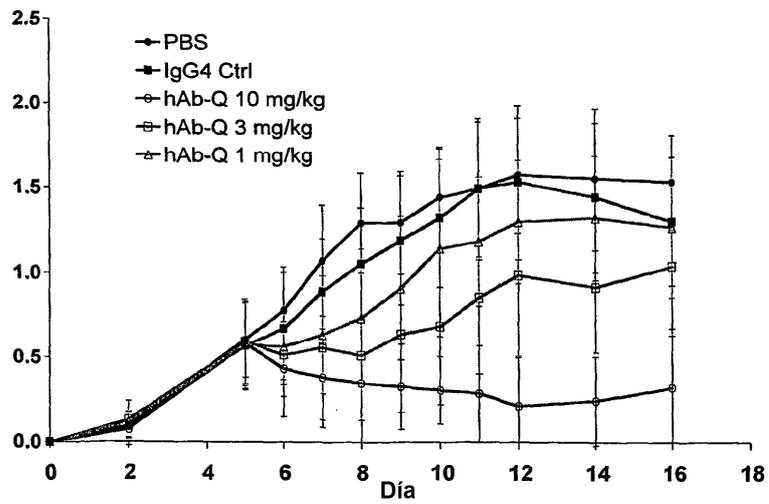


Figura 36b

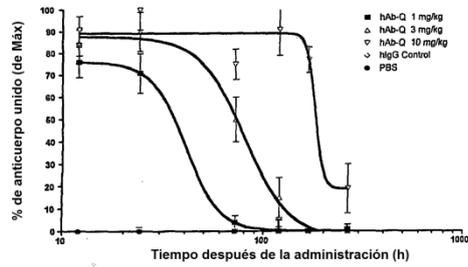


Figura 37

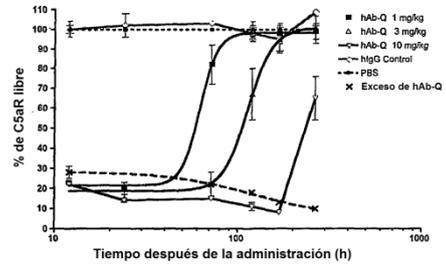


Figura 38

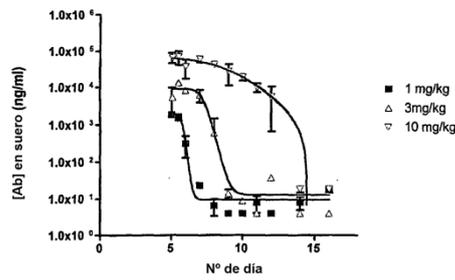


Figura 39

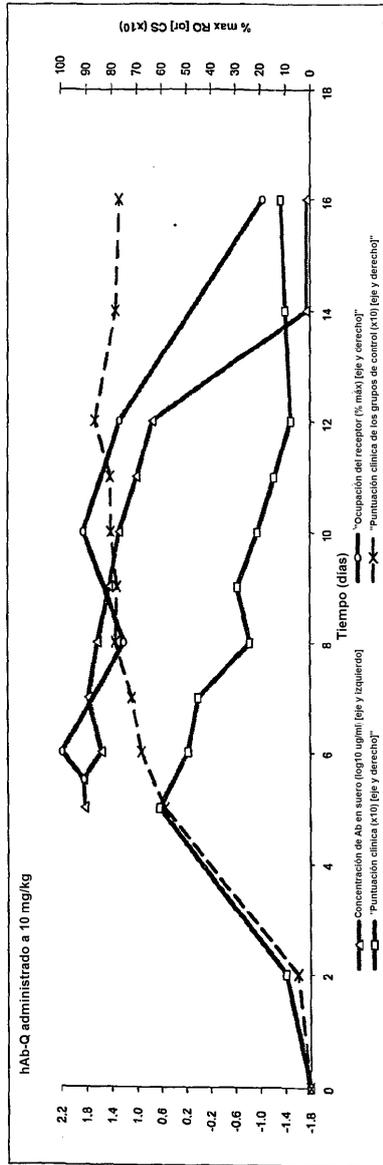


Figura 40

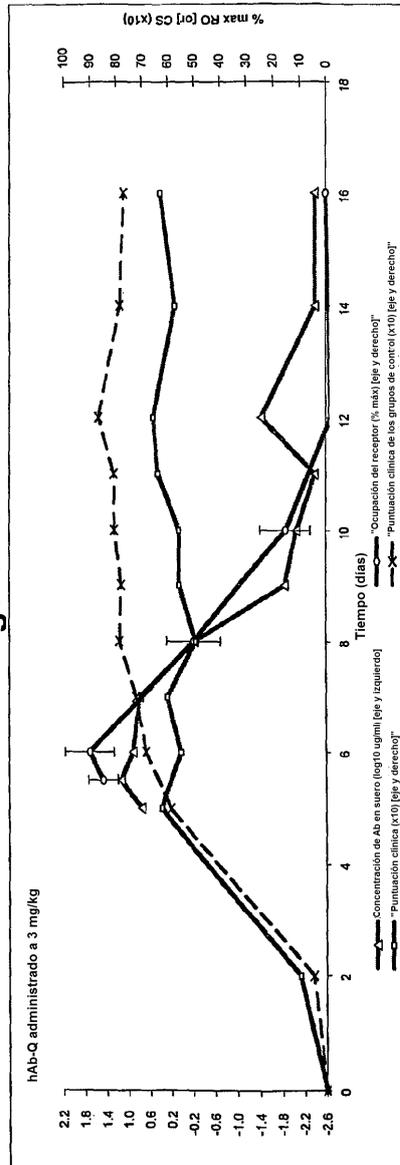


Figura 41

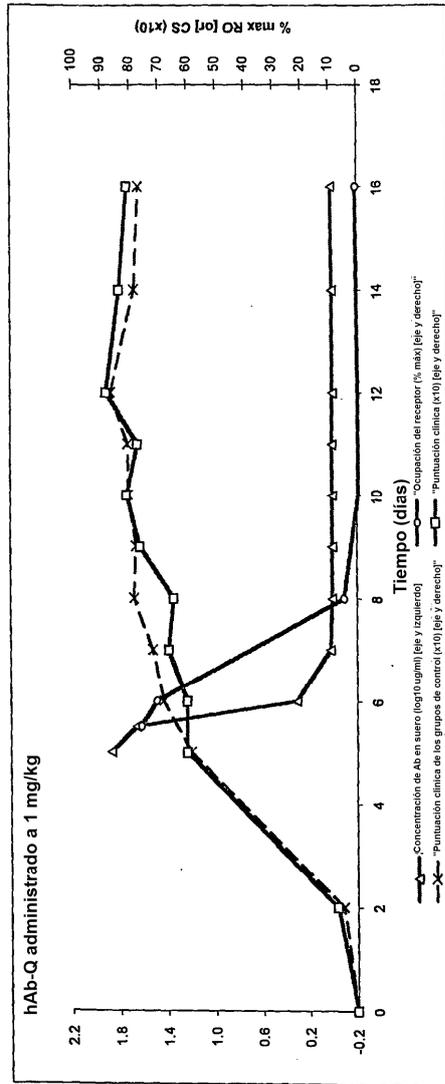


Figura 42

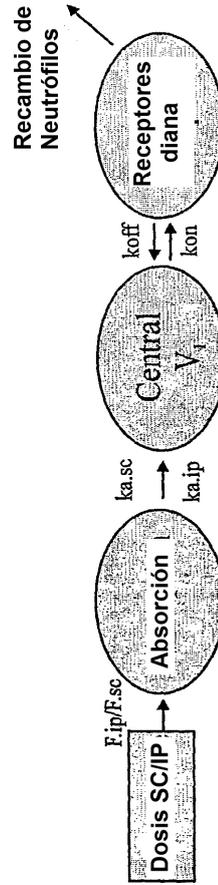


Figura 43

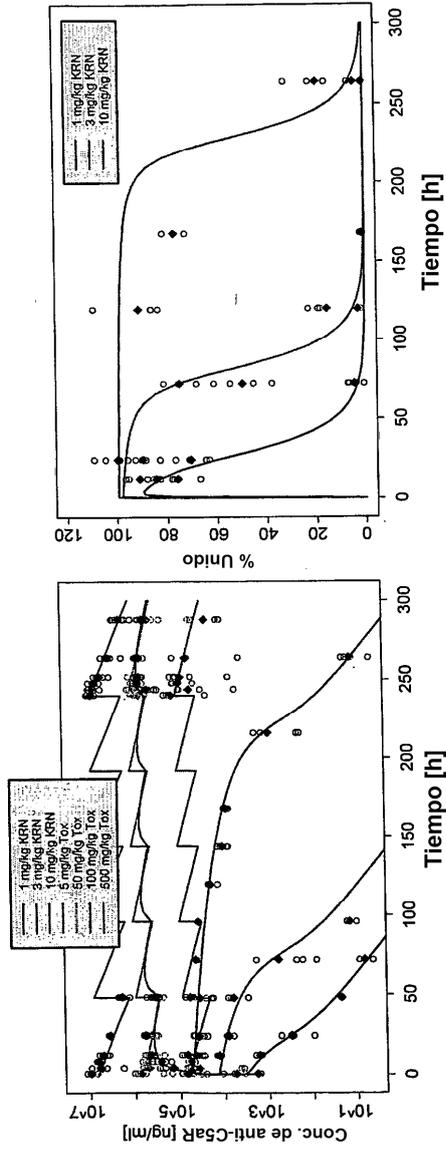


Figura 44

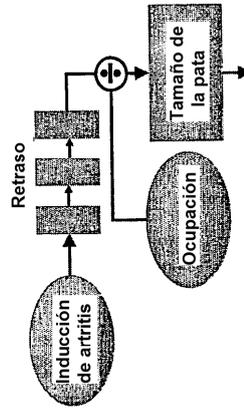


Figura 45

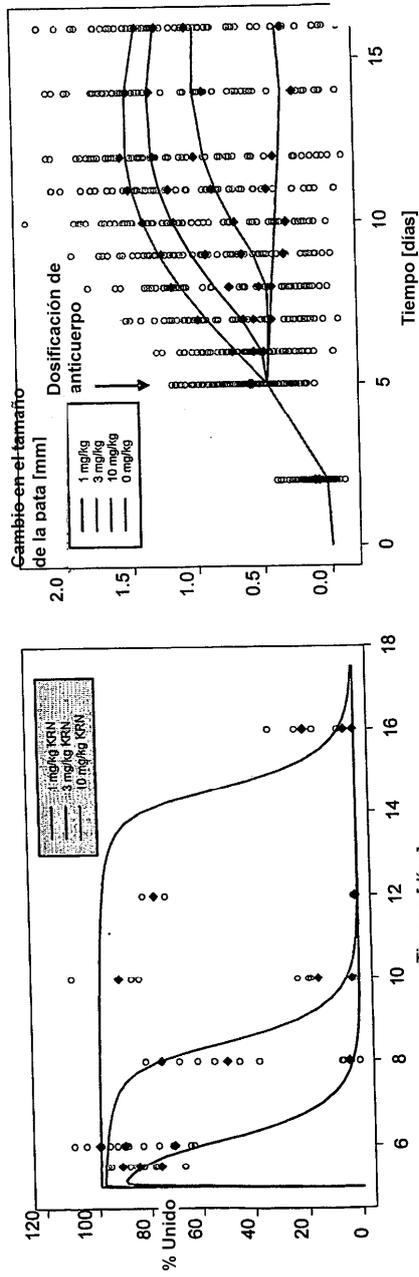


Figura 46

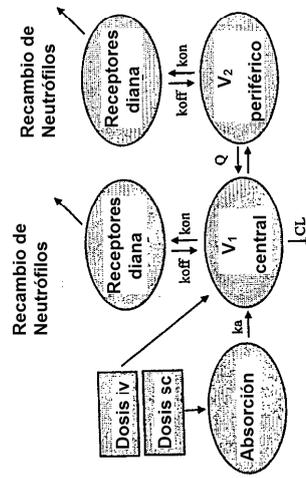


Figura 47

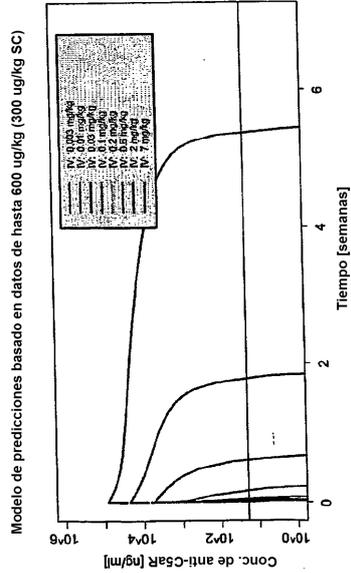
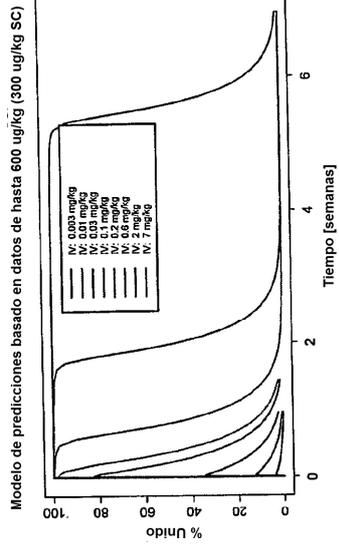


Figura 48

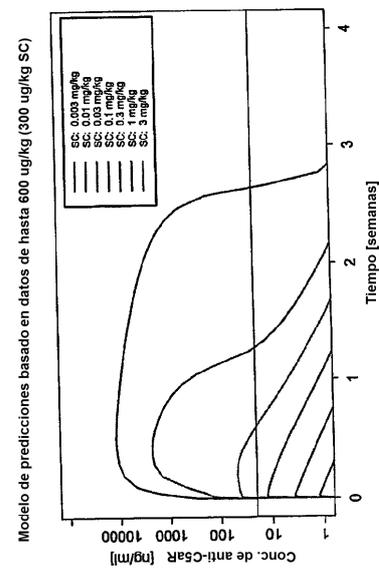
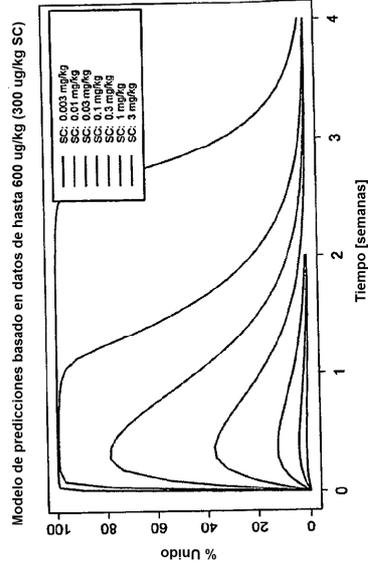


Figura 49