



# OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 570 153

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 22.08.2007 E 12155157 (6)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: 10.02.2016 EP 2455404

54 Título: Anticuerpos anti-C5aR con propiedades mejoradas

(30) Prioridad:

22.08.2006 US 839634 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 17.05.2016

(73) Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%) Novo Allé 2880 Bagsværd, DK

(72) Inventor/es:

**MACKAY, CHARLES REAY** 

(74) Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario** 

## **DESCRIPCIÓN**

Anticuerpos anti-C5aR con propiedades mejoradas

#### Campo de la invención

10

15

50

La presente invención se refiere a anticuerpos mejorados que se unen a C5aR y que son útiles en métodos de dia-5 gnóstico y terapéuticos.

### Antecedentes de la invención

La proteólisis de cada una de las proteínas del complemento C3-C5 da lugar a fragmentos catiónicos aminoterminales con moléculas de señalización denominadas anafilotoxinas (6-9). 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 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. C5a está implicada en la patogénesis de 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 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 con alta afinidad 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 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 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 debe reducir la respuesta inflamatoria aguda mediada a través de C5a, sin afectar a otros componentes del complemento. Con este fin, se han descrito previamente 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). Por ejemplo, el documento WO95/00164 (Scripps Research Inst.) describe anticuerpos dirigidos contra un péptido N-terminal (residuos 9-29) del receptor de C5a.
- 35 El documento WO 03/062278 (G2 Therapies) describe anticuerpos dirigidos a los bucles extracelulares de C5aR distintos del dominio N-terminal, que son eficaces en la inhibición de la unión entre C5a y C5aR. Anticuerpos monoclonales específicos descritos en esa solicitud son AcMo 7F3, AcMo 12D4 y AcMo 6C12. Entre estos anticuerpos monoclonales, AcMo 7F3 tiene la mayor afinidad de unión hacia C5aR.

## Compendio de la invención

40 El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no forma parte de las reivindicaciones, se proporciona únicamente como información.

Los presentes inventores han desarrollado ahora nuevos anticuerpos monoclonales que han mejorado sustancialmente las afinidades de unión a C5aR, en comparación con el AcMo 7F3 y son muy efectivos en la reversión de la inflamación en un modelo de artritis de ratón.

- 45 En un aspecto, el anticuerpo se une a C5aR humano o a un fragmento del mismo con
  - (i) un valor de CI<sub>50</sub> que es al menos 1,5 veces menor que el de AcMo7F3 cuando se determina en condiciones idénticas; o
  - (ii) una constante de asociación (Kon) que es al menos 1,5 veces mayor que la de AcMo7F3 cuando se determina en condiciones idénticas; o
  - (iii) una constante de afinidad K<sub>D</sub> que es al menos 1,3 veces menor que la de AcMo7F3 cuando se determina en condiciones idénticas.

Preferiblemente, el anticuerpo se une a C5aR humano o a un fragmento del mismo con una constante de afinidad K<sub>D</sub>

que es al menos 1,4 veces menor que la de AcMo7F3, cuando se determina en condiciones idénticas.

En un aspecto adicional, el anticuerpo se une a C5aR humano o a un fragmento del mismo con

- (i) un valor de  $Cl_{50}$  que es inferior a 500 pM, preferiblemente menor de 300 pM y más preferiblemente menor de 200 pM; o
- (ii) una constante de asociación (Kon) que es al menos 6,8 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>; o
- (iii) una constante de afinidad K<sub>D</sub> que es menor de 1,4 Nm.

5

15

45

Preferiblemente, el anticuerpo se une a C5aR humano o a un fragmento del mismo con

- (ii) una constante de asociación (Kon) que es al menos 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>; o
- (iii) una constante de afinidad K<sub>D</sub> que es menor de 0,5 nM.
- 10 Preferiblemente, el fragmento de C5aR es un péptido que comprende la secuencia LYRVVREEYFPPKVLCGVDYSHDKRRERAVAIV (SEQ ID NO: 2).

La presente descripción también proporciona un anticuerpo que comprende al menos una secuencia de bucle de CDR que comparte al menos un 80% de identidad con una secuencia de bucle de CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena pesada variable tal y como se muestra en SEQ ID NO: 5 [7H3 Vh], en donde el anticuerpo reduce o inhibe la unión entre C5a y C5aR.

En un aspecto adicional, el anticuerpo comprende al menos dos secuencias de bucle de CDR que comparten al menos un 80% de identidad con secuencias de bucle de CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena pesada variable tal y como se muestra en SEQ ID NO: 5 [7H3 Vh].

En un aspecto adicional, el anticuerpo comprende además al menos una secuencia de bucle de CDR que comparte al menos un 80% de identidad con una secuencia de bucle de CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena ligera variable tal y como se muestra en SEQ ID NO: 6 [7H3 V1].

En un aspecto adicional, el anticuerpo comprende al menos dos secuencias de bucle de CDR que comparten una identidad de al menos el 80% con una secuencia de bucle de CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena ligera variable tal y como se muestra en SEQ ID NO: 6 [7H3 V1].

En un aspecto adicional, el anticuerpo comprende una secuencia que comparte al menos un 80% de identidad con secuencias de la cadena pesada y/o de la cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente, en donde el anticuerpo reduce o inhibe la unión entre C5a y C5aR.

En realizaciones preferidas de la presente invención, el anticuerpo es reactivo con el segundo bucle extracelular (residuos 175 a 206) de C5aR humano.

30 En otras realizaciones preferidas, el anticuerpo es reactivo con un epítopo que comprende los residuos 179-184 (EEYFPP) de C5aR humano.

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

El anticuerpo puede tener cualquier isotipo. En una realización preferida adicional de la presente invención, sin embargo, el anticuerpo es un anticuerpo de la clase IgG2a o de la clase IgG3.

En otra realización preferida de la invención, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal AcMo 7H3.

La presente invención también proporciona un hibridoma depositado en la ECACC con el número de orden 06081802.

Se apreciará que también se pueden producir varios derivados químicos de los anticuerpos de la invención. Por ejemplo, inmunoconjugados que consisten en un anticuerpo de la presente invención unido a un marcador tal como un radioisótopo u otra molécula marcadora, se pueden preparar por métodos conocidos en la técnica. Alternativamente, el anticuerpo puede estar unido a una molécula terapéuticamente útil que se dirige a su sitio de acción deseado en virtud de la especificidad de unión del anticuerpo.

De acuerdo con ello, la presente invención también proporciona un conjugado que comprende un anticuerpo de la presente invención y un agente terapéutico.

Se apreciará que se puede emplear una gama de agentes terapéuticos en el contexto de la presente invención. Agentes terapéuticos preferidos incluyen agentes que median en la muerte celular o la inactivación de proteínas. El agente terapéutico puede ser cualquiera entre un gran número de toxinas conocidas en la técnica. La toxina puede

ser una exotoxina de Pseudomonas o un derivado de la misma. En una realización preferida, la toxina es PE40.

La presente invención también proporciona un conjugado que comprende un anticuerpo de la presente invención y un marcador detectable.

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

La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada, comprendiendo la molécula de ácido nucleico una secuencia que codifica un anticuerpo de la presente invención.

La presente invención también proporciona una composición que comprende un anticuerpo de acuerdo con la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 La presente invención también proporciona un anticuerpo de la presente invención para uso como medicamento.

La presente invención también proporciona un método para el diagnóstico de un trastorno que implica la migración de leucocitos o neutrófilos en un sujeto, comprendiendo el método poner en contacto una muestra obtenida a partir del sujeto *in vitro* con un conjugado de la presente invención, y detectar la unión inmunoespecífica entre el conjugado y la muestra.

La presente invención también proporciona un anticuerpo de la presente invención para uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno que implica la migración de leucocitos o neutrófilos.

La presente invención también proporciona un anticuerpo de la presente invención para uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inmunopatológica.

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

5

30

35

40

50

La presente invención también proporciona un método para inhibir la interacción de una célula portadora de C5aR con un ligando del mismo, comprendiendo el método exponer la célula a un anticuerpo de la presente invención.

La presente invención también proporciona un método para inhibir la actividad de C5aR en una célula, comprendiendo el método exponer la célula a un anticuerpo de la presente invención.

La presente descripción también proporciona un método para tratar un trastorno que implica la migración de neutrófilos en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto un anticuerpo de la presente invención.

Los expertos en la técnica apreciarán que los anticuerpos de la presente invención también se pueden utilizar para detectar, cuantificar y/o localizar células que expresan C5aR.

De acuerdo con ello, la presente descripción también proporciona un método para el diagnóstico de un trastorno que implica la migración de neutrófilos en un sujeto, comprendiendo el método poner en contacto una muestra obtenida a partir del sujeto con un conjugado de la presente invención, y detectar la unión inmunoespecífica entre el conjugado y la muestra.

Se puede utilizar una variedad de inmunoensayos en los métodos de diagnóstico. Tales inmunoensayos incluyen sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que emplean técnicas tales como radioinmunoensayos, ELISA, inmunoensayos de tipo "sándwich", reacciones de precipitina, reacciones de precipitina con difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunorradiométricos, inmunoensayos fluorescentes y similares. Se pueden utilizar ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*.

La muestra obtenida a partir del sujeto puede comprender cualquier fluido corporal, tal como sangre periférica, plasma, líquido linfático, líquido peritoneal, líquido cefalorraquídeo o líquido pleural, o cualquier tejido del cuerpo. La unión *in vitro* se puede realizar utilizando muestras histológicas o subfracciones de tejido o fluido. La unión *in vivo* se puede conseguir mediante la administración del conjugado por cualquier medio conocido en la técnica (tal como intravenoso, intraperitoneal, intraarterial, etc.) de modo que se pueda detectar la unión inmunoespecífica.

Además, se pueden emplear técnicas de formación de imágenes, en las que un anticuerpo de la presente invención se une a un marcador adecuado formador de imágenes. El anticuerpo marcado se puede administrar *in vivo* para determinar la localización de C5aR en un sujeto.

De acuerdo con ello, la presente descripción también proporciona un método para el diagnóstico de un trastorno que implica la migración de neutrófilos en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto un anticuerpo de la presente invención marcado con un agente formador de imágenes, en condiciones tales que se forma un complejo entre el anticuerpo y las células presentadoras de C5aR en el sujeto, y en donde el complejo forma una imagen.

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

La presente descripción también proporciona un método para suministrar un agente terapéutico a un sitio de inflamación en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto un conjugado de la presente invención.

La presente descripción también proporciona un método para introducir material genético en células presentadoras de C5aR, comprendiendo el método poner en contacto las células con un anticuerpo de la presente invención, en donde el anticuerpo está fijado a o asociado con material genético.

En una realización preferida, las células presentadoras de C5aR se seleccionan a partir del grupo que consiste en granulocitos, leucocitos, tales como monocitos, macrófagos, basófilos y eosinófilos, mastocitos y linfocitos incluyendo linfocitos T, células dendríticas y células no mieloides tales como células endoteliales y células musculares lisas.

También se incluyen en la presente descripción métodos para identificar ligandos adicionales u otras sustancias que se unen C5aR, incluyendo inhibidores y/o promotores de la función de C5aR de mamífero. Por ejemplo, los agentes que tienen la misma especificidad de unión o una similar a la de un anticuerpo de la presente invención o un fragmento funcional del mismo, se pueden identificar a través de un ensayo de competición con dicho anticuerpo o fragmento. Por lo tanto, la presente descripción también incluye métodos para identificar ligandos u otras sustancias que se unen C5aR, incluyendo inhibidores (por ejemplo, antagonistas) o promotores (por ejemplo, agonistas) de la función del receptor. En una realización, las células que expresan de forma natural C5aR o células hospedadoras adecuadas que se han modificado genéticamente para expresar C5aR o una variante codificada por ácido nucleico introducido en dichas células, se utilizan en un ensayo para identificar y evaluar la eficacia de ligandos, inhibidores o promotores de la función del receptor. Tales células también son útiles en la evaluación de la función de la proteína o del polipéptido del receptor expresado.

### 20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

25

50

55

**Figura 1**. Los AcMos anti-C5aR humano generados a partir de ratones inmunizados con células L1.2/hC5aR inhibían la unión de <sup>125</sup>I-C5a a neutrófilos humanos en diversos grados. La barra de error indica la DE.

**Figura 2**. Mapa del locus de C5aR en ratón de tipo silvestre y vector dirigido a la diana utilizado para construir ratones con inserción de la secuencia de hC5aR. La CDS del exón 3 del gen de C5aR de ratón se sustituyó con precisión por la CDS del exón 3 del gen de C5aR humano en el vector dirigido a la diana. Las secuencias que flanqueaban el gen de C5aR de ratón permitían la recombinación homóloga. El marcador de selección PGKneo flanqueado por sitios loxP se eliminó del primer ratón con inserción de secuencia utilizando Cre. Las sondas 3' y 5' se utilizaron para confirmar que el vector dirigido a la diana se había recombinado correctamente en el locus de C5aR de ratón. X, Xbal; V, EcoRV.

- Figura 3. Transferencia Southern de ADN genómico digerido con EcoRV obtenido de las colas de ratones procedentes de un cruce entre ratones con inserción de la secuencia de hC5aR heterocigotos (hC5R1\*/-). La transferencia se hibridó con la sonda 3', que distingue entre el alelo de C5aR ratón (10,0 kb) y el alelo con inserción de la secuencia de hC5aR (8,1 kb).
- **Figura 4**. Expresión de C5aR en neutrófilos de ratón *hC5R1*<sup>+/-</sup>, *hC5R1*<sup>+/-</sup> y de tipo silvestre (Wt). Los neutrófilos se tiñeron con AcMo anti-C5aR humano conjugado con FITC (7F3) o AcMo anti-C5aR de ratón 20/70.
  - **Figura 5**. Los anticuerpos generados a partir de neutrófilos de ratones hCSaR<sup>+/+</sup> mostraban un amplio espectro de inhibición de la unión de <sup>125</sup>I-C5a, que oscilaba desde una inhibición completa a una inhibición parcial o reducida, dependiendo del clon de AcMo. Los resultados son representativos de al menos dos experimentos independientes para cada anticuerpo y la barra de error indica el e.e.m.
- **Figura 6**. AcMos anti-C5aR tienen valores subnanomolares de CI<sub>50</sub>. Los anticuerpos generados usando neutrófilos de ratones *hC5R1*\*/+ (3C5, 7H3 y 8G7) mostraron 5-10 veces menos CI<sub>50</sub> que el mejor AcMo generado utilizando transfectantes L1.2/hC5aR (7F3). Los valores de CI<sub>50</sub> se determinaron a partir de 3 o 4 experimentos independientes de unión competitiva del ligando <sup>125</sup>I-C5a.
- **Figura 7**. Ensayo de unión competitiva del ligando que muestra un desplazamiento de <sup>125</sup>I-C5a desde hC5aR en células L1.2 transfectadas con hC5aR con 7F3 o 3C5. Los valores de CE<sub>50</sub> se determinaron a partir de 2 o 3 experimentos independientes.
  - Figura 8. Unión relativa de AcMos específicos de C5aR a los receptores C5aR quiméricos humano/ratón. Los receptores quiméricos se muestran esquemáticamente (regiones obtenidas a partir de hC5aR se muestran en rojo y a partir de mC5aR en negro). El origen de los cuatro dominios extracelulares se designa por un código de 4 letras (HHHH es C5aR humano de tipo silvestre, mHHH tiene un dominio extracelular N-terminal de ratón y el primero, el segundo y el tercer bucle extracelular humano, etc.). Células L1.2 transfectadas transitoriamente que expresaban receptores quiméricos se tiñeron con los diversos AcMos anti-C5aR. Todos los AcMos anti-hC5aR mostraron perfiles de unión distintos, restringidos por el dominio, que se unían a los receptores que contenían el extremo N-terminal de C5aR humano o el 2º bucle extracelular. El AcMo anti-C5aR de ratón 20/70 se une a receptores quiméricos que contienen el 2º bucle extracelular de C5aR de ratón.

- **Figura 9**. Gráfico de puntos que muestra el grado en que cada AcMo anti-hC5aR individual inhibía la unión de C5a a neutrófilos humanos. Los AcMos se agrupan de acuerdo con el dominio del receptor que reconocen. Los AcMos bloqueadores más potentes (aquellos que inhiben la unión de C5a en >90%), estaban todos cartografiados en el 2º bucle extracelular de hC5aR.
- Figura 10. Cartografiado de sitios de unión de anticuerpos en el 2º bucle extracelular de hC5aR mediante ELISA con péptidos. Los AcMos 7F3 y 3C5 se unían a todos los péptidos solapantes del 2º bucle extracelular de hC5aR que contenían la secuencia 179EEYFPP184.
  - **Figura 11**. (a). El cartografiado de los residuos de contacto de anticuerpos empleando mutantes de alanina de péptidos de 12 meros identificaba los residuos decisivos en hC5aR reconocidos por los AcMos 7F3 y 3C5. (b). El cartografiado de los residuos de contacto de anticuerpos empleando mutantes de alanina de péptidos de 12 meros identificaba los residuos decisivos en hC5aR reconocidos por los AcMos 8G7 y 7H3.
    - **Figura 12**. Tasas de asociación y de disociación y afinidades de unión de los AcMos 7F3, 3C5, 8G7 y 7H3 para el péptido 23 en un ensayo Biacore.
- **Figura 13**. Comparación de la eficacia terapéutica de los AcMos anti-hC5aR. Ratones  $hC5R1^{+/+}$  fueron inyectados por vía i.p. con 7F3, 3C5 o 8G7 (a 1 mg/kg o 3 mg/kg en PBS) una vez, el día 5 después de haber desarrollado inflamación. El grupo control recibió PBS. El gráfico muestra los cambios en el tamaño de la pata (tobillo) desde el día 0. Promedio del grupo (n = 5-7 por grupo).
  - **Figura 14**. Comparación de la eficacia terapéutica de los AcMos anti-hC5aR. Ratones *hCSR1*<sup>+/+</sup> fueron inyectados por vía i.p. con 7F3, 3C5 o 8G7 (a 1 mg/kg o 3 mg/kg en PBS) una vez, el día 5 después de haber desarrollado inflamación. El grupo control recibió PBS. El gráfico muestra las puntuaciones clínicas. Promedio del grupo (n = 5-7 por grupo).

## CLAVE PARA LOS LISTADOS DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1	Secuencia proteica de C5aR humano
SEQ ID NO: 2	Péptido de C5aR humano
SEQ ID NO: 3	Secuencia (proteica) de la cadena pesada variable de 3C5
SEQ ID NO: 4	Secuencia (proteica) de la cadena ligera variable de 3C5
SEQ ID NO: 5	Secuencia (proteica) de la cadena pesada variable de 7H3
SEQ ID NO: 6	Secuencia (proteica) de la cadena ligera variable de 7H3
SEQ ID NO: 7	Secuencia (proteica) de la cadena pesada variable de 8G7
SEQ ID NO: 8	Secuencia (proteica) de la cadena ligera variable de 8G7
SEQ ID NO: 9	Péptido de C5aR humano modificado
SEQ ID NOs: 10-25	Cebadores para la construcción de C5aRs quiméricos de ratón/humanos
SEQ ID NO: 26	Péptido de C5aR humano biotinilado (2º bucle extracelular)
SEQ ID NO: 27	Residuos 179 a 184 del 2º bucle extracelular de C5aR humano
SEQ ID NO: 28-50	Solapamiento de péptidos de 12 meros del 2º bucle extracelular de C5aR humano que contiene la secuencia EEYFPP
SEQ ID NO: 51-62	Mutantes de alanina de la secuencia del péptido VREEYFPPKVLC
SEQ ID NO: 63	Péptido VREEYFPPKVLC desorganizado

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no está recogida en las reivindicaciones se proporciona únicamente como información.

## Estructura de C5aR

10

20

25

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

	aminoácidos 133 - 149 aminoácidos 150 - 174 aminoácidos 175 - 206 aminoácidos 207 - 227	dominio intracelular dominio transmembranal dominio extracelular - bucle extracelular 2 dominio transmembranal
5	aminoácidos 228 - 242 aminoácidos 243 - 264	dominio intracelular dominio transmembranal
	aminoácidos 265 - 283 aminoácidos 284 - 307 aminoácidos 308 - 350	dominio extracelular - bucle extracelular 3 dominio transmembranal dominio intracelular - C-terminal.

### 10 Detalles del Depósito de Microorganismos

El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal designado 3C5, se depositó en la ECACC con el número de orden 06081801.

El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal designado 7H3, se depositó en la ECACC con el número de orden 06081802.

15 El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal designado 8G7, se depositó en la ECACC con el número de orden 06081803.

Estos depósitos se realizaron bajo las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento de Patentes y su Reglamento. Esto asegura el mantenimiento de cultivos viables durante 30 años a partir de la fecha de depósito. Los organismos serán puestos a disposición por la ECACC bajo los términos del Tratado de Budapest, que asegura la disponibilidad permanente y no restringida al público de la progenie del cultivo tras la publicación de la pertinente patente.

El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si el depósito del cultivo muriera o se perdiera o se destruyera cuando se cultiva en condiciones adecuadas, será reemplazado de inmediato después de la notificación con un espécimen viable del mismo cultivo. La disponibilidad de una cepa depositada no ha de interpretarse como una licencia para poner en práctica la invención en contravención de los derechos otorgados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

## Anticuerpos

20

25

35

40

45

Los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos policionales, monocionales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

- 30 El término "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 con su antígeno o receptor y se definen del modo siguiente:
  - (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 la cadena pesada;
    - (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo se puede obtener tratando un anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para producir una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo;
  - (3) (Fab')<sub>2</sub>, 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 unidos 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) 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; y
    - (6) Anticuerpo de dominio sencillo, normalmente un dominio pesado variable que carece de una cadena ligera
- 50 Los anticuerpos preferidos de la presente descripción comprenden regiones variables o uno o varios bucles de CDRs que son sustancialmente los mismos que los de los AcMos 3C5, 7H3 o 8G7.

Las secuencias de las regiones variables para los AcMos 3C5, 7H3 o 8G7 se exponen en SEQ ID Nos 3 a 8. Los

bucles de CDRs de cada una de estas regiones variables se definen del modo siguiente:

```
AcMo 3C5
             CDR H1: residuos 26-36 de SEQ ID NO: 3 (inclusive);
             CDR H2: residuos 51-66 de SEQ ID NO: 3 (inclusive):
 5
             CDR H3: residuos 97-108 de SEQ ID NO: 3 (inclusive);
             CDR L1: residuos 24-39 de SEQ ID NO: 4 (inclusive);
             CDR L2: residuos 55-61 de SEQ ID NO: 4 (inclusive);
             CDR L3: residuos 94-102 de SEQ ID NO: 4 (inclusive).
             AcMo 7H3
             CDR H1: residuos 26-35 de SEQ ID NO: 5 (inclusive);
10
             CDR H2: residuos 50-68 de SEQ ID NO: 5 (inclusive);
             CDR H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO: 5 (inclusive);
             CDR L1: residuos 24-39 de SEQ ID NO: 6 (inclusive);
             CDR L2: residuos 55-61 de SEQ ID NO: 6 (inclusive);
             CDR L3: residuos 94-102 de SEQ ID NO: 6 (inclusive).
15
             CDR H1: residuos 26-36 de SEQ ID NO: 7 (inclusive):
             CDR H2: residuos 51-66 de SEQ ID NO: 7 (inclusive);
             CDR H3: residuos 97-108 de SEQ ID NO: 7 (inclusive);
20
             CDR L1: residuos 24-39 de SEQ ID NO: 8 (inclusive);
             CDR L2: residuos 55-61 de SEQ ID NO: 8 (inclusive);
             CDR L3: residuos 94-102 de SEQ ID NO: 8 (inclusive).
```

Las CDRs L1, L2, L3 y H2 son como se han definido por Kabat. Los límites de las CDRs H1 y H3 se modifican de la definición de Kabat e incluyen residuos adicionales en su extremo N-terminal. CDR H1 se extiende para incluir los residuos definidos por Chothia como parte de CDR-H1. CDR H3 se extiende para incluir 2 residuos de "contacto". Véase <a href="http://www.bioinfo.org.uk/abs">http://www.bioinfo.org.uk/abs</a> para obtener información sobre la numeración de Kabat, la definición de CDRs y los residuos de contacto entre Ab y antígeno.

Es interesante observar que los bucles de CDRs de los AcMos 3C5 y 8G7 comparten el siguiente nivel de identidad de secuencia:

% de identidad	CDR1	CDR2	CDR3
3C5 frente a 8G7	10/11 91%	13/16 81%	10/12 83%

30

35

45

50

25

Se entenderá que las regiones variables o bucles de CDRs mostrados en los listados de secuencias se pueden modificar para el uso en la presente descripción. Normalmente, se realizan modificaciones que conservan la especificidad de la unión de la secuencia. Se pueden realizar sustituciones conservadoras, por ejemplo, sin afectar a la especificidad de la unión del anticuerpo. La presente descripción incluye anticuerpos que comprenden al menos un bucle de CDR que tiene al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98% de identidad con un bucle de CDR dentro de una cualquiera de SEQ ID Nos: 3 a 8. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de 1, 2, 3 o 4 aminoácidos dentro del bucle de CDR, siempre que la secuencia modificada conserve sustancialmente la misma especificidad de la unión.

40 En una realización alternativa, se pueden realizar modificaciones en las secuencias de aminoácidos de un anticuerpo de la descripción de forma intencionada para reducir la actividad biológica del anticuerpo. Por ejemplo, anticuerpos modificados que siguen siendo capaces de unirse a C5aR pero que carecen de dominios efectores funcionales, pueden ser útiles como inhibidores de la actividad biológica de C5aR.

Las sustituciones de aminoácidos también pueden incluir el uso de análogos no naturales, por ejemplo, para aumentar la semivida plasmática en sangre de un anticuerpo administrado terapéuticamente.

En general, preferiblemente se modifican menos del 20%, 10% o 5% de los residuos de aminoácidos de una variante o derivados, en comparación con las regiones variables correspondientes o bucles de CDRs descritos en el listado de secuencias.

En el contexto de la presente descripción, una secuencia "sustancialmente igual" que una de las regiones variables que se muestra es el listado de secuencias, puede incluir una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85% o 90% idéntica, preferiblemente al menos 95 o 98% idéntica a nivel de aminoácidos a lo largo de al menos 20, preferiblemente al menos 50 aminoácidos, con la región variable. La homología generalmente se debe considerar con respecto a aquellas regiones de la secuencia que se conocen por ser esenciales para la especificidad de la unión, en lugar de secuencias vecinas no esenciales.

Las comparaciones para la homología se pueden realizar visualmente, o más generalmente, con ayuda de programas de comparación de secuencias de fácil acceso. Estos programas informáticos disponibles comercialmente pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

El porcentaje de homología se puede calcular sobre secuencias contiguas, es decir, una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un residuo cada vez. Esto se denomina una alineación "sin huecos". Normalmente, tales alineaciones sin huecos se realizan solo sobre un número relativamente bajo de residuos (por ejemplo menos de 50 aminoácidos contiguos).

Aunque este es un método muy simple y consistente, no tiene en consideración, por ejemplo, que en una pareja de secuencias que es por lo demás idéntica, una inserción o deleción provocará que los siguientes residuos de aminoácidos estén fuera de la alineación, por tanto, dando como resultado potencialmente una gran reducción en el % de homología cuando se realiza una alineación global. En consecuencia, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias se diseñan para producir alineaciones óptimas que tengan en cuenta posibles inserciones y deleciones sin penalizar indebidamente la puntuación global de la homología. Esto se logra insertando "huecos" en la alineación de las secuencias para intentar maximizar la homología local.

La mayoría de los programas de alineación permiten modificar las penalizaciones por hueco. Sin embargo, se prefiere utilizar los valores por defecto cuando se utiliza tal programa informático para comparaciones de secuencias. Por ejemplo, cuando se utiliza el paquete GCG Wisconsin Bestfit (véase a continuación) la penalización por hueco por defecto para secuencias de aminoácidos es -12 para un hueco y -4 para cada extensión.

El cálculo del % máximo de homología, por tanto, requiere en primer lugar la producción de una alineación óptima, teniendo en consideración las penalizaciones por hueco. Un programa informático adecuado para llevar a cabo dicha alineación es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Universidad de Wisconsin, EE. UU.; Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387). Ejemplos de otros programas informáticos que pueden realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete BLAST (véase Ausubel et al., 1999 ibid. - Capítulo 18), FASTA (Atschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 403-410) y la serie de herramientas de comparación de GENEWORKS. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para la búsqueda fuera de línea y en línea (véase Ausubel et al., 1999 ibid, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo se prefiere utilizar el programa GCG Bestfit.

Aunque el % de homología final puede medirse en términos de identidad, el proceso de alineación en sí normalmente no se basa en una comparación de parejas de todo o nada. En su lugar, se utiliza generalmente una matriz de puntuación de similitud a escala que asigna puntuaciones a cada comparación por parejas, basándose en la similitud química o la distancia evolutiva. Un ejemplo de una matriz de este tipo utilizada comúnmente es la matriz BLO-SUM62 - la matriz por defecto para el conjunto de programas BLAST. Los programas GCG Wisconsin generalmente utilizan cualquiera de los valores por defecto públicos o una tabla de comparación de símbolos personalizada, si se suministra (véase el manual del usuario para más detalles). Se prefiere utilizar los valores por defecto públicos para el paquete GCG, o en el caso de otro programa informático, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

Una vez que el programa informático ha producido una alineación óptima, es posible calcular el % de homología, preferentemente el % de identidad de secuencia. El programa informático hace esto normalmente como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

#### Anticuerpos policionales

30

35

50

Un anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo policional. Los métodos para preparar anticuerpos policionales son conocidos por el experto en la materia. Los anticuerpos policionales se pueden obtener en un mamífero, por ejemplo, mediante una o varias inyecciones de las células que expresan el polipéptido de la primera especie obtenidas a partir del mamífero transgénico y, si se desea, un adyuvante. Por lo general, se inyectarán las células y/o el adyuvante en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. Ejemplos de adyuvantes que se pueden emplear incluyen el adyuvante completo de Freund y el adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización lo puede seleccionar un experto en la técnica sin una experimentación indebida.

## Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos producidos por el método de la invención pueden ser, alternativamente, anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, un hámster u otro animal hospedador apropiado, normalmente se inmuniza con las células que expresan el polipéptido de la primera especie obtenidas a partir del mamífero transgénico para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al polipéptido de la primera especie.

En general, si se desean células de origen humano se utilizan linfocitos de sangre periférica ("PBLs"), o se usan células de bazo o células de nódulos linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Los linfocitos se fusionan después con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilengli-

col, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) págs. 59-103). Las líneas celulares inmortalizadas son generalmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de roedor, bovinas y humanas. Por lo general, se emplean líneas de células de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o varias sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo de los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que evitan el crecimiento de células que carecen de HGPRT.

Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, favorecen un nivel de expresión elevado, estable de los anticuerpos a través de las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino que se pueden obtener, por ejemplo, a partir del Centro de Distribución de Células del Salk Institute, San Diego, Calif., y la "American Type Culture Collection", Manassas, Va. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) págs. 51-63).

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se puede someter a ensayo, a continuación, para estudiar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido de la primera especie. Preferiblemente, la especificidad de la unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Dichas técnicas y ensayos son conocidos en la técnica. La afinidad de la unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar mediante procedimientos convencionales. Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, Medio Eagle Modificado con Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden aislar o purificar a partir del medio de cultivo o el fluido de ascitis mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía con hidroxiapatita, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía de afinidad

Los anticuerpos monoclonales también se pueden preparar mediante métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en el documento de Patente de EE. UU. nº 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se puede aislar fácilmente y secuenciar utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican la cadena pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como una fuente preferida de ADN de este tipo. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que se transfectan a continuación en células hospedadoras tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen una proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia que codifica los dominios constantes de la cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (documento de Patente de EE. UU. nº 4.816.567) o mediante la unión covalente a la secuencia que codifica la inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia que codifica un polipéptido que no es inmunoglobulina de este tipo se puede sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o se puede sustituir por los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo de la invención, para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de una cadena ligera de inmunoglobulina y una cadena pesada modificada. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc para evitar la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína relevantes se sustituyen por otro residuo de aminoácido o se delecionan para evitar una reticulación.

Los métodos *in vitro* son también adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente, fragmentos Fab, se puede conseguir usando métodos rutinarios conocidos en la técnica.

### 55 Anticuerpos humanos y humanizados

20

25

30

35

40

45

50

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias que se unen

a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima obtenida a partir de una inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que residuos procedentes de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor, se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos estructurales de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDRs o estructurales importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDRs se corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FRs son las de una secuencia de consenso de una inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de forma óptima al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)).

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o varios residuos de aminoácidos introducidos en el mismo, procedentes de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente residuos "importados", los cuales normalmente se obtienen a partir de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986);
 Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de CDRs de roedor o secuencias de CDRs por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (documento de Patente de EE. UU. nº 4.816.567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDRs y posiblemente algunos residuos de FRs, se sustituyen por residuos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando diversos métodos conocidos en la técnica, que incluyen genotecas de presentación en fagos (Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77 (1985) y Boerner et al., J. Immunol, 147(1):86-95 (1991)). De manera similar, los anticuerpos humanos se pueden preparar mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes endógenos de inmunoglobulina han sido parcial o completamente inactivados. Después de la estimulación, se observa una producción de anticuerpos humanos, que se asemeja bastante a la observada en los seres humanos en todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento génico, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en los documentos de Patente de EE. UU. nº 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996.); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995).

Los anticuerpos también se pueden madurar por afinidad usando métodos de selección y/o mutagénesis conocidos, tales como los conocidos en la técnica. Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tienen una afinidad que es cinco veces, más preferiblemente 10 veces, incluso más preferiblemente 20 o 30 veces mayor que la del anticuerpo de partida (generalmente murino, humanizado o humano) a partir del cual se prepara el anticuerpo madurado

## Anticuerpos biespecíficos

5

10

30

35

40

45

50

55

60

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Por ejemplo, una de las especificidades de unión puede ser para C5aR, la otra puede ser para cualquier otro antígeno, y preferentemente para una proteína de la superficie celular o un receptor o una subunidad de receptor.

Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, Nature, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se logra generalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. Procedimientos similares se describen en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo 1993, y en Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

Los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpoantígeno) se pueden fusionar con secuencias del dominio constante de una inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos la parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión distintos y se cotransfectan en un organismo hospedador adecuado. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

Según otro enfoque descrito en el documento WO 96/27011, la interfaz entre una pareja de moléculas de anticuerpos se puede modificar genéticamente para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan a partir del
cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o varias cadenas laterales pequeñas de aminoácidos procedentes
de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo, se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo
tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar al de la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo, mediante la sustitución de cadenas laterales
grandes de aminoácidos por otras más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo
para incrementar el rendimiento en heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodíme-

Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, F(ab')<sub>2</sub>, anticuerpos biespecíficos). Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar usando un enlace químico. Brennan et al., Science 229:81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se cortan proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente que forma un complejo con ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditioles adyacentes y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten después en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB, para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los fragmentos Fab' se pueden recuperar directamente a partir de *E. coli* y acoplados químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) describen la producción de una molécula F(ab').sub.2 de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado era capaz de unirse a células que hiperexpresaban el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos, directamente a partir de un cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se han producido usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina procedentes de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y luego se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión al antígeno. Otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de cadena sencilla (sFv), también se ha descrito. Véase, Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994).

50 Se contemplan los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

## Anticuerpos heteroconjugados

10

15

20

25

40

45

55

60

Los anticuerpos heteroconjugados están también dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune hacia células no deseadas (documento de Patente de EE. UU. nº 4.676.980, y para el tratamiento de la infección por VIH) (documentos WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). 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. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en el documento de

Patente EE. UU. nº 4.676.980.

#### Modificación genética de la función efectora

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, con el fin de mejorar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, se pueden introducir residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodímero generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o un aumento de la muerte celular mediada por el complemento y de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Véase Caron et al., J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodímeros con actividad antitumoral mejorada también se pueden preparar usando reticuladores heterobifuncionales tal como se describe en Wolff et al. Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, un anticuerpo se puede modificar por ingeniería genética de modo que tenga regiones Fc duales y pueda mejorar de ese modo la lisis del complemento y las capacidades de ADCC. Véase Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design. 3: 219-230 (1989).

## Inmunoconjugados

10

40

45

50

55

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

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales inmunoconjugados se han descrito anteriormente. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar, incluyen la cadena A de la 20 difteria, fragmentos activos no enlazantes de la toxina diftérica, la cadena A de la exotoxina (de Pseudomonas aeruginosa), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolaca americana (PAPI, PAPII y PAP-S), el inhibidor de Momordica charantia, curcina, crotina, el inhibidor de Saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, eno-25 micina y los tricotecenos. Una variedad de radionucleidos está disponible para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen .sup.212Bi, sup.131I, .sup.131In, .sup.90Y y .sup.186Re. Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se preparan usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), 30 aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolieno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal y como se describe en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminpentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un ejemplo de agente 35 quelante para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

En otra realización, el anticuerpo se puede conjugar con un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el premarcado de un tumor, en donde el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación de la circulación del conjugado no unido, utilizando un agente de aclaramiento y después la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

## Isotipos de anticuerpos

En ciertas circunstancias, los anticuerpos monoclonales de un isotipo podrían ser más preferibles que los de otro isotipo, en términos de su eficacia diagnóstica o terapéutica. Por ejemplo, por estudios sobre la citolisis mediada por anticuerpos se sabe que anticuerpos monoclonales de ratón sin modificar de isotipo gamma-2a y gamma-3 son generalmente más eficaces en la lisis de células diana que los anticuerpos del isotipo gamma-1. Esta eficacia diferencial se piensa que es debida a la capacidad de los isotipos gamma-2a y gamma-3 para participar más activamente en la destrucción citolítica de las células diana. Los isotipos particulares de un anticuerpo monoclonal se pueden preparar secundariamente, a partir de un hibridoma parental que secreta el anticuerpo monoclonal con un isotipo diferente, mediante el uso de la técnica de selección sib para aislar variantes de cambio de clase (Steplewski, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 82:8653, 1985; Spira, et al., J. Immunol. Methods, 74:307, 1984).

#### Características de la unión

En una realización de la invención, el anticuerpo se define en términos de su valor 50 de concentración inhibitoria.

La expresión "concentración inhibitoria del 50%" (abreviada como " $Cl_{50}$ ") representa la concentración de un inhibidor (por ejemplo, un anticuerpo de la invención) que se requiere para una inhibición del 50% de una actividad determinada de la molécula a la que se dirige el inhibidor (por ejemplo, la unión de C5a a C5aR o a un fragmento del mismo). Un experto en la técnica entenderá que un valor de  $Cl_{50}$  más bajo, se corresponde a un inhibidor más potente.

En una realización, el anticuerpo de la descripción inhibe la unión entre C5a y C5aR con un valor de CI<sub>50</sub> que es al menos 1,5 veces menor que el de AcMo7F3 cuando se determina en condiciones idénticas.

En otra realización, el anticuerpo de la descripción inhibe la unión entre C5a y C5aR con una Cl<sub>50</sub> menor de 500 pM, más preferiblemente menor de 400 pM, más preferiblemente menor de 300 pM y más preferiblemente menor de 200 pM. Preferiblemente, estos valores de Cl<sub>50</sub> se determinan mediante ensayos de unión llevados a cabo usando neutrófilos humanos tal como se describe en los Ejemplos en este documento.

Otra realización de la presente descripción se refiere a anticuerpos que se unen a C5aR o a un fragmento del mismo con una  $K_D$  (constante de afinidad) que es al menos 1,3 veces menor, preferiblemente 1,4 veces menor que la de AcMo7F3 cuando se determina en condiciones idénticas.

10 En otra realización, el anticuerpo de la descripción se une a C5aR o a un fragmento del mismo con una K<sub>D</sub> menor que 1,4 nM, más preferiblemente menor que 0,7 nM, más preferiblemente menor que 0,5 nM, más preferiblemente menor que 0,3 nM.

Otra realización de la presente descripción se refiere a anticuerpos que se unen a C5aR o a un fragmento del mismo con una constante de asociación o tasa K<sub>a</sub> que es al menos 1,5 veces mayor que la de AcMo7F3 cuando se determina en condiciones idénticas.

En otra realización, el anticuerpo de la descripción se une a C5aR o a un fragmento del mismo con una constante de asociación o tasa  $K_a$  que es al menos  $6.8 \times 10^5 \, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ , más preferiblemente al menos  $10^6 \, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ , preferiblemente al menos  $3 \times 10^6 \, \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ .

En una realización, la afinidad de la unión se determina por análisis BIACore de la unión del anticuerpo a un péptido obtenido a partir de C5aR humano. Preferiblemente, el péptido obtenido a partir de C5aR humano comprende la secuencia LYRVVREEYFPPKVLCGVDYSHDKRRERAVAIV (SEQ ID NO: 2). Más preferiblemente, el análisis de la unión se lleva a cabo mediante ensayos de unión BIACore en las condiciones descritas en los ejemplos de esta memoria.

#### Ensayos in vitro

5

15

40

45

50

55

Los anticuerpos monoclonales de la invención son adecuados para el uso *in vitro*, por ejemplo, en inmunoensayos en los que se pueden utilizar en fase líquida o unidos a un vehículo en fase sólida. Los anticuerpos pueden ser útiles para controlar el nivel de C5aR en una muestra. Del mismo modo, los anticuerpos anti-idiotipo son útiles para medir el nivel de C5a en una muestra. Además, los anticuerpos monoclonales en estos inmunoensayos se pueden marcar de forma detectable de varias maneras. Ejemplos de tipos de inmunoensayos que pueden utilizar anticuerpos monoclonales de la invención, son inmunoensayos competitivos y no competitivos en un formato directo o indirecto. Ejemplos de tales inmunoensayos son el radioinmunoensayo (RIA) y el ensayo de tipo sándwich (inmunométrico). La detección de los antígenos usando los anticuerpos monoclonales de la invención se puede realizar utilizando inmunoensayos que se ejecutan ya sea de modo directo, inverso o simultáneo, incluyendo ensayos inmunohistoquímicos sobre muestras fisiológicas. Los expertos en la técnica conocerán, o pueden entender fácilmente, otros formatos de inmunoensayos sin una experimentación indebida.

Los anticuerpos de la invención se pueden unir a muchos vehículos diferentes y utilizar para detectar la presencia de C5aR. Ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los fines de la invención. Los expertos en la técnica conocerán otros vehículos adecuados para la unión de anticuerpos monoclonales, o serán capaces de determinarlos, usando experimentación de rutina.

En una realización, las células que expresan de forma natural C5aR o las células que comprenden una secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica un C5aR o una variante del mismo, se utilizan en ensayos de unión de la presente invención. Las células se mantienen en condiciones apropiadas para la expresión del receptor. Las células se ponen en contacto con un anticuerpo o un fragmento en condiciones adecuadas para la unión (por ejemplo, en un tampón de unión adecuado), y se detecta la unión mediante técnicas convencionales. Para determinar la unión, el grado de unión se puede determinar con respecto a un control adecuado (por ejemplo, en comparación con el fondo determinado en ausencia de anticuerpo, en comparación con la unión de un segundo anticuerpo (es decir, un patrón), en comparación con la unión del anticuerpo a células no transfectadas). Una fracción celular, tal como una fracción de la membrana, que contiene el receptor o liposomas que comprenden el receptor, se puede utilizar en lugar de células completas.

Los ensayos de inhibición de la unión también se pueden utilizar para identificar anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen a C5aR e inhiben la unión de C5a a C5aR o una variante funcional. Por ejemplo, un ensayo de unión se puede llevar a cabo en el cual se detecta o se mide una reducción de la unión de C5a (en presencia del anticuerpo), en comparación con la unión de C5a en ausencia del anticuerpo. Una composición que comprende un C5aR de mamífero aislado y/o recombinante o una variante funcional del mismo, se puede poner en contacto con C5a y el anticuerpo simultáneamente, o uno después del otro, en cualquier orden. Una reducción del grado de unión

del ligando en presencia del anticuerpo, es indicativa de una inhibición de la unión a través del anticuerpo. Por ejemplo, la unión del ligando podría disminuir o suprimirse.

Otros métodos de identificación de la presencia de un anticuerpo que se une a C5aR están disponibles, tales como otros ensayos de unión adecuados, o métodos que controlan eventos que son desencadenantes de la unión al receptor, incluyendo la función de señalización y/o la estimulación de una respuesta celular (por ejemplo, el tráfico de leucocitos). Los anticuerpos que se identifican de esta manera se pueden evaluar adicionalmente para determinar si, después de la unión, actúan para inhibir otras funciones de C5aR y/o para evaluar su utilidad terapéutica.

#### Ensavos de señalización

5

20

25

30

35

40

45

50

La unión de un ligando o promotor, tal como un agonista, a C5aR puede dar como resultado una señalización a través de este receptor acoplado a proteína G, y se estimula la actividad de las proteínas G, así como de otras moléculas de señalización intracelulares. La inducción de la función de señalización a través de un compuesto (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo) se puede controlar usando cualquier método adecuado. Un ensayo de este tipo se puede usar para identificar anticuerpos agonistas de C5aR. La actividad inhibidora de un anticuerpo o de un fragmento funcional del mismo se puede determinar usando un ligando o un promotor en el ensayo, y evaluando la capacidad del anticuerpo para inhibir la actividad inducida por el ligando o promotor.

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

Por ejemplo, el ensayo funcional de Sledziewski et al. que emplea receptores híbridos acoplados a proteínas G, se puede emplear para controlar la capacidad de un ligando o un promotor para unirse a un receptor y activar una proteína G (Sledziewski et al., documento de Patente de EE. UU. nº 5.284.746).

Tales ensayos se pueden realizar en presencia del anticuerpo o de un fragmento del mismo que se va a evaluar, y la capacidad del anticuerpo o del fragmento para inhibir la actividad inducida por el ligando o el promotor se determina usando métodos conocidos y/o métodos descritos en el presente documento.

## Quimiotaxis y ensayos de estimulación celular

Los ensayos de quimiotaxis también se pueden utilizar para evaluar la capacidad de un anticuerpo o de un fragmento funcional del mismo para bloquear la unión de un ligando a C5aR y/o inhibir una función asociada con la unión del ligando al receptor. Estos ensayos se basan en la migración funcional de células *in vitro* o *in vivo*, inducida por un compuesto. La quimiotaxis se puede evaluar por cualquier medio adecuado, por ejemplo, en un ensayo que utiliza una placa de quimiotaxis de 96 pocillos, o usando otros métodos reconocidos en la técnica para evaluar la quimiotaxis. Por ejemplo, el uso de un ensayo de quimiotaxis transendotelial *in vitro* está descrito por Springer *et al.* (Springer et al., documento WO 94/20142, publicado el 15 de septiembre 1994; véase también Berman et al., Immunol. Invest. 17: 625-677 (1988)). La migración a través del endotelio en geles de colágeno también se ha descrito (Kavanaugh et al., J. Immunol., 146: 4149-4156 (1991)). Los transfectantes estables de células de ratón L1-2 pre-B o de otras células hospedadoras adecuadas capaces de quimiotaxis, se pueden usar en ensayos de quimiotaxis.

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

Por ejemplo, se puede detectar o medir la inhibición de la migración de células en un recipiente adecuado (un medio que las contiene), desde una primera cámara al interior de o a través de una membrana microporosa, a una segunda cámara que contiene un anticuerpo que se va a someter a ensayo, y que está separada de la primera cámara por la membrana. Se selecciona una membrana adecuada, que tiene un tamaño de poro adecuado para el control de la migración específica como respuesta a un compuesto, incluyendo, por ejemplo, nitrocelulosa, policarbonato. Por ejemplo, se pueden utilizar tamaños de poro de aproximadamente 3-8 micras, y preferiblemente de aproximadamente 5-8 micras. El tamaño de poro puede ser uniforme en un filtro o estar dentro de un intervalo adecuado de tamaños de poro.

Para evaluar la migración y la inhibición de la migración, la distancia de la migración hacia el filtro, el número de células que cruzan el filtro que permanecen adheridas a la segunda superficie del filtro y/o el número de células que se acumulan en la segunda cámara, se pueden determinar usando técnicas convencionales (por ejemplo, microscopía). En una realización, las células se marcan con un marcador detectable (por ejemplo, radioisótopo, marcador

fluorescente, antígeno o marcador de epítopo), y la migración se puede evaluar en presencia y ausencia del anticuerpo o de un fragmento, determinando la presencia del marcador adherido a la membrana y/o presente en la segunda cámara usando un método apropiado (por ejemplo, mediante la detección de radioactividad, fluorescencia, inmunoensayo). El grado de migración inducida por un agonista del anticuerpo se puede determinar respecto a un control adecuado (por ejemplo, en comparación con la migración de fondo determinada en ausencia del anticuerpo, en comparación con el grado de migración inducida por un segundo compuesto (es decir, un patrón), en comparación con la migración de células no transfectadas inducidas por el anticuerpo). En una realización, particularmente para linfocitos T, monocitos o células que expresan C5aR, se puede controlar la migración transendotelial. En esta realización, se evalúa la transmigración a través de una capa de células endoteliales. Para preparar la capa de células, las células endoteliales se pueden cultivar sobre un filtro microporoso o una membrana, recubierta opcionalmente con una sustancia tal como colágeno, fibronectina u otras proteínas de la matriz extracelular, para facilitar la fijación de las células endoteliales. Preferiblemente, las células endoteliales se cultivan hasta que se forma una monocapa confluente. Una variedad de células endoteliales de mamífero puede estar disponible para la formación de monocapas, incluyendo, por ejemplo, endotelio venoso, arterial o microvascular, tal como células endoteliales de la vena umbilical humana (Clonetics Corp, San Diego, Calif.). Para someter a ensayo la quimiotaxis como respuesta a un receptor de mamífero particular, se prefieren células endoteliales del mismo mamífero; sin embargo las células endoteliales de una especie o un género de mamífero heterólogo también se pueden utilizar.

En general, el ensayo se realiza detectando la migración direccional de células hacia o a través de una membrana o filtro, en una dirección hacia niveles incrementados de un compuesto, desde una primera superficie del filtro hacia una segunda superficie opuesta del filtro, en donde el filtro contiene una capa de células endoteliales en una primera superficie. La migración direccional se produce desde el área adyacente a la primera superficie, hacia o a través de la membrana, hacia un compuesto situado en el lado opuesto del filtro. La concentración de compuesto presente en el área adyacente a la segunda superficie, es mayor que en el área adyacente a la primera superficie.

En una realización utilizada para la prueba de un inhibidor de anticuerpo, una composición que comprende células capaces de migrar y que expresan C5aR, se puede colocar en la primera cámara. Una composición que comprende uno o varios ligandos o promotores capaces de inducir la quimiotaxis de las células en la primera cámara (que tiene función quimioatrayente) se coloca en la segunda cámara. Preferiblemente poco antes de colocar las células en la primera cámara, o simultáneamente con las células, se coloca una composición que comprende el anticuerpo que se va a ensayar, preferiblemente, en la primera cámara. Los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos que se pueden unir al receptor e inhibir la inducción de la quimiotaxis, a través de un ligando o promotor, de las células que expresan C5aR en este ensayo, son inhibidores de la función del receptor (por ejemplo, inhibidores de la función estimuladora). Una reducción en el grado de migración inducida por el ligando o el promotor en presencia del anticuerpo o un fragmento, es indicativa de actividad inhibidora. Se podrían realizar diferentes estudios de la unión para determinar si la inhibición es un resultado de la unión del anticuerpo al receptor o se produce a través de un mecanismo diferente.

A continuación se describen ensayos *in vivo* que supervisan la infiltración de un tejido con leucocitos, como respuesta a la inyección de un compuesto (por ejemplo, quimiocina o anticuerpo) en el tejido (véanse los modelos de inflamación). Estos modelos de retorno dirigido *in vivo* miden la capacidad de las células para responder a un ligando o a un promotor mediante la emigración y quimiotaxis a un sitio de inflamación y para evaluar la capacidad de un anticuerpo o de un fragmento del mismo para bloquear esta emigración.

Además de los métodos descritos, los efectos de un anticuerpo o un fragmento sobre la función estimuladora de C5aR se pueden evaluar mediante la supervisión de respuestas celulares inducidas por un receptor activo, usando células hospedadoras adecuadas que contienen el receptor.

#### Identificación de ligandos adicionales, inhibidores y/o promotores de C5aR

5

10

15

20

40

60

45 Los ensayos descritos anteriormente, que se pueden utilizar para evaluar la unión y la función de los anticuerpos y fragmentos de la presente invención, se pueden adaptar para identificar ligandos adicionales u otras sustancias que se unen a C5aR o a una variante funcional del mismo, así como inhibidores y/o promotores de la función de C5aR. Por ejemplo, agentes que tienen la misma especificidad de unión o una similar a la de un anticuerpo de la presente invención o de una porción funcional del mismo, se puede identificar con un ensayo de competición con dicho anti-50 cuerpo o porción del mismo. Por tanto, la presente invención también incluye métodos de identificación de ligandos del receptor u otras sustancias que se unen a C5aR, así como inhibidores (por ejemplo, antagonistas) o promotores (por ejemplo, agonistas) de la función del receptor. En una realización, células portadoras de una proteína de C5aR o una variante funcional de la misma (por ejemplo, leucocitos, líneas celulares o células hospedadoras adecuadas que se han modificado genéticamente para expresar una proteína de C5aR de mamífero o una variante funcional 55 codificada por un ácido nucleico introducido en dichas células) se utilizan en un ensayo para identificar y evaluar la eficacia de ligandos u otras sustancias que se unen al receptor, incluyendo inhibidores o promotores de la función del receptor. Tales células son también útiles en la evaluación de la función de la proteína o del polipéptido expresado del receptor.

De acuerdo con la presente invención, los ligandos y otras sustancias que se unen al receptor, inhibidores y promotores de la función del receptor, se pueden identificar en un ensayo adecuado, y determinar adicionalmente el efecto

terapéutico. Los antagonistas de la función del receptor se pueden usar para inhibir (reducir o evitar) la actividad del receptor, y los ligandos y/o agonistas se pueden usar para inducir (desencadenar o potenciar) la función del receptor normal, cuando se indica. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método de tratamiento de enfermedades inflamatorias, que incluyen la enfermedad autoinmunitaria y el rechazo de injerto, que comprende administrar un antagonista de la función del receptor a un individuo (por ejemplo, un mamífero). La presente invención proporciona además un método para estimular la función del receptor mediante la administración de un nuevo ligando o agonista de la función del receptor a un individuo, proporcionando un nuevo enfoque para la estimulación selectiva de la función leucocitaria, que es útil, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades infecciosas y cáncer.

Tal y como se emplea en este documento, un "ligando" de una proteína de C5aR se refiere a una clase particular de sustancias que se unen a una proteína de C5aR de mamífero, incluyendo ligandos naturales y sintéticos y/o formas recombinantes de ligandos naturales. En una realización preferida, la unión al ligando de una proteína de C5aR se produce con alta afinidad.

Tal y como se emplea en este documento, un "antagonista" es una sustancia que inhibe (disminuye o evita) al menos una función característica de una proteína de C5aR, tal como una actividad de unión (por ejemplo, la unión de un ligando, la unión de un promotor, la unión de un anticuerpo), una actividad de señalización (por ejemplo, activación de una proteína G de mamífero, inducción de un aumento rápido y transitorio de la concentración de calcio libre citosólico) y/o una función de respuesta celular (por ejemplo, estimulación de la quimiotaxis, exocitosis o liberación de mediadores inflamatorios a través de leucocitos). El término antagonista incluye sustancias que se unen al receptor (por ejemplo, un anticuerpo, un mutante de un ligando natural, moléculas orgánicas de bajo peso molecular, otros inhibidores competitivos de la unión del ligando), y sustancias que inhiben la función del receptor sin unirse al mismo (por ejemplo, un anticuerpo anti-idiotípico).

Tal y como se emplea en este documento, un "agonista" es una sustancia que favorece (induce, provoca, potencia o aumenta) al menos una función característica de una proteína de C5aR, tal como una actividad de unión (por ejemplo, unión de ligando, inhibidor y/o promotor), una actividad de señalización (por ejemplo, la activación de una proteína G de mamífero, la inducción de un aumento rápido y transitorio de la concentración de calcio libre citosólico) y/o una función de respuesta celular (por ejemplo, estimulación de la quimiotaxis, exocitosis o liberación de mediadores inflamatorios a través de leucocitos). El término agonista incluye sustancias que se unen al receptor (por ejemplo, un anticuerpo, un homólogo de un ligando natural de otra especie), y sustancias que favorecen la función del receptor sin unirse al mismo (por ejemplo, mediante la activación de una proteína asociada). En una realización preferida, el agonista es distinto de un homólogo de un ligando natural.

Por lo tanto, la invención se refiere también a un método para detectar o identificar un agente que se une a C5aR o a una variante que se une a ligando del mismo, incluyendo ligandos, antagonistas, agonistas y otras sustancias que se unen a C5aR o a una variante funcional. Según el método, un agente que se va a ensayar, un anticuerpo o un fragmento que se une a antígeno de la presente invención (por ejemplo, un anticuerpo que tiene una especificidad epitópica que es igual o similar a la de 7F3, y fragmentos del mismo que se unen a antígeno) y una composición que comprende un C5aR o una variante del mismo que se une a ligando, se pueden combinar. Los componentes anteriores se combinan en condiciones adecuadas para la unión del anticuerpo o del fragmento que se une a antígeno, a C5aR, y la unión del anticuerpo o del fragmento al C5aR se detecta o se mide, ya sea directa o indirectamente, según los métodos descritos en el presente documento u otros métodos adecuados. Una disminución de la cantidad de complejo formado con respecto a un control adecuado (por ejemplo, en ausencia del agente que se va a ensayar) es indicativa de que el agente se une a dicho receptor o variante. La composición que comprende C5aR puede ser una fracción de la membrana de una célula que es portadora de proteína C5aR recombinante o de una variante del mismo que se une a ligando. El anticuerpo o un fragmento del mismo se pueden marcar con un marcador tal como un radioisótopo, marcador de espín, antígeno o marcador de epítopo, marcador enzimático, grupo fluorescente y grupo quimioluminiscente.

Existen razones de porqué el desplazamiento del AcMo anti-C5aR puede identificar antagonistas del receptor de C5a con más facilidad. La unión de C5a a C5aR es un proceso de dos etapas que implica diferentes regiones de C5aR (véase Klco *et al.*, 2005), mientras que los anticuerpos monoclonales anti-C5aR es decir, 7F3 o 3C5 reconocen la región decisiva aislada para la inhibición en el 2º bucle extracelular.

#### 50 Modelos de inflamación

5

10

15

20

25

30

35

40

45

55

60

Están disponibles modelos de inflamación *in vivo* que se pueden utilizar para evaluar los efectos de anticuerpos y fragmentos de la invención *in vivo* como agentes terapéuticos. Por ejemplo, la infiltración de leucocitos después de una inyección intradérmica de una quimiocina y un anticuerpo o un fragmento del mismo que reacciona con C5aR en un animal adecuado, tal como conejo, ratón, rata, cobaya o macaco rhesus se puede controlar (véase, por ejemplo, Van Damme, J. et al., J. Exp. Med., 176: 59-65 (1992); Zachariae, C. O. C. et al., J. Exp. Med. 171: 2177-2182 (1990); Jose, P. J. et al., J. Exp. Med. 179: 881-887 (1994)). En una realización, las biopsias de piel se evalúan histológicamente para estudiar la infiltración de leucocitos (por ejemplo, eosinófilos, granulocitos). En otra realización, células marcadas (por ejemplo, células transfectadas de forma estable que expresan C5aR) capaces de quimiotaxis y extravasación, se administran al animal. Un anticuerpo o un fragmento que se va evaluar se puede administrar ya sea antes, simultáneamente con 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.

#### <u>Usos</u>

5

10

15

20

35

40

Los anticuerpos de la presente invención son útiles en una variedad de aplicaciones, incluyendo la investigación, el diagnóstico y las aplicaciones terapéuticas.

C5aR tiene un papel importante en el tráfico de leucocitos. Por lo tanto, C5aR es un receptor quimioatrayente para la migración de neutrófilos, eosinófilos, linfocitos T o un subconjunto de linfocitos T o monocitos a ciertos sitios inflamatorios, y de este modo los anticuerpos anti-C5aR se pueden utilizar para inhibir (reducir o evitar) la migración de leucocitos, particularmente la asociada con una lesión tisular con neutrófilos, tal como lesión por reperfusión y accidente cerebrovascular, una disfunción de linfocitos T, tal como enfermedad autoinmune o reacciones alérgicas, o con trastornos mediados con monocitos tales como la aterosclerosis.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden actuar como inhibidores para inhibir (reducir o prevenir) (a) la unión (por ejemplo, de un ligando, un inhibidor o un promotor) al receptor, (b) una 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 o promotor directa o indirectamente (por ejemplo, causando un cambio conformacional). Por ejemplo, los anticuerpos pueden inhibir una función del receptor inhibiendo la unión de un ligando, o mediante una desensibilización (con o sin inhibición de la unión de un ligando).

Por lo tanto, la presente descripción proporciona un método para inhibir el tráfico de leucocitos en un mamífero (por ejemplo, un paciente humano), que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de un anticuerpo de la presente invención. La presente descripción también proporciona un método para inhibir otros efectos asociados con la actividad de C5aR, tales como la liberación de histaminas desde los basófilos y la liberación de gránulos desde los eosinófilos, basófilos y neutrófilos. La administración de un anticuerpo de la presente invención puede dar como resultado la mejora o la eliminación del estado de enfermedad.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden utilizar de forma inmunoterapéutica para una enfermedad asociada inmunopatológicamente. El término "inmunoterapéuticamente" o "inmunoterapia" tal y como se usa en el presente documento en combinación con los anticuerpos de la invención, indica una administración tanto profiláctica como terapéutica. Por lo tanto, los anticuerpos se pueden administrar a pacientes de alto riesgo con el fin de disminuir la probabilidad y/o la gravedad de una enfermedad inmunopatológica o administrar a pacientes que ya tienen una evidencia de la enfermedad activa, por ejemplo sepsis debida a una infección bacteriana gram-negativa.

Los anticuerpos se pueden utilizar para tratar una alergia, aterogénesis, anafilaxis, tumor maligno, inflamación crónica y aguda, reacciones alérgicas mediadas por IgE e histamina, choque y artritis reumatoide, aterosclerosis, esclerosis múltiple, rechazo de aloinjerto, enfermedad fibrótica, asma, glomerulopatías inflamatorias o cualquier trastorno relacionado con complejos inmunes.

Las enfermedades o afecciones de seres humanos u otras especies que se pueden tratar con anticuerpos de la invención incluyen, pero no se limitan a:

- (a) enfermedades y afecciones inflamatorias o alérgicas, incluyendo enfermedades respiratorias alérgicas tales como asma, rinitis alérgica, enfermedades de hipersensibilidad pulmonar, neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades pulmonares intersticiales (ILD) (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática o ILD asociada
  con artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, esclerosis sistémica, síndrome
  de Sjögren, polimiositis o dermatomiositis); respuestas anafilácticas o de hipersensibilidad, alergias a medicamentos (por ejemplo, a penicilina, cefalosporinas), alergias a picaduras de insectos; enfermedades inflamatorias del intestino, como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa; espondiloartropatías; esclerodermia; psoriasis y dermatosis inflamatorias tales como dermatitis, eczema, dermatitis atópica, dermatitis por contacto
  alérgica, urticaria; vasculitis (por ejemplo, necrotizante, cutánea, y vasculitis por hipersensibilidad);
- (b) enfermedades autoinmunes, tales como artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis psoriásica), esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, miastenia grave, diabetes juvenil, nefritis tales como glomerulone-fritis, tiroiditis autoinmune, enfermedad de Behcet;
  - (c) rechazo de injerto (por ejemplo, en un trasplante), incluyendo rechazo de aloinjerto o enfermedad de injerto contra hospedador;
- 50 (d) aterosclerosis;
  - (e) cánceres de piel u órganos con infiltración de leucocitos;
  - (f) otras enfermedades o afecciones (incluyendo enfermedades o afecciones mediadas por C5aR), en las que las respuestas inflamatorias no deseables que se van a inhibir se pueden tratar, incluyendo, pero no limitadas a, lesión por reperfusión, accidente cerebrovascular, síndrome de insuficiencia respiratoria en adultos, ciertas

enfermedades malignas hematológicas, toxicidad inducida por citocinas (por ejemplo, choque séptico, choque endotóxico), polimiositis, dermatomiositis, pénfigo, enfermedad de Alzheimer y enfermedades granulomatosas incluyendo sarcoidosis, sinovitis hemofílica y degeneración macular relacionada con la edad.

Los anticuerpos anti-C5aR de la presente descripción pueden bloquear la unión de uno o varios ligandos, bloqueando de este modo la cascada aguas abajo de uno o varios eventos que conducen a los trastornos anteriores.

En una realización, los anticuerpos de la presente descripción se utilizan en el tratamiento de la sepsis, accidente cerebrovascular o síndrome de dificultad respiratoria del adulto.

En otra realización, los diversos anticuerpos de la presente invención se puede utilizar para detectar C5aR o para medir la expresión de un receptor, por ejemplo, en leucocitos (por ejemplo neutrófilos, monocitos, linfocitos B), células endoteliales y/o en células transfectadas con un gen del receptor. Por lo tanto, también tienen utilidad en aplicaciones tales como clasificación de células (por ejemplo, citometría de flujo, clasificación de células activadas con fluorescencia), para fines de diagnóstico o de investigación.

Los anticuerpos anti-C5aR de la presente invención tienen valor en aplicaciones de diagnóstico. Normalmente, los ensayos de diagnóstico implican la detección de la formación de un complejo que es el resultado de la unión de un anticuerpo o un fragmento del mismo a C5aR. Para fines de diagnóstico, los anticuerpos o los fragmentos que se unen a antígeno pueden estar marcados o sin marcar. Los anticuerpos o los fragmentos se pueden marcar directamente. Se puede emplear una variedad de marcadores, que incluyen, pero no se limitan a, radioisótopos, agentes fluorescentes, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos y ligandos (por ejemplo, biotina, haptenos). El experto en la técnica conoce numerosos inmunoensayos apropiados (véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de EE. UU. nº 3.817.827; 3.850.752; 3.901.654 y 4.098.876). La inmunohistoquímica de muestras tisulares también se puede utilizar en los métodos de diagnóstico de la presente invención. Cuando no están marcados, los anticuerpos o los fragmentos se pueden detectar usando medios adecuados, como en ensayos de aglutinación, por ejemplo. Los anticuerpos o los fragmentos sin marcar también se pueden utilizar en combinación con otro (es decir, uno o varios) reactivo adecuado que se puede usar para detectar un anticuerpo, tal como un anticuerpo marcado (por ejemplo, un segundo anticuerpo) reactivo con el primer anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos anti-idiotipo u otros anticuerpos que son específicos de la inmunoglobulina sin marcar) u otro reactivo adecuado (por ejemplo, proteína A marcada).

Los kits para uso en la detección de la presencia de una proteína de C5aR en una muestra biológica también se pueden preparar. Tales kits incluirán un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo que se une a C5aR, así como uno o varios reactivos auxiliares, adecuados para detectar la presencia de un complejo entre el anticuerpo o un fragmento y C5aR. Las composiciones de anticuerpos de la presente invención se pueden proporcionar en forma liofilizada, ya sea aislada o en combinación con anticuerpos adicionales específicos para otros epítopos. Los anticuerpos, que pueden estar marcados o sin marcar, se pueden incluir en los kits con ingredientes adyuvantes (por ejemplo, tampones, tales como Tris, fosfato y carbonato, estabilizadores, excipientes, biocidas y/o proteínas inertes, por ejemplo, albúmina de suero bovino). Por ejemplo, los anticuerpos se pueden proporcionar como una mezcla liofilizada con los ingredientes adyuvantes, o los ingredientes adyuvantes se pueden proporcionar por separado para que el usuario los combine. En general, estos materiales adyuvantes estarán presentes en menos de aproximadamente el 5% en peso, basado en la cantidad de anticuerpo activo, y normalmente estarán presentes en una cantidad total de al menos aproximadamente 0,001% en peso basado en la concentración de anticuerpo. Cuando se emplea un segundo anticuerpo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal, tal anticuerpo se puede proporcionar en el kit, por ejemplo en un vial o un recipiente separado. El segundo anticuerpo, si está presente, normalmente está marcado, y se puede formular de una manera análoga con las formulaciones de anticuerpos descritas anteriormente.

Del mismo modo, la presente invención también se refiere a un método para detectar y/o cuantificar la expresión de C5aR a través de una célula, en la que una composición que comprende una célula o una fracción de la misma (por ejemplo, una fracción de la membrana) se pone en contacto con un anticuerpo de la invención en condiciones apropiadas para la unión del anticuerpo o un fragmento del mismo, y la unión se supervisa. Una detección del anticuerpo, indicativa de la formación de un complejo entre el anticuerpo y C5aR, indica la presencia del receptor. La unión del anticuerpo a la célula se puede determinar utilizando técnicas tales como las descritas en el documento WO 03/062278. El método se puede utilizar para detectar la expresión de C5aR en las células de un individuo (por ejemplo, en una muestra, tal como un fluido corporal, tal como sangre, saliva u otra muestra adecuada). El nivel de expresión de C5aR en la superficie de linfocitos T o monocitos también se puede determinar, por ejemplo, por citometría de flujo, y el nivel de expresión (por ejemplo, intensidad de la tinción) se puede correlacionar con la susceptibilidad a la enfermedad, la progresión o el riesgo de la misma.

## Modos de administración

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Son posibles una variedad de vías de administración, incluyendo pero no necesariamente limitadas a oral, alimenticia, 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 de administración adecuados también pueden incluir dispositivos recargables o biodegradables y dispositivos poliméricos de liberación lenta. Las composiciones farmacéuticas de esta invención

también se pueden administrar como parte de una terapia combinatoria con otros agentes.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

La formulación de un anticuerpo que se va a administrar variará de acuerdo con la vía de administración y la formulación (por ejemplo, solución, emulsión, cápsula) seleccionadas. Una composición farmacéutica apropiada que comprende un anticuerpo que se va a administrar se puede preparar en un vehículo o soporte fisiológicamente aceptable. Una mezcla de anticuerpos también se puede utilizar. Para soluciones o emulsiones, los vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas o alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo 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. Los anticuerpos y fragmentos de esta invención se pueden liofilizar para almacenamiento y reconstituir en un vehículo adecuado antes del uso 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 puede solubilizar y cargar en un dispensador adecuado para la administración (por ejemplo, atomizador, nebulizador o dispensador de aerosol presurizado).

Los intervalos de dosificación para la administración de los anticuerpos de la invención 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 cardiaca 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 desde aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente desde aproximadamente 20 mg/kg en una o varias administraciones de dosis diarias, durante uno o varios días.

Uno o varios anticuerpos de la presente invención se pueden administrar a un individuo a través de una vía apropiada, ya sea solo o en combinación con (antes de, simultáneamente con, o después de) otro fármaco o agente. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención también se pueden utilizar en combinación con otros anticuerpos monoclonales o policlonales (por ejemplo, en combinación con anticuerpos que se unen a receptores de quimiocinas, incluyendo, pero no limitados a, CCR2 y CCR3) o con anti-TNF u otros agentes antiinflamatorios o con productos de plasma sanguíneo existentes, tales como gammaglobulina disponible en el mercado y productos de inmunoglobulina utilizados en tratamientos profilácticos o terapéuticos. Los anticuerpos de la presente invención se pueden usar como composiciones administradas por separado, proporcionadas en combinación con antibióticos y/o agentes antimicrobianos.

Los expertos en la técnica apreciarán que los anticuerpos de la presente invención 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 secuencia 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 detención apropiados.

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 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 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 forma complejos no 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 de nuevo 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.

A continuación se proporcionan aspectos y realizaciones de la descripción

15

30

35

45

La descripción proporciona un anticuerpo que comprende al menos una secuencia de bucle de CDR que comparte al menos un 80% de identidad con una secuencia de bucle de CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena pesada variable como se muestra en SEQ ID NO: 3 [3C5 Vh], en donde el anticuerpo reduce o inhibe la unión de C5a a C5aR.

El anticuerpo puede comprender al menos dos secuencias de bucle de CDRs que comparten al menos un 80% de identidad con secuencias de bucle de CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena pesada variable mostradas en SEQ ID NO: 3 [3C5 Vh].

El anticuerpo puede comprender además al menos una secuencia de bucle de CDR que comparte al menos un 80% de identidad con una secuencia de bucle de CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena ligera variable tal y como se muestra en SEQ ID NO: 4 [3C5 V1].

El anticuerpo puede comprender al menos dos secuencias de bucle de CDRs que comparten al menos un 80% de identidad con una secuencia de bucle de CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena ligera variable tal y como se muestra en SEQ ID NO: 4 [3C5 V1].

40 El anticuerpo puede comprender una secuencia que comparte al menos un 80% de identidad con secuencias de la cadena pesada y/o ligera tal y como se muestran en SEQ ID NO: 3 [3C5 Vh] y SEQ ID NO: 4 [3C5 V1], respectivamente, en donde el anticuerpo reduce o inhibe la unión de C5a a C5aR.

El anticuerpo se puede unir a C5aR humano o a un fragmento del mismo con

- (i) un valor de Cl₅o que es al menos 1,5 veces menor que el de AcMo7F3 cuando se determina en condiciones idénticas; o
- (ii) una constante de asociación (Kon) que es al menos 1,5 veces mayor que la de AcMo7F3 cuando se determina en condiciones idénticas; o
- (iii) una constante de afinidad  $K_D$  que es al menos 1,3 veces menor que la de AcMo7F3 cuando se determina en condiciones idénticas.
- 50 El anticuerpo se puede unir a C5aR humano o a un fragmento del mismo con
  - (i) un valor de Cl₅₀ que es inferior a 500 pM, preferiblemente menor de 300 pM, y más preferiblemente menor de 200 pM; o

- (ii) una constante de asociación (Kon) que es al menos 6,8 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>; o
- (iii) una constante de afinidad K<sub>D</sub> que es menor que 1,4 Nm.

10

- El fragmento de C5aR puede ser un péptido que comprende la secuencia LYRVVREEYFPPKVLCGVDYSHDKRRERAVAIV (SEQ ID NO: 2).
- 5 El anticuerpo puede comprender al menos un 80% de identidad con una secuencia de bucle de CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena pesada variable tal y como se muestra en SEQ ID NO: 5 [7H3 Vh], en donde el anticuerpo reduce o inhibe la unión de C5a a C5aR.
  - El anticuerpo puede comprender al menos dos secuencias de bucle de CDRs que comparten al menos un 80% de identidad con las secuencias de bucle de CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena pesada variable tal y como se muestran en SEQ ID NO: 5 [7H3 Vh].
    - El anticuerpo puede comprender además al menos una secuencia de bucle de CDRs que comparte al menos un 80% de identidad con una secuencia de bucle de CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena ligera variable tal y como se muestra en SEQ ID NO: 6 [7H3 V1].
- El anticuerpo puede comprender al menos dos secuencias de bucle de CDR que comparten una identidad de al menos un 80% con una secuencia de bucle de CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena ligera variable tal y como se muestra en SEQ ID NO: 6 [7H3] V1.
  - El anticuerpo puede comprender una secuencia comparte al menos un 80% de identidad con secuencias de la cadena pesada y/o ligera tal y como se muestran en SEQ ID NO: 5 [7H3 Vh] y SEQ ID NO: 6 [7H3 V1], respectivamente, en donde el anticuerpo reduce o inhibe la unión de C5a a C5aR.
- 20 El anticuerpo puede comprender al menos un 80% de identidad con una secuencia de bucle de CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena pesada variable tal y como se muestra en SEQ ID NO: 7 [8G7 Vh], en donde el anticuerpo reduce o inhibe la unión entre C5a y C5aR.
  - El anticuerpo puede comprender al menos dos secuencias de bucle de CDRs que comparten al menos un 80% de identidad con las secuencias de bucle de CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena pesada variable tal y como se muestran en SEQ ID NO: 7 [8G7 Vh].
  - El anticuerpo puede comprender además al menos una secuencia de bucle de CDR que comparte al menos 80% de identidad con una secuencia de bucle de CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena ligera variable tal y como se muestra en SEQ ID NO: 8 [8G7 V1].
- El anticuerpo puede comprender al menos dos secuencias de bucle de CDRs que comparten una identidad de al menos un 80% con una secuencia de bucle de CDR1, CDR2 o CDR3 de la cadena ligera variable tal y como se muestra en SEQ ID NO: 8 [8G7 V1].
  - El anticuerpo puede comprender una secuencia que comparte al menos un 80% de identidad con secuencias de la cadena pesada y/o ligera tal y como se muestran en SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, respectivamente, en donde el anticuerpo reduce o inhibe la unión entre C5a y C5aR.
- 35 El anticuerpo puede ser monoclonal, anticuerpo recombinante, quimérico o anticuerpo humanizado.
  - El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal seleccionado a partir del grupo que consiste en AcMo 3C5, AcMo 8G7 y AcMo 7H3.
  - El anticuerpo puede ser reactivo con el segundo bucle extracelular (residuos 175 a 206) de C5aR humano.
  - El anticuerpo puede ser reactivo con un epítopo que comprende los residuos 179-184 (EEYFPP) de C5aR humano.
- 40 La descripción proporciona además un hibridoma tal y como se ha depositado en la ECACC con el número de orden 06081801. El hibridoma puede estar depositado en la ECACC con el número de orden 06081802. El hibridoma puede estar depositado en la ECACC con el número de orden 06081803.
  - La invención proporciona además un conjugado que comprende un anticuerpo según la invención y un agente terapéutico. El conjugado puede comprender un anticuerpo de acuerdo con la invención y un marcador detectable.
- La invención proporciona además una molécula de ácido nucleico aislada, comprendiendo la molécula de ácido nucleico una secuencia que codifica un anticuerpo de acuerdo con la invención.
  - La invención proporciona además una composición que comprende un anticuerpo según la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
  - La invención proporciona además un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso como medicamento.

La invención proporciona además un método para diagnosticar un trastorno que implica la migración de leucocitos o de neutrófilos en un sujeto, comprendiendo el método poner en contacto una muestra obtenida a partir del sujeto *in vitro* con un conjugado de la presente invención, y detectar la unión inmunoespecífica entre el conjugado y la muestra.

5 La invención proporciona además un anticuerpo de acuerdo con la invención para uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno que implica la migración de leucocitos o de neutrófilos.

A lo largo de esta memoria descriptiva, la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entiende que implica la inclusión de un elemento indicado, un 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.

La presente invención se ilustrará ahora con los siguientes Ejemplos, que no pretenden ser limitantes de ningún modo.

## **Ejemplos**

10

20

25

30

35

40

55

#### **Detalles experimentales**

#### 15 Generación de ratones con secuencias insertadas de C5aR humano

Se adoptó una estrategia de desactivación/inserción de secuencias (del inglés "knock-out/knock-in") para construir un ratón transgénico que expresaba C5aR humano, pero no C5aR de ratón, bajo el control del promotor del gen de C5aR de ratón. El vector que se dirigía a la diana comprendía una región de 3,5 kb de ADN genómico de ratón C57BL/6 aguas arriba del exón 3 del gen de C5aR, una secuencia que codificaba el exón 3 del gen de C5aR humano, la región 3' no traducida del gen C5aR de ratón, el promotor de fosfoglucocinasa y el gen de resistencia a neomicina flanqueado por sitios loxP y una región de 3 kb de ADN genómico de ratón aguas abajo del gen C5aR en el vector pLOz (Ozgene, Perth, Australia). Se generaron fragmentos de ADN genómico utilizando amplificación con PCR. El vector se transfectó en células madre embrionarias de C57BL/6 y el ADN procedente de colonias resistentes a G418 se escrutó mediante transferencia Southern. El ADN digerido con Xba I y EcoR V se hibridó con una sonda en 5' y 3', respectivamente, para identificar clones con el suceso de recombinación homóloga correcto en ambos extremos 5' y 3'. Quimeras generadas a partir de blastocistos inyectados con los clones ES dirigidos correctamente, se aparearon con hembras C57BL/6. La transmisión de la línea germinal del gen C5aR humano se confirmó por transferencia Southern de ADN genómico de la cola del ratón. Se generaron los ratones homocigotos para el gen C5aR humano (hC5R1\*/+) y la PCR, la transferencia Southern y la tinción FACS confirmaron la ausencia de mC5aR.

## Aislamiento de neutrófilos

Los neutrófilos humanos se aislaron a partir de sangre venosa periférica de voluntarios sanos, tal y como se ha descrito previamente (Haslett *et al.*, (1985)) con modificaciones. Brevemente, las muestras de sangre recogidas en vacutainers recubiertos con EDTA, se centrifugaron a 400 x g durante 15 min y después se retiró el plasma y las capas leucocitarias. Después de una sedimentación con dextrano al 1% durante 30 min, los glóbulos blancos de la sangre se sedimentaron por centrifugación a 300 x g durante 5 min y se lavaron con PBS. A continuación, las células se centrifugaron a 500 x g durante 30 min en una almohadilla de Percoll al 65% (densidad, 1,093 g/ml, Amersham Bioscience). Después de la centrifugación, los neutrófilos se resuspendieron en PBS. Los neutrófilos de ratón se aislaron a partir de ambos fémures de las patas traseras inyectando 5 ml de medio DMEM (GIBCO) con suero de ternera fetal al 10% a través del hueso con una jeringa. Los neutrófilos se separaron mediante centrifugación de densidad sobre Ficoll-Paque (Amersham Bioscience). Los glóbulos rojos se lisaron mediante tampón hipotónico (NH<sub>4</sub>Cl 155 mM, KHCO<sub>3</sub> 10 mM, EDTA 1 mM). La viabilidad celular se determinó por exclusión con azul de tripano y el sedimento de neutrófilos se resuspendió en PBS.

## Generación de anticuerpos monoclonales

Los ratones C57BL/6 se inmunizaron con ~2 x 10<sup>7</sup> transfectantes L1.2 que expresaban niveles elevados de hC5aR (Campbell *et al.* (1996)), i.p., 5 veces en intervalos de 2 semanas, después una vez i.v. Cuatro días después de la inmunización i.v. final, se extrajo el bazo y las células se fusionaron con la línea celular SP2/0, usando procedimientos convencionales. Los ratones C57BL/6 se inmunizaron con ~1 x 10<sup>7</sup> neutrófilos aislados a partir de fémures de ratones hC5R1\*\* de manera similar, dos veces con una inmunización i.v., una vez i.p. y una i.v. final. Los hibridomas se cultivaron en DMEM (GIBCO) que contenía 10% de Fetalclone (Hyclone) y suplemento HAT (Sigma) y se retiró el material sobrenadante del cultivo para el escrutinio inicial. La producción de anticuerpos seleccionados se amplió y el AcMo se purificó mediante cromatografía de proteína A o G, se concentró, se intercambió el tampón y se eliminaron las endotoxinas. La concentración de AcMo se determinó usando un kit de ELISA con IgG de ratón (Roche).

#### Citometría de flujo

Para evaluar la reactividad de los AcMos frente a células transfectadas o leucocitos, se utilizó una tinción inmuno-

fluorescente indirecta y citometría de flujo. Las células se lavaron una vez con PBS, y se resuspendieron en 100 µl de PBS que contenía suero humano al 2% y azida sódica al 0,1% (tampón de tinción), anticuerpo purificado o 50 µl de material sobrenadante del cultivo de hibridoma. Después de 20 min a 4°C, las células se lavaron dos veces con tampón de tinción y se resuspendieron en 50 µl de IgG anti-ratón de cabra F(ab')₂ purificada por afinidad, conjugada con FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluidos 1:200 en tampón de tinción. Después de incubar durante 20 min a 4°C, las células se lavaron dos veces con tampón de tinción y se analizaron en el FACSCalibur (Becton-Dickinson) para determinar el nivel de expresión en la superficie. Una tinción con yoduro de propidio se utilizó para excluir las células muertas.

### Ensayos de unión

5

35

40

45

Los neutrófilos humanos se lavaron y se resuspendieron en tampón de unión (HEPES 50 mM, pH 7,5, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y 0,5% de BSA) a 1 x 10<sup>7</sup>/ml. Para cada reacción de unión (en un volumen final de 120 µl), se incubaron 40 µl de suspensión celular (4 x 10<sup>5</sup> células) con una cantidad apropiada de AcMo anti-hC5aR, AcMo control con isotipo correspondiente o C5a humana sin marcar (SIGMA), a temperatura ambiente durante 15 min. Se añadió C5a humana marcada con <sup>125</sup>l (Perkin Elmer) hasta una concentración final de 0,4 nM y las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 60 min. A continuación, las células se recogieron y se lavaron 3 veces con tampón de unión que contenía NaCl 150 mM. Las células se transfirieron después a placas Opti (Perkin Elmer) con líquido de centelleo de MicroScint 20 y se hizo un recuento de la radiactividad en TopCount (Packard). Cada muestra se sometió a ensayo por triplicado.

#### Análisis BIACore

- 20 1. Reactivos del instrumento:
  - 1.1 Equipo/Programa: programa de control BIACore 2000/BIACore 2000

Tampón del análisis: HBS-EP (BIACore, nº BR-1001-88)

Tampón de regeneración: HCI 100 mM

Chip sensor: Chip sensor SA (estreptavidina; BIACore nº BR-1003/98)

25 Péptido de C5aR humano biotinilado (2º bucle): biotina-SGSGLYRVVREEYFPPKVLCGVDYSHD-KRRERAVAIV-OH (SEQ ID NO: 26).

- 2. Procedimiento del ensayo/Configuración del Instrumento:
  - 2.1 Caudal del ensayo: 30 µl/min
  - 2.2 Condiciones del chip SA (Fc1 y Fc2) con 3 x 1 inyecciones por minuto de NaCl 1 M en NaOH 50 mM.
- 30 2.3 Preparación de la muestra:

Diluir las muestras de anticuerpos en HBS-EP (BIACore, nº BR-12001-88)

Utilizar las siguientes concentraciones para cada anticuerpo:

- i) 100 nM
- ii) 50 nM
- iii) 25 nM
- iv) 12,5 nM
- v) 6,25 nM
- vi) 3,125 nM.
- 2.4 Ensayo de control:

Analizar los anticuerpos para la unión no específica a estreptavidina (Fc1) antes de continuar con el estudio cinético. Usar la concentración más alta de anticuerpo que se va a utilizar en un ensayo de cinética (100 nM en HBS-EP)

2.5 Inmovilización del péptido 23 biotinilado (péptido C5aR) en un chip sensor SA Fc2:

Preparar el péptido biotinilado en HBS-EP a 1 μg/ml. Inmovilizar en Fc2 con inyecciones manuales ~1000 UR.

### 2.6 Ensayo de la cinética del anticuerpo:

Uso del asistente de análisis cinético, seguir las instrucciones e introducir los parámetros del ensayo como se indica a continuación:

2.6.1 Introducir las series de concentraciones que se van a analizar:

es decir, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 nM. Análisis de las muestras por duplicado.

2.6.2 Seleccionar "Ensayo de unión directa"

2.6.3 Seleccionar: "Series de concentraciones"

2.6.4 Introducir los siguientes parámetros en la caja de diálogo:

Usar Fc2, con Fc1 como referencia

10 Caudal: 30 µl/min

5

Tiempo de inyección: 2 min

Tiempo de estabilización: 10 min

Tiempo de disociación: 20 min

Seleccionar: "analizar las muestras como se han introducido".

15 Seleccionar: "siguiente".

2.6.5 Método de regeneración:

Inyección única

Caudal: 30 µl/min

Tampón de regeneración: HCI 100 mM

20 Tiempo de inyección: 2 min

Tiempo de estabilización después de la regeneración: 2 min.

2.6.6 Colocar los anticuerpos y el tampón de regeneración en las posiciones designadas de la rejilla.

2.6.7 Ejecutar el asistente.

## Ensayo de flujo de calcio

Los neutrófilos humanos recién aislados se cargaron con Fluo-3AM. (Molecular Probes) durante 30 min a 37°C tal y como se ha descrito previamente (Ponath *et al.* (1996)). Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACS-Calibur y las intensidades de la fluorescencia lineal se midieron a lo largo del tiempo.

### Ensayos de quimiotaxis

30

40

Neutrófilos humanos o de ratón (1 - 2 x 10<sup>5</sup> células por pocillo) suspendidos en tampón de quimiotaxis (RPMI 1640 con M199 al 50% (SIGMA) y suero de ternera fetal al 2% (Hyclone) se colocaron en la cámara superior de una placa transwell de 12 pocillos (Corning Costar Co.) y se dejaron migrar durante 30 min a través de un filtro de 3 µm a la cámara inferior que contenía C5a humana o de ratón. El número de células que migraban se contó en FACSCalibur haciendo un recuento durante 60 segundos. Se estableció un ángulo directo ajustado y puertas de dispersión laterales para excluir los desechos o las células irrelevantes.

### 35 Construcción de líneas celulares que expresan C5aRs quiméricos humanolratón

Los receptores de C5a quiméricos humano/ratón se construyeron utilizando una técnica de extensión con superposición basada en PCR modificada (Wurch *et al.* 1998)). Brevemente, diferentes fragmentos del gen de C5aR humano o de ratón se amplificaron mediante PCR. Los fragmentos solapantes se combinaron, se desnaturalizaron y se reasociaron y se amplificaron mediante una segunda ronda de PCR. Las secuencias del receptor quimérico de longitud completa con sitios de enzimas de restricción apropiados, se amplificaron en una tercera etapa de PCR y se clonaron en pcDNA3.1(+) (Invitrogen) para la expresión. Los cebadores de la PCR se diseñaron de acuerdo con las secuencias de los genes de C5aR humano y C5aR de ratón (números de orden de Genebank M62505 y <u>S46665</u>, respectivamente). Los cebadores comprendían secuencias de C5aR humano y de ratón adyacentes (Tabla 1).

### Tabla 1

Se muestran las secuencias de los cebadores de PCR utilizados para construir los receptores de C5a quiméricos humano/ratón. La secuencia en rojo procede del gen de C5aR humano y la secuencia azul corresponde al C5aR de ratón, respectivamente. El cebador directo del extremo 5' del gen de C5aR incorpora una secuencia de Kozak (subrayada) aguas arriba de los sitios ATG y un sitio HindIII (negrita). El cebador inverso del extremo 3' incorpora un sitio Xbal (negrita) para facilitar la clonación en el vector de expresión.

Cebador	secuencia del cebador (5' > 3')
HuC5aREX1.f	CGTTTAAACTT <b>AAGCTT</b> GCCACCATGGACCCCATAGATAACAGCAG (SEQ ID NO:10)
HuC5aRIC1.f	GGCAACCTGGGGATGTTGCAGCCTTGGTCATCTTTGCAGTC (SEQ ID NO:11)
HuC5aRIC1.r	CCAGTAGTTATGATTTAAAACGGTCGTGAACAAGATGGGCAGCG(SEQID NO:12)
HuC5aRIC2.f	ATGCCACCGCCTGTATAGTCCTGCCCTCCCTCATCCTGCTC (SEQ ID NO:13)
HuC5aRIC2.r	CCTTATATGCCTCCCGGTACACGAAGGAGGGTATGGTCAGCAG (SEQ ID NO:14)
HuC5aRIC3.f	AGAAGGCTGTGGCCATCCTGCGGCTGGTCCTGGGCTTCC (SEQ ID NO:15)
HuC5aRIC3.r	GGCAGCCACGCTATCATCACCCCGTCACCTGGTAGGGC (SEQ ID NO:16)
HuC5aRIC4.f	AAGAGGGTGGAGAAGCTGAACTCCCTGTGTGTCTCCTTTGCC (SEQ ID NO:17)
HuC5aRIC4.r	CCTCTAGAGTTAGGCCGGGGCCAC (SEQ ID NO:18)
MuC5aREX1.r	GACTGCAAAGATGACCAAGGCTGCAACATCCCCAGGTTGCC (SEQ ID NO:19)
MuC5aREX2.f	CGCTGCCCATCTTGTTCACGACCGTTTTAAATCATAACTACTGG (SEQ ID NO:20)
Muc5aREX2.r	AGCAGGATGAGGGAGGCAGGACTATACAGGCGGTGGCATC (SEQ ID NO:21)
MuC5aREX3.f	CTGCTGACCATACCCTCCTTCGTGTACCGGGAGGCATATAAG (SEQ ID NO:22)
MuC5aREX3.r	AGGAAGCCCAGGACCAGCCGCAGGATGGCCACAGCCTTC (SEQ ID NO:23)
MuC5aREX4.f	GCCCTACCAGGTGACGGGGGTGATGATAGCGTGGCTGCC (SEQ ID NO:24)
Muc5aREX4.r	GGCAAAGGAGACACAGGGAGTTCAGCTTCTCCACCCTCTTC (SEQ ID NO:25)

## Análisis de epítopos con péptidos sintéticos

Dos grupos de péptidos con biotina N-terminal y espaciadores GSGS se sintetizaron en forma inmovilizada sobre barras de plástico (Mimotopes Pty Ltd, Melbourne, Australia). El primer grupo contenía todos los 12 meros posibles procedentes del segundo bucle extracelular de C5aR humano, cada uno diferenciado por un aminoácido. El segundo grupo eran 12 meros de la secuencia VREEYFPPKVLC, cada uno con un residuo sustituido por alanina. Los péptidos se reconstituyeron inicialmente en 200 µl de DMSO al 60% y posteriormente se diluyeron en PBS para proporcionar una concentración final de 10 µg/ml para ELISA directo.

## 10 ELISA peptídico

15

20

Las placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina (Nunc) se recubrieron con 10  $\mu$ g/ml de péptido/pocillo en un volumen de 200  $\mu$ l, y se incubaron a 4°C durante una noche. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado ELISA (0,05% de Tween 20 en PBS). Los AcMos se añadieron a 2,5  $\mu$ g/ml, y las placas se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón conjugado con HRP, diluido 1:1000 en tampón de lavado de ELISA, se utilizó para la detección. Las placas se revelaron utilizando TMB (3,3',5,5'-tetrametil bencidina, SIGMA) y se leyeron a  $A_{540}$  nm.

#### Transfección de vectores de expresión en células L1.2

Las células de ratón L1.2 se cultivaron en RPMI 1640 (GIBCO) complementado con 10% de suero de ternera fetal (HyClone), y se transfectaron usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## Modelo de artritis reumatoide en K/BxN

Se recogió el suero de ratones artríticos K/BxN tal y como se ha descrito previamente (Korganow et al. (1999)). La artritis experimental se indujo en ratones receptores mediante la inyección de 150 µl de suero por vía i.p. los días 0 y

2, y se supervisó el progreso de la enfermedad tal y como se ha descrito (Lee *et al.* (2002)). El espesor del tobillo y las puntuaciones clínicas se determinaron diariamente. La puntuación clínica se calculó para cada ratón mediante la suma de las puntuaciones de las cuatro patas: 0 - normal, 1 - ligero enrojecimiento, 2 - roja y algo de inflamación, 3 - roja e hinchazón mayor. Se inyectaron AcMos anti-hC5aR o de control de isotipo (1-10 mg/kg en PBS) por vía i.p. los días -1 y 1 (tratamiento preventivo) o el día 5 (tratamiento terapéutico).

### Análisis estadístico

5

15

20

25

30

35

40

45

50

55

La significación estadística de las diferencias entre los grupos de tratamiento y el control independiente en el modelo de KxB/N se determinó mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un análisis a posteriori con la prueba de comparación múltiple de Dunn.

### 10 Ejemplo 1: Generación de AcMos para C5aR utilizando células L1.2 transfectadas (ejemplo comparativo)

Se obtuvieron AcMos para hC5aR, en primer lugar mediante el uso de un enfoque conocido para receptores quimioatrayentes (Heath *et al.* (1997); Qin *et al.* (1998); Wu *et al.* (1997); Qin, *et al.* (1996)). Los ratones se inmunizaron con células L1.2 (una línea de linfocitos B de linfoma de ratón) que expresaban niveles muy altos de hC5aR (~80.000 receptores por célula). Se llevaron a cabo cinco fusiones y se identificaron más de 40 AcMos diferentes que reaccionaron específicamente con transfectantes de hC5aR, pero no con transfectantes que expresaban otros receptores quimioatrayentes estrechamente relacionados, tales como CXCR1, CXCR2, o el otro receptor que se une a C5a, C5L2 (Gerard *et al.* (2005)). Una cantidad de estos AcMos inhibía la unión de C5a humana marcada con <sup>125</sup>l a transfectantes de hC5aR. El AcMo líder identificado, 7F3, mostraba una potente inhibición de la unión de C5a (Figura 1), inhibía la quimiotaxis de los neutrófilos humanos hacia C5a en un ensayo de quimiotaxis y bloqueaba el flujo de calcio inducido por C5a en los neutrófilos humanos (datos no mostrados).

# Ejemplo 2: Generación de AcMos para el C5aR usando neutrófilos procedentes de ratones con inserción de la secuencia de hC5aR

En un segundo enfoque para desarrollar AcMos anti-C5aR potentes, se generaron ratones con inserción de la secuencia de C5aR mediante recombinación homóloga dirigida, en el gen de C5aR de ratón (*C5R1*). La eliminación simultánea de la secuencia que codificaba C5aR endógeno y su sustitución por la secuencia que codificaba hC5aR se consiguió transfectando células madre embrionarias de ratón (ES) con una estructura artificial diana (Figura 2). Se identificaron dos clones ES de los 672 escrutados por contener la secuencia de hC5aR dirigida correctamente. Se logró la transmisión de la línea germinal del transgén hC5aR y se produjeron 5 ratones quiméricos a partir de estas células ES, estableciendo de este modo la línea con inserción de la secuencia de hC5aR. El gen PGK-neo flanqueado por los sitios loxP se eliminó del locus insertado utilizando una cepa supresora BL/6 Cre. Los ratones homocigotos para el transgén C5aR humano (*hC5R1*<sup>+/+</sup>) fueron identificados por transferencia Southern (Figura 3). Los neutrófilos de estos ratones, expresaban niveles muy altos de hC5aR, a juzgar por la tinción FACS con AcMos anti-hC5aR (Figura 4). Los neutrófilos procedentes de ratones de tipo silvestre no se teñían con el AcMo anti-C5aR humano 7F3, pero se tiñeron intensamente con un AcMo anti-C5aR de ratón, 20/70 (Soruri *et al.* (2003)) (Figura 4). Los C5aRs humanos y de ratón comparten solo un 65% de homología, pero de forma importante para el desarrollo de ratones con inserción de hC5aR, C5a de ratón y humana se une a C5aR humano con una afinidad similar (Gerard *et al.* (1992)) (y nuestras observaciones sin publicar). Los neutrófilos procedentes de ratones *hC5R1*<sup>+/+</sup> migraban hacia C5a humana y de ratón de una manera similar.

A partir de una fusión generamos numerosos AcMos específicos de hC5aR. Los AcMos anti-C5aR generados mediante la inmunización de ratones de tipo silvestre con neutrófilos procedentes de ratones hC5R1<sup>+/+</sup> eran todos distintos, ya que las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada eran todas distintas, lo que indicaba que se originaron a partir de clones independientes.

Los ensayos de unión a ligando revelaron que muchos de estos AcMos mostraban una mayor inhibición de la unión de C5a marcada con <sup>125</sup>I a neutrófilos humanos que el AcMo 7F3. Los anticuerpos generados a partir de neutrófilos de ratones hC5aR<sup>+/+</sup> mostraban un amplio espectro de inhibición de la unión de <sup>125</sup>I-C5a a neutrófilos, oscilando desde una inhibición sustancialmente completa (por ejemplo, 3C5, 8G7, 7H3) a una inhibición parcial o reducida, dependiendo del clon de AcMo (Figura 5). El inhibidor más potente, el AcMo 3C5, tenía una CI<sub>50</sub> de 171 pM, en comparación con una CI<sub>50</sub> para el AcMo 7F3 de 503 pM (Figura 6). Se llevaron a cabo estudios adicionales de unión competitiva a ligando para medir el desplazamiento de <sup>125</sup>I-C5a desde hC5aR en células L1.2 transfectadas con hC5aR, con 7F3 o 3C5. Una vez más, 3C5 (CE50: 0,021 nM) mostraba una afinidad sustancialmente mayor hacia C5aR que 7F3 (CE50: 0,48 nM) (Figura 7).

### Ejemplo 3: Caracterización del epítopo de C5aR unido por AcMos

El uso de transfectantes de hC5aR y neutrófilos de ratón que expresaban hC5aR permitió la generación de AcMos que reconocían, potencialmente, cualquiera de los dominios extracelulares, así como epítopos dependiendo de la estructura terciaria. Por lo tanto, determinamos los epítopos decisivos sobre hC5aR, reconocidos por los AcMos bloqueantes que habíamos generado. Dado que estos anticuerpos reconocen el C5aR humano pero no de ratón, construimos un panel de receptores quiméricos C5aR humano/ratón (Figura 8). Los dominios extracelulares únicos o múltiples de C5aR humano se sustituyeron secuencialmente por la región homóloga procedente de C5aR de ratón,

utilizando un método de PCR de extensión con solapamiento (Shevchuk *et al.* (2004)). Los receptores quiméricos se expresaban en células L1.2 de ratón y la reactividad de los AcMos se determinó mediante una tinción FACS. Todos los anticuerpos con la actividad bloqueante más potente, incluyendo los AcMos 7F3, 3G5, 7H3 y 8G7, se unían al segundo bucle extracelular de hC5aR (Figura 9). Para definir los residuos de contacto precisos de los anticuerpos bloqueantes más potentes sobre el segundo bucle extracelular de C5aR, realizamos un análisis de exploración de péptidos usando un conjunto de péptidos 12 meros, siendo cada solapamiento de 11 aminoácidos, que cubría el segundo bucle extracelular de hC5aR, y ELISA. Los AcMos 3C5 y 7F3 mostraban una unión fuerte a siete péptidos desde el nº 1 al nº 7, que contenían la secuencia hexapeptídica común <sup>179</sup>EEYFPP<sup>184</sup> (Figura 10). El epítopo <sup>179</sup>EEYFPP<sup>184</sup> se estudió adicionalmente mediante la sustitución con alanina de cada aminoácido incluido en esta región del péptido. Las Figuras 11A y 11B muestran que los aminoácidos E<sup>179</sup>, E<sup>180</sup>, Y<sup>181</sup> y F<sup>182</sup> eran decisivos para el reconocimiento del péptido a través de los AcMos 7F3, 3C5, 8G7 y 7H3. Por lo tanto, entre los numerosos AcMos generados por nosotros contra hC5aR, los inhibidores más potentes de la unión de C5a o de la función, estaban todos cartografiados en una región muy específica en el segundo bucle extracelular de C5aR.

### Ejemplo 4: Afinidades de la unión del AcMo

5

10

20

25

30

15 Se utilizó un análisis BIACore para determinar las afinidades de la unión de los anticuerpos 7F3, 3C5, 8G7 y 7H3 al péptido 23 (2° bucle extracelular, residuos 173 a 205 de C5aR humano - LYRVVREEYFPPKVLCGVDYSHDKRRERAVAIV). Los resultados se muestran en la Figura 12 y se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: Resumen de los datos de BIACore para la serie de AcMos anti-C5aR

	Tasa de asociación (on)	Tasa de disociación (off)	Afinidad de la unión	Afinidad de la unión
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KA (1/M)	KD (nM)
7H3-N9	5,95E + 05	9,95E-03	5,97E + 07	16,7
3C5	3,30E + 06	1,60E-03	2,10E + 09	0,48
8G7-M6	3,70E + 06	5,90E-03	6,30E + 08	1,6
7F3	6,40E + 05	4,50E-04	1,40E + 09	0,7
2D7 (ctrl mlgG2a)	4,60E + 03	1,90E-04	2,50E + 07	40
6G7 (ctrl mlgG3)	1,90E + 04	2,60E-04	7,20E + 07	14

Análisis BIACore adicionales se realizaron para comparar las afinidades de la unión de los anticuerpos 7F3 y 3C5 con el péptido 23 en condiciones variables. Los resultados de estos análisis adicionales se muestran en la Tabla 3. Las condiciones para estos experimentos BIAcore adicionales eran como se han descrito anteriormente en "Detalles Experimentales" con las siguientes modificaciones:

Experimento 2: Concentraciones de los anticuerpos incluidos en el análisis cinético - 100 nM - 0,78 nM; 20 min de disociación.

Experimento 3: Concentraciones de los anticuerpos incluidos en el análisis cinético - 7F3: 25 nM - 0,78 nM; 3C5: 6,25 nM - 0,78 nM; 5 min de disociación.

Experimento 4: Concentraciones de los anticuerpos incluidos en el análisis cinético - 7F3: 25 nM - 1,56 nM; 3C5: 6,25 nM - 0,4 nM; 1 min de asociación, 3 min de disociación.

Tabla 3: Resumen de datos adicionales de BIACore para 7F3 y 3C5

Experimento	AcMo	Tasa de asociación (on)	Tasa de disociación (off)	Afinidad de la unión	Afinidad de la unión
		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KA (1/M)	KD (nM)
1.	7F3	2,10E + 05	3,80e-04	5,40E + 08	1,80
	3C5	6,80E + 05	5,20E-04	1,30E + 09	0,76
2.	7F3	2,90E + 05	3,50E-04	8,10E + 08	1,20
	3C5	1,50E + 06	7,00E-04	2,20E + 09	0,45
3.	7F3	3,32E + 05	4,62E-04	7,19E + 08	1,39
	3C5	1,06E + 06	1,11E-03	9,60E + 08	1,04
4.	7F3	2,86E + 05	5,98E-04	4,79E + 08	2,09
	3C5	1,03e + 06	1,44E-03	7,16E + 08	1,40

Estos resultados muestran que 3C5 tiene una afinidad mejorada aproximadamente 1,5 veces hacia el péptido C5aR

que 7F3.

10

15

20

30

35

40

45

#### Ejemplo 5: Pruebas de AcMos anti-hC5aR en un modelo de ratón de artritis reumatoide

El desarrollo de ratones transgénicos que expresan moléculas humanas es un medio conveniente en modelos animales adecuados para someter a ensayo nuevas terapias humanas, diseñadas para el uso en seres humanos. C5aR tiene un papel esencial en la patogénesis de la artritis inflamatoria en ratones. Por ejemplo ratones que carecen de C5aR están protegidos contra la artritis inducida por autoanticuerpos anti-glucosa 6-fosfato isomerasa (Ji et al. (2002)) o AcMos contra colágeno de tipo II (Grant et al. (2002)). Los AcMos anti-hC5aR se sometieron a ensayo para determinar su capacidad para proteger o revertir la progresión de la artritis experimental en ratones hC5R1<sup>+1</sup> La transferencia de suero desde ratones K/BxN artríticos a ratones sanos induce una reacción inflamatoria específica de la articulación que imita la enfermedad K/BxN (Kouskoff et al. (1996); Korganow et al. (1999)). Los ratones se trataron previamente ya sea con AcMo anti-hC5aR o AcMo de control con isotipo correspondiente, los días -1 y 1 y el suero de K/BxN se inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) el día 0 y 2. Después de la transferencia de suero, los ratones tratados con anticuerpo de control mostraban artritis clínica típica con hinchazón de las articulaciones e infiltrados inflamatorios, mientras que los ratones tratados con un AcMo anti-hC5aR mostraban una ausencia completa de inflamación, clínica o histológicamente. No hubo ninguna diferencia observable entre los ratones hC5R1<sup>+/+</sup> y crías de la misma camada de control, en el desarrollo de la enfermedad (datos no mostrados), lo que indicaba que el C5aR humano era completamente funcional, ya que la enfermedad en el modelo KxB/N depende de C5aR (Ji et al. (2002); Grant. et al. (2002)). Más importante aún, cuando el anticuerpo se administraba 5 días después de la inducción de la enfermedad, se observaba una reversión significativa de la inflamación establecida. Los efectos de los AcMos producidos contra neutrófilos de ratón que expresaban hC5aR (3C5 y 8G7) se alargaron más que los del AcMo 7F3 (Figuras 13 y 14). Tan solo con 1 mg/kg de AcMo 3C5 se podía revertir la inflamación y proporcionar una inhibición sostenida.

#### Referencias

Allegretti, M. et al. Targeting C5a: recent advances in drug discovery. Curr. Med. Chem. 12, 217-236 (2005).

Campbell, J.J., Qin, S., Bacon, K.B., Mackay, C.R. & Butcher, E.C. Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. J Cell Biol 134, 255-266 (1996).

Gerard, C. & Gerard, N.P. C5A anaphylatoxin and its seven transmembrane-segment receptor. Annu. Rev. Immunol. 12, 775-808 (1994).

Grant, E.P. et al. Essential role for the C5a receptor in regulating the effector phase of synovial infiltration and joint destruction in experimental arthritis. J. Exp. Med. 196, 1461-1471 (2002).

Guo, R.F. & Ward, P.A. Role of C5a in inflammatory responses. Annu. Rev. Immunol. 23, 821-852 (2005).

Haslett, C., Guthrie, L.A., Kopaniak, M.M., Johnston, R.B., Jr. & Henson, P.M. Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. Am J Pathol 119, 101-110 (1985).

Heath, H. et al. Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody. J. Clin. Invest. 99, 178-184 (1997).

Ji, H. et al. Arthritis critically dependent on innate immune system players. Immunity 16, 157-168 (2002).

Kaneko, Y., et al., Antagonistic peptides against human anaphylatoxin C5a. Immunology, 1995. 86(1): p. 149-54.

Klco, J.M. et al Nat Struct Mol Biol. 12:320-326 (2005).

Konteatis, Z.D., et al., Development of C5a receptor antagonists. Differential loss of functional responses. Journal of Immunology, 1994. 153(9): p. 4200-5.

Korganow, A.S. et al. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. Immunity 10, 451-461 (1999).

Kouskoff, V. et al. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. Cell 87, 811-822 (1996).

- Luster, A.D., Alon, R. & von Andrian, U.H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. Nat. Immunol. 6, 1182-1190 (2005).
- Mackay, C.R. Chemokines: immunology's high impact factors. Nat. Immunol. 2, 95-101 (2001).
- Morgan, E.L., et al., Anti-C5a receptor antibodies. Characterization of neutralizing antibodies specific for a peptide, C5aR-(9-29), derived from the predicted amino-terminal sequence of the human C5a receptor. Journal of Immunology, 1993. 151(1): p. 377-88.
  - Murdoch, C. y A. Finn, Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. Blood, 2000. 95(10): p. 3032-43.
- Murphy, P.M. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. Annu. Rev. Immunol. 12, 593-633 (1994).
  - Pellas, T.C., et al., Novel C5a receptor antagonists regulate neutrophil functions in vitro and in vivo. Journal of Immunology, 1998. 160(11): p. 5616-21.
  - Ponath, P.D. et al. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. J. Clin. Invest. 97, 604-612 (1996).
    - Qin, S. et al. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 receptors on subsets of T cells: correlation with transendothelial chemotactic potential. Eur. J. Immunol. 26, 640-647 (1996).
    - Qin, S. et al. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. J. Clin. Invest. 101, 746-754 (1998).
- 20 Riedemann, N.C., Guo, R.F. & Ward, P.A. The enigma of sepsis. J. Clin. Invest. 112, 460-467 (2003).

- Shevchuk, N.A. et al. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. Nucleic Acids Res 32, e19 (2004).
- Sumichika, H. C5a receptor antagonists for the treatment of inflammation. Curr Opin Investig Drugs 5, 505-510 (2004).
- von Andrian, U.H. & Mackay, C.R. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. N. Engl. J. Med. 343, 1020-1034 (2000).
  - Wang, Y., Rollins, S.A., Madri, J.A. & Matis, L.A. Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 8955-8959 (1995).
- Watanabe, H., et al., Analysis of C5a receptor by monoclonal antibody. Journal of Immunological Methods, 1995. 185(1): p. 19-29.
  - Wu, L. et al. Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding. J. Exp. Med. 186, 1373-1381 (1997).
- Wurch, T., Colpaert, F.C. & Pauwels, P.J. Chimeric receptor analysis of the ketanserin binding site in the human 5-Hydroxytryptamine1D receptor: importance of the second extracellular loop and fifth transmembrane domain in antagonist binding. Mol Pharmacol 54, 1088-1096 (1998).

## **LISTADO DE SECUENCIAS**

145

<110> G2 Inflammation Pty Ltd <120> Anticuerpos anti-C5aR con propiedades mejoradas <130> 505869 5 <160> 63 <170> PatentIn versión 3.3 <210> 1 < 211> 350 < 212> PRT 10 < 213> Homo sapiens <400> 1 Met Asn Ser Phe Asn Tyr Thr Thr Pro Asp Tyr Gly His Tyr Asp Asp Lys Asp Thr Leu Asp Leu Asn Thr Pro Val Asp Lys Thr Ser Asn Thr Leu Arg Val Pro Asp Ile Leu Ala Leu Val Ile Phe Ala Val Val Phe 40 Leu Val Gly Val Leu Gly Asn Ala Leu Val Val Trp Val Thr Ala Phe Glu Ala Lys Arg Thr Ile Asn Ala Ile Trp Phe Leu Asn Leu Ala Val 70 75 Ala Asp Phe Leu Ser Cys Leu Ala Leu Pro Ile Leu Phe Thr Ser Ile Val Gln His His Trp Pro Phe Gly Gly Ala Ala Cys Ser Ile Leu Pro Ser Leu Ile Leu Leu Asn Met Tyr Ala Ser Ile Leu Leu Leu Ala Thr Ile Ser Ala Asp Arg Phe Leu Leu Val Phe Lys Pro Ile Trp Cys

170

Gln Asn Phe Arg Gly Ala Gly Leu Ala Trp Ile Ala Cys Ala Val Ala

Trp Gly Leu Ala Leu Leu Thr Ile Pro Ser Phe Leu Tyr Arg Val

Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr

Ser	His	Asp 195	Lys	Arg	Arg	Glu	<b>A</b> rg 200	Ala	Val	Ala	Ile	Val 205	Arg	Leu	Val
Leu	Gly 210	Phe	Leu	Trp	Pro	Leu 215	Leu	Thr	Leu	Thr	Ile 220	Cys	Tyr	Thr	Phe
Ile 225	Leu	Leu	Arg	Thr	Trp 230	Ser	Arg	Arg	Ala	Thr 235	Arg	Ser	Thr	Lys	Thr 240
Leu	Lys	Val	Val	Val 245	Ala	Val	Val	Ala	Ser 250	Phe	Phe	Ile	Phe	Trp 255	Leu
Pro	Tyr	Gln	Val 260	Thr	Gly	Ile	Met	Met 265	Ser	Phe	Leu	Glu	Pro 270	Ser	Ser
Pro	Thr	Phe 275	Leu	Leu	Leu	Asn	Lys 280	Leu	Asp	Ser	Leu	Cys 285	Val	Ser	Phe
Ala	Tyr 290	Ile	Asn	Cys	Cys	Ile 295	Asn	Pro	Ile	Ile	<b>Tyr</b> 300	Val	Val	Ala	Gly
G1n 305	Gly	Phe	Gln	Gly	Arg 310	Leu	Arg	Lys	Ser	Leu 315	Pro	Ser	Leu	Leu	Arg 320
Asn	Val	Leu	Thr	G1u 325	Glu	Ser	Val	Val	Arg 330	Glu	Ser	Lys	Ser	Phe 335	Thr
_		Thr	Val 340	Asp	Thr	Met	Ala	Gln 345	Lys	Thr	Gln	Ala	Val 350		
<210 < 211 < 212 < 213	1> 33 2> PF	RT	apien	s											
<400 Leu 1	_	Arg	Val	Val 5	Arg	Glu	Glu	Tyr	Phe 10	Pro	Pro	Lys	Val	<b>Le</b> u <b>15</b>	Cys
Gly	Val	Asp	Туг 20	Ser	His	Asp	Lys	Arg 25	Arg	<b>G</b> lu	Arg	Ala	Val 30	Ala	Ile
Val															
<210 < 211 < 212 < 213	I> 11 2> PF	RT	ısculu	ıs											

<400 Asp 1	-	Gln	Leu	Gln 5	Glu	Ser	G1y	Pro	Gly 10	Leu	Val	Lys	Pro	Ser 15	Gln
Ser	Leu	Ser	Leu 20	Thr	Cys	Ser	Val	Thr 25	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr 30	Ser	Gly
Asn	Tyr	Trp 35	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln 40	Phe	Pro	Gly	Lys	Lys 45	Leu	Glu	Trp
Met	Gly 50	His	Ile	Ser	Tyr	Asp 55	Gly	Asn	Asn	Lys	Tyr 60	Asn	Pro	Ser	Leu
Lys 65	Asn	Arg	Ile	Ser	Ile 70	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser 75	Lys	Asn	Gln	Phe	Phe 80
Leu	Arg	Leu	Asn	Ser 85	Val	Thr	Ala	Glu	Asp 90	Thr	Ala	Ala	Tyr	Tyr 95	Cys
Ala	Leu	Phe	Tyr 100	Phe	Asp	Tyr	Ala	Ser 105	Phe	Thr	Tyr	Trp	Gly 110	Gln	Gly
Thr	Leu	Val 115	Thr	Val	Ser	Ala									
<210 < 211 < 212	l> 11														
< 213	3> Mu	ıs mu	sculu	S											
<400	> 4	val			Gln	Thr	Pro	Leu	Ser 10	Leu	Pro	Val	Ser	Leu 15	Gly
<400 Asp 1	>4 Val		Met	Thr 5					10					15	
<400 Asp 1	> 4 Val Gln	Val	Met Ser 20	Thr 5	Ser	Cys	Arg	Ser 25	10 Ser	Gln	Ser	Leu	Val 30	15 His	Ser
<400 Asp 1 Asp	> 4 Val Gln	Val Ala Asn	Met Ser 20 Thr	Thr 5 Ile Tyr	Ser Leu	Cys His	Arg Trp 40	Ser 25 Tyr	10 Ser Leu	Gln Arg	Ser Lys	Leu Pro 45	Val 30 Gly	15 His Gln	Ser
<400 Asp 1 Asp Asn	> 4 Val Gln Gly Lys 50	Val Ala Asn 35	Met Ser 20 Thr	Thr 5 Ile Tyr	Ser Leu Tyr	Cys His Lys 55	Arg Trp 40 Val	Ser 25 Tyr Ser	10 Ser Leu Asn	Gln Arg	Ser Lys Phe 60	Leu Pro 45 Ser	Val 30 Gly	His Gln Val	Ser Ser Pro
<400 Asp 1 Asp Asn Pro	<pre>&gt; 4 Val Gln Gly Lys 50</pre>	Val Ala Asn 35	Met Ser 20 Thr Leu Ser	Thr 5	Ser Leu Tyr Ser 70	Cys His Lys 55	Arg Trp 40 Val	Ser 25 Tyr Ser	10 Ser Leu Asn	Gln Arg Arg Asp 75	Ser Lys Phe 60	Leu Pro 45 Ser	Val 30 Gly Gly Leu	His Gln Val	Ser Ser Pro
<400 Asp 1 Asp Asn Pro Asp 65	> 4 Val Gln Gly Lys 50 Arg	Val Ala Asn 35 Leu Phe	Met Ser 20 Thr Leu Ser	Thr 5 lle Tyr lle Gly Ala 85	Ser Leu Tyr Ser 70	Cys His Lys 55 Gly	Arg Trp 40 Val Ser	Ser 25 Tyr Ser Gly	Ser Leu Asn Thr	Gln Arg Arg Tyr	Ser Lys Phe 60	Leu Pro 45 Ser Thr	Val 30 Gly Gly Leu	His Gln Val Lys Gln 95	Ser Pro Ile 80

	<400 Glu 1	_	Lys	Leu	Glu 5	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly 10	Leu	Val	Gln	Pro	Gly 15	Gly
	Ser	Met	Lys	Leu 20	Ser	Cys	Val	Ala	Ser 25	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser 30	Asp	Ala
	Trp	Met	Asp 35	Trp	Val	Arg	Gln	Ser 40	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu 45	Glu	Trp	Val
	Ala	Gly 50	Ile	Arg	Asn	Arg	<b>A</b> la 55	Asn	Asn	His	Ala	Thr 60	Tyr	Tyr	Val	Ala
	Ser 65	Val	Lys	Gly	Arg	Phe 70	Thr	Val	Ser	Arg	Asp 75	Asp	Ser	Lys	Ser	Ser 80
	Val	Tyr	Leu	Gln	Met 85	Asn	Ser	Leu	Arg	<b>A</b> la 90	Glu	Asp	Ala	Gly	Ile 95	Tyr
	Tyr	Cys	Thr	Arg 100	Gly	Asp	Gly	Tyr	Phe 105	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly 110	Gln	Gly
	Thr	Thr	Leu 115	Thr	Val	Ser	Ser									
5	<210 < 211 < 212 < 213	l> 11 2> PR	RΤ	sculu	s											
	<400 Asp 1		Val	Leu	Thr 5	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser 10	Leu	Ser	Val	Ser	Leu 15	Gly
	Asp	Gln	Ala	Ser 20	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser 25	Gly	Gln	Ser	Leu	Val 30	His	Ser
	Asn	Gly	Asn 35	Thr	Туг	Leu	His	Trp 40	Туг	Leu	Gln	Lys	Pro 45	Gly	Gln	Ser
	Ser	Lys 50	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys 55	Val	Ser	Asn	Arg	Leu 60	Ser	Gly	Val	Pro
	Asp 65	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser 70	Gly	Ser	Gly	Thr	<b>Asp</b> 75	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile 80
	Ser	Arg	Val	<b>Gl</b> u	<b>Ala</b> 85	Glu	Asp	Leu	Gly	<b>Val</b> 90	Tyr	Phe	Cys	Ser	Gln 95	Thr
10	Thr	His	Val	Pro 100	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly 105	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu 110	Ile	Lys
	<210 < 211 < 212 < 213	l> 11 2> PF	RT	sculu	s											

400	_														
<400 Asp 1		Gln	Leu	Gln 5	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly 10	Leu	Val	Lys	Pro	Ser 15	Gln
Ser	Leu	Ser	Leu 20	Thr	Cys	Ser	Val	Thr 25	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr 30	Ser	Gly
His	Tyr	Trp 35	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln 40	Leu	Pro	Gly	Asn	Lys 45	Met	Glu	Trp
Met	Gly 50	His	Ile	Ser	Asn	Asp 55	Gly	Ser	Asn	Arg	Tyr 60	Asn	Pro	Ser	Leu
Lys 65	Asn	Arg	Ile	Ser	Ile 70	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser 75	Lys	Asn	Gln	Phe	Phe 80
Leu	Lys	Leu	Asn	Ser 85	Val	Thr	Thr	Glu	Asp 90	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr 95	Cys
Ala	Leu	Phe	Tyr 100	Phe	Ala	Tyr	Ala	Ser 105	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly 110	Gln	Gly
Thr	Leu	Val 115	Thr	Val	Ser	Ala									
<210 < 211	-	2													
< 212		RT ıs mu	sculu	S											
< 212 < 213 <400	3> Mเ > 8				Gln	Thr	Pro	Leu	Ser 10	Leu	Pro	Val	Ser	Leu 15	Gly
< 212 < 213 <400 <b>As</b> p 1	3> Mu > 8 <b>Val</b>	ıs mu	Met	Thr 5					10					15	-
< 212 < 213 <400 <b>As</b> p 1	3> Mu > 8 <b>Val</b>	val	Met Ser	Thr 5				Ser	10				Leu	15	-
< 212 < 213 <400 <b>As</b> p 1	3> Mu > 8 <b>Val</b>	val	Met	Thr 5					10					15	-
< 212 < 213 <400 Asp 1	3> Mu > 8 Val Gln	val	Met Ser 20	Thr 5	Ser	Cys	Arg	Ser 25	10 Ser	Gln	Ser	Leu	Leu 30	15 His	Ser
< 212 < 213 <400 <b>Asp</b> 1 Asp	3> Mu > 8 Val Gln	Val Ala Asn	Met Ser 20 Thr	Thr 5 Ile Tyr	Ser Leu	Cys	Arg Trp 40	Ser 25 Tyr	10 Ser Leu	Gln Gln	Ser Lys	Leu Pro 45	Leu 30 Gly	15 His	Ser
< 212 < 213 <400 Asp 1 Asp	S> Mu > 8 Val Gln Gly Lys 50	Val Ala Asn 35	Met Ser 20 Thr	Thr 5	Ser Leu Tyr	Cys His Lys 55	Arg Trp 40 Val	Ser 25 Tyr Ser	10 Ser Leu Thr	Gln Gln <b>A</b> rg	Ser Lys Phe 60	Leu Pro 45 Ser	Leu 30 Gly	His Gln Val	Ser Ser Pro
< 212 < 213 <400 Asp 1 Asp Pro	3> Mu > 8 Val Gln Gly Lys 50	Val Ala Asn 35	Met Ser 20 Thr Leu Ser	Thr 5	Ser Leu Tyr Ser 70	Cys His Lys 55	Arg Trp 40 Val	Ser 25 Tyr Ser	10 Ser Leu Thr	Gln Gln Arg Asp	Ser Lys Phe 60	Leu Pro 45 Ser	Leu 30 Gly Gly Leu	15 His Gln Val	Ser Ser Pro
< 212 < 213 <400 Asp 1 Asp Asn Pro	3> Mu > 8 Val Gln Gly Lys 50 Arg	Val Ala Asn 35 Leu	Met Ser 20 Thr Leu Ser	Thr 5 Ile Tyr Ile Gly Ala 85	Ser Leu Tyr Ser 70	Cys His 55 Gly	Arg Trp 40 Val Ser	Ser 25 Tyr Ser Gly	10 Ser Leu Thr Ala Val	Gln Arg Asp 75	Ser Lys Phe 60 Phe	Leu Pro 45 Ser Thr	Leu 30 Gly Gly Leu Ser	His Gln Val Gln Gln 95	Ser Ser Pro Ile 80 Ser

```
< 212> PRT
              < 213> Homo sapiens
              <400> 9
               Ser Gly Ser Gly Leu Tyr Arg Val Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro
               Lys Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr Ser His Asp Lys Arg Arg Glu Arg
               Ala Val Ala Ile Val
 5
              <210> 10
              < 211> 46
              < 212> ADN
              < 213> Artificial
              <220>
10
              < 223> oligonucleótido
              <400> 10
              cgtttaaact taagettgcc accatggacc ccatagataa cagcag
                                                                     46
              <210> 11
              < 211> 41
              < 212> ADN
15
              < 213> Artificial
              <220>
              < 223> oligonucleótido
              <400> 11
20
              ggcaacctgg ggatgttgca gccttggtca tctttgcagt c
                                                              41
              <210> 12
              < 211> 44
              < 212> ADN
              < 213> Artificial
25
              <220>
              < 223> oligonucleótido
              ccagtagtta tgatttaaaa cggtcgtgaa caagatgggc agcg
                                                                   44
              <210> 13
30
              < 211> 41
              < 212> ADN
              < 213> Artificial
              <220>
              < 223> oligonucleótido
35
              <400> 13
              atgccaccgc ctgtatagtc ctgccctccc tcatcctgct c
                                                             41
              <210> 14
              < 211> 43
```

	< 212> ADN < 213> Artificial	
	<220> < 223> oligonucleótido	
5	<400> 14 ccttatatgc ctcccggtac acgaaggagg gtatggtcag cag	43
10	<210> 15 < 211> 39 < 212> ADN < 213> Artificial	
	<220> < 223> oligonucleótido	
	<400> 15 agaaggctgt ggccatcctg cggctggtcc tgggcttcc	39
15	<210> 16 < 211> 39 < 212> ADN < 213> Artificial	
20	<220> < 223> oligonucleótido	
	<400> 16 ggcagccacg ctatcatcac ccccgtcacc tggtagggc	39
25	<210> 17 < 211> 42 < 212> ADN < 213> Artificial	
	<220> < 223> oligonucleótido	
30	<400> 17 aagagggtgg agaagctgaa ctccctgtgt gtctcctttg cc	42
	<210> 18 < 211> 24 < 212> ADN < 213> Artificial	
35	<220> < 223> oligonucleótido	
	<400> 18 cctctagagt taggccgggg ccac 24	
40	<210> 19 < 211> 41 < 212> ADN < 213> Artificial	
	<220> < 223> oligonucleótido	

	<400> 19 gactgcaaag atgaccaagg ctgcaacatc cccaggttgc c	41
5	<210> 20 < 211> 44 < 212> ADN < 213> Artificial	
	<220> < 223> oligonucleótido	
10	<400> 20 cgetgeceat ettgtteaeg acegttttaa ateataaeta etgg	44
	<210> 21 < 211> 41 < 212> ADN < 213> Artificial	
15	<220> < 223> oligonucleótido	
	<400> 21 agcaggatga gggagggcag gactatacag gcggtggcat c	4′
20	<210> 22 < 211> 42 < 212> ADN < 213> Artificial	
	<220> < 223> oligonucleótido	
25	<400> 22 ctgctgacca taccetcett cgtgtaccgg gaggcatata ag	42
30	<210> 23 < 211> 39 < 212> ADN < 213> Artificial	
	<220> < 223> oligonucleótido	
	<400> 23 aggaagccca ggaccagccg caggatggcc acagccttc	39
35	<210> 24 < 211> 39 < 212> ADN < 213> Artificial	
40	<220> < 223> oligonucleótido	
	<400> 24 gccctaccag gtgacggggg tgatgatagc gtggctgcc	39
	<210> 25 < 211> 43	

```
< 212> ADN
             < 213> Artificial
             <220>
             < 223> oligonucleótido
             <400> 25
 5
             ggcaaaggag acacacaggg agttcagctt ctccaccctc ttc
                                                              43
             <210> 26
             < 211> 37
             < 212> PRT
             < 213> Homo sapiens
10
              <400> 26
              Ser Gly Ser Gly Leu Tyr Arg Val Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro
              Lys Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr Ser His Asp Lys Arg Arg Glu Arg
                                                  25
              Ala Val Ala Ile Val
                       35
             <210> 27
             < 211> 6
15
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
             <220>
             < 223> péptido
             <400> 27
               Glu Glu Tyr Phe Pro Pro
                                 5
20
             <210> 28
             < 211> 12
              < 212> PRT
             < 213> Artificial
25
             <220>
             < 223> péptido
             <400> 28
              Leu Tyr Arg Val Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro
             <210> 29
30
             < 211> 12
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
             <220>
             < 223> péptido
35
             <400> 29
              Tyr Arg Val Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys
                                5
```

```
<210> 30
             < 211> 12
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
 5
             <220>
             < 223> péptido
             <400> 30
              Arg Val Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val
             <210> 31
10
             < 211> 12
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
             <220>
             < 223> péptido
15
             <400> 31
              Val Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu
                                                       10
             <210> 32
             < 211> 12
             < 212> PRT
20
             < 213> Artificial
             <220>
             < 223> péptido
             <400> 32
              Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys
             <210> 33
25
             < 211> 12
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
             <220>
30
             < 223> péptido
             <400> 33
              Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys Gly
             <210> 34
             < 211> 12
             < 212> PRT
35
             < 213> Artificial
              <220>
             < 223> péptido
              <400> 34
              Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys Gly Val
                                5
40
```

```
<210> 35
             < 211> 12
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
 5
             <220>
             < 223> péptido
             <400> 35
              Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys Gly Val Asp
             <210> 36
10
             < 211> 12
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
             <220>
             < 223> péptido
15
             <400> 36
                 Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr
                                                         10
             <210> 37
20
             < 211> 12
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
             <220>
             < 223> péptido
25
             <400> 37
              Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr Ser
             <210> 38
             < 211> 12
             < 212> PRT
30
             < 213> Artificial
             <220>
             < 223> péptido
             <400> 38
              Pro Pro Lys Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr Ser His
             <210> 39
35
             < 211> 12
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
             <220>
40
             < 223> péptido
             <400> 39
              Pro Lys Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr Ser His Asp
```

```
<210>40
             < 211> 12
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
 5
             <220>
             < 223> péptido
              <400> 40
              Lys Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr Ser His Asp Lys
                                5
             <210>41
10
             < 211> 12
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
             <220>
             < 223> péptido
15
             <400> 41
              Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr Ser His Asp Lys Arg
             <210> 42
             < 211> 12
             < 212> PRT
20
             < 213> Artificial
             <220>
             < 223> péptido
             <400> 42
              Leu Cys Gly Val Asp Tyr Ser His Asp Lys Arg Arg
             <210> 43
25
             < 211> 12
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
             <220>
30
             < 223> péptido
             <400> 43
              Cys Gly Val Asp Tyr Ser His Asp Lys Arg Arg Glu
             <210> 44
             < 211> 12
35
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
              <220>
             < 223> péptido
              <400> 44
              Gly Val Asp Tyr Ser His Asp Lys Arg Arg Glu Arg
                                5
40
                                                      10
```

```
<210>45
             < 211> 12
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
 5
             <220>
             < 223> péptido
             <400> 45
              Val Asp Tyr Ser His Asp Lys Arg Arg Glu Arg Ala
                                5
             <210>46
             < 211> 12
10
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
             <220>
             < 223> péptido
15
             <400>46
              Asp Tyr Ser His Asp Lys Arg Arg Glu Arg Ala Val
             <210> 47
             < 211> 12
             < 212> PRT
20
             < 213> Artificial
             <220>
             < 223> péptido
             <400> 47
              Tyr Ser His Asp Lys Arg Arg Glu Arg Ala Val Ala
             <210> 48
25
             < 211> 12
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
             <220>
30
             < 223> péptido
             <400> 48
              Ser His Asp Lys Arg Arg Glu Arg Ala Val Ala Ile
             <210>49
             < 211> 12
             < 212> PRT
35
             < 213> Artificial
              <220>
             < 223> péptido
             <400>49
              His Asp Lys Arg Arg Glu Arg Ala Val Ala Ile Val
                               5
40
```

```
<210> 50
             < 211> 12
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
 5
             <220>
             < 223> péptido
             <400> 50
              Leu Tyr Arg Val Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro
                                5
             <210> 51
10
             < 211> 12
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
             <220>
             < 223> péptido
15
              <400> 51
              Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Ala
             <210> 52
             < 211> 12
             < 212> PRT
20
             < 213> Artificial
             <220>
             < 223> péptido
             <400> 52
              Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Ala Cys
             <210> 53
25
             < 211> 12
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
             <220>
30
             < 223> péptido
             <400> 53
              Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Ala Leu Cys
             <210> 54
             < 211> 12
             < 212> PRT
35
             < 213> Artificial
              <220>
             < 223> péptido
              <400> 54
              Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Ala Val Leu Cys
                                5
                                                       10
40
```

```
<210> 55
             < 211> 12
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
 5
             <220>
             < 223> péptido
              <400> 55
              Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Ala Lys Val Leu Cys
                                5
             <210> 56
10
             < 211> 12
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
             <220>
             < 223> péptido
15
              <400> 56
              Val Arg Glu Glu Tyr Phe Ala Pro Lys Val Leu Cys
             <210> 57
             < 211> 12
             < 212> PRT
20
             < 213> Artificial
             <220>
             < 223> péptido
             <400> 57
              Val Arg Glu Glu Tyr Ala Pro Pro Lys Val Leu Cys
25
             <210> 58
             < 211> 12
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
             <220>
30
             < 223> péptido
             <400> 58
              Val Arg Glu Glu Ala Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys
             <210> 59
             < 211> 12
35
             < 212> PRT
             < 213> Artificial
             <220>
             < 223> péptido
             <400> 59
              Val Arg Glu Ala Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys
40
```

```
<210> 60
              < 211> 12
              < 212> PRT
             < 213> Artificial
              <220>
 5
              < 223> péptido
              <400> 60
              Val Arg Ala Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys
                                5
              <210>61
10
              < 211> 12
              < 212> PRT
              < 213> Artificial
              <220>
              < 223> péptido
              <400> 61
15
              Val Ala Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys
              <210> 62
              < 211> 12
              < 212> PRT
20
              < 213> Artificial
              <220>
              < 223> péptido
              <400> 62
              Ala Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys
              <210> 63
25
             < 211> 12
< 212> PRT
              < 213> Artificial
              <220>
30
              < 223> péptido
              <400> 63
              Pro Cys Tyr Val Leu Glu Lys Pro Glu Phe Val Arg
                                5
```

#### **REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo que comprende:

10

25

una región variable de la cadena pesada tal y como se muestra en SEQ ID NO: 5 [7H3 Vh] y (ii) una región variable de la cadena ligera tal y como se muestra en SEQ ID NO: 6 [7H3 Vl]; o

(ii) una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de bucle de CDR1, CDR2 y CDR3 de una región variable de la cadena pesada tal y como se muestra en SEQ ID NO: 5 [7H3 Vh], de acuerdo con la numeración de Kabat, y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de bucle de CDR1, CDR2 y CDR3 de una región variable de la cadena ligera tal y como se muestra en SEQ ID NO: 6 [7H3 Vl], de acuerdo con la numeración de Kabat,

en donde el anticuerpo se une a C5aR humano y reduce o inhibe la unión de C5a a C5aR.

2. El anticuerpo según la reivindicación 1, en el que las CDRs en el anticuerpo son las siguientes:

CDR H1: residuos 26-35 de SEQ ID NO: 5 (inclusive);

CDR H2: residuos 50-68 de SEQ ID NO: 5 (inclusive);

CDR H3: residuos 99-108 de SEQ ID NO: 5 (inclusive);

15 CDR L1: residuos 24-39 de SEQ ID NO: 6 (inclusive);

CDR L2: residuos 55-61 de SEQ ID NO: 6 (inclusive);

CDR L3: residuos 94-102 de SEQ ID NO: 6 (inclusive).

- 3. Un anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, recombinante, un anticuerpo quimérico o humanizado.
- 20 4. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es un anticuerpo humanizado y comprende dominios variables en los que las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) se corresponden con las CDRs tal y como se muestran en SEQ ID NO: 5 [7H3 Vh] y SEQ ID NO: 6 [7H3 Vl].
  - 5. Un anticuerpo monoclonal seleccionado a partir del grupo que consiste en:
    - (i) un anticuerpo que comprende una secuencia variable de la cadena pesada tal y como se muestra en SEQ ID NO: 5 y una secuencia variable de la cadena ligera tal y como se muestra en SEQ ID NO: 6; y
    - (ii) un anticuerpo producido por un hibridoma depositado en la ECACC con el número de orden 06081802.
  - 6. Un hibridoma tal como el depositado en la ECACC con el número de orden 06081802.
  - 7. Un conjugado que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un agente terapéutico o un marcador detectable.
- 30 8. Una molécula de ácido nucleico aislada, comprendiendo la molécula de ácido nucleico una secuencia que codifica un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
  - 9. Una composición que comprende un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
  - 10. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso como medicamento.
- 35 11. Un método para diagnosticar un trastorno que implica la migración de leucocitos o de neutrófilos en un sujeto, comprendiendo el método poner en contacto una muestra obtenida a partir del sujeto *in vitro* con un conjugado según la reivindicación 7, y detectar una unión inmunoespecífica entre el conjugado y la muestra.
- 12. Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria o alérgica tal como colitis ulcerosa o psoriasis, una enfermedad autoinmune tal como artritis reumatoide o lupus eritematoso sistémico, rechazo de injertos, aterosclerosis, cáncer de piel u órganos con infiltración de leucocitos, una lesión por reperfusión, accidente cerebrovascular, síndrome de insuficiencia respiratoria en adultos, enfermedades malignas hematológicas, toxicidad inducida por citocinas, polimiositis, dermatomiositis, pénfigo, enfermedad de Alzheimer o una enfermedad granulomatosa.

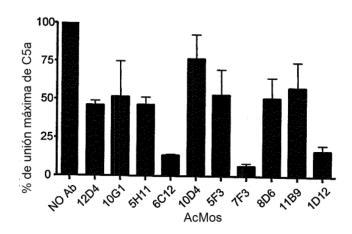


Figura 1

#### Locus de C5aR de ratón

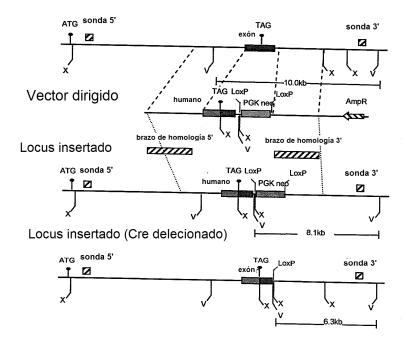


Figura 2

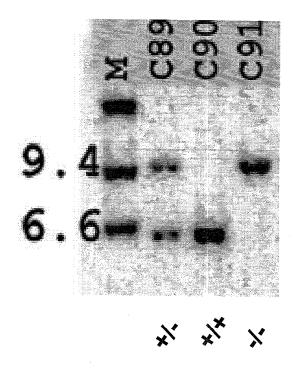


Figura 3

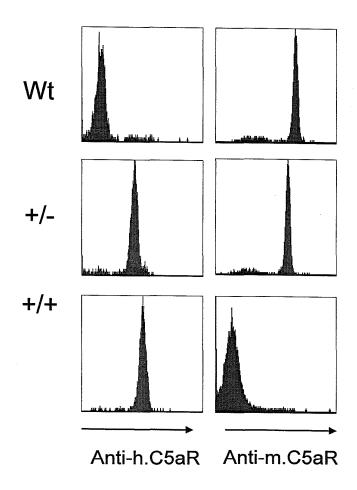


Figura 4

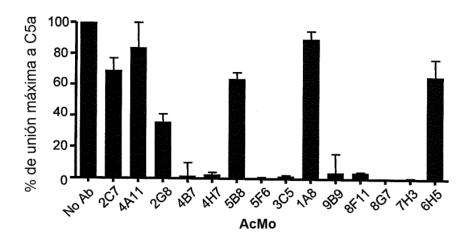


Figura 5

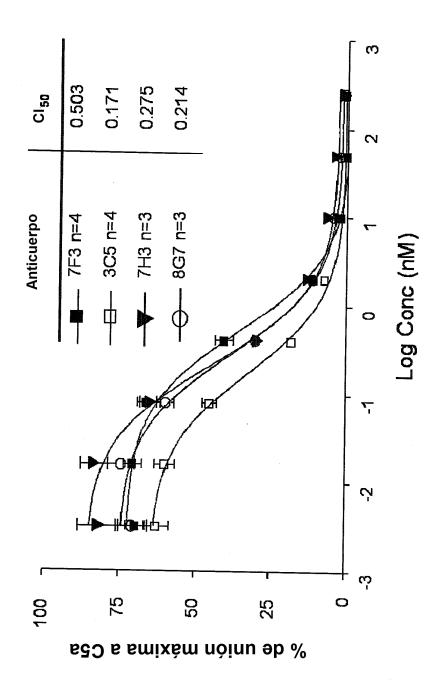
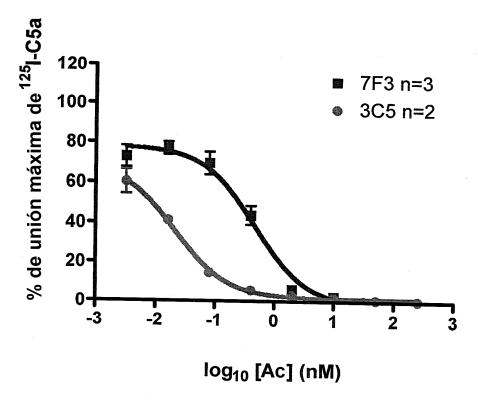


Figura 6



CE50: 7F3 n=3 3C5 n=2 0.4831 0.02164

Figura 7

Receptor quimérico	AcMos que se unen al 2º BEC	AcMos que se unen al extremo N-term	AcMo anti- C5aR de ratón (20/70)
<del>- Му</del> -нннн	+++	+++	-
<del>- Му</del> -тнн	+++	-	-
₩ mmHH	+++	-	-
<b>∭</b> mmmH	-	-	+++
-MM- mmmm	2	-	+++
₩ HmHH	+	-	-
- <del></del>	-	+++	+++
- МЭ НННт	+	+++	_
-MM- Hmmm	-	+	+++
₩ mHmm	-	. •	+++
- <b>∭</b> mmHm	++	-	-

Figura 8

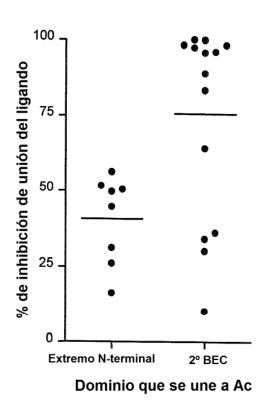


Figura 9

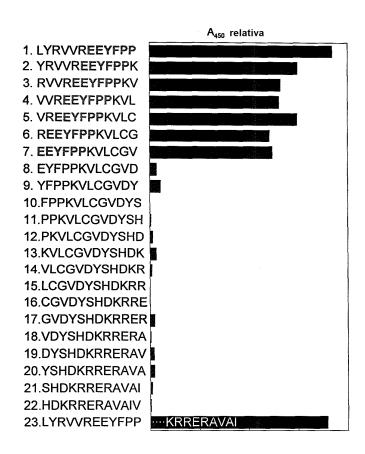


Figura 10

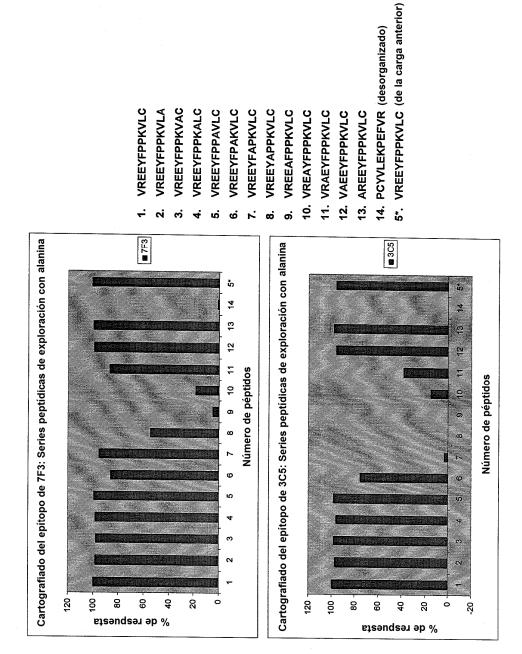
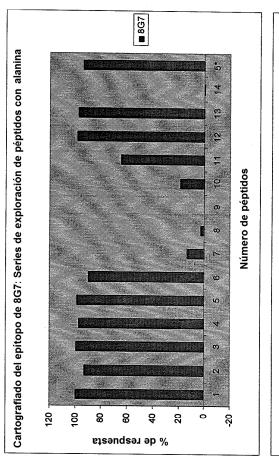


Figura 11 (a)

5\*. VREEYFPPKVLC (de la carga anterior) 14. PCYVLEKPEFVR (desorganizado) VREEYFPPKVLA VREEYFPPKVAC VREEYFPPKALC VREEYFPPAVLC VREEYFPAKVLC VREEYFAPKVLC VREEYAPPKVLC VREEAFPPKVLC 11. VRAEYFPPKVLC 10. VREAYFPPKVLC VAEEYFPPKVLC 13. AREEYFPPKVLC ĸ. ø.



VREEYFPPKVLC

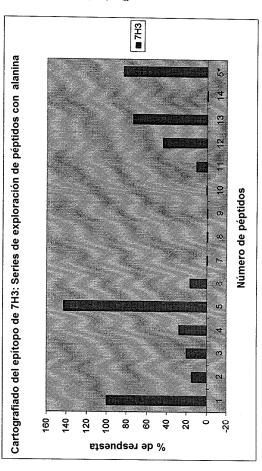
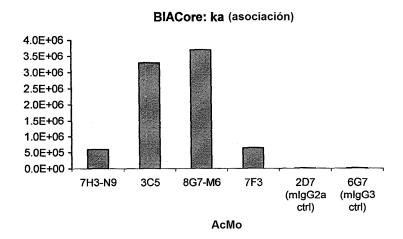


Figura 11 (b)



#### BIACore: kd (disociación)

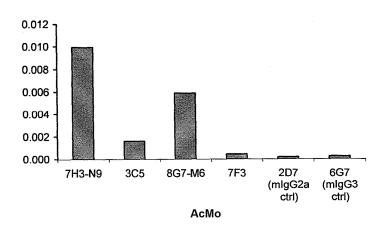


Figura 12

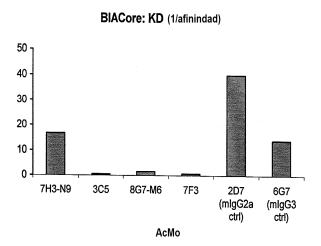


Figura 12 (continuación)

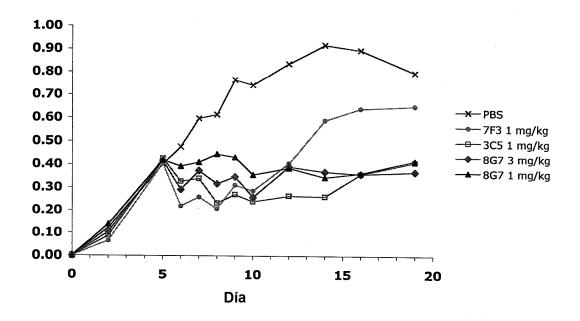


Figura 13

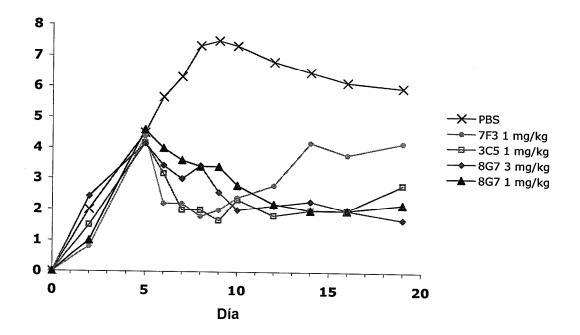


Figura 14