

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 823**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/07 (2010.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2010 PCT/US2010/034116**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.11.2010 WO10129917**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2010 E 10772913 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2427212**

54 Título: **Anticuerpos anti-CD100 y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

08.05.2009 US 176826 P
16.04.2010 US 325213 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.12.2017

73 Titular/es:

VACCINEX, INC. (100.0%)
1895 Mt. Hope Avenue
Rochester, NY 14620, US

72 Inventor/es:

SMITH, ERNEST S. y
FISHER, TERRENCE LEE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 647 823 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-CD100 y métodos de uso de los mismos

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 CD100, también conocida como semaforina 4D (SEMA4D), es una proteína transmembranaria (por ejemplo, SEQ ID NO: 1 (humana); SEQ ID NO: 2 (murina)) que pertenece a la familia de genes de semaforina. CD100 se expresa sobre la superficie celular como un homodímero, pero tras la activación celular CD100 puede ser liberada de la superficie celular mediante escisión proteolítica para generar CD100s activa, una forma soluble de la proteína. Véase Suzuki et al., Nature Rev. Immunol. 3:159-167 (2003); Kukutani et al., Nature Immunol. 9:17-23 (2008).

10 La CD100 se identificó por primera vez generando dos anticuerpos monoclonales de ratón, BD16 y BB18, contra clones de linfocitos T humanos activados (Herold et al., Int. Immunol. 7:1-8 (1994)). CD100 fue el primer ejemplo de una semaforina expresada en el sistema inmunitario. CD100 se expresa abundantemente sobre la superficie de linfocitos T en reposo, y débilmente sobre linfocitos B en reposo, monocitos y células presentadoras de antígeno profesionales, tales como células dendríticas (DC). La activación celular puede estimular la regulación por incremento de la expresión superficial de CD100 en linfocitos B y DC, además de la generación de CD100s. Se cree que CD100 funciona tanto de receptor, que señala mediante su dominio citoplásmico, como de ligando (Hall et al., PNAS 93:11780-11785 (1996)). Uno de los receptores identificados para CD100 es plexina-B1. La plexina-B1 se expresa en tejidos no linfoides y es un receptor de alta afinidad (1 nM) por CD100 (Tamagnone et al., Cell 99:71-80 (1999)).

20 CD100 es un mediador importante de la activación celular de linfocitos T y B. Ratonos inactivados en CD100 (CD100^{-/-}) tienen respuestas reducidas de anticuerpos a antígenos dependientes de T y sensibilización de linfocitos T alterada. Ambas de estas funciones son restauradas tras la administración de CD100s (Shi et al., Immunity 13:633-642 (2000)).

25 Además de los efectos demostrados de CD100 sobre células inmunitarias, parece que CD100 también desempeña una función directa en la desmielinización y degeneración axonal observada en enfermedades neuroinflamatorias. La patogénesis de las enfermedades inflamatorias desmielinizantes, tales como EM, incluye tanto una fase inflamatoria que implica a células inmunitarias, además de fases de desmielinización selectiva y neurodegeneración. CD100 se expresa en oligodendrocitos del sistema nervioso central (SNC) y es un inhibidor de la regeneración axonal. La expresión de CD100 está regulada por incremento en oligodendrocitos en la periferia de lesiones de la médula espinal (Moreau-Fauvarque et al., J. Neurosci 23:9229-9239 (2003)). El cultivo de linfocitos T crónicamente activados que expresan CD100s con precursores neurales multipotentes humanos u oligodendrocitos primarios de cerebro de rata induce la apoptosis y el colapso de la extensión del proceso (Giraudon et al., J. Immunol. 172:1246-1255 (2004); Giraudon et al., NeuroMolecular Med. 7:207-216 (2005)). La apoptosis inducida por CD100 de precursores neurales puede inhibirse por el anticuerpo anti-CD100 BD16.

35 Los ratones inactivados en CD100 son resistentes al desarrollo de encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), que es un modelo de ratón para esclerosis múltiple (EM) humana (Kumanogoh et al., J. Immunol. 169:1175-1181 (2002)).

40 Varios otros estudios han demostrado que CD100 induce el colapso del cono de crecimiento en neuronas, y, en apoyo adicional de la relevancia funcional de CD100 en neuroinflamación, se ha informado que hay niveles altamente elevados de CD100s en líquido cefalorraquídeo (CSF) de pacientes con mielopatía asociada a HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). Así, hay un efecto perjudicial directo de CD100s sobre la integridad de oligodendrocitos y precursores neurales y CD100 puede desempeñar una función patogénica en la desmielinización. Como un mediador importante de ambas respuestas inflamatorias y desmielinización directa, existe una necesidad en la materia de moléculas neutralizantes de CD100, por ejemplo, anticuerpos anti-CD100, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y desmielinizantes.

45 CD100 también es una potente molécula pro-angiogénica. La activación de plexina-B1 mediante la unión de CD100 transactiva c-Met y promueve la capacidad invasiva de células tumorales y promueve la angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo*. El análisis inmunohistoquímico de CD100 en un gran conjunto de muestras tumorales reveló que la expresión en exceso de CD100 era un evento muy frecuente en cánceres de cabeza y cuello, próstata, colon, mama y de pulmón.

50 También se ha mostrado que la señalización de CD100/plexina B1 induce la migración de células endoteliales y promueve la migración de células tumorales (Conrotto et al., Blood 105:4321-4329 (2005); Giordano et al., Nature Biology Cell 4:720-724 (2002)). La migración de células endoteliales inducida por CD100 se previene por anticuerpos bloqueantes contra CD100 y por inactivación de CD100. El inactivar la expresión de CD100 en células de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) con ARN de horquilla corta (ARNhc) de CD100 antes de injertar en ratones sin pelo causó una espectacular reducción en la vascularidad tumoral y el crecimiento tumoral (Basile et al., PNAS 103:9017-9022 (2006)). Informes han indicado recientemente una estrecha correlación entre la infiltración inflamatoria del estroma del tumor y una alta calidad vascular. CD100 se produce por células inflamatorias presentes en el microentorno tumoral. En un entorno que carece de CD100, la capacidad de las células de cáncer de mama de ratón para originar masas tumorales y metástasis estuvo gravemente alterada, y la fuente de CD100 era macrófagos

asociados al tumor (Sierra et al., JEM 205:1673-1685 (2008)). Así, hay una necesidad adicional en la materia de moléculas neutralizantes de CD100, por ejemplo anticuerpos anti-CD100, para el tratamiento de cáncer por CD100.

Campo de la invención

5 La invención se refiere a anticuerpos neutralizantes contra CD100, por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanizados, y su uso en métodos para el tratamiento de afecciones y enfermedades asociadas a células que expresan CD100.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

10 Se proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, por ejemplo, para tratar enfermedades asociadas a CD100, que incluyen ciertas tales como ciertos tipos de enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, cánceres y angiogénesis invasiva. En particular, se han desarrollado anticuerpos monoclonales anti-CD100 para neutralizar CD100. El MAb 67 de ratón demostró la capacidad de bloquear la actividad de CD100 *in vitro*, y, reducir la gravedad de los signos clínicos de la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), artritis inducida por colágeno (CIA) y cáncer en modelos de ratón. El MAb 2503 es una versión humanizada de MAb 67 que ha demostrado afinidad mejorada por CD100 humana y murina y actividad de bloqueo de CD100 similar como mAb 67.

20 Como se expone por las reivindicaciones adjuntas, la invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que puede unirse específicamente a CD100, que comprende un polipéptido de la región variable de la cadena pesada (VH) y un polipéptido de la región variable de la cadena ligera (VL), en el que la VH comprende secuencias de aminoácidos de VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 que comprenden SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente y la VL comprende secuencias de aminoácidos de VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 que comprenden SEQ ID NO: 14, 15 y 16, respectivamente.

25 En ciertas realizaciones, el anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención que se une específicamente a CD100 comprende una región variable de la cadena pesada (VH) que tiene una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10. En otro aspecto más de la invención, la VH de dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10.

30 En ciertas realizaciones, el anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención que se une específicamente a CD100 comprende una región variable de la cadena ligera (VL) que tiene una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18. En otro aspecto más de la invención, la VL de dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18.

35 En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención se une específicamente a un polipéptido CD100 o fragmento del mismo, o un polipéptido de variante CD100 con una afinidad caracterizada por una constante de disociación (K_D) no superior a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, $5,7 \times 10^{-12}$ M, $8,4 \times 10^{-12}$ M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, o 10^{-15} M. En ciertos aspectos, el polipéptido CD100 o fragmento del mismo, o un polipéptido de variante CD100 es humano o murino. En aspectos adicionales, un polipéptido CD100 o fragmento del mismo, o un polipéptido de variante CD100 es humano y dicha K_D es aproximadamente 5×10^{-9} M a aproximadamente 6×10^{-9} M. En otro aspecto más, un polipéptido CD100 o fragmento del mismo, o un polipéptido de variante CD100 es murino y dicha K_D es aproximadamente 1×10^{-9} M a aproximadamente 2×10^{-9} M.

En otro aspecto, el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención está humanizado, primatizado o es quimérico.

En otra realización, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención, y un vehículo.

45 En otra realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido VH o VL de anticuerpo de la invención. En otro aspecto, el polinucleótido de la invención comprende o consiste en un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo de la invención. En otro aspecto más, la invención proporciona un vector que comprende un polinucleótido de la invención. En otro aspecto, la invención proporciona una célula hospedadora que comprende el vector de la invención. En otro aspecto, la invención proporciona un método de producción de un anticuerpo de la invención.

55 En otra realización, la invención proporciona el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad inflamatoria en un animal en necesidad de tratamiento, que comprende administrar a dicho animal una composición que comprende: el anticuerpo aislado o fragmento del mismo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En realizaciones adicionales, la enfermedad autoinmunitaria o enfermedad inflamatoria es esclerosis múltiple o artritis.

En otra realización, la invención proporciona el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención para su uso en un método de tratamiento de un cáncer en un animal en necesidad de tratamiento, que comprende administrar a dicho animal una composición que comprende: el anticuerpo aislado o fragmento del mismo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 En otra realización, la invención proporciona el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención para su uso en un método de inhibición de la angiogénesis en un animal en necesidad de tratamiento para el cáncer, que comprende administrar a dicho animal una composición que comprende: el anticuerpo aislado o fragmento del mismo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 10 En un aspecto adicional, el anticuerpo o fragmento del mismo de la invención inhibe la unión de CD100 a un receptor de CD100. En otro aspecto más de la invención, el receptor de CD100 es plexina-B1.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS/FIGURAS

- 15 Figura 1. Diagrama del ensayo de bloqueo de CD100. CD100-His mostró la unión a plexina B1 sobre la superficie celular de una línea celular estable que expresa plexina B1 (293/plexina). CD100-His que está unida a plexina B1 se detecta usando un anticuerpo monoclonal específico anti-marca de His conjugado con biotina y estreptavidina-APC. Los MAb anti-CD100 que son capaces de bloquear la unión de CD100-His a plexina B1 producen fluorescencia más baja asociada a las células 293/plexina como se mide por citometría de flujo.

- 20 Figura 2. Se muestran resultados de citometría de flujo para anti-His de conejo + estreptavidina-APC (anti-His de conejo + APCe), CD100 de ratón (muCD100 solo), CD100 de ratón + 0,625 µg/ml de MAb (MAb 67, MAb 76 e isotipo mIgG) y CD100 de ratón + 0,156 µg/ml de MAb (MAb 67, MAb 76 e isotipo mIgG) probados en el ensayo de bloqueo de CD100 descrito en la Figura 1. Los anticuerpos monoclonales 67 y 76 bloquean la unión de CD100 de ratón al receptor de plexina B1.

Figura 3. Los anticuerpos monoclonales 67 y 76 bloquean el desprendimiento mediado por CD100 de ratón de células 293/plexina B de una placa recubierta con fibronectina, como se muestra por un aumento en la absorbancia para ambos MAb 67 (67-2) y 76 (76-1) en comparación con el control de isotipo.

- 25 Figura 4. El tratamiento con 30 mg/kg de MAb 76 anti-CD100 (1X/semana o 2X/semana) o MAb 67 (1X/semana o 2X/semana) atenúa la EAE remitente recidivante en ratones SJL en comparación con el tratamiento con control de IgG de ratón como se muestra mediante la reducción en la puntuación clínica (4A). Los resultados se ilustran además en comparación con el porcentaje de reducción en la puntuación media del grupo (GMS) para cada tratamiento con MAb entre el día 21 y el fin del estudio (4B).

- 30 Figura 5. El tratamiento con 30 mg/kg de MAb 76 anti-CD100 (1X/semana) o MAb 67 (1X/semana) atenúa la EAE remitente recidivante en ratones SJL en comparación con el tratamiento con control de IgG de ratón como se muestra mediante la reducción en la puntuación clínica (5A). Los resultados se ilustran además comparando el porcentaje de reducción en la puntuación media del grupo (GMS) para ambos tratamientos con MAb entre el día 18 y el fin del estudio (5B).

- 35 Figura 6. El tratamiento con 30 mg/kg de MAb anti-CD100 67 a partir del día 7 después de la inmunización (1X/semana) atenúa la EAE remitente recidivante en ratones SJL en comparación con el tratamiento con control de IgG de ratón como se muestra mediante reducción en la puntuación clínica.

Figura 7. Resultados de ELISA que muestran el porcentaje (%) de bloqueo de la unión de 67 biotinilado a CD100 humana (7A) o CD100 de ratón (7B) debido a la unión competitiva de MAb 2503, MAb 67, o control de IgG.

- 40 Figura 8. Se muestran los resultados de citometría de flujo para estreptavidina-APC (APCe solo), CD100 humana (huCD100), CD100 de tití (marmCD100), CD100 de ratón (muCD100), 1,0 µg de isotipo y 1,0 µg de MAb (67 o 2503) probados en el ensayo de bloqueo de CD100 descrito en la Figura 1. MAb 67 y MAb 2503 bloquean que CD100 humana (8A), CD100 de tití (8B) o de ratón (8C) se unan al receptor de plexina B1.

- 45 Figura 9. Se muestra una reducción bloqueada en la absorbancia producida por CD100 debido a la neutralización de CD100 por MAb 67, MAb 2503 y control de IgG. MAb 67 y MAb 2503 anti-CD100 bloquean el desprendimiento mediado por CD100 humana (9A) y CD100 de tití (9B) de células 293/plexina de una placa recubierta con fibronectina.

Figura 10. Se muestra el cambio en el volumen tumoral (mm³) para ratones Balb/c no mutados y ratones CD100^{-/-} después de que se inyectaran 50.000 células de tumor de colon CT26 en el músculo de la pata de los ratones.

- 50 Figura 11. Se muestra el cambio en el volumen medio de la pata (mm³) para ratones Balb/c no mutados tratados con 1 mg de MAb 67 o 1 mg de IgG de ratón de control y ratones CD100^{-/-} ("KO") después de que se inyectaran 50.000 células de tumor de colon CT26 en el músculo de la pata de los ratones.

Figura 12. Un esquema que muestra una estrategia de tratamiento general para artritis inducida por colágeno (CIA)

Figura 13. Se mostró la reducción en el desarrollo de la enfermedad de artritis en el modelo de CIA para grupos tratados con 600 µg de MAb 67. Se comparó el índice artrítico (IA) en ratones tratados con 600 µg de MAb 67 con el IA en ratones tratados con 600 µg de control negativo (IgG1) y 600 µg de etanercept de control positivo (Enbrel®) cuando el tratamiento empezó en el día 20 (13A). Los resultados del índice artrítico (IA) para el tratamiento con MAb 67 se compararon con el tratamiento con un control negativo (IgG1) y etanercept de control positivo (Enbrel®) cuando el tratamiento se empezó o bien en el día 20 o cuando el IA era ≥ 3 (13B).

Figura 14. En ratones Balb/c inmunizados con gamma-globulina de pollo conjugada con (4-hidroxi-3-nitrofenil)acetilo precipitada con alumbre (hidróxido de aluminio/magnesio) ("NP-CGG"), el tratamiento con 600 µg de MAb 67 disminuyó el número de linfocitos B del centro germinal (CG) ("B220+CD38lowPNA+") en bazo (SP) y ganglios linfáticos (LN) después de tanto la inmunización primaria (14A) como la inmunización secundaria (14B). Los resultados también se muestran para ratones CD100^{-/-} y ratones Balb/c con y sin inmunización con NP-CGG.

Figura 15. Se muestra el cambio en el volumen tumoral (mm³) para ratones Balb/c no mutados después de que se inyectaran con 50.000 células de tumor de colon CT26 en el músculo de la pata de los ratones. Los resultados se muestran para ratones inyectados con 1 mg de MAb 67 semanalmente empezando en el día 1 en comparación con ratones inyectados con control de IgG. El estudio se llevó a cabo hasta un criterio de valoración de retraso del crecimiento neuronal.

Figura 16. Se muestra el cambio en el volumen tumoral (mm³) para ratones Balb/c no mutados y ratones CD100^{-/-} ("SEMA4D^{-/-}") después de que se inyectaran s.c. con 50.000 células de tumor fibroblástico BCA34 en la región abdominal de los ratones (16A). Se muestra el cambio en el volumen medio del muslo (mm³) para ratones Balb/c no mutados tratados con 1 mg de MAb 67 o 1 mg de IgG de ratón de control después de que se inyectaran 50.000 células de tumor fibroblástico BCA34 en el músculo de la pata de los ratones (16B).

Figura 17. Se muestra el cambio en el volumen tumoral (mm³) para ratones Balb/c no mutados y ratones CD100^{-/-} ("SEMA4D^{-/-}") después de que se inyectaran 50.000 células de carcinoma mamario de ratón EMT6 en el músculo de la pata de los ratones.

Figura 18. Se muestra el cambio en el volumen tumoral (mm³) para ratones sin pelo atímicos después de que se inyectaran s.c. dos tumores de cabeza y cuello HN12/ratón en el músculo del flanco de los ratones. Los resultados se muestran para ratones inyectados con 1 mg de MAb 2503 semanalmente empezando en el día 1 después del injerto en comparación con ratones inyectados con control de IgG4.

Figura 19. Se muestra el cambio en el volumen tumoral (mm³) para ratones sin pelo atímicos después de que se inyectaran s.c. dos tumores de cabeza y cuello HN6 HIF1a mODD en el músculo de la pata de los ratones. Los resultados se muestran para ratones inyectados con 1 mg de MAb 2503 semanalmente empezando en el día 1 después del injerto en comparación con ratones inyectados con control de IgG4 (19A). Se muestran imágenes de tumores representativos de ratones tratados con control de IgG4 y MAb 2503 (19B).

Figura 20. Resultados del porcentaje de saturación del análisis de saturación de una inyección intravenosa única de MAb 2503 en rata. Se administraron ratas Sprague-Dawley con una inyección intravenosa única de MAb 2503 a las dosis de 0, 0,01, 0,1, 1,0, 10 y 100 mg/kg. Se realizó un ensayo de saturación basado en citometría de flujo en sangre completa lisada en diversos momentos de tiempo para determinar el porcentaje de la diana celular (SEMA4D) que se saturó con MAb 2503 en ratas macho (20A) y hembra (20B).

Figura 21. Resultados del porcentaje de saturación del análisis de saturación de una inyección intravenosa única de MAb 2503 en mono cinomolgo. Se administraron monos cinomolgos con una inyección intravenosa única de MAb 2503 a las dosis de 0, 0,01, 0,1, 1,0, 10 y 100 mg/kg. Se realizó un ensayo de saturación basado en citometría de flujo en sangre completa lisada en diversos momentos de tiempo para determinar el porcentaje de la diana celular (SEMA4D) que se saturó con MAb 2503 (se combinaron datos de machos y hembras).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Definiciones

Debe observarse que el término "un" o "una" entidad se refiere a uno o más de esa entidad; por ejemplo, "un anticuerpo anti-CD100" se entiende que representa uno o más anticuerpos anti-CD100. Como tales, los términos "un" (o "una"), "uno o más," y "al menos uno" pueden usarse indistintamente en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "tumor" se refiere a todo crecimiento celular neoplásico y proliferación, tanto maligna como benigna, y todas las células cancerosas y pre-cancerosas y tejidos.

"Angiogénesis invasiva" se refiere a la formación de vasos sanguíneos para el apoyo de afecciones patológicas, que incluyen tumores malignos y no malignos, además de la formación anormal de nuevos vasos sanguíneos en degeneración macular.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinomas, linfomas y leucemias.

5 Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" pretende englobar el singular "polipéptido", además del plural "polipéptidos," y se refiere a una molécula compuesta de monómeros (aminoácidos) linealmente unidos por enlaces amida (también conocidos como enlaces peptídicos). El término "polipéptido" se refiere a cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, y no se refiere a una longitud específica del producto. Así, péptidos, dipéptidos, tripéptidos, oligopéptidos, "proteína", "cadena de aminoácido", o cualquier otro término usado para referirse a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, están incluidos dentro de la definición de "polipéptido", y el término "polipéptido" puede usarse en lugar de, o indistintamente, con cualquiera de estos términos. El término "polipéptido" también pretende referirse a los productos de modificaciones post-expresión del polipéptido, que incluyen, sin limitación, glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores / bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, o modificación por aminoácidos que no existen de forma natural. Un polipéptido puede derivar de una fuente biológica natural o producirse por tecnología recombinante, pero necesariamente no se traduce de una secuencia de ácidos nucleicos designada. Puede generarse de cualquier manera, que incluye por síntesis química.

Un polipéptido puede ser de un tamaño de aproximadamente 3 o más, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 25 o más, 50 o más, 75 o más, 100 o más, 200 o más, 500 o más, 1.000 o más, o 2.000 o más aminoácidos. Los polipéptidos pueden tener una estructura tridimensional definida, aunque no tienen necesariamente tal estructura. Polipéptidos con una estructura tridimensional definida se denominan plegados, y polipéptidos que no poseen una estructura tridimensional definida, sino que pueden adoptar un gran número de conformaciones diferentes, se denominan no plegados. Como se usa en el presente documento, el término glucoproteína se refiere a una proteína acoplada a al menos un resto de hidrato de carbono que está unido a la proteína mediante una cadena lateral que contiene oxígeno o que contiene nitrógeno de un resto de aminoácido, por ejemplo, un resto de serina o un resto de asparagina.

Por un polipéptido "aislado", o un fragmento, variante o derivado del mismo, está previsto un polipéptido que no está en su ámbito natural. No se requiere nivel de purificación particular. Por ejemplo, un polipéptido aislado puede sacarse del entorno nativo o natural. Los polipéptidos y proteínas recombinantemente producidos expresados en células hospedadoras se consideran aislados para el fin de la invención, ya que son polipéptidos nativos o recombinantes que han sido separados, fraccionados, o parcialmente o sustancialmente purificados, por cualquier técnica adecuada.

También están incluidos como polipéptidos fragmentos, derivados, análogos, o variantes de los polipéptidos anteriores, y cualquier combinación de los mismos. Los términos "fragmento", "variante", "derivado" y "análogo", cuando se refieren a anticuerpos anti-CD100 o polipéptidos de anticuerpo de la presente invención, incluyen cualquier polipéptido que retenga al menos algunas de las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo o polipéptido de anticuerpo correspondiente de la invención. Fragmentos de polipéptidos de la presente invención incluyen fragmentos proteolíticos, además de fragmentos de delección, además de fragmentos de anticuerpos específicos tratados en cualquier parte en el presente documento. Variantes de anticuerpos anti-CD100 y polipéptidos de anticuerpo de la presente invención incluyen fragmentos como se ha descrito anteriormente, y también polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas debido a sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos. Las variantes pueden producirse naturalmente o no existir de forma natural. Las variantes que no existen de forma natural pueden producirse usando técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica. Los polipéptidos de variante pueden comprender sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, deleciones, o adiciones. Los polipéptidos de variante también pueden denominarse en el presente documento "análogos de polipéptidos". Como se usa en el presente documento, un "derivado" de un anticuerpo anti-CD100 o polipéptido de anticuerpo se refiere a un polipéptido objeto que tiene uno o más restos químicamente derivatizados haciendo reaccionar un grupo lateral funcional. También se incluyen como "derivados" aquellos péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos que existen de forma natural de los veinte aminoácidos estándar. Por ejemplo, la 4-hidroxiprolina puede estar sustituida con prolina; la 5-hidroxilisina puede estar sustituida con lisina; la 3-metilhistidina puede estar sustituida con histidina; la homoserina puede estar sustituida con serina; y la ornitina puede estar sustituida con lisina. Los derivados de anticuerpos anti-CD100 y polipéptidos de anticuerpo de la presente invención pueden incluir polipéptidos que han sido alterados de manera que presenten características adicionales no encontradas en el anticuerpo de referencia o polipéptido de anticuerpo de la invención.

El término "polinucleótido" pretende englobar el singular ácido nucleico, además del plural ácidos nucleicos, y se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada o construcción, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm) o ADN de plásmido (ADNp). Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo, un enlace amida, tal como se encuentra en ácidos nucleicos peptídicos (PNA)). El término "ácido nucleico" se refiere a uno cualquiera o más segmentos de ácidos nucleicos, por ejemplo, fragmentos de ADN o de ARN, presentes en un polinucleótido. Por ácido nucleico o polinucleótido "aislado" está prevista una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha sacado de su entorno nativo. Por ejemplo, un polinucleótido recombinante que codifica una molécula de unión anti-CD100, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, contenida en un vector se considera aislado para los fines de la presente invención. Ejemplos

adicionales de un polinucleótido aislado incluyen polinucleótidos recombinantes mantenidos en células hospedadoras heterólogas o polinucleótidos (parcialmente o sustancialmente) purificados en disolución. Moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de polinucleótidos de la presente invención. Polinucleótidos o ácidos nucleicos aislados según la presente invención incluyen además moléculas tales producidas sintéticamente. Además, un polinucleótido o un ácido nucleico puede ser o puede incluir un elemento regulador tal como un promotor, sitio de unión al ribosoma, o un terminador de la transcripción.

Como se usa en el presente documento, una "región codificante" es una porción de ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un "codón de terminación" (TAG, TGA o TAA) no se traduce en un aminoácido, puede considerarse que es parte de una región codificante, pero cualquier secuencia flanqueante, por ejemplo promotores, sitios de unión al ribosoma, terminadores de la transcripción, intrones, y similares, no es parte de una región codificante. Pueden estar presentes dos o más regiones codificantes de la presente invención en una única construcción de polinucleótido, por ejemplo, en un único vector, o en construcciones de polinucleótido separadas, por ejemplo, en vectores separados (diferentes). Además, cualquier vector puede contener una única región codificante, o puede comprender dos o más regiones codificantes, por ejemplo, un único vector puede codificar por separado una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina. Además, un vector, polinucleótido o ácido nucleico de la invención puede codificar regiones codificantes heterólogas, bien fusionadas o sin fusionar a un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-CD100 o fragmento, variante, o derivado del mismo. Regiones codificantes heterólogas incluyen sin limitación elementos o motivos especializados, tales como un péptido señal secretor o un dominio funcional heterólogo.

En ciertas realizaciones, el polinucleótido o ácido nucleico es ADN. En el caso de ADN, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido normalmente puede incluir un promotor y/u otros elementos de transcripción o de control de la traducción operativamente asociados a una o más regiones codificantes. Una asociación operativa es cuando una región codificante para un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, está asociada a una o más secuencias reguladoras de tal forma que se ponga la expresión del producto génico bajo la influencia o el control de la(s) secuencia(s) reguladora(s). Dos fragmentos de ADN (tales como una región codificante de polipéptido y un promotor asociado con el mismo) están "operativamente asociados" si la inducción de la función de promotor produce la transcripción de ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza del enlace entre los dos fragmentos de ADN no interfiere con la capacidad de las secuencias reguladoras de la expresión para dirigir la expresión del producto génico o interferir con la capacidad del molde de ADN para transcribirse. Así, una región promotora estaría operativamente asociada a un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor fuera capaz de efectuar la transcripción de ese ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de célula que dirige la sustancial transcripción del ADN solo en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, pueden estar operativamente asociados al polinucleótido para dirigir la transcripción específica de célula. Promotores adecuados y otras regiones de control de la transcripción se desvelan en el presente documento.

Una variedad de regiones de control de la transcripción son conocidas para aquellos expertos en la materia. Éstas incluyen, sin limitación, regiones de control de la transcripción que funcionan en células de vertebrado, tales como, pero no se limitan a, segmentos de promotor y potenciador de citomegalovirus (el promotor temprano inmediato, conjuntamente con el intrón A), virus simio 40 (el promotor temprano) y retrovirus (tal como el virus del sarcoma de Rous). Otras regiones de control de la transcripción incluyen aquellas derivadas de genes de vertebrado tales como actina, proteína de choque térmico, hormona de crecimiento bovina y β -globina de conejo, además de otras secuencias capaces de controlar la expresión génica en células eucariotas. Regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejido, además de promotores inducibles por linfocinas (por ejemplo, promotores inducibles por interferones o interleucinas).

Similarmente, aquellos expertos habituales en la materia conocen una variedad de elementos de control de la traducción. Éstos incluyen, pero no se limitan a, sitios de unión al ribosoma, iniciación de la traducción y codones de terminación, y elementos derivados de picornavirus (particularmente un sitio interno de entrada al ribosoma, o IRES, también denominada una secuencia CITE).

En otras realizaciones, un polinucleótido de la presente invención es ARN, por ejemplo, en forma de ARN mensajero (ARNm).

Regiones codificantes de polinucleótidos y ácidos nucleicos de la presente invención pueden asociarse a regiones codificantes adicionales que codifican péptidos secretores o señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un polinucleótido de la presente invención. Según la hipótesis de señal, proteínas secretadas por células de mamífero tienen un péptido señal o secuencia conductora secretora que se escinde de la proteína madura una vez se ha iniciado la exportación de la cadena de proteína en crecimiento a través del áspero retículo endoplásmico. Aquellos expertos habituales en la materia saben que los polipéptidos secretados por células de vertebrados generalmente tienen un péptido señal fusionado al extremo N del polipéptido, que se escinde del polipéptido completo o de "longitud completa" para producir una forma secretada o "madura" del polipéptido. En ciertas realizaciones, se usa el péptido señal nativo, por ejemplo, un péptido señal de cadena pesada o cadena ligera de la inmunoglobulina, o un derivado funcional de esa secuencia que retiene la capacidad para dirigir la

secreción del polipéptido que está operativamente asociados a él. Alternativamente, puede usarse un péptido señal de mamífero heterólogo, o un derivado funcional del mismo. Por ejemplo, la secuencia conductora no mutada puede estar sustituida con la secuencia conductora del activador de plasminógeno de tejido humano (TPA) o β -glucuronidasa de ratón.

- 5 Una "molécula de unión" o "molécula de unión al antígeno" se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. En una realización, la molécula de unión se une específicamente a CD100, por ejemplo, un polipéptido CD100 transmembranario de aproximadamente 150 kDa o un polipéptido CD100 soluble de aproximadamente 120 kDa (comúnmente denominado CD100s). En otra realización, una molécula de unión de la invención es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende al menos una CDR de cadena pesada o ligera de una molécula de anticuerpo. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende al menos dos CDR de una o más moléculas de anticuerpo. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende al menos tres CDR de una o más moléculas de anticuerpo. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende al menos cuatro CDR de una o más moléculas de anticuerpo. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende al menos cinco CDR de una o más moléculas de anticuerpo. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende al menos seis CDR de una o más moléculas de anticuerpo.

La presente invención se refiere a ciertos anticuerpos anti-CD100, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos. A menos que se refiera específicamente a anticuerpos de tamaño completo, tales como anticuerpos que existen de forma natural, el término "anticuerpos anti-CD100" engloba anticuerpos de tamaño completo, además de fragmentos de unión al antígeno, variantes, análogos, o derivados de tales anticuerpos, por ejemplo, moléculas de anticuerpo o de inmunoglobulina que existen de forma natural o moléculas de anticuerpo manipuladas o fragmentos que se unen al antígeno de un modo similar a las moléculas de anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, anticuerpos "humanos" o "completamente humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe abajo y, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 5.939.598 por Kucherlapati et al. Anticuerpos "humanos" o "completamente humanos" también incluyen anticuerpos que comprenden al menos el dominio variable de una cadena pesada, o al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera, donde el (los) dominio(s) variable(s) tienen la secuencia de aminoácidos del (de los) dominio(s) variable(s) de inmunoglobulina humana.

Anticuerpos "humanos" o "completamente humanos" también incluyen anticuerpos "humanos" o "completamente humanos", como se ha descrito anteriormente, que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en variantes (incluyendo derivados) de moléculas de anticuerpo (por ejemplo, las regiones VH y/o regiones VL) descritas en el presente documento, cuyos anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen inmunoespecíficamente a un polipéptido CD100 o fragmento o variante del mismo. Pueden usarse técnicas convencionales conocidas para aquellos expertos en la materia para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-CD100 humano, que incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR que produce sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, las variantes (incluyendo derivados) codifican menos de 50 sustituciones de aminoácidos, menos de 40 sustituciones de aminoácidos, menos de 30 sustituciones de aminoácidos, menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos, o menos de 2 sustituciones de aminoácidos con respecto a la región VH de referencia, VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, región VL, VLCDR1, VLCDR2 o VLCDR3.

En ciertas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos son sustitución de aminoácidos conservativa, tratada adicionalmente más adelante. Alternativamente, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden cribarse para actividad biológica para identificar mutantes que retienen la actividad (por ejemplo, la capacidad para unirse a un polipéptido CD100, por ejemplo, CD100 humana, murina, o tanto humana como murina). Tales variantes (o derivados de las mismas) de anticuerpos "humanos" o "completamente humanos" también pueden denominarse anticuerpos humanos o completamente humanos que están "optimizados" u "optimizados para la unión al antígeno" e incluyen anticuerpos que tienen afinidad mejorada por el antígeno.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el presente documento. Un anticuerpo o inmunoglobulina comprende al menos el dominio variable de una cadena pesada, y normalmente comprende al menos los dominios variables de una cadena pesada y una cadena ligera. Las estructuras de inmunoglobulina básicas en los sistemas de vertebrado son relativamente bien entendidas. Véase, por ejemplo, Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Como se tratará más abajo en más detalle, el término "inmunoglobulina" comprende diversas clases amplias de polipéptidos que pueden distinguirse bioquímicamente. Aquellos expertos en la materia apreciarán que las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o epsilon (γ , μ , α , δ , ϵ), con algunas subclases entre ellas (por

ejemplo, $\gamma 1-\gamma 4$). Es la naturaleza de esta cadena la que determina la "clase" del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgG o IgE, respectivamente. Las subclases de inmunoglobulina (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, etc., están bien caracterizadas y se sabe que confieren especialización funcional. Versiones modificadas de cada una de estas clases e isotipos son fácilmente perceptibles para el experto en vista de la presente divulgación y, por consiguiente, están dentro del alcance de la presente invención. Todas las clases de inmunoglobulina están claramente dentro del alcance de la presente invención, la siguiente discusión generalmente se referirá a la clase de IgG de moléculas de inmunoglobulina. Con respecto a IgG, una molécula de inmunoglobulina estándar comprende dos polipéptidos de cadena ligera idénticos de peso molecular aproximadamente 23.000 Daltons, y dos polipéptidos de cadena pesada idénticos de peso molecular 53.000-70.000. Las cuatro cadenas normalmente se unen por enlaces disulfuro en una configuración en "Y" en la que las cadenas ligeras unen las cadenas pesadas empezando en la boca de la "Y" y continuando a través de la región variable.

Las cadenas ligeras se clasifican o bien como kappa o bien como lambda (κ , λ). Cada clase de cadena pesada puede unirse con cualquiera de una cadena ligera kappa o lambda. En general, las cadenas ligeras y pesadas se unen covalentemente entre sí, y las porciones de "cola" de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro covalentes o enlaces no covalentes cuando las inmunoglobulinas se generan o bien por hibridomas, linfocitos B o bien por células hospedadoras genéticamente manipuladas. En la cadena pesada, las secuencias de aminoácidos van de un extremo N en los extremos bifurcados de la configuración en Y al extremo C en el final de cada cadena.

Ambas de las cadenas ligeras y pesadas se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se usan funcionalmente. A este respecto, se apreciará que los dominios variables de tanto las porciones de cadena ligera (VL o VK) como pesada (VH) determinan el reconocimiento del antígeno y la especificidad. En cambio, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas importantes tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión al receptor de Fc, unión al complemento, y similares. Por convenio, la numeración de los dominios de la región constante aumenta a medida que se vuelven más distales desde el sitio de unión al antígeno o extremo amino del anticuerpo. La porción del extremo N es una región variable y en la porción del extremo C está una región constante; los dominios CH3 y CL comprenden en realidad el extremo carboxi de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

Como se indica anteriormente, la región variable permite que el anticuerpo reconozca selectivamente y se una específicamente a epítopes sobre antígenos. Es decir, se combinan el dominio VL y el dominio VH, o subconjunto de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) dentro de estos dominios variables, de un anticuerpo para formar la región variable que define un sitio de unión al antígeno tridimensional. Esta estructura de anticuerpo cuaternaria forma el sitio de unión al antígeno presente en el extremo de cada brazo de la Y. Más específicamente, el sitio de unión al antígeno se define por tres CDR sobre cada una de las cadenas VH y VL. En algunos casos, por ejemplo, ciertas moléculas de inmunoglobulina derivadas de especies de camélido o manipuladas basándose en inmunoglobulinas de camélido, una molécula de inmunoglobulina completa puede consistir en cadenas pesadas solo, sin cadenas ligeras. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993).

En anticuerpos que existen de forma natural, las seis "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" presentes en cada dominio de unión al antígeno son secuencias no contiguas cortas de aminoácidos que están específicamente situadas para formar el dominio de unión al antígeno a medida que el anticuerpo adopta su configuración tridimensional en un entorno acuoso. El resto de los aminoácidos en los dominios de unión al antígeno, denominadas las "regiones estructurales", muestran menos variabilidad intermolecular. Las regiones estructurales adoptan en gran medida una configuración de hoja β y las CDR forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de hoja β . Así, las regiones estructurales actúan formando un armazón que proporciona el posicionamiento de las CDR en orientación correcta por interacciones intercatenarias, no covalentes. El dominio de unión al antígeno formado por las CDR posicionadas define una superficie complementaria al epítipo sobre el antígeno inmunorreactivo. Esta superficie complementaria promueve la unión no covalente del anticuerpo a su epítipo relacionado. Los aminoácidos que comprenden las CDR y las regiones estructurales, respectivamente, pueden ser fácilmente identificados para cualquier dominio variable de la cadena pesada o ligera dado por un experto habitual en la materia, ya que han sido definidos con precisión (véase más adelante).

En el caso en el que haya dos o más definiciones de un término que se usa y/o está aceptado dentro de la materia, la definición del término como se usa en el presente documento pretende incluir todos aquellos significados, a menos que se establezca explícitamente lo contrario. Un ejemplo específico es el uso del término "región determinante de la complementariedad" ("CDR") para describir los sitios de combinación de antígenos no contiguos encontrados dentro de la región variable de tanto polipéptidos de cadena pesada como ligera. Esta región particular se ha descrito por Kabat et al. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" y por Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), que se incorporan en el presente documento por referencia, donde las definiciones incluyen solapamientos o subconjuntos de restos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Sin embargo, la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes del mismo pretende estar dentro del alcance del término como se define y se usa en el presente documento. Restos de aminoácidos apropiados que engloban las CDR como se define por cada una de las referencias anteriormente citadas se exponen a continuación en la **Tabla 1** como una comparación. Los números exactos de resto que engloban una CDR particular variarán dependiendo de la secuencia y el tamaño de la CDR.

Aquellos expertos en la materia pueden determinar rutinariamente qué restos comprenden una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

Tabla 1. Definiciones de CDR¹

| | Kabat | Chothia |
|--------|--------|---------|
| CDR1VH | 31-35 | 26-32 |
| CDR2VH | 50-65 | 52-58 |
| CDR3VH | 95-102 | 95-102 |
| CDR1VL | 24-34 | 26-32 |
| CDR2VL | 50-56 | 50-52 |
| CDR3VL | 89-97 | 91-96 |

¹La numeración de todas las definiciones de CDR en la Tabla 1 es según los convenios de numeración expuestos por Kabat et al. (véase más adelante).

5 Kabat *et al.* también definieron un sistema de numeración para secuencias del dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto habitual en la materia puede asignar inequívocamente este sistema de "numeración de Kabat" a cualquier secuencia del dominio variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la propia secuencia. Como se usa en el presente documento, "numeración de Kabat" se refiere al sistema de numeración expuesto por Kabat et al. (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest". A menos que se especifique de otro modo, referencias a la numeración de las posiciones de restos de aminoácidos específicos en un anticuerpo anti-CD100 o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, de la presente invención son según el sistema de numeración de Kabat.

15 Anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, de la invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, multiespecíficos, humanos, humanizados, primatizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de unión al epítipo, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs, Fvs monocatenarios (scFv), Fvs unidos por disulfuro (sdFv), fragmentos que comprenden ya sea un dominio VL o VH, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, y anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id) (incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-Id para los anticuerpos anti-CD100 desvelados en el presente documento). Las moléculas de scFv son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 5.892.019.

20 Las moléculas de inmunoglobulina o de anticuerpo de la invención pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, etc.), o subclase de molécula de inmunoglobulina.

25 Como se usa en el presente documento, el término "porción de cadena pesada" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena pesada de la inmunoglobulina. Un polipéptido que comprende una porción de cadena pesada comprende al menos uno de: un dominio CH1, un dominio bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3, o una variante o fragmento de los mismos. Por ejemplo, un polipéptido de unión puede comprender una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1; una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra y un dominio CH2; una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1 y un dominio CH3; una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra y un dominio CH3, o una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH1, al menos una porción de un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. En otra realización, un polipéptido de la invención comprende una cadena de polipéptidos que comprende un dominio CH3. Además, un polipéptido de unión puede carecer de al menos una porción de un dominio CH2 (por ejemplo, toda o parte de un dominio CH2). Como se expone anteriormente, se entenderá por un experto habitual en la materia que estos dominios (por ejemplo, las porciones de cadena pesada) pueden modificarse de forma que varíen en la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina que existe de forma natural.

35 En ciertos anticuerpos anti-CD100, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos desvelados en el presente documento, las porciones de cadena pesada de una cadena de polipéptidos de un multímero son idénticas a aquellas en una segunda cadena de polipéptidos del multímero. Alternativamente, los monómeros que contienen porción de cadena pesada de la invención no son idénticos. Por ejemplo, cada monómero puede comprender un sitio de unión diana diferente, formando, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico.

Las porciones de cadena pesada de una molécula de unión para su uso en los métodos de diagnóstico y de tratamiento desvelados en el presente documento pueden derivar de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, una porción de cadena pesada de un polipéptido puede comprender un dominio C_{H1} derivado de una molécula de IgG1 y una región bisagra derivada de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una región bisagra derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, una porción de cadena pesada puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG4.

Como se usa en el presente documento, el término "porción de cadena ligera" incluye secuencias de aminoácidos derivadas de una cadena ligera de la inmunoglobulina, por ejemplo, una cadena ligera kappa o lambda. Preferentemente, la porción de cadena ligera comprende al menos uno de un dominio VL o CL.

Anticuerpos anti-CD100, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos desvelados en el presente documento pueden describirse o especificarse en términos del (de los) epítoto(s) o porción (porciones) de un antígeno, por ejemplo, un polipéptido diana desvelado en el presente documento (por ejemplo, CD100) que reconocen o al que se unen específicamente. La porción de un polipéptido diana que interacciona específicamente con el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo es un "epítoto," o un "determinante antigénico." Un polipéptido diana puede comprender un único epítoto, pero normalmente comprende al menos dos epítotos, y puede incluir cualquier número de epítotos, dependiendo del tamaño, conformación y tipo de antígeno. Además, debe observarse que un "epítoto" sobre un polipéptido diana puede ser o puede incluir elementos no de polipéptido, por ejemplo, un epítoto puede incluir una cadena lateral de hidrato de carbono.

Se cree que el tamaño mínimo de un epítoto de péptido o polipéptido para un anticuerpo tiene aproximadamente cuatro a cinco aminoácidos. Los epítotos de péptido o polipéptido contienen preferentemente al menos siete, más preferentemente al menos nueve, y lo más preferentemente entre al menos aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos. Como una CDR puede reconocer un péptido o polipéptido antigénico en su forma terciaria, los aminoácidos que comprenden un epítoto no necesitan estar contiguos, y en algunos casos incluso pueden no estar sobre la misma cadena de péptido. Un epítoto de péptido o polipéptido reconocido por los anticuerpos anti-CD100 de la presente invención puede contener una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, más preferentemente al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos contiguos o no contiguos de CD100.

Por "se une específicamente a" se indica generalmente que un anticuerpo se une a un epítoto mediante su dominio de unión al antígeno, y que la unión implica cierta complementariedad entre el dominio de unión al antígeno y el epítoto. Según esta definición, se dice que un anticuerpo "se une específicamente" a un epítoto cuando se une a ese epítoto, mediante su dominio de unión al antígeno más fácilmente de lo que se uniría a un epítoto no relacionado aleatorio. El término "especificidad" se usa en el presente documento para limitar la afinidad relativa por la que un cierto anticuerpo se une a un cierto epítoto. Por ejemplo, puede considerarse que el anticuerpo "A" tiene una especificidad más alta por un epítoto dado que el anticuerpo "B", o puede decirse que el anticuerpo "A" se une al epítoto "C" con una especificidad más alta que la que tiene por el epítoto "D" relacionado.

Por "se une preferencialmente" se indica que el anticuerpo se une específicamente a un epítoto más fácilmente de lo que se uniría a un epítoto relacionado, similar, homólogo, o análogo. Así, un anticuerpo que "se une preferencialmente" a un epítoto dado se uniría más probablemente a ese epítoto que a un epítoto relacionado, aún cuando un anticuerpo tal pueda reaccionar de forma cruzada con el epítoto relacionado.

A modo de ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítoto preferencialmente si se une a dicho primer epítoto con una constante de disociación (K_D) que es inferior a la K_D del anticuerpo para el segundo epítoto. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferencialmente si se une al primer epítoto con una afinidad que es al menos un orden de magnitud inferior a la K_D del anticuerpo para el segundo epítoto. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítoto preferencialmente si se une al primer epítoto con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud inferior a la K_D del anticuerpo para el segundo epítoto.

En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítoto preferencialmente si se une al primer epítoto con una constante de disociación ($k(\text{dis})$) que es inferior a la $k(\text{dis})$ del anticuerpo para el segundo epítoto. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítoto preferencialmente si se une al primer epítoto con una afinidad que es al menos un orden de magnitud inferior a la $k(\text{dis})$ del anticuerpo para el segundo epítoto. En otro ejemplo no limitante, puede considerarse que un anticuerpo se une a un primer epítoto preferencialmente si se une al primer epítoto con una afinidad que es al menos dos órdenes de magnitud inferior a la $k(\text{dis})$ del anticuerpo para el segundo epítoto. Puede decirse que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado desvelado en el presente documento se une a un polipéptido diana desvelado en el presente documento (por ejemplo, CD100, por ejemplo, CD100 humana, murina, o tanto humana como murina) o un fragmento o variante del mismo con una constante de disociación ($k(\text{dis})$) inferior o igual a $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, 10^{-2} s^{-1} , $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o 10^{-3} s^{-1} . Más preferentemente, puede decirse que un anticuerpo de la invención se une a un polipéptido diana desvelado en el presente documento (por ejemplo, CD100, por ejemplo, CD100 humana,

murina, o tanto humana como murina) o un fragmento o variante del mismo con una constante de disociación ($k(\text{dis})$) inferior o igual a $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, 10^{-4} s^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, o 10^{-5} s^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, 10^{-6} s^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ o 10^{-7} s^{-1} .

5 Puede decirse que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado desvelado en el presente documento, se une a un polipéptido diana desvelado en el presente documento (por ejemplo, CD100, por ejemplo, CD100 humana, murina, o tanto humana como murina) o un fragmento o variante del mismo con una constante de asociación ($k(\text{as})$) superior o igual a $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Más preferentemente, puede decirse que un anticuerpo de la invención se une a un polipéptido diana desvelado en el presente documento (por ejemplo, CD100, por ejemplo, CD100 humana, murina, o tanto humana como murina) o un fragmento o variante del mismo con una constante de asociación ($k(\text{as})$) superior o igual a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ o $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

10 Se dice que un anticuerpo inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de referencia a un epítotope dado si se une preferencialmente a ese epítotope hasta el punto que bloquee, hasta cierto grado, la unión del anticuerpo de referencia al epítotope. La inhibición competitiva puede determinarse por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, ensayos de ELISA de competición. Puede decirse que un anticuerpo inhibe competitivamente la unión del anticuerpo de referencia a un epítotope dado al menos el 90 %, al menos el 80 %, al menos el 70 %, al menos el 60 %, o al menos el 50 %.

15 Como se usa en el presente documento, el término "afinidad" se refiere a una medida de la intensidad de la unión de un epítotope individual con la CDR de una molécula de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Harlow et al. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed.) páginas 27-28. Como se usa en el presente documento, el término "avidéz" se refiere a la estabilidad global del complejo entre una población de inmunoglobulinas y un antígeno, es decir, la intensidad de combinación funcional de una mezcla de inmunoglobulinas con el antígeno. Véase, por ejemplo, Harlow en las páginas 29-34. La avidéz está relacionada con tanto la afinidad de moléculas de inmunoglobulina individuales en la población con epítotospes específicos, como también las valencias de las inmunoglobulinas y el antígeno. Por ejemplo, la interacción entre un anticuerpo monoclonal bivalente y un antígeno con una estructura de epítotope altamente repetitiva, tal como un polímero, sería una de alta avidéz.

20 Los anticuerpos anti-CD100 o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, de la invención también pueden describirse o especificarse en términos de su reactividad cruzada. Como se usa en el presente documento, el término "reactividad cruzada" se refiere a la capacidad de un anticuerpo, específico por un antígeno, para reaccionar con un segundo antígeno; una medida de vinculación entre dos sustancias antigénicas diferentes. Así, un anticuerpo es reactivo de forma cruzada si se une a un epítotope distinto del que indujo su formación. El epítotope reactivo de forma cruzada generalmente contiene muchas de las mismas características estructurales complementarias que el epítotope inductor, y en algunos casos, puede en realidad adaptarse mejor que el original.

25 Por ejemplo, ciertos anticuerpos tienen algún grado de reactividad cruzada, por que se unen a epítotospes relacionados, pero no idénticos, por ejemplo, epítotospes con al menos el 95 %, al menos el 90 %, al menos 85 %, al menos el 80 %, al menos el 75 %, al menos el 70 %, al menos el 65 %, al menos el 60 %, al menos el 55 % y al menos el 50 % de identidad (como se calcula usando métodos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento) con un epítotope de referencia. Puede decirse que un anticuerpo tiene poca o ninguna reactividad cruzada si no se une a epítotospes con menos del 95 %, menos del 90 %, menos del 85 %, menos del 80 %, menos del 75 %, menos del 70 %, menos del 65 %, menos del 60 %, menos del 55 % y menos del 50 % de identidad (como se calcula usando métodos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento) con un epítotope de referencia. Un anticuerpo puede ser considerado "altamente específico" para un cierto epítotope si no se une a ningún otro análogo, ortólogo, u homólogo de ese epítotope.

35 Los anticuerpos de unión anti-CD100, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos, de la invención también pueden describirse o especificarse en términos de su afinidad de unión a un polipéptido de la invención, por ejemplo, CD100, por ejemplo, CD100 humana, murina, o tanto humana como murina. Afinidades de unión preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación o K_d inferior a $5 \times 10^{-2} \text{ M}$, 10^{-2} M , $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, 10^{-3} M , $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, 10^{-4} M , $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, 10^{-5} M , $5 \times 10^{-6} \text{ M}$, 10^{-6} M , $5 \times 10^{-7} \text{ M}$, 10^{-7} M , $5 \times 10^{-8} \text{ M}$, 10^{-8} M , $5 \times 10^{-9} \text{ M}$, 10^{-9} M , $5 \times 10^{-10} \text{ M}$, 10^{-10} M , $5 \times 10^{-11} \text{ M}$, 10^{-11} M , $5 \times 10^{-12} \text{ M}$, 10^{-12} M , $5 \times 10^{-13} \text{ M}$, 10^{-13} M , $5 \times 10^{-14} \text{ M}$, 10^{-14} M , $5 \times 10^{-15} \text{ M}$, o 10^{-15} M . En ciertas realizaciones, la molécula de unión anti-CD100, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, de la invención se une a CD100 humana con una K_d de aproximadamente 5×10^{-9} a aproximadamente 6×10^{-9} . En otra realización, la molécula de unión anti-CD100, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, de la invención se une a CD100 murina con una K_d de aproximadamente 1×10^{-9} a aproximadamente 2×10^{-9} .

40 Los anticuerpos anti-CD100, o fragmentos de unión al antígeno, variantes o derivados de los mismos, de la invención pueden ser "multiespecíficos", por ejemplo, biespecíficos, triespecíficos, o de mayor multi-especificidad, que significa que reconocen y se unen a dos o más epítotospes diferentes presentes sobre uno o más antígenos diferentes (por ejemplo, proteínas) al mismo tiempo. Así, si un anticuerpo anti-CD100 es "monoespecífico" o "multiespecífico", por ejemplo, "biespecífico", se refiere al número de epítotospes diferentes con los que reacciona un

polipéptido de unión. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopes de un polipéptido diana descrito en el presente documento o pueden ser específicos para un polipéptido diana, además de para un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido.

5 Como se usa en el presente documento, el término "valencia" se refiere al número de posibles dominios de unión, por ejemplo, dominios de unión al antígeno presentes en un polipéptido de unión o molécula de unión a CD100, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo. Cada dominio de unión se une específicamente a un epítipo. Cuando un polipéptido de unión o molécula de unión a CD100 comprende más de un dominio de unión, cada dominio de unión puede unirse específicamente al mismo epítipo, para un anticuerpo con dos dominios de unión, llamado "monoespecífico bivalente", o para diferentes epítipes, para un anticuerpo con dos dominios de unión, llamado "bivalente biespecífico". Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo también puede ser biespecífico y bivalente para cada especificidad (llamados "anticuerpos tetravalentes biespecíficos"). En otra realización, pueden prepararse minicuerpos tetravalentes o anticuerpos de dominios delecionados.

15 Anticuerpos bivalentes biespecíficos, y métodos de su preparación se describen, por ejemplo en las patentes de EE.UU. N.º 5.731.168; 5.807.706; 5.821.333; y las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2003/020734 y 2002/0155537, cuyas divulgaciones se incorporan por referencia en el presente documento. Anticuerpos tetravalentes biespecíficos, y métodos de su preparación, se describen, por ejemplo, en los documentos WO 02/096948 y WO 00/44788, cuyas divulgaciones se incorporan por referencia en el presente documento. Véanse generalmente las PCT de publicación WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991); las patentes de EE.UU. N.º 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; 5.601.819; Kostelny et al., J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992).

25 Como se indicó previamente, las estructuras de subunidad y la configuración tridimensional de las regiones constantes de las diversas clases de inmunoglobulina son muy conocidas. Como se usa en el presente documento, el término "dominio VH" incluye el dominio variable del extremo amino de una cadena pesada de la inmunoglobulina y el término "dominio CH1" incluye el primer dominio (el más hacia el extremo amino) de la región constante de una cadena pesada de la inmunoglobulina. El dominio CH1 es adyacente al dominio VH y está en el extremo amino con respecto a la región bisagra de una cadena pesada de la molécula de inmunoglobulina.

30 Como se usa en el presente documento, el término "dominio CH2" incluye la porción de una molécula de cadena pesada que se extiende, por ejemplo, desde aproximadamente el resto 244 al resto 360 de un anticuerpo usando esquemas de numeración convencional (resto 244 a 360, sistema de numeración de Kabat; y resto 231-340, sistema de numeración EU; véase Kabat EA et al.). El dominio CH2 es único por que no está estrechamente emparejado con otro dominio. Más bien, dos cadenas de hidrato de carbono ramificadas unidas en N están intercaladas entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG nativa intacta. También está bien documentado que el dominio CH3 se extiende desde el dominio CH2 hasta el extremo C de la molécula de IgG y comprende aproximadamente 108 restos.

35 Como se usa en el presente documento, el término "región bisagra" incluye la porción de una molécula de cadena pesada que une el dominio CH1 con el dominio CH2. Esta región bisagra comprende aproximadamente 25 restos y es flexible, permitiendo así que las dos regiones de unión al antígeno del extremo N se muevan independientemente. Las regiones bisagra pueden ser subdivididas en tres dominios distintos: dominios bisagra superior, central e inferior (Roux et al., J. Immunol. 161:4083 (1998)).

40 Como se usa en el presente documento, el término "enlace disulfuro" incluye el enlace covalente formado entre dos átomos de azufre. El aminoácido cisteína comprende un grupo tiol que puede formar un enlace disulfuro o puente con un segundo grupo tiol. En la mayoría de las moléculas de IgG que existen de forma natural, las regiones CH1 y CL están unidas por un enlace disulfuro y las dos cadenas pesadas están unidas por dos enlaces disulfuro en las posiciones correspondientes a 239 y 242 usando el sistema de numeración de Kabat (posición 226 o 229, sistema de numeración EU).

45 Como se usa en el presente documento, se mantendrá que el término "anticuerpo quimérico" significa cualquier anticuerpo en el que la región inmunorreactiva o sitio se obtiene o deriva de una primera especie y la región constante (que puede estar intacta, parcial o modificada según la presente invención) se obtiene de una segunda especie. En realizaciones preferidas, la región de unión diana o sitio será de una fuente no humana (por ejemplo, ratón o primate) y la región constante es humana (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal (MAB) 2368 descrito en el presente documento).

55 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo modificado" se refiere a un anticuerpo en el que el dominio variable en cualquiera de la cadena pesada o ligera o ambas está alterado por sustitución al menos parcial de una o más CDR de un anticuerpo de especificidad conocida y, si fuera necesario, por sustitución de la región estructural parcial y cambio de secuencia. Aunque las CDR pueden derivar de un anticuerpo de la misma clase o incluso subclase que el anticuerpo del que derivan las regiones estructurales, se prevé que las CDR deriven de un anticuerpo de clase diferente y preferentemente de un anticuerpo de una especie diferente. Un anticuerpo modificado en el que una o más CDR "donantes" de un anticuerpo no humano de especificidad conocida se injertan en una región estructural de la cadena pesada o ligera humana se denomina en el presente documento un

"anticuerpo humanizado". Puede no ser necesario sustituir todas las CDR con las CDR completas del dominio variable del donante para transferir la capacidad de unión al antígeno de un dominio variable a otro. Más bien, puede solo ser necesario transferir aquellos restos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión diana.

Se reconoce además que las regiones estructurales dentro del dominio variable en una cadena pesada o ligera, o ambas, de un anticuerpo humanizado pueden comprender únicamente restos de origen humano, en cuyo caso estas regiones estructurales del anticuerpo humanizado se denominan "regiones estructurales completamente humanas" (por ejemplo, MAb 2503). Alternativamente, uno o más restos de la(s) región (regiones) estructural(es) del dominio variable del donante pueden manipularse dentro de la posición correspondiente de la(s) región (regiones) estructural(es) de un dominio variable en una cadena pesada o ligera, o ambas, de un anticuerpo humanizado si fuera necesario para mantener la apropiada unión o para potenciar la unión al antígeno CD100. Una región estructural humana que ha sido manipulada de este modo comprendería así una mezcla de restos humanos y de donante de la región estructural, y se denomina en el presente documento una "región estructural parcialmente humana".

Por ejemplo, la humanización de un anticuerpo anti-CD100 puede realizarse 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)), sustituyendo CDR de roedor o de roedor mutante o secuencias de CDR con las secuencias correspondientes de un anticuerpo anti-CD100 humano. Véanse también las patentes de EE.UU. N.º 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205; incorporadas en el presente documento por referencia. El anticuerpo anti-CD100 humanizado resultante comprendería al menos una CDR de roedor o de roedor mutante dentro de las regiones estructurales completamente humanas del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo humanizado. En algunos casos, restos dentro de las regiones estructurales de uno o más dominios variables del anticuerpo anti-CD100 humanizado están sustituidos con restos no humanos (por ejemplo, de roedor) correspondientes (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; y 6.180.370), en cuyo caso el anticuerpo anti-CD100 humanizado resultante comprendería regiones estructurales parcialmente humanas dentro del dominio variable de la cadena pesada y/o ligera.

Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo (por ejemplo, para obtener afinidad deseada). En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las CDR se corresponden con las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones estructurales son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles véanse Jones et al., Nature 331:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992); incorporados en el presente documento por referencia. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" pueden incluir anticuerpos en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados normalmente son anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR, y posiblemente algunos restos de la región estructural, están sustituidos con restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205. Véanse también la patente de EE.UU. N.º 6.180.370 y la publicación internacional N.º WO 01/27160, donde se desvelan anticuerpos humanizados y técnicas para producir anticuerpos humanizados que tienen afinidad mejorada por un antígeno predeterminado.

Como se usa en el presente documento, los términos "unido", "fusionado" o "fusión" se usan indistintamente. Estos términos se refieren a la unión de dos más elementos o componentes, por cualquier medio que incluye conjugación química o medios recombinantes. Una "fusión en marco" se refiere a la unión de dos o más marcos de lectura abiertos (ORF) de polinucleótidos para formar un ORF más largo continuo, de un modo que se mantenga el marco de lectura traduccional correcto de los ORF originales. Así, una proteína de fusión recombinante es una única proteína que contiene dos o más segmentos que se corresponden con polipéptidos codificados por los ORF originales (segmentos que normalmente no están unidos así en la naturaleza). Aunque el marco de lectura se hace así continuo a través de los segmentos fusionados, los segmentos pueden estar físicamente o espacialmente separados por, por ejemplo, secuencia conectora en marco. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican las CDR de una región variable de inmunoglobulina pueden fusionarse, en marco, pero estar separados por un polinucleótido que codifica al menos una región estructural de inmunoglobulina o regiones CDR adicionales, en tanto que las CDR "fusionadas" se co-traduzcan como parte de un polipéptido continuo.

En el contexto de los polipéptidos, una "secuencia lineal" o una "secuencia" es un orden de aminoácidos en un polipéptido en una dirección de extremo amino a carboxilo en la que restos que son vecinos entre sí en la secuencia son contiguos en la estructura primaria del polipéptido.

El término "expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso por el que un gen produce un producto bioquímico, por ejemplo, un polipéptido. El proceso incluye cualquier manifestación de la presencia funcional del gen dentro de la célula que incluye, sin limitación, inactivación génica, además de tanto expresión transitoria como expresión estable. Incluye, sin limitación, la transcripción del gen en ARN mensajero (ARNm) y la

traducción de tal ARNm en polipéptido(s). Si el producto final deseado es un producto bioquímico, la expresión incluye la creación de ese producto bioquímico y cualquier precursor. La expresión de un gen produce un "producto génico". Como se usa en el presente documento, un producto génico puede ser cualquiera de un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN mensajero producido por transcripción de un gen, o un polipéptido que se traduce de un transcrito.

5 Los productos génicos descritos en el presente documento incluyen además ácidos nucleicos con modificaciones post-transcripcionales, por ejemplo, poliadenilación, o polipéptidos con modificaciones post-traduccionales, por ejemplo, metilación, glucosilación, la adición de lípidos, asociación con otras subunidades de proteína, escisión proteolítica, y similares.

10 Como se usa en el presente documento, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren a tanto tratamiento terapéutico y profiláctico como a medidas preventivas, en las que el objeto es prevenir o ralentizar (reducir) un cambio fisiológico no deseado o trastorno, tal como la progresión de esclerosis múltiple, artritis, o cáncer. Resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de síntomas, reducción del grado de enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, que no empeora), retraso o ralentizamiento de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, y remisión (tanto parcial como total), tanto detectable como indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con la afección o trastorno, además de aquellos propensos a tener la afección o trastorno o aquellos en los que la afección o trastorno va a prevenirse.

20 Por "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" o "mamífero" se indica cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, para el que se desea diagnóstico, pronóstico o terapia. Sujetos mamíferos incluyen seres humanos, animales domésticos, animales de granja, y zoológico, deportes, o mascotas tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado vacuno, vacas, etc.

25 Como se usa en el presente documento, expresiones tales como "un sujeto que se beneficiaría de la administración de un anticuerpo anti-CD100" y "un animal en necesidad de tratamiento" incluyen sujetos, tales como sujetos mamíferos, que se beneficiarían de la administración de un anticuerpo anti-CD100 usado, por ejemplo, para la detección de un polipéptido anti-CD100 (por ejemplo, para un procedimiento de diagnóstico) y/o de tratamiento, es decir, paliación o prevención de una enfermedad, con un anticuerpo anti-CD100. Como se describe en más detalle en el presente documento, un anticuerpo anti-CD100 puede usarse en forma no conjugada o puede conjugarse, por ejemplo, con un fármaco, profármaco, o un isótopo.

30 II. Descripción del polipéptido diana

Como se usa en el presente documento, los términos "CD100" y "polipéptido CD100" se usan intercambiamente. En ciertas realizaciones, CD100 se expresa sobre la superficie de o es secretada por una célula. En otra realización, CD100 está unida a membrana. En otras realizaciones, CD100 es soluble, por ejemplo, CD100s. En otras realizaciones, CD100 puede incluir una CD100 de tamaño completo o un fragmento de la misma, o un polipéptido de variante CD100, en el que el fragmento de CD100 o polipéptido de variante CD100 retiene alguna o todas las propiedades funcionales de CD100 de tamaño completo.

35 La proteína humana CD100 de tamaño completo es una proteína transmembranaria homodimérica que consiste en dos cadenas de polipéptidos de 150 kDa. CD100 pertenece a la familia de la semaforina de los receptores de la superficie celular y también se denomina SEMA4D. Tanto Sema4D/CD100 humana como de ratón son escindidas proteolíticamente de su forma transmembranaria para generar formas solubles de 120 kDa, que indica la existencia de dos isoformas de Sema4D (Kumanogoh et al., *J. Cell Science* 116(7):3464 (2003)). Las semaforinas consisten en proteínas solubles y de membrana unidas que fueron originalmente definidas como factores de orientación axonal que desempeñan una función importante en el establecimiento de conexiones precisas entre neuronas y su diana apropiada. Estructuralmente considerada una semaforina de clase IV, la CD100 consiste en una secuencia señal del extremo amino seguida de un dominio 'Sema' característico que contiene 17 restos de cisteína conservados, un dominio similar a Ig, un tramo rico en lisina, una región transmembranaria hidrófoba y una cola citoplásmica.

40 Cada cadena de polipéptidos de CD100 incluye una secuencia señal de aproximadamente 13 aminoácidos seguida de un dominio de semaforina de aproximadamente 512 aminoácidos, un dominio similar a inmunoglobulina (similar a Ig) de aproximadamente 65 aminoácidos, tramo rico en lisina de 104 aminoácidos, una región transmembranaria hidrófoba de aproximadamente 19 aminoácidos y una cola citoplásmica de 110 aminoácidos. Un sitio consenso para la fosforilación de tirosina en la cola citoplásmica soporta la asociación predicha de CD100 con una tirosina cinasa (Schlossman, et al., Eds. (1995) *Leucocyte Typing V* (Oxford University Press, Oxford).

45 Se han identificado dos tipos de receptores para CD100. Uno de los receptores, plexina-B1, se expresa en tejidos no linfoides y se ha mostrado que es un receptor de alta afinidad (1 nM) por CD100 (Tamagnone et al., *Cell* 99:71-80 (1999)). Se ha mostrado que la estimulación por CD100 de la señalización de plexina B1 induce el colapso del cono de crecimiento de neuronas, e induce el colapso de la extensión del proceso y la apoptosis de oligodendrocitos (Giraudon et al., *J. Immunol.* 172:1246-1255 (2004); Giraudon et al., *NeuroMolecular Med.* 7:207-216 (2005)). Después de la unión a CD100, la señalización de plexina B1 media en la inactivación de R-Ras, que conduce a una disminución en la unión mediada por integrina a la matriz extracelular, además de a la activación de Rho, que

conduce al colapso celular por reorganización del citoesqueleto. Véanse Kruger et al., *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6:789-800 (2005); Pasterkamp, *TRENDS in Cell Biology* 15:61-64 (2005)).

En tejidos linfoides se utiliza CD72 como un receptor de baja afinidad (300 nM) de CD100 (Kumanogoh et al., *Immunity* 13:621-631 (2000)). Los linfocitos B y las APC expresan CD72, y los anticuerpos anti-CD72 tienen muchos de los mismos efectos que CD100, tales como el potenciamiento de las respuestas de linfocitos B inducidas por CD40 y la eliminación por linfocito B de CD23. Se cree que CD72 actúa de regulador negativo de las respuestas de linfocitos B reclutando la tirosina fosfatasa SHP-1, que puede asociarse con muchos receptores inhibidores. La interacción de CD100 con CD72 produce la disociación de SHP-1, y la pérdida de esta señal de activación negativa. Se ha mostrado que CD100 promueve la estimulación de linfocitos T y la agregación de linfocitos B y la supervivencia *in vitro*. La adición de células que expresan CD100 o CD100s potencia la proliferación de linfocitos B inducida por CD40 y la producción de inmunoglobulina *in vitro*, y acelera las respuestas *in vivo* de anticuerpos (Ishida et al., *Inter. Immunol.* 15:1027-1034 (2003); Kumanogoh y H. Kikutani, *Trends in Immunol.* 22:670-676 (2001)). La CD100s potencia la maduración inducida por CD40 de DC, que incluye la regulación por incremento de moléculas coestimulantes y la elevada secreción de IL-12. Además, CD100s puede inhibir la migración de células inmunitarias, que puede ser invertida mediante la adición de anticuerpos bloqueantes de ratón anti-CD100 (Elhabazi et al., *J. Immunol.* 166:4341-4347 (2001); Delaire et al., *J. Immunol.* 166:4348-4354 (2001)).

Sema4D se expresa a altos niveles en órganos linfoides, que incluye el bazo, timo y los ganglios linfáticos, y en órganos no linfoides, tales como el cerebro, corazón y riñón. En los órganos linfoides, Sema4D se expresa abundantemente en linfocitos T en reposo, pero solo se expresa débilmente en linfocitos B en reposo y células presentadoras de antígeno (APC), tales como células dendríticas (DC).

La activación celular aumenta la expresión superficial de CD100, además de la generación de CD100 soluble (CD100s). El patrón de expresión de CD100 sugiere que desempeña una función fisiológica importante, además de patológica, en el sistema inmunitario. Se ha mostrado que CD100 promueve la activación, agregación y supervivencia de linfocitos B; potencia la proliferación inducida por CD40 y la producción de anticuerpos; potencia la respuesta de anticuerpos a antígenos dependientes de linfocitos T; aumenta la proliferación de linfocitos T; potencia la maduración de células dendríticas y la capacidad para estimular linfocitos T; y está directamente implicada en la desmielinización y degeneración axonal (Shi et al., *Immunity* 13:633-642 (2000); Kumanogoh et al., *J Immunol* 169:1175-1181 (2002); y Watanabe et al., *J Immunol* 167:4321-4328 (2001)).

Ratones inactivados en CD100 (CD100^{-/-}) han proporcionado evidencia adicional de que CD100 desempeña una función importante en tanto las respuestas inmunitarias humorales como celulares. No se conocen anomalías de tejidos no linfoides en ratones CD100^{-/-}. Células dendríticas (DC) de los ratones CD100^{-/-} tienen mala capacidad aloestimulante y muestran defectos en la expresión de moléculas coestimulantes, que pueden ser rescatadas mediante la adición de CD100s. Ratones deficientes en CD100 (CD100^{-/-}) dejan de desarrollar encefalitis autoinmunitaria experimental inducida por el péptido de glucoproteína de oligodendrocitos de mielina, debido a que los linfocitos T específicos de la glucoproteína de oligodendrocitos de mielina no son generados en ausencia de CD100 (Kumanogoh et al., *J Immunol* 169:1175-1181 (2002)). También se detecta una cantidad significativa de CD100 soluble en los sueros de ratones MRL/lpr propensos a la autoinmunidad (modelo de enfermedades autoinmunitarias sistémicas tales como LES), pero no en ratones normales. Además, los niveles de CD100s se correlacionan con niveles de auto-anticuerpos y aumentan con la edad (Wang et al., *Blood* 97:3498-3504 (2001)). También se ha mostrado que CD100 soluble se acumula en el líquido cefalorraquídeo cerebral y los sueros de pacientes con enfermedad desmielinizante, y CD100s induce la apoptosis de precursores neurales pluripotentes humanos (células de Dev), y tanto inhibe la extensión del proceso como induce la apoptosis de oligodendrocitos de rata *in vitro* (Giraudon et al., *J Immunol* 172(2):1246-1255 (2004)). Esta apoptosis se bloqueó por un MAb anti-CD100.

III. Anticuerpos anti-CD100

Se han descrito en la materia anticuerpos que se unen a CD100. Véanse, por ejemplo, la publicación de EE.UU. N.º 2008/0219971 A1, la solicitud de patente internacional WO 93/14125 y Herold et al., *Int. Immunol.* 7(1): 1-8 (1995).

Los anticuerpos de la invención comprenden anticuerpos anti-CD100 o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos que se unen a CD100, por ejemplo, MAb 2503 o MAb 67. En ciertas realizaciones los anticuerpos anti-CD100 se unen a CD100 humana, murina, o tanto humana como murina. En otras realizaciones, los anticuerpos anti-CD100 bloquean la unión de CD100 a su receptor, por ejemplo, plexina-B.

La presente divulgación también proporciona una molécula de unión aislada, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente al mismo epítopo CD100 que el anticuerpo monoclonal 2503, 67 o 76. En otra realización, la presente divulgación proporciona una molécula de unión aislada, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a CD100, e inhibe competitivamente que el anticuerpo monoclonal 2503, 67 o 76 se una específicamente a CD100, por ejemplo, CD100 humana, murina, o tanto humana como murina.

- 5 En ciertas realizaciones, la molécula de unión tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 88 %, aproximadamente el 89 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, o aproximadamente el 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos para la molécula de anticuerpo anti-CD100 de referencia. En una realización adicional, la molécula de unión comparte al menos aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o el 100 % de identidad de secuencia con el anticuerpo de referencia.
- 10 En otra realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (dominio VH), donde al menos una de las CDR del dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o idéntica a CDR1, CDR2 o CDR3 de SEQ ID NO: 9 o 10.
- 15 En otra realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (dominio VH), donde al menos una de las CDR del dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o idéntica a SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 8.
- 20 En otra realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (dominio VH), donde al menos una de las CDR del dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos idéntica, excepto por 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos conservativas, a SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 8.
- 25 En otra realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, en la que un anticuerpo anti-CD100 que comprende el dominio VH codificado se une específicamente o preferencialmente a CD100.
- 30
- 35 En otra realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (dominio VL), donde al menos una de las CDR del dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o idéntica a CDR1, CDR2 o CDR3 de SEQ ID NO: 17 o 18.
- 40 En otra realización, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (dominio VL), donde al menos una de las CDR del dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o idéntica a SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 16.
- 45 En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (dominio VL), donde al menos una de las CDR del dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos idéntica, excepto por 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos conservativas, a SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, o SEQ ID NO: 16.
- 50 En una realización adicional, la presente divulgación incluye un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o el 100 % idéntica a SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18, en la que un anticuerpo anti-CD100 que comprende el dominio VL codificado se une específicamente o preferencialmente a CD100.
- 55

Variantes biológicamente activas adecuadas de los anticuerpos anti-CD100 de la invención pueden usarse en los métodos de la presente invención. Tales variantes retendrán las propiedades de unión deseadas del anticuerpo anti-CD100 original. Métodos de producción de variantes de anticuerpo están generalmente disponibles en la materia.

Métodos para mutagénesis y alteraciones de secuencias de nucleótidos son muy conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Walker y Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel et al., *Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987); Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.); la patente de EE.UU. N.º 4.873.192; y las referencias citadas en su interior; incorporadas en el presente documento por referencia. Orientación en cuanto a sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan la actividad biológica del polipéptido de interés pueden encontrarse en el modelo de Dayhoff et al. (1978) en *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), pp. 345-352. El modelo de Dayhoff et al. usa la matriz de similitud de aminoácidos de mutación puntual aceptada (PAM) (matriz PAM 250) para determinar sustituciones de aminoácidos conservativas adecuadas. Pueden preferirse sustituciones conservativas, tales como intercambio de un aminoácido con otro que tiene propiedades similares. Ejemplos de sustituciones de aminoácidos conservativas como se enseñan por la matriz PAM 250 del modelo de Dayhoff et al. incluyen, pero no se limitan a, Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln y Phe↔Trp↔Tyr.

En la construcción de variantes de la molécula de unión a anti-CD100, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, polipéptidos de interés, se hacen modificaciones de forma que las variantes continúen poseyendo las propiedades deseadas, por ejemplo, siendo capaces de unirse específicamente a una CD100, por ejemplo, CD100 humana, murina, o tanto humana como murina, por ejemplo, expresada sobre la superficie de o secretada por una célula y que tiene actividad de bloqueo de CD100, como se describe en el presente documento. Obviamente, cualquier mutación hecha en el ADN que codifica el polipéptido de variante no debe poner la secuencia fuera del marco de lectura y preferentemente no creará regiones complementarias que pudieran producir estructura de ARNm secundaria. Véase la publicación de solicitud de patente EP N.º 75.444.

Métodos de medición de la especificidad de unión de la molécula de unión anti-CD100, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión competitiva estándar, ensayos para monitorizar la secreción de inmunoglobulinas por linfocitos T o linfocitos B, ensayos de proliferación de linfocitos T, ensayos de apoptosis, ensayos de ELISA, y similares. Véanse, por ejemplo, tales ensayos desvelados en el documento WO 93/14125; Shi et al., *Immunity* 13:633-642 (2000); Kumanogoh et al., *J Immunol* 169:1175-1181 (2002); Watanabe et al., *J Immunol* 167:4321-4328 (2001); Wang et al., *Blood* 97:3498-3504 (2001); y Giraudon et al., *J Immunol* 172(2):1246-1255 (2004), todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

Cuando se trata en el presente documento si cualquier polipéptido particular, que incluye las regiones constantes, CDR, dominios VH, o dominios VL desvelados en el presente documento, es o no al menos aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o incluso aproximadamente el 100 % idéntico a otro polipéptido, el % de identidad puede determinarse usando métodos y programas informáticos/software conocidos en la técnica tales como, pero no se limitan a, el programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). BESTFIT usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489, para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Si se usa BESTFIT o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular es o no, por ejemplo, el 95 % idéntica a una secuencia de referencia según la presente invención, los parámetros están establecidos, por supuesto, de forma que el porcentaje de identidad se calcule con respecto a la longitud completa de la secuencia de polipéptidos de referencia y que se dejen huecos en la homología de hasta el 5 % del número total de aminoácidos en la secuencia de referencia.

Para los fines de la presente invención, el porcentaje de identidad de secuencia puede determinarse usando el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afín con una penalización por abertura de hueco de 12 y una penalización por extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se enseña en Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489. Una variante puede, por ejemplo, diferenciarse de un anticuerpo anti-CD100 de referencia (por ejemplo, MAb 2503, 67 o 76) por tan solo 1 a 15 restos de aminoácidos, tan solo 1 a 10 restos de aminoácidos, tales como 6-10, tan solo 5, tan solo 4, 3, 2, o incluso 1 resto de aminoácido.

La estructura química precisa de un polipéptido capaz de unirse específicamente a CD100 y de retener la actividad de bloqueo de CD100 deseada depende de varios factores. Como están presentes grupos amino y carboxilo ionizables en la molécula, puede obtenerse un polipéptido particular como una sal ácida o básica, o en forma neutra. Todas aquellas preparaciones que retienen su actividad biológica cuando se ponen en condiciones medioambientales adecuadas están incluidas en la definición de anticuerpos anti-CD100 como se usa en el presente documento. Además, la secuencia de aminoácidos primaria del polipéptido puede ser aumentada por derivatización usando restos de azúcar (glucosilación) o por otras moléculas suplementarias tales como lípidos, grupos fosfato, acetilo y similares. También puede ser aumentada por conjugación con sacáridos. Ciertos aspectos de tal aumento

se llevan a cabo mediante sistemas de procesamiento post-traducciona del hospedador productor; otras modificaciones tales pueden introducirse *in vitro*. En cualquier caso, tales modificaciones están incluidas en la definición de un anticuerpo anti-CD100 usado en el presente documento, mientras que no se destruyan las propiedades deseadas del anticuerpo anti-CD100. Se espera que tales modificaciones puedan afectar cuantitativa o cualitativamente la actividad, bien potenciando o disminuyendo la actividad del polipéptido, en los diversos ensayos. Además, pueden modificarse restos de aminoácidos individuales en la cadena por oxidación, reducción, u otra derivatización, y el polipéptido puede escindirse para obtener fragmentos que retienen la actividad. Tales alteraciones que no destruyen las propiedades deseadas (por ejemplo, especificidad de unión por CD100, afinidad de unión y actividad de bloqueo de CD100) no eliminan la secuencia de polipéptidos de la definición de anticuerpos anti-CD100 de interés como se usa en el presente documento.

La materia proporciona orientación sustancial con respecto a la preparación y el uso de variantes de polipéptido. En la preparación de la molécula de unión anti-CD100, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, variantes, un experto en la materia puede determinar fácilmente qué modificaciones a la secuencia de nucleótidos o aminoácidos de la proteína nativa producirán una variante que es adecuada para su uso como un componente terapéuticamente activo de una composición farmacéutica usada en los métodos de la presente invención.

La región constante de un anticuerpo anti-CD100 puede mutarse para alterar la función efectora de varias formas. Por ejemplo, véanse la patente de EE.UU. N.º 6.737.056B1 y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2004/0132101A1, que desvelan mutaciones de Fc que optimizan la unión del anticuerpo a receptores de Fc.

En ciertos anticuerpos anti-CD100, la porción Fc puede mutarse para reducir la función efectora usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la delección o inactivación (mediante mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de la región constante puede reducir la unión al receptor de Fc del anticuerpo modificado circulante aumentando así la localización tumoral. En otros casos puede ser que las modificaciones de la región constante de acuerdo con la presente invención moderen la unión del complemento y así reduzcan la semivida en suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Pueden usarse aún otras modificaciones de la región constante para modificar los enlaces disulfuro o restos de oligosacárido que permiten la localización potenciada debido a la elevada especificidad por antígenos o flexibilidad del anticuerpo. El perfil fisiológico resultante, la biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las modificaciones, tales como la localización del tumor, biodistribución y semivida en suero, pueden medirse y cuantificarse fácilmente usando técnicas inmunológicas muy conocidas sin excesiva experimentación.

Los anticuerpos anti-CD100 de la invención también incluyen derivados que se modifican, por ejemplo, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de forma que la unión covalente no prevenga que el anticuerpo se una específicamente al epítipo relacionado. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores / de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo por técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica, acetilación, formilación, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el resto de aminoácido se sustituye por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga similar. Familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares se han definido en la materia. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Alternativamente, pueden introducirse mutaciones al azar a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante, tal como por mutagénesis por saturación, y los mutantes resultantes pueden cribarse para actividad biológica para identificar mutantes que retienen la actividad (por ejemplo, la capacidad para unirse a un polipéptido anti-CD100).

Por ejemplo, es posible introducir mutaciones solo en regiones estructurales o solo en regiones CDR de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser mutaciones silenciosas o de aminoácidos neutros, es decir, no tienen, o tienen poco efecto sobre la capacidad de un anticuerpo para unirse al antígeno. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codones, o mejorar la producción de anticuerpos del hibridoma. Alternativamente, mutaciones de aminoácidos no neutros pueden alterar la capacidad de un anticuerpo para unirse al antígeno. Es probable que la localización de la mayoría de las mutaciones silenciosas o de aminoácidos neutros sea en las regiones estructurales, mientras que es probable que la localización de la mayoría de las mutaciones de aminoácidos no neutros sea en CDR, aunque esto no es un requisito absoluto. Un experto en la materia sería capaz de diseñar y probar moléculas mutantes con propiedades deseadas tales como sin alteración en la actividad de unión al antígeno o alteración en la actividad de unión (por ejemplo, mejoras en la actividad de unión al antígeno o cambio en la especificidad del anticuerpo). Tras la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse rutinariamente y la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada (por ejemplo, la capacidad

para unirse inmunoespecíficamente a al menos un epítipo de un polipéptido CD100) puede determinarse usando técnicas descritas en el presente documento o modificando rutinariamente técnicas conocidas en la técnica.

"Actividad anti-CD100" o "actividad de bloqueo de CD100" puede incluir actividad que modula una o más de las siguientes actividades asociadas a CD100: activación, agregación y supervivencia de linfocitos B; proliferación inducida por CD40 y producción de anticuerpos; respuesta de anticuerpos a antígenos dependientes de linfocitos T; proliferación de linfocitos T u otras células inmunitarias; maduración de células dendríticas; desmielinización y degeneración axonal; apoptosis de precursores neurales pluripotentes y/u oligodendrocitos; inducción de migración de células endoteliales; inhibición de la migración espontánea de monocitos; unión a plexina B1 de la superficie celular; o cualquier otra asociación de actividad con CD100 soluble o CD100 que se expresa sobre la superficie de células CD100+. La actividad anti-CD100 también puede atribuirse a una disminución en la incidencia o gravedad de enfermedades asociadas a la expresión de CD100, que incluyen, pero no se limitan a, ciertos tipos de linfomas, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias que incluyen enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP), rechazo de trasplantes y angiogénesis invasiva. Ejemplos de anticuerpos optimizados basados en MAbs BD16 y BB18 anti-CD100 murinos se describieron en la publicación de EE.UU. N.º 2008/0219971 A1, la solicitud de patente internacional WO 93/14125 y Herold et al., Int. Immunol. 7(1): 1-8 (1995). Las modificaciones pueden implicar la sustitución de restos de aminoácidos dentro de la CDR de forma que un anticuerpo anti-CD100 retenga la especificidad por el antígeno CD100 y tenga afinidad de unión mejorada y/o actividad anti-CD100 mejorada.

IV. Polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-CD100

La presente invención también proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-CD100 de la invención, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos.

En una realización, la presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (dominio VH), donde al menos una de las CDR del dominio VH tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o idéntica a una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, o SEQ ID NO: 5.

En otras realizaciones, la presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un ácido nucleico que codifica un dominio VH de inmunoglobulina, donde al menos una de las CDR del dominio VH está seleccionada del grupo que consiste en: (a) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6; (b) una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7; y (c) una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8.

En una realización adicional, la presente divulgación incluye un polinucleótido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un ácido nucleico que codifica un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o el 100 % idéntica a una secuencia de polipéptidos del dominio VH de referencia que comprende SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, en la que un anticuerpo anti-CD100 que comprende el dominio VH codificado se une específicamente o preferencialmente a CD100.

En una realización, la presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un ácido nucleico que codifica un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina (dominio VL), donde al menos una de las CDR del dominio VL tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o idéntica a una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13.

En otras realizaciones, la presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un ácido nucleico que codifica un dominio VL de inmunoglobulina, donde al menos una de las CDR del dominio VL está seleccionada del grupo que consiste en: (a) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 14; (b) una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 15; y (c) una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 16.

En una realización adicional, la presente divulgación incluye un polinucleótido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en un ácido nucleico que codifica un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o el 100 % idéntica a una secuencia de polipéptidos del dominio VL de referencia que comprende SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18, en la que un anticuerpo anti-CD100 que comprende el dominio VL codificado se une específicamente o preferencialmente a CD100.

aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 %, o el 100 % idéntica a una secuencia de polipéptidos del dominio VL de referencia que comprende SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18, en la que un anticuerpo anti-CD100 que comprende el dominio VL codificado se une específicamente o preferencialmente a CD100.

Cualquiera de los polinucleótidos descritos anteriormente puede incluir además ácidos nucleicos adicionales, que codifican, por ejemplo, un péptido señal para dirigir la secreción del polipéptido codificado, regiones constantes de anticuerpo como se describen en el presente documento, u otros polipéptidos heterólogos como se describen en el presente documento. Por tanto, como se describe en más detalle en cualquier parte en el presente documento, la presente invención incluye composiciones que comprenden uno o más de los polinucleótidos descritos anteriormente.

En una realización, la invención incluye composiciones que comprenden un primer polinucleótido y segundo polinucleótido en la que dicho primer polinucleótido codifica un dominio VH como se describe en el presente documento y en la que dicho segundo polinucleótido codifica un dominio VL como se describe en el presente documento. Específicamente, una composición que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un polinucleótido que codifica el dominio VH, como se expone en SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20, y un polinucleótido que codifica el dominio VL, por ejemplo, un polinucleótido que codifica el dominio VL como se expone en SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22.

La presente invención también incluye fragmentos de los polinucleótidos de la invención, como se describe en cualquier parte. Adicionalmente, también se contemplan por la invención polinucleótidos que codifican polipolipéptidos de fusión, fragmentos Fab, y otros derivados, como se describen en el presente documento.

Los polinucleótidos pueden producirse o fabricarse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, si la secuencia de nucleótidos del anticuerpo es conocida, un polinucleótido que codifica el anticuerpo puede ensamblarse a partir de oligonucleótidos químicamente sintetizados (por ejemplo, como se describe en Kutmeier et al., *Bio Techniques* 17:242 (1994)), que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, hibridación y ligación de aquellos oligonucleótidos, y entonces amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR.

Alternativamente, un polinucleótido que codifica un anticuerpo anti-CD100, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, de la invención, puede generarse a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada. Si no está disponible un clon que contenga un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular, pero la secuencia de la molécula de anticuerpo es conocida, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede ser químicamente sintetizado u obtenerse a partir de una fuente adecuada (por ejemplo, una genoteca de ADNc de anticuerpo, o una genoteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, preferentemente poli A+ARN, aislada de, cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo u otro anticuerpo anti-CD100, tal como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo) por amplificación por PCR usando cebadores sintéticos hibridables con los extremos 3' y 5' de la secuencia o clonando usando una sonda de oligonucleótidos específica para la secuencia de genes particular para identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una genoteca de ADNc que codifica el anticuerpo u otro anticuerpo anti-CD100. Entonces pueden clonarse ácidos nucleicos amplificados generados por PCR en vectores de clonación replicables usando cualquier método muy conocido en la técnica.

Una vez se determina la secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos correspondiente del anticuerpo anti-CD100, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, su secuencia de nucleótidos puede manipularse usando métodos muy conocidos en la técnica para la manipulación de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, mutagénesis dirigida al sitio, PCR, etc. (véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al. (1990) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) y Ausubel et al., eds. (1998) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, NY), para generar anticuerpos que tienen una secuencia de aminoácidos diferente, por ejemplo para crear sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos.

Un polinucleótido que codifica una molécula de unión anti-CD100, por ejemplo, un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, puede estar compuesto de cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificado. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica anticuerpo anti-CD100, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, puede estar compuesto de ADN mono- y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono- y bicatenarias, ARN mono- y bicatenario, y ARN que es mezcla de regiones mono- y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarios o, más normalmente, bicatenarios o una mezcla de regiones mono- y bicatenarias. Además, un polinucleótido que codifica una molécula de unión anti-CD100, por ejemplo, un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo puede estar compuesto de regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Un polinucleótido que codifica una molécula de unión anti-CD100, por ejemplo, anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, también puede contener una o más bases modificadas o esqueletos de ADN o ARN modificados para estabilidad o para otros motivos. Bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases poco usuales

tales como inosina. Puede hacerse una variedad de modificaciones al ADN y ARN; así, "polinucleótido" engloba formas químicamente, enzimáticamente o metabólicamente modificadas.

Puede crearse un polinucleótido aislado que codifica una variante no natural de un polipéptido derivado de una inmunoglobulina (por ejemplo, una porción de la cadena pesada o porción de la cadena ligera de la inmunoglobulina) introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la inmunoglobulina de forma que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos en la proteína codificada. Las mutaciones pueden introducirse por técnicas convencionales, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferentemente, se hacen sustituciones de aminoácidos conservativas en uno o más restos de aminoácidos no esenciales.

10 V. Proteínas de fusión y conjugados de anticuerpo

Como se trata en más detalle en cualquier parte en el presente documento, moléculas de unión anti-CD100, por ejemplo, anticuerpos de la invención, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, pueden además fusionarse recombinantemente con un polipéptido heterólogo en el extremo N o C o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, anticuerpos anti-CD100 pueden fusionarse recombinantemente o conjugarse con moléculas útiles como marcas en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos, o toxinas. Véanse, por ejemplo, PCT de publicación WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; la patente de EE.UU. N.º 5.314.995; y el documento EP 396.387.

Anticuerpos anti-CD100 de la invención, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, pueden incluir derivados que se modifican, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de forma que la unión covalente no prevenga la unión del anticuerpo anti-CD100. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores / de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo por técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica, acetilación, formilación, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Las moléculas de unión anti-CD100, por ejemplo, anticuerpos de la invención, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, pueden estar compuestas de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos, y pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD100 pueden modificarse por procesos naturales, tales como procesamiento post-traduccion, o por técnicas de modificación química que son muy conocidas en la técnica. Tales modificaciones están bien descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, además de en una voluminosa bibliografía de investigación. Las modificaciones pueden producirse en cualquier parte en la molécula de unión anti-CD100, que incluye el esqueleto del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo, o en restos tales como hidratos de carbono. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en los mismos grados o en grados variables en varios sitios en una molécula de unión anti-CD100 dada. Por tanto, una molécula de unión anti-CD100 dada puede contener muchos tipos de modificaciones. Las moléculas de unión anti-CD100 pueden ser ramificadas, por ejemplo, como resultado de ubiquitinación, y pueden ser cíclicas, con o sin ramificación. La molécula de unión anti-CD100 cíclica, ramificada y cíclica ramificada puede resultar de procesos naturales post-traducción o puede prepararse por métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de anclajes de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a proteínas tales como arginilación y ubiquitinación (véanse, por ejemplo, *Proteins--Structure and Molecular Properties*, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, NY; 2ª ed. (1993); Johnson, ed. (1983) *Posttranslational Covalent Modification of Proteins* (Academic Press, NY), pgs. 1-12; Seifter et al., *Meth. Enzymol.* 182:626-646 (1990); Rattan et al., *Ann. NY Acad. Sci.* 663:48-62 (1992)).

La presente invención también proporciona proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo anti-CD100, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, y un polipéptido heterólogo. El polipéptido heterólogo al que el anticuerpo está fusionado puede ser útil para la función o es útil para dirigir a las células que expresan polipéptido anti-CD100.

En una realización, una proteína de fusión de la invención comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera o más de los dominios VH de un anticuerpo de la invención o la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera o más de los dominios VL de un anticuerpo de la invención o fragmentos o variantes de los mismos, y una secuencia de polipéptidos heterólogos.

La divulgación también proporciona una proteína de fusión para su uso en los métodos de diagnóstico y de tratamiento desvelados en el presente documento que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera, dos, tres de las CDR del dominio VH de un anticuerpo anti-CD100, o fragmentos, variantes, o derivados del mismo, o la secuencia de aminoácidos de una cualquiera, dos, tres de las CDR del dominio VL de un anticuerpo anti-CD100, o fragmentos, variantes, o derivados del mismo, y una secuencia de polipéptidos heterólogos. En una realización, una proteína de fusión comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos un dominio VH de un anticuerpo anti-CD100 de la invención y la secuencia de aminoácidos de al menos un dominio VL de un anticuerpo anti-CD100 de la invención o fragmentos, derivados o variantes del mismo, y una secuencia de polipéptidos heterólogos. Preferentemente, los dominios VH y VL de la proteína de fusión se corresponden con un anticuerpo de fuente única (o fragmento scFv o Fab) que se une específicamente a al menos un epítipo de CD100. En otra realización más, una proteína de fusión para su uso en los métodos de diagnóstico y de tratamiento desvelados en el presente documento comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera, dos, tres o más de las CDR del dominio VH de un anticuerpo anti-CD100 y la secuencia de aminoácidos de una cualquiera, dos, tres o más de las CDR del dominio VL de un anticuerpo anti-CD100, o fragmentos o variantes del mismo, y una secuencia de polipéptidos heterólogos. Preferentemente, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de la(s) CDR(s) del dominio VH o dominio VL se corresponden con anticuerpo de fuente única (o fragmento scFv o Fab) de la invención. Moléculas de ácidos nucleicos que codifican estas proteínas de fusión también están englobadas por la invención.

Proteínas de fusión a modo de ejemplo informadas en la bibliografía incluyen fusiones del receptor de linfocitos T (Gascoigne et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936-2940 (1987)); CD4 (Capon et al., Nature 337:525-531 (1989); Traunecker et al., Nature 339:68-70 (1989); Zettmeissl et al., DNA Cell Biol. USA 9:347-353 (1990); y Byrn et al., Nature 344:667-670(1990)); L-selectina (receptor de recirculación) (Watson et al., J. Cell. Biol. 110:2221-2229 (1990); y Watson et al., Nature 349:164-167 (1991)); CD44 (Aruffo et al., Cell 61:1303-1313 (1990)); CD28 y B7 (Linsley et al., J. Exp. Med. 173:721-730 (1991)); CTLA-4 (Lisley et al., J. Exp. Med. 174:561-569 (1991)); CD22 (Stamenkovic et al., Cell 66:1133-1144 (1991)); receptor de TNF (Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539 (1991); Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. 27:2883-2886 (1991); y Peppel et al., J. Exp. Med. 174:1483-1489 (1991)); y receptor a de IgE (Ridgway and Gorman, J. Cell. Biol. Vol. 115, Abstract No. 1448 (1991)).

Como se trata en cualquier parte en el presente documento, moléculas de unión anti-CD100, por ejemplo, anticuerpos de la invención, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, pueden fusionarse con polipéptidos heterólogos para aumentar la semivida *in vivo* de los polipéptidos o para su uso en inmunoensayos usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, puede conjugarse PEG con los anticuerpos anti-CD100 de la invención para aumentar su semivida *in vivo*. Véanse Leong et al., Cytokine 16:106 (2001); Adv. in Drug Deliv. Rev. 54:531 (2002); o Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30:512 (2002).

Además, las moléculas de unión anti-CD100, por ejemplo, anticuerpos de la invención, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, pueden fusionarse con secuencias de marcador, tales como un péptido para facilitar su purificación o detección. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos del marcador es un péptido de hexa-histidina, tal como la marca proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otros, muchas de las cuales están comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989), por ejemplo, la hexa-histidina proporciona purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras marcas de péptido útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la marca "HA", que se corresponde con un epítipo derivado de la proteína de hemaglutinina de la gripe (Wilson et al., Cell 37:767 (1984)) y la marca "flag".

Pueden prepararse proteínas de fusión usando métodos que son muy conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.116.964 y 5.225.538). El sitio preciso en el que se hace la fusión puede seleccionarse empíricamente para optimizar las características de secreción o de unión de la proteína de fusión. Entonces se transfecta ADN que codifica la proteína de fusión en una célula hospedadora para la expresión.

Pueden usarse moléculas de unión anti-CD100, por ejemplo, anticuerpos de la presente invención, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, en forma no conjugada o pueden conjugarse con al menos una de una variedad de moléculas, por ejemplo, para mejorar las propiedades terapéuticas de la molécula, para facilitar la detección de dianas, o para la obtención de imágenes o terapia del paciente. Pueden marcarse o conjugarse moléculas de unión anti-CD100, por ejemplo, anticuerpos de la invención, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, bien antes o bien después de la purificación, o cuando se realiza la purificación.

En particular pueden conjugarse, anticuerpos anti-CD100 de la invención, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, con agentes terapéuticos, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos, o PEG.

Aquellos expertos en la materia apreciarán que también pueden ensamblarse conjugados usando una variedad de técnicas dependiendo del agente seleccionado a conjugar. Por ejemplo, se preparan conjugados con biotina, por ejemplo, haciendo reaccionar un polipéptido de unión con un éster activado de biotina tal como el éster de N-hidroxisuccinimida de biotina. Similarmente, pueden prepararse conjugados con un marcador fluorescente en

presencia de un agente de acoplamiento, por ejemplo, aquellos enumerados en el presente documento, o mediante reacción con un isotiocianato, preferentemente isotiocianato de fluoresceína. Conjugados de los anticuerpos anti-CD100 de la invención, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, se preparan de forma análoga.

5 La presente invención engloba además moléculas de unión anti-CD100, por ejemplo, anticuerpos de la invención, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, conjugadas con un agente de diagnóstico o terapéutico. Los anticuerpos anti-CD100, que incluyen fragmentos de unión al antígeno, variantes, y derivados de los mismos, pueden usarse diagnósticamente para, por ejemplo, monitorizar el desarrollo o la progresión de una enfermedad como parte de un procedimiento de ensayo clínico para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento y/o prevención dado. Por ejemplo, la detección puede facilitarse acoplado el anticuerpo anti-CD100, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones que usan diversas tomografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 4.741.900 para iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso como agentes de diagnóstico según la presente invención. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{90}Y o ^{99}Tc .

Una molécula de unión anti-CD100, por ejemplo, un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, puede conjugarse con un resto terapéutico tal como una citotoxina, un agente terapéutico o un ión metálico radiactivo. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células.

Una molécula de unión anti-CD100, por ejemplo, un anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, también puede marcarse detectablemente acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia de la molécula de unión anti-CD100 marcada con quimioluminiscencia se determina entonces detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. Ejemplos de compuestos de marcado quimioluminiscente particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sal de acridinio y éster de oxalato.

Una de las formas en las que un anticuerpo anti-CD100, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, puede marcarse detectablemente es uniendo el mismo a una enzima y usando el producto unido en una inmunoensayo enzimático (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md.; Diagnostic Horizons 2:1-7 (1978); Voller et al., J. Clin. Pathol. 31:507-520 (1978); Butler, Meth. Enzymol. 73:482-523 (1981); Maggio, ed. (1980) Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla.; Ishikawa et al., eds. (1981) Enzyme Immunoassay (Kgakaku Shoin, Tokio). La enzima, que está unida al anticuerpo anti-CD100, reaccionará con un sustrato apropiado, preferentemente un sustrato cromogénico, de tal manera que produzca un resto químico que puede detectarse, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorimétricos o por medios visuales. Enzimas que pueden usarse para marcar detectablemente el anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato, deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. Adicionalmente, la detección puede llevarse a cabo por métodos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima. La detección también puede llevarse a cabo por comparación visual del grado de reacción enzimática de un sustrato en comparación con patrones similarmente preparados.

La detección también puede llevarse a cabo usando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, marcando radiactivamente la molécula de unión anti-CD100, por ejemplo, anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, es posible detectar la molécula de unión mediante el uso de un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub (March, 1986) Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques (The Endocrine Society), que se incorpora por referencia en el presente documento). El isótopo radiactivo puede detectarse por medios que incluyen, pero no se limitan a, un contador gamma, un contador de centelleo, o autorradiografía.

Una molécula de unión anti-CD100, por ejemplo, anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, también puede marcarse detectablemente usando metales emisores de fluorescencia tales como ^{152}Eu , u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales pueden unirse a la molécula de unión usando grupos quelantes de metal tales como ácido dietilentriaminapentacético (DTPA) o ácido etilendiaminatetraacético (EDTA).

Técnicas para conjugar diversos restos con un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD100), o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, son muy conocidas, véase, por ejemplo, Amon et al. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, ed. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), pp. 243-56; Hellstrom et al. (1987) "Antibodies for Drug Delivery," en *Controlled Drug Delivery*, ed. Robinson et al. (2ª ed.; Marcel Dekker, Inc.), pp. 623-53; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, ed. Pinchera et al., pp. 475-506; "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, ed. Baldwin et al., Academic Press, pp. 303-16 (1985); y Thorpe et al. (1982) "The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62:119-58.

VI. Expresión de polipéptidos de anticuerpo

Pueden prepararse secuencias de ADN que codifican las cadenas ligeras y las pesadas del anticuerpo, ya sea simultáneamente o por separado, usando transcriptasa inversa y ADN polimerasa según métodos muy conocidos. Puede iniciarse PCR por cebadores consenso de la región constante o por cebadores más específicos basándose en las secuencias de ADN y de aminoácidos de la cadena pesada y ligera publicadas. Como se trata anteriormente, también puede usarse PCR para aislar clones de ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo. En este caso, las genotecas pueden ser cribadas por cebadores consenso o sondas homólogas más grandes, tales como sondas de región constante de ratón.

Puede aislarse ADN, normalmente ADN de plásmido, de las células usando técnicas conocidas en la técnica, mapearse por restricción y secuenciarse según técnicas muy conocidas estándar expuestas en detalle, por ejemplo, en las referencias anteriores que se refieren a técnicas de ADN recombinante. Por supuesto, el ADN puede ser sintético según la presente invención en cualquier momento durante el proceso de aislamiento o análisis posterior.

Tras la manipulación del material genético aislado para proporcionar anticuerpos anti-CD100, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, de la invención, los polinucleótidos que codifican los anticuerpos anti-CD100 normalmente se insertan en un vector de expresión para introducción en células hospedadoras que puede usarse para producir la cantidad deseada de anticuerpo anti-CD100.

La expresión recombinante de un anticuerpo, o fragmento, derivado o análogo del mismo, por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo que se une a una molécula diana descrita en el presente documento, por ejemplo, CD100, requiere la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo. Una vez ha sido obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o porción del mismo (preferentemente que contiene el dominio variable de la cadena pesada o ligera), de la invención, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo puede producirse por tecnología de ADN recombinante usando técnicas muy conocidas en la técnica. Así, se describen en el presente documento métodos de preparación de una proteína expresando un polinucleótido que contiene un anticuerpo que codifica la secuencia de nucleótidos. Pueden usarse métodos que son muy conocidos para aquellos expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de anticuerpos y señales de control transcripcional y traduccional apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. La invención, así, proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo de la invención, o una cadena pesada o ligera del mismo, o un dominio variable de la cadena pesada o ligera, operativamente unido a un promotor. Tales vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véanse, por ejemplo, publicación PCT WO 86/05807; publicación PCT WO 89/01036; y la patente de EE.UU. N.º 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en un vector tal para la expresión de la cadena pesada o ligera entera.

El término "vector" o "vector de expresión" se usa en el presente documento para significar vectores usados según la presente invención como vehículo para introducir y expresar un gen deseado en una célula hospedadora. Como es conocido para aquellos expertos en la materia, tales vectores pueden seleccionarse fácilmente del grupo que consiste en plásmidos, fagos, virus y retrovirus. En general, vectores compatibles con la presente invención comprenderán un marcador de selección, sitios de restricción apropiados para facilitar la clonación del gen deseado y la capacidad para entrar y/o replicarse en células eucariotas o procariotas.

Para los fines de la presente invención, pueden emplearse numerosos sistemas de vector de expresión. Por ejemplo, una clase de vector utiliza elementos de ADN que derivan de virus animales tales como virus del papiloma bovino, virus del polioma, adenovirus, virus de la variolovacuna, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistrónicos con sitios internos de unión al ribosoma. Adicionalmente, pueden seleccionarse células que han integrado el ADN en sus cromosomas introduciendo uno o más marcadores que permiten la selección de células hospedadoras transfectadas. El marcador puede proporcionar prototofia a un hospedador auxotrófico, resistencia a biocidas (por ejemplo, antibióticos) o resistencia a metales pesados tales como el cobre. El gen marcador de selección pueden o bien unirse directamente a las secuencias de ADN que van a expresarse, o bien introducirse en la misma célula por cotransformación. Elementos adicionales

también pueden ser necesarios para la síntesis óptima de ARNm. Estos elementos pueden incluir secuencias señal, señales de corte y empalme, además de promotores de la transcripción, potenciadores y señales de terminación.

En realizaciones particularmente preferidas, los genes de la región variable clonados se insertan en un vector de expresión junto con los genes de la región constante de la cadena pesada y ligera (preferentemente humanos) sintetizados como se trata anteriormente. Por supuesto, puede usarse cualquier vector de expresión que sea capaz de provocar la expresión en células eucariotas en la presente invención. Ejemplos de vectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, plásmidos DNAPc3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF 1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1 y pZeoSV2 (disponibles de Invitrogen, San Diego, Calif.) y plásmido pCI (disponible de Promega, Madison, Wis.). En general, el cribado de grandes números de células transformadas para aquellos que expresan adecuadamente altos niveles de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina es experimentación rutinaria que puede llevarse a cabo, por ejemplo, por sistemas robóticos.

Más generalmente, una vez ha sido preparado el vector o la secuencia de ADN que codifica una subunidad monomérica del anticuerpo anti-CD100, el vector de expresión puede introducirse en una célula hospedadora apropiada. La introducción del plásmido en la célula hospedadora puede llevarse a cabo por diversas técnicas muy conocidas para aquellos expertos en la materia. Éstas incluyen, pero no se limitan a, transfección (incluyendo electroforesis y electroporación), fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio, fusión de células con ADN envuelto, microinyección e infección con virus intacto. Véase Ridgway (1988) "Mammalian Expression Vectors" en Vectors, ed. Rodriguez and Denhardt (Butterworths, Boston, Mass.), Capítulo 24.2, pp. 470-472. Normalmente, la introducción de plásmidos en el hospedador es mediante electroporación. Las células hospedadoras que albergan la construcción de expresión se cultivan en condiciones apropiadas para la producción de las cadenas ligeras y cadenas pesadas, y se ensayan para la síntesis de proteínas de la cadena pesada y/o ligera. Técnicas de ensayo a modo de ejemplo incluyen enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), o análisis de citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

El vector de expresión se transfiere a una célula hospedadora por técnicas convencionales, y las células transfectadas se cultivan entonces por técnicas convencionales para producir un anticuerpo para su uso en los métodos descritos en el presente documento. Así, la invención incluye células hospedadoras que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención, o una cadena pesada o ligera del mismo, operativamente unido a un promotor heterólogo. En realizaciones preferidas para la expresión de anticuerpos bicatenarios, los vectores que codifican tanto las cadenas pesadas como ligeras pueden co-expresarse en la célula hospedadora para la expresión de la molécula de inmunoglobulina entera, como se detalla más adelante.

Como se usa en el presente documento, "células hospedadoras" se refiere a células que albergan vectores contruidos usando técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo. En descripciones de procesos para el aislamiento de anticuerpos de hospedadores recombinantes, los términos "célula" y "cultivo celular" se usan indistintamente para indicar la fuente de anticuerpo, a menos que se especifique evidentemente de otro modo. En otras palabras, la recuperación del polipéptido de las "células" puede significar o bien de células completas centrifugadas, o del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspensas.

Puede utilizarse una variedad de sistemas de vector de expresión en hospedador para expresar moléculas de anticuerpo para su uso en los métodos descritos en el presente documento. Tales sistemas de expresión en hospedador representan vehículos por los que las secuencias codificantes de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresar una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN de plásmido o de ADN de cósmido que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión en levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insecto infectados con vector de expresión en virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de planta infectados con vectores de expresión en virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión plasmídicos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BLK, 293, 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7,5K del virus de la variolovacuna). Preferentemente, células bacterianas tales como *Escherichia coli*, y más preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de molécula de anticuerpo recombinante completa, se usan para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), conjuntamente con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio mayor del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foelcking et al., Gene 45:101 (1986); Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990)).

La línea de células hospedadoras usada para la expresión de proteínas es frecuentemente de origen de mamífero; a aquellos expertos en la materia se les atribuye la capacidad para determinar preferencialmente las líneas de células

hospedadoras particulares que son más aptas para el producto génico deseado que va a expresarse en ellas. Líneas de células hospedadoras a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, CHO (ovario de hámster chino), DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chino, DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno T de SV40), VERY, BHK (riñón hámster de bebé), MDCK, 293, WI38, R1610 (fibroblasto de hámster chino) BALBC/3T3 (fibroblasto de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), P3.times.63-Ag3.653 (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocito humano) y 293 (riñón humano). Las líneas de células hospedadoras normalmente están disponibles de servicios comerciales, la Colección Americana de Cultivos de Tejido o de la bibliografía.

Además, puede elegirse una cepa de células hospedadoras que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico en el modo específico deseado. Tales modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos de proteína pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento post-traducciona y la modificación de proteínas y productos génicos. Pueden elegirse líneas celulares apropiadas o sistemas hospedadores para garantizar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña expresada. Para este fin, pueden usarse células hospedadoras eucariotas que poseen la maquinaria celular para el apropiado procesamiento del transcrito primario, glucosilación y fosforilación del producto génico.

Para producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden manipularse líneas celulares que expresan establemente la molécula de anticuerpo. En vez de usar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, pueden transformarse células hospedadoras con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador de selección. Tras la introducción del ADN foráneo, puede dejarse que las células manipuladas crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido, y entonces se cambian a un medio selectivo. El marcador de selección en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren establemente el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para manipular líneas celulares que expresan establemente la molécula de anticuerpo.

Pueden usarse varios sistemas de selección, que incluyen, pero no se limitan a, los genes de timidina cinasa (Wigler et al., Cell 11:223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992)) y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy et al., Cell 22:817 (1980)) del virus del herpes simple que pueden emplearse en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Por tanto, resistencia a antimetabolitos como base de la selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77:357 (1980); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan y Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu y Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993); y Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); TIB TECH 11(5):155-215 (Mayo, 1993); e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre et al., Gene 30:147 (1984)). Métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel et al. (1993) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, NY); Kriegler (1990) "Gene Transfer and Expression" en A Laboratory Manual (Stockton Press, NY); Dracopoli et al. (eds) (1994) Current Protocols in Human Genetics (John Wiley & Sons, NY) Capítulos 12 y 13; Colberre-Garapin et al. (1981) J. Mol. Biol. 150:1, que se incorporan por referencia en el presente documento en sus totalidades.

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden aumentarse por amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington and Hentschel (1987) "The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning" (Academic Press, NY) Vol. 3. Cuando un marcador es amplificable en el sistema de vector que expresa el anticuerpo, el aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de célula hospedadora aumentará el número de copias del gen marcador. Como la región amplificada está asociada con el gen de anticuerpo, también aumentará la producción del anticuerpo (Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3:257 (1983)).

La producción *in vitro* permite el aumento de escala para dar grandes cantidades de los polipéptidos deseados. Técnicas para el cultivo de células de mamífero en condiciones de cultivo de tejido se conocen en la técnica e incluyen cultivo en suspensión homogénea, por ejemplo, en un reactor de columna aireada o en un reactor con agitador continuo, o cultivo celular inmovilizado o atrapado, por ejemplo, en fibras huecas, microcápsulas, sobre microperlas de agarosa o cartuchos cerámicos. Si fuera necesario y/o se deseara, las disoluciones de polipéptidos pueden purificarse por los métodos de cromatografía habituales, por ejemplo, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía sobre DEAE-celulosa o cromatografía de (inmuno-)afinidad, por ejemplo, después de la biosíntesis preferencial de un polipéptido de región bisagra sintético o antes o posterior a la etapa de cromatografía HIC descrita en el presente documento.

También pueden expresarse genes que codifican anticuerpos anti-CD100, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, de la invención, en células no de mamífero tales como células de insecto,

bacteria o levadura o vegetales. Bacterias que fácilmente absorben ácidos nucleicos incluyen miembros de las enterobacteriaceae, tales como cepas de *Escherichia coli* o *Salmonella*; *Bacillaceae*, tales como *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* y *Haemophilus influenzae*. Se apreciará además que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos heterólogos normalmente llegan a ser de cuerpos de inclusión. Los polipéptidos heterólogos deben aislarse, purificarse y luego ensamblarse en moléculas funcionales. Donde se desean formas tetravalentes de anticuerpos, las subunidades se auto-ensamblarán entonces en anticuerpos tetravalentes (documento WO 02/096948A2).

En sistemas bacterianos, pueden seleccionarse ventajosamente varios vectores de expresión que dependen del uso previsto para la molécula de anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, cuando va a producirse una gran cantidad de una proteína tal, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que son fácilmente purificados. Tales vectores incluyen, pero no se limitan, al vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., EMBO J. 2:1791 (1983)), en el que la secuencia codificante de anticuerpos puede unirse individualmente en el vector en marco con la región codificante lacZ de manera que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye y Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985); Van Heeke y Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509 (1989)); y similares. También pueden usarse vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente de células lisadas por adsorción y unión a una matriz de perlas de glutatión-agarosa, seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión de trombina o proteasa del factor Xa de manera que el producto génico diana clonado pueda ser liberado del resto de GST.

Además de procariotas, también pueden usarse microbios eucariotas. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura de cerveza común, es el más comúnmente usado entre microorganismos eucariotas, aunque varias otras cepas están comúnmente disponibles, por ejemplo, *Pichia pastoris*.

Para la expresión en *Saccharomyces*, se usa comúnmente el plásmido YRp7, por ejemplo, (Stinchcomb et al., Nature 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene 10:157 (1980)). Este plásmido ya contiene el gen TRP1, que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo ATCC N.º 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics 85:12 (1977)). La presencia de la lesión trp1 como una característica de la célula hospedadora del genoma de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano.

En un sistema de insecto, normalmente se usa el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante de anticuerpos puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de poliedrina) del virus y ponerse bajo el control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor de poliedrina).

Una vez se ha expresado recombinantemente una molécula de anticuerpo de la invención, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de la proteína A, y cromatografía de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Alternativamente, un método preferido para aumentar la afinidad de anticuerpos de la invención se desvela en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2002 0123057 A1.

VII. Métodos de tratamiento usando anticuerpos anti-CD100 terapéuticos

Aspectos de la invención se refieren a anticuerpos de unión anti-CD100, que incluyen fragmentos de unión al antígeno, variantes y derivados de los mismos, para su uso en el tratamiento de pacientes que tienen una enfermedad asociada a CD100 soluble secretada de o expresada en células que expresan CD100. Por "célula que expresa CD100" están previstas células normales y malignas que expresan el antígeno CD100. Métodos de detección de la expresión de CD100 en células son muy conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, técnicas de PCR, inmunohistoquímica, citometría de flujo, transferencia Western, ELISA, y similares.

Aunque la siguiente discusión se refiere a tales usos en métodos de diagnóstico y el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos con un anticuerpo anti-CD100 de la invención, los métodos descritos en el presente documento también son aplicables a los fragmentos de unión al antígeno, variantes, y derivados de estos anticuerpos anti-CD100 que retienen las propiedades deseadas de los anticuerpos anti-CD100 de la invención, por ejemplo, capaces de unirse específicamente a CD100, por ejemplo, CD100 humana, de ratón, o humana y de ratón, y que tienen actividad neutralizante de CD100.

En una realización, el tratamiento incluye la aplicación o administración de un anticuerpo de unión anti-CD100 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la presente invención a un paciente, o la aplicación o administración de la molécula de unión anti-CD100 a un tejido aislado o línea celular de un paciente, donde el paciente tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad, o una predisposición hacia una enfermedad. En otra realización, el tratamiento también pretende incluir la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende

el anticuerpo de unión anti-CD100 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la presente invención a un paciente, o la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión anti-CD100 a un tejido aislado o línea celular de un paciente, que tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad, o una predisposición hacia una enfermedad.

5 Los anticuerpos de unión anti-CD100 o fragmentos de unión de los mismos de la presente invención son útiles para el tratamiento de diversos tumores malignos y no malignos. Por "actividad antitumoral" está prevista una reducción en la tasa de proliferación o acumulación de células que expresan CD100 malignas, y de ahí una disminución en la tasa de crecimiento de un tumor existente o en un tumor que surge durante la terapia, y/o la destrucción de células neoplásicas (tumoraes) existentes o células neoplásicas recién formadas, y de ahí una disminución en el tamaño global de un tumor durante la terapia. Por ejemplo, la terapia con al menos un anticuerpo anti-CD100 produce una respuesta fisiológica, por ejemplo, una reducción en la angiogénesis, que es beneficiosa con respecto al tratamiento de estados de enfermedad asociados a células que expresan CD100 en un ser humano.

10 En una realización, la invención se refiere a anticuerpos de unión anti-CD100 o fragmentos de unión de los mismos según la presente invención para su uso como un medicamento, en particular para su uso en el tratamiento o la profilaxis de cáncer o para su uso en una afección o lesión precancerosa. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de unión anti-CD100 o fragmento de unión del mismo de la invención se usa para el tratamiento de un cáncer que expresa en exceso CD100. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de unión anti-CD100 o fragmento de unión del mismo de la invención se usa para el tratamiento de un cáncer de cabeza y cuello o de colon que expresa en exceso CD100.

20 Además, también pueden usarse anticuerpos de unión anti-CD100 o fragmentos de unión de los mismos de la presente invención para inhibir la angiogénesis para el tratamiento de afecciones patológicas dependientes de la formación de nuevos vasos sanguíneos, que incluyen desarrollo tumoral y degeneración macular. La angiogénesis es un evento morfogénico multietapa complejo durante el que las células endoteliales, estimuladas por determinantes importantes de la remodelación vascular, modifican dinámicamente sus contactos célula a célula y célula a matriz y se mueven direccionalmente para ser reorganizados en un árbol vascular maduro (Bussolino et al., Trends Biochem Sci. 22:251-256 (1997); Risau, Nature 386:671-674 (1997); Jain, Nat. Med. 9:685-693 (2003)). La formación de nuevos vasos sanguíneos es una etapa clave durante el desarrollo embrionario, pero también se produce en adultos en condiciones fisiológicas y en patológicas, tales como retinopatía, artritis reumatoide, isquemia, y particularmente crecimiento tumoral y metástasis (Carmeliet, Nat. Med. 9:653-660 (2003)). Esta formación patológica de nuevos vasos sanguíneos se denomina en el presente documento "angiogénesis invasiva". Basile et al., PNAS 103(24):9017-9022 (2006)) demostraron que, cuando se elimina de células HNSCC, CD100 estimula la migración de células endoteliales, que se previno por anticuerpos bloqueantes de CD100 y por inactivación de CD100. La expresión en exceso de CD100 también se observó en cánceres de próstata, colon, mama y pulmón, sugiriendo que la expresión de CD100 es una estrategia frecuentemente usada por la que una amplia variedad de carcinomas pueden promover la angiogénesis.

Según la presente invención, al menos un anticuerpo de unión anti-CD100 o fragmento de unión al antígeno del mismo, como se define en cualquier parte en el presente documento, se usa para promover una respuesta terapéutica positiva con respecto a una célula humana maligna. Por "respuesta terapéutica positiva" con respecto al tratamiento contra el cáncer está prevista una mejora en la enfermedad en asociación con la actividad antitumoral de estas moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos, y/o una mejora en los síntomas asociados a la enfermedad. Es decir, puede observarse un efecto antiproliferativo, la prevención de crecimientos tumorales adicionales, una reducción en el tamaño del tumor, una disminución en la vasculatura del tumor, una reducción en el número de células cancerosas y/o una disminución en uno o más síntomas asociados a la enfermedad. Así, por ejemplo, una mejora en la enfermedad puede caracterizarse como una respuesta completa. Por "respuesta completa" está prevista una ausencia de enfermedad clínicamente detectable con normalización de cualquier estudio radiográfico previamente anormal, médula ósea y líquido cefalorraquídeo (CSF). Una respuesta tal debe persistir durante al menos un mes tras el tratamiento según los métodos de la invención. Alternativamente, una mejora en la enfermedad puede clasificarse como que es una respuesta parcial. Por "respuesta parcial" está previsto al menos aproximadamente una disminución del 50 % en toda la carga tumoral medible (es decir, el número de células tumorales presentes en el sujeto) en ausencia de nuevas lesiones y que persiste durante al menos un mes. Una respuesta tal es aplicable a tumores medibles solo.

La respuesta tumoral puede evaluarse para cambios en la morfología del tumor (es decir, carga tumoral global, recuento de células tumorales, y similares) usando técnicas de cribado tales como obtención de imágenes bioluminiscentes, por ejemplo, obtención de imágenes de luciferasa, obtención de imágenes por gammagrafía ósea y muestreo de biopsia tumoral que incluye aspiración de médula ósea (BMA). Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto que recibe terapia con el anticuerpo de unión anti-CD100 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede experimentar el efecto beneficioso de una mejoría en los síntomas asociados a la enfermedad. Por ejemplo, el sujeto puede experimentar una disminución en los llamados síntomas B, por ejemplo, sudores nocturnos, fiebre, pérdida de peso y/o urticaria.

60 Los anticuerpos de unión anti-CD100 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, descritos en el presente documento, también pueden encontrar uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y deficiencias o

trastornos del sistema inmunitario que están asociados a células que expresan CD100. Las enfermedades inflamatorias se caracterizan por inflamación y destrucción de tejido, o una combinación de los mismos. Por "actividad antiinflamatoria" está previsto una reducción o prevención de la inflamación. "Enfermedad inflamatoria" incluye cualquier proceso inflamatorio mediado por la inmunidad donde el evento desencadenante o diana de la respuesta inmunitaria implica antígeno(s) no propio(s), que incluyen, por ejemplo, aloantígenos, xenoantígenos, antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos desconocidos, o alérgenos. En una realización, la enfermedad inflamatoria es un trastorno inflamatorio del sistema nervioso periférico o central. En otra realización, la enfermedad inflamatoria es un trastorno inflamatorio de las articulaciones.

Además, para los fines de la presente invención, el término "enfermedad(es) inflamatoria(s)" incluye "enfermedad(es) autoinmunitaria(s)". Como se usa en el presente documento, el término "autoinmunidad" se entiende generalmente como que engloba procesos inflamatorios mediados por la inmunidad que implican antígenos "propios". En las enfermedades autoinmunitarias, el (los) auto-antígeno(s) desencadenan respuestas inmunitarias del hospedador. Una enfermedad autoinmunitaria puede resultar de una respuesta inmunitaria inapropiada dirigida contra un antígeno propio (un autoantígeno), que es una desviación del estado normal de la auto-tolerancia. En general, los anticuerpos (particularmente, pero no exclusivamente, anticuerpos IgG), que actúan como moléculas citotóxicas o como complejos inmunitarios, son los principales mediadores de diversas enfermedades autoinmunitarias, muchas de las cuales pueden ser debilitantes o potencialmente mortales.

En una realización, el anticuerpo de unión anti-CD100 o fragmento de unión al antígeno de la invención se usa para tratar esclerosis múltiple (EM). La EM, también conocida como esclerosis diseminada o encefalomiелitis diseminada, es una condición autoinmunitaria en la que el sistema inmunitario ataca al sistema nervioso central, conduciendo a la desmielinización. El nombre esclerosis múltiple se refiere a las cicatrices (esclerosis, también denominadas placas o lesiones) que se forman en el sistema nervioso. Las lesiones de la EM comúnmente implican áreas de materia blanca próximas a los ventrículos del cerebelo, tronco encefálico, ganglios basales y médula espinal, y el nervio óptico. La EM produce la destrucción de oligodendrocitos, las células responsables de crear y mantener la vaina de mielina. La EM produce un adelgazamiento o pérdida completa de mielina y, a medida que avanza la enfermedad, la transección de axones.

El síntoma neurológico puede variar con la EM, y la enfermedad frecuentemente progresa a incapacidad física y cognitiva. La EM adopta varias formas, produciéndose algunos síntomas bien en ataques discretos (formas de recaída) o bien acumulándose lentamente con el tiempo (formas progresivas). Entre ataques, los síntomas pueden desaparecer completamente, pero frecuentemente resulta daño neurológico permanente, especialmente a medida que avanza la enfermedad.

La neutralización de CD10 usando un anticuerpo monoclonal anti-CD100 de la invención, por ejemplo, MAb 2503 o MAb 67, puede usarse para reducir la gravedad de la EM a través de varios mecanismos diferentes, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-CD100 pueden bloquear la maduración inmunitaria y la activación por CD100 para reducir la tasa de recaída reduciendo las respuestas inmunitarias secundarias a antígenos del SNC, y anticuerpos monoclonales anti-CD100 que pueden bloquear el efecto de CD100 soluble que media en la apoptosis de oligodendrocitos en el SNC pueden reducir la gravedad de enfermedad reduciendo la desmielinización.

En una realización, el anticuerpo de unión anti-CD100 o fragmento de unión al antígeno de la invención se usa para tratar artritis. La artritis es una enfermedad inflamatoria de las articulaciones, que puede producirse por una condición autoinmunitaria en la que el sistema inmunitario ataca a las articulaciones. En ciertas realizaciones, la artritis está seleccionada del grupo que consiste en osteoartritis, artritis gotosa, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, artritis reactiva, artritis reumatoide, artritis reumatoide de aparición juvenil, artritis infecciosa, artritis inflamatoria, artritis séptica, artritis degenerativa, artritis mutilante y artritis de Lyme. En una realización, la artritis es artritis reumatoide (AR).

La presente invención incluye un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención para su uso en métodos de tratamiento o prevención de la artritis administrando a un sujeto una molécula de unión anti-CD100 de la invención, por ejemplo, MAb 2503 o MAb 67. Tales usos de la presente invención pueden reducir el dolor, hinchazón o rigidez asociada a la artritis, por ejemplo, artritis reumatoide. La presente invención para su uso en la invención también se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención para su uso en métodos de mejora del rendimiento, función y salud de las articulaciones. En algunas realizaciones de la presente invención, el tratamiento produce una disminución en las puntuaciones de gravedad de la artritis, una disminución en la gravedad de la artritis/área bajo la curva, una disminución en los parámetros de histopatología asociados a la artritis (inflamación, paño, daño al cartílago y daño al hueso), una disminución en los niveles de ácido araquidónico en suero, o una disminución en los anticuerpos anti-colágeno. En ciertas realizaciones, resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de síntomas asociados a la artritis; prevención de la artritis; retraso en la aparición de la artritis; incidencia reducida de artritis en una población; reducción del grado de la afección asociada a la artritis; estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado de la afección, trastorno o enfermedad asociada a la artritis; retraso en la aparición o ralentizamiento de la afección, trastorno o progresión de la enfermedad asociada a la artritis; mejora de la afección, trastorno o estado de enfermedad, remisión (tanto parcial como total) de la afección, trastorno o enfermedad asociada a la artritis, tanto detectable como indetectable; o potenciamiento o mejora de la afección, trastorno o enfermedad asociada a la artritis.

El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención para su uso en el método de la presente invención puede administrarse a individuos que tienen artritis o individuos que están en riesgo de desarrollar artritis. Así, en algunas realizaciones, la invención se refiere a un método de tratamiento de un sujeto que tiene articulaciones normales, articulaciones artríticas limitrofes, o cualquier articulación artrítica, comprendiendo el método administrar una molécula de unión anti-CD100 de la invención, por ejemplo, MAb 2503 o MAb 67, a un sujeto como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la presente invención puede usarse para tratar artritis crónica durante el resto de la vida del sujeto.

Según la presente invención, al menos un anticuerpo de unión anti-CD100 o fragmento de unión al antígeno del mismo, como se define en cualquier parte en el presente documento, se usa para promover una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento o prevención de una enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria. Por "respuesta terapéutica positiva" con respecto a una enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria está prevista una mejora en la enfermedad en asociación con la actividad antiinflamatoria, actividad antiangiogénica, actividad antiapoptótica, o similares, de estos anticuerpos, y/o una mejora en los síntomas asociados a la enfermedad. Es decir, puede observarse un efecto antiproliferativo, la prevención de la proliferación adicional de la célula que expresa CD100, una reducción en la respuesta inflamatoria que incluye, pero no se limita a, secreción reducida de citocinas inflamatorias, moléculas de adhesión, proteasas, inmunoglobulinas (en casos en los que la célula que lleva CD100 es un linfocito B), combinaciones de las mismas, y similares, elevada producción de proteínas antiinflamatorias, una reducción en el número de células autorreactivas, un aumento en la tolerancia inmunitaria, inhibición de la supervivencia de células autorreactivas, reducción en la apoptosis, reducción en la migración de células endoteliales, aumento en la migración de monocitos espontáneos, reducción y/o una disminución en uno o más síntomas mediados por la estimulación de CD100s o células que expresan CD100. Tales respuestas terapéuticas positivas no se limitan a la vía de administración y pueden comprender la administración al donante, el tejido del donante (tal como, por ejemplo, perfusión del órgano), el hospedador, cualquier combinación de los mismos, y similares.

Puede evaluarse la respuesta clínica usando técnicas de cribado tales como imagen por resonancia magnética (IRM), obtención de imágenes por rayos X, tomografía computerizada (CT), citometría de flujo o análisis por citometría activada por fluorescencia (FACS), histología, patología macroscópica y química de la sangre, que incluyen, pero no se limitan a, cambios detectables por ELISA, RIA, cromatografía, y similares. Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto que recibe terapia con el anticuerpo de unión anti-CD100 o fragmento de unión al antígeno del mismo puede experimentar el efecto beneficioso de una mejoría en los síntomas asociados a la enfermedad.

Los anticuerpos de unión anti-CD100 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos pueden usarse en combinación con al menos otra terapia contra el cáncer, que incluye, pero no se limita a, cirugía o procedimientos quirúrgicos (por ejemplo, esplenectomía, hepatectomía, linfadenectomía, leucoforesis, trasplante de médula ósea, y similares); radioterapia; quimioterapia, opcionalmente en combinación con trasplante autólogo de médula ósea, u otra terapia contra el cáncer; donde la terapia contra el cáncer adicional se administra antes, durante, o posterior a la terapia de anticuerpo de unión anti-CD100 o fragmento de unión al antígeno del mismo. Así, donde las terapias combinadas comprenden la administración de un anticuerpo de unión anti-CD100 o fragmento de unión al antígeno del mismo de la invención en combinación con la administración de otro agente terapéutico, como con quimioterapia, radioterapia, otras terapias contra anticuerpos del cáncer, terapia contra el cáncer basada en moléculas pequeñas, o terapia contra el cáncer basada en vacunas/inmunoterapia, los métodos de la invención engloban la coadministración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, o y la administración consecutiva en cualquier orden.

Los anticuerpos de unión anti-CD100 o fragmentos de unión de los mismos de la invención pueden usarse en combinación con cualquier terapia conocida para enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias, que incluye cualquier agente o combinación de agentes que son conocidos por ser útiles, o que se han usado o están actualmente en uso, para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias. Así, donde las terapias combinadas comprenden la administración de moléculas de unión anti-CD100 en combinación con la administración de otro agente terapéutico, la invención engloba la coadministración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden. En algunas realizaciones de la invención, los anticuerpos anti-CD100 descritos en el presente documento se administran en combinación con fármacos inmunosupresores o fármacos antiinflamatorios, en las que el anticuerpo y el (los) agente(s) terapéutico(s) pueden administrarse secuencialmente, en cualquier orden, o simultáneamente (es decir, simultáneamente o dentro del mismo periodo de tiempo).

En algunas otras realizaciones, los anticuerpos de unión anti-CD100 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención pueden usarse solos o en combinación con fármacos inmunosupresores para tratar y/o prevenir la artritis reumatoide. Así, en algunas realizaciones donde los anticuerpos anti-CD100 de la invención se usan para tratar artritis reumatoide, los anticuerpos pueden usarse en combinación con fármacos inmunosupresores adecuados. Como se trata anteriormente, la eficacia del tratamiento puede evaluarse usando cualquier medio e incluye, pero no se limita a, eficacia como se mide por respuestas clínicas definidas por los criterios del Colegio Estadounidense de Reumatología, los criterios de la Liga Europea contra el Reumatismo, o cualquier otro criterio.

Véanse, por ejemplo, Felson et al., *Arthritis. Rheum.* 38:727-35 (1995) y van Gestel et al., *Arthritis Rheum.* 39:34-40 (1996).

5 En aún otras realizaciones, los anticuerpos anti-CD100 de la invención pueden usarse solos o en combinación con fármacos inmunosupresores para tratar y/o prevenir la esclerosis múltiple. Así, en algunas realizaciones donde los anticuerpos anti-CD100 de la invención se usan para tratar esclerosis múltiple, los anticuerpos pueden usarse en combinación con fármacos inmunosupresores adecuados.

10 Una realización adicional de la invención es el uso de anticuerpos de unión anti-CD100 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos para la monitorización diagnóstica de niveles de proteína en tejido como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. Por ejemplo, la detección puede facilitarse acoplando el anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aecuorina; y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

VIII. Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

20 Métodos de preparación y administración de los anticuerpos de unión anti-CD100, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos de la invención a un sujeto en necesidad de los mismos son muy conocidos o son fácilmente determinados por aquellos expertos en la materia. La vía de administración del anticuerpo de unión anti-CD100, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, puede ser, por ejemplo, oral, parenteral, por inhalación o tópica. El término parenteral, como se usa en el presente documento incluye, por ejemplo, administración intravenosa, intrarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Aunque todas estas formas de administración son claramente contempladas como que están dentro del alcance de la invención, un ejemplo de una forma para administración sería una disolución para inyección, en particular para inyección intravenosa o intrarterial o goteo. Normalmente, una composición farmacéutica adecuada para inyección puede comprender un tampón (por ejemplo, tampón acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato), opcionalmente un agente estabilizador (por ejemplo, albúmina humana), etc. Sin embargo, en otros métodos compatibles con las enseñanzas en el presente documento, pueden administrarse anticuerpos de unión anti-CD100, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, de la invención directamente al sitio de la población celular adversa, aumentado así la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

35 Como se trata en el presente documento, anticuerpos de unión anti-CD100, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, de la invención pueden administrarse en una cantidad farmacéuticamente eficaz para el tratamiento *in vivo* de enfermedades mediadas por células que expresan CD100 tales como ciertos tipos de cánceres, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias que incluyen enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central (SNC) y del sistema nervioso periférico (SNP), y angiogénesis invasiva. A este respecto, se apreciará que las moléculas de unión desveladas de la invención se formularán para facilitar la administración y promover la estabilidad del agente activo. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas según la presente invención comprenden un vehículo estéril farmacéuticamente aceptables no tóxico tal como solución salina fisiológica, tampones no tóxicos, conservantes y similares. Para los fines de la presente solicitud, una cantidad farmacéuticamente eficaz de un anticuerpo de unión anti-CD100, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, conjugado o sin conjugar, debe mantenerse que significa una cantidad suficiente para lograr la unión eficaz a una diana y para lograr un beneficio, por ejemplo, para mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno o para detectar una sustancia o una célula.

50 Las composiciones farmacéuticas usadas en la presente invención comprenden vehículos farmacéuticamente aceptables que incluyen, por ejemplo, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas del suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y lanolina.

60 Preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Vehículos acuosos incluyen, por ejemplo, agua, disoluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen solución salina y medios tamponados. En la invención objeto, vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, tampón

fosfato 0,01-0,1 M y preferentemente 0,05 M o 0,8 % de solución salina. Otros vehículos parenterales comunes incluyen disoluciones de fosfato de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato, o aceites no volátiles. Vehículos intravenosos incluyen reforzadores de fluidos y de nutrientes, reforzadores de electrolitos, tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes, y similares.

Más particularmente, composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles (donde son solubles en agua) y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En tales casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y preferentemente se preservará contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, usando un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y usando tensioactivos. Formulaciones adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos desvelados en el presente documento se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16ª ed. (1980).

La prevención de la acción de microorganismos pueden lograrse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, o cloruro sódico en la composición. Puede provocarse la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En cualquier caso, pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando un compuesto activo (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD100, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, por sí mismo o en combinación con otros agentes activos) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de componentes enumerados en el presente documento, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío y liofilización, que da un polvo de un principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una disolución previamente esterilizada por filtración del mismo. Las preparaciones para inyecciones se procesan, envasan en recipientes tales como ampollas, bolsas, botellas, jeringas o viales, y se sellan bajo condiciones asépticas según métodos conocidos en la técnica. Además, las preparaciones pueden envasarse y comercializarse en forma de un kit tal como aquellos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. N.º de serie 09/259.337. Tales artículos de fabricación preferentemente tendrán etiquetas o prospectos que indican que las composiciones asociadas son útiles para tratar un sujeto que padece, o predispuesto a una enfermedad o trastorno.

Las formulaciones parenterales pueden ser una dosis en bolo única, una infusión o una dosis de bolo de carga seguida de una dosis de mantenimiento. Estas composiciones pueden administrarse a intervalos fijos o variables específicos, por ejemplo, una vez al día, o en una base "según se necesite".

Ciertas composiciones farmacéuticas usadas en la presente invención pueden administrarse por vía oral en una forma de dosificación aceptable que incluye, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, suspensiones o disoluciones acuosas. Ciertas composiciones farmacéuticas también pueden administrarse por aerosol nasal o inhalación. Tales composiciones pueden prepararse como disoluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

La cantidad de un anticuerpo de unión anti-CD100, o fragmento, variante, o derivado del mismo, que puede combinarse con los materiales de vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del hospedador tratado y el modo de administración particular. La composición puede administrarse como una dosis única, dosis múltiple o durante un periodo de tiempo establecido en una infusión. Los regímenes de dosificación también pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica).

De acuerdo con el alcance de la presente divulgación, pueden administrarse anticuerpos anti-CD100, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, de la invención a un ser humano u otro animal según los métodos anteriormente mencionados de tratamiento en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico. Los anticuerpos anti-CD100, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, de la invención pueden administrarse a tal ser humano u otro animal en una forma de dosificación convencional preparada combinando el anticuerpo de la invención con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable convencional según técnicas conocidas. Se reconocerá por un experto en la materia que la forma y carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable está impuesto por la cantidad de principio activo con la que va a combinarse,

la vía de administración y otras variables muy conocidas. Aquellos expertos en la materia apreciarán además que una mezcla que comprende una o más especies de moléculas de unión anti-CD100, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, de la invención puede demostrar ser particularmente eficaz.

- 5 Por "dosis o cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" está previsto una cantidad de anticuerpo de unión anti-CD100 o fragmento de unión al antígeno del mismo que, cuando se administra provoca una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un paciente con una enfermedad que va a tratarse.

10 Dosis terapéuticamente eficaces de las composiciones de la presente invención, para el tratamiento de enfermedades mediadas por células que expresan CD100 tales como ciertos tipos de cánceres, por ejemplo, cánceres de cabeza y cuello, próstata, colon, mama y de pulmón; enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, artritis, esclerosis múltiple, enfermedades inflamatorias que incluyen enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central (SNC) y del sistema nervioso periférico (SNP); y angiogénesis invasiva, varían dependiendo de muchos factores diferentes, que incluyen medios de administración, sitio diana, estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o un animal, otras medicaciones administradas, y si tratamiento es profiláctico o terapéutico.

15 Normalmente, el paciente es un ser humano, pero también pueden tratarse mamíferos no humanos que incluyen mamíferos transgénicos. Pueden valorarse dosificaciones de tratamiento usando métodos rutinarios conocidos para aquellos expertos en la materia para optimizar la seguridad y eficacia.

20 La cantidad de al menos un anticuerpo de unión anti-CD100 o fragmento de unión del mismo, que va a administrarse es fácilmente determinada por un experto habitual en la materia sin excesiva experimentación dada la divulgación de la presente invención. Factores que influyen en el modo de administración y la cantidad respectiva de al menos un anticuerpo de unión anti-CD100, fragmento de unión al antígeno, variante o derivado del mismo incluyen, pero no se limitan a, la gravedad de la enfermedad, la historia de la enfermedad y la edad, altura, peso, salud y estado físico del individuo que recibe la terapia. Similarmente, la cantidad de anticuerpo de unión anti-CD100, o fragmento, variante, o derivado del mismo, que va a administrarse dependerá del modo de administración y si el sujeto recibirá una dosis

25 única o múltiples dosis de este agente.

La presente invención también proporciona el uso de un anticuerpo de unión anti-CD100 o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria, que incluye, por ejemplo, artritis, esclerosis múltiple, enfermedades inflamatorias del SNC y SNP, o un cáncer.

30 La invención también proporciona el uso de un anticuerpo de unión anti-CD100 de la invención, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, en la fabricación de un medicamento para tratar un sujeto para tratar una enfermedad autoinmunitaria y/o enfermedad inflamatoria, o para tratar un cáncer, en la que el medicamento se usa en un sujeto que ha sido pretratado con al menos otra terapia. Por "pretratado" o "pretratamiento" se pretende que el sujeto haya recibido una o varias de otras terapias (por ejemplo, ha sido tratado

35 con al menos otra terapia contra el cáncer) antes de recibir el medicamento que comprende el anticuerpo de unión anti-CD100 o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo. "Pretratado" o "pretratamiento" incluye sujetos que han sido tratados con al menos otra terapia en el plazo de 2 años, en el plazo de 18 meses, en el plazo de 1 año, en el plazo de 6 meses, en el plazo de 2 meses, en el plazo de 6 semanas, en el plazo de 1 mes, en el plazo de 4 semanas, en el plazo de 3 semanas, en el plazo de 2 semanas, en el plazo de 1 semana, en el plazo de 6 días, en el plazo de 5 días, en el plazo de 4 días, en el plazo de 3 días, en el plazo de 2 días, o incluso en el plazo de 1 día antes del inicio del tratamiento con el medicamento que comprende la molécula de unión anti-CD100, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 2503 desvelado en el presente documento, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo. No es necesario que el sujeto sea un respondedor al pretratamiento con la terapia o terapias previas. Así, el sujeto que recibe el medicamento que comprende el anticuerpo de unión anti-CD100 o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, podría haber respondido, o podría haber dejado de responder (por ejemplo, el cáncer era resistente), al pretratamiento con la terapia previa, o a una o más de las terapias previas donde el pretratamiento comprendía múltiples terapias. Ejemplos de otras terapias contra el cáncer para que un sujeto pueda haber recibido pretratamiento antes de recibir el medicamento que comprende el anticuerpo de unión anti-CD100 o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, incluyen, pero no se limitan a, cirugía; radioterapia; quimioterapia, opcionalmente en combinación con trasplante autólogo de médula ósea, donde agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, aquellos enumerados en el presente documento anteriormente; otra terapia de anticuerpos monoclonales contra el cáncer; terapia contra el cáncer basada en moléculas pequeñas, que incluye, pero no se limita a, las moléculas pequeñas enumeradas en el presente documento anteriormente; terapias contra el cáncer basadas en vacunas/inmunoterapia; terapia con esteroides; otra terapia contra el cáncer; o cualquier combinación de las mismas.

50

55

IX. Diagnósticos

La invención proporciona además los anticuerpos anti-CD100 de la invención y fragmentos de unión al antígeno de los mismos para su uso en un método de diagnóstico útil durante el diagnóstico de enfermedades mediadas por células que expresan CD100 tales como ciertos tipos de cánceres, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias que incluyen, por ejemplo, artritis, esclerosis múltiple, enfermedades inflamatorias del sistema nervioso

60

central (SNC) y del sistema nervioso periférico (SNP) y angiogénesis invasiva, que implica medir el nivel de expresión de la proteína CD100 o transcrito en tejido u otras células o líquido corporal de un individuo y comparar el nivel de expresión medido con un nivel de expresión de CD100 patrón en tejido normal o líquido corporal, por lo que un aumento en el nivel de expresión en comparación con el patrón es indicativo de un trastorno.

- 5 Los anticuerpos anti-CD100 de la invención y fragmentos de unión al antígeno, variantes, y derivados de los mismos, pueden usarse para ensayar niveles de proteína CD100 en una muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos conocidos para aquellos expertos en la materia (por ejemplo, véase Jalcanon, et al., J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalcanon et al., J. Cell Biol. 105:3087-3096 (1987)). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión de proteínas CD100 incluyen inmunoensayos, tales como el
10 enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), inmunoprecipitación, o transferencia Western. Ensayos adecuados se describen en más detalle en cualquier parte en el presente documento.

Por "ensayar el nivel de expresión del polipéptido CD100" está previsto medir o estimar cualitativamente o cuantitativamente el nivel del polipéptido CD100 en una primera muestra biológica ya sea directamente (por ejemplo, determinando o estimando el nivel de proteína absoluto) o relativamente (por ejemplo, comparando con el nivel de polipéptido asociado a la enfermedad en una segunda muestra biológica). Preferentemente, el nivel de expresión del polipéptido CD100 en la primera muestra biológica se mide o estima y se compara con un nivel de polipéptido CD100 patrón, siendo el patrón tomado de una segunda muestra biológica obtenida de un individuo que no tiene el trastorno o que se determina promediando niveles de una población de individuos que no tiene el trastorno. Como se apreciará en la materia, una vez que se conoce el nivel de polipéptido CD100 "patrón", puede usarse repetidamente
15 como patrón para comparación.

Por "muestra biológica" está prevista cualquier muestra biológica obtenida de un individuo, línea celular, cultivo de tejido, u otra fuente de células que posiblemente expresan CD100. Métodos de obtención de biopsias de tejido y líquidos corporales de mamíferos son muy conocidos en la técnica.

X. Inmunoensayos

- 25 Pueden ensayarse anticuerpos anti-CD100, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, de la invención para unión inmuno-específica por cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (enzimoimmunoanálisis de adsorción), inmunoensayos de "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, por nombrar algunos. Tales ensayos son rutinarios y muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) Vol. 1). Inmunoensayos a modo de ejemplo se describen brevemente a continuación (pero no están previstos a modo de limitación).
30

Los protocolos de inmunoprecipitación generalmente comprenden lisar una población de células en un tampón de lisis tal como tampón RIPA (1 % de NP-40 o Triton X-100, 1 % de desoxicolato de sodio, 0,1 % de SDS, NaCl 0,15 M, fosfato de sodio 0,01 M a pH 7,2, 1 % de Trasylol) complementado con proteína fosfatasa y/o inhibidores de la proteasa (por ejemplo, EDTA, PMSF, aprotinina, vanadato de sodio), añadir el anticuerpo de interés al lisado celular, incubar durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 1-4 horas) a 4 °C, añadir perlas de proteína A y/o proteína G Sepharose al lisado celular, incubar durante aproximadamente una hora o más a 4 °C, lavar las perlas en tampón de lisis y resuspender las perlas en tampón SDS/de muestra. La capacidad del anticuerpo de interés para inmunoprecipitar un antígeno particular puede evaluarse, por ejemplo, por análisis de transferencia Western. Un experto en la materia sería conocedor de los parámetros que pueden modificarse para aumentar la unión del anticuerpo a un antígeno y disminuir el ruido de fondo (por ejemplo, aclarar previamente el lisado celular con perlas Sepharose). Para discusión adicional referente a los protocolos de inmunoprecipitación véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) Vol. 1 a 10.16.1.
35

El análisis de transferencia Western generalmente comprende preparar muestras de proteína, electroforesis de las muestras de proteína en un gel de poliacrilamida (por ejemplo, 8 %-20 % de SDS-PAGE dependiendo del peso molecular del antígeno), transferir la muestra de proteína del gel de poliacrilamida a una membrana tal como nitrocelulosa, PVDF o nailon, bloquear la membrana en disolución de bloqueo (por ejemplo, PBS con 3 % de BSA o leche desnatada), lavar la membrana en tampón de lavado (por ejemplo, PBS-Tween 20), bloquear la membrana con anticuerpo primario (el anticuerpo de interés) diluido en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado, bloquear la membrana con un anticuerpo secundario (que reconoce el anticuerpo primario, por ejemplo, un anticuerpo anti-humano) conjugado con un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) o molécula radiactiva (por ejemplo, ³²P o ¹²⁵I) diluido en tampón de bloqueo, lavar la membrana en tampón de lavado, y detectar la presencia del antígeno. Un experto en la materia sería conocedor de los parámetros que pueden modificarse para aumentar la señal detectada y para reducir el ruido de fondo. Para discusión adicional referente a los protocolos de transferencia Western véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) Vol. 1 a 10.8.1.
40
45
50
55
60

Los ELISA comprenden preparar antígeno, recubrir el pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno, añadir el anticuerpo de interés conjugado con un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) al pocillo e incubar durante un periodo de tiempo, y detectar la presencia del antígeno. En los ELISA, el anticuerpo de interés no tiene que conjugarse con un compuesto detectable; en su lugar, un segundo anticuerpo (que reconoce el anticuerpo de interés) conjugado con un compuesto detectable puede añadirse al pocillo. Además, en lugar de recubrir el pocillo con el antígeno, el anticuerpo puede recubrir al pocillo. En este caso, un segundo anticuerpo conjugado con un compuesto detectable puede añadirse tras la adición del antígeno de interés al pocillo recubierto. Un experto en la materia sería conocedor de los parámetros que pueden modificarse para aumentar la señal detectada, además de otras variaciones de ELISA conocidas en la técnica. Para discusión adicional referente a los ELISA véase, por ejemplo, Ausubel et al., eds, (1994) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., NY) Vol. 1 a 11.2.1.

La afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno y la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno pueden determinarse por ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación de antígeno marcado (por ejemplo, ^3H o ^{125}I) con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de antígeno no marcado, y la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo de interés por un antígeno particular y las constantes de disociación de la unión pueden determinarse a partir de los datos por análisis de gráficos de Scatchard. La competición con un segundo anticuerpo también puede determinarse usando radioinmunoensayos. En este caso, el antígeno se incuba con anticuerpo de interés que está conjugado con un compuesto marcado (por ejemplo, ^3H o ^{125}I) en presencia de cantidades crecientes de un segundo anticuerpo no marcado.

Pueden emplearse además anticuerpos anti-CD100, o fragmentos de unión al antígeno, variantes, o derivados de los mismos, de la invención, histológicamente, como en inmunofluorescencia, microscopía inmunoelectrónica o ensayos no inmunológicos, para la detección *in situ* de la proteína CD100 o variantes conservadas o fragmentos de péptido de la misma. La detección *in situ* puede llevarse a cabo extrayendo un espécimen histológico de un paciente, y aplicando al mismo un anticuerpo anti-CD100 marcado, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, preferentemente aplicado solapando el anticuerpo marcado (o fragmento) sobre una muestra biológica. Mediante el uso de un procedimiento tal es posible determinar no solo la presencia de proteína CD100, o variantes conservadas o fragmentos de péptido, sino también su distribución en el tejido examinado. Usando la presente invención, aquellos expertos habituales percibirán fácilmente que puede modificarse cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tales como procedimientos de tinción) con el fin de lograr tal detección *in situ*.

Inmunoensayos y no inmunoensayos para productos génicos CD100 o variantes conservadas o fragmentos de péptido de los mismos normalmente comprenderán incubar una muestra, tal como un fluido biológico, un tejido extracto, células recién recogidas, o lisados de células que han sido incubadas en cultivo celular, en presencia de un anticuerpo detectablemente marcado capaz de unirse a CD100 o variantes conservadas o fragmentos de péptido del mismo, y detectar el anticuerpo unido por cualquiera de varias técnicas muy conocidas en la técnica.

La muestra biológica puede ponerse en contacto con e inmovilizarse sobre un soporte de fase sólida o vehículo tal como nitrocelulosa, u otro soporte sólido que es capaz de inmovilizar las células, partículas de célula o proteínas solubles. El soporte puede entonces lavarse con tampones adecuados, seguido de tratamiento con el anticuerpo anti-CD100 detectablemente marcado, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo. El soporte de fase sólida puede entonces lavarse con el tampón una segunda vez para eliminar el anticuerpo sin unir. Opcionalmente, el anticuerpo se marca posteriormente. La cantidad de marca unida sobre el soporte sólido puede entonces detectarse mediante medios convencionales.

Por "soporte de fase sólida o vehículo" está previsto cualquier soporte capaz de unir un antígeno o un anticuerpo. Soportes o vehículos muy conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser cualquiera soluble de algún modo o insoluble para los fines de la presente invención. El material de soporte puede tener prácticamente cualquier configuración estructural posible, mientras que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un antígeno o anticuerpo. Así, la configuración del soporte puede ser esférica, como en una perla, o cilíndrica, con en la superficie interna de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser plana tal como una hoja, tira reactiva, etc. Soportes preferidos incluyen perlas de poliestireno. Aquellos expertos en la materia conocerán muchos otros vehículos adecuados para unir el anticuerpo o antígeno, o serán capaces de determinar los mismos usando experimentación rutinaria.

La actividad de unión de un lote dado de anticuerpo anti-CD100, o fragmento de unión al antígeno, variante, o derivado del mismo, puede determinarse según métodos muy conocidos. Aquellos expertos en la materia serán capaces de determinar condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación empleando experimentación rutinaria.

Existe una variedad de métodos disponibles para medir la afinidad de una interacción anticuerpo-antígeno, pero relativamente pocos para determinar constantes de velocidad. La mayoría de los métodos se basan en cualquier marcado de anticuerpo o antígeno, que inevitablemente complica las mediciones rutinarias e introduce incertidumbres en las cantidades medidas.

La resonancia de plasmones superficiales (SPR) como se realiza en BIACORE® ofrece varias ventajas con respecto a los métodos convencionales de medición de la afinidad de interacciones anticuerpo-antígeno: (i) no hay requisito de marcar ni el anticuerpo ni el antígeno; (ii) los anticuerpos no necesitan ser purificados de antemano, puede usarse sobrenadante de cultivo celular directamente; (iii) se permiten mediciones en tiempo real, que permiten la rápida comparación semicuantitativa de diferentes interacciones de anticuerpos monoclonales, y son suficientes para muchos fines de evaluación; (iv) puede regenerarse superficie bioespecífica de manera que una serie de diferentes anticuerpos monoclonales pueda compararse fácilmente en condiciones idénticas; (v) los procedimientos analíticos están completamente automatizados, y pueden realizarse amplias series de mediciones sin intervención del usuario. BIAApplications Handbook, versión AB (reimpreso 1998), BIACORE® código N.º BR-1001-86; BIAtechnology Handbook, versión AB (reimpreso 1998), BIACORE® código N.º BR-1001-84. Los estudios de unión basados en SPR requieren que un miembro de un par de unión se inmovilice sobre una superficie de sensor. El componente de unión inmovilizado se denomina el ligando. El componente de unión en disolución se denomina el analito. En algunos casos, el ligando se une indirectamente a la superficie mediante la unión a otra molécula inmovilizada, que se denomina la molécula de captura. La respuesta de SPR refleja un cambio en la concentración de masa en la superficie del detector a medida que los analitos se unen o se disocian.

Basándose en SPR, las mediciones de BIACORE® en tiempo real monitorizan interacciones directamente a medida que ocurren. La técnica es muy adecuada para la determinación de parámetros cinéticos. La clasificación de afinidades comparativas es simple de realizar, y tanto las constantes cinéticas como de afinidad pueden derivarse de datos de sensograma.

Cuando el analito se inyecta en un pulso discreto a través de una superficie de ligando, el sensograma resultante puede dividirse en tres fases esenciales: (i) Asociación de analito con ligando durante la inyección de muestra; (ii) Equilibrio o estado estacionario durante la inyección de muestra, donde la tasa de analito que se une está equilibrada por disociación del complejo; (iii) Disociación de analito de la superficie durante el flujo de tampón.

Las fases de asociación y disociación proporcionan información sobre la cinética de la interacción analito-ligando (k_a y k_d , las tasas de formación de complejos y disociación, $k_d/k_a=K_D$). La fase de equilibrio proporciona información sobre la afinidad de la interacción analito-ligando (K_D).

El software BIAevaluation proporciona amplios servicios para el ajuste de curva usando tanto integración numérica como algoritmos de ajuste global. Con análisis adecuado de los datos, pueden obtenerse constantes de velocidad y de afinidad separadas para la interacción a partir de simples investigaciones de BIACORE®. El intervalo de afinidades medible por esta técnica es muy amplio, oscilando de mM a pM.

La especificidad del epítipo es una característica importante de un anticuerpo monoclonal. El mapeo de epítopes con BIACORE®, a diferencia de las técnicas convencionales usando radioinmunoensayo, ELISA u otros métodos de adsorción superficial, no requiere marcado o anticuerpos purificados, y permite pruebas de especificidad multi-sitio usando una secuencia de varios anticuerpos monoclonales. Adicionalmente, pueden procesarse automáticamente grandes números de análisis.

Los experimentos de unión por pares prueban la capacidad de dos MAb para unirse simultáneamente al mismo antígeno. Los MAb dirigidos contra epítopes separados se unirán independientemente, mientras que los MAb dirigidos contra epítopes idénticos o estrechamente relacionados interferirán con la unión de los otros. Estos experimentos de unión con BIACORE® son sencillos de llevar a cabo.

Por ejemplo, puede usarse una molécula de captura para unirse al primer Mab, seguido de la adición de antígeno y segundo MAb secuencialmente. Los sensogramas revelarán: (1) cuánto del antígeno se une al primer Mab, (2) a qué grado el segundo MAb se une al antígeno unido a superficie, (3) si el segundo MAb no se une, si la inversión del orden de la prueba por parejas altera los resultados.

La inhibición de péptidos es otra técnica usadas para el mapeo de epítopes. Este método puede complementar los estudios de unión de anticuerpo por parejas, y puede relacionar epítopes funcionales con características estructurales cuando se conoce la secuencia primaria del antígeno. Se prueban péptidos o fragmentos de antígeno para la inhibición de la unión de diferentes MAb al antígeno inmovilizado. Péptidos que interfieren con la unión de un MAb dado se supone que están estructuralmente relacionados con el epítipo definido por ese MAb.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la experiencia de la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., ed. (1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual (2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) DNA Cloning, Volúmenes I y II; Gait, ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; Mullis et al., patente de EE.UU. N.º 4.683.195; Hames and Higgins, eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins, eds. (1984) Transcription And Translation; Freshney (1987) Culture Of Animal Cells (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Cloning; el tratado Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987)

Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); y en Ausubel et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

Principios generales de la manipulación de anticuerpos se exponen en Borrebaeck, ed. (1995) Antibody Engineering (2nd ed.; Oxford Univ. Press). Principios generales de la manipulación de proteínas se exponen en Rickwood et al., eds. (1995) Protein Engineering, A Practical Approach (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Principios generales de anticuerpos y unión de anticuerpo-hapteno se exponen en: Nisonoff (1984) Molecular Immunology (2ª ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); y Steward (1984) Antibodies, Their Structure and Function (Chapman and Hall, New York, N.Y.). Adicionalmente, métodos estándar en inmunología conocidos en la técnica y no descritos específicamente son generalmente seguidos como en Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Stites et al., eds. (1994) Basic and Clinical Immunology (8ª ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) y Mishell and Shiigi (eds) (1980) Selected Methods in Cellular Immunology (W.H. Freeman and Co., NY).

Trabajos de referencia estándar que exponen principios generales de inmunología incluyen Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley & Sons, NY); Kennett et al., eds. (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" en Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, ed. Burden et al., (Elsevier, Amsterdam); Goldsby et al., eds. (2000) Kuby Immunology (4ª ed.; H. Freeman & Co.); Roitt et al. (2001) Immunology (6ª ed.; London: Mosby); Abbas et al. (2005) Cellular and Molecular Immunology (5ª ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann and Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlag); Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall 2003); Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach and Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press).

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Selección y caracterización de anticuerpos específicos para CD100

Anticuerpos anti-CD100 de ratón que reconocen CD100 humana, de mono y murina y se generaron usando los métodos descritos a continuación.

La línea celular "Línea 1" derivó de un tumor de pulmón espontáneo en un ratón BALB/c. Los inventores mostraron previamente que inyectar ratones BALB/c con las células vivas de la Línea 1 transfectadas con un ADNc foráneo era una forma eficaz de inducir respuestas inmunitarias (datos no publicados). Se transfectó la línea celular Línea 1 con un plásmido de expresión que codificaba ADNc de CD100 humana de longitud completa (SEQ ID NO: 23). Se aisló una línea estable que expresaba CD100 humana de la línea celular transfectada (Línea1.CD100). Se sensibilizaron ratones deficientes en CD100 (ruido de fondo de BALB/c, véase Kumanogoh et al., J. Immunol. 169:1175-1181 (2002)) por inmunización con CD100 de ratón purificada-His (el dominio extracelular de CD100 de ratón con una marca 6X His del extremo C para la purificación) emulsionada en adyuvante completo de Freund (CFA). Una semana tras esta inmunización, los ratones se inyectaron por vía intramuscular (i.m.) con 200.000 células Línea1.CD100 vivas. Diecinueve días después de la inyección de Línea1.CD100, los ratones se sacrificaron y se recogieron los bazo y se fusionaron con el componente de fusión P3X63Ag8.653 (ATCC N.º CRL-1580) siguiendo procedimientos convencionales para generar hibridomas. Los clones de hibridoma se cribaron por ELISA para unirse a CD100 humana y de ratón. En particular, se preparó una línea celular de hibridoma, específica para MAb 67, usando tecnología de hibridomas (Kohler et al., Nature 256:495 (1975); Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:511 (1976); Kohler et al., Eur. J. Immunol. 6:292 (1976); Hammerling et al., en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., pp. 571-681 (1981)). Se generó un gran panel de anticuerpos específicos de CD100 de ratón. La mayoría de estos anticuerpos también se unieron con alta afinidad a CD100 humana. Dos hibridomas, clones 67-2 y 76-1, produjeron anticuerpos monoclonales (llamados MAb 67 y MAb 76, respectivamente) que presentaron alta afinidad para tanto CD100 de ratón como humana (**Véase la Tabla 2**).

Tabla 2. Mediciones de afinidad por MAb anti-CD100 de ratón

| MAb | Isotipo | Afinidad por CD100 de ratón (nM)* | Afinidad por CD100 humana (nM)* |
|-----|---------|-----------------------------------|---------------------------------|
| 67 | IgG1 | 1,00 | 5,7 |
| 76 | IgG2b | 0,33 | 0,12 |

* La afinidad se midió usando la tecnología de resonancia de plasmones superficiales BIACORE®

Un ELISA de bloqueo cruzado de anticuerpos demostró que MAb 67 y MAb 76 reconocen distintos epítopes sobre CD100. Además, los MAb 67 y 76 reconocen un epítipo que es distinto del reconocido por el anticuerpo anti-CD100 humana independientemente derivado murino BD16 (descrito en el documento US 2008/0219971 A1). Así, se generaron dos anticuerpos anti-CD100 de ratón independientes, MAb 76 (véanse SEQ ID NO: 25-40) y MAb 67 (véanse SEQ ID NO: 3-8; 10; 11-16; 18; 20 y 22).

Ejemplo 2

MAbs 67 y 76 bloquean la actividad de CD100 de ratón y humana *in vitro*

Se cribaron anticuerpos específicos CD100 para su capacidad para inhibir la unión de CD100 en un ensayo de bloqueo de fluorescencia. Una ilustración del método usado para probar si los anticuerpos específicos de CD100 bloquearon o no que CD100 se uniera a plexina B1 se muestra en la **Figura 1**. Se transfectaron células 293 humanas con ADNc que codifica un receptor de CD100: plexina B1. Se seleccionó una línea celular estable que expresa plexina B1 (293/plexina). Se detectó CD100-His unido a plexina B1 sobre la superficie celular por citometría de flujo usando un anticuerpo monoclonal específico de marca de His conjugada con biotina y estreptavidina-APC. Cuando un MAb anti-CD100 probado fue capaz de bloquear la unión de CD100 a plexina B1, entonces se detectó menos CD100-His sobre la célula, produciendo fluorescencia más baja.

Se incubaron cuarenta nanogramos (ng) de CD100 humana o de ratón-His (marca de His del extremo C) solo o con diversas concentraciones de MAb anti-CD100 durante la noche a 4 °C. A la mañana siguiente, se combinó o bien (1) CD100 solo o bien (2) CD100 pre-incubado con un MAb anti-CD100 (67 o 76) con las células 293/plexina y se incubaron durante 30 minutos sobre hielo. La CD100 que se unió a la célula mediante plexina B1 se detectó usando MAb anti-His de conejo policlonal biotinilado, seguido de estreptavidina-APC, y las células se analizaron por citometría de flujo. Los resultados indicaron que la neutralización de CD100 produjo fluorescencia más baja. En particular, la pre-incubación de CD100 con MAb 67 o MAb 76 produjo fluorescencia más baja en comparación con CD100 solo (**Figura 2**). El aumentar la concentración de MAb anti-CD100 67 o 76 de 0,156 µg/ml a 0,625 µg/ml produjo una reducción adicional en la fluorescencia. También se observó bloqueo similar de CD100 humana (datos no mostrados). Así, estos resultados mostraron que MAb 67 y MAb 76 fueron ambos capaces de bloquear que CD100 humana y de ratón se unieran a plexina B1.

Se ha mostrado que la señalización de CD100/plexina B1 induce el desprendimiento de la matriz extracelular y el colapso celular, induciendo la reorganización de los filamentos de actina (véase Kruger et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology 6:789-800 (2005)). Se usó un ensayo heterólogo para determinar el desprendimiento celular tras la unión a una matriz extracelular para determinar si los anticuerpos anti-CD100 podrían bloquear o no el desprendimiento inducido por CD100 de células 293/plexina de placas recubiertas con fibronectina.

Para el ensayo de desprendimiento de células, se sembraron células 293/plexina (normalmente cultivadas como una línea celular en suspensión) a una densidad de 40.000 células/pocillo sobre una placa recubierta con fibronectina de 96 pocillos y se dejó que se unieran durante la noche. Se incubaron dos (2) µg/ml de CD100 de ratón-His (marca de His del extremo C) solo o con diversas concentraciones de un MAb anti-CD100 (67 o 76) durante 6 horas a 4 °C. Entonces se llevaron muestras de CD100 hasta temperatura ambiente antes de la adición a las células 293/plexina. Las células se trataron con CD100 o CD100 pre-incubadas con anticuerpo durante 30 minutos a 37 °C, se lavaron dos veces con PBS y se tiñeron con cristal violeta durante 15 minutos. Entonces, las células se lavaron dos veces con PBS y se secaron. Se tomaron imágenes en un escáner para documentación. El cristal violeta se solubilizó entonces durante 15 minutos a TA con 100 µl de ácido acético glacial al 33 %, y se pipeteó en una placa nueva. La absorbancia se leyó a 570 nm. La CD100 produce una reducción en el número de células unidas a la placa, y así una absorbancia reducida, mientras que la neutralización de CD100 produce un aumento en la absorbancia.

Como se muestra en la **Figura 3**, tanto MAb 67 como MAb 76 fueron capaces de bloquear el desprendimiento de células mediado por CD100 de ratón y aumentar la absorbancia en comparación con el control de isotipo. Similarmente, ambos MAb también fueron capaces de bloquear el desprendimiento de células mediado por CD100 humana (datos no mostrados).

Los MAb 67 y 76 bloquearon la unión de CD100 a la plexina B1 de superficie celular e indujeron el desprendimiento de células 293/plexina de las placas recubiertas con fibronectina. Los resultados de los ensayos funcionales *in vitro*

descritos anteriormente mostraron que MAb 67 y MAb 76 fueron capaces de bloquear la función CD100 de ratón y humana *in vitro*.

Ejemplo 3

Evaluación de anticuerpos monoclonales anti-CD100 en modelos de enfermedad de ratón

- 5 Se probaron anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-CD100 (76 y 67) *in vivo* en el modelo animal de EAE de SJL. La encefalomiелitis autoinmunitaria experimental recidivante (EAE-R) es un enfermedad mediada por linfocitos T CD4+ caracterizada por inflamación y desmielinización dentro del sistema nervioso central. En ratones SJL, la EAE-R puede inducirse por inmunización con un epítipo de péptido de la proteína de proteolípid (PLP₁₃₉₋₁₅₁) (HSLGKWLGHDPKF; SEQ ID NO: 24). Este modelo se caracteriza por una fase parálitica aguda de moderada a grave, seguida de remisión y posteriores recaídas. La gravedad de la enfermedad se puntuó usando la escala mostrada en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Evaluación de los signos clínicos de EAE

| Puntuación | Signos | Descripción |
|------------|---------------------------|---|
| 0 | Comportamiento normal | Sin signos neurológicos. |
| 1 | Cola flexible distal | La parte distal de la cola es flexible y está caída. |
| 1,5 | Cola flexible completa | La cola completa está suelta y caída. |
| 2 | Reflejo de enderezamiento | El animal tiene dificultades darse la vuelta cuando está tumbado sobre su lomo. |
| 3 | Ataxia | Caminar tambaleante - cuando el ratón camina las patas traseras son inestables. |
| 4 | Parálisis temprana | El ratón tiene dificultades para ponerse sobre sus patas traseras, pero todavía tiene restos de movimiento. |
| 5 | Parálisis completa | El ratón no puede mover sus patas en absoluto, parece más delgado y consumido. |
| 6 | Moribundo/Muerte | Muerte. |

- 15 Se inmunizaron ratones SJL con 100 µg de PLP₁₃₉₋₁₅₁ en CFA. Se administró toxina de Pertussis en el día 0 y otra vez 48 horas después. Los ratones se trataron con 30 mg/kg de MAb 76, 67 o anticuerpo de control de isotipo dos veces por semana empezando en el Día 0, o una vez por semana empezando en el Día 7. La puntuación de signos clínicos de EAE se inició a partir del 10º día después de la inducción de EAE.

- 20 Como se muestra en la **Figura 4A**, el tratamiento con MAb 76 o MAb 67 redujo la gravedad de EAE en ratones SJL en comparación con el control de IgG de ratón. El porcentaje de reducción en la puntuación media del grupo (GMS) entre el Día 21 y el final del estudio para MAb 76 y 67 a 1X/semana y 2x/semana se muestra cada uno en la **Figura 4B**. Como se muestra en la **Figura 4B**, MAb 76 (1X/semana) tuvo un porcentaje de inhibición de GMS del 35-40 %; MAb 67 (1X/semana) tuvo un porcentaje de inhibición de GMS del 65-70 %; MAb 76 (2X/semana) tuvo un porcentaje de inhibición de GMS del 40-50 %; y MAb 67 (2X/semana) tuvo un porcentaje de inhibición de GMS del 45-50 %. Estos resultados muestran que tanto MAb 67 como MAb 76 atenuaron la EAE de remisión recidivante en ratones SJL.

- 25 El estudio de EAE de SJL se repitió usando MAb 76 a 30 mg/kg de dosis y dosificando 1X/semana. Los resultados demostraron además que MAb 76 era capaz de reducir la gravedad de EAE en ratones SJL en comparación con IgG de ratón (datos no mostrados). El porcentaje de reducción en la puntuación media del grupo (GMS) entre el Día 21 y el final del estudio estuvo entre el 50-60 %. Además, se repitió el estudio de EAE de SJL usando MAb 76 o MAb 67 a 30 mg/kg dosificando 1X/semana. El tratamiento con MAb 67 o MAb 76 produjo un porcentaje de reducción en GMS de entre el 30-40 % entre el Día 18 y el final del estudio. Los resultados en la **Figura 5A** y **5B** demuestran además que MAb 76 y MAb 67 fueron capaces de reducir la gravedad de EAE en ratones SJL.

- 35 El estudio de EAE de SJL se repitió usando MAb 67 a 30 mg/kg dosificando 1X/semana donde el tratamiento empezó en el Día 7 después de la inmunización. El tratamiento con MAb 67 a partir del Día 7 produjo un porcentaje de reducción en GMS de aproximadamente el 50 % entre el Día 12 y el final del estudio. Los resultados se muestran en la **Figura 6**.

Los resultados de estos estudios *in vivo* demuestran que la neutralización de CD100 usando MAb 76 o MAb 67 redujo los signos clínicos de EAE en diferentes experimentos de EAE murina. Los resultados para MAb 76 y MAb 67 fueron similares entre sí en estos experimentos.

5 Estos resultados demostraron que MAb 76 y MAb 67 tienen la capacidad de bloquear la actividad de CD100 *in vitro*, y, lo que es más importante, la capacidad de reducir la gravedad de EAE en diferentes experimentos de dosis en el modelo de EAE de ratón.

Ejemplo 4

Preparación de anticuerpos monoclonales anti-CD100 quiméricos y humanizados

10 Se ha mostrado que el clon 67 del anticuerpo monoclonal murino, descrito anteriormente, tiene la capacidad de neutralizar tanto CD100 humana como de ratón *in vitro* y de mejorar EAE en modelos murinos *in vivo*.

Se clonaron los genes pesados variables (VH) y ligeros variables (VK) a partir del hibridoma del clon 67 y se determinó su secuencia. Las secuencias de aminoácidos de los genes VH y VK de MAb 67 se muestran a continuación con las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 subrayadas.

VH de MAb 67:

15 QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFSDYYMHVWKQSPENSLEWIGQINPTT
GGASYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEESAVYYCTRYYYGRHFDVW
 GQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 10)

VK de MAb 67:

DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYA
ASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQOSNEDPYTFGGGTKLEI
 K (SEQ ID NO: 18)

20 Se clonó el gen VH de MAb 67 en un vector de expresión de mamífero que contenía la secuencia codificante de la región constante de la cadena pesada gamma 4, creando una cadena pesada quimérica de longitud completa. Se clonó VK de MAb 67 en un vector de expresión de mamífero que tenía la secuencia codificante de la región constante kappa humana, creando una cadena ligera quimérica de longitud completa. Con el fin de preparar un anticuerpo quimérico, los vectores de expresión que contenían la cadena pesada quimérica y la cadena ligera quimérica se co-transfectaron en células CHO-S. El anticuerpo monoclonal que se produjo se secretó de las células y se recogió después de un periodo de expresión 3 - 6 días. El MAb resultante se purificó usando cromatografía en proteína A y se caracterizó. Se demostró que el MAb quimérico resultante (MAb 2368) era específico para CD100 por citometría de flujo y por ELISA, y se mostró que era capaz de competir con MAb 67 murino para unirse a CD100. Conjuntamente, estos datos demuestran que se aislaron los genes VH y VK correctos que codifican el MAb 67.

30 Se usaron las regiones CDR variables de MAb 67 para crear un anticuerpo monoclonal humanizado. Los genes VH y VK humanizados fueron respectivamente clonados en vectores que contenían los dominios constantes gamma 4 humana y kappa humana. El emparejamiento de VH humanizado y VK humanizado creó IgG4/ MAb 2503 kappa. Las secuencias de aminoácidos de VH (H2160) y VK (L553) de MAb 67 humanizado se muestran a continuación con las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 subrayadas.

Secuencia de H2160:

35 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYSFSDYYMHVWRQAPGQGLEWMGQIN
PTTGGASYNQKFKGKATITVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYYYGRHFD
VWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 9)

Secuencia de L553:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYA
ASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQOSNEDPYTFGQGTKLEI
 K (SEQ ID NO: 17)

40 Se clonaron polinucleótidos que codifican regiones VH (gen de la inmunoglobulina humana con gamma humana; H2160) y VK (gen de la inmunoglobulina humana con kappa humana; L553) de anticuerpo MAb 2503 en vectores pCMV-Script (Stratagene) y se depositaron en la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") el 7 de mayo de 2009, y se les dio los Números de depósito de ATCC PTA-10004 y PTA-10005, respectivamente. La ATCC está ubicada 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EE.UU. Los depósitos de ATCC se hicieron conforme a los términos del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para fines del procedimiento de patente.

Ejemplo 5

Caracterización del anticuerpo monoclonal anti-CD100 humanizado 2503

5 Se caracterizó la especificidad de MAb 2503 por ELISA y citometría de flujo. Se probó MAb 2503 en un ensayo de competición de epítotope con MAb 67 y en un ensayo de determinación de afinidad usando la tecnología de resonancia de plasmones superficiales BIACORE®.

10 Se determinaron la especificidad por epítotope de MAb 2503 y MAb 67 por ELISA de competición. Para el protocolo de ELISA, se recubrió una placa de ELISA con CD100-Fc. Se valoraron MAb 67 de ratón o 2503 humanizado. Se dejó que los anticuerpos se unieran a CD100 y se lavó el anticuerpo sin unir. Se añadió MAb 67 biotinilado. Se dejó que los anticuerpos se unieran a CD100 y se lavó el anticuerpo sin unir. Se detectó MAb 67 biotinilado unido a CD100 usando estreptavidina-HRP. Se analizó la capacidad de MAb 2503 o MAb 67 para bloquear la unión de 67 biotinilado a CD100 humana (mostrado en la **Figura 7A**) y CD100 de ratón (mostrado en la **Figura 7B**) por ELISA.

15 Se determinaron afinidades de unión de MAb anti-CD100 usando la tecnología de resonancia de plasmones superficiales BIACORE®. MAb 2503 mostró que solo se unía a CD100 (humana, de ratón y tití) y líneas celulares que expresaban CD100, que indica que MAb 2503 es específico para CD100. MAb 2503 mostró una elevada afinidad por CD100 humana y de ratón en comparación con MAb 67. Un resumen de las características de afinidad de MAb 2503 y MAb 67 se presenta a continuación en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Afinidades de MAb anti-CD100 por CD100 humana, de tití y de ratón

| MAb | Afinidad por CD100 humana (nM)* | Afinidad por CD100 de tití (nM)* | Afinidad por CD100 de ratón (nM)* |
|------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| 67 | 5,1 | 2,7 | 1,3 |
| 2503 | 5,4 | 2,4 | 1,5 |

* La afinidad se midió usando la tecnología de resonancia de plasmones superficiales BIACORE®

20 Estos ensayos muestran que MAb 2503 es específico de CD100 y se une al mismo epítotope que MAb 67 de ratón. Se mostró que MAb 2503 se unía a tanto CD100 de ratón como humana, así una ventaja de MAb 2503 es que puede probarse para seguridad y eficacia en ratones y también en seres humanos. Además, se mostró que MAb 2305 se unía a CD100 humana, de mono y de ratón.

Ejemplo 6

MAb 2503 bloquea la actividad de CD100 de ratón y humana *in vitro*

25 Se probó MAb 2503 para la capacidad para bloquear la función de CD100 usando los ensayos descritos anteriormente en el Ejemplo 2, que incluye (1) el ensayo de bloqueo de citometría de flujo y (2) el ensayo de desprendimiento de células.

30 Se cribaron anticuerpos específicos de CD100, MAb 67 y MAb 2503, para su capacidad para inhibir la unión de CD100 a plexina B1 en un ensayo de bloqueo de fluorescencia. El método usado para probar si los anticuerpos específicos de CD100 bloquearon que CD100 se uniera a plexina B1 se mostró en la **Figura 1** (Ejemplo 2). El preincubar CD100 con MAb 67 o MAb 2503 produjo fluorescencia más baja en comparación con CD100 solo. MAb 2503 fue capaz de bloquear la unión de CD100 humana (véase la **Figura 8A**), tití (véase la **Figura 8B**) y ratón (véase la **Figura 8C**) *in vitro*. Así, estos resultados mostraron que MAb 67 y MAb 2503 fueron ambos capaces de bloquear que CD100 humana, de mono y de ratón se una a plexina B1.

35 Se determinó la capacidad de MAb anti-CD100 para bloquear el desprendimiento mediado por CD100 humana y de mono de células 293/plexina de una placa recubierta con fibronectina usando el ensayo de desprendimiento de células descrito en el Ejemplo 2. CD100 produce una reducción en el número de células unidas a la placa, y así una absorbancia reducida. La neutralización de CD100 humana y CD100 de tití con MAb 2503 o MAb 67 produjo un aumento en la absorbancia como se muestra en las **Figuras 9A** y **9B**, respectivamente. MAb 2503 y MAb 67 también neutralizaron CD100 de ratón en este ensayo (datos no mostrados).

40 MAb 2503 bloqueó la unión de CD100 humana, de ratón y mono a plexina B1 de superficie celular e indujo el desprendimiento de células 293/plexina de placas recubiertas con fibronectina. Así, estos resultados muestran que MAb 2503 fue capaz de neutralizar funcionalmente CD100 humana, de ratón y de mono.

Ejemplo 7

El anticuerpo anti-CD100 inhibe la angiogénesis *in vivo*

CD100 es una potente molécula pro-angiogénica y la activación de plexina B1 mediante la unión de CD100 transactiva c-Met y promueve la capacidad invasiva de células tumorales y promueve la angiogénesis.

5 Para demostrar el efecto *in vivo* de la ausencia de CD100 sobre el crecimiento tumoral, se inyectaron células tumorales CT26 en el músculo de la pata de ratones Balb/c no mutados o CD100^{-/-} y se midió el crecimiento tumoral resultante. Como se muestra en la **Figura 10**, disminuyó el volumen tumoral en ratones CD100^{-/-} en comparación con ratones Balb/c no mutados en este estudio. Estos resultados demostraron que una línea de células de cáncer de colon de ratón (CT26) tiene crecimiento alterado en un entorno que carece de CD100.

10 A continuación, se probó la capacidad de MAb 67 para reducir el crecimiento de células tumorales CT26 en ratones Balb/c no mutados. Se inyectaron células tumorales CT26 en el músculo de la pata de ratones Balb/c no mutados (n =48) o CD100^{-/-} (n=9). Tras la inyección, los ratones no mutados se dividieron en 2 grupos de 24 ratones cada uno. Un grupo se trató empezando en el día 1 por inyección i.p. con 1 mg de MAb 67, y el otro grupo se trató por inyección i.p. con 1 mg de IgG de ratón. Los tratamientos se repitieron cada 7 días. Los ratones se analizaron para crecimiento tumoral. Como se muestra en la **Figura 11**, el tratamiento con MAb 67 redujo el crecimiento de tumores CT26 en ratones Balb/c en comparación con el grupo de control de IgG de ratón.

15

Así, estos resultados muestran que un anticuerpo que tiene las características estructurales y funcionales de MAb 67 redujo el crecimiento tumoral *in vivo*.

Ejemplo 8

20 **El anticuerpo anti-CD100 inhibe la artritis inducida por colágeno *in vivo***

Se probó MAb 67 para su capacidad para reducir la artritis en el modelo de ratón de artritis inducida por colágeno (CIA). El modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) es un modelo de inflamación animal preclínico de artritis reumatoide (AR) que se usa ampliamente para tratar la patogénesis de la enfermedad y validar las dianas terapéuticas de AR (Brand et al., Nat. Protoc. 2(5):1269-75 (2007)). El procedimiento general de CIA se ilustra en la **Figura 12** (cualquier modificación a este procedimiento general se describe a continuación). Brevemente, se indujo artritis en el día 0 por inyección intradérmica en la cola de una emulsión que comprendía colágeno y adyuvante completo de Freund (CFA). A partir de aquí, se administraron los tratamientos de control y de prueba por inyección subcutánea (s.c.) o intraperitoneal (i.p.) dos veces a la semana empezando en el día 20. Los grupos de prueba para el Estudio 1 se describen a continuación en la **Tabla 5**.

25

30 Tabla 5. Grupos de prueba del Estudio 1 de artritis inducida por colágeno (CIA)

| Grupo N.º | N.º Animales | Tratamiento | Dosis | Días de tratamiento |
|-----------|--------------|---------------------------------|-------------|----------------------------------|
| 1 | 10 | Control de isotipo IgG de ratón | 600 µg i.p. | 2X/semana empezando en el día 20 |
| 2 | 10 | MAb 67 | 600 µg i.p. | 2X/semana empezando en el día 20 |
| 3 | 10 | etanercept | 600 µg s.c. | 2X/semana empezando en el día 20 |

La gravedad de la enfermedad se puntuó usando la escala mostrada en la **Tabla 6**. Cada pata de ratón recibió una puntuación (se evaluaron signos macroscópicos de artritis 3 veces a la semana). Se calculó el índice artrítico (IA) mediante la suma de puntuaciones de patas individuales (IA máximo = 16). Normalmente, los primeros signos de artritis aparecen en el modelo de CIA 21-28 días después de la inmunización.

35

Tabla 6. Método de puntuación de CIA

| Puntuación | Descripción |
|------------|--|
| 0 | sin efectos visibles de artritis |
| 1 | edema y/o eritema de 1 dedo |
| 2 | edema y/o eritema de 2 dedos |
| 3 | edema y/o eritema de más de 2 dedos |
| 4 | artritis intensa de la pata entera y dedos |

Los resultados del Estudio 1 mostraron una reducción en el desarrollo de la enfermedad de artritis en el modelo de CIA en grupos tratados con 600 µg de MAb 67. El índice artrítico (IA) en ratones tratados con 600 µg de MAb 67 se comparó con el IA en ratones tratados con 600 µg de control negativo (IgG1) y 600 µg de control positivo (etanercept) donde el tratamiento empezó en el día 20. Los resultados se muestran en la **Figura 13A**. Estos resultados muestran que MAb 67 era tan bueno como o mejor que etanercept en reducir el desarrollo de la enfermedad de artritis en el modelo de CIA.

Un segundo estudio (Estudio 2) incluyó MAb 67 y tratamientos de control positivo donde el tratamiento se retrasó, es decir, empezó cuando el índice de artritis era ≥ 3 . Los grupos de prueba para el Estudio 2 se describen a continuación en la **Tabla 7**.

10 Tabla 7. Grupos de prueba del Estudio 2 de artritis inducida por colágeno (CIA)

| Grupo N.º | N.º de animales | Tratamiento | Dosis | Días de tratamiento |
|-----------|-----------------|---------------------------------|-------------|--|
| 1 | 10 | Control de isotipo IgG de ratón | 600 µg i.p. | 2X/semana empezando en el día 20 |
| 2 | 10 | MAb 67 | 600 µg i.p. | 2X/semana empezando en el día 20 |
| 3 | 10 | MAb 67 | 600 µg i.p. | 2X/semana empezando cuando el índice de artritis es ≥ 3 |
| 4 | 10 | etanercept | 600 µg s.c. | 2X/semana empezando cuando el índice de artritis es ≥ 3 |

Para el Estudio 2, se compararon los resultados del IA para el tratamiento con MAb 67 (el tratamiento empezó en el día 20 o cuando el IA fue ≥ 3) con el tratamiento con un control negativo (IgG1) y control positivo (etanercept; el tratamiento empezó cuando el IA fue ≥ 3). Los resultados se muestran en la **Figura 13B**. Estos resultados muestran que MAb 67 era tan bueno como o mejor que etanercept en reducir el desarrollo de la enfermedad de artritis en el modelo de CIA cuando el tratamiento se empezó en el día 20 o se retrasó a IA ≥ 3 . Así, se mostró que MAb 67 prevenía el desarrollo de la enfermedad de artritis, además de tratar la enfermedad de artritis cuando se administró una vez que el IA era ≥ 3 en el modelo de CIA.

Ejemplo 9

20 El anticuerpo anti-CD100 bloquea las respuestas de linfocitos B primarias y de memoria *in vivo*

Se inmunizaron ratones Balb/c y CD100^{-/-} con gamma-globulina de pollo conjugada con (4-hidroxi-3-nitrofenil)acetilo precipitada con alumbre (hidróxido de aluminio/magnesio) ("NP-CGG"), seguido de tratamiento con IgG1 de control (Balb/c y CD100^{-/-}) o MAb 67 (Balb/c solo). Los grupos de prueba se muestran a continuación en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Grupos de prueba de respuestas de linfocitos B primarias y de memoria

| Grupo | Cepa | N.º animales | exposición | Tratamiento con Ab | dosis | Inyección de Ab |
|-------|----------------------|--------------|----------------|--------------------|--------|----------------------------|
| 1 | CD100 ^{-/-} | 6 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 2 | CD100 ^{-/-} | 6 | NP-CGG/Alumbre | IgG1 de control | N/A | Día (-7), 0, 7, 14, 21, 28 |
| 3 | Balb/c | 6 | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 4 | Balb/c | 6 | NP-CGG/Alumbre | IgG1 de control | 600ug | Día (-7), 0, 7, 14, 21, 28 |
| 5 | Balb/c | 6 | NP-CGG/Alumbre | MAb 67 | 600 ug | Día (-7), 0, 7, 14, 21, 28 |

Los ratones se trataron como se ha descrito anteriormente en la Tabla 8 empezando en el día -7 y se inmunizaron con NP-CGG en el día 0. Tres ratones por grupo se sacrificaron en el día 10, y se analizaron el bazo y los ganglios linfáticos para linfocitos B del centro germinal (CG) ("B220+CD38lowPNA⁺"). Cada bazo se analizó por separado, y los ganglios linfáticos de los tres ratones se combinaron en una muestra para análisis. El tratamiento de los restantes ratones continuó como se muestra en la Tabla 8. En el día 21, los ratones se reforzaron con el mismo NP-CGG en alumbre. En el día 31, se sacrificaron los restantes ratones y se analizaron el bazo y los ganglios linfáticos para linfocitos B del centro germinal (CG) ("B220+CD38lowPNA⁺"). Cada bazo se analizó por separado, y los ganglios linfáticos de los tres ratones se combinaron en una muestra para análisis. Los resultados en las Figuras **14A y B** muestran que el tratamiento con 600 µg de MAb 67 disminuyó el número de linfocitos B de CG en el bazo (SP) y los

ganglios linfáticos (LN) después de tanto la inmunización primaria (14A) como la inmunización secundaria (14B), respectivamente. Así, se mostró que MAb 67 bloqueaba las respuestas de linfocitos B primarias y de memoria *in vivo*.

Ejemplo 10

5 **El anticuerpo anti-CD100 ralentiza el crecimiento tumoral *in vivo***

Se probó la reducción del crecimiento tumoral por MAb 67 en modelos de tumor de xenoinjerto de ratón CT26 y BCA34. Para estos estudios, se inyectaron células tumorales por vía intramuscular en las patas de ratones Balb/c. A partir del 1 día después del injerto, los ratones se trataron por inyección intraperitoneal (i.p.) 1X por semana con 1 mg de anticuerpo MAb 67 o control negativo (IgG) en 0,2 ml de volumen. Se midió el cambio en el volumen tumoral (mm³) y/o volumen del muslo (mm³) para determinar las velocidades de crecimiento tumoral. Se usó la velocidad de crecimiento tumoral para ratones tratados con MAb 67 en comparación con la velocidad de crecimiento tumoral en ratones de control negativo para calcular el retraso del crecimiento neuronal (TGD).

También se probó la capacidad de células tumorales BCA34 y EMT6 para crecer en un entorno que carece de CD100. Para estos estudios, se inyectaron células tumorales en las patas de ratones Balb/c y CD100^{-/-} (SEMA4D^{-/-}) y se midió el crecimiento tumoral.

Células de tumor de colon CT26

Se derivan células tumorales CT26 de tumores de colon murinos y expresan niveles muy bajos de CD100. Se inyectaron s.c. 50.000 células de tumor de colon CT26 en ratones Balb/c no mutados (20 ratones/grupo de tratamiento). Se midió el cambio en el volumen tumoral (mm³) en ratones tratados con 1 mg de MAb 67 semanalmente empezando en el día 1 después del injerto en comparación con ratones inyectados con control de IgG. Los resultados (volumen medio del tumor con el tiempo) se muestran en la **Figura 15**. El TGD para ratones tratados con MAb 67 fue del 17 % (p=0,0317). Estos resultados muestran que el crecimiento tumoral de CT26 se redujo en ratones tratados con MAb 67.

Células de tumor fibroblástico BCA34

Células tumorales BCA34 expresan bajos niveles de CD100. Primero, se inyectaron s.c. 50.000 células tumorales BCA34 en la región abdominal de ratones Balb/c no mutados o ratones CD100^{-/-} ("SEMA4D^{-/-}"). Se midió el cambio en el volumen tumoral (mm³) en estos ratones, y los resultados se muestran en la **Figura 16A**. Estos resultados mostraron que las células tumorales BCA34 tenían crecimiento alterado en un entorno que carece de CD100.

En un experimento separado, se inyectaron 50.000 células tumorales BCA34 en los músculos de la pata de ratones Balb/c no mutados (21 ratones/grupo de tratamiento). Se midió el cambio en el volumen tumoral (mm³) en ratones tratados con 1 mg de MAb 67 semanalmente empezando en el día 1 después del injerto en comparación con ratones inyectados con control de IgG. Los resultados (volumen medio del muslo con el tiempo) se muestran en la **Figura 16B**. El TGD para ratones tratados con MAb 67 fue del 18 % (p=0,009). Estos resultados muestran que se redujo el crecimiento tumoral de BCA34 en ratones tratados con MAb 67.

35 **Células tumorales de carcinoma mamario EMT6**

Se obtienen células tumorales EMT6 de tumores de carcinoma mamario murino y expresan niveles moderados de CD100. Se inyectaron 50.000 células tumorales EMT6 en los músculos de la pata de ratones Balb/c no mutados o ratones CD100^{-/-} ("SEMA4D^{-/-}"). Se midió el cambio en el volumen tumoral (mm³) en estos ratones, y los resultados se muestran en la **Figura 17**. Se muestra el cambio en el volumen tumoral (mm³) para ratones Balb/c no mutados y ratones CD100^{-/-} ("SEMA4D^{-/-}"). Estos resultados mostraron que células tumorales EMT6 tenían crecimiento alterado en un entorno que carece de CD100.

Ejemplo 11

El anticuerpo anti-CD100 ralentiza el crecimiento tumoral humano *in vivo*

Se probó la reducción del crecimiento tumoral por MAb 2503 en modelos de tumor de xenoinjerto humano HN12 y HN6 HIF1a mODD. Se obtienen HN12 y HN6 HIF1a mODD de tumores de cabeza y cuello humanos, y ambos xenoinjertos expresan altos niveles de HIF1a y CD100. El modelo de xenoinjerto HN6 HIF-1a mODD se describe en Sun et al., J Biol Chem 284(46):32066-74 (2009). Para estos experimentos, se inyectaron s.c. 2 tumores/ratón en ratones sin pelo atímicos (10 ratones/grupo de tratamiento). A partir del 1 día después del injerto, los ratones se trataron por inyección i.p. 1X por semana con 1 mg de anticuerpo MAb 2503 o control negativo (IgG4) en 0,2 ml de volumen. Se midió el cambio en el volumen tumoral (mm³). Se usó la velocidad de crecimiento tumoral para ratones HN6 HIF-1a mODD tratados en MAb 2503 en comparación con la velocidad de crecimiento en ratones de control negativo para calcular el retraso del crecimiento neuronal (TGD).

El criterio de valoración para este experimento fue TGD. Se muestran los resultados del crecimiento tumoral para el tratamiento con MAb 2503 en modelos de xenoinjerto HN12 y HN6 HIF-1a mODD en las **Figuras 18 y 19A**,

respectivamente. El TGD en los ratones con xenoinjerto HN6 HIF-1a mODD tratados con MAb 2503 fue del 13 % (p=0,0008). Además, se muestran imágenes de tumores representativos de ratones con xenoinjerto HN6 HIF-1a mODD tratados con control de IgG4 y MAb 2505 en la **Figura 19B**. Estos resultados muestran que el tratamiento con MAb 2503 redujo el crecimiento de tumor de cabeza y cuello humano *in vivo*.

5 Ejemplo 12

Línea celular CHO-S estable para expresar altos títulos de MAb 2503

Se obtuvo la línea celular CHO-S estable para expresar altos títulos de MAb 2503. Se usó ADN complementario (ADNc) para las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo monoclonal anti-CD100 humanizado 2503 para producir varias líneas celulares de expresión de ovario de hámster chino (CHO-S) construidas usando la tecnología GPEX™ (Catalent Pharma Solutions, Madison, Wisconsin) y células CHO-S progenitoras (véase Bleck et al., "An Alternative Method for the Rapid Generation of Stable, High-Expressing Mammalian Cell Lines", *BioProcessing Journal* (Septiembre / Octubre de 2005)).

Tras la clonación de células individuales, se seleccionó una expresión basándose en el crecimiento en cultivo y la producción de anticuerpos, y se produjo un banco de investigación de células de expresión en vial. El anticuerpo expresado producido por este clon se caracterizó para potencia y especificidad usando ensayos funcionales *in vitro* e *in vivo* (por ejemplo, ensayos de bloqueo del flujo y de desprendimiento). Posteriormente, células del clon de expresión de CHO seleccionadas se expandieron en cultivo y se preparó un segundo banco (reserva de células parentales) y se congeló. Las células de un vial del banco de reserva de células parentales se expandieron posteriormente en cultivo y se usaron para la producción de cGMP del banco maestro de células (MCB).

20 Ejemplo 13

Dosificación de anticuerpo anti-CD100 y estudios PC en rata y mono cinomolgo

Se realizó el análisis de saturación de inyección intravenosa única de MAb 2503 en rata y mono cinomolgo.

Estudio en ratas: Se administraron 36 ratas Sprague-Dawley (3/sexo/grupo) con una única inyección intravenosa de MAb 2503 que oscilaba de 0,01 a 100 mg/kg. Se realizó un ensayo de saturación basado en citometría de flujo en sangre completa lisada en diversos momentos de tiempo para determinar el porcentaje de la diana celular (SEMA4D) que se saturó con MAb 2503. Hubo buena correlación de datos con la cantidad de MAb detectada en el suero, sugiriendo que la saturación dependía de la cantidad de fármaco libre en el suero, y esas células se saturaron cuando se detectó aproximadamente 1 a 5 ug/ml de fármaco libre en el suero. El porcentaje de saturación de SEMA4D a la dosis de MAb 2503 de 0, 0,01, 0,1, 1,0, 10 y 100 mg/kg en ratas macho y hembra se muestra en las **Figuras 20A y 20B**, respectivamente.

Estudio en primates: Se administraron 28 monos cinomolgos (2/sexo/grupo; 4/sexo/grupo de control) con una única inyección intravenosa de MAb 2503 que oscilaba de 0,01 a 100 mg/kg. Se realizó un ensayo de saturación basado en citometría de flujo en sangre completa lisada en diversos momentos de tiempo para determinar el porcentaje de la diana celular (SEMA4D) que se saturó con MAb 2503. Hubo buena correlación de datos con la cantidad de MAb detectada en el suero, sugiriendo que la saturación dependía de la cantidad de fármaco libre en el suero, y esas células se saturaron cuando se detectó aproximadamente 1 a 5 ug/ml de fármaco libre en el suero. El porcentaje de saturación de SEMA4D a la dosis de MAb 2503 de 0, 0,01, 0,1, 1,0, 10 y 100 mg/kg en ratas macho y hembra (combinadas) se muestra en la **Figura 21**. Los resultados de saturación de rata y primate fueron muy similares.

Resultados farmacocinéticos (PK) que incluyen semivida biológica (horas (días)), concentración de anticuerpo en plasma a tiempo cero tras la inyección (C₀) y área bajo la curva de concentración plasmática de tiempo cero a tiempo t (ABC_{0-t}) para inyecciones intravenosas únicas de 0,01, 0,1, 1,0, 10 o 100 mg/kg de MAb 2503 en rata y primate se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Valores PC para el anticuerpo 2503 en rata y primate (mono cinomolgo)

| Dosis (mg/kg) | Semivida (horas (días)) | | C ₀ (µg/ml) | | ABC _{0-t} | |
|---------------|-------------------------|-------------|------------------------|-----------|--------------------|-----------|
| | Cino | Rata | Cino | Rata | Cino | Rata |
| 0,01 | | | 0,1051 | Sin datos | 0,3573 | Sin datos |
| Fase A | 0,1649 (0,01) | Sin datos | | | | |
| Fase B | 43,21 (1,80) | Sin datos | | | | |
| 0,1 | | | 3,356 | 1,99 | 23,09 | 11,40 |
| Fase A | 0,1659 (0,01) | 3,47 (0,14) | | | | |

ES 2 647 823 T3

| Dosis (mg/kg) | Semivida (horas (días)) | | C ₀ (µg/ml) | | ABC _{0-t} | |
|---------------|-------------------------|---------------|------------------------|-------|--------------------|---------|
| | Cino | Rata | Cino | Rata | Cino | Rata |
| Fase B | 6,829 (0,28) | Sin datos | | | | |
| 1,0 | | | 39,35 | 34,14 | 1,974 | 834,7 |
| Fase A | 3,175 (0,13) | 0,636 (0,026) | | | | |
| Fase B | 43,69 (1,82) | 27,77 (1,2) | | | | |
| 10 | | | 327,1 | 317,7 | 38,741 | 27,431 |
| Fase A | 3,075 (0,13) | 5,85 (0,24) | | | | |
| Fase B | 109,4 (4,56) | 105,7 (4,4) | | | | |
| 100 | | | 3,681 | 3,305 | 477,154 | 488,194 |
| Fase A | 6,978 (0,29) | 9,20 (0,38) | | | | |
| Fase B | 239,8 (9,99) | 246,2 (10,3) | | | | |

5 Se encontró que la semivida de la fase de eliminación de MAb 2503 era similar entre rata y mono cinomolgo, y osciló de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 10 días de un modo dependiente de la dosis. Tanto los resultados de saturación como PC parecen ser dependientes de la dosis y sugieren un perfil sorprendentemente similar entre rata y mono cinomolgo. Además, no se observó toxicidad significativa para MAb 2503 a dosis que oscilan de 0,01 a 100 mg/kg en rata o mono cinomolgo.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Smith, Ernest S. Fisher, Terrence Lee
- 10 <120> Anticuerpos anti-CD100 y métodos de uso de los mismos
- <130> 1843.060PC02/EJH/BNC
- <140> Por asignar
- 15 <141> Por medio de la presente
- <150> 61/325.213
- <151> 16-04-2010
- 20 <150> 61/176.826
- <151> 05-05-2009
- <160> 40
- 25 <170> PatentIn versión 3.3

ES 2 647 823 T3

<210> 1

<211> 862

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 1

```

Met Arg Met Cys Thr Pro Ile Arg Gly Leu Leu Met Ala Leu Ala Val
 1          5          10          15

Met Phe Gly Thr Ala Met Ala Phe Ala Pro Ile Pro Arg Ile Thr Trp
          20          25          30

Glu His Arg Glu Val His Leu Val Gln Phe His Glu Pro Asp Ile Tyr
          35          40          45

Asn Tyr Ser Ala Leu Leu Leu Ser Glu Asp Lys Asp Thr Leu Tyr Ile
          50          55          60

Gly Ala Arg Glu Ala Val Phe Ala Val Asn Ala Leu Asn Ile Ser Glu
 65          70          75          80

Lys Gln His Glu Val Tyr Trp Lys Val Ser Glu Asp Lys Lys Ala Lys
          85          90          95

Cys Ala Glu Lys Gly Lys Ser Lys Gln Thr Glu Cys Leu Asn Tyr Ile
          100          105          110

Arg Val Leu Gln Pro Leu Ser Ala Thr Ser Leu Tyr Val Cys Gly Thr
          115          120          125
    
```

ES 2 647 823 T3

Asn Ala Phe Gln Pro Ala Cys Asp His Leu Asn Leu Thr Ser Phe Lys
 130 135 140

Phe Leu Gly Lys Asn Glu Asp Gly Lys Gly Arg Cys Pro Phe Asp Pro
 145 150 155 160

Ala His Ser Tyr Thr Ser Val Met Val Asp Gly Glu Leu Tyr Ser Gly
 165 170 175

Thr Ser Tyr Asn Phe Leu Gly Ser Glu Pro Ile Ile Ser Arg Asn Ser
 180 185 190

Ser His Ser Pro Leu Arg Thr Glu Tyr Ala Ile Pro Trp Leu Asn Glu
 195 200 205

Pro Ser Phe Val Phe Ala Asp Val Ile Arg Lys Ser Pro Asp Ser Pro
 210 215 220

Asp Gly Glu Asp Asp Arg Val Tyr Phe Phe Phe Thr Glu Val Ser Val
 225 230 235 240

Glu Tyr Glu Phe Val Phe Arg Val Leu Ile Pro Arg Ile Ala Arg Val
 245 250 255

Cys Lys Gly Asp Gln Gly Gly Leu Arg Thr Leu Gln Lys Lys Trp Thr
 260 265 270

Ser Phe Leu Lys Ala Arg Leu Ile Cys Ser Arg Pro Asp Ser Gly Leu
 275 280 285

Val Phe Asn Val Leu Arg Asp Val Phe Val Leu Arg Ser Pro Gly Leu
 290 295 300

Lys Val Pro Val Phe Tyr Ala Leu Phe Thr Pro Gln Leu Asn Asn Val
 305 310 315 320

Gly Leu Ser Ala Val Cys Ala Tyr Asn Leu Ser Thr Ala Glu Glu Val
 325 330 335

Phe Ser His Gly Lys Tyr Met Gln Ser Thr Thr Val Glu Gln Ser His
 340 345 350

Thr Lys Trp Val Arg Tyr Asn Gly Pro Val Pro Lys Pro Arg Pro Gly
 355 360 365

Ala Cys Ile Asp Ser Glu Ala Arg Ala Ala Asn Tyr Thr Ser Ser Leu
 370 375 380

ES 2 647 823 T3

Asn Leu Pro Asp Lys Thr Leu Gln Phe Val Lys Asp His Pro Leu Met
 385 390 395 400

Asp Asp Ser Val Thr Pro Ile Asp Asn Arg Pro Arg Leu Ile Lys Lys
 405 410 415

Asp Val Asn Tyr Thr Gln Ile Val Val Asp Arg Thr Gln Ala Leu Asp
 420 425 430

Gly Thr Val Tyr Asp Val Met Phe Val Ser Thr Asp Arg Gly Ala Leu
 435 440 445

His Lys Ala Ile Ser Leu Glu His Ala Val His Ile Ile Glu Glu Thr
 450 455 460

Gln Leu Phe Gln Asp Phe Glu Pro Val Gln Thr Leu Leu Leu Ser Ser
 465 470 475 480

Lys Lys Gly Asn Arg Phe Val Tyr Ala Gly Ser Asn Ser Gly Val Val
 485 490 495

Gln Ala Pro Leu Ala Phe Cys Gly Lys His Gly Thr Cys Glu Asp Cys
 500 505 510

Val Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Ser Pro Pro Thr Ala Thr
 515 520 525

Cys Val Ala Leu His Gln Thr Glu Ser Pro Ser Arg Gly Leu Ile Gln
 530 535 540

Glu Met Ser Gly Asp Ala Ser Val Cys Pro Asp Lys Ser Lys Gly Ser
 545 550 555 560

Tyr Arg Gln His Phe Phe Lys His Gly Gly Thr Ala Glu Leu Lys Cys
 565 570 575

Ser Gln Lys Ser Asn Leu Ala Arg Val Phe Trp Lys Phe Gln Asn Gly
 580 585 590

Val Leu Lys Ala Glu Ser Pro Lys Tyr Gly Leu Met Gly Arg Lys Asn
 595 600 605

Leu Leu Ile Phe Asn Leu Ser Glu Gly Asp Ser Gly Val Tyr Gln Cys
 610 615 620

Leu Ser Glu Glu Arg Val Lys Asn Lys Thr Val Phe Gln Val Val Ala
 625 630 635 640

ES 2 647 823 T3

Lys His Val Leu Glu Val Lys Val Val Pro Lys Pro Val Val Ala Pro
645 650 655

Thr Leu Ser Val Val Gln Thr Glu Gly Ser Arg Ile Ala Thr Lys Val
660 665 670

Leu Val Ala Ser Thr Gln Gly Ser Ser Pro Pro Thr Pro Ala Val Gln
675 680 685

Ala Thr Ser Ser Gly Ala Ile Thr Leu Pro Pro Lys Pro Ala Pro Thr
690 695 700

Gly Thr Ser Cys Glu Pro Lys Ile Val Ile Asn Thr Val Pro Gln Leu
705 710 715 720

His Ser Glu Lys Thr Met Tyr Leu Lys Ser Ser Asp Asn Arg Leu Leu
725 730 735

Met Ser Leu Phe Leu Phe Phe Phe Val Leu Phe Leu Cys Leu Phe Phe
740 745 750

Tyr Asn Cys Tyr Lys Gly Tyr Leu Pro Arg Gln Cys Leu Lys Phe Arg
755 760 765

Ser Ala Leu Leu Ile Gly Lys Lys Lys Pro Lys Ser Asp Phe Cys Asp
770 775 780

Arg Glu Gln Ser Leu Lys Glu Thr Leu Val Glu Pro Gly Ser Phe Ser
785 790 795 800

Gln Gln Asn Gly Glu His Pro Lys Pro Ala Leu Asp Thr Gly Tyr Glu
805 810 815

Thr Glu Gln Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val Pro Thr Asp Arg Glu Asp
820 825 830

Ser Gln Arg Ile Asp Asp Leu Ser Ala Arg Asp Lys Pro Phe Asp Val
835 840 845

Lys Cys Glu Leu Lys Phe Ala Asp Ser Asp Ala Asp Gly Asp
850 855 860

<210> 2

<211> 861

5 <212> PRT

<213> Murine sp.

<400> 2

ES 2 647 823 T3

Met Arg Met Cys Ala Pro Val Arg Gly Leu Phe Leu Ala Leu Val Val
1 5 10 15

Val Leu Arg Thr Ala Val Ala Phe Ala Pro Val Pro Arg Leu Thr Trp
20 25 30

Glu His Gly Glu Val Gly Leu Val Gln Phe His Lys Pro Gly Ile Phe
35 40 45

Asn Tyr Ser Ala Leu Leu Met Ser Glu Asp Lys Asp Thr Leu Tyr Val
50 55 60

Gly Ala Arg Glu Ala Val Phe Ala Val Asn Ala Leu Asn Ile Ser Glu
65 70 75 80

Lys Gln His Glu Val Tyr Trp Lys Val Ser Glu Asp Lys Lys Ser Lys
85 90 95

Cys Ala Glu Lys Gly Lys Ser Lys Gln Thr Glu Cys Leu Asn Tyr Ile
100 105 110

Arg Val Leu Gln Pro Leu Ser Ser Thr Ser Leu Tyr Val Cys Gly Thr
115 120 125

Asn Ala Phe Gln Pro Thr Cys Asp His Leu Asn Leu Thr Ser Phe Lys
130 135 140

Phe Leu Gly Lys Ser Glu Asp Gly Lys Gly Arg Cys Pro Phe Asp Pro
145 150 155 160

Ala His Ser Tyr Thr Ser Val Met Val Gly Gly Glu Leu Tyr Ser Gly
165 170 175

Thr Ser Tyr Asn Phe Leu Gly Ser Glu Pro Ile Ile Ser Arg Asn Ser
180 185 190

Ser His Ser Pro Leu Arg Thr Glu Tyr Ala Ile Pro Trp Leu Asn Glu
195 200 205

Pro Ser Phe Val Phe Ala Asp Val Ile Gln Lys Ser Pro Asp Gly Pro
210 215 220

Glu Gly Glu Asp Asp Lys Val Tyr Phe Phe Phe Thr Glu Val Ser Val
225 230 235 240

Glu Tyr Glu Phe Val Phe Lys Leu Met Ile Pro Arg Val Ala Arg Val

ES 2 647 823 T3

Gln Ala Pro Leu Ala Phe Cys Glu Lys His Gly Ser Cys Glu Asp Cys
500 505 510

Val Leu Ala Arg Asp Pro Tyr Cys Ala Trp Ser Pro Ala Ile Lys Ala
515 520 525

Cys Val Thr Leu His Gln Glu Glu Ala Ser Ser Arg Gly Trp Ile Gln
530 535 540

Asp Met Ser Gly Asp Thr Ser Ser Cys Leu Asp Lys Ser Lys Glu Ser
545 550 555 560

Phe Asn Gln His Phe Phe Lys His Gly Gly Thr Ala Glu Leu Lys Cys
565 570 575

Phe Gln Lys Ser Asn Leu Ala Arg Val Val Trp Lys Phe Gln Asn Gly
580 585 590

Glu Leu Lys Ala Ala Ser Pro Lys Tyr Gly Phe Val Gly Arg Lys His
595 600 605

Leu Leu Ile Phe Asn Leu Ser Asp Gly Asp Ser Gly Val Tyr Gln Cys
610 615 620

Leu Ser Glu Glu Arg Val Arg Asn Lys Thr Val Ser Gln Leu Leu Ala
625 630 635 640

Lys His Val Leu Glu Val Lys Met Val Pro Arg Thr Pro Pro Ser Pro
645 650 655

Thr Ser Glu Asp Ala Gln Thr Glu Gly Ser Lys Ile Thr Ser Lys Met
660 665 670

Pro Val Ala Ser Thr Gln Gly Ser Ser Pro Pro Thr Pro Ala Leu Trp
675 680 685

Ala Thr Ser Pro Arg Ala Ala Thr Leu Pro Pro Lys Ser Ser Ser Gly
690 695 700

Thr Ser Cys Glu Pro Lys Met Val Ile Asn Thr Val Pro Gln Leu His
705 710 715 720

Ser Glu Lys Thr Val Tyr Leu Lys Ser Ser Asp Asn Arg Leu Leu Met
725 730 735

Ser Leu Leu Leu Phe Ile Phe Val Leu Phe Leu Cys Leu Phe Ser Tyr
740 745 750

ES 2 647 823 T3

Asn Cys Tyr Lys Gly Tyr Leu Pro Gly Gln Cys Leu Lys Phe Arg Ser
 755 760 765

Ala Leu Leu Leu Gly Lys Lys Thr Pro Lys Ser Asp Phe Ser Asp Leu
 770 775 780

Glu Gln Ser Val Lys Glu Thr Leu Val Glu Pro Gly Ser Phe Ser Gln
 785 790 795 800

Gln Asn Gly Asp His Pro Lys Pro Ala Leu Asp Thr Gly Tyr Glu Thr
 805 810 815

Glu Gln Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val Pro Thr Asp Arg Glu Asp Ser
 820 825 830

Gln Arg Ile Asp Glu Leu Ser Ala Arg Asp Lys Pro Phe Asp Val Lys
 835 840 845

Cys Glu Leu Lys Phe Ala Asp Ser Asp Ala Asp Gly Asp
 850 855 860

<210> 3

<211> 30

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido anti-CDR1 VH de CD100

10

<400> 3

ggctacagct tcagcgacta ctacatgcac 30

<210> 4

15 <211> 51

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Polinucleótido anti-CDR2 VH de CD100

<400> 4

cagattaatc ctaccactgg cggcgctagc tacaaccaga agttcaaggg c 51

ES 2 647 823 T3

<210> 5

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Polinucleótido anti-CDR3 VH de CD100

<400> 5

10 tattactacg gcagacactt cgatgtc 27

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

15

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido anti-CDR1 VH de CD100

20

<400> 6

Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr Tyr Met His
1 5 10

<210> 7

25

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30

<223> Polipéptido anti-CDR2 VH de CD100

<400> 7

Gln Ile Asn Pro Thr Thr Gly Gly Ala Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

ES 2 647 823 T3

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Polipéptido anti-CDR3 VH de CD100

<400> 8

10

Tyr Tyr Tyr Gly Arg His Phe Asp Val
1 5

<210> 9

<211> 118

15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido anti-VH de CD100 2503

20

<400> 9

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr

ES 2 647 823 T3

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 45
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Polinucleótido anti-CDR1 VL de CD100
10

<400> 11
aaggccagcc aaagcgtgga ttatgatggc gatagctata tgaac 45

<210> 12
15 <211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
20 <223> Polinucleótido anti-CDR2 VL de CD100

<400> 12
gctgcatcca atctggaaag c 21

25 <210> 13
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Polinucleótido anti-CDR3 VL de CD100

<400> 13
cagcaaagca atgaggatcc ctacacc 27
35

<210> 14

ES 2 647 823 T3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Polipéptido anti-CDR1 VL de CD100

<400> 14

10 Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
 1 5 10 15

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido anti-CDR2 VL de CD100

20 <400> 15

 Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 16

25 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> Polipéptido anti-CDR3 VL de CD100

<400> 16

 Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
 1 5

35

ES 2 647 823 T3

<210> 17

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Polipéptido anti-VL de CD100 2503

<400> 17

10

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
          20           25           30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
          35           40           45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50           55           60

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
          85           90           95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110
```

<210> 18

<211> 111

15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido anti-VL de CD100 67

20

<400> 18

ES 2 647 823 T3

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

<210> 19

<211> 354

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido anti-VH de CD100 2503

10

<400> 19

caggtgcagc tgggtgcagag cggcgctgag gtgaagaagc ctggcagcag cgtgaaggtc 60
 tcctgcaagg ctagcgggcta cagcttcagc gactactaca tgcactgggt gagacaggcc 120
 cctggccaag gcctggagtg gatgggccag attaatccta ccactggcgg cgctagctac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccaccatt accgtggaca aaagcaccag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag aagcaggagc accgccgtgt attactgtgc cagatattac 300
 tacggcagac acttcgatgt ctggggccaa ggcaccacgg tcaccgtctc ttca 354

15 <210> 20

<211> 354

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 647 823 T3

<220>

<223> Polinucleótido anti-VH de CD100 67

<400> 20

5

```

caggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata      60
tcctgcaagg cttctggtta ctcatlcagt gactactaca tgcactgggt gaagcaaagt      120
cctgaaaata gtcttgagtg gattggacag attaatccta ccactggggg tgctagctac      180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccacatta actgtagata aatcctccag cacagcctac      240
atgcagctca agagcctgac atctgaagag tctgcagtct attactgtac aagatattac      300
tacggtagac acttcgatgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtttc ctca          354
    
```

<210> 21

<211> 333

10

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido anti-VL de CD100 2503

15

<400> 21

```

gacatcgtga tgacctagag cccagacagc ctggctgtga gcctggggga gagggccacc      60
atcaactgca aggccagcca aagcgtggat tatgatggcg atagctatat gaactggtac      120
cagcagaaac caggccagcc tcctaagctg ctgatttacg ctgcatccaa tctggaaagc      180
ggcgtgcctg acagattcag cggcagcggc agcggcacag attcactct gaccatcagc      240
agcctgcagg ctgaagatgt ggcagtgtat tactgtcagc aaagcaatga ggatccctac      300
accttcggcc aagggaccaa gctcagatc aaa          333
    
```

20

<210> 22

<211> 333

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Polinucleótido anti-VL de CD100 67

ES 2 647 823 T3

<400> 22

```
gacattgtga tgaccagtc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
atctcctgca aggccagcca aagtgttgat tatgatggtg atagttatat gaactggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatcaa tctagaatct 180
gggatcccag ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcacct caacatccat 240
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc aaagtaatga ggatccgtac 300
acgttcggag gggggaccaa gctcgagatc aaa 333
```

5 <210> 23

<211> 2586

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <400> 23

ES 2 647 823 T3

atgaggatgt gcacccccat tagggggctg ctcatggccc ttgcagtgat gtttgggaca 60
 gcgatggcat ttgcacccat accccggatc acctgggagc acagagaggt gcacctggtg 120
 cagtttcatg agccagacat ctacaactac tcagccttgc tgctgagcga ggacaaggac 180
 accttgta ca taggtgcccg ggaggcggtc ttcgctgtga acgcactcaa catctccgag 240
 aagcagcatg aggtgtattg gaaggtctca gaagacaaaa aagcaaatg tgcagaaaag 300
 gggaaatcaa aacagacaga gtgcctcaac tacatccggg tgctgcagcc actcagcgc 360
 acttcccttt acgtgtgtgg gaccaacgca ttccagccgg cctgtgacca cctgaactta 420
 acatccttta agtttctggg gaaaaatgaa gatggcaaa gaagatgtcc ctttgaccca 480
 gcacacagct acacatccgt catggttgat ggagaacttt attcggggac gtcgtataat 540
 tttttgggaa gtgaacccat catctcccga aattcttccc acagtcctct gaggacagaa 600
 tatgcaatcc cttggctgaa cgagcctagt ttcgtgtttg ctgacgtgat ccgaaaaagc 660
 ccagacagcc ccgacggcga ggatgacagg gtctacttct tcttcacgga ggtgtctgtg 720
 gagtatgagt ttgtgttcag ggtgctgac ccacggatag caagagtgtg caagggggac 780
 cagggcggcc tgaggacctt gcagaagaaa tggacctcct tcctgaaagc ccgactcatc 840
 tgctcccggc cagacagcgg cttggtcttc aatgtgctgc gggatgtctt cgtgctcagg 900
 tccccgggcc tgaaggtgcc tgtgtctat gcaactctca ccccacagct gaacaacgtg 960
 gggctgtcgg cagtgtgcgc ctacaacctg tccacagccg aggaggtctt ctcccagggg 1020
 aagtacatgc agagcaccac agtggagcag tcccacacca agtgggtgcg ctataatggc 1080
 ccggtaccca agcccgggcc tggagcgtgc atcgacagcg aggcacgggc cgccaactac 1140
 accagctcct tgaatttgcc agacaagacg ctgcagttcg ttaaagacca ccctttgatg 1200
 gatgactcgg taaccccaat agacaacagg ccaggttaa tcaagaaaga tgtgaactac 1260
 accagatcg tggtgaccg gaccagggc ctggatggga ctgtctatga tgtcatgttt 1320
 gtcagcacag accggggagc tctgcacaaa gccatcagcc tcgagcacgc tgttcacatc 1380
 atcgaggaga ccagctctt ccaggacttt gagccagtcc agaccctgct gctgtcttca 1440
 aagaagggca acaggtttgt ctatgctggc tctaactcgg gcgtggtcca ggccccgctg 1500
 gccttctgtg ggaagcacgg cacctgcgag gactgtgtgc tggcgcggga cccctactgc 1560
 gcctggagcc cggccacagc gacctgcgtg gctctgcacc agaccgagag ccccagcagg 1620
 ggtttgattc aggagatgag cggcgtgct tctgtgtgcc cggataaaag taaaggaagt 1680
 taccggcagc attttttcaa gcacggtggc acagcggaac tgaatgctc ccaaaaatcc 1740
 aacctggccc ggtcttttg gaagttccag aatggcgtgt tgaaggccga gagccccaa 1800
 tacggtctta tgggcagaaa aaacttgctc atcttcaact tgtcagaagg agacagtggg 1860

ES 2 647 823 T3

gtgtaccagt gcctgtcaga ggagagggtt aagaacaaaa cggctctcca agtggtcgcc 1920
aagcacgtcc tggaagtgaa ggtggttcca aagcccgtag tggccccac cttgtcagtt 1980
gttcagacag aaggtagtag gattgccacc aaagtgttg tggcatccac ccaaggtct 2040
tctccccaa cccagccgt gcagccacc tcctccggg ccatcacct tcctccaag 2100
cctgcccaca ccggcacatc ctgcgaacca aagatcgtca tcaacacggc cccccagctc 2160
cactcggaga aaaccatgta tcttaagtcc agcgacaacc gcctcctcat gtccctcttc 2220
ctcttcttct ttgttctctt cctctgcctc tttttctaca actgctataa gggatacctg 2280
cccagacagt gcttgaatt ccgctcggcc ctactaattg ggaagaaga gcccaagtca 2340
gatttctgtg accgtgagca gacctgaag gagacgttag tagagccagg gagcttctcc 2400
cagcagaatg gggagcacc caagccagcc ctggacaccg gctatgagac cgagcaagac 2460
accatcacca gcaaagtccc cacggatagg gaggactcac agaggatoga cgaccttct 2520
gccagggaca agcccttga cgtcaagtgt gagctgaagt tcgctgactc agacgcagat 2580
ggagac 2586

<210> 24

<211> 13

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Epítope de péptido de la proteína de proteólípido PLP(139-151)

<400> 24

His Ser Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe
1 5 10

15 <210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido anti-VH de CD100 76

<400> 25

ES 2 647 823 T3

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Pro Tyr Gly Trp Thr Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 26

5 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido anti-CDR1 VH de CD100 76

<400> 26

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Trp Met His
 1 5 10

15 <210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido anti CDR2 VH de CD100 76

ES 2 647 823 T3

<400> 27

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

Asp

5 <210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Polipéptido anti-CDR3 VH de CD100 76

<400> 28

15 Asp Pro Tyr Gly Trp Thr Met Asp Ser
1 5

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido anti-VL de CD100 76

25 <400> 29

ES 2 647 823 T3

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

Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp
20 25 30

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

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 30

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido anti-CDR1 VL de CD100 76

10

<400> 30

His Ala Ser Gln Asn Ile Asn Val Trp Leu Ser
1 5 10

15 <210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido anti-CDR2 VL de CD100 76

<400> 31

ES 2 647 823 T3

Lys Ala Ser Asn Leu His Thr
1 5

<210> 32
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Polipéptido anti-CDR3 VL de CD100 76
10
<400> 32

Gln Gln Gly Gln Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

15 <210> 33
<211> 354
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Polinucleótido anti-VH de CD100 76
<400> 33

| | | |
|----|---|-----|
| | caggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggcaaaac ctggggcctc agtgaagatg | 60 |
| | tcctgcaagg cttctggcta cacctttact aggtactgga tgcactgggt aaaacagagg | 120 |
| | cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gcactggtta ttctgattac | 180 |
| | aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac | 240 |
| | atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagacccc | 300 |
| 25 | tacggctgga ctatggactc ctggggccaa gggactctgg tcaccgtctc ctca | 354 |

<210> 34
<211> 30
<212> ADN
30 <213> Artificial

ES 2 647 823 T3

<220>

<223> Polinucleótido anti-CDR1 VH de CD100 76

<400> 34

5 ggctacacct ttactaggta ctggatgcac 30

<210> 35

<211> 51

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido anti-CDR2 VH de CD100 76

15 <400> 35

tacattaatc ctgacctgg ttattctgat tacaatcaga agtcaagga c 51

<210> 36

<211> 27

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido anti-CDR3 VH de CD100 76

25

<400> 36

gaccctacg gctggactat ggactcc 27

<210> 37

30 <211> 321

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35 <223> Polinucleótido anti-VL de CD100 76

<400> 37

ES 2 647 823 T3

gacatccaga tgaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttggaga cacaattacc 60
 atcacttgcc atgccagtca gaacattaat gtttggttaa gctggtacca gcagaaacca 120
 ggaaatattc ctaaactatt gatctataag gttccaact tgcacacagg cgtcccatca 180
 aggttttagtg gcagtggatc tggaacaggt ttcacattaa ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaagtt atccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tcgagatcaa a 321

<210> 38

<211> 33

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Polinucleótido anti-CDR1 VL de CD100 76

10

<400> 38

catgccagtc agaacattaa tgttggtta agc 33

<210> 39

15 <211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Polinucleótido anti-CDR2 VL de CD100 76

<400> 39

aaggcttcca acttcacac a 21

25 <210> 40

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Polinucleótido anti-CDR3 VL de CD100 76

ES 2 647 823 T3

<400> 40

caacagggtc aaagttatcc gtacacg 27

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a CD100, que comprende un polipéptido de la región variable de la cadena pesada (VH) y un polipéptido de la región variable de la cadena ligera (VL), en el que la VH comprende las secuencias de aminoácidos de VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 que comprenden SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente y la VL comprende las secuencias de aminoácidos de VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 que comprenden SEQ ID NO: 14, 15, y 16, respectivamente.
2. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1, en el que:
 - (a) la VH comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10;
 - (b) la VL comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18;
 - (c) la VH comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10 y la VL comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18; o
 - (d) el anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo monoclonal que comprende una VH codificada por el polinucleótido depositado como ATCC PTA-10004 y una VL codificada por el polinucleótido depositado como ATCC PTA-10005.
3. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además una región constante humana.
4. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que está seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo monocatenario, un fragmento Fab, un fragmento F(ab)2 y un fragmento Fv.
5. El anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que inhibe que CD100 se una a un receptor de CD100.
6. El anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que está humanizado, primatizado o es quimérico.
7. El anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además un polipéptido heterólogo fusionado con el mismo.
8. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un vehículo.
9. Un polinucleótido que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2.
10. Una composición que comprende una VH aislada que codifica el polinucleótido y una VL aislada que codifica el polinucleótido,
 - (a) en la que la VH que codifica el polinucleótido codifica una VH que comprende las secuencias de aminoácidos de VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 que comprenden SEQ ID NO: 6, 7, y 8, respectivamente; en la que la VL que codifica el polinucleótido codifica una VL que comprende las secuencias de aminoácidos de VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 que comprenden SEQ ID NO: 14, 15, y 16, respectivamente; o
 - (b) en la que la VH que codifica el polinucleótido comprende SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20 y la VL que codifica el polinucleótido comprende SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22; y
- en la que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende la VH y VL se une específicamente a CD100.
11. La composición según la reivindicación 10, en la que la VH que codifica el polinucleótido y la VL que codifica el polinucleótido están contenidas en un único vector o en vectores separados.
12. Una célula hospedadora que comprende (a) un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 9 o (b) la composición de la reivindicación 11.
13. Un método de producción de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a CD100, que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 12 y recuperar el anticuerpo, o fragmento del mismo.

14. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o la composición de la reivindicación 8 para su uso en

(a) el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad inflamatoria en un animal en necesidad del mismo,

5 (b) el tratamiento de un cáncer en un animal en necesidad del mismo, o

(c) inhibir la angiogénesis en un animal en necesidad de tratamiento contra el cáncer.

15. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, o composición para el uso según la reivindicación 14, en el que la enfermedad autoinmunitaria o la enfermedad inflamatoria es esclerosis múltiple o artritis.

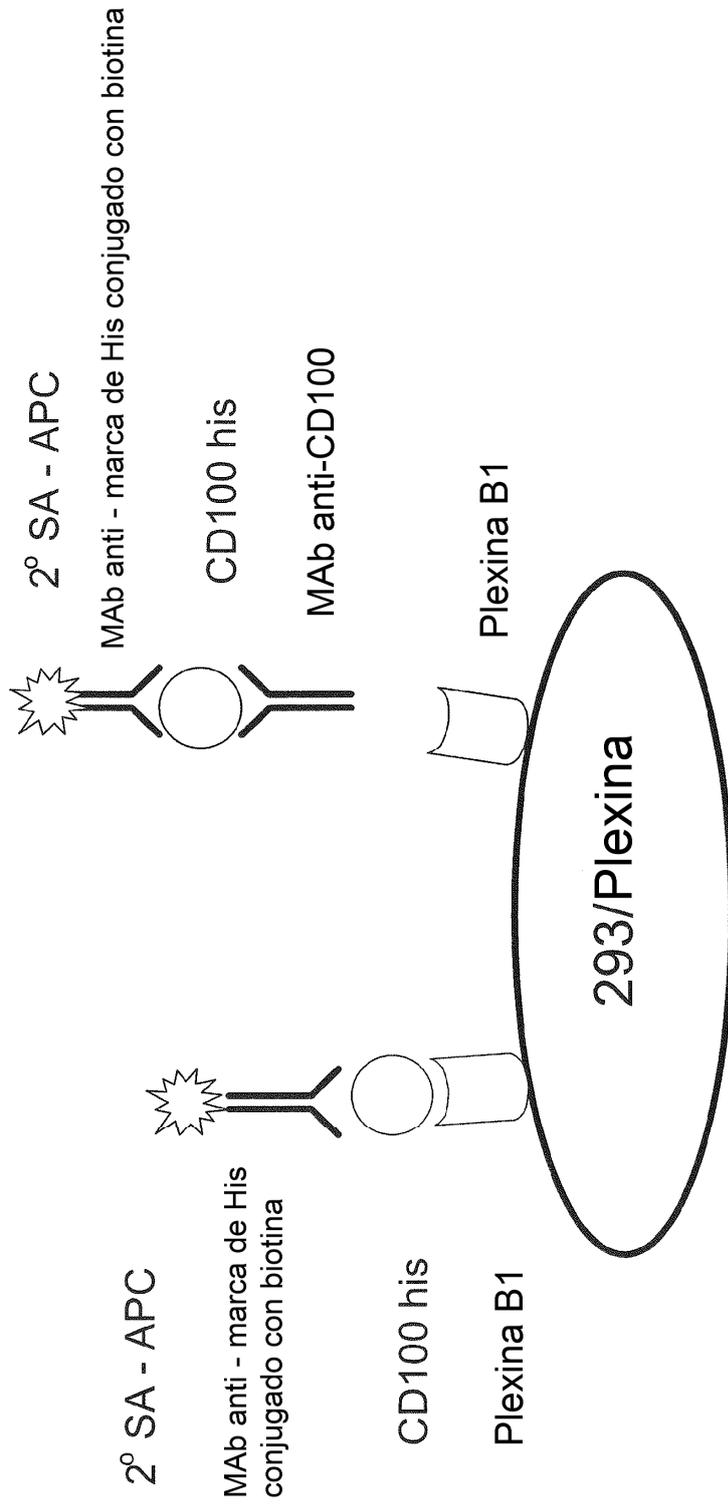


FIG. 1

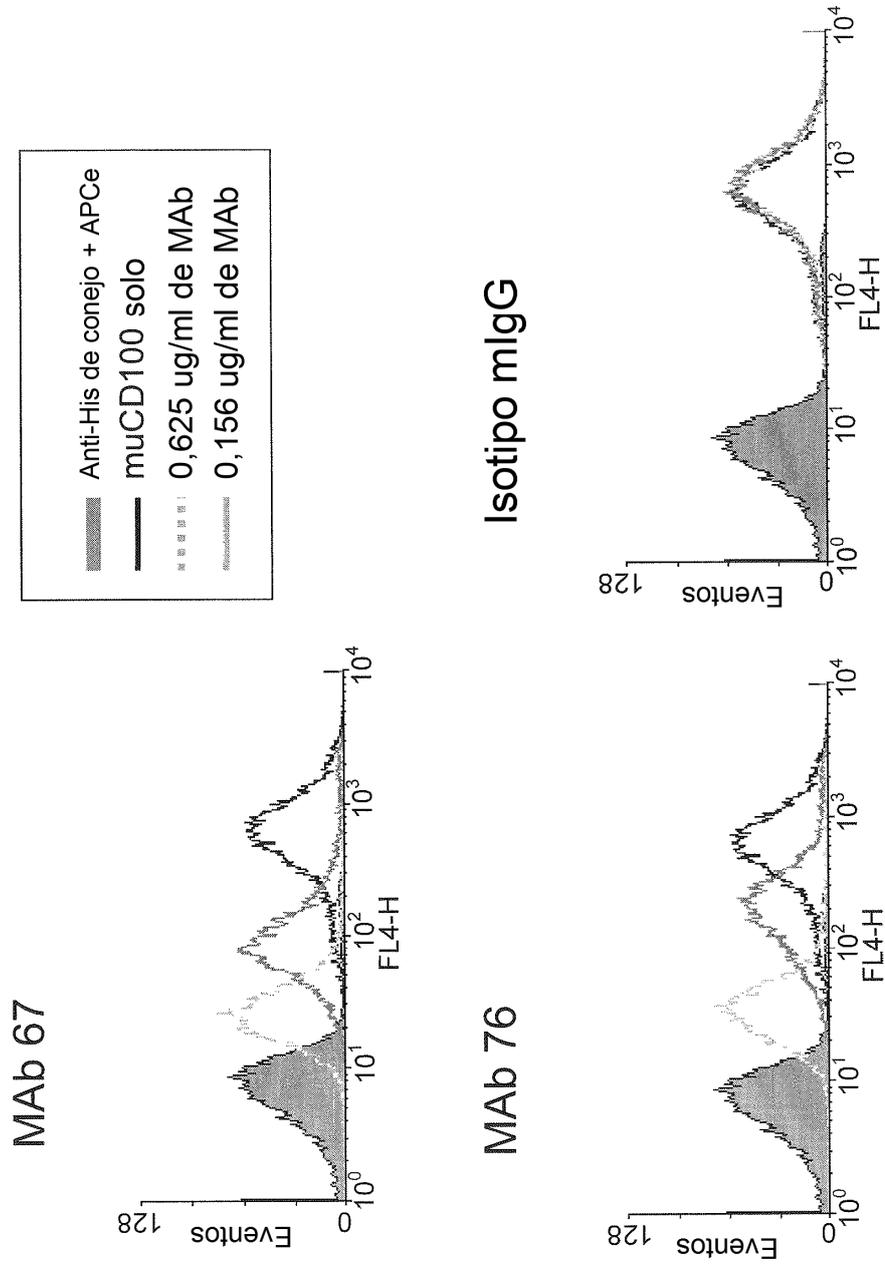


FIG. 2

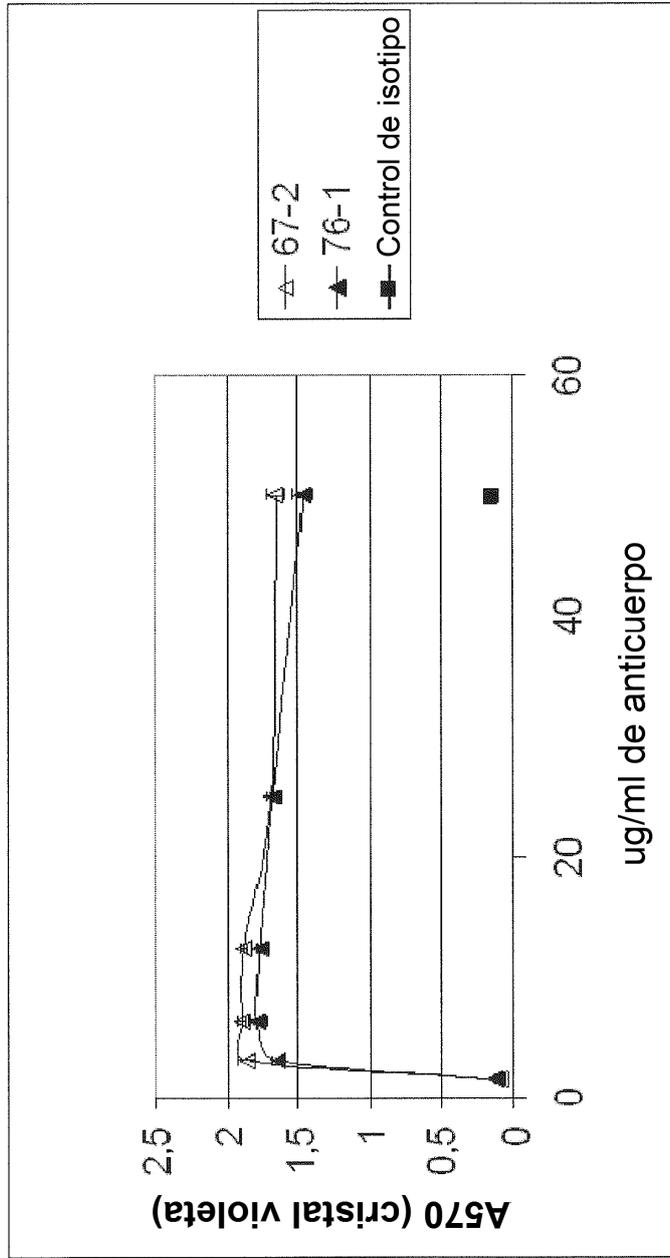


FIG. 3

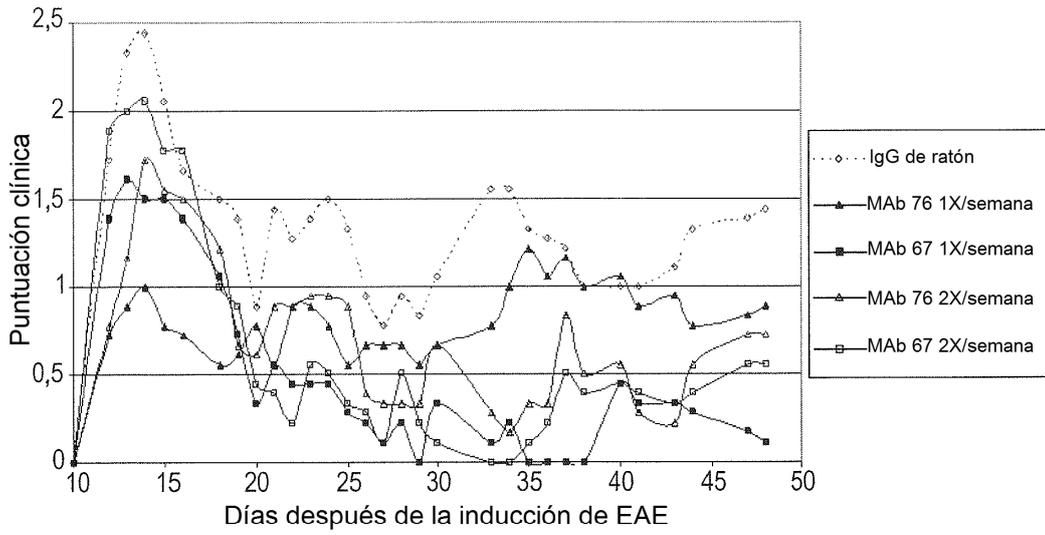


FIG. 4A

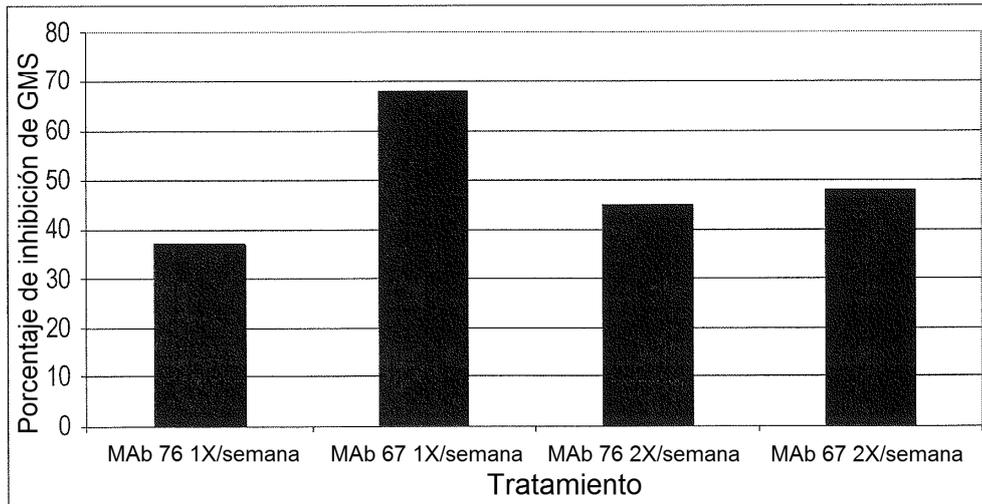


FIG. 4B

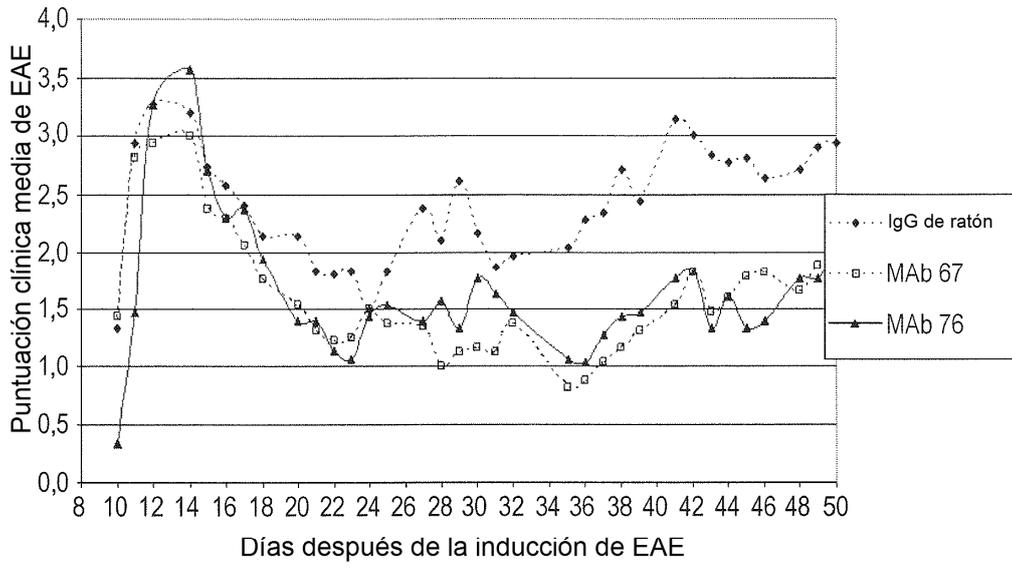


FIG. 5A

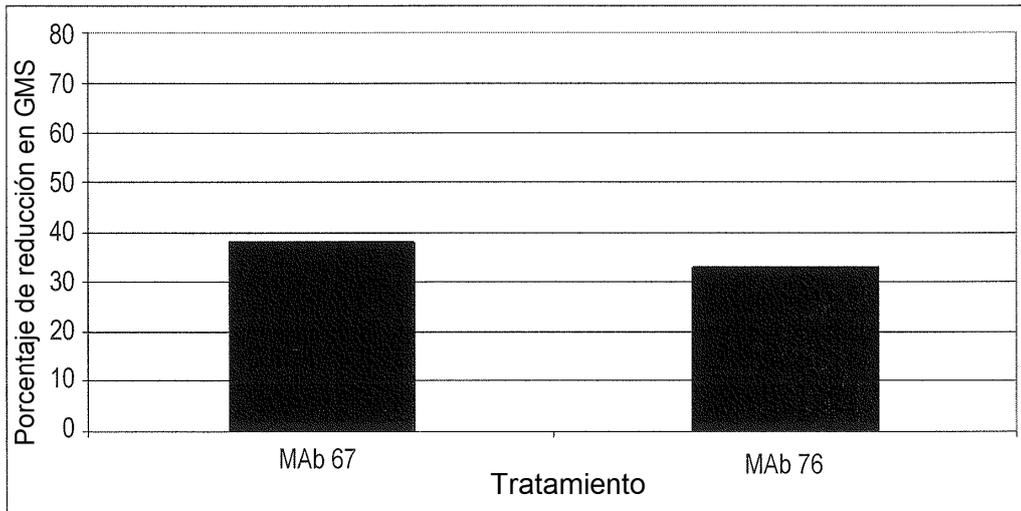


FIG. 5B

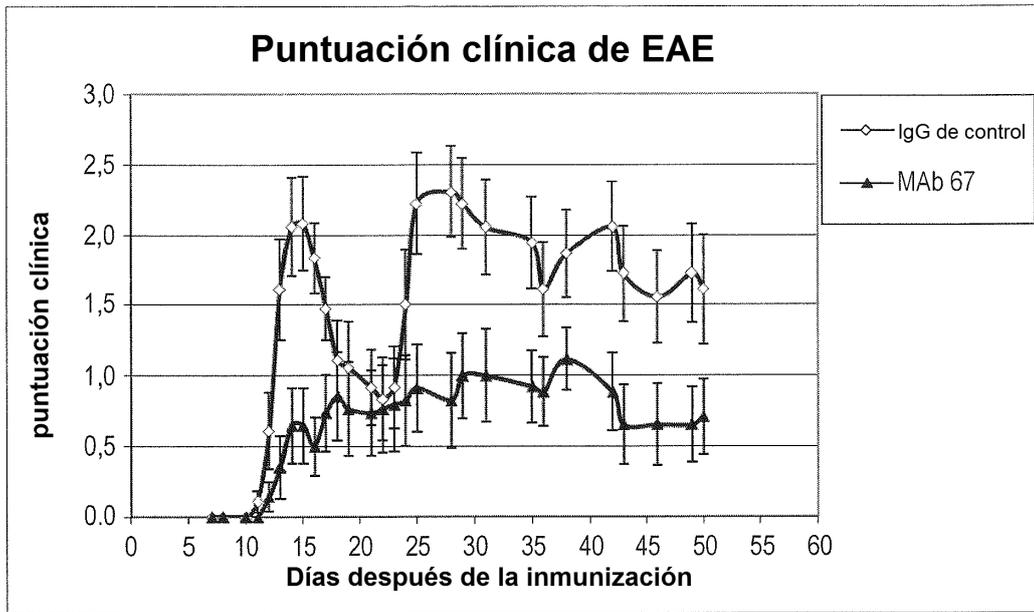


FIG. 6

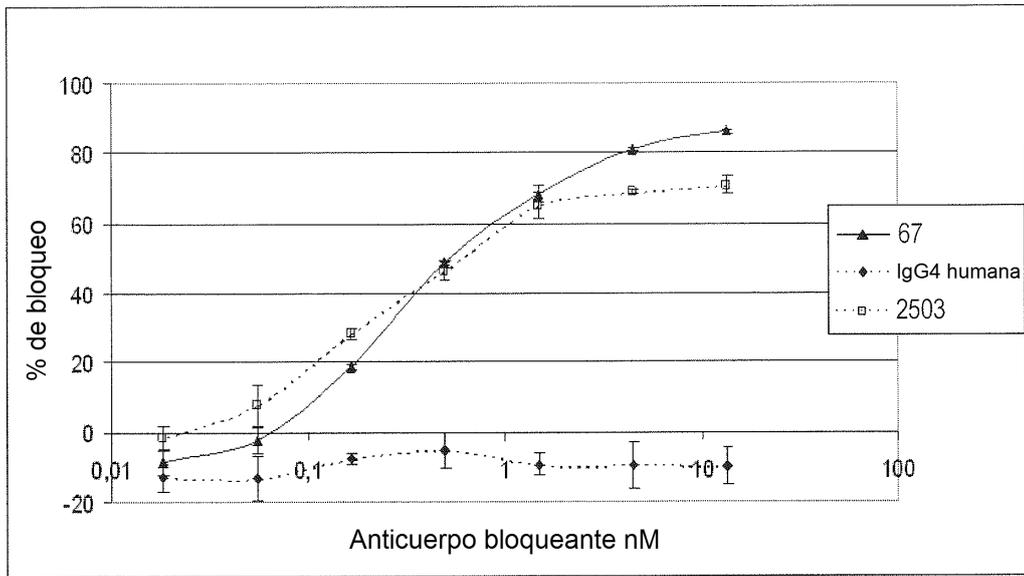


FIG. 7A

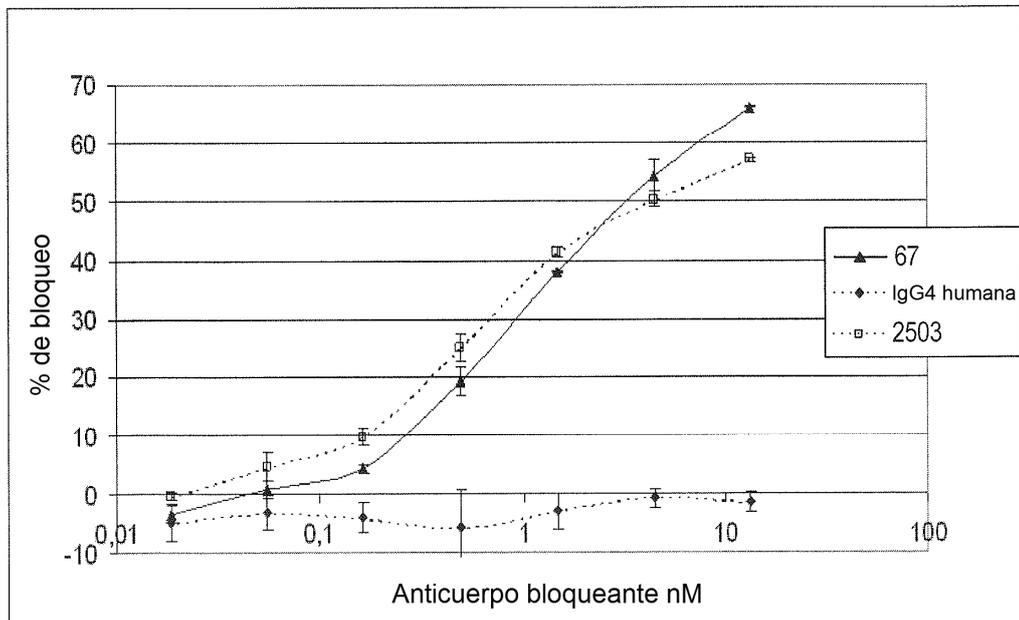
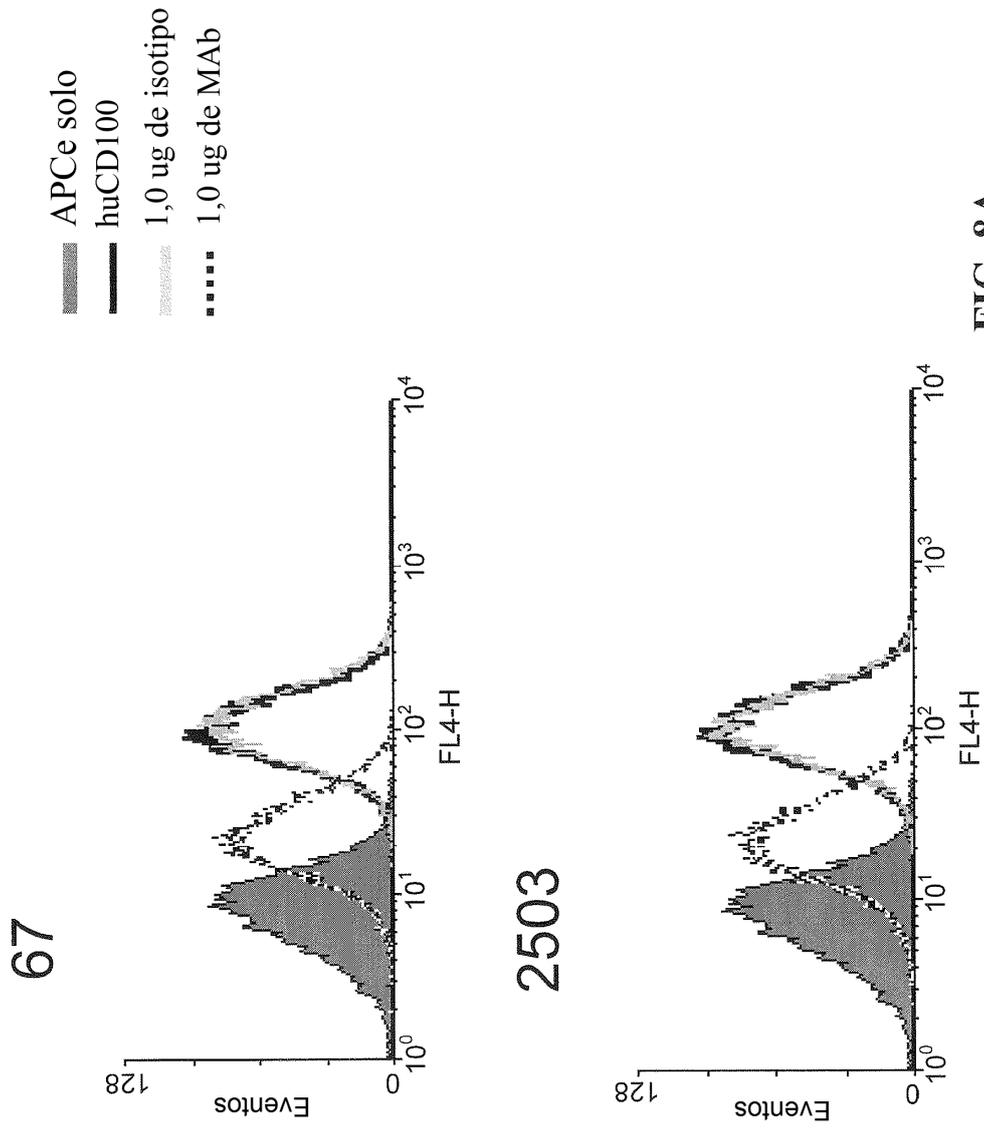


FIG. 7B



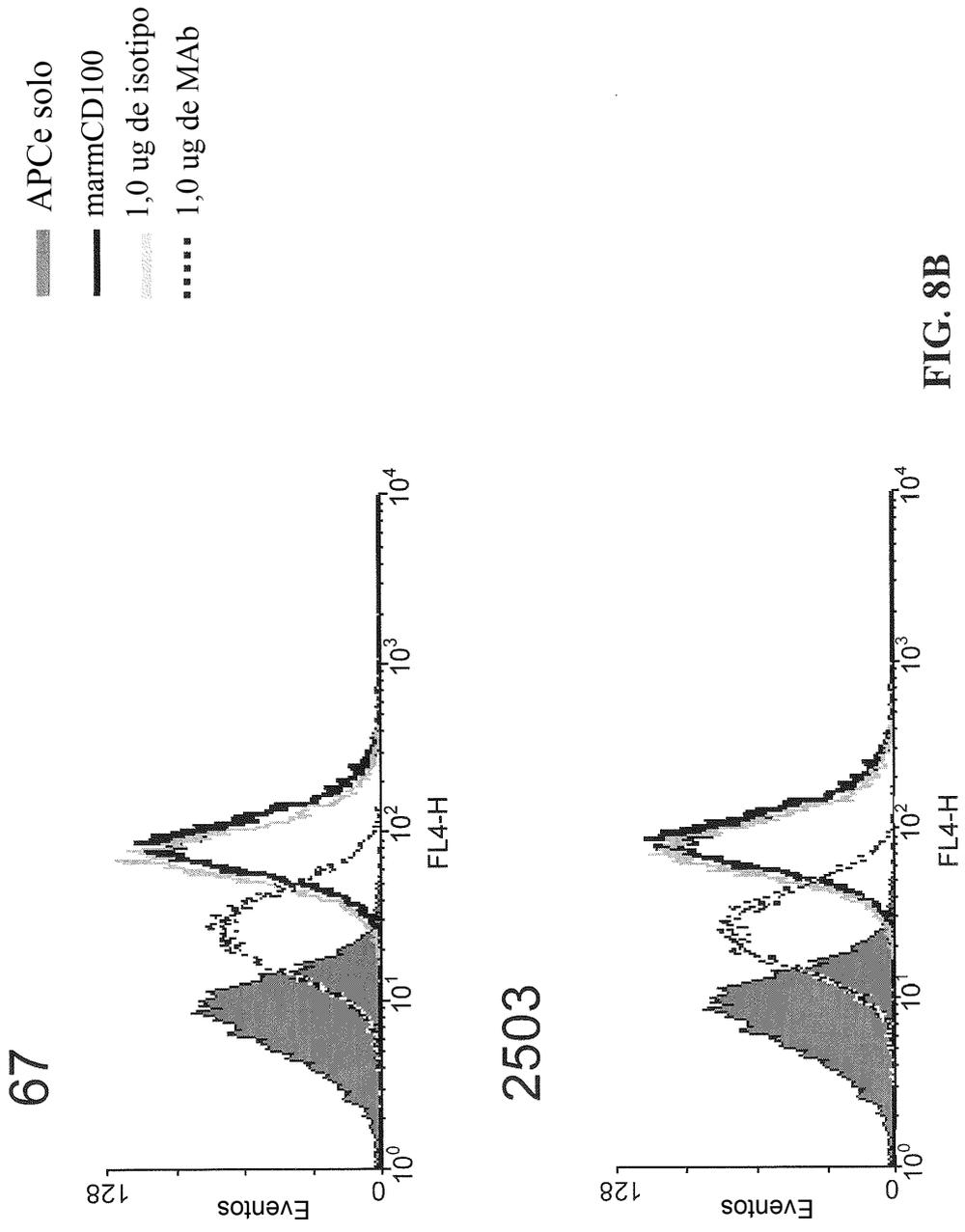
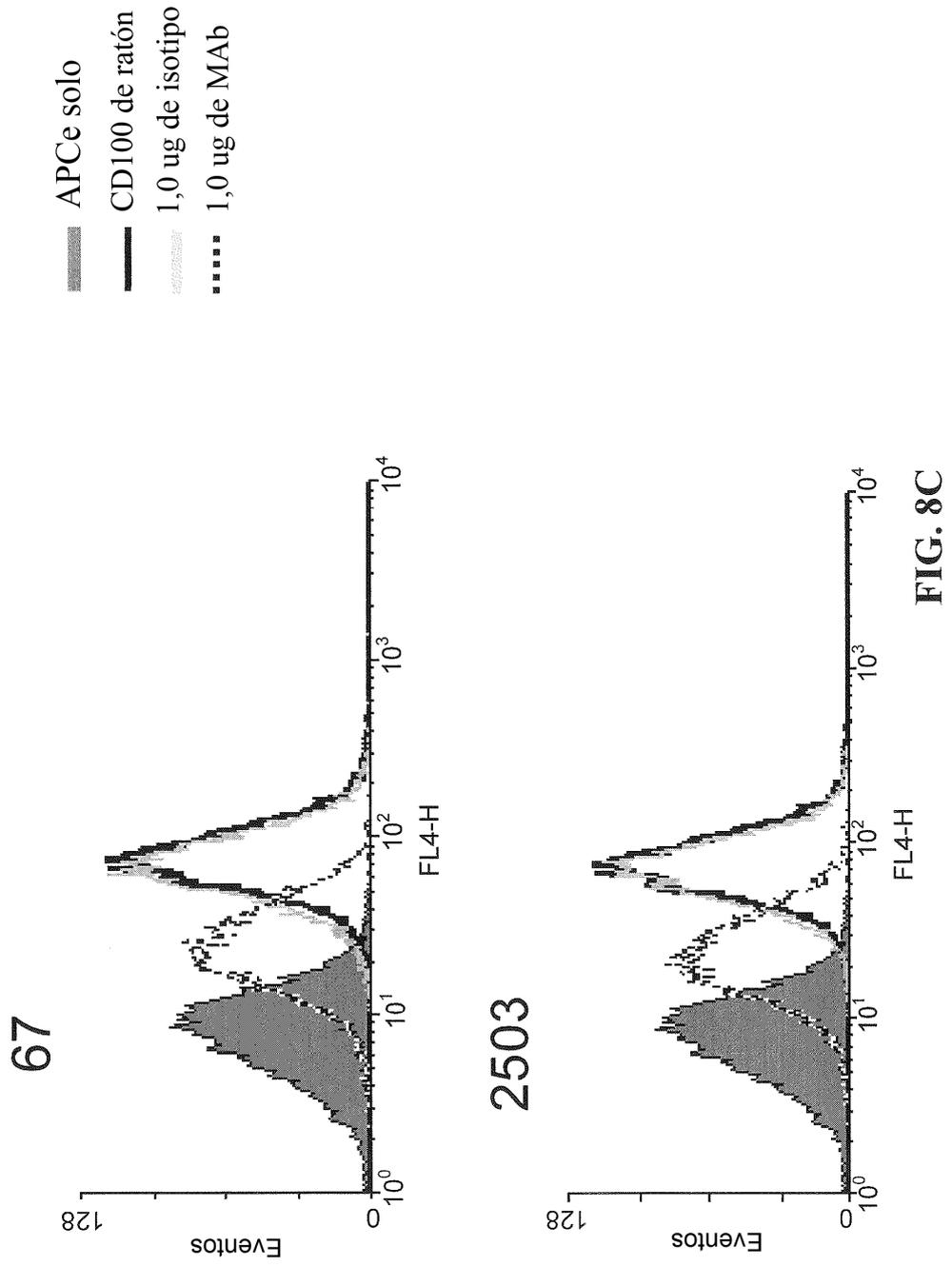


FIG. 8B



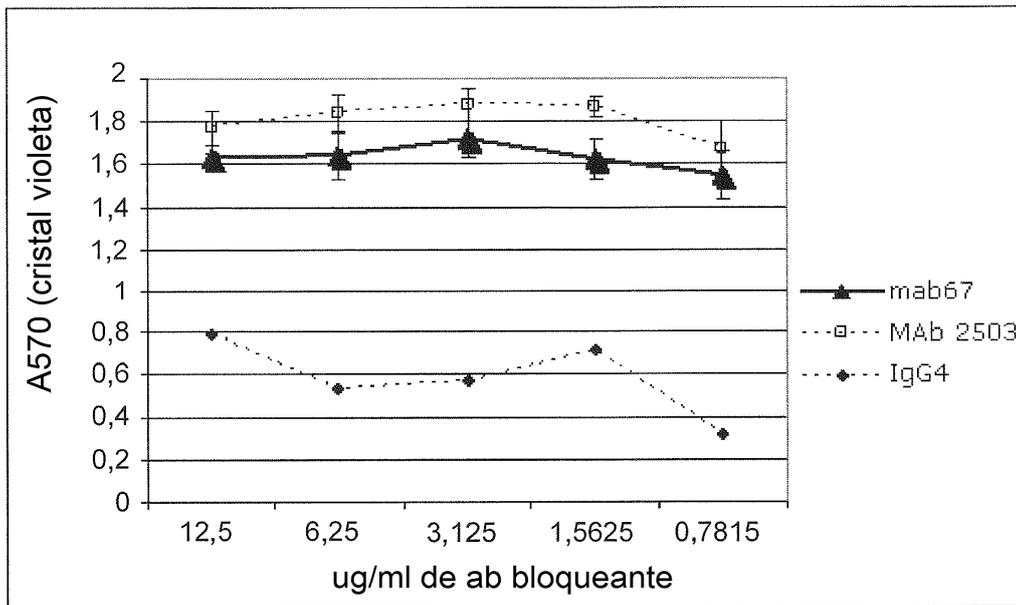


FIG. 9A

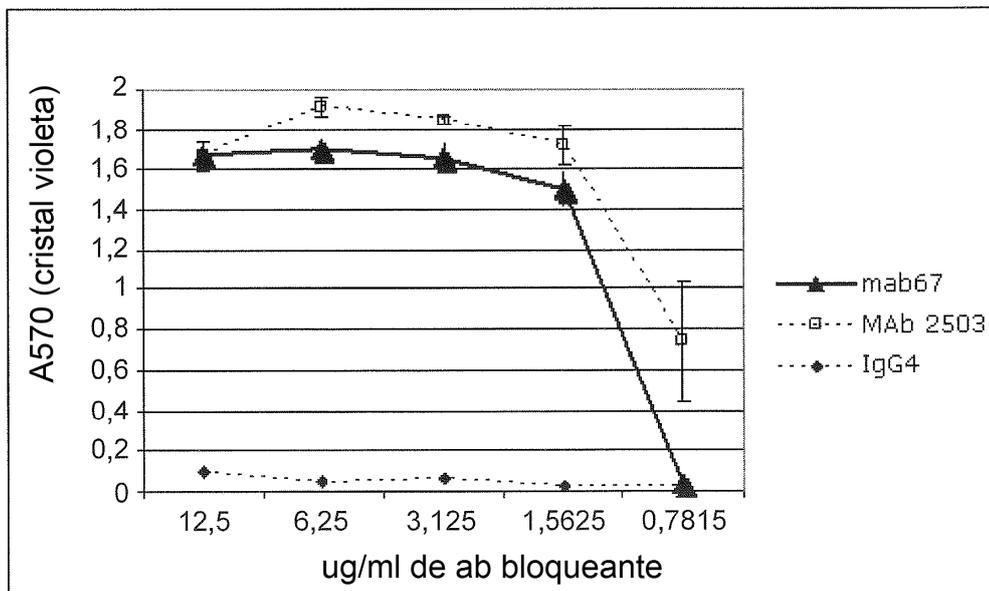


FIG. 9B

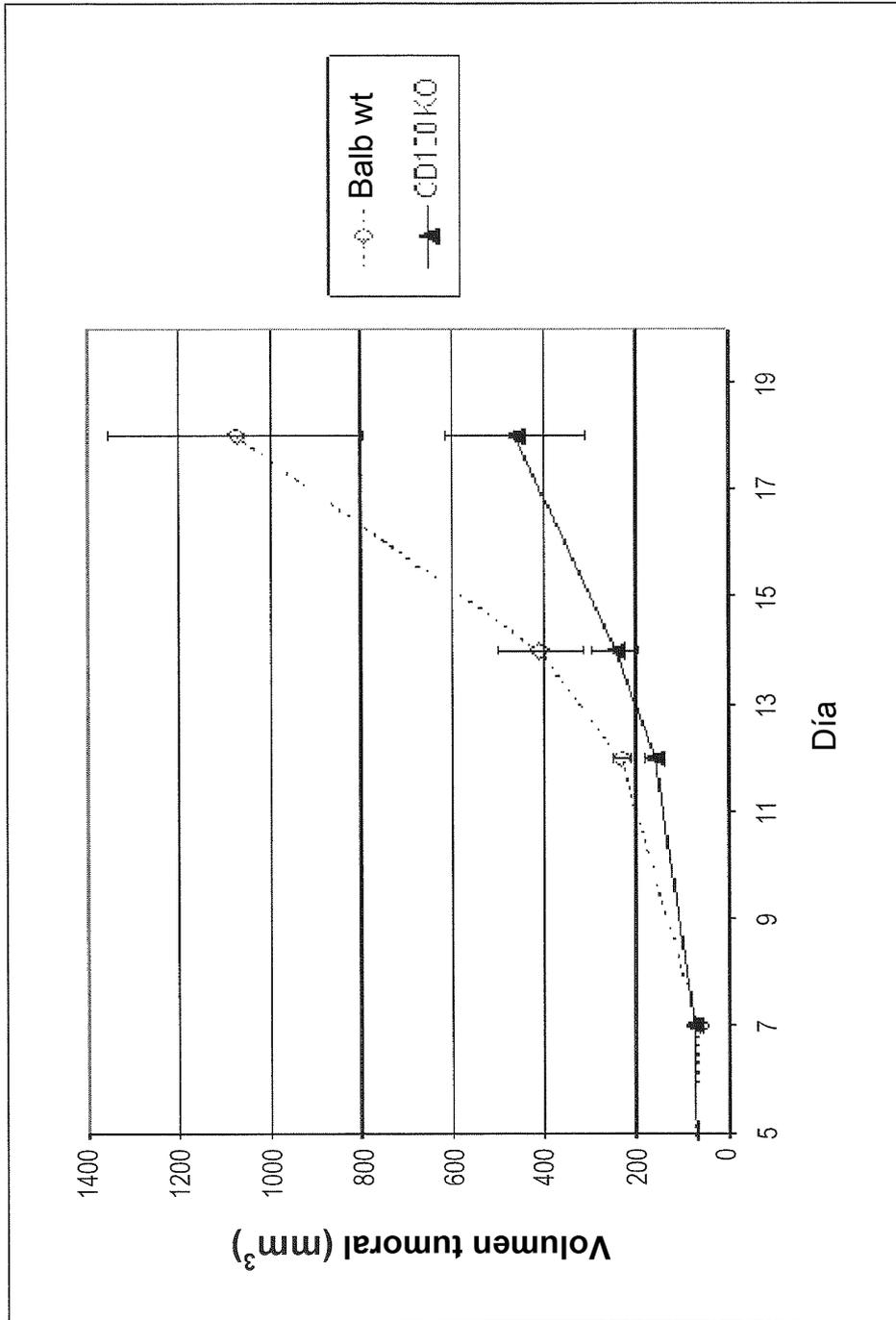


FIG. 10

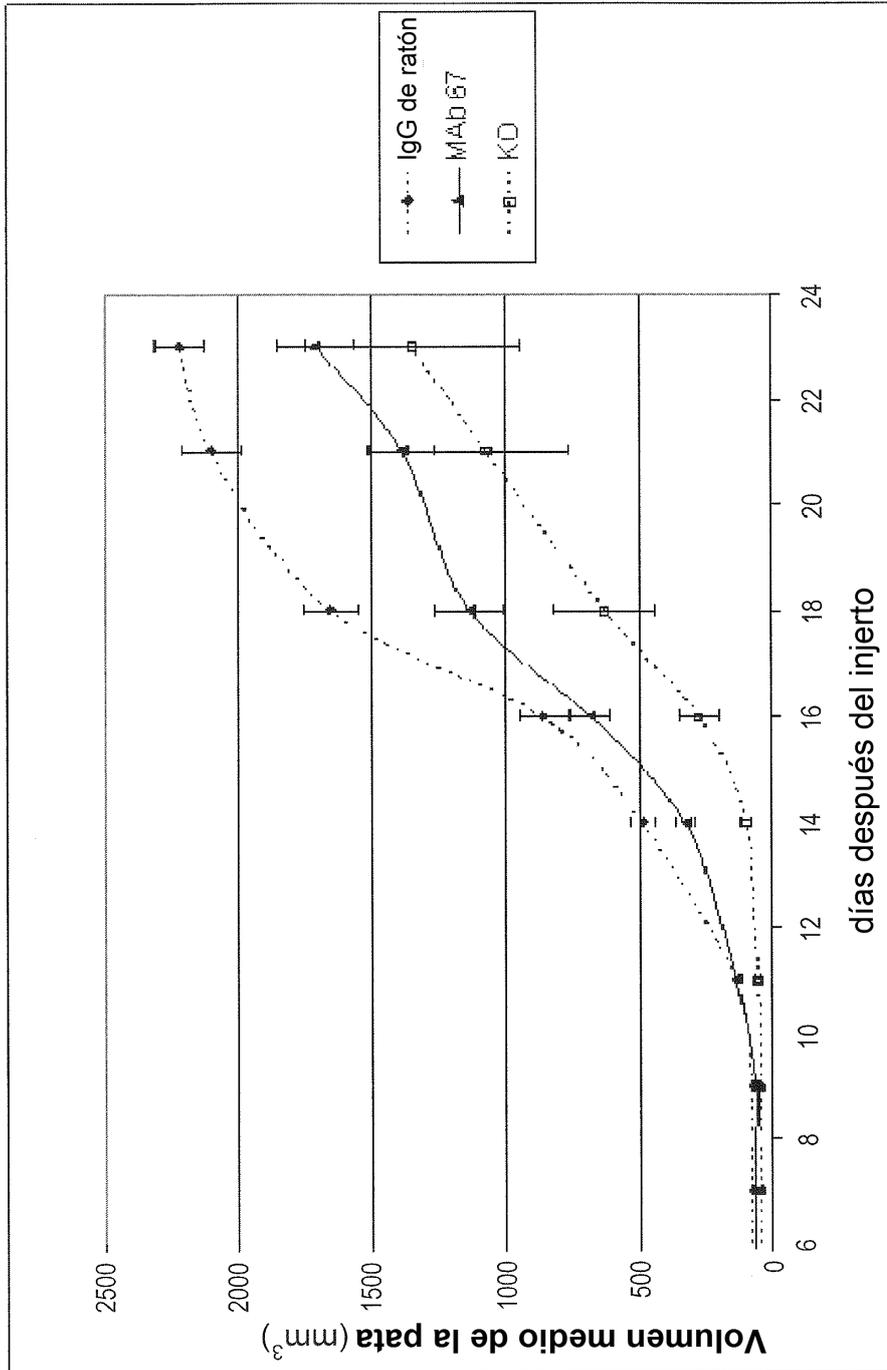


FIG. 11

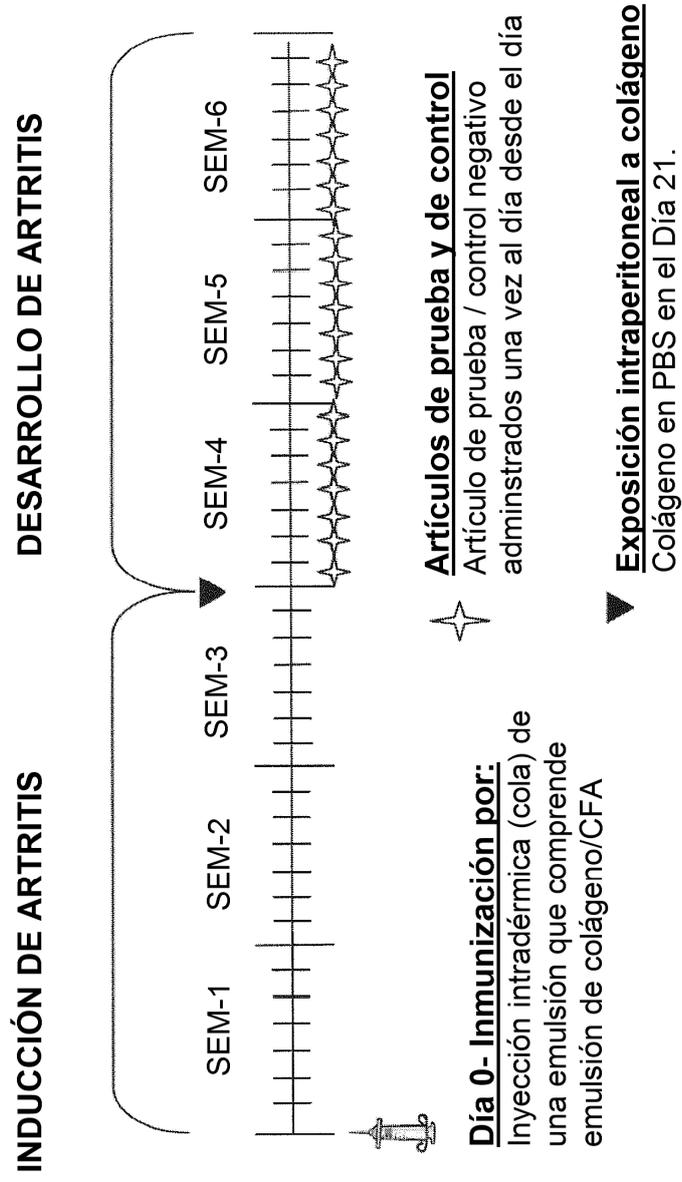


FIG. 12

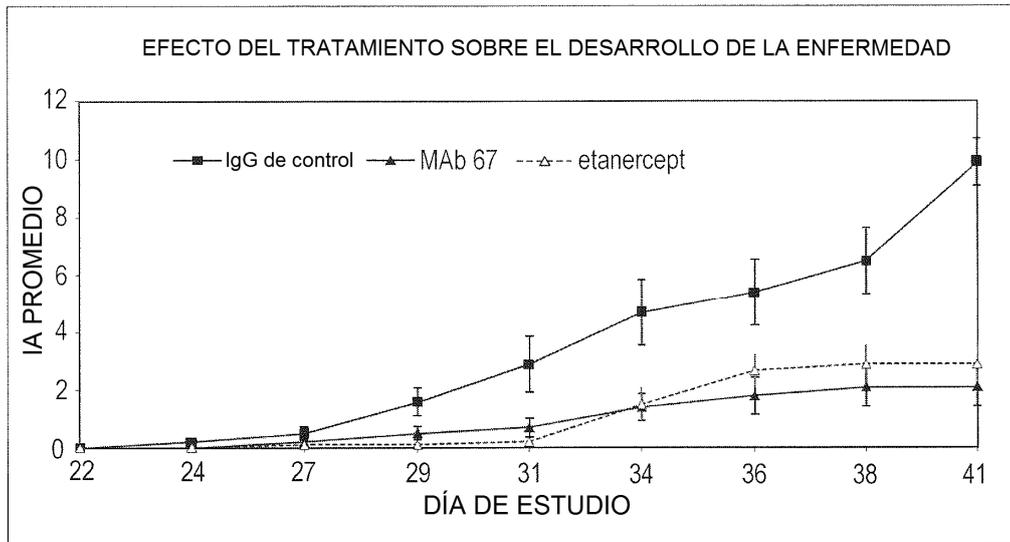


FIG. 13A

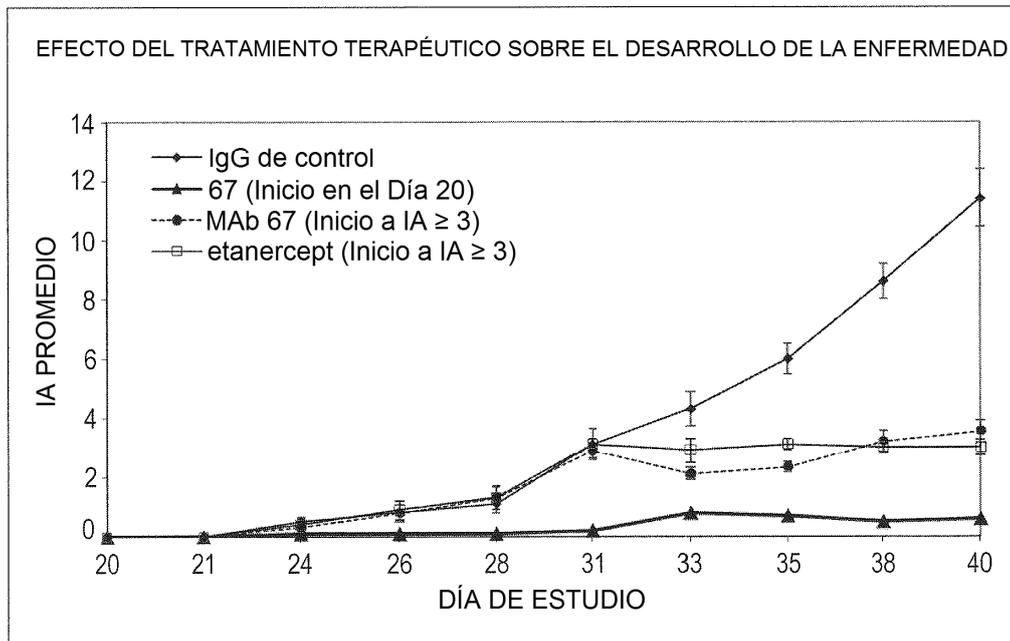


FIG. 13B

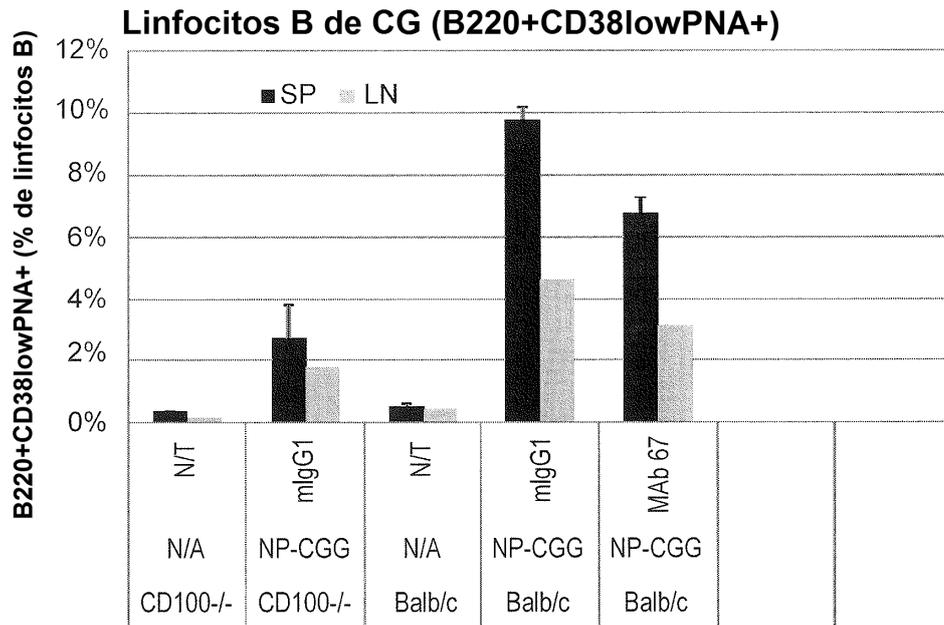


FIG. 14A

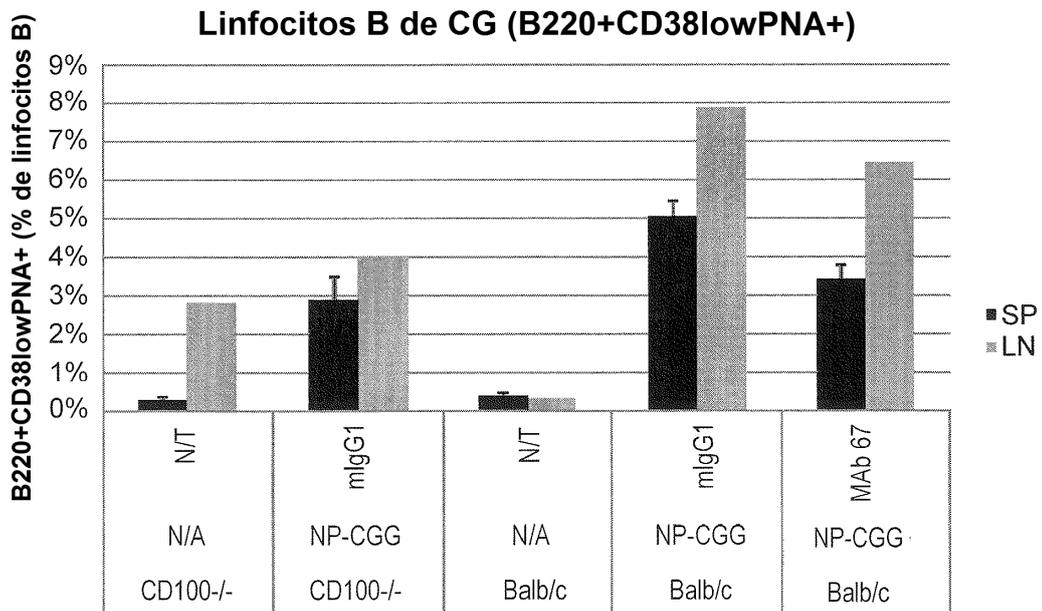


FIG. 14B

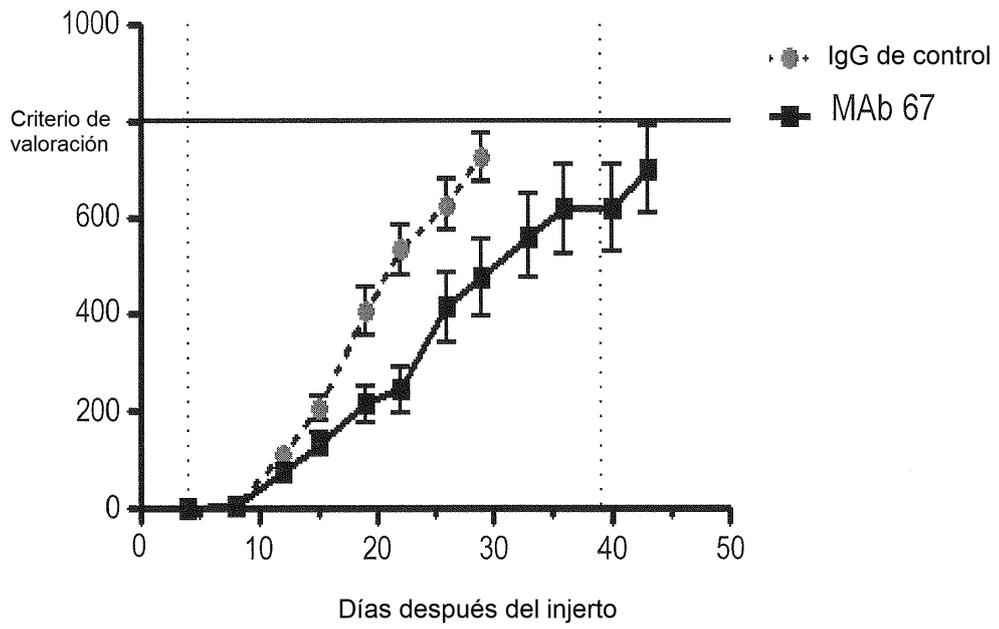


FIG. 15

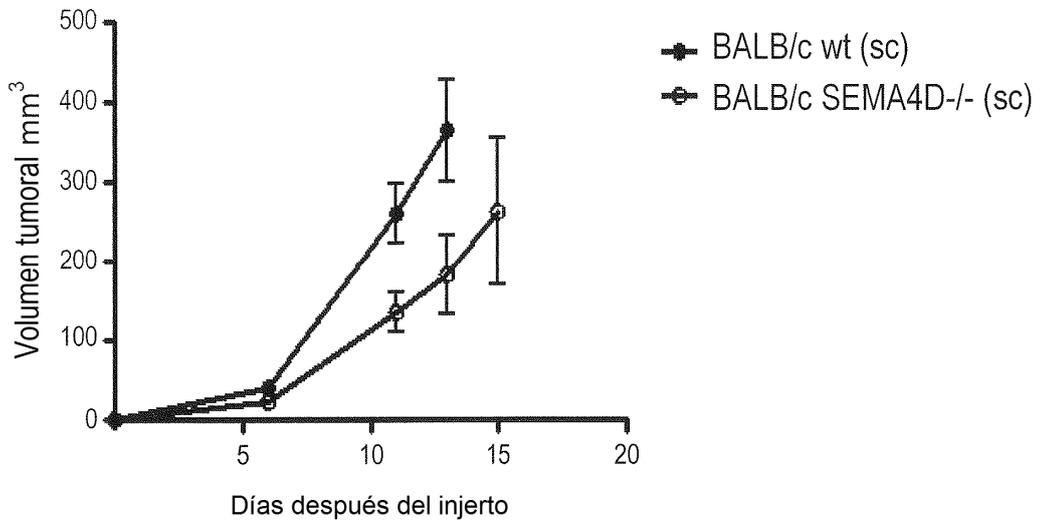


FIG. 16A

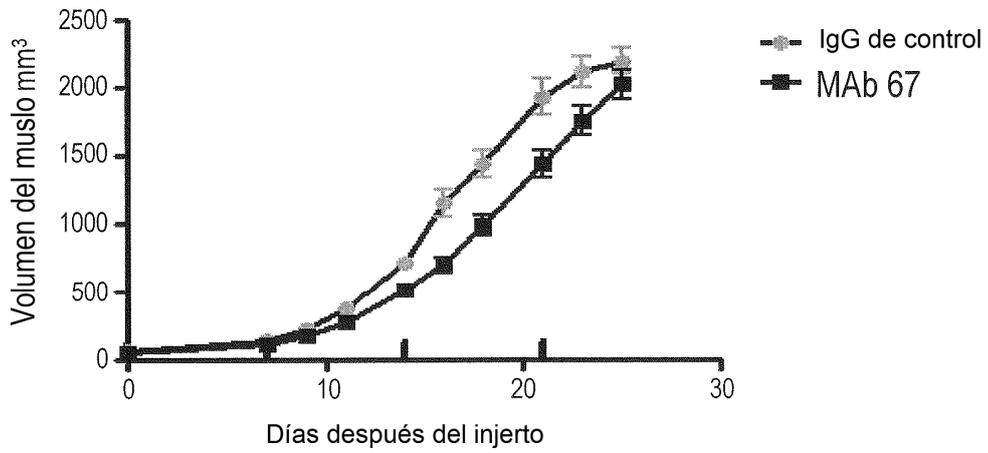


FIG. 16B

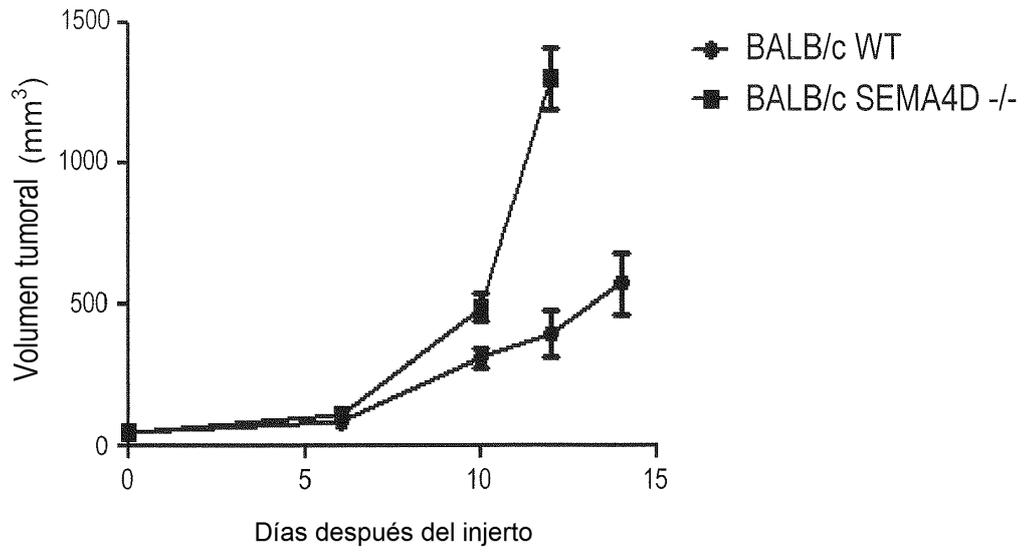


FIG. 17

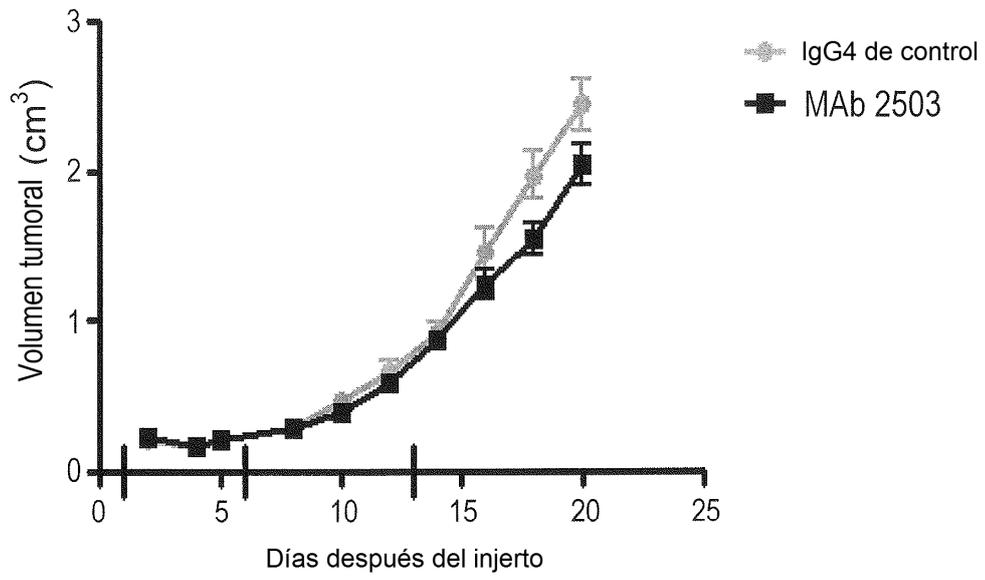


FIG. 18

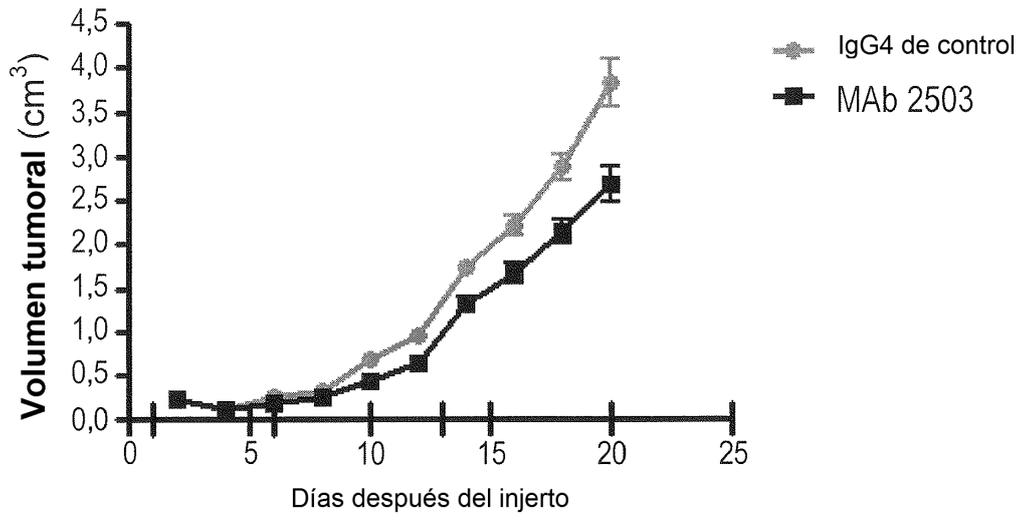


FIG. 19A

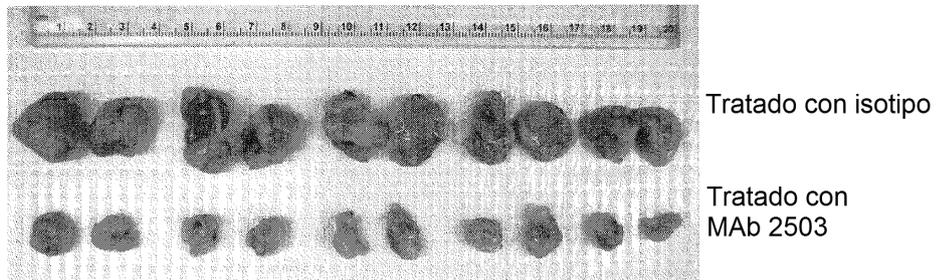


FIG. 19B

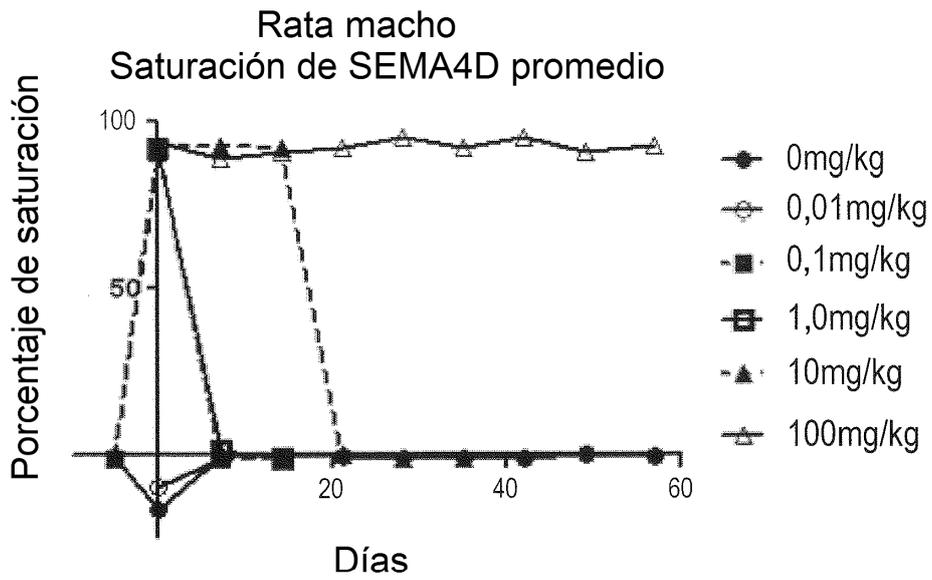


FIG. 20A

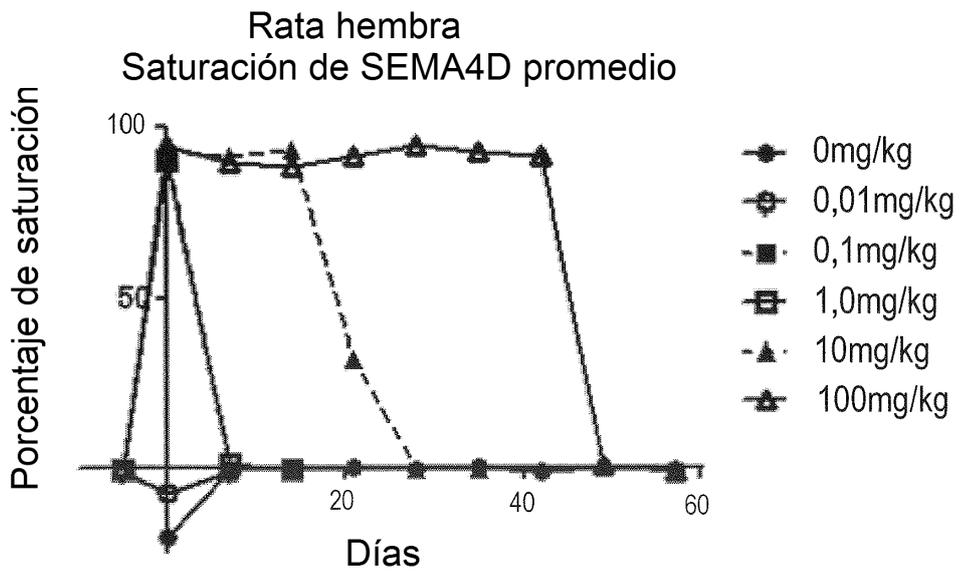


FIG. 20B

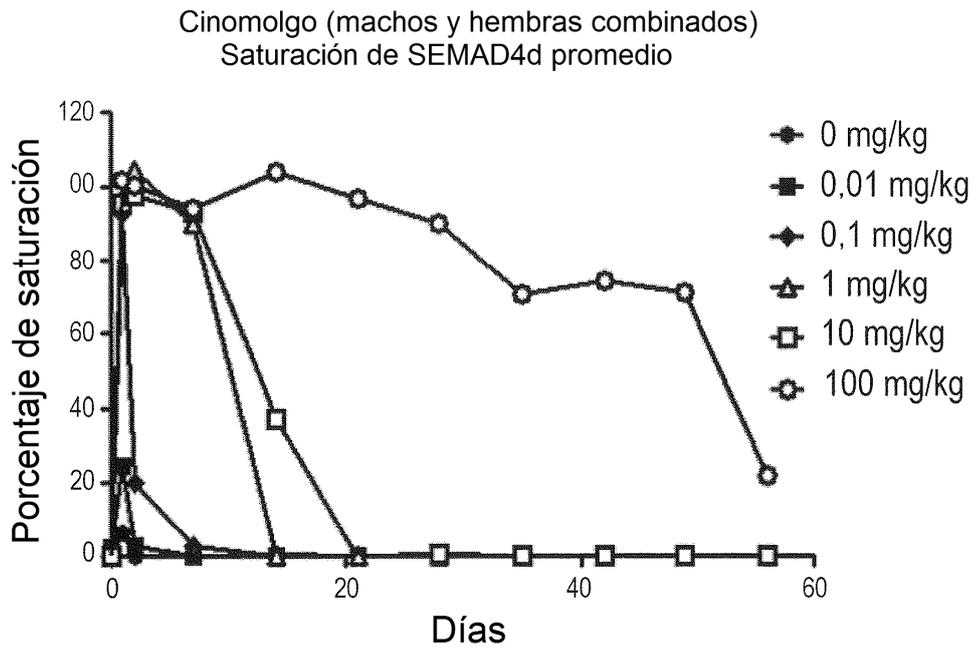


FIG. 21