

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 849**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.05.2010 PCT/CU2010/000002**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.11.2010 WO10127642**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2010 E 10721287 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2428521**

54 Título: **Anticuerpos antisulfátidos y proteoglicanos antisulfatados y su uso**

30 Prioridad:

04.05.2009 CU 20090071

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

28.02.2018

73 Titular/es:

**CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR
(100.0%)**

**Calle 216 y 15, Atabey Playa
Ciudad de la Habana 11600, CU**

72 Inventor/es:

**MATEO DE ACOSTA DEL RIO, CRISTINA;
VAZQUEZ LOPEZ, ANA, MARIA;
LOPEZ REQUENA, ALEJANDRO;
FERNANDEZ MARRERO, YUNIEL;
SOTO LOPEZ, YOSDEL y
BRITO NAVARRO, VICTOR**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

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

ES 2 656 849 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 antisulfátidos y proteoglicanos antisulfatados y su uso

Campo técnico.

5 La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos monoclonales (MAb) que reconocen específicamente y con alta afinidad sulfátidos y proteoglicanos sulfatados. También la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos monoclonales de la invención o fragmentos derivados de estos anticuerpos.

Técnica anterior

10 Después de más de 30 años del desarrollo de la tecnología de hibridoma para obtener MAb murínico (Koehler and Milstein Nature, 256: 495-497, (1975), han demostrado ser muy útiles en el diagnóstico de la enfermedad y la investigación básica, pero solo han sido registrados 20 Abs para terapia humana (Pharma Vitae, Monoclonal Abs Update, 6-363, 2008) Esto se ha debido en gran parte a su corta vida media en sangre y al pobre reconocimiento de las funciones efectoras murínicas por el sistema inmune humano, y también por la respuesta inmune debido al origen murínico de estos Abs cuando se inyectan en pacientes (respuesta HAMA, acrónimo de Abs humano anti-ratón). Varios estudios han demostrado que después de la administración de un anticuerpo extraño, la respuesta inmune producida en el paciente puede ser considerablemente fuerte y puede eliminar sustancialmente la utilidad terapéutica del anticuerpo después del tratamiento inicial. Además, después de administrar a un paciente un MAb murínico, los tratamientos posteriores con Abs de ratón no relacionados pueden no ser efectivos o incluso peligrosos debido a la respuesta HAMA de reactividad cruzada, de acuerdo con el informe de Khzaaeli, M.B. et al., Journal of Immunotherapy 15: 42 - 52 (1994). A partir de la información anterior, se hace necesario obtener versiones de Abs terapéuticos que son menos inmunogénicas en humanos, que se obtienen de manera fácil y económica y que son adecuadas para la fabricación de formulaciones terapéuticas y otros usos. Morrison S.L. et al., Adv. Immunol., 44: 65 - 92 (1989).

25 Se han desarrollado varios métodos para humanizar Abs de ratón o rata y así reducir la respuesta xenogénica contra estas proteínas extrañas cuando se inyectan en humanos. Uno de los primeros intentos para reducir la inmunogenicidad ha sido la generación de Abs "quiméricos", en los que los dominios variables de las proteínas murínicas se unen a dominios constantes de moléculas humanas, logrando no solo una inmunogenicidad reducida, sino también la activación de funciones efectoras inmunes. Morrison S.L. et al., PNAS USA, 81: 6851 - 6855 (1984). Estas moléculas quiméricas mantienen las características del anticuerpo original en relación con la unión al antígeno mientras que su región constante no es inmunogénica.

30 La aterosclerosis y sus consecuencias tienen un gran impacto en la población mundial y son la principal causa de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados (Melián, A. et al., Am. J. Pathol., 155: 775, 1999) y en Cuba desde hace varios años (OMS, 2004, Anuario Estadístico, MINSAP, 2007).

35 La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica de naturaleza multifactorial que contribuye en gran medida a la patogenia del infarto de miocardio y cerebro, la gangrena y la pérdida de las funciones de las extremidades. Greaves, D.R. et al., Trends Immunol 22: 180 - 181 (2001); Ross, R. et al., Am Heart J 138 (5 Pt 2): S419 - 20 (1999).

40 Una de las principales causas de la aterosclerosis es la hipercolesterolemia. Las lipoproteínas de bajo peso molecular (LDL) en tránsito a través de la pared arterial quedan atrapadas en la matriz extracelular de la íntima arterial, por interacciones con los proteoglicanos, y sufren modificaciones oxidativas. Las lipoproteínas unidas a los proteoglicanos de la íntima arterial son más susceptibles a los cambios en las unidades estructurales lipídicas y proteicas, tal como la oxidación y la hidrólisis enzimática, lo que aumenta su potencial aterogénico. ApoB-100 contiene varias regiones a través de las cuales se puede unir a las cadenas de glucosaminoglucanos de proteoglicanos, que tienen en común la presencia de múltiples aminoácidos básicos. Camejo, G., E. et al., Atherosclerosis 139: 205-22, (1998); Chang, T. Y. et al., Curr Opin Lipidol 12: 289-96 (2001); Camejo, G., U. et al., Atheroscler Suppl 3: 3-9 (2002).

45 La densidad de cargas negativas sobre glicosaminoglucanos influye en la interacción con LDL, para lo cual el grado de sulfatación afecta la interacción de LDL con proteoglicanos (Sambandam T. et al., Arterioascler Thromb, 11: 561-568 (1991)).

50 Además, las LDL oxidadas pueden ser internalizadas por los macrófagos a través de receptores depuradores en la superficie de estas células, lo que conduce a la acumulación de colesterol intracelular con la subsecuente formación de células espumosas. Estos eventos representan los principales pasos para iniciar la respuesta inflamatoria, con la participación de monocitos/macrófagos, mastocitos, células dendríticas, células T y NKT. Camejo, G. et al., Atherosclerosis 139 (2): 205 - 22 (1998); Hurt-Camejo, E. et al., Invest Clin 42 Suppl 1: 43-73 (2001); Skalen, K., M. et al., Nature 417: 750 - 754 (2002).

55 Existen evidencias experimentales que demuestran la participación de los proteoglicanos presentes en la superficie de los macrófagos en la unión de las LDL oxidadas a estas células y en la internalización o incorporación de estas

partículas, lo que finalmente provoca la formación de células espumosas. Halvorsen B. et al., *Biochem J.* 331: 743 - 752 (1998).

5 Es indiscutible que la adopción de estilos de vida más sanos junto con el uso de agentes antitrombóticos y reductores de lípidos ha tenido un impacto en la reducción del riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares, pero estas estrategias aún son insuficientes para eliminar completamente estos riesgos.

Como se mencionó anteriormente, la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria multifactorial donde son importantes múltiples antígenos en su desarrollo, por lo que se están desarrollando diferentes estrategias para la inmunoterapia activa y pasiva con el objetivo de lograr un mayor impacto terapéutico en esta enfermedad.

10 Una de estas estrategias son las terapias para aumentar el HDL, debido a la relación inversa entre el colesterol HDL y la enfermedad cardiovascular. El CETP es una enzima clave en el metabolismo del HDL y se considera un objetivo potencial para la terapia ya que la reducción de su actividad aumenta los niveles de HDL. La estrategia de usar vacunas que inducen Abs capaz de unirse e inhibir la función de CETP se ha descrito en WO 1997/041227 y WO 2006/133196. Sin embargo, estudios recientes que muestran el fracaso de un ensayo clínico de Fase III usando el inhibidor de la CETP Torcetrapib han arrojado dudas sobre esta estrategia. Nicholls S.J. et al., *Circulation.* 9; 118: 2506 - 14 (2008); Hermann M. et al., *Curr Hypertens Rep.* 11: 76-80 (2009).

20 Algunos autores han descrito vacunas que usan LDL oxidadas como inmunógenos con el fin de inhibir la formación de placas ateroscleróticas. Palinski W. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:821-25 (1995); Ameli S et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16:1074-79 (1996); Freigang S. et al., *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 18:1972-82 9 (1998); Zhou X. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:108-14 (2001); George J. et al., *Atherosclerosis* 138:147-52 (1998); Fredrikson G.N. et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:879-84 (2003); US 2008/0070265A1.

Otra estrategia es el desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas basadas en fragmentos específicos de la apolipoproteína C-III oxidada, con el objetivo de inducir una respuesta inmune capaz de prevenir o reducir la formación de lesiones ateroscleróticas (WO 2001/064008, WO 2003/020765, WO 2004/080375 y WO 2004/081045).

25 Otro enfoque de vacuna descrito se basa en un péptido conjugado con un aldehído tal como MDA o 4-HNE para inducir Abs que interactúan con los receptores alfa/beta de las células T, que previene la formación de lesiones ateroscleróticas (WO2001/068119).

Algunos autores han defendido la importancia de las vacunas contra los patógenos en la aterosclerosis para evitar el desarrollo de placas ateroscleróticas (WO1998/033510, US 006291437 B1, US 6471965 B1, US006808713 B1).

30 Otra estrategia propuesta para retrasar o reducir la gravedad de la aterosclerosis, causada por la ingestión de colesterol en la dieta, es el uso de vacunas contra esteroides (US 2002/0018808 A1).

La inmunoterapia pasiva como una herramienta terapéutica también puede jugar un papel importante en la aterosclerosis. Se ha descrito la inmunización pasiva para tratar o prevenir la aterosclerosis usando Abs humano contra fragmentos oxidados o modificados de Apo B100 (US 005196324^a, US 2007/0098725 A1, US 2008/0075716 A1).

35 Adicionalmente, se ha propuesto la inmunización pasiva con Abs específicos para fosforilcolina como una combinación terapéutica para el tratamiento o la prevención de la aterosclerosis (US 2007/0286868 A1, documento US 2007/0122419 A1).

Otra estrategia descrita es el uso de Abs o fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a M-CSF humano (US 2007326414 B2).

40 El uso de MAb que previene la adhesión de monocitos al endotelio vascular y así evita la invasión al endotelio y a los tejidos circundantes por estas células, es otro enfoque terapéutico para esta enfermedad (US 005541296 A).

Se ha descrito el uso de Abs monoclonales como inhibidores del receptor de la glicoproteína IIb/IIIa y, por lo tanto, de la agregación plaquetaria (WO 1999/052551, documento US 005976532 A).

45 Además, se obtuvieron Abs monoclonales humanos contra los epítomos peptídicos protectores de la apolipoproteína CIII para usar en inmunoterapia pasiva (WO 2004/081046).

Además, el uso de inmunoglobulina intravenosa (IGIV) puede tener un efecto ateroprotector. Udi N et al., *Autoimmunity reviews* 7: 445-452 (2008).

50 No se han descrito MAbs quiméricos que reaccionen con glicosaminoglicanos sulfatados y sulfatados o que reconozcan macrófagos y lesiones ateroscleróticas, con la capacidad de inhibir la formación de lesiones ateroscleróticas cuando se administran en dosis bajas e inducir una respuesta de anticuerpos contra estas moléculas sulfatadas.

El documento EP1411064 describe anticuerpos recombinantes asociados a gangliósidos y el uso de los mismos en el diagnóstico y el tratamiento de tumores. López-Requena et al. describen las bases moleculares para la

interacción de un anticuerpo monoclonal (mAb) y su mAb antiidiotípico (Lopez-Requena et al., Molecular Immunology 44 (2007), 423-433).

Descripción detallada de la invención:

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1. Los Abs antisulfátidos y proteoglicanos antisulfatados de la invención son monoclonales. También se describen aquí fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH y F(ab')₂ del Abs antisulfátido y proteoglicano antisulfatado proporcionados en la presente especificación. Estos fragmentos de Ab pueden crearse por medios tradicionales, como la digestión enzimática, o pueden producirse mediante técnicas recombinantes. Estos fragmentos de Ab pueden ser quiméricos o humanizados. Estos fragmentos son útiles para fines de diagnóstico y terapéuticos expuestos en esta descripción. También se describen en la presente memoria Abs y fragmentos sustancialmente puros.

10 En una realización particular, el Ab de la presente invención se caracteriza por las siguientes secuencias de la región variable de cadenas pesada y ligera:

Cadena pesada:

HCDR1 SEQ ID NO:1 RYSVH
 15 HCDR2 SEQ ID NO:2 MIWGGGSTDYNSALKS
 HCDR3 SEQ ID NO:3 SGVRRGRAQAWFAY
 HFR1 SEQ ID NO:7 QVQLKESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSL
 HFR2 SEQ ID NO:8 WVRQPPGKGLEWLG
 HFR3 SEQ ID NO:9 RLSISKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAMYYCAR
 20 HFR4 SEQ ID NO:10 WGQGTTLVTVSA

Cadena ligera:

LCDR1 SEQ ID NO:4 KASQDVSTAVA
 LCDR2 SEQ ID NO:5 SASRYT
 LCDR3 SEQ ID NO:6 QQHYPSTPWT
 25 LFR1 SEQ ID NO:11 DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC
 LFR2 SEQ ID NO:12 WYQQKPGQSPKLLIY
 LFR3 SEQ ID NO:13 GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYC
 LFR4 SEQ ID NO:14 FGGGTKLELK

30 Adicionalmente, el anticuerpo de la invención puede incluir regiones constantes de IgG1 humana para cadena pesada y C_κ humana para cadena ligera.

Esta invención proporciona además una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5. Como se usa en esta especificación, las composiciones comprenden uno o más Abs que se unen a sulfatidos y proteoglicanos sulfatados.

35 Estas composiciones pueden comprender además vehículos adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen soluciones reguladas o adyuvantes, que son bien conocidos en el estado de la técnica.

También se describe aquí una composición farmacéutica que comprende el MAb cuyas secuencias de región variable de cadenas pesadas y ligeras se muestran a continuación.

Cadena pesada:

HCDR1 RYSVH
 40 HCDR2 MIWGGGSTDYNSALKS
 HCDR3 SGVRRGRAQAWFAY
 HFR1 QVQLKESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSL
 HFR2 WVRQPPGKGLEWLG

HFR3 RLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCAR

HFR4 WGQGTLVTVSA

Cadena ligera:

LCDR1 KASQDVSTAVA

5 LCDR2 SASYRYT

LCDR3 QQHYSTPWT

LFR1 DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC

LFR2 WYQQKPGQSPKLLIY

LFR3 GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYC

10 LFR4 FGGGTKLELK

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un kit de reactivos de acuerdo con la reivindicación 7. Y más particularmente al conjunto de reactivos que comprende el MAb con las secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera descrita anteriormente. La invención proporciona además una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 8.

15 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un uso de acuerdo con la reivindicación 10. Se describe aquí el uso de Abs de la invención para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, particularmente aquellas que muestran evidencia de lesiones ateroscleróticas.

El término anticuerpo, generalmente se refiere a un MAb y más particularmente a un MAb murínico o Ab quimérico.

La invención también proporciona una vacuna según la reivindicación 12.

20 Obteniendo el anticuerpo:

En general, los MAb anti-sulfatido y proteoglicanos anti-sulfatados de la invención pueden obtenerse mediante el método de hibridoma, descrito por primera vez en Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975), a partir de ratones inmunizados con extractos glicolipídicos obtenidos de fuentes naturales o sintéticas. Las células del bazo de ratones inmunizados se fusionan con células de mieloma P3.X63Ag8 6.5.3, se cultivan en medio selectivo como se describe y los clones productores se seleccionan por detección de inmunoglobulinas en el sobrenadante del cultivo mediante ELISA.

25 Después de identificar las células de hibridoma que producen Abs con la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones productores de Ab se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y se pueden cultivar mediante métodos estándar de crecimiento de cultivos celulares (Goding, Monoclonal Abs: Principles and Practice, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Adicionalmente, las células de hibridoma pueden cultivarse in vivo en un animal en forma de tumor de ascitis.

30 Los MABs secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido de ascitis o suero mediante procedimientos convencionales para la purificación de inmunoglobulinas, por ejemplo, proteína A-sefariosa, cromatografía con hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

35 Los anticuerpos de la invención también se pueden obtener mediante técnicas de ingeniería genética que manipulen adecuadamente los genes de inmunoglobulina murínica. Por ejemplo, los Abs quiméricos de la invención pueden obtenerse a partir de ARN purificado de células que producen Abs monoclonales murínicos mediante técnicas convencionales para la manipulación de genes, tales como amplificación, clonación, secuenciación génica y digestión, entre otros descritos en el estado de la técnica, por ejemplo en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Current Protocols in molecular biology (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); la serie Methods in Enzimology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A practical approach (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ABS, A laboratory manual, and Animal cell culture (R. I. Freshney, ed. (1987)).

40 La síntesis de ADNc y amplificación por PCR (el acrónimo de Reacción en cadena de la polimerasa) de las regiones variables de Ab se puede realizar a partir del ARN que codifica el Ab murínico, el ADNc se sintetiza, las regiones variables VK y VH se amplifican mediante PCR, esto puede hacerse siguiendo las técnicas convencionales descritas para el propósito en el estado de la técnica.

45 Los productos de las PCR para cada una de las cadenas pesada y ligera, respectivamente, se clonaron en los vectores usados para la secuenciación de genes. Los clones resultantes se secuencian utilizando cualquiera de los

métodos descritos para este fin, por ejemplo, el método de los didesoxinucleótidos que usa ADN polimerasa T7 de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

5 Los genes de la región variable de las cadenas VH pesadas y VK ligeras se obtienen por restricción enzimática de las construcciones intermedias y se clonan en los respectivos vectores de expresión de acuerdo con técnicas convencionales para la construcción de genes quiméricos. Para tales propósitos, son útiles cualesquiera de los vectores descritos para la expresión eficiente de proteínas recombinantes, particularmente MAbs.

10 Para la expresión de Ab quiméricos, se pueden usar células NS0, que se electroporan con constructos de ADN en los respectivos vectores de expresión que contienen los genes de Ab. Estas células crecen en el medio selectivo. La detección de clones productores de inmunoglobulina se realiza mediante la medición en el sobrenadante de los cultivos usando un ELISA (ensayo de inmunoabsorbente enlazado a enzimas).

Selección de Abs con la especificidad y función deseadas:

Como se describe aquí, los Ab de la presente invención se pueden detectar mediante diversas técnicas descritas para este fin en el estado de la técnica, por ejemplo, mediante un ELISA.

15 Como se describe aquí, la actividad biológica de los Ab producidos puede analizarse. Como se describe aquí, los Ab de la invención se pueden probar para determinar su actividad de unión a antígeno.

20 Los ensayos de unión a antígeno conocidos en la especialidad y que se pueden usar en la presente especificación incluyen, entre otros, ensayos de unión directos o competitivos que utilizan técnicas tales como inmunotransferencia Western, radioinmunoensayos, ELISA, doble inmunoensayo de anticuerpos (sándwich), ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A. Los ensayos ilustrativos para la unión al antígeno se incluyen más adelante en la sección de Ejemplos.

Adicionalmente, pueden identificarse aquellos clones que producen Abs capaces de reconocer placas ateroscleróticas en secciones de tejido aórtico humano, esto puede hacerse usando técnicas inmunohistoquímicas convencionales descritas en el estado de la técnica.

25 Se describe adicionalmente que puede medirse la capacidad de inducir respuesta antiheparina en ratones mediante Abs de la presente invención. Para esto, se inmunizan diferentes grupos de animales con los Abs de la invención y las muestras de suero de estos animales se prueban para determinar la presencia de Abs antiheparina.

30 Se describe adicionalmente que se puede medir el efecto antiaterosclerótico de los Abs de la presente invención, y para esto se puede usar un modelo de inducción de lesiones ateroscleróticas en conejos con Lipofundin. (Takács E, Hársing J, Füzési S, Jellinek H. 1986 Arteriosclerosis developing in rabbits after lipofundin administration. Morphol Igazsagugyi Orv Sz. 26:99-105; Noa M & Más R (1992). Ateromixol y lesion aterosclerótica en conejos inducida por lipofundin. Progresos en Ciencias Médicas, 6: 14-19).

Composición farmacéutica:

En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más Abs de la presente invención y un excipiente que es farmacéuticamente aceptable.

35 También se describe aquí un kit de reactivos que comprende uno o más Abs de la invención, que adicionalmente puede comprender una solución reguladora. Como se describe aquí, el regulador de solución puede ser farmacéuticamente aceptable. Como se describe aquí, una composición que comprende un Ab también puede incluir una molécula transportadora, que en algunos casos es farmacéuticamente aceptable. Un kit de reactivos también puede incluir instrucciones para la administración o el uso de la composición (por ejemplo, Ab para un sujeto).

40 Las composiciones farmacéuticas que comprenden un Ab de la invención se preparan para su conservación mezclando los Abs con el grado de pureza deseado con moléculas portadoras, excipientes opcionales o estabilizadores fisiológicamente aceptables (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th edition (2000)), en forma de soluciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones liofilizadas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en todas las dosis y concentraciones empleadas.

45 Los MAb de la invención están presentes en la composición farmacéutica en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito pretendido.

Las formulaciones para administración in vivo deben ser estériles. Esto se logra por filtración a través de membranas de filtración estériles.

50 Aquí se describe el uso de un Ab de la invención en la preparación de un fármaco para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como una enfermedad cardiovascular.

Los anticuerpos de la invención pueden usarse para tratar, inhibir, retrasar la progresión, prevenir/retrasar el inicio de lesiones ateroscleróticas, mejorar o prevenir enfermedades, trastornos o procesos asociados con la expresión y/o actividad de una o más moléculas antigénicas.

De acuerdo con la descripción, una dosis terapéutica de estos Abs estaría en el rango entre 10 microgramos y 10 mg por dosis, preferiblemente entre 100 microgramos y 1 mg por dosis.

Los MAb de la invención se administran por cualquier medio apropiado, que incluye las vías parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para el tratamiento local, la vía intralesional.

- 5 La descripción proporciona un kit de reactivos para diagnosticar un trastorno, como enfermedades cardiovasculares.

Ejemplos:

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar la invención sin limitar su alcance.

En los siguientes ejemplos, todas las enzimas de restricción o modificación así como los reactivos y materiales usados se obtuvieron a partir de fuentes comerciales a menos que se especifique otra cosa.

- 10 Ejemplo 1. Reconocimiento por el MAb quimérico anti-SO3 de los sulfátidos de cerebro bovino.

Usando ELISA, se recubrieron placas PolySorp, Nunc, con 50 µL/pozo de una solución de sulfátidos de cerebro bovino a una concentración de 4 µg/mL en metanol y se evaporó el disolvente incubando durante 90 minutos a 37°C. Luego las placas se bloquearon con 200 µL/pozo de solución salina regulada con fosfato (PBS) que contenía albúmina de suero bovino (SAB) al 1% durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 50 µL/pozo de diferentes concentraciones de anticuerpo quimérico anti-SO3 en PBS y se incubaron durante una hora a 37°C. Luego las placas se lavaron con PBS y 50 µL/pozo de una cadena gamma anti-humana antisuero de cabra conjugada a fosfatasa alcalina (Sigma). Después de incubar las placas durante 1 hora a 37°C, se lavaron nuevamente y se añadieron 100 µL/pozo de solución de sustrato que consistía en 1 mg/ml de p-nitrofenilfosfato en regulador de dietanolamina, pH 9,8. La absorbancia del producto de reacción se midió en un lector de ELISA a 405 nm después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente.

Como control negativo se usó un MAb quimérico modificado por el reemplazo de R por S en la región variable de la cadena pesada en la posición 98 del anticuerpo monoclonal quimérico anti-SO3-. La Figura 1 muestra la reactividad contra sulfatidas de los diferentes MAb quiméricos. El gráfico muestra que el anticuerpo monoclonal quimérico anti-SO3 reconoce las sulfatidas incluso a una concentración tan baja como 0,01 mg/ml. Por el contrario, el MAb quimérico modificado en la posición 98 no mostró ninguna reactividad.

Ejemplo 2. Prueba de reconocimiento de heparina.

Subsecuentemente, se evaluó si eran más complejas que los sulfátidos. Para el estudio se eligió heparina, una molécula altamente sulfatada que se usa como modelo de glicosaminoglicanos sulfatados.

El ensayo para reactividad antiheparina se realizó en base a la técnica de ELISA para biglican desarrollada por Skalen, K. M. et al. (Nature 417: 750 - 754, 2002), con ligeras modificaciones. Las placas de microtitulación Maxisorp (Nunc) se recubrieron con heparina (Sigma) a 10 µg/ml (100 µL/pozo) en solución salina regulada con Hepes (HBSS) (Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con HBSS y luego se bloquearon con HBSS que contenía SAB al 1% (HBSS-BSA) durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con HBSS -Tween 20 al 0,02% (HBSS-T) y se añadieron diluciones en serie de anti-SO3 monoclonal quimérico, a partir de una concentración inicial de 40 µg/ml en regulador de unión (Hepes 10 mM, NaCl 20 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, pH 7,4), durante una hora a temperatura ambiente. Como control negativo, se utilizó el Ab quimérico modificado por el reemplazo de R por S en la región variable de la cadena pesada en la posición 98 del anti-SO3 monoclonal quimérico. Las placas se lavaron dos veces con HBSS-T y luego se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con una cadena gamma anti-humana antisuero de cabra conjugada a fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, EE. UU.) en HBSS-T que contenía un SAB al 0,1 %. Se realizaron lavados necesarios y la reacción se desarrolló utilizando el sustrato p-nitrofenilfosfato disuelto en regulador de dietanolamina, pH 9,8. La absorbancia a 405 nm del producto se cuantificó en un lector de ELISA (Organon Teknica, Austria).

Como se muestra en la Figura 2, el anti-SO3 monoclonal quimérico tenía una alta reactividad contra la heparina. Por el contrario, el Ab quimérico modificado utilizado como control del isotipo no mostró reactividad en ninguna de las concentraciones estudiadas.

Ejemplo 3: Reconocimiento de la línea celular J774 por citometría de flujo.

Los monocitos y macrófagos son importantes en los procesos inflamatorios, tal como la aterosclerosis (Osterud B Björklid E. Physiol Rev 83: 1069-1112, 2003). Estas células sintetizan proteoglicanos y se ha demostrado que algunas de las maneras de incorporar LDL oxidada por los macrófagos en la formación de células espumosas implican los proteoglicanos de la membrana celular (Halvorsen B, et al., Biochem J. 331: 743 - 752, 1998).

Para determinar si el Ab anti-SO3-quimérico fue capaz de reconocer macrófagos, se llevó a cabo experimentos de citometría de flujo usando la línea celular de macrófagos murínicos J774, que se cultivó en DMEM-F12 (Gibco BRL,

Paisley, Escocia) complementado con 8% de suero inactivado fetal de becerro (SFT, Gibco), L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml.

5 Las células ($0,5 \times 10^6$ por tubo) se incubaron con 20 µl/tubo de suero de conejo inactivado durante 10 minutos a 37 °C para bloquear los receptores Fc-gamma. Posteriormente, se añadieron MAb anti-SO3-quimérico y Ab quimérico modificado por control de isotipo, ambos biotinilados, a 10 µg/ml en PBS, pH 7,4, que contenían albúmina de suero bovino al 1% (Sigma, St. Louis, MO) y azida de sodio al 0,01 % durante 30 minutos en un baño de hielo. Después de lavar las células, se incubaron con un complejo de estreptavidina-isotiocianato de fluoresceína (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) a una dilución 1/200, durante 30 minutos en un baño de hielo. Las células se lavaron, se resuspendieron en PBS que contenía azida de sodio al 1% y se analizaron en un citómetro de flujo (Becton-Dickinson, San Jose, CA).

Como se muestra en la Figura 3, el Ab quimérico utilizado como control de isotipo, no reconoció la línea celular J774. Por el contrario, el Ab anti-SO3- quimérico reconoció el 93,7% de las células.

Ejemplo 4: reconocimiento de placa aterosclerótica en aorta humana.

15 La determinación inmunohistoquímica del reconocimiento de anti-SO3 de Ab quimérico se realizó en fragmentos de aorta humana fijada en formalina y embebida en parafina. Se usaron secciones de tejido de 4 µm, que se montaron en portaobjetos silanizados y se incubaron a 68 °C durante 12 horas. Las secciones de tejido se desparafinaron en xilol y se hidrataron en etanol a concentraciones decrecientes. Luego se lavaron durante 5 minutos en agua destilada y se lavaron en PBS. El desenmascaramiento del antígeno se realizó usando un baño termostático ajustado a una temperatura de 100 °C. Las placas sumergidas en regulador de citrato pH 6,0 permanecieron en el baño durante 30 minutos y luego se hirvieron en regulador de citrato pH 6,8 durante 10 minutos utilizando un horno de microondas. Los portaobjetos se dejaron enfriar durante 20 minutos y luego se lavaron con agua destilada y PBS. La peroxidasa endógena se inhibió con una solución de H₂O₂ al 3% durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavó con PBS y se añadieron anti-SO3 Ab biotinilado quimérico y Ab de control de isotipo a una concentración de 50 µg/ml durante 30 minutos a temperatura ambiente. Más tarde, los portaobjetos se lavaron con PBS y se añadió un complejo de estreptavidina-peroxidasa (Anacrom Diagnostics) durante el mismo tiempo y temperatura. Finalmente, las secciones de tejido se incubaron con una solución de mezcla fresca de 3,3'-diaminobencidina (DAB) en 1 ml de regulador de sustrato durante 3 a 5 minutos. El contraste se realizó con hematoxilina de Mayer, las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol, se clarificaron en xilol y finalmente se montaron en placas de medio permanente Eukitt (Kinder GmbH & Co.). La evaluación se realizó utilizando un microscopio de luz blanca (Leica).

La Figura 4 muestra cómo el Ab quimérico anti-SO3 reaccionó intensamente con muestras de lesiones ateroscleróticas presentes en la aorta. Se observó reactividad con macrófagos cargados de lípidos o células espumosas y con núcleo lipídico de lesión (la reactividad se muestra en color marrón oscuro). La figura muestra cómo el Ab usado como control de isotipo no reconoce las secciones de aorta humana.

35 Ejemplo 5: capacidad para inducir respuesta antiheparina en ratones mediante el Ab quimérico anti-SO3.

Se usaron diez ratones hembra BALB/c; recibieron subcutáneamente 50 µg de Ab anti-SO3-quimérico en 200 µL. Las inmunizaciones se realizaron cada 14 días hasta completar un total de cuatro dosis. El Ab anti-SO3- quimérico se administró sin adyuvante o proteína transportadora. Las muestras de suero se tomaron los días 0 y 49 (siete días después de la cuarta dosis).

40 La presencia de Abs antiheparina en el suero de animales inmunizados se midió usando la técnica de ELISA descrita en el Ejemplo 2, usando placas Maxisorp recubiertas con heparina (10 µg/ml, 100 µl/pozo). Los sueros de los ratones se probaron a una dilución de 1/100 en regulador de unión, 100 µL/pozo. Como anticuerpo secundario se usó un antisuero IgG e IgM anti-ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson).

45 La Figura 5 muestra los resultados del ensayo con los sueros de ratones tomados en los días 0 y 49. No se detectó la presencia de Abs antiheparina en los sueros preinmunes (día 0) de ningún animal. Por el contrario, se detectó la presencia de estos Abs en suero después de inmunizar ratones con el Ab anti-SO3- quimérico. Este resultado indica que el Ab anti-SO3- quimérico no solo reconoce fuertemente la heparina, sino que tiene la sorprendente capacidad de inducir una respuesta contra esta molécula (efecto de vacuna).

Ejemplo 6: efecto antiaterosclerótico de Ab anti-SO3- quimérico.

50 Para evaluar si el anticuerpo anti-SO3-quimérico era capaz de producir un efecto biológico in vivo, se utilizó un modelo previamente descrito de inducción de lesiones ateroscleróticas en conejos con Lipofundin (Takács E and cols. *Morphol Igazságügyi Orv Sz.* 26:99 - 105, 1998, Noa M & R. *More Progress in Sciences Médicas*, 6: 14-19, 1992).

55 Se utilizaron quince conejos de Nueva Zelanda divididos en tres grupos de cinco conejos. El grupo 1 no recibió tratamiento (control negativo). El grupo 2 recibió diariamente, durante ocho días, 2 ml por kg de Lipofundin 20% (Braun), por vía intravenosa. Al grupo 3 se le administraron tres dosis de 100 µg de Ab anti-SO3-quimérico en PBS, por vía subcutánea, a intervalos de siete días, y el día de la última inmunización comenzó la administración diaria de

Lipofundin con el mismo esquema que se utilizó en animales del grupo 2. Todos los conejos se sacrificaron bajo anestesia un día después de recibir la última dosis de Lipofundin y los animales de control negativo del grupo 1 se sacrificaron el mismo día. Las aortas se obtuvieron de animales y se realizó el estudio patológico para determinar la presencia de lesiones ateroscleróticas microscópicas y macroscópicas.

5 Las aortas de conejos del grupo 1, que no recibieron tratamiento, no mostraron lesiones macroscópicas. En todas las aortas de conejos del grupo 2, que recibieron 2 ml de Lipofundin por kg durante ocho días, se observaron lesiones macroscópicas. En las aortas de conejos que previamente recibieron tres dosis de Ab anti-SO3-quimérico y luego se les administró Lipofundin, no hubo lesiones macroscópicas.

10 Para el estudio de lesiones microscópicas, los fragmentos de aortas se fijaron en formalina y se embebieron en parafina. Se usaron secciones de tejido de 4 µm, montadas en portaobjetos silanizados y teñidas con hematoxilina-eosina. La evaluación se realizó utilizando un microscopio de luz blanca (Leica).

15 Cuando se evaluaron las secciones de tejido de la aorta de conejos que no recibieron tratamiento, todas mostraron la estructura normal de las arterias sin alteraciones, como se muestra en la Figura 6. En las secciones aórticas de todos los conejos del grupo que recibió Lipofundin se observaron lesiones características: presencia de engrosamiento de la íntima, con depósitos de material extracelular entre fibras musculares, elásticas y de colágeno, y distorsión de la arquitectura tisular. Por el contrario, las muestras de tres conejos que recibieron tres dosis de Ab anti-SO3-quimérico y luego se les administró Lipofundin, no se observaron lesiones microscópicas. En las muestras de los dos conejos restantes se observaron alteraciones tisulares que consistían en un engrosamiento discreto en algunas áreas de la pared arterial, con un depósito de material extracelular entre las fibras. No hubo engrosamiento de la íntima.

Breve descripción de las figuras:

Figura 1. Reconocimiento de sulphatidas por MAb anti-SO3-quimérico.

25 Se añadieron diversas concentraciones de MAb anti-SO3-quiméricos y MABs quiméricos de control de isotipo a placas de ELISA recubiertas con sulfátidos a una concentración de 4 pg/ml en metanol. La reactividad se detectó con antisuero de cadena gamma antihumano de cabra conjugado con fosfatasa alcalina. La absorbancia a 405 nm del producto se cuantificó en un lector de ELISA. (*p <0.05, prueba U de Mann-Whitney).

Figura 2. Reconocimiento de heparina por MAb anti-SO3- quimérico.

30 Se añadieron diversas concentraciones del MAb anti-SO3-quimérico y el MAB quimérico de control de isotipo a placas de ELISA recubiertas con heparina a una concentración de 10 pg/ml en HBSS. La reactividad se detectó con un antisuero de cadena gamma antihumano de cabra conjugado con fosfatasa alcalina. La absorbancia a 405 nm del producto se cuantificó en un lector de ELISA. (* p <0.05, prueba U de Mann-Whitney).

Figura 3. Reconocimiento de la línea celular J774 por el MAb anti-SO3-quimérico.

Las células se incubaron con 10 pg/ml de Abs biotinilado. La reacción se reveló con un antisuero de IgG antihumano de cabra conjugado con FITC y analizado por citometría de flujo.

35 Figura 4. Reconocimiento de placas ateroscleróticas humanas por el MAb anti-SO3-quimérico.

Se incubaron fragmentos de aorta humana fijados en formalina y embebidos en parafina (4 µm) con Ab biotinilado anti-SO3-quimérico y Ab de control de isotipo. La reacción se reveló con un complejo de estreptavidina-peroxidasa. Los epítomos reconocidos por el anti-SO3- MAb están indicados por el color marrón intenso y los núcleos de las células se contratiñeron con hematoxilina. (400 X).

40 Figura 5: respuesta de Abs frente a heparina inducida por inmunización con el MAb anti-SO3-quimérico.

Las muestras de suero obtenidas de ratones BALB/c en los días 0 y 49 del esquema de inmunización con el Mab anti-SO3-quimérico se analizaron por ELISA. Cada símbolo es el valor obtenido con el suero de un ratón. pl y hi: preinmune e hiperinmune, respectivamente (* p <0.05, prueba U de Mann-Whitney).

45 Figura 6: Efecto del tratamiento con MAb anti-SO3-quimérico en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas en el modelo Lipofundin en conejos.

50 Secciones histológicas de aortas torácicas de conejo representativas de diferentes grupos de estudios. (A) Grupo 1, animal no tratado, que muestra la estructura normal de las arterias, sin alteraciones. (B) Grupo 2, animales tratados con Lipofundin, donde se observa engrosamiento de la íntima arterial, con depósitos de material extracelular entre las fibras musculares, elásticas y de colágeno, y la distorsión de la arquitectura del tejido. (C y D) Grupo 3, animales inmunizados con el Mab anti-SO3-quimérico y que posteriormente recibieron Lipofundin; no se observó daño tisular evidente o engrosamiento de la íntima. Tinción de hematoxilina-eosina 180X

Anticorps reconnaissant des sulfatides et des protéoglycans sulfatés et Leur utilisation
Listado de secuencias

Listado de secuencias

<110> CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

<120> ANTICUERPOS ANTISULFÁTIDOS Y PROTEOGLICANOS ANTISULFATADOS Y SU USO

<130> PCT/CU2010/000002

<160> 14

5 <170> patentIn version 3.5

<210> SEQ ID: 1

<211> 5

<212> PRT

<213> desconocido

10 <220>

<223> por tecnología recombinante de ADN

<400> 1

Arg Tyr Ser Val His
1 5

<210> SEQ ID: 2

15 <211> 16

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> por tecnología recombinante de ADN

20 <400> 2

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

<210> SEQ ID: 3

<211> 14

<212> PRT

25 <213> desconocido

<220>

<223> Tecnología recombinante de ADN

<400> 3

Ser Gly Val Arg Arg Gly Arg Ala Gln Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

30 <210> SEQ ID: 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

35 <223> Tecnología recombinante de ADN

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> SEQ ID: 5

<211> 7

5 <212> PRT

<213> desconocido

<220>

<223> by Tecnología recombinante de ADN

<400> 5

10 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
 1 5

<210> SEQ ID: 6

<211> 9

<212> PRT

<213> desconocido

15 <220>

<223> by Tecnología recombinante de ADN

<400> 6

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
 1 5

<210> SEQ ID: 7

20 <211> 30

<212> PRT

<213> desconocido

<220>

<223> por tecnología recombinante de ADN

25 <400> 7

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

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

<210> SEQ ID: 8

<211> 14

<212> PRT

30 <213> Desconocido

<220>

<223> por tecnología recombinante de ADN

<400> 8

ES 2 656 849 T3

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
1 5 10

<210> SEQ ID: 9

<211> 32

<212> PRT

5 <213> desconocido

<220>

<223> por tecnología recombinante de ADNn

<400> 9

Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

10 <210> SEQ ID: 10

<211> 11

<212> PRT

<213> desconocido

<220>

15 <223> por tecnología recombinante de ADN

<400> 10

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
1 5 10

<210> SEQ ID: 11

<211> 23

20 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> por tecnología recombinante de ADN

<400> 11

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

25 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys
20

<210> SEQ ID: 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Desconocido

30 <220>

<223> por tecnología recombinante de ADN

<400> 12

ES 2 656 849 T3

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> SEQ ID: 13

<211> 32

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> por tecnología recombinante de ADN

<400> 13

Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

10 Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> SEQ ID: 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Desconocido

15 <220>

<223> by Tecnología recombinante de ADN

<400> 14

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente y con alta afinidad a sulfátidos y proteoglicanos sulfatados, en donde las secuencias de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de las cadenas pesada y ligera son:

5 Cadena pesada:

HCDR1 RYSVH

HCDR2 MIWGGGSTDYNSALKS

HCDR3 SGVRRGRAQAWFAY

Cadena ligera:

10 LCDR1 KASQDVSTAVA

LCDR2 SASRYT

LCDR3 QQHYSTPWT;

y en donde las secuencias de las regiones estructurales dentro de la región variable de las cadenas pesada y ligera son:

15 Cadena pesada:

HFR1 QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSL

HFR2 WVRQPPGKGLEWLG

HFR3 RLSISKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAMYYCAR

HFR4 WGQGLVTVSA

20 Cadena ligera:

LFR1 DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC

LFR2 WYQQKPGQSPKLLIY

LFR3 GVPDRFTGSGSGTDFITSSVQAEDLAVYYC

LFR4 FGGGTKLELK.

25 2. Anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, para uso como medicamento.

3. El anticuerpo monoclonal para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho medicamento es para uso en el tratamiento de la aterosclerosis.

4. El anticuerpo monoclonal para uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en donde las secuencias de las regiones constantes son IgG1 humana para cadena pesada y Ck para cadena ligera.

30 5. Una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos monoclonales como se define en la reivindicación 1 o fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH o F(ab')₂ de los mismos, en donde dicha composición comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende adicionalmente un adyuvante.

35 7. Un kit de reactivos que comprende cualquiera de los anticuerpos monoclonales como se define en la reivindicación 1, o fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH o F(ab')₂ de los mismos.

8. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, para uso como un medicamento.

9. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha composición es para uso en el tratamiento de la aterosclerosis.

40 10. Un uso de los anticuerpos monoclonales como se define en la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento de la aterosclerosis.

11. El anticuerpo monoclonal como se define en la reivindicación 1, para uso como una vacuna.

12. Una vacuna que comprende el anticuerpo monoclonal como se define en la reivindicación 1

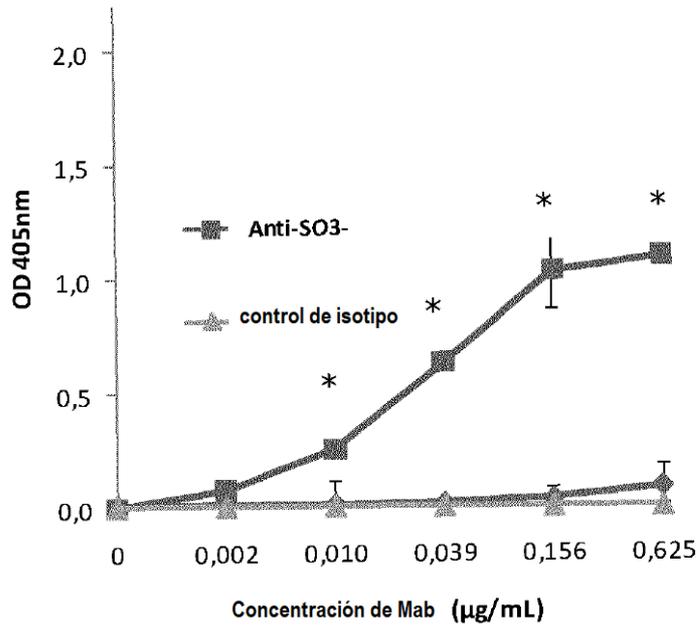


Figura 1.

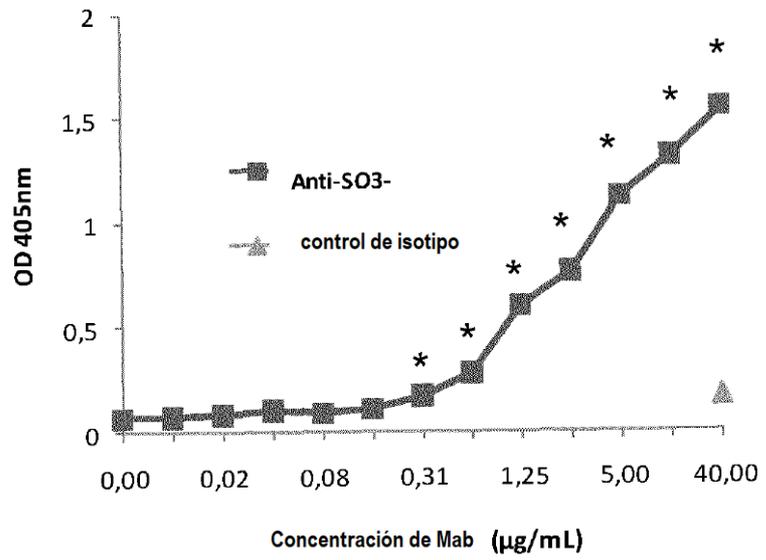


Figura 2.

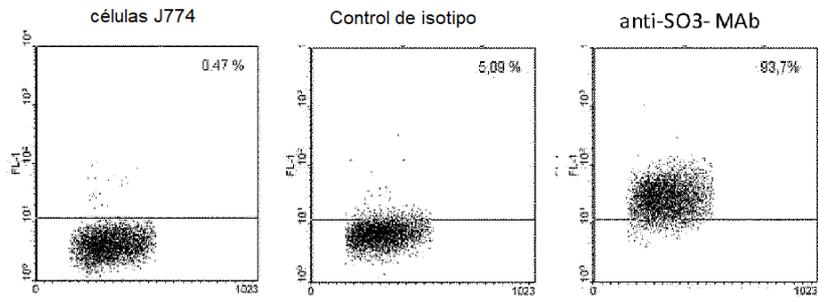


Figura 3.

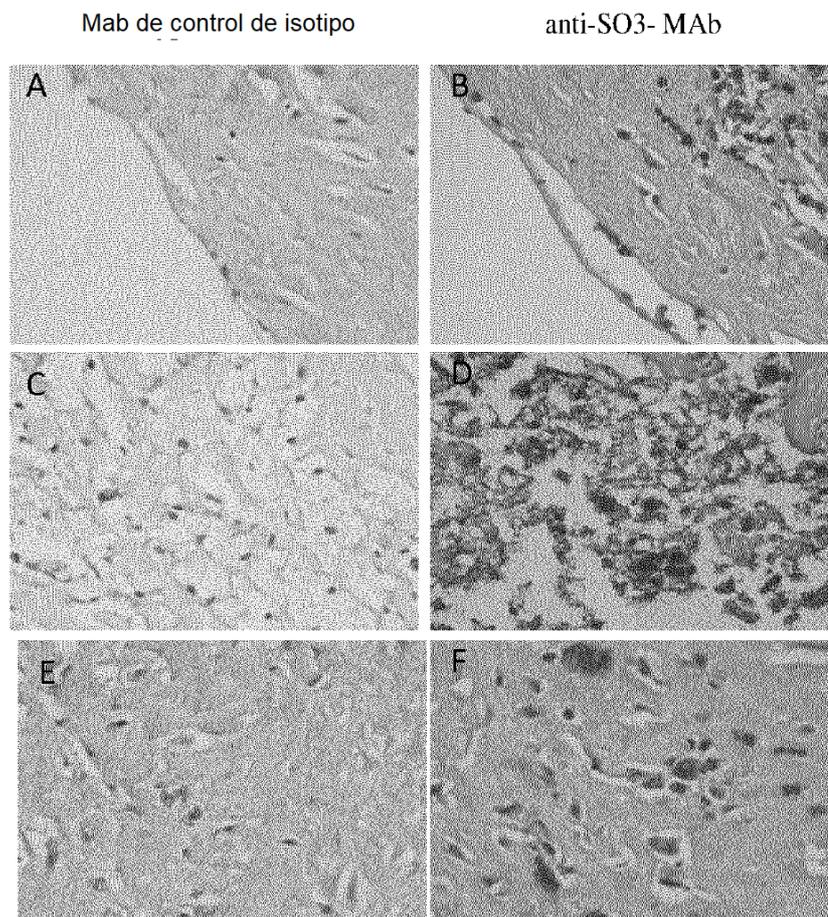


Figura 4.

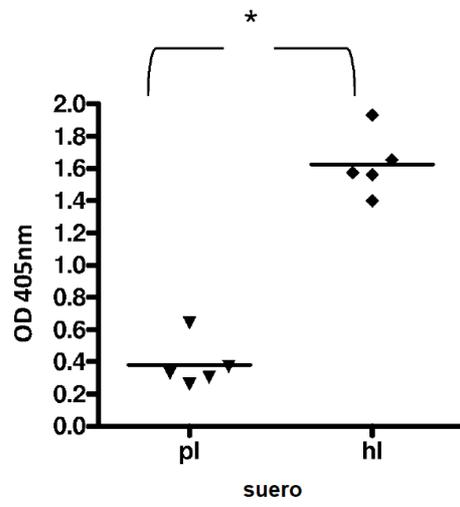


Figura 5.

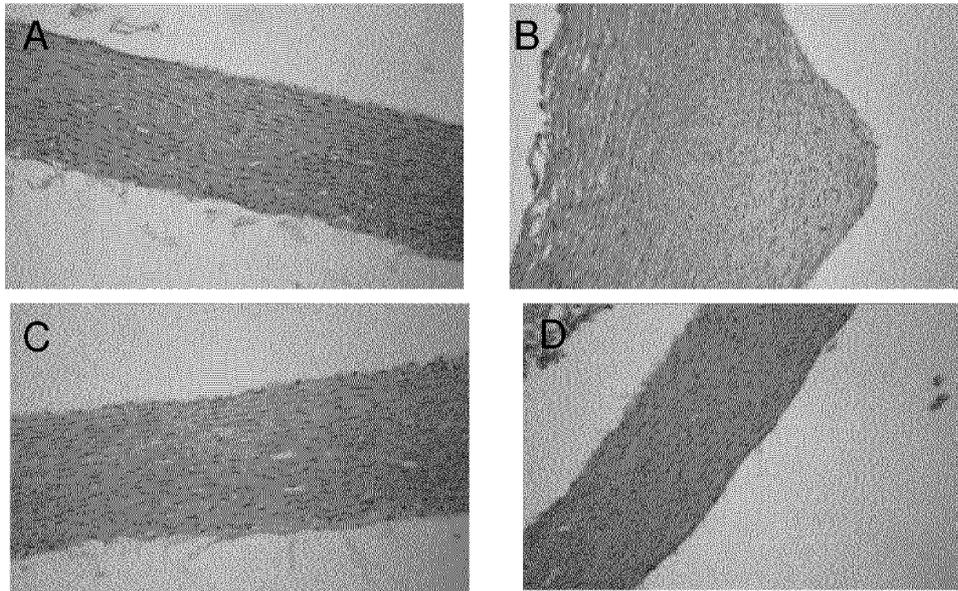


Figura 6.