

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 317**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2011 PCT/US2011/044172**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2012 WO12009631**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2011 E 11741717 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2593128**

54 Título: **Anticuerpos humanizados dirigidos contra el dominio EC1 de la cadherina-11 y composiciones y procedimientos relacionados**

30 Prioridad:

**15.07.2010 US 364698 P**

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

**25.04.2018**

73 Titular/es:

**ADHERON THERAPEUTICS, INC. (100.0%)  
200 Boston Avenue, Suite 1100  
Medford, MA 02155, US**

72 Inventor/es:

**MCARTHUR, JAMES, G.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 665 317 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 humanizados dirigidos contra el dominio EC1 de la cadherina-11 y composiciones y procedimientos relacionados

5 **Antecedentes de la invención**

10 Los pacientes con inflamación crónica de las articulaciones sufren deterioro articular grave, incluyendo destrucción de hueso y de cartílago, que produce dolor prolongado, deformidad, pérdida de función de la articulación, movilidad reducida y acortamiento de la esperanza de vida. La inflamación articular se asocia con un incremento del número de células y sustancias inflamatorias en la articulación, que causan irritación, desgaste del cartílago y tumefacción del revestimiento articular. Se sabe que varios trastornos autoinmunitarios distintos desencadenan una inflamación inadecuada o mal dirigida en una articulación, lo que produce una inflamación crónica en las articulaciones de las personas que padecen estos trastornos. Los trastornos inflamatorios frecuentes de las articulaciones incluyen artritis reumatoide, artritis psoriásica, síndrome de Reiter y espondilitis anquilosante.

15 La artritis reumatoide (AR) es la forma más frecuente de artritis inflamatoria y se estima que afecta aproximadamente al 1 por ciento de la población de EE. UU. o a aproximadamente 2,1 millones de estadounidenses. La AR es una enfermedad crónica que se caracteriza por la inflamación del revestimiento, o sinovio, de las articulaciones y puede ocasionar daños significativos en los huesos y cartílagos con el tiempo. La AR es más frecuente en las mujeres que en los varones y hasta el 3 % de las mujeres puede desarrollar artritis reumatoide durante su vida. Actualmente, la causa de la AR es desconocida.

20 La AR puede provocar daños en las articulaciones a largo plazo, lo que produce dolor crónico, pérdida de la función y discapacidad. Además, investigaciones recientes indican que las personas con AR, particularmente aquellas cuya enfermedad no está bien controlada, pueden tener un mayor riesgo de enfermedad cardíaca, accidente cerebrovascular y desarrollo de fibrosis, particularmente fibrosis pulmonar.

25 La fibrosis pulmonar, incluidas la fibrosis pulmonar idiopática y la fibrosis inducida por radiación, así como la fibrosis causada por tabaquismo, exposición química, esclerodermia, sarcoidosis, radioterapia, AR o lupus, afecta a 5.000.000 de pacientes en todo el mundo y a más de 500.000 individuos en Estados Unidos. La mortalidad a 5 años por fibrosis pulmonar idiopática es de aproximadamente el 80 %, causando 40.000 muertes anuales solo en EE.UU. Actualmente no existe una terapia aprobada para la fibrosis pulmonar idiopática ni en Estados Unidos ni en Europa.

30 Por lo tanto, la fibrosis y la inflamación crónica de las articulaciones causadas por la AR y otras afecciones inflamatorias son una carga sanitaria internacional. Es necesario desarrollar nuevos agentes para la prevención y el tratamiento de estos y otros trastornos.

35 El documento US 2009/0253200 A1 desvela antagonistas de la cadherina-11 y composiciones que comprenden antagonistas de la cadherina-11, y su uso para tratar trastornos inflamatorios de las articulaciones en un sujeto mamífero.

40 **Sumario de la invención**

45 El objetivo de la invención se establece en las reivindicaciones adjuntas.

50 La invención se refiere a un anticuerpo humanizado que se une específicamente a un dominio EC1 de una proteína cadherina-11 de mamífero, que comprende una región variable de la cadena pesada de anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 69 y una región variable de la cadena ligera de anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 71. El anticuerpo humanizado es antagonista de la proteína cadherina-11 de mamífero.

La presente invención proporciona nuevos agentes y terapias que tienen una eficacia mejorada para el tratamiento de la inflamación y otras afecciones mediadas por la cadherina-11 en seres humanos.

55 **Breve descripción de los dibujos**

El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo realizado a color. La Oficina proporcionará copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujos a color previa solicitud y pago de la tarifa necesaria.

60 La figura 1A es una transferencia Western que muestra la detección de una proteína de fusión cadherina-11-EC1-5-Fc usando anticuerpos anti-Cad-11 23C6, 13C2 y 27F3 (véanse las flechas sólidas). Estos anticuerpos no reconocían las proteínas de fusión cadherina-11-EC1-Fc y cadherina-11-EC1/2-Fc que también estaban presentes en la membrana (véanse las flechas abiertas para las posiciones de las proteínas cadherina-11-EC1-Fc y cadherina-11-EC1/2-Fc en la transferencia).

65 La figura 1B es un gráfico que representa la unión de los anticuerpos públicos anti-cadherina 11 13C2, 23C6 y 5F82 a la proteínas de fusión Cad-11-EC1-5-Fc humana, pero no a la proteína de fusión Cad-11-EC1-Fc,

determinado mediante ELISA. Por el contrario, el anticuerpo de EC1 H1M1 se une tanto a la proteína de fusión Cad-11-EC1-Fc como a la proteína de fusión Cad-11-EC1-5-Fc.

La figura 2 es una alineación de la secuencia de aminoácidos de los primeros 34 aminoácidos de los dominios EC1 de la Cad-11 humana (SEQ ID NO:3), MN-Cad (SEQ ID NO:4) y Cad-8 (SEQ ID NO:5) que participan en la unión a la cadherina. Las secuencias donantes que contienen residuos que se extienden en el bolsillo de un contrarreceptor de cadherina se indican mediante el subrayado de la mitad izquierda de la secuencia y los residuos de la secuencia del bolsillo se indican mediante el subrayado de la mitad derecha de la secuencia en la SEQ ID NO:3.

La figura 3 es un gráfico que representa la unión de un Fab que se une a cadherina-11 a un péptido de dominio EC1 de Cad-11 humano, así como a la proteína de fusión Cad-11-EC1-Fc, pero no a los péptidos del dominio EC1 de Cad-8 o MN-Cad, determinado mediante ELISA. El clon 7 demostró una unión significativa al péptido del dominio EC1 de Cad-11 y a la proteína de fusión, pero no a los péptidos del dominio MN-Cad o Cad-8 EC1.

La figura 4 es un gráfico que representa datos de un ensayo de agregación celular de Cad-11 *in vitro*. Se añadieron antagonistas de Cad-11 a los medios, tales como un Fab fabricado a partir del anticuerpo anti-Cad-11 13C2, o concentraciones variables de un Fab anti-EC1 de cadherina-11 dirigido a los primeros 35 aminoácidos del dominio EC1 de la cadherina-11 (designado clon 7 de Fab de EC1), bloquean la agregación celular 431-D-11 mediada por Cad-11. El Fab anti-EC1 de cadherina-11 (clon 7) inhibió la agregación de células de carcinoma epidermoide A-431-D-11 a todas las concentraciones probadas en un intervalo de 0,3 µg/ml a 10 µg/ml. Por el contrario, el Fab fabricado a partir del anticuerpo 13C2 anti-cadherina-11 solo inhibió la agregación celular a una concentración de 10 µg/ml.

La figura 5 es un gráfico que representa datos de un segundo ensayo de agregación celular de Cad-11 *in vitro*. El porcentaje de agregación de las células 431-D-11 se muestra a los 40 minutos de la adición de medio SME (control designado), concentraciones variables de una proteína de fusión que comprende el dominio EC1 de Cad-11 fusionado a los dominios bisagra, CH2 y CH3 de la IgG2 humana (designada Cad-11-EC1-Fc), concentraciones variables de un Fab de EC1 anti-cadherina-11 dirigido a los 35 primeros aminoácidos del dominio EC1 de cadherina-11 (designado Cad-11 EC1 Fab) o concentraciones variables de un Fab anti-proteína fluorescente verde de control (anti-GFP) (designada GFP fAb). El Fab anti EC1 de cadherina-11 (clon 7) inhibió la agregación de células 431-D-11 que expresan Cad-11 a concentraciones de 3 µg/ml, 1 µg/ml y 0,1 µg/ml. La proteína de fusión EC1-Fc inhibió la agregación de células 431-D-11 a concentraciones de 3 µg/ml. Por el contrario, el Fab anti-GFP no inhibió significativamente la agregación celular en ninguna de las concentraciones de prueba.

La figura 6 es un gráfico que representa la inhibición de la agregación celular mediada por Cad-11 por varios Fab anti-EC1 de cadherina 11 que tienen especificidad de unión por Cad-11 solo (fAb de EC1, clon 7 y clon 4), Cad-11 y Cad-8 (fAb de EC1, clon 6) o Cad-11 y MN-Cad (fAb de EC1, clon 5), usando un ensayo de agregación celular *in vitro*. Todos los Fabs probados inhibieron la agregación celular 431-D-11 en relación con el control (D-11 SME, barra izquierda).

La figura 7 es un gráfico que representa la inhibición de la agregación celular mediada por Cad-11 por Fab anti-Cad-11 que tienen especificidad de unión por Cad-11 solo (fAb de EC1, clon 7) o Cad-11 y MN-Cad (fAb de EC1, clon 8), usando un ensayo de agregación celular *in vitro*. La especificidad de los Fab probados se muestra entre paréntesis junto a cada designación de Fab. Ambos Fab específicos de cadherina inhibieron la agregación celular (barras central y derecha) con respecto a un Fab de control que era específico para la GFP (barra izquierda).

La figura 8 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 6) de la proteína de fusión Cad-11-EC1-hlgG2-Fc1 humana (Cad-11-EC1-Fc). La secuencia del dominio extracelular de la cadherina-11 humano se muestra en cursiva, el sitio BgIII está subrayado y la secuencia que codifica la región IgG2-Fc1 se muestra en negrita.

La figura 9 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7) de la proteína de fusión Cad-11-EC1-hlgG2-Fc1 humana (Cad-11-EC1-Fc). La secuencia del dominio extracelular de la cadherina-11 humano se muestra en cursiva, la secuencia codificada por el sitio BgIII está subrayada y la secuencia de la región IgG2-Fc1 humana se muestra en negrita.

La figura 10 es una imagen de un gel de poliacrilamida SDS que se ha teñido con azul de Coomassie, que muestra las bandas intensas predominantes correspondientes a la forma monomérica de las proteínas de fusión Cad-11-EC1-hlgGz-Fc1 (carril central) y Cad-11-EC1/2-hlgG2-Fc1 (carril derecho) purificadas, respectivamente, después de la purificación del medio de cultivo celular utilizando una columna de proteína A. Los patrones del peso molecular se muestran en el carril izquierdo.

La figura 11 es una transferencia Western que muestra la detección de las proteínas de fusión humanas Cad-11-EC1-hlgG2-Fc1 (carril central) y Cad-11-EC1/2-hlgG2-Fc1 (carril derecho) usando un anticuerpo IgG antihumano conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). La banda observada predominante en cada carril corresponde a las ubicaciones de las formas monoméricas de las proteínas de fusión. Las ubicaciones de las formas dimericas de las proteínas de fusión también son visibles (véanse las bandas de mayor peso molecular menos intensas), debido a condiciones de reducción incompletas. Los patrones del peso molecular se muestran en el carril izquierdo.

La figura 12 es un gráfico que representa que la proteína de fusión Cad-11-EC1-Fc y un anticuerpo anti-Cad-11 de ratón, 13C2, inhiben la invasión de sinoviocitos similares a fibroblastos humanos que expresan Cad-11 en un tapón de matriz en las concentraciones indicadas en comparación con las células no tratadas, marcado como *Invasión*. Los datos se agrupan a partir de dos experimentos independientes.

Las figuras 13A y B son gráficos que representan los datos de dos ensayos de agregación de celular Cad-11 *in*

*vitro*. El porcentaje de agregación de células 431-D-11 que expresan Cad-11 se muestra a los 40 minutos de la adición de medio SME (control designado) o una proteína de fusión Cad-11. La figura 13A muestra la inhibición de la agregación en presencia de concentraciones variables de una proteína de fusión que comprende los 5 dominios extracelulares de Cad-11 fusionados a los dominios bisagra de IgG2 humana, CH2 y CH3 (designada Cad-11-EC1-5-Fc). La figura 13B muestra la inhibición de la agregación de concentraciones variables de una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular N-terminal (dominio EC1) de Cad-11 fusionado a los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgG2 (designada Cad-11-EC1-Fc) o Cad-11-EC1-5-Fc.

Las figuras 14A-C muestran la secuencia del ADNc de la cadherina-11 humana (SEQ ID NO:1; N.º de acceso en Genbank NM001797). La figura 15 muestra la secuencia de la proteína de la cadherina-11 humana (SEQ ID NO:2; N.º de acceso en Genbank NP001788). La figura 16 es un gráfico que representa el nivel de unión de los anticuerpos en medios de hibridomas peptídicos 4 (HL), o medios de hibridoma de control (Medios), a las proteínas que contienen los dominios EC1-2 de Cad-11, Cad-8 o MN-Cad, determinado mediante ELISA.

Las figuras 17A-C son gráficos representativos que representan la intensidad de la tinción celular (MFI; intensidad de fluorescencia media) como una medida de la unión del anticuerpo H14 a las células 431-D-11 que expresan Cad-11.

Las figuras 17D-F son gráficos representativos que representan la ausencia de tinción celular de 431-D (MFI; intensidad de fluorescencia media) respecto a las figuras 17A-C, que indica una falta de unión del anticuerpo H14 a las células negativas para Cad-11.

Las figuras 17G-I son gráficos representativos que representan la intensidad de la tinción celular (MFI; intensidad de fluorescencia media) como una medida de la unión del anticuerpo H1M1 a las células 431-D-11 que expresan Cad-11.

La figura 18A es un gráfico que representa la unión del anticuerpo H14 a células que expresan Cad-11 y la ausencia de unión de H14 a células de control negativas para Cad-11, a concentraciones variables de anticuerpo, según se mide mediante la intensidad de la tinción celular (MFI; intensidad de fluorescencia media).

La figura 18B es un gráfico que representa la unión del anticuerpo H1M1 a células que expresan Cad-11 y la ausencia de unión H1M1 a células de control negativas para Cad-11, a concentraciones variables de anticuerpo, según se mide mediante la intensidad de la tinción celular (MFI; intensidad de fluorescencia media).

La figura 19A es un gráfico que representa el grado de unión del anticuerpo H14 anti-Cad-11 a los péptidos del dominio EC1 de Cad-8, a diversas concentraciones de anticuerpo, determinado mediante ELISA.

La figura 19B es un gráfico que representa la ausencia de unión del anticuerpo H14 anti-Cad-11 a los péptidos de los dominios EC1 de Cad7, MNCad, Cad9, Cad18, Cad20 o Cad24 a diversas concentraciones de anticuerpo, determinado mediante ELISA.

La figura 20 es un gráfico que representa la unión del anticuerpo H1M1 anti-Cad-11 a los péptidos del dominio EC1 de Cad-11, Cad-8, Cad-7, MN-Cad, Cad-9, Cad-18, Cad-20 y Cad-24 a diversas concentraciones de anticuerpo, determinado mediante ELISA.

La figura 21A es un gráfico que representa el grado de unión del anticuerpo H1M1 anti-Cad-11 a los diferentes inmunógenos peptídicos del dominio EC1 Cad-11 (PEP1, PEP2, PEP3 y PEP4), así como la proteína de fusión del dominio EC1 de Cad-11 (EFL) y la IgG control humana (bloque de Fc), determinado mediante ELISA.

La figura 21B es un gráfico que representa el grado de unión del anticuerpo H14 anti-Cad-11 a los inmunógenos peptídicos del dominio EC1 de Cad-11 (PEP1, PEP2, PEP3 y PEP4), así como la proteína de fusión del dominio EC1 de Cad-11 (EFL) y la IgG control humana (bloque de Fc), determinado mediante ELISA.

La figura 22 es un diagrama esquemático que representa la secuencia de los primeros 37 aminoácidos del dominio EC1 de cadherina-11 humana y las porciones de esta secuencia abarcadas por cada uno de los péptidos 1-4. Los restos de aminoácidos compartidos por los péptidos 2 y 4 que están aguas arriba del péptido 3 se resaltan en la región en recuadro. Los aminoácidos directamente implicados en la unión de Cad-11 a Cad-11 están subrayados.

La figura 23A es una fotografía que muestra una gran masa de células agregadas que expresan Cad-11 que se trataron con un anticuerpo de isotipo de control.

La figura 23B es una fotografía que muestra pequeñas agrupaciones de células que expresan Cad-11 tratadas con H1M1 que no progresaron para formar las grandes masas observadas en la figura 23A.

La figura 23C es una fotografía que muestra que las células parentales negativas para Cad-11 sin tratar permanecen como grupos de células simples o dobles.

La figura 24A es una fotografía que muestra un cultivo de células que expresan Cad-11 con grandes masas de células agregadas.

La figura 24B es una fotografía que representa un cultivo de células que expresan Cad-11 con células predominantemente simples con agrupamientos celulares pequeños e infrecuentes en relación con las mostradas en la figura 24A tras el tratamiento con el anticuerpo frente al dominio EC1 de Cad-11 H14.

La figura 25 es un gráfico que representa la inhibición de la inflamación articular asociada a la artritis en ratones tratados con dosis crecientes de anticuerpo H1M1 anti-Cad-11 en relación con ratones de control no tratados.

La figura 26 es un gráfico que representa la inhibición de la inflamación articular asociada a la artritis en ratones tratados con 0,3 mg de anticuerpos anti-Cad-11 H14 o H1M1 en relación con ratones de control no tratados.

La figura 27 es un gráfico que muestra que el tratamiento con 0,3 mg de anticuerpo H1M1 o H14 retrasó el desarrollo de la artritis en un modelo de ratón en comparación con un control no tratado.

La figura 28 es un gráfico que representa el grado de unión de los medios que contienen anticuerpo en medios de hibridomas peptídicos 3 (HL), o medios de hibridoma de control (medios), a los dominios EC1-2 de Cad-11, Cad-8 y MN-Cadherina o una proteína de fusión Cad-11 EC1-Fc.

La figura 29 es un gráfico que representa el grado de unión de anticuerpos anti-Cad-11 de los hibridomas del péptido 3 a células que expresan la proteína Cad-11 humana (véase la flecha) y células de control que no expresan Cad-11 que expresan Neos.

La figura 30A es una fotografía que representa sinoviocitos similares a fibroblastos (FLS) incubados con medios. Los agregados celulares y las células que se asocian mediante procesos celulares son visibles.

La figura 30B es una fotografía que representa FLS incubados con 30 µg/ml de anticuerpo de control. Los agregados celulares y las células que se asocian mediante procesos celulares son visibles.

La figura 30C es una fotografía que representa FLS incubados con 30 µg/ml de anticuerpo H1M1. Pocos agregados celulares y procesos celulares son visibles.

La figura 31 es un gráfico que representa la inhibición de la invasión de FLS en la membrana recubierta con matrigel después del contacto con anticuerpos H1M1 con respecto a los controles, incluidos otros anticuerpos frente a Cad-11 que se unen fuera de la región EC1.

La figura 32 es un gráfico que representa la inhibición de la inflamación articular en un modelo de ratón KBN de artritis después de la administración de anticuerpos H1M1 con relación al control.

La figura 33 representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida de la región variable de la cadena pesada de H1M1. Las definiciones de CDR y la numeración de LAS secuencias de proteínas se realizan conforme a Kabat. Las secuencias de nucleótidos y de proteínas de las CDR se muestran en gris.

La figura 34 representa las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducida de la región variable de la cadena ligera de H1M1. Las definiciones de CDR y la numeración de LAS secuencias de proteínas se realizan conforme a Kabat. Las secuencias de nucleótidos y de proteínas de las CDR se muestran en gris.

Las figuras 35A-H representan las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las 5 cadenas VH (A-E) (SEQ ID NO: 60-69) y 3 cadenas VK (FH) (SEQ ID NO: 70-75) utilizadas en el diseño de las variantes de anticuerpos humanizados anti-Cad-11 H1M1/SYN0012. Las definiciones de CDR y la numeración de LAS secuencias de proteínas se realizan conforme a Kabat. Las secuencias de nucleótidos y de proteínas de las CDR se resaltan en color rojo.

La figura 36 es un diagrama de vectores que ilustra los vectores pANTVK y pANTVhG4. Ambos vectores pANTVK y pANTVhG4 contienen fragmentos de ADN genómico que incorporan intrones y secuencias de poli A. La expresión de ambas cadenas está dirigida por un promotor de CMV. El mini gen DHFR en el vector de la cadena pesada se usa para la selección.

La figura 37 representa un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de anticuerpos purificados con proteína A, (a) IgG4 anti-EC1 de Cad11(SYN0014); (b) Variantes de anticuerpo anti-Cad-11 humanizado (SDP011-SDP151). El marcador de tamaño es un patrón de proteína preteñido Fermentas PageRuler (N.º de catálogo SM1811). Nota: No se pasó el SDP111.

Las figuras 38A-C son gráficos que representan los resultados de un ELISA de competición anti-Cad-11. Se analizó una serie de diluciones de anticuerpos anti- EC1 de Cad-11 humanizados (SDP011 a SDP151) frente a una concentración fija de anticuerpo SYN0012 murino biotinilado para determinar la unión a una proteína de fusión Cad-11 humana recombinante. La unión de anticuerpos biotinilados disminuye con cantidades crecientes de anticuerpos de ensayo y control. A: SDP011 a SDP051; B: SDP061 a SDP101; C: SDP111 a SDP151.

Las figuras 39A-O son gráficos que representan la valoración de anticuerpos anti-Cad-11 humanizados en un ensayo de reactividad cruzada de cadherina con péptidos que incluyen el inmunógeno peptídico de Cad-11 (línea roja en cada curva) y las secuencias homólogas correspondientes de las cadherinas 7, -8, -9, -11, -18, -20 y -24. La concentración de recubrimiento peptídico fue de 500 ng/ml. A: SDP011; B: SDP021; C: SDP031; D: SDP041; E: SDP051; F: SDP061; G: SDP071; H: SDP081; I: SDP091; J: SDP101; K: SDP111; L: SDP121; M: SDP131; N: SDP141; y O: SDP151.

Las figuras 40A-D representan las secuencias de aminoácidos de los dominios de la región variable de las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos anti-Cad-11 humanizados (A) SDP031 (SEQ ID Nos.: 71, 65), (B) SDP051 (SEQ ID NO: 71,69), (C) SDP061 (SEQ ID NO: 73,61), (D), SDP071 (SEQ ID NO:73,63).

La figura 41A es un gráfico que representa la valoración de SDP051 en un ensayo de reactividad cruzada de cadherina con péptidos que incluyen el inmunógeno peptídico de Cad-11 (rojo) o las secuencias homólogas correspondientes de las cadherinas 7, -8, -9, -11, -18, -20 y -24. La concentración de recubrimiento peptídico fue de 500 ng/ml.

La figura 41B es un gráfico que representa la valoración de SDP051 en un ensayo de reactividad cruzada de cadherina con péptidos que incluyen el inmunógeno peptídico de Cad-11 (rojo) o las secuencias homólogas correspondientes de las cadherinas 8 y 18. La concentración de recubrimiento peptídico fue de 50 ng/ml.

La figura 42 es un gráfico de sensograma para la unión de SDP051 a Cad-11 humana recombinante (rhCad-11).

La figura 43 es un gráfico que representa la unión dependiente de la concentración de anticuerpo de los anticuerpos anti-EC1 de Cad-11 humanizados SDP051 y SDP071 a células 431D-11 que expresan Cad-11 medido por FACS (Intensidad media de fluorescencia (MFI)). También se muestra la ausencia de unión a las células 431D que no expresan Cad-11.

Las figuras 44A-C son gráficos que representan la especificidad del anticuerpo SDP051 para Cad-11 usando un ensayo que mide el efecto de un péptido que incluye el antígeno Cad-11 sobre la capacidad del anticuerpo SDP051 para unirse a células que expresan Cad-11 en relación con los péptidos que incluyen los antígenos relacionados de Cad-20 o Cad-24 (Figura 44A), Cad-7 o Cad-18 (FIG. 44B) o Cad-8 o Cad-9 (FIG. 44C), sobre la capacidad del anticuerpo SDP051 para unirse a células que expresan Cad-11, medido mediante FACS (intensidad de fluorescencia media (MFI)).

Las figuras 45A y B son gráficos que representan la inmunogenicidad de (A) el anticuerpo anti-EC1 de Cad-11

quimérico murino/humano SYN0014 y (B) el anticuerpo anti-EC1 de Cad-11 humanizado SDP051 determinado por un ensayo de células T en el curso del tiempo de inmunogenicidad usando PBMC de 25 donantes. Los resultados para cada muestra por triplicado se promediaron y se normalizaron por conversión al índice de estimulación (SI). Se muestra el SI para cada punto de tiempo con cada donante. El límite para determinar las respuestas positivas con un  $SI \geq 2,0$  se resalta con la línea roja y se indican las respuestas significativas ( $p < 0,05$  en la prueba t de Student) (\*).

La figura 46 es un gráfico que muestra que SDP-051 a una dosis de 0,3  $\mu\text{g/ml}$  inhibe la invasión de FLS en un 50 % en comparación con una dosis de 3  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpo de control de isotipo (AC1-P).

La figura 47 es un gráfico que muestra que SDP-051 a una dosis de 0,3  $\mu\text{g/ml}$  inhibe la expresión de MMP en comparación con una dosis de 3  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpo de control de isotipo (AC1-P).

La figura 48 es un gráfico que ilustra una reducción del 47 % en la inflamación articular en ratones tratados con SDP051 en relación con ratones tratados con el anticuerpo de control AC1-P.

La figura 49 es un gráfico que representa los niveles séricos de anticuerpo SDP051 después de la administración a ratones (modelo de artritis KBN).

La figura 50 es un gráfico que representa los cambios en el grosor del tobillo en ratones tratados con diferentes dosis de anticuerpo SDP051 en relación con ratones tratados con anticuerpo de control AC3-1P (modelo de artritis KBN murina; estudio KBN024).

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, los términos "cadherina-11", "Cad-11" y "OB-Cadherina" se refieren a una proteína cadherina-11 natural o endógena (por ejemplo, de mamífero, por ejemplo humana) y a proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que es la misma que la de la proteína cadherina-11 natural o endógena (por ejemplo, proteínas recombinantes, proteínas sintéticas). Por consiguiente, los términos "cadherina-11", "Cad-11" y "OB-Cadherina", que se usan indistintamente en el presente documento, incluyen variantes polimórficas o alélicas y otras isoformas de una proteína cadherina-11 (por ejemplo, de mamífero, humana) producidas mediante, *por ejemplo*, corte y empalme alternativo u otros procesos celulares, que se producen de forma natural en mamíferos (por ejemplo, seres humanos, primates no humanos). Preferentemente, la proteína cadherina-11 es una proteína humana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 (véase, n.º de acceso en Genbank NP001788 y la Figura 15).

Como se define en el presente documento, un "antagonista de cadherina-11" es un anticuerpo humanizado que se une específicamente a un dominio EC1 de una proteína cadherina-11 de mamífero y antagoniza dicha proteína cadherina-11 de mamífero, que comprende una región variable de la cadena pesada de anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 69 y una región variable de la cadena ligera de anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 71. Preferentemente, el anticuerpo inhibe (por ejemplo, reduce, previene) una o más actividades mediadas por la cadherina-11 en una célula. Las actividades mediadas por la cadherina-11 incluyen, pero sin limitación, la unión de una proteína cadherina-11 a una o más de otras proteínas cadherina-11 de una manera homotípica, agregación de células que expresan cadherina-11, inducción de la expresión o actividad enzimática (por ejemplo, colagenasa, serina proteasas, MMP1, MMP3, MMP13) e inducción de citocinas (por ejemplo, citocinas inflamatorias) o factores de crecimiento (por ejemplo, IL-6, IL-8 o RANKL o TRANCE), migración de células que expresan cadherina-11 y destrucción del cartílago por células que expresan cadherina-11. En una realización, el antagonista de la cadherina-11 puede inhibir la unión de una proteína cadherina-11 a una o más proteínas cadherina-11, por ejemplo, bloqueando la interacción entre las secuencias donantes en el dominio EC1 de una proteína Cad-11 (por ejemplo, una proteína Cad-11 expresada en la superficie de una célula) con la secuencia de bolsillo en el dominio EC1 de una o más proteínas Cad-11 (por ejemplo, una o más proteínas Cad-11 expresadas en la superficie de otra célula).

Tal como se usa en el presente documento, un antagonista de cadherina-11 que "se une específicamente" a un dominio EC1 de una proteína cadherina-11 se refiere a un antagonista de cadherina-11 que se une (por ejemplo, en condiciones fisiológicas) un dominio EC1 de una proteína cadherina-11 con una afinidad (por ejemplo, una afinidad de unión) que es al menos aproximadamente 5 veces, preferentemente de al menos aproximadamente 10 veces, mayor que la afinidad con la que el antagonista de cadherina-11 se une a un dominio EC1 de otra proteína cadherina (por ejemplo, MN-Cadherina, Cadherina-8). En una realización particular, el antagonista de cadherina-11 que se une específicamente a un dominio EC1 de una proteína cadherina-11 se une a un epítipo presente en la SEQ ID NO:3, la porción N-terminal del dominio EC1 de la cadherina-11 humana, con una afinidad que es al menos aproximadamente 5 veces, preferentemente de al menos aproximadamente 10 veces, mayor que la afinidad con la que el antagonista de cadherina-11 se une a un epítipo presente en la SEQ ID NO:4, la porción N-terminal del dominio EC1 de MN-cadherina humana y la afinidad con la que el antagonista de cadherina-11 se une a un epítipo presente en la SEQ ID NO: 5, la porción N-terminal del dominio EC1 de la cadherina-8 humana.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" pretende abarcar tanto anticuerpos completos como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno, por ejemplo, fragmentos Fv, Fc, Fd, Fab, Fab', F(ab') y dAb). "Anticuerpo" se refiere a anticuerpos policlonales y monoclonales e incluye anticuerpos de origen natural y modificados genéticamente. (Véase, por ejemplo, Harlow et al., Antibodies A

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

5 El término "epítipo" se refiere a una unidad de estructura unida convencionalmente por una par  $V_H/V_L$  de inmunoglobulina. Un epítipo define el sitio de unión mínimo para un anticuerpo y, por lo tanto, representa el objetivo de especificidad de un anticuerpo.

La expresión "proteína de fusión" se refiere a una molécula de proteína individual recombinante, sintética, semisintética o de origen natural que comprende la totalidad o una porción de dos o más polipéptidos heterólogos.

10 El término "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos y no a una longitud específica; por tanto, los péptidos, los oligopéptidos y las proteínas están incluidos dentro de la definición de un polipéptido.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "péptido" se refiere a un compuesto que consiste en de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 residuos de aminoácidos en el que el grupo amino de un aminoácido está unido al grupo carboxilo de otro aminoácido por un enlace peptídico. Tales péptidos tienen, normalmente, menos de aproximadamente 100 residuos de aminoácidos de longitud y, preferentemente, tienen aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40 o aproximadamente 50 residuos.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "peptidomimético" se refiere a moléculas que no son péptidos o proteínas, pero que imitan aspectos de sus estructuras. Los antagonistas de peptidomiméticos pueden prepararse por procedimientos químicos convencionales (véase, por ejemplo, Damewood J.R. "Peptide Mimetic Design with the Aid of Computational Chemistry" en Reviews in Computational Biology, 2007, Vol. 9, págs. 1-80, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 1996; Kazmierski W.K., "Methods of Molecular Medicine: Peptidomimetic Protocols", Humana Press, New Jersey, 1999).

25 Como se define en el presente documento, "terapia" es la administración de un agente terapéutico o profiláctico particular a un sujeto que es un mamífero, tal como un ser humano, que da como resultado un beneficio terapéutico o profiláctico deseado para el sujeto.

30 Tal como se definen en el presente documento, un "régimen de tratamiento" es un régimen en el que uno o más agentes terapéuticos o profilácticos se administran a un sujeto mamífero a una dosis particular (por ejemplo, nivel, cantidad, cantidad) y en un horario particular o en intervalos particulares (por ejemplo, minutos, días, semanas, meses).

35 Como se define en el presente documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado en las condiciones de administración, tales como, pero sin limitación, una cantidad suficiente para inhibir (es decir, reducir, prevenir) la inflamación en una articulación (por ejemplo, inhibiendo la agregación de células, por ejemplo sinoviocitos, que expresan cadherina-11) o la formación, crecimiento o metástasis de un tumor. La efectividad de una terapia (por ejemplo, la reducción de la inflamación en una articulación y/o la prevención de la inflamación en una articulación) se puede determinar mediante procedimientos adecuados (por ejemplo, procedimientos de imagen, tales como MRI, RMN, TAC).

#### Cadherinas

45 Las cadherinas pertenecen a una gran familia de moléculas de adhesión dependientes de  $Ca^{2+}$  que participan en la adhesión celular uniéndose a otras cadherinas de manera homotípica (MJ Wheelock y KR Johnson, Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 19: 207-235 (2003)). Las cadherinas clásicas son proteínas transmembrana de un solo paso que contienen cinco dominios extracelulares (EC) de cadherina, cada uno de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud, una región transmembrana y un dominio citoplasmático conservado. Las cadherinas se dividen en cadherinas de tipo I o de tipo II en función del grado de homología entre los dominios EC. Las cadherinas de tipo II incluyen las cadherinas humanas- 5, -6, -8, -11 y -12, y MN-cadherina. La importancia relativa del papel de cada uno de los dominios extracelulares en la mediación de la unión intercelular no está clara.

#### Actividad de la cadherina-11 en sinoviocitos

55 La cadherina-11 participa en la unión entre sinoviocitos y sinoviocitos en el revestimiento sinovial de las articulaciones articuladas (Valencia y col., J. Exp. Med. 200 (12): 1673-1679 (2004); Kiener y Brenner, Arthritis Res Ther. 7(2):49-54 (2005)). Una proteína de fusión que comprendía los cinco dominios extracelulares de cadherina de cadherina-11 humana, fusionada con el dominio bisagra-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> de la IgG<sub>2</sub> humana, inhibió la formación de revestimiento de sinoviocitos *in vitro* (Kiener et al., Am. J. Pathol. 168 (2006)). Además, los anticuerpos anti-cadherina-11 antagonistas y una proteína de fusión que comprendía EC1-5 de cadherina-11 murina, fusionada con los dominios de bisagra CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> de IgG<sub>2</sub>a murina, inhibieron la inflamación y la tumefacción articular en modelos murinos de artritis reumatoide (Lee et al., Science 315:1006-1010 (2007)).

65 Antagonistas de cadherina-11

Un antagonista de cadherina-11 de la invención puede ser cualquier agente que se una específicamente a un dominio EC1 de una proteína cadherina-11 e inhiba (por ejemplo, reduzca o prevenga) una o más actividades mediadas por la cadherina-11 en una célula. Las actividades mediadas por la cadherina-11 incluyen, pero sin limitación, la agregación de células que expresan cadherina-11 en la superficie celular y la expresión o secreción de factores tales como, por ejemplo, colagenasa, serina proteasas, MMP1, MMP3, IL-6, IL-8 o RANKL/TRANSE. El agente es un anticuerpo humanizado de acuerdo con la invención.

Anticuerpos frente a cadherina-11

10 Como se describe en el presente documento, los anticuerpos que se unen a un epítipo dentro de una porción N-terminal del dominio EC1 de la cadherina-11 humana que comprende las secuencias donantes y el bolsillo de unión a cadherina de Cad-11 (por ejemplo, SEQ ID NO:3) bloquean la actividad de cadherina-11 in vitro con más eficacia que los anticuerpos que se unen a epítopos en otras regiones de esta proteína (véanse los ejemplos 1 y 2).

15 Por consiguiente, en una realización, Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente se une a un epítipo que está presente en la porción N-terminal del dominio EC1 de una proteína cadherina-11 que comprende las secuencias donantes y el bolsillo de unión a cadherina de Cad-11. El término "anticuerpo" pretende abarcar todos los tipos de anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno (por ejemplo, Fv, Fc, Fd, Fab, Fab', F(ab)', dAb). (Véase, por ejemplo, Harlow et al., *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Los anticuerpos específicos del dominio EC1 de Cad-11 es un anticuerpo humanizado. Los anticuerpos específicos del dominio EC1 de Cad-11 también se pueden unir directa o indirectamente a un agente citotóxico.

25 También se pueden producir otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a una porción N-terminal del dominio EC1 de una proteína Cad-11 e inhiben la actividad de la proteína Cad-11, construirse, modificarse por ingeniería genética y/o aislarse por procedimientos convencionales u otras técnicas adecuadas. Por ejemplo, se pueden generar anticuerpos que son específicos del dominio EC1 de una proteína cadherina-11 contra un inmunógeno adecuado, tal como un péptido del dominio EC1 de CADHERINA-11 recombinante de mamífero (por ejemplo, humano) (por ejemplo, SEQ ID NO:3) o una porción del mismo (incluyendo moléculas sintéticas, por ejemplo, péptidos sintéticos). Se han descrito diversos procedimientos (véase, por ejemplo, Kohler et al., *Nature*, 256: 495-497 (1975) y *Eur. J. Immunol.* 6: 511-519 (1976); Millstein et al., *Nature* 266: 550-552 (1977); Koprowski et al., la patente de Estados Unidos n.º 4.172.124; (Harlow, E. y D. Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY); *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2 (Suplemento 27, verano de 1994), Ausubel, F.M. et al., Eds., (John Wiley & Sons: New York, NY), Capítulo 11, (1991)). También se pueden producir anticuerpos inmunizando un huésped adecuado (por ejemplo, ratón) con células que expresan el dominio EC1 de cadherina-11 (por ejemplo, células cancerosas/líneas celulares) o células modificadas mediante ingeniería para que expresen el dominio EC1 de cadherina-11 (por ejemplo, células transfectadas). (Véase, por ejemplo, Chuntharapai et al., *J. Immunol.*, 152:1783-1789 (1994); Chuntharapai et al. patente de Estados Unidos n.º 5.440.021). Para la producción de anticuerpos monoclonales, se puede producir un hibridoma fusionando una línea celular inmortal adecuada (por ejemplo, una línea celular de mieloma, tal como SP2/0 o P3X63Ag8.653) con células productoras de anticuerpos. Las células productoras de anticuerpos se pueden obtener a partir de sangre periférica, o preferentemente, el bazo o los ganglios linfáticos, de seres humanos u otros animales adecuados inmunizados con el antígeno de interés. Las células fusionadas (hibridomas) pueden aislarse usando condiciones de cultivo selectivas y clonarse por dilución límite. Las células que producen anticuerpos con la especificidad deseada se pueden seleccionar mediante un ensayo adecuado (por ejemplo, ELISA).

Los fragmentos de anticuerpos pueden producirse por escisión enzimática o por técnicas recombinantes. Por ejemplo, la escisión con papaína o pepsina puede generar fragmentos Fab o F(ab')<sub>2</sub>, respectivamente. Otras proteasas con la especificidad de sustrato requerida también se pueden usar para generar fragmentos Fab o F(ab')<sub>2</sub>. Los anticuerpos también se pueden producir en diversas formas truncadas usando genes de anticuerpos en los que se han introducido uno o más codones de terminación aguas arriba del sitio natural de terminación. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una porción de la cadena pesada de F(ab')<sub>2</sub> se puede diseñar para incluir secuencias de ADN que codifican el dominio CH<sub>1</sub> dominio y la región de bisagra de la cadena pesada. Los anticuerpos humanizados están incluidos en la presente invención y el término "anticuerpo". Las diversas porciones de estos anticuerpos se pueden unir químicamente mediante técnicas convencionales o se pueden preparar como proteínas contiguas usando técnicas de ingeniería genética. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican una cadena humanizada se pueden expresar para producir una proteína contigua. Véase, *por ejemplo*, Cabilly et al., patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; Cabilly et al., patente europea n.º 0.125.023 B1; Boss et al., patente de Estados Unidos n.º 4.816.397; Boss *et al.*, patente europea n.º 0.120.694 B1; Neuberger, M.S. et al., documento WO 86/01533; Neuberger, M.S. *et al.*, patente europea n.º 0.194.276 B1; Winter, patente de Estados Unidos n.º 5.225.539; Winter, patente europea n.º 0.239.400 B1; Queen y col., patente europea n.º 0 451 216 B1; y Padlan, E.A. et al., documento EP 0 519 596 A1. Véanse también, Newman, R. et al., *BioTechnology*, 10: 1455-1460 (1992), con respecto al anticuerpo primatizado, y Ladner et al., y la patente de Estados Unidos N.º 4.946.778 y Bird, R.E. et al., *Science*, 242: 423-426 (1988)) con respecto a anticuerpos monocatenarios.

65 Los anticuerpos humanizados se pueden producir usando tecnología de ADN sintético o recombinante usando

procedimientos estándar u otras técnicas adecuadas. También pueden construirse secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, ADNc) que codifican regiones variables humanizadas usando procedimientos de mutagénesis por PCR para alterar las secuencias de ADN que codifican una cadena humana o humanizada, tal como un molde de ADN de una región variable previamente humanizada (véase, por ejemplo, Kamman, M., et al., Nucl. Acids Res., 17:5404 (1989)); Sato, K., et al., Cancer Research, 53: 851-856 (1993); Daugherty, B.L. et al., Nucleic Acids Res., 19(9): 2471-2476 (1991); y Lewis, A.P. y J.S. Crowe, Gene, 101, 297-302 (1991)). Usando estos u otros procedimientos adecuados, también se pueden producir fácilmente variantes. En una realización, las regiones variables clonadas (por ejemplo, dAbs) pueden mutarse y las secuencias que codifican variantes con la especificidad deseada pueden seleccionarse (por ejemplo, de una biblioteca de fagos; véase, por ejemplo, Krebber et al., documento U.S. 5.514.548; Hoogenboom et al., documento WO 93/06213, publicado el 1 de abril de 1993).

Se pueden usar otros procedimientos adecuados para producir o aislar anticuerpos de la especificidad requerida, incluyendo, por ejemplo, procedimientos que seleccionan un anticuerpo recombinante o fragmento de unión a anticuerpo (por ejemplo, dAbs) de una biblioteca (por ejemplo, una biblioteca de expresión en fagos) o que se basan en la inmunización de animales transgénicos (por ejemplo, ratones). Los animales transgénicos capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Xenomouse ®(Abgenix, Fremont, CA)) y pueden producirse utilizando procedimientos adecuados (véase, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551-2555 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993); Lonberg et al., patente de Estados Unidos n.º 5.545.806; Surani et al., patente de Estados Unidos n.º 5.545.807; Lonberg et al., documento WO 97/13852).

#### Identificación de antagonistas de cadherina-11

Los anticuerpos que se unen específicamente al dominio EC1 de la cadherina-11 humana se pueden identificar, por ejemplo, mediante detección selectiva de bibliotecas de anticuerpos combinatorias disponibles comercialmente (Dyax Corp., MorphoSys AG). Las bibliotecas de anticuerpos combinatorias adecuadas y procedimientos estándar de selección de estas bibliotecas se describen en Hoet et al., Nature Biotechnology 23(3):344-348 (2005) y Rauchenberger et al., J. Biol. Chem. 278(40):38194-38205 (2003). Tales bibliotecas o colecciones de moléculas también pueden prepararse usando procedimientos químicos bien conocidos.

Como alternativa, se pueden identificar los anticuerpos murinos que se unen específicamente al dominio EC1 de la cadherina-11 humana, por ejemplo, inmunizando ratones con dominios EC1 de proteínas o péptidos de EC1 junto con un adyuvante para romper la tolerancia al antígeno. Estos anticuerpos pueden cribarse para detectar la especificidad y la actividad deseadas y, a continuación, humanizarse usando técnicas conocidas para crear agentes adecuados para el tratamiento de enfermedades humanas.

Los agentes que se unen a cadherina-11 se pueden evaluar adicionalmente para determinar la actividad antagonista de cadherina-11. Por ejemplo, una composición que comprende una proteína cadherina-11 se puede usar en un ensayo de cribado o de unión para detectar y/o identificar agentes que se unen y antagonizan la proteína cadherina-11. Las composiciones adecuadas para su uso incluyen, por ejemplo, células que expresan de forma natural una proteína cadherina-11 (por ejemplo, un sinoviocito), extractos de tales células y proteína cadherina-11 recombinante.

Un agente que se une a una proteína cadherina-11 se puede identificar en un ensayo de unión competitiva, por ejemplo, en el que se evalúa la capacidad de un agente de ensayo para inhibir la unión de cadherina-11 a un agente de referencia. El agente de referencia puede ser una proteína Cad-11 de longitud completa o una porción de la misma que comprende el dominio EC1. El agente de referencia se puede marcar con un marcador adecuado (por ejemplo, radioisótopo, marcador epitópico, marcador de afinidad (por ejemplo, biotina y avidina o estreptavidina), marcador espín, enzima, grupo fluorescente, grupo quimioluminiscente, colorante, metal (por ejemplo, oro, plata), perla magnética) y se puede determinar la cantidad de agente de referencia marcado requerido para saturar la proteína cadherina-11 en el ensayo. La especificidad de la formación del complejo entre la proteína cadherina-11 y el agente de ensayo se puede determinar usando un control adecuado (por ejemplo, agente no marcado, marcador solo).

La capacidad de un agente de ensayo para inhibir la formación de un complejo entre el agente de referencia y una proteína de cadherina-11 se puede determinar como la concentración de agente de ensayo requerida para una inhibición del 50 % (valor de la  $CI_{50}$ ) de la unión específica del agente de referencia marcado. La unión específica se define, preferentemente, como la unión total (por ejemplo, el marcador total en el complejo) menos la unión inespecífica. La unión inespecífica se define, preferentemente, como la cantidad de marcador aún detectada en los complejos formados en presencia de exceso de agente de referencia no marcado. Los agentes de referencia adecuados para su uso en el procedimiento incluyen moléculas y compuestos que se unen específicamente a cadherina-11, *por ejemplo*, un anticuerpo que se une a cadherina-11.

Un agente que antagoniza una proteína de cadherina-11 puede identificarse mediante detección selectiva de agentes que tienen la capacidad de antagonizar (reducir, prevenir, inhibir) una o más actividades de cadherina-11, tales como, por ejemplo, una actividad de unión (por ejemplo, unión homotípica a Cad-11). Tales actividades se pueden evaluar utilizando un ensayo *in vitro* o *in vivo*. Anteriormente se han descrito ejemplos de ensayos para la

actividad de cadherina-11 (Patel, SD, et al., Cell 124: 255-1268 (2006); Lee *et al.*, Science 375:1006-1010 (2007)).

Una vez que se identifica un antagonista de cadherina-11, se puede evaluar la capacidad del antagonista de cadherina-11 para interferir (por ejemplo, reducir, inhibir, prevenir) con una o más funciones biológicas o propiedades asociadas con la actividad de cadherina-11 en una célula por ejemplo, usando un ensayo basado en células diseñado para medir una función o propiedad biológica concreta asociada con la cadherina 11. Entre las propiedades y funciones biológicas que se sabe que están asociadas a la expresión y/o actividad de la cadherina-11 se incluyen, pero sin limitación, adhesión celular, migración celular, invasión celular, clasificación celular, condensación celular, reorganización celular, mantenimiento de la integridad y la arquitectura tisular, inhibición por contacto de la proliferación celular y la transformación maligna de células de cáncer (por ejemplo, tumores) (Kiener y Brenner, Arthritis Res Ther. 7(2):49-54 (2005)). Además, en el presente documento se muestra que los antagonistas de Cad-11 inhiben la producción de MMP activas por los sinoviocitos. Los expertos en la materia conocen ensayos adecuados para evaluar una o más funciones biológicas de las cadherinas (véase, por ejemplo, Patel, SD, et al., Cell 124: 1255-1268 (2006)) e incluyen, por ejemplo, el ensayo de agregación celular descrito en el presente documento (véanse los ejemplos de la sección Materiales y procedimientos).

#### Terapia

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que los primeros aproximadamente 35 aminoácidos (por ejemplo, de aproximadamente 33 a aproximadamente 37 aminoácidos) del dominio EC1 de Cad-11 son necesarios para la unión homotípica de cadherina y que los agentes que se unen específicamente a esta región de cad-11 pueden inhibir eficazmente la unión entre moléculas de Cad-11. Por consiguiente, dichos agentes son útiles en el tratamiento y prevención de trastornos (por ejemplo, trastornos inflamatorios, fibrosis, cáncer) asociados con la expresión o actividad de cad-11 en las células (por ejemplo, sinoviocitos). En el presente documento se divulga un antagonista de cadherina-11 para su uso en el tratamiento de un trastorno mediado por la cadherina-11 en un sujeto mamífero que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de cadherina-11 que se une a un péptido de dominio EC1 de cadherina-11 humana (SEQ ID NO:3).

Tal como se usa en el presente documento, un "trastorno mediado por la cadherina-11" se refiere a una enfermedad, trastorno o afección que implica, o en la que participan (por ejemplo, está causada), células que expresan la proteína cadherina-11. Los trastornos en los que participa la cadherina-11 que se pueden tratar con los anticuerpos humanizados de la invención incluyen, pero sin limitación, trastornos inflamatorios (por ejemplo, trastornos articulares inflamatorios), trastornos de fibrosis (por ejemplo, fibrosis dérmica, fibrosis pulmonar) y cáncer.

Usando los anticuerpos de la invención, se puede tratar un trastorno mediado por la cadherina-11 en un mamífero (por ejemplo, un ser humano) mediante la administración del anticuerpo en una cantidad que sea suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico, por ejemplo, inhibiendo la agregación de células o inhibiendo la migración de células o inhibiendo la expresión de proteasas activas o moléculas inflamatorias por las células, que expresan cadherina-11 (por ejemplo, sinoviocitos, fibroblastos, células tumorales).

Por consiguiente, un aspecto de la invención se refiere al anticuerpo humanizado definido en el presente documento para su uso en el tratamiento de un trastorno inflamatorio en un sujeto mamífero. Los trastornos inflamatorios generalmente se caracterizan por la expresión de moléculas proinflamatorias (por ejemplo, citocinas inflamatorias y factores de crecimiento) y la activación de las células inmunitarias (por ejemplo, macrófagos, monocitos, linfocitos, plasmocitos, leucocitos, fibroblastos, neutrófilos, linfocitos T). Los trastornos inflamatorios incluyen, por ejemplo, trastornos articulares inflamatorios, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), psoriasis, dermatitis (por ejemplo, eccema), amiloidosis renal, nefritis glomerular, vasculitis, enfermedad inflamatoria pélvica, prostatitis crónica, oftalmopatía de Graves. En una realización particular, el trastorno inflamatorio es un trastorno autoinmunitario.

En una realización particular, la invención se refiere al anticuerpo humanizado definido en el presente documento para su uso en el tratamiento de un trastorno articular inflamatorio en un sujeto mamífero. El trastorno articular inflamatorio puede ser cualquier trastorno asociado o caracterizado por la expresión de cadherina-11 en las células de una articulación articulada (por ejemplo, sinoviocitos). Los ejemplos de trastornos articulares inflamatorios que pueden tratarse mediante la presente invención incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide, artritis psoriásica, síndrome de Reiter, espondilitis anquilosante, artritis juvenil crónica, enfermedad de Lyme crónica y artritis articular asociada con lupus eritematoso sistémico. En una realización particular, el trastorno articular inflamatorio es artritis reumatoide.

En otro aspecto, la invención se refiere al anticuerpo humanizado definido en el presente documento para su uso en el tratamiento de la fibrosis en un sujeto mamífero. Tal como se usa en el presente documento, el término "fibrosis" se refiere a la formación o desarrollo de exceso de tejido conectivo fibroso en un órgano o tejido como un proceso reparador o reactivo. Entre los ejemplos de fibrosis se incluyen, pero sin limitación, fibrosis vascular (por ejemplo, fibrosis vascular asociada con hipertensión pulmonar), fibrosis renal, fibrosis hepática (por ejemplo, cirrosis, fibrosis de la piel/dérmica (por ejemplo, esclerodermia), fibrosis del pulmón/pulmonar (por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática), mielofibrosis, fibrosis endomiocárdica, fibrosis de la articulación, fibrosis del mesotelio, fibrosis de los

ojos, la fibrosis del intestino y fibrosis intersticial. En una realización particular, la fibrosis es fibrosis pulmonar o del pulmón. En otra realización, la fibrosis es dérmica o fibrosis de la piel.

5 Sin desear quedar ligado a teoría alguna concreta, se cree que ciertos tipos de células tumorales expresan cadherina-11, que puede estimular la metástasis tumoral. Por consiguiente, se puede usar un antagonista de Cad-11 de la invención para inhibir la formación, crecimiento y/o metástasis de tumores en un sujeto. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere al anticuerpo humanizado definido en el presente documento para su uso en el tratamiento de un cáncer caracterizado por células que expresan cad-11 en un sujeto mamífero. Los cánceres que implican células que expresan proteína cad-11 pueden incluir, por ejemplo, leucemia (por ejemplo, LMA, LLC, leucemia prolinfocítica), cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón microcítico y no microcítico), cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de cerebro (por ejemplo, astrocitoma, glioma, glioblastoma, meduloblastoma, meningioma, neuroblastoma), cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer epitelial, cáncer nasofaríngeo (por ejemplo, carcinoma de células escamosas oral o laríngeo), linfoma (por ejemplo, linfoma folicular), cáncer de útero (por ejemplo, histiocitoma fibroso maligno), cáncer hepático (por ejemplo, carcinoma hepatocelular), cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer renal, tumores de células germinales masculinas, mesotelioma maligno, síndrome de mielodisplasia, cáncer de ovarios, cáncer pancreático o biliar, cáncer de próstata, cáncer de tiroides (por ejemplo, tumores tiroideos foliculares esporádicos) y cáncer urotelial.

20 En un aspecto, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de cadherina-11 a un paciente que lo necesite. La cantidad del antagonista de cadherina-11 que se va a administrar (por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz) puede determinarla un médico usando la guía proporcionada en el presente documento y otros procedimientos conocidos en la materia y depende de varios factores, incluidos, por ejemplo, el agente particular elegido, la edad del sujeto, la sensibilidad, la tolerancia a las fármacos y el bienestar general. Por ejemplo, las dosis adecuadas para los antagonistas de cad-11 que son anticuerpos pueden ser de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg de peso corporal por tratamiento y, preferentemente, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por tratamiento. Las dosis adecuadas para un antagonista de cad-11 de molécula pequeña pueden ser de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal por tratamiento. La determinación de la dosificación para un agente, paciente y cáncer concretos está dentro de las capacidades de un experto en la materia. Preferentemente, la dosis no causa ni produce efectos secundarios adversos mínimos (por ejemplo, respuesta inmunogénica, náuseas, mareos, malestar gástrico, síndromes de hiperviscosidad, insuficiencia cardíaca congestiva, accidente cerebrovascular, edema pulmonar).

40 Una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de cadherina-11 se puede administrar solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos diferentes (por ejemplo, agentes antiinflamatorios, agentes quimioterapéuticos). Los agentes antiinflamatorios adecuados que son útiles para tratar trastornos inflamatorios de las articulaciones, en particular AR, que pueden administrarse en combinación con antagonistas de cad-11 de la invención, incluyen, pero sin limitación, (i) fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE; *por ejemplo*, detopropeno, diclofenaco, diflunisal, etodolaco, fenopropeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, meclofenamato, ácido mefenámico, meloxicam, nabumeona, naproxeno sódico, oxaprozina, piroxicam, sulindaco, tolmetina, celecoxib, rofecoxib, aspirina, salicilato de colina, salsalto y salicilato de sodio y magnesio); (ii) esteroides (por ejemplo, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona); (iii) DMARD, es decir, fármacos antireumáticos modificadores de la enfermedad (por ejemplo, ciclosporina, azatioprina, metotrexato, leflunomida, ciclofosfamida, hidroxicloquina, sulfasalazina, D-penicilamina, minociclina y oro); o (iv) proteínas recombinantes (por ejemplo, ENBREL® (etanercept, un receptor soluble de TNF), REMICADE® (infiximab, un anticuerpo quimérico monoclonal anti-TNF), ORENCIA® (abatacept, un receptor soluble de CTLA4), ACTEMRA® (tocilizumab, un anticuerpo monoclonal frente al receptor de IL-6) y RITUXAN® (rituximab, un anticuerpo monoclonal frente a CD20).

55 Por lo tanto, un antagonista de cadherina-11 se puede administrar como parte de una terapia de combinación (por ejemplo, con uno o más agentes terapéuticos adicionales). El antagonista de Cad-11 puede administrarse antes, después o al mismo tiempo que uno o más agentes terapéuticos diferentes. En algunas realizaciones, el antagonista de cadherina-11 y otro agente terapéutico se pueden coadministrar simultáneamente (por ejemplo, concurrentemente) como formulaciones separadas o como una formulación conjunta. Como alternativa, los agentes pueden administrarse secuencialmente, como composiciones separadas, dentro de un marco de tiempo apropiado según lo determine el médico experto (por ejemplo, un tiempo suficiente para permitir una superposición de los efectos farmacéuticos de las terapias). El antagonista de cadherina-11 y uno o más de otros agentes terapéuticos se pueden administrar en una sola dosis o en dosis múltiples, en un orden y en un programa adecuados para lograr un efecto terapéutico deseado (por ejemplo, una reducción y/o inhibición de la inflamación articular). Las dosis y los regímenes de administración adecuados pueden determinarlos un médico y dependen del o los agentes elegidos, la formulación farmacéutica y la vía de administración, varios factores relacionados con el paciente y otras consideraciones.

La efectividad de una terapia (por ejemplo, la reducción o eliminación de la inflamación articular y/o la prevención o inhibición de la inflamación articular) se puede determinar mediante cualquier procedimiento adecuado (por ejemplo, formación de imágenes (RM, RMN)).

5 De acuerdo con la invención, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo humanizado a un sujeto mamífero para SU uso para tratar un trastorno inflamatorio articular. La expresión "sujeto mamífero" se define en el presente documento de modo que incluya mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos) vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, cobayas, ratas, ratas u otros bóvidos, óvidos, équidos, caninos, felinos, roedores y especies murinas.

10 Los agentes que son antagonistas de cad-11 se pueden administrar a un sujeto mamífero por diversas rutas. Por ejemplo, el agente se puede administrar por cualquier vía parenteral o no parenteral, incluyendo, por ejemplo, por vía tópica (por ejemplo, crema, pomada) por vía nasal (por ejemplo, solución, suspensión). La administración parenteral puede incluir, por ejemplo, administración intraarticular, intramuscular, intravenosa, intraventricular, intraarterial, intratecal, subcutánea o intraperitoneal. El agente también se puede administrar por vía oral (por ejemplo, en cápsulas, suspensiones, comprimidos o dietas), por vía transdérmica, intradérmica, tópica, mediante inhalación (por ejemplo, intrabronquial, intranasal, inhalación oral o gotas intranasales), transmucosa o rectal. La administración puede ser local o sistémica, según corresponda, y se puede usar más de una ruta al mismo tiempo, si se desea. La administración localizada de un antagonista de cad-11 se puede lograr mediante inyección intraarticular (por ejemplo, inyección directa del agente en una articulación). El modo de administración preferente puede variar dependiendo del agente particular elegido. Sin embargo, generalmente es preferente la administración sistémica intravenosa o subcutánea para anticuerpos.

25 La administración también puede ser mediante inyección en el cerebro o la cavidad corporal de un paciente o mediante el uso de un sistema de administración en matriz de liberación controlada o sostenida o mediante la administración *in situ* utilizando micelas, geles y liposomas. Los dispositivos nebulizadores, los inhaladores de polvo y las soluciones en aerosol son representativos de los procedimientos que se pueden usar para administrar tales preparaciones al tracto respiratorio. La administración puede ser *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*.

30 Los agentes que son antagonistas de cadherina-11 se pueden administrar a un sujeto mamífero como parte de una composición farmacéutica o fisiológica, por ejemplo, como parte de una composición farmacéutica que comprende un antagonista de cadherina-11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones o composiciones que comprenden un antagonista de cadherina-11 o composiciones que comprenden un antagonista de cadherina-11 y uno o más agentes terapéuticos diferentes (por ejemplo, un agente antiinflamatorio) variará según la vía de administración seleccionada (por ejemplo, solución, emulsión o cápsula). Los vehículos farmacéuticos adecuados pueden contener ingredientes inertes que no interaccionan con el antagonista de cadherina-11. Pueden emplearse técnicas de formulación farmacéutica estándar, tales como las descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Los vehículos farmacéuticos adecuados para administración parenteral incluyen, por ejemplo, agua estéril, solución salina fisiológica, solución salina bacteriostática (solución salina que contiene aproximadamente 0,9 % mg/ml de alcohol bencílico), solución salina tamponada con fosfato, solución de Hank, lactato de Ringer y similares. Las formulaciones también pueden incluir pequeñas cantidades de sustancias que mejoran la eficacia del principio activo (por ejemplo, agentes emulsionantes, agentes solubilizantes, agentes de tamponamiento del pH, agentes humectantes). Los procedimientos de las composiciones de encapsulación (tales como en un recubrimiento de gelatina dura o ciclodextrano) son conocidos en la materia. Para la inhalación, el agente se puede solubilizar y cargar en un dispensador adecuado para administración (por ejemplo, un atomizador o nebulizador o dispensador de aerosol presurizado).

50 A continuación, se ilustrará la presente invención mediante los ejemplos siguientes, que no se pretende que sean limitantes de ningún modo.

### Ejemplos

Ejemplo de referencia 1: Identificación de Fab que tiene especificidad de unión por un epítipo dentro de los 35 aminoácidos N-terminales del dominio EC1 de la cadherina-11 humana.

55 Materiales y procedimientos

Transferencia de tipo Western

60 Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (NC) usando procedimientos estándar. Brevemente, la membrana de NC se aclaró con solución salina tamponada con tris-tween (TBST) (8,8 g/l de NaCl, 0,2 g/l de KCl, 3 g/l de base Tris, 500 ul/l de Tween-20, pH a 7,4). La membrana se bloqueó con BSA al 4 % disuelto en TBST durante una hora a 22 °C. La membrana de NC se aclaró 3 veces durante 5 minutos, cada vez con TBST. El anticuerpo frente a cad-11 humana de ratón se diluyó a 0,5 µg/ml en TBST y la NC se incubó durante 1 hora a 22 °C. La membrana de NC se aclaró 3X durante 5 minutos cada uno en TBST. El anticuerpo de cabra anti-Ig de deratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) se diluyó a 1 µg/ml en

TBST y la membrana de NC se incubó en solución secundaria durante un tiempo mínimo de 1 hora a temperatura ambiente (TA) a 22 °C. La membrana DE NC se aclaró 3 veces durante 5 minutos cada vez en TBST. La señal se desarrolló usando el procedimiento HRP estándar.

## 5 ELISA

El antígeno (5 µg/ml o 50 µg de Cad-11-EC-1-Fc o 5 µg/ml de péptido cadherina) se diluyó en un tampón y se usó para recubrir las placas durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron y, a continuación, se bloquearon con BSA al 1,5 %, 5 % de leche en polvo baja en grasa en tampón de dilución PBS: 1,5 % de BSA, 2,5 % leche en polvo baja en grasa, 0,1 % de Tween-20 en PBS. A continuación, se incubaron las placas con lisado bacteriano que contenía los fAb humanos anti-cad-11 o fAb humanos anti-cad-11 purificados durante 1 hora. Tras el lavado, se aplicó el anticuerpo secundario (a-hu-Fab conjugado con Cy5 diluido a 1/100) durante 25 minutos. A continuación, se lavaron las placas y se leyó la fluorescencia resultante.

## 15 Resultados

Se analizaron tres conjuntos de anticuerpos específicos de cadherina-11 previamente indicados para determinar su capacidad para unirse al dominio EC1 de la cadherina-11 humana. Estos anticuerpos incluyeron anticuerpos que se generaron contra un inmunógeno de proteína de fusión cadherina-11-Fc de ratón en ratones deficientes en cadherina-11 o con inactivación de la misma (Lee et al., Science 315:1006-1010 (2007)), los anticuerpos que se generaron en ratones de tipo salvaje para la cadherina-11 contra un inmunógeno de proteína de fusión cadherina-11-Fc humana que se había producido en células CHO (Valencia et al., J. Exp. Med. 200 (12): 1673-1679 (2004)), y los anticuerpos que se generaron en ratones tipo salvaje para la cadherina-11 contra una proteína producida en bacterias que contenía los dominios EC1-3 de cadherina-11 humana. Estos anticuerpos se analizaron mediante análisis Western para determinar la capacidad para unirse a proteínas de fusión que solo contenían el dominio EC1 de cad-11 humana (cadherina-11-EC1-Fc), los dominios EC1 y EC2 de cad-11 (Cad-11-EC1/2-Fc) o los 5 dominios EC de cad-11 (cadherina-11-EC1-5-Fc). Ninguno de los anticuerpos analizados reconoció las proteínas de fusión EC1-Fc o EC1-2-Fc en una transferencia de tipo Western (Figura 1A). Sin embargo, los anticuerpos de cada uno de los tres conjuntos analizados reconocieron la proteína de fusión Cad-11-Fc humana que incluía los dominios extracelulares 1 a 5 (Figura 1B). Estos resultados indican que los anticuerpos analizados no se unieron a los dominios EC1 o EC2 de cad-11 humana, pero reconocieron epítomos en otras partes de la región extracelular de esta proteína.

Los anticuerpos anti-cad-11 publicados disponibles que se unen a las células que expresan cad-11, 13C2, 23C6, 5F82 (Lifespan Science) y 283416 (R&D Systems), así como el anticuerpo de unión a EC1 de cad-11 H1M1 y el anticuerpo de control, MOPC, se analizaron mediante ELISA para determinar la capacidad de unirse a proteínas de fusión que contenían solo el dominio EC1 de cad-11 humana (cadherina-11-EC1-Fc) o los 5 dominios EC de cad-11 (cadherina-11-EC1-5-Fc). Ninguno de los anticuerpos anti-cad-11 publicados disponibles analizados reconoció el EC1-Fc (Figura 1B, barras abiertas) (los datos para 283416 no se muestran en el presente documento). Sin embargo, el anticuerpo H1M1 de unión a EC1 de cad-11 se unió tanto a cadherina-11-EC1-Fc como a cadherina-11-EC1-5-Fc (Figura 1B, barra cerrada). El anticuerpo de control MOPC no se unió a ninguna proteína de fusión. Estos resultados indican que los anticuerpos anti-cad-11 publicados disponibles no se unen al dominio EC1 de la cad-11 humana, pero reconocieron epítomos en otras partes de la región extracelular de esta proteína.

Para crear un anticuerpo específico de un epítomo dentro de los 35 aminoácidos N-terminales del dominio EC1 de cadherina-11 humana, se cribó una biblioteca de expresión en fagos (MorphoSys AG) que codifican fragmentos Fab humanos. Los Fab candidatos se identificaron utilizando dos criterios de selección: una selección positiva para la unión a un péptido que incluía los primeros 35 aminoácidos del dominio EC1 cadherina-11 humana y una selección negativa para la unión a péptidos correspondientes de los dominios EC1 de dos cadherinas estrechamente relacionadas y cadherinas altamente homólogas, cadherina-8 y MN-cadherina (Figura 2). Se usó un ELISA para evaluar la unión.

Se realizaron dos selecciones. En la primera selección, mediante ELISA se identificaron 96 clones de Fab que se unieron al péptido EC1 de cadherina-11. Siete (7) candidatos de Fab unieron al péptido EC-1 de cad-11; sin embargo, solo dos de estos se unieron tanto al péptido EC-1 como a la proteína de fusión EC1-2-Fc. Uno de estos dos Fab también se unió al péptido MN-Cad. Por consiguiente, solo uno de los siete clones de Fab se unió específicamente a la proteína de fusión EC1-Fc, pero no se unió a los péptidos del dominio MN-Cad y EC1 de cadherina-8. En una segunda selección, se observaron resultados similares, ya que solo 1 de 96 Fab (clon F9) que mostraban especificidad por el péptido EC1 de cadherina-11 y la proteína de fusión EC1-2-Fc, no se unieron a los péptidos de MN-Cad y el dominio EC1 de cadherina-8 (Figura 3). La mayoría de los Fab de unión al dominio EC1 de cad-11 analizados mostró reactividad cruzada con el péptido MN-Cad, que contiene una secuencia EEY CAR que se solapa con la secuencia EEY CAR de cad-11.

Ejemplo de referencia 2: Un Fab que se une al dominio EC1 de la cadherina-11 inhibe la agregación celular mediada por cad-11 en un ensayo *in vitro*.

## Materiales y procedimientos

Ensayo *in vitro* de agregación de cadherina-11

- 5 Las células 431-D crecen en suspensión y normalmente no expresan cadherinas y no se agregan. Las células 431-D-11 se han modificado genéticamente para expresar Cad-11. Cuando se incuban las células 431-D-11 en medio solo y comienzan a agregarse durante 40 minutos y los grupos de células se depositan en el fondo del pozo y se pueden medir las células no agregadas restantes en suspensión y se calcula el porcentaje de células 431-D-11 agregadas. Para el ensayo de agregación, las células 431-D-11 (células D-11) se cultivaron hasta subconfluencia en un matraz y, después, se retiraron del matraz usando Tripsina al 0,05 % más EDTA 0,53 mM. Se añadieron aproximadamente  $2 \times 10^6$  células 431-D-11 a 2 ml de medio SME (medio Eagle modificado de Dulbecco con contenido alto de glucosa, HEPES 0,1M a pH 7,4 y 5U/ml de ADNasa) y se epreincubaron durante 15 minutos en hielo, en ausencia o en presencia de un agente de ensayo (por ejemplo, anticuerpo, Fab, proteína de fusión). Después de la preincubación con el agente de ensayo, las células se transfirieron a un pocillo de fondo redondo en una placa de 24 pocillos y se incubaron a 37 °C en rotación a 130 rpm en un agitador rotatorio. A medida que las células se agregan, se hunden al fondo del pocillo. A 0 minutos y a 40 minutos, se extrajeron 200 µl del centro de la muestra del pocillo y se mezclaron con 25 µl de glutaraldehído al 8 % para fijar las células. Se añadieron 200 µl de la muestra fija de células a 9,8 ml de solución salina isotónica de contador Coulter y se contaron usando un contador Coulter fijado en el umbral de 8 µm a 24 µm. Se registraron 3 recuentos de células por muestra. Se calculó el porcentaje de células reducidas o agregadas a los 40 minutos en comparación con el porcentaje a 0 minutos de punto temporal.

## Resultados

- 25 Un Fab candidato (clon F9) que tiene especificidad de unión por un epítipo dentro de los 35 aminoácidos N-terminales del dominio EC1 de la cadherina-11, que no se une a los dominios EC1 de MN-Cad o Cad-8, se analizó para determinar la capacidad para inhibir la agregación celular mediada por cad-11 usando un ensayo *in vitro* de agregación celular a cadherina-11. El Fab candidato inhibió significativamente la agregación de células mediada por cadherina-11 a concentraciones de 1 µg/ml o inferiores (Figuras 4 y 5). Por el contrario, un Fab hecho a partir del anticuerpo 13C2 que se une a un epítipo en la región extracelular de cad-11 fuera de los dominios EC1/2 inhibió la agregación de cadherina-11 solo a una concentración de 10 µg/ml, lo que sugiere que el Fab F9 inhibe la actividad de cad-11 más eficazmente a concentraciones más bajas que los anticuerpos que se unen a otras porciones del dominio extracelular de la cad-11.
- 35 La agregación celular mediada por cad-11 también fue inhibida por varios Fab anti-dominio EC1 de cad-11 que eran específicos para cad-11 solo, Cad-11 y Cad-8, Cad-11 y MN-Cad, o Cad-11, Cad-8 y MN-Cad (figuras 6 y 7). Todos los Fab específicos del dominio EC1 de cadherina analizados inhibieron la agregación celular *in vitro* relativo a las muestras de control (por ejemplo, medio SME (figura 6), un Fab específico para GFP (figura 7)).
- 40 Ejemplo de referencia 3: Generación de proteínas de fusión de cadherina-11/inmunoglobulina que contienen el dominio EC1 de cadherina-11 humana.

- La región EC1 de cadherina-11 se preparó a partir de un vector que codifica el ADNc de cadherina-11 humana de longitud completa (la cad-11 humana clonada en los sitios Not1 y Kpn-1 del vector Invitrogen pCEP4®) utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) realizada en condiciones estándar usando los siguientes cebadores oligonucleotídicos para introducir los sitios EcoR1 y BglIII (véanse las secuencias subrayadas en los cebadores directo e inverso, respectivamente) en el producto amplificado:

50 Cebador directo:  
 tttttttgaattcatgaaggagaactactgtttacaagc (SEQ ID NO:8)

EcoR1

55 Cebador inverso:  
 ttttttttagatctctggaccttgacaatgaattccgacgg (SEQ ID NO:9)

BglIII

- 60 El producto amplificado se digirió con las enzimas de restricción EcoR1 y BglIII, y el producto de la digestión se aisló y se ligó en el vector pFUSE-IlgG2e1-Fc1 (InvivoGen) usando los sitios EcoR1 y BglIII correspondientes. Las bacterias competentes TOP10 (Invitrogen) se transformaron como describe el fabricante con el producto de ligación y las bacterias con el plásmido cadherina-11-EC1-Fc se seleccionaron con zeomicina. Se aisló el plásmido cadherina-11-EC1-Fc, se secuenció y después se usó para transfectar transitoriamente células 293F. Se recogió el medio acondicionado y se purificó la proteína de fusión cadherina-11-EC1-Fc (SEQ ID NO: 9) usando filtración de

- flujo tangencial seguida de aislamiento en una columna con una mezcla 50/50 de proteína A/proteína G equilibrada en HEPES 20 mM pH 7,4, NaCl 137 mM, KCl 3 mM y CaCl<sub>2</sub> 1mM. La proteína de fusión cadherina-11-EC1-Fc purificada se eluyó de la columna usando glicina 0,1 M (pH 3) y CaCl<sub>2</sub> 1 mM y en tubos que contenían 200 µl de Tris 1 M, a pH 7,4 y CaCl<sub>2</sub> 1 mM. Las fracciones eluidas con la proteína de fusión cad-11 se dializaron contra Hepes 20 mM (pH 7,4), NaCl 137 mM, KCl 3 mM y CaCl<sub>2</sub> 1 mM. El tamaño de la proteína se confirmó mediante SDS PAGE (Figura 10) y la identidad se confirmó mediante análisis Western usando un anticuerpo que reconoce la región Fc humana (figura 11) y secuenciación N-terminal (no mostrada). Se produjo Cad-11-EC1-2-Fc utilizando técnicas y condiciones similares a las descritas anteriormente.
- 10 Ejemplo de referencia 4: Una proteína de fusión de inmunoglobulina Cad-11-EC1-Fc inhibe la agregación celular mediada por cad-11 en un ensayo *in vitro*.

#### Materiales y procedimientos

- 15 Invasión/migración celular a un tapón de matrigel

Se evaluó la actividad migratoria de sinoviocitos de tipo fibroblastos (FLS) en transpocillos revestidos con ECM de Matrigel en medio FLS (medio Eagle modificado de Dulbecco con contenido alto de glucosa [Sigma # D7777], 10 % de suero bovino fetal [Benchmark #100-106], 1 % de penicilina-estreptomina [Gibco 315140-122], 1 % de L-Glutamina [Gibco #25030], 0,5 % de gentamicina [Gibco #15710-064]. Se añadieron suspensiones de células FLS humanas en medio FLS que contiene 1x10<sup>4</sup> células al inserto de control o al inserto recubierto de matrigel fijado en el pocillo de una placa de 24 pocillos que contenía 0,750 ml de medio FLS. A continuación, se incubaron las placas en una incubadora de cultivo de tejido humidificado a 37 °C, en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> durante 22 horas.

25 Para calcular el número de células que migraron, se eliminaron las células no invasoras de la superficie superior de la membrana de los insertos de control frotando con un bastoncillo de algodón. Se repite una segunda limpieza con un bastoncillo de algodón humedecido con medio FLS. A continuación, se fijaron los insertos de control y se tiñeron utilizando un kit de tinción diferencial [Fisher # 122-911]. Se deja secar los insertos y las células se cuentan en 4 cuadrantes del inserto de control usando un microscopio con un objetivo de 10x. Se cuentan los insertos por triplicado y se promedian los totales.

35 Para calcular el número de células que invadieron los insertos de matrigel, las células no invasoras se eliminaron suavemente de la superficie del inserto de Matrigel frotando con un bastoncillo de algodón. Se repite una segunda limpieza con un bastoncillo de algodón humedecido con medio FLS. Los insertos se fijaron y se tiñeron usando un kit de tinción diferencial [Fisher # 122-911]. Se deja secar los insertos y las células se cuentan en 4 cuadrantes del inserto de control usando un microscopio con un objetivo de 10x. Se cuentan los insertos por triplicado y se promedian los totales.

#### Resultados

40 Cad-11-EC1-Fc inhibió significativamente la agregación celular a una concentración de 3 µg/ml, mientras que la proteína Cad-11-EC1-5-Fc de longitud completa que contenía los 5 dominios EC de cad-11 humana inhibió la agregación mediada por cad-11 a una concentración de 100 µg/ml (Figura 13). Estos datos muestran que la proteína de fusión de inmunoglobulina Cad-11-EC1-Fc inhibe eficazmente la agregación celular mediada por cad-11 en un ensayo *in vitro*.

50 Además, se analizó la capacidad de la proteína de fusión de inmunoglobulina Cad-11-EC1-Fc para inhibir la invasión de los sinoviocitos similares a fibroblastos humanos (FLS) en un tapón de matrigel *in vitro*. La invasión de FLS en el matrigel es un proceso complejo que implica la expresión de MMP1, MMP-3, MMP-13, serina proteasas y otras proteínas por el FLS para degradar el matrigel, así como la migración del FLS en el matrigel. En un ensayo distinto no se vio inhibición de la migración de FLS a través de un inserto de fibra normal. Esto sugiere que el impacto del mAb EC-Fc o 13C2 es inhibir la degradación del matrigel (un sustituto del cartílago articular). Tanto el Cad-11-EC1-Fc como el mAb 13C2 murino anti-cad-11 inhibieron la invasión de FLS en un tapón de matrigel en dos experimentos independientes.

55 Ejemplo de referencia 5: Generación de anticuerpos contra un péptido de dominio EC1 de cadherina-11 humana

#### Materiales y procedimientos

60 Se inmunizaron ratones Balb/c dos veces a la semana en la almohadilla de la pata nueve veces durante un período de un mes con 0,01 mg de un péptido correspondiente a los primeros 33 aminoácidos del dominio EC1 de cad11 humana (GWVWN QFFVI EYTG PDPVL VGR LH SDIDS GDG (SEQ ID NO:10)), unido covalentemente a BSA. Este péptido se denomina en el presente documento Péptido 4. Se extrajeron los bazo de los ratones inmunizados y se fusionaron con un compañero de fusión murino, P3X63-Ag8.653, para crear hibridomas productores de anticuerpos. Los hibridomas se expandieron y subclonaron a 10, 3 o 0,5 células/pocillo y los medios que contenían anticuerpos anti-cad-11 de los hibridomas se sometieron a detección selectiva en un ELISA para determinar la

capacidad de unirse específicamente a la proteína que contenía el dominio EC1-2 de cad-11 producida en bacterias. Los medios que contenían anticuerpo anti-cad-11 de estos hibridomas de Péptido 4 se sometieron a detección selectiva de forma concurrente para determinar la ausencia de unión a proteínas que abarcaban los dominios EC1-2 de cad-8 humana y MN-cadherina. Se recubrieron placas de EIA de 96 pocillos durante la noche a 4 °C con 0,05 ml de 0,0 a 0,3 mg/ml de cada una de las proteínas EC1-2 Cad y luego se lavaron varias veces con tampón salino. Las placas se bloquearon después con 0,25 ml de tampón de caseína-PBS y se lavaron varias veces con tampón salino. Los medios de hibridoma que contienen el anticuerpo anti-cad-11 se incubaron puros en cada pocillo durante 1 hora a 22 °C y luego se lavaron dos veces con PBS-Tween (0,05 %). A cada pocillo se añadieron 100 µl de una dilución 1/1000 de un anticuerpo secundario de carba anti-IgG de ratón, se incubaron durante 30 minutos a 22 °C y, después, se lavaron dos veces con PBS-Tween (0,05 %). Se añadieron 100 µl/pocillo de reactivo TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina) a temperatura ambiente a cada pocillo y se dejó que se desarrollara el color durante 5 minutos a 22 °C. La reacción se detuvo con 100 µl de ácido sulfúrico 2N a temperatura ambiente y la placa se leyó a 450 nm en un lector de microplacas Wallac 1420.

La especificidad de los anticuerpos anti-cad-11 H1M1 y H14 se analizó adicionalmente usando un ELISA contra los primeros 33 aminoácidos de los dominios EC1 de cad-11, cad-7, cad-8, cad-20, cad-24, cad-9, cad-18 y MN-Cad. Los péptidos correspondientes a la región de cad-7, cad-8, cad-20, cad-24, cad-9, cad-18, MN-Cad que se superponen con la región G1-G33 del dominio EC1 de Cad-11 se sintetizaron y conjugaron a biotina. Se incubaron 100 µl de una solución de 30 ng/ml de cada uno de estos péptidos en PBS-Tween (0,05 %) en cada pocillo de una placa de Netravidina de 96 pocillos durante 2-3 horas a 4 °C y luego se lavaron dos veces con PBS-Tween (0,05 %). Se incubaron diversas concentraciones del anticuerpo anti-cad-11 en cada pocillo durante 1 hora a 22 °C y luego se lavaron dos veces con PBS-Tween (0,05 %). A cada pocillo se añadieron 100 µl de una dilución 1/1000 de un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón, se incubaron durante 30 minutos a 22 °C y, después, se lavaron dos veces con PBS-Tween (0,05 %). Se añadieron 100 µl/pocillo de reactivo TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina) a temperatura ambiente a cada pocillo y se dejó que se desarrollara el color durante 5 minutos a 22 °C. La reacción se detuvo con 100 µl de ácido sulfúrico 2N a temperatura ambiente y la placa se leyó a 450 nm en un lector de microplacas Wallac 1420.

Los medios de los pocillos que contenían hibridomas de anticuerpos anti-Cad-11 positivos se analizaron para determinar la capacidad de unirse a las células que expresan cad-11. Las células 431D que expresaban cad-11 se descongelaron y se lavaron dos veces en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) que contenía Ca<sup>2+</sup>(NaCl 0,137 M, KCl 5,4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,0 mM y NaHCO<sub>3</sub> 4,2 mM) y después se resuspendieron a 10<sup>5</sup> células/ml en HBSS con Ca<sup>2+</sup>. Se tiñeron 10<sup>5</sup> células/pocillos con un medio de anticuerpo anti-cad-11 al 50 % o al 16 % durante 45 minutos en hielo, se lavaron dos veces en HBSS que contenía Ca<sup>2+</sup>, se tiñeron con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con fitoeritrina (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) a una concentración del 1 % durante 45 minutos en hielo y luego se volvió a lavar dos veces en HBSS con Ca<sup>2+</sup>. A continuación, las células se resuspendieron en 400 µl de HBSS con Ca<sup>2+</sup> y 1 % de formaldehído y posteriormente se analizaron en un FACScalibur (Becton Dickenson, Franklin Lakes, NJ) para las células positivas para PE.

## Resultados

Los medios que contenían anticuerpos anti-cad-11 de los hibridomas de Péptido 4 se unieron a la proteína EC1-2 de cad-11 (Figura 16, HL frente a Cad-11), pero a ninguna proteína con los dominios EC1-2 de cad-8 y MN-Cad (figura 16, HL frente a cad8 y HL frente a MNCad, respectivamente). Los medios de hibridoma de control no se unieron a ninguna de las proteínas de cadherina analizadas (Figura 16, Medios frente a cad-11, medios frente a cad8 y medios frente a MNCad). Estos datos demuestran la presencia de anticuerpos específicos de cad-11 contra el péptido 4 en los hibridomas.

Dos hibridomas del Péptido 4, denominados en el presente documento H1M1 y H14, se unieron a células que expresan la proteína cad-11 humana (Figuras 17A-C y 17G-I), pero no a células 431-D de control no-cad-11 (figuras 17D-17F). La línea celular de hibridoma denominada H1M1 tiene la designación en el depósito de patentes A.T.C.C. PTA-9699, depositada el 8 de enero de 2009. La línea celular de hibridoma denominada H14 tiene la designación en el depósito de patentes ATCC PTA-9701, depositada el 9 de enero de 2009. Estos hibridomas contienen anticuerpos anti-cad-11 que reconocen las células que expresan tanto péptido 4 como cad-11 *in vitro*. Se demostró que la unión de estos anticuerpos a las células que expresan cad-11 se titulan con la cantidad de anticuerpo del péptido 4 usada, como se muestra en las gráficas de la titulación de H1M1 (Figura 18A) y H14 (Figura 18B) frente a la intensidad de la tinción celular con respecto a la intensidad de fluorescencia media (MFI).

Los anticuerpos H1M1 y H14 péptido 4 anti-cad-11 demostraron una unión > 100 veces mayor a cad-11 que a cualquiera de las otras cadherinas analizadas, incluidas cad-7, cad-8, cad-20, cad-24, cad-9, cad-18 y MN-Cad. En la mayoría de casos, no se observó unión de los anticuerpos H1M1 y H14 anti-cad-11 a las otras cadherinas. El anticuerpo anti-cad-11 H14 mostró una fuerte unión a Cad-11 (Figura 19A), con una unión 468 veces menor a Cad-8 (Figura 19A), y prácticamente sin unión a cad-7, MN-Cad, cad-9, cad-18, cad-20 o cad-24 (figura 19B). De forma similar, el anticuerpo anti-cad-11 H1M1 mostró una fuerte unión a cad-11 (Figura 20), con una unión 1500 veces menor a cad-8 y sustancialmente sin unión a cad-7, MN-Cad, cad-9, cad-18, cad-20 o cad-24 (figura 20).

Ejemplo de referencia 6: Los anticuerpos del dominio EC1 anti-cad-11 H1M1 y H14 se unen a epítomos en el dominio EC1 de cad-11 que incluyen la secuencia de aminoácidos GPDP.

#### Materiales y procedimientos

5 Para determinar el epítipo dentro del dominio EC1 de cad-11 que los anticuerpos de péptido 4 del EC1 DE cad-11 H1M1 y H14 se unen, se inmovilizaron cuatro péptidos diferentes que abarcan los primeros 37 aminoácidos de la región EC1 (véase la Figura 22) en un formato de ELISA y se determinó la capacidad de los anticuerpos H1M1 y H14 para unirse a cada uno de los cuatro péptidos. Las placas Reactibind de 96 pocillos se recubrieron durante la  
10 noche a 4 °C con 0,3 ng/pocillo de péptido 1 (aminoácidos G1-P18 del dominio EC1 de cad-11), 0,3 ng/pocillo del péptido 2 de (aminoácidos G15-N34 del dominio EC1 de cad-11), 0,3 ng/pocillo del péptido 3 de (aminoácidos V19-Y37 del dominio EC1 de cad-11), 0,3 ng/pocillo del péptido 4 inmunógeno (aminoácidos G1-G33 del dominio EC1 de cad-11), 20 ng de una proteína de fusión que incluye el dominio EC1 completo (EFL) o 20 ng de Ig humana de control (bloque Fc). Los pocillos se lavaron dos veces con PBS-Tween (0,05 %), se bloquearon con caseína en dH<sub>2</sub>O durante 3 horas a 22 °C y después se lavaron de nuevo dos veces con PBS-Tween (0,05 %). Se transfirieron  
15 diversas diluciones de los diferentes anticuerpos del dominio EC1 de cad-11 péptido 4 a los pocillos revestidos con péptido o proteína, se incubaron durante 45 minutos a 22 °C y luego se lavaron dos veces con PBS-Tween (0,05 %). A cada pocillo se añadieron 100 µl de una dilución 1/1000 de un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), se incubaron durante 30 minutos a 22 °C y, después, se lavaron dos  
20 veces con PBS-Tween (0,05 %). se añadieron 100 µl/pocillo de reactivo TMB a temperatura ambiente a cada pocillo y se dejó que se desarrollara el color durante 5 minutos a 22 °C. La reacción se detuvo con 100 µl de ácido sulfúrico 2 N a temperatura ambiente y la placa se leyó a una longitud de onda 450 nm en un lector de microplacas Wallac 1420.

#### 25 Resultados

Los anticuerpos H1M1 anti-cad-11 del péptido 4 a 1:11 (Figura 21A) y H14 a 1:23 (Figura 21B) se unieron ambos al inmunógeno del péptido 4 (PEP4), así como a la proteína de fusión del dominio EC1 (EFL), en el ELISA según lo  
30 indicado por las lecturas elevadas de la placa a DO450 en relación con el control. Ninguno de estos anticuerpos se unió a la IgG humana de control (bloque Fc). Además, ambos anticuerpos se unieron al péptido 2 (PEP2), pero no al péptido 1 (PEP1) ni al péptido 3 (PEP3) en el ELISA (Figuras 21A y 21B).

Estos resultados sugieren que los anticuerpos frente al dominio EC1 de cad-11 H1M1 y H14 se unen a un epítipo  
35 común en los péptidos 2 y 4 que no está presente en el péptido 3 superpuesto. Los aminoácidos compartidos por los péptidos 2 y 4 que están aguas arriba del péptido 3 están resaltados en la región en recuadro que se muestra en la figura 22. Estos cuatro aminoácidos, GPDP (SEQ ID NO:11), comenzando en G15 del dominio EC1 de cad-11, son, probablemente, parte del epítipo reconocido por los anticuerpos H1M1 y H14.

Ejemplo de referencia 7: Los anticuerpos contra el dominio EC1 anti-cad-11 H1M1 y H14 inhiben la agregación de  
40 células que expresan cad-11 *in vitro*.

#### Materiales y procedimientos

45 Para evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-cad-11 para inhibir la agregación celular mediada por cad-11, se cultivaron 30 µg/ml del anticuerpo péptido 4 H1M1 con 75.000 células de carcinoma epidermoide A-431-D que expresaban cad-11 en 0,5 ml de DMEM con un contenido alto de glucosa, HEPES 20mM a pH 7,4, 10 % de FCS y 10 U/ml de ADNasa en una placa de polipropileno de fondo redondo de 24 pocillos. Las placas de 24 pocillos se colocaron en una plataforma giratoria a aproximadamente 60 rpm y se incubaron con CO<sub>2</sub> al 5 % durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, se evaluó la agregación celular después de fotografiar las placas a 100 aumentos (para el  
50 experimento con H1M1) o 40 aumentos (para el experimento con H14).

#### Resultados

55 En presencia de un anticuerpo de isotipo de control (30 µg/ml), las células que expresan cad-11 formaron masas grandes (Figura 23A), mientras que las células parentales negativas para cad-11 permanecen como grupos de células simples o dobles (Figura 23C). Las células con cad-11 tratadas con H1M1 permanecieron como pequeños grupos de células (Figura 23B) que no progresaron para formar las grandes masas obtenidas usando el anticuerpo de control.

60 Usando el mismo ensayo, el anticuerpo H14 anti-cad-11 también se demostró que inhibía la agregación mediada por cad-11. Mientras que las células parentales que expresan cad-11 formaban grupos grandes de células agregadas (Figura 24A), el anticuerpo H14 (Figura 24B) inhibía la agregación a una concentración de 30 µg/ml, ya que los grupos celulares eran pequeños e infrecuentes. Estos resultados indican que los anticuerpos anti-cad-11 H1M1 y H14 inhiben la agregación celular mediada por cad-11 *in vitro*.

65 Ejemplo de referencia 8: Los anticuerpos frente al dominio EC1 de cad-11, H1M1 y H14, inhiben la inflamación

articular asociada a la artritis *in vivo* en un modelo murino de artritis reumatoide

#### Materiales y procedimientos

5 Estudio 1 - Se inyectó en ratones C57/B16 macho de seis semanas de edad 150 µl de sueros KBN el día 0 y el día 2. Los ratones tratados con el suero KBN recibieron inyecciones de solución salina (Figura 25, triángulos sin rellenar) o se trataron con diferentes dosis del anticuerpo anti-EC1 de cad-11 H1M1. Los regímenes de tratamiento incluyeron la dosificación el día 0 con 0,5 mg de anticuerpo/ratón y en días alternos (q2d) después con 0,1 mg de anticuerpo/ratón (0,5 mg + 0,1 mg) (figura 25, triángulos rellenos); dosificación el día 0 con 0,5 mg de anticuerpo/ratón (0,5 mg) (Figura 25, rombos); dosificación en días alternos (q2d) con 0,1 mg de anticuerpo/ratón (0,1 mg + 0,1 mg) (Figura 25, cuadrados); o dosificación en días alternos (q2d) con 0,3 mg de anticuerpo/ratón (0,3 mg + 0,3 mg) (Figura 25, círculos). El grupo de control consistió en 5 ratones y el grupo de tratamiento consistió en 7 ratones. La inflamación articular asociada a artritis hinchazón se determinó mediante medidas de calibre tomadas cada dos días.

15 Estudio 2 - Se inyectó en ratones C57/B16 macho de seis semanas de edad 150 µl de sueros KBN el día 0 y el día 2 y después se trataron con solución salina en días alternos (q2d) (Figura 26, triángulos) o con uno de los anticuerpos anti-cad-11, H1M1 (figura 26, cuadrados) o H14 (figura 26, círculos), a 0,3 mg/dosis q2d. El grupo de control consistió en 5 ratones y el grupo de tratamiento consistió en 7 ratones. La inflamación articular asociada a artritis hinchazón se determinó mediante medidas de calibre tomadas cada dos días.

#### Resultados

25 Estudio 1: el anticuerpo anti-cad-11 H1M1 inhibió la inflamación articular en relación con los ratones control. La mayor inhibición de la inflamación articular asociada a artritis se observó al administrar a ratones tratados con KBN 0,3 mg de anticuerpo H1M1 cada dos días (Figura 25, círculos).

30 Estudio 2: ambos anticuerpos anti-cad-11 inhibieron la inflamación articular en relación con el control. En este estudio, el anticuerpo H14 retrasó significativamente el inicio de la artritis en comparación con los animales control (Figura 27). Todos los ratones en el grupo de control desarrollaron artritis el día 3, mientras que los ratones tratados con H14 requirieron 6 días antes de que todos los animales desarrollaran artritis.

35 Estos estudios indican que los anticuerpos contra el dominio EC1 de cad-11 humano pueden inhibir el desarrollo y la gravedad de la artritis *in vivo*.

Ejemplo de referencia 9: Generación de anticuerpos contra otro péptido del dominio EC1 de la cadherina-11 humana

#### Materiales y procedimientos

40 Se inmunizaron ratones Balb/c dos veces a la semana en la almohadilla de la pata nueve veces durante un período de 1 mes con 0,01 mg de péptido V19-Y37 (VL VGRLH SDIDS GDGNI KY (SEQ ID NO:12)), correspondiente a 19 aminoácidos del dominio EC1 de cad-11 humana, unido covalentemente a BSA. Este péptido se denomina en el presente documento Péptido 3. Se extrajeron los bazos de los ratones inmunizados y se fusionaron con un compañero de fusión murino P3X63-Ag8.653, para crear hibridomas productores de anticuerpos. Estos hibridomas se expandieron y los medios que contenían anticuerpos anti-cad-11 de los hibridomas se sometieron a detección selectiva para determinar la capacidad de unirse a una proteína correspondiente al dominio EC1-2 de cad-11, que se produjo en bacterias. Los medios que contenían anticuerpos anti-cad-11 de estos hibridomas de péptido 3 se sometieron a detección selectiva de forma simultánea para determinar la ausencia de unión a proteínas que abarcaban los dominios EC1-2 de cad-8 y MN-cadherina. Se recubrieron placas de EIA de 96 pocillos durante la noche a 4 °C con 0,05 ml de 0 a 300 mg/ml de cada una de las proteínas EC1-2 Cad o la proteína de fusión EC1-Fc producida en las células CHO y luego se lavaron varias veces con tampón salino. Las placas se bloquearon después usando 0,25 ml de tampón de caseína-PBS y se lavaron varias veces con tampón salino. Los medios de hibridoma que contenían los anticuerpos anti-cad-11 de péptido 3 se incubaron puros en cada pocillo durante 1 hora a 22 °C y luego se lavaron dos veces con PBS-Tween (0,05 %). A cada pocillo se añadieron 100 µl de una dilución 1/1000 de un anticuerpo secundario de carba anti-IgG de ratón, se incubaron durante 30 minutos a 22 °C y, después, se lavaron dos veces con PBS-Tween (0,05 %). Se añadieron 100 µl/pocillo de reactivo TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina) a temperatura ambiente a cada pocillo y se dejó que se desarrollara el color durante 5 minutos a 22 °C. La reacción se detuvo con 100 µl de ácido sulfúrico 2N a temperatura ambiente y la placa se leyó a 450 nm en un lector de microplacas Wallac 1420.

60 También se analizaron los medios de los hibridomas del péptido 3 para determinar la capacidad de unirse a la proteína Cad-11 humana expresada en las células. Las células congeladas 431D que expresaban cad-11 se descongelaron y lavaron dos veces en HBSS con Ca<sup>2+</sup> y, después, se resuspendieron a 10<sup>6</sup> células/ml en HBSS con Ca<sup>2+</sup>. Se tiñeron 10<sup>5</sup> células/pocillos con un medio de anticuerpo anti-cad-11 al 50 % o al 16 % durante 45 minutos en hielo, se lavaron dos veces en HBSS que contenía Ca<sup>2+</sup>, y después se tiñeron con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con ficoeritrina a una concentración de 1 % durante 45 en hielo y después se

lavaron de nuevo dos veces en HBSS con  $\text{Ca}^{2+}$ . A continuación, las células se resuspendieron en 400  $\mu\text{l}$  de HBSS con  $\text{Ca}^{2+}$  y 1 % de formaldehído y, posteriormente, se analizaron en un FACScalibur para determinar las células positivas para PE.

5 Resultados

Los medios que contenían anticuerpos anti-Cad-11 de los hibridomas de péptido 3 se unieron a la proteína Cad-11 EC1-2 y la proteína de fusión EC1-Fc (Figura 28, HL frente a Cad-11 y HL frente a Cad-11-EC1, respectivamente), pero no se unieron a las proteínas que contenían los dominios EC1-2 de cad-8 y MN-Cad (Figura 28, HL frente a Cad8 y HL frente a MNCad, respectivamente). Los medios de hibridoma de control no se unieron a ninguna de las proteínas de cadherina (Figura 28, medios frente a Cad-11, medios frente a cad8 y medios frente a MNCad).

Los anticuerpos anti-cad-11 de los hibridomas del péptido 3 también se unieron a las células que expresan la proteína cad-11 humana (Figura 29, véase la flecha), pero no a las células de control que no expresan cad-11 que expresaban Neos. Este resultado confirmó la presencia de anticuerpos anti-Cad-11 en los hibridomas que reconocen las células que expresan tanto péptido 3 como cad-11 *in vitro*.

Ejemplo de referencia 10: El anticuerpo frente al dominio EC1 de cad-11, H1M1, evita la agregación de sinoviocitos similares a fibroblastos primarios humanos *in vitro*.

20 Materiales y procedimientos

Ensayo de agregación

En este ensayo, se cultivaron líneas de sinoviocitos similares a fibroblastos humanos (FLS) en medios FLS (DMEM, 10 % de FCS, 1 % de penicilina/estreptomicina, 1 % de L-Glutamina, 0,05 % de gentamicina, 1 % de HEPES) hasta llegar a un 90-100 % de confluencia. El día del ensayo, se retiró el medio de los FLS privados de suero y las células se retiraron del matraz usando Tripsina al 0,05 %-EDTA, se lavaron con medio MM (DMEM, 10 % de FCS, 1 % de penicilina/estreptomicina, 1 % de L-Glutamina, 0,05 % de gentamicina, 1 % HEPES) y después se lavaron dos veces con HBS con calcio (NaCl 0,137 M, KCl 5,4 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,25 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,44 mM,  $\text{CaCl}_2$  1,3 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,0 mM y NaHCO 4,2 mM). Se resuspendieron los FLS tripsinizados en medio MM hasta  $4 \times 10^4$  células/ml y  $2 \times 10^4$  células/pocillo se colocaron en una placa de 24 pocillos que contenía medio solo, anticuerpo de control de isotipo o diversos anticuerpos anti-Cad-11 a 30  $\mu\text{g/ml}$ . La placa se incubó durante 24 horas en un incubador con 5 % de  $\text{CO}_2$  incubadora y al día siguiente se examinaron los pocillos con un microscopio óptico y se fotografiaron.

35 Ensayo de invasión de FLS

Para analizar la capacidad del anticuerpo H1M1 para inhibir la invasión de FLS en matrigel, que consiste en diversas proteínas de la matriz extracelular, se empleó un ensayo de invasión que usa un sistema de pocillos divididos Matrigel. Este modelo *in vitro* de la biología de los FLS imita la capacidad de los FLS para degradarse y perforar el cartílago humano en articulaciones articulares. En este ensayo, las líneas de FLS humanas se cultivaron en medios FLS MM hasta llegar a una confluencia del 90-100 %. El día antes de comenzar el ensayo, se privó a los FLS de suero durante 24 horas en medio FLS sin suero. El día del ensayo, se retiró el medio de los FLS privados de suero y las células se eliminaron del matraz usando Tripsina-EDTA al 0,05 %, se lavaron con medio MM y luego se lavaron 2 veces con HBS con calcio. Los FLS tripsinizados se resuspendieron en medio MM a  $4 \times 10^5$  células/ml. Se colocaron insertos recubiertos con matrigel preparadas en una placa de 24 pocillos que contenía los medios MM con FCS, que actúa como mitógeno para los FLS. En el otro lado de la cámara, En cada pocillo se introdujeron 50  $\mu\text{l}$  de medio MM que no contienen anticuerpo o el doble de la concentración de trabajo del anticuerpo de tratamiento, a los que se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de  $4 \times 10^5$  se añadió. Las cámaras con el FLS y los anticuerpos se incubaron durante 18 horas en una incubadora a 37 ° C.

Después de 24 horas, los insertos con células se fijaron en metanol, los FLS pegados al exterior de la membrana recubierta de Matrigel se eliminaron usando un bastoncillo de algodón y las membranas se secaron y luego se tiñeron con yoduro de propidio (PI) durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La tinción con PI se retiró y los insertos se lavaron con D-glucosa (1 mg/ml) y luego se secaron en la oscuridad. Las membranas se cortaron e imprimieron en portaobjetos usando un microscopio de fluorescencia y se cuantificó el número de FLS que migraron a la membrana.

60 Resultados

Los FLS incubados con medios o agregados de células formados por anticuerpos de control y una amplia red de células que se asocian a través de procesos celulares (Figuras 30A y B). Por el contrario, las células tratadas con el anticuerpo anti-cad-11, H1M1, formaron pocos agregados de células y pocas conexiones (Figura 30C).

65 En una serie de ensayos de invasión de FLS con diferentes FLS humanos primarios, 30  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpo H1M1 inhibieron consistentemente la invasión de FLS en la membrana. Específicamente, H1M1 a una dosis de 30  $\mu\text{g/ml}$

inhibió la invasión de FLS en un 80 % en comparación con el anticuerpo de control. Esta actividad fue mayor que la observada con otros anticuerpos frente a cad-11 que se unieron fuera de la región EC1, incluido el anticuerpo 13C2 (Figura 31).

- 5 Ejemplo de referencia 11: Los anticuerpos H1M1 inhiben la inflamación articular en un modelo de ratón con artritis KBN

Materiales y procedimientos

- 10 El anticuerpo anti-cad-11, H1M1, se analizó en un modelo KBN de artritis en el que se indujo la enfermedad mediante la administración de 2 dosis de 75  $\mu$ l de sueros KBN administrados los días 0 y 2. Se administró a grupos de 7 ratones C57BL/6 macho 10 mg/kg de H1M1 por vía intraperitoneal en días alternos, comenzando el día 0, y la inflamación articular en los ratones se controló a diario. Se midió la inflamación de las articulaciones o el grosor del tobillo en los maléolos con el tobillo en una posición completamente flexionada, usando calibradores pie de rey con resorte (Long Island Indicator Service, Hauppauge, NY).
- 15

Resultados

- 20 El anticuerpo H1M1 suprimió la inflamación articular en un 53 % ( $p < 0,001$ ) en comparación con el grupo control (Figura 32).

Ejemplo de referencia 12: Secuenciación de los dominios variables de H1M1 y regiones determinantes de la complementariedad

- 25 Materiales y procedimientos

- Se extrajo el ARN de 3 clones células de hibridoma productoras de H1M1 (H1, H17 y H27). La RT-PCR se realizó usando conjuntos de cebadores degenerados para secuencias señal murinas con cebadores de la región constante para cada uno de IgGVH, IgMVH, IgkVL e IGAVL. Se amplificó el ARN de la región variable (V) de la cadena pesada usando un conjunto de seis grupos de cebadores degenerados (HA a HF) y se amplificó el ARNm de la región V de la cadena ligera usando un conjunto de siete grupos de cebadores degenerados para el grupo  $\kappa$  ( $\kappa A$  a  $\kappa G$ ) y un cebador degenerado para el grupo  $\lambda$  (véase la Tabla 1).
- 30

- 35 Para todas las muestras de ARN, los productos de amplificación de la cadena pesada se obtuvieron a partir del ARN transcrito de forma inversa con iniciador de transcripción inversa IgGVH combinado con grupos de cebadores de cadena pesada B y E. Los productos de la amplificación se obtuvieron del cebador de transcripción inversa IgKVL y con grupos de cebadores de cadena ligera  $\kappa$  B, C y G. Los productos de la PCR de cada uno de los conjuntos anteriores se purificaron y clonaron y se secuenciaron al menos cuatro clones para cada producto.

- 40 Para los clones productores de H1M1, H1, H17 y H27, se identificaron las secuencias de la región V de las cadenas pesada y ligera de función simple para cada muestra y se encontró que los tres anticuerpos eran idénticos (Tabla 2). Las secuencias de la región V de las cadenas pesada y ligera, y sus secuencias de CDR, se muestran en las figuras 33 y 34, respectivamente.

- 45 Las regiones V de las cadenas pesada y ligera de los tres clones de hibridoma H1M1 muestran buena homología con sus secuencias germinales humanas más cercanas (64 % y 82 %, respectivamente) y las secuencias marco individuales tienen homólogos cercanos en la base de datos de línea germinal humana (Tabla 2). Este alto grado de homología reduce la probabilidad de que se necesite una ingeniería extensa para producir un anticuerpo humanizado con éxito.

Tabla 1. Cebadores utilizados para la secuenciación de dominios variables de H1M1 y regiones determinantes de la complementariedad

Nombre	Bases	Degeneración	Posición de aminoácido	Secuencia	SEQ ID NO:
MulgVH5-A	33	512	-20 a -13	GGAAATTCATGRASSTTSKGGYTMARCTKGRTTT	14
MulgVH5-B	34	64	-20 a -13	GGAAATTCATGRAATGSASCTGGGYWYCTCTT	15
MulgVH5-C	39	-	-20 a -11	ACTAGTCGACATGGACTCCAGGCTCAATTAGTTTCCCT	16
	36	48	-20 a -12	ACTAGTCGACATGGCTGCTYRFBGCTGYCTCTCG	17
	39	24	-20 a -11	ACTAGTCGACATGGVTTGGSTGGAMCTTGCYATTCCT	18
MulgVH5-D	36	8	-20 a -12	ACTAGTCGACATGAAATGCAGCTGGRYATSTTCT	19
	36	32	-20 a -12	ACTAGTCGACATGGRACGRCTTACWYTYTCAITTCCT	20
	36	-	-20 a -12	ACTAGTCGACATGATGGTGAAGTCTTCTGTACCT	21
MulgVH5-E	36	8	-20 a -12	ACTAGTCGACATGGATGGAGCTRTATCATSYCTT	22
	33	24	-20 a -13	ACTAGTCGACATGAAGWTGTGGBTRAACGGRT	23
	35	64	-20 a -13	ACTAGTCGACATGGRATGGASCKKIRTCTTMTCT	24
MulgVH5-F	35	32	-20 a -13	ACTAGTCGACATGAACITTYGGYTSAGMTTGRTTT	25
	35	-	-20 a -13	ACTAGTCGACATGACTTGGGACTGAGCTGTGTAT	26
	33	-	-20 a -13	ACTAGTCGACATGAGAGTGTGATCTTTTGTG	27
	38	-	-20 a -12	ACTAGTCGACATGGATTTTGGGCTGATTTTTTATTG	28
MulgMVH3-1	32	-	125 a 118	CCCAAGCTTACGAGGGGGGAGACATTTGGGAA	29
MulgGVH3-2	35	32	126 a 119	CCCAAGCTTCCAGGGRRCCARKGGATARACIGRTGG	30
MulgVL5-A-32	32	32	-20 a -13	GGAAATTCATGRAGWCACAKWCYCAAGTCTTT	31
MulgkVL5-B	33	-	-20 a -13	GGAAATTCATGGAGACAGACACTCCTGCTAT	32
MulgkVL5-C	39	8	-20 a -11	ACTAGTCGACATGGAGWCAGACACACTSCTGYTATGGGT	33
MulgkVL5-D	42	16	-20 a -10	ACTAGTCGACATGAGGCCCTGCTCAGWTTTGGIWTCTT	34
	41	128	-24 a -14	ACTAGTCGACATGGGCWTCAGATGRAGTCACAKWYCWGG	35
MulgkVL5-E	39	4	-20 a -11	ACTAGTCGACATGAGTGTGCYCACTCAGTCTCGSGT	36
	41	32	-15 a -5	ACTAGTCGACATGGGGYCGKTTTYAMMCTTTTCAATTG	37
	38	-	-20 a -11	ACTAGTCGACATGGAAGCCCACTCAGCTTCTCTCC	38
MulgkVL5-F	36	32	-20 a -12	ACTAGTCGACATGAGIMMKTCTMTCATTCYTGCG	39
	36	96	-20 a -12	ACTAGTCGACATGAKGTHCYCIGCTCAGYTYCTIRG	40
	35	8	-20 a -12	ACTAGTCGACATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG	41
	37	-	-16 a -8	ACTAGTCGACATGATATATATGTTTGTGCTATTCT	42
MulgkVL5-G	39	-	-19 a -10	ACTAGTCGACATGAAGTTGCCCTGTTAGGCTGTGGTCT	43
	39	8	-22 a -13	ACTAGTCGACATGGATTTWCARGTGCAGATTTWCAGCTT	44
	37	12	-15 a -7	ACTAGTCGACATGGTYCTYATVTCCTGTCTGTTCTGG	45
	37	24	-15 a -7	ACTAGTCGACATGGTYCTYATVTRCTGTCTGCTATGG	46
MulgkVL3-1	30	-	122 a 116	CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA	47
MulgkVL5-A	33	128	-20 a -13	GGAAATTCATGGCTGGATYCWCTWYTMCTCT	48
MulgkVL3-1	32	32	125 a 118	CCCAAGCTTAGCTCTCWGGAAGGGYGGRAA	49

\* Posición de aminoácido del cebador con relación al codón de iniciación de la secuencia de codificación de la región variable de la Ig. Los cebadores 5' de ratón A-B y los cebadores 3' contienen 500 pmol de cada cebador a una concentración de 10 pmol/μl. Los cebadores líder en 5' de ratón C-F (cadena pesada) y D-G (cadena ligera) contienen una mezcla equimolar (100 pmoles) de cada cebador a una concentración de 5 pmol/μl de las secuencias indicadas.

Tabla 2: Análisis de secuencia de los clones de hibridoma H1M1 H1, H17 y H27

	Cadena H	Cadena L
Longitud de CDR 1	5aa	16aa
Longitud de CDR 2	17aa	7aa
Longitud de CDR 3	10aa	9aa
Línea germinal humana más cercana <sup>a</sup>	IGHV1-46 * 01 (64 %)	IGKV2-29 * 02 (82 %)
FW1 humano más cercano <sup>b</sup>	IGHV7-4-1 * 01 (80 %)	IGKV2-30 * 01 (78 %)
FW2 humano más cercano <sup>b</sup>	IGHV3-73 * 01 (64 %)	IGKV2-40 * 01 (93 %)
FW3 humano más cercano <sup>b</sup>	IGHV1-69 * 02 (69 %)	IGKV2-40 * 01 (94 %)
J humano más cercano <sup>b</sup>	IGHJ6 (91 %)	IGKJ2 o IGKJ4 (90 %)
<sup>a</sup> Definiciones de CDR y numeración de las secuencias según Kabat		
<sup>b</sup> ID de la línea germinal indicadas seguido del % de homología		

**Ejemplo 13: Generación de anticuerpos anti-cad-11 humanizados**

## 5 Diseño de secuencias de regiones variables de anticuerpo anti-cad-11 humanizado

Los modelos estructurales de las regiones variables (V) del anticuerpo del anticuerpo monoclonal murino H1M1 descrito en el presente documento, también denominado anticuerpo SYN0012, se produjeron utilizando la base de datos de proteínas Swiss y se analizaron para identificar aminoácidos "restrictivos" importantes en las regiones V que se ha predicho que eran esenciales para las propiedades de unión del anticuerpo SYN0012/H1M1. Los residuos contenidos en las CDR (que utilizan las definiciones de Kabat y Chothia) junto con una serie de restos de marco se consideraron importantes. Ambas secuencias VH y VK del anticuerpo SYN0012/H1M1 contienen residuos marco típicos y los motivos CDR 1, 2 y 3 son comparables a muchos anticuerpos murinos.

15 A partir del análisis anterior, se consideró que las secuencias compuestas humanas del anticuerpo SYN0012/H1M1 podrían crearse con una amplia latitud de alternativas fuera de las CDR, pero con solo una pequeña selección de posibles residuos alternativos dentro de las secuencias de las CDR. El análisis preliminar indicó que los segmentos de secuencia correspondientes de varios anticuerpos humanos podrían combinarse para crear CDR similares o idénticas a las de las secuencias de anticuerpo SYN0012/H1M1 murino. Para regiones fuera y flanqueantes de las CDR, se identificaron una amplia selección de segmentos de secuencias humanas como posibles componentes de las regiones V de anticuerpos anti-cad-11 humanizados.

## Diseño de variantes

25 Según el análisis anterior, se seleccionaron y analizaron un gran conjunto preliminar de segmentos de secuencia que podrían usarse para crear variantes de anticuerpo anti-cad-11 humanizado SYN0012 para el análisis *in silico* de la unión del péptido a los alelos del MHC de clase II humano (Perry *et al* 2009) y usando la TCEDTM (base de datos de epítopos de linfocitos T de Antitope LLC, Cambridge, Reino Unido) de epítopos de linfocitos T relacionados con la secuencia del anticuerpo conocidos (Bryson C, Jones TD y Baker MP. Prediction of immunogenicity of therapeutic proteins: validity of computational tools. *Biodrugs* 2010, 24 (1): 1-8). Se descartaron los segmentos de secuencia que se identificaron como aglutinantes de línea germinal no humana significativos para el MHC clase II humano o que indicaron éxitos significativos contra el TCEDTM. Esto dio como resultado un conjunto reducido de segmentos y se analizaron nuevamente combinaciones de estos, como se ha indicado anteriormente, para asegurar que las uniones entre segmentos no contuvieran posibles epítopos de linfocitos T. Los segmentos seleccionados se combinaron luego para producir secuencias de la región V de las cadena pesada y ligera para la síntesis. Para las variantes de anticuerpo anti-cad-11 humanizado SYN0012, se diseñaron 5 cadenas de VH (VH1-VH5; SEQ ID NO: 61, 63, 65, 67, 69) y tres cadenas de VK (Vk1- VK3; SEQ ID NO:71, 73, 75) con secuencias como se detalla en las figuras 35A-35H.

## 40 Construcción de variantes compuestas de anticuerpos humanos

Se sintetizaron todos los genes de las regiones VH y VK de anticuerpo humano compuesto variante para SYN0012/H1M1 usando una serie de oligonucleótidos solapantes que se hibridaron, se ligaron y se amplificaron por PCR para proporcionar regiones V sintéticas de longitud completa. Las variantes de VH ensambladas se clonaron usando los sitios Mlu I y Hind III, y las variantes de Vk ensambladas se clonaron usando los sitios de restricción Bss HII y Bam H1 directamente en el sistema de vector de expresión pANT (Antitope, Cambridge, Reino Unido) para las cadenas VH y Vk (S241P) de IgG4 (Figura 36). Todas las construcciones se confirmaron por secuenciación.

## Construction, expresión y purificación de anticuerpos

50 Las 15 combinaciones de las cadenas de VH y Vk de IgG4 (S241P) humanizadas compuestas se transfectaron de forma estable en células NSO mediante electroporación y se seleccionaron usando metotrexato 200 nM (Sigma Cat.

M8407, Sigma Aldrich, Reino Unido). Las colonias resistentes a metotrexato para cada construcción se analizaron para determinar los niveles de expresión de IgG usando un ELISA de IgG4, y se seleccionaron las mejores líneas de expresión, se expandieron y se congelaron en nitrógeno líquido. Las células que expresan cada una de las 15 variantes de anticuerpo humanizado se generaron con éxito.

5 Las quince variantes compuestas IgG4 humanizada (S241P) de SYN0012, denominadas SDP011 (Vk1/VH1), SDP021 (Vk1/VH2), SDP031 (Vk1/VH3), SDP041 (Vk1/VH4), SDP051 (Vk1/VH5), SDP061 (Vk2/VH1), SDP071 (Vk2/VH2), SDP081 (Vk2/VH3), SDP091 (Vk2/VH4), SDP101 (Vk2/VH5), SDP111 (Vk3/VH1), SDP121 (Vk3/VH2), SDP131 (Vk3/VH3), SDP141 (Vk3/VH4) y SDP151 (Vk3/VH5), se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo celular NS0 en una columna de sefrosa A proteína (GE Healthcare Cat. N.º 110034-93) y el anticuerpo se cuantificó mediante DO280nm usando un coeficiente de extinción ( $E_c(0,1\%) = 1,51$ ) basado en la secuencia de aminoácidos predicha. Se observó durante la purificación del anticuerpo IgG1 anti-EC1 de cad-11 murino (SYN0011) que el anticuerpo precipitaba como un floculado a un pH de aproximadamente 7,5; por lo tanto, todos los anticuerpos se neutralizaron después de la elución de ácido hasta un pH de aproximadamente 6,5 y se cambió el tampón en tampón de acetato de sodio 10 mM a pH 5,5 (ácido acético 1,4 mM, acetato de sodio 8,6 mM). Cada variante de anticuerpo anti-cad-11 humanizado se purificó y se analizó mediante SDS-PAGE reductora. Las muestras se cargaron en un gel NuPage 4-12 % de Bis-Tris (Invitrogen n.º de cat. NP0322BOX) y se pasaron a 200 V durante 30 minutos. Se observaron bandas correspondientes a los tamaños predichos de las cadenas VH y VK sin evidencia de ninguna proteína contaminante (Figura 37).

#### 20 **Ejemplo 14: Caracterización de la unión de anticuerpos anti-cad-11 humanizados a proteínas Cad-11**

##### Materiales y procedimientos

25 Unión de anticuerpos purificados al EC1 de cad-11 humana recombinante

La unión de los anticuerpos variantes humanizados purificados (SDP011 a SDP151) a una proteína de fusión IgG1 humana de EC1 de Cad11 recombinante se evaluó en un ELISA de unión competitiva. Se premezcló una serie de diluciones de 5 µg/ml a 0,0022 µg/ml de anticuerpos humanizados o de control (SYN0012/H1M1) con una concentración constante de anticuerpo anti-cad-11 murino biotinilado, SYN0012/H1M1 (0,1 µg/ml, concentración final), antes de incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en una placa de microtitulación Nunc Immuno MaxiSorp de 96 pocillos de fondo plano (Fisher n.º de cat. DIS-971-030J) previamente revestidos con 0,25 µg/ml de EC1 de cad-11 humana recombinante (R&D Systems n.º de cat. 1790-CA-050) diluido en PBS. La unión del mAb biotinilado se detectó con estreptavidina-HRP (Sigma n.º de cat. S5512) y sustrato de tetrametilbenzidina (TMB) (Invitrogen n.º de cat. 00-2023).

##### ELISA de reactividad cruzada de cadherina-péptido

40 Para evaluar cuál de los anticuerpos anti-cad-11 humanizados mostraba la mayor especificidad para cad-11, los anticuerpos humanizados se analizaron en un formato ELISA para determinar la capacidad de unión a péptidos de 37 unidades unidos a BSA que abarcaban el inmunógeno de cad-11 o las secuencias correspondientes de las 6 secuencias más estrechamente relacionadas con el inmunógeno de cad-11, tomadas de las cadherinas-7, -8, -9, -18, -20 y -24.

45 Las placas Reactibind (ThermoScientific) se recubrieron con 500 ng/ml del péptido de 37 unidades de cadherina acoplado a BSA (péptido NE) correspondiente a las cadherinas-7, -8, -9, -11, -18, -20 y -24 en 0,05 % de Tween (EMD, código de producto 9480) en PBS (pH 7,2) (Gibco(Invitrogen), #20012) a 100 µl volumen/pocillo durante la noche a 4 °C. La solución que contenía el péptido se retiró del pocillo y la placa se bloqueó con seroalbúmina bovina al 2 % (BSA) en PBS, 200 µl de volumen/pocillo, durante 2 horas a 22 °C. A continuación, la placa se lavó dos veces con 200 µl/pocillo de PBS-Tween al 0,05 % a 22 °C y se secó. Una serie de diluciones de 5 µg/ml a 8 ng/ml en un volumen de 100 µl/pocillo de cada uno de los anticuerpos anti-Cad-11 humanizados se incubaron en los pocillos revestidos con péptido y se incubaron a 22 °C durante 1 hora. La solución de anticuerpo se retiró de los pocillos y la placa se lavó dos veces con 200 µl/pocillo de Tween-PBS al 0,05 % a 22 °C y se secó. A cada pocillo se añadió la IgG de cabra anti-ratón (Pierce # 31432) para sembrar a una dilución de 1:1000, 100 µl/pocillos e incubar a 22 °C durante 30 minutos. La solución de anticuerpo secundario se retiró y la placa se lavó dos veces con 200 µl/pocillo de Tween-PBS al 0,05 % a 22 °C y se secó. La reacción se desarrolló añadiendo 100 µl/pocillo de reactivo tetrametilbenzidina (TMB) IgG (Pierce # 34022, 1 etapa Turbo TMB - ELISA) a la placa y se desarrolló a 22 °C durante 5 minutos. La reacción se detuvo usando 100 µl de ácido sulfúrico 2N a TA y la placa se leyó a 450 nm en un lector de microplacas (Wallac 1420).

60 Unión a Cad-11 en resonancia de plasmón superficial (SPR)

65 Para determinar la afinidad de SDP051 por cad-11 humana recombinante marcada con his, se inmovilizó rhCad-11 (R&D Systems) al chip a una única concentración, se determinaron las cinéticas de alta resolución para SDP051 y se estableció un modelo de unión de reacción de 2 estados ajustado satisfactoriamente a los datos cinéticos.

Los datos cinéticos se obtuvieron a un caudal de 40 µl/min para minimizar cualquier posible efecto de transferencia de masa. Se preparó una serie de concentraciones de analito que oscilaba entre 12,5 nM y 0,195 nM mediante dilución en serie. Se programaron dos repeticiones del blanco (sin mAb) y la concentración de 3,125 nM (primer y último ciclo) del analito en los ciclos cinéticos para verificar la estabilidad tanto de la superficie como del analito a lo largo de los ciclos cinéticos. El SDP051 se inyectó sobre los Fc durante 360 segundos, el tiempo suficiente para observar la curvatura en la fase de asociación.

Ensayo de unión celular a Cad-11

Las células 431D congeladas que expresaban cad-11 (K. Johnson, U. Nebraska, Omaha) o las células 431D parentales que no expresan Cad-11 (K. Johnson, U. Nebraska, Omaha) se descongelaron, se lavaron y se resuspendieron a  $2 \times 10^6$  células/ml y se añadieron 50 µl a cada pocillo. Después, las células se tiñeron en hielo durante 45 minutos con concentraciones crecientes de los anticuerpos SDP051 o SDP071 humanizados desde 1 ng/ml hasta 30 µg/ml. Después de teñir, las células se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) con solución bovina fetal al 1 % (FBS), se resuspendieron y se tiñeron con IgG4-PE antihumano de ratón (dilución 100x) en hielo durante 45' protegido de la luz. Después de teñir las células con el agente secundario, las células se lavaron dos veces con HBSS con 1 % de FBS, Se resuspendieron en 200 µl de formaldehído al 2 % en HBSS con 1 % de FBS y luego se analizaron con BD FACSCalibur.

Ensayo FACS de reactividad cruzada de cadherina-péptido

Las células 431D congeladas que expresaban cad-11 o las células 431D parentales que no expresaban Cad-11 se descongelaron, se lavaron y se resuspendieron a  $2 \times 10^6$  células/ml y se añadieron 100.000 células a cada pocillo. Las células se tiñeron en hielo durante 45 minutos con concentraciones crecientes del péptido cad-11 de 37 unidades o de los péptidos de cad-7, cad-8, cad-9, cad-18, cad-20 o cad-24 con 0,5 µg/ml de SDP051. Después de teñir, las células se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) que contenía solución bovina fetal al 1 % (FBS), se resuspendieron y, después, se tiñeron con 100 µl de IgG-PE de cabra anti-ratón (dilución 100x) en hielo durante 30' protegido de la luz. Después de teñir las células con el agente secundario, las células se lavaron dos veces con HBSS con 1 % de FBS, se resuspendieron y se fijaron en 200 µl de formaldehído al 2 % en HBSS con 1 % de FBS y luego se analizaron con BD FACSCalibur.

Resultados

Todos los anticuerpos anti-cad-11 humanizados compitieron eficazmente con SYN0012 por la unión a la proteína de fusión cad-11 (Figuras 38A a C). Esto indicó que unían el mismo epítipo que SYN0012 o un epítipo superpuesto en Cad-11 y que se unían al menos tan bien o mejor que SYN0012 a cad-11 humana recombinante. Las curvas se usaron para calcular los valores de  $CI_{50}$  para cada anticuerpo y estos se normalizaron con la  $CI_{50}$  de SYN0012, que se incluyó en cada placa de ELISA de modo que se pudieron hacer comparaciones entre las placas (Tabla 3). También se muestran los niveles de expresión de cada línea celular y el punto isoeléctrico (pI) calculado de cada anticuerpo (Tabla 3).

SDP051, un anticuerpo Vk1/VH5, se unió a cad-11 con la especificidad más alta, lo que demuestra una unión más de 100 veces mayor al antígeno cad-11 que los antígenos relacionados de las otras cadherinas (Figuras 39A-O). La mayor reactividad cruzada se observó contra cad-8. SDP031, SDP061 y SDP071 también mostraron una especificidad significativa para cad-11, lo que demuestra una unión más de 20 veces mayor al antígeno cad-11 que los antígenos relacionados de las otras cadherinas. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada para SDP031, SDP051, SDP061 y SDP071 se muestran en las figuras 40A-40D.

Tabla 3: Caracterización de anticuerpos compuestos anti-cad-11 humanos.

Número Synovex	ID de la región V	$CI_{50}$ µg/ml	PI	Niveles de expresión mg/l
SDP011	VK1/VH1	0,91	7,64	20
SDP021	VK1/VH2	0,67	7,78	15
SDP031	VK1/VH3	0,84	7,78	12
SDP041	VK1/VH4	0,65	7,78	13
SDP051	VK1/VH5	0,99	7,78	15
SDP061	VK2/VH1	0,47	7,64	12
SDP071	VK2/VH2	0,33	7,78	10
SDP081	VK2/VH3	0,42	7,78	12
SDP091	VK2/VH4	0,57	7,78	8
SDP101	VK2/VH5	0,53	7,78	10
SDP111	VK3/VH 1	0,68	7,64	6
SDP121	VK3/VH2	0,52	7,78	20
SDP131	VK3/VH3	0,55	7,78	15
SDP141	VK3/VH4	0,61	7,78	8

SDP151	VK3/VH5	0,72	7,78	34
--------	---------	------	------	----

La  $CI_{50}$  relativa se calculó dividiendo el valor para el anticuerpo de ensayo por el de SYN0012. Los niveles de expresión de anticuerpos dados son para cultivos estáticos en matraces T. Se calculan los PI.

- 5 En la selección inicial de los anticuerpos anti-cad-11 humanizados contra el antígeno cad-11 y los antígenos cad-7, -8, -9, -11, -18, -20, -24 a un revestimiento de 500 ng/ml ( Figura 41A), SDP051 demostró una unión mucho mayor a cad-11 que cualquier otra cadherina. El mayor grado de reactividad cruzada se observó con el antígeno de cad-8. Este ensayo se repitió con los antígenos de cad-11, cad-8 y cad-18 con una concentración de revestimiento de antígeno inferior de 50 ng/ml y una serie de dilución más amplia del anticuerpo SDP051 (Figura 41B). En este ensayo, SDP051 tenía una  $CE_{50}$  de 6,8 ng/ml para cad-11 y una  $CE_{50}$  de 1421 ng/ml de cad-8, un diferencial de unión de más de 200 veces. No se pudo establecer una  $CE_{50}$  para ad-18 debido al bajo nivel de unión observado. Estos resultados confirmaron que SDP051 era altamente específico para cad-11. Una búsqueda BLAST con la secuencia del dominio EC1 de cad-11 indicó que las coincidencias más cercanas estaban entre los antígenos cad-7, -8, -9, -11, -18, -20 y -24. Una búsqueda BLAST con el epítipo de unión a hexapéptido SDP051 dilucidado en el dominio EC1 de cad-11 indicó que ninguna otra proteína humana conocida poseía esta secuencia.

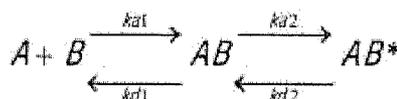
SDP051 tenía afinidad subnanomolar por la proteína rhCad-11 con una constante de disociación en el equilibrio (KD) de 0,37 nM (Tabla 4).

20 Tabla 4: Propiedades físicas de SDP051.

mAb	SDP051
ka1 (1/Ms)	$6,13 \times 10^5$
kd1 (1/s)	0,004301
ka2 (1/s)	0,01160
kd2 (1/s)	$6,618 \times 10^{-4}$
KD (M)	$3,787 \times 10^{-10}$
Chi <sup>2</sup>	0,194

Los experimentos de caracterización y control para la superficie del chip sugirieron que la rhCad-11 inmovilizada en la densidad única era adecuada para determinar los valores cinéticos de las interacciones del anticuerpo anti-cad-11.

- 25 Para el análisis cinético, se usó un modelo de reacción de 2 estados (Ecuación 1, Figura 42) basándose en los resultados del control de reacción de unión, que indicaba que se producía otro suceso dependiente del tiempo una vez que el antígeno se había unido al anticuerpo. Dado que rhCad-11 es homodimérica y, por lo tanto, contiene dos epítopos de unión idénticos, es probable que las moléculas de mAb individuales se unan secuencialmente a través de un primer sitio de unión y luego a ambos sitios de unión.



Ecuación 1: Reacción de dos estados

En los ensayos de unión a células, SDP051 y SDP071 demostraron una unión dependiente de la dosis a las células que expresan cad-11 y no se unen a la línea celular parental negativa para cad-11 (Figura 43).

- 35 Una forma alternativa de determinar la especificidad de SDP051 para cad-11 es medir la capacidad de diferentes cadherinas para bloquear la unión de SDP051 a células que expresan cad-11. Esto se realizó para cada una de las cadherinas-7, -8, -9, -18, -20, -24 o -MN. Solo el péptido cad-11 bloqueó significativamente la unión de SDP051 a las células cad-11<sup>+</sup>. Los resultados del análisis se muestran en las figuras 44A-C.

40 **Ejemplo 15: SDP051, un anticuerpo humanizado Anti- EC1 de cad-11, exhibe baja inmunogenicidad en ensayos que usan células humanas**

45 Materiales y procedimientos

Purificación de anticuerpos

- SDP051 se purificó a partir de cultivos de 5 l de células que expresaban anticuerpos que crecían hasta la saturación. Los sobrenadantes se separaron de las células y los desechos, se ajustaron a pH 7,4, se esterilizaron por filtración y se procesaron a través de columnas de afinidad de proteína A Hi-Trap Mab Select Sure de 5 ml (GE Healthcare, Amersham, Reino Unido), previamente desinfectadas con NaOH 0,5 M, a un caudal de 5 ml/min. La columna se lavó con 100 ml de PBS a pH 7,4. El anticuerpo se eluyó en fracciones de 5 ml con citrato de sodio 0,1M a pH 3,0 y cada fracción se neutralizó inmediatamente con 0,25 ml de Tris-HCl 1M. El contenido de proteína de cada fracción se controló por absorción de UV a 280 nm y las fracciones que contenían proteína se juntaron, se cambió el tampón en

acetato de sodio 10 mM a pH 5,5 y se concentraron. El anticuerpo se purificó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Sephacryl S200 16/60 (GE Healthcare, Amersham, Reino Unido). Las principales fracciones de los picos se recogieron, se agruparon, se esterilizaron por filtración y se analizaron los niveles de endotoxina usando un Endosafe®-PTSTM (Charles River, Margate, Reino Unido). El anticuerpo purificado se almacenó a + 4 °C. Las concentraciones finales se determinaron por absorción UV utilizando los coeficientes de extinción molar calculados, donde  $A_{280} 1,0 = 1,51 \text{ mg/ml}$ . A continuación, cada anticuerpo se diluyó a 100 µg/ml en medio de cultivo AIMV (Invitrogen, Paisley, Reino Unido).

#### Ensayo de inmunogenicidad

Las PBMC se aislaron a partir de capas leucocíticas de donantes sanos (de sangre extraída en 24 horas) obtenidas del Servicio Nacional de Transfusión de Sangre (Addenbrooke's Hospital, Cambridge, Reino Unido). Las PBMC se aislaron a partir de capas leucocíticas con Lymphoprep® (Axis-Shield, Dundee, Reino Unido) y centrifugación por densidad y se agotaron los linfocitos T CD8+ usando CD8+ RosetteSep® (StemCell Technologies Inc., Londres, Reino Unido). Los donantes se caracterizaron por identificar haplotipos HLA-DR utilizando un kit de tipificación de tejidos basado en Biotest SSP-PCR (Biotest, Landsteinerstraße, Dinamarca) y mediante la determinación de las respuestas de los linfocitos T a un antígeno de control de "reproducibilidad" (KLH: Pierce, Cramlington, Reino Unido). A continuación, las PBMC se congelaron y almacenaron en nitrógeno líquido hasta que se requirieron.

Las PBMC de cada donante se descongelaron, se contaron y se evaluó su viabilidad. Las células se revivieron en medio de cultivo AIMV a temperatura ambiente (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) y se resuspendieron en AIMV a  $4-6 \times 10^6$  PBMC/ml. Para cada donante, se establecieron cultivos a granel en los que se añadió un total de 1 ml de reserva de células de proliferación a una placa de 24 pocillos. Se añadió un total de 1 ml de cada muestra de prueba diluida a las PBMC para dar una concentración final de 50 µg/ml por muestra. Para cada donante, también se incluyeron un control positivo (células incubadas con 100 µg/ml de KLH) y un control negativo (células incubadas solo con medio de cultivo). Para los primeros 4 donantes, se incluyó un control adicional para evaluar la modulación de las respuestas de los linfocitos T por parte de las muestras de prueba, en las que tanto la muestra de prueba como KLH se añadieron a las PBMC. La comparación de estas muestras con KLH solo puede usarse para evaluar los efectos de las muestras de prueba sobre la proliferación.

Los cultivos se incubaron durante un total de 8 días a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Los días 5, 6, 7 y 8, las células en cada pocillo se resuspendieron suavemente y se transfirieron 3 alícuotas de 100 µl a pocillos individuales de una placa de 96 pocillos de fondo redondo. A los cultivos se añadieron pulsos de 1 µCi [<sup>3</sup>H]-Timidina (Perkin Elmer®, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) en 100 µl de medio de cultivo AIMV y se incubaron durante otras 18 horas antes de la cosecha en esterillas de filtración (Perkin Elmer®, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) utilizando un cosechador celular TomTec® Mach III. Las Cpm para cada pocillo se determinaron mediante recuento de centelleo en Meltilex™ (Perkin Elmer®, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) en un contador beta de microplacas en modo de recuento paralux, con fondo bajo.

#### Ensayos de proliferación celular

Para los ensayos de proliferación, se ha establecido previamente un umbral empírico de un SI igual o mayor que 2 ( $SI \geq 2,0$ ) donde las muestras que inducen respuestas proliferativas por encima de este umbral se consideran positivas (cuando se incluyen, se resaltan los SI límite  $\geq 1,90$ ). El amplio desarrollo del ensayo y los estudios previos han demostrado que este es el umbral mínimo de señal a ruido que permite una sensibilidad máxima sin detectar grandes cantidades de respuestas positivas falsas. Para los conjuntos de datos de proliferación ( $n = 3$ ), las respuestas positivas se definieron mediante umbrales estadísticos y empíricos:

1. Significación ( $p < 0,05$ ) de la respuesta al comparar las cpm de los pocillos de prueba contra los pocillos de control con medio usando una prueba t de Student de dos muestras no apareada.
2. SI igual o mayor que 2 ( $SI \geq 2,0$ ).

#### Resultados

Para evaluar adicionalmente la inmunogenicidad potencial, se analizó el anticuerpo frente a EC1 anti-cad-11 humanizado SDP051 para determinar su potencial para inducir la proliferación de PBMC con depleción de CD8 (linfocitos T CD4) de 25 donantes de células T humanas diferentes en un ensayo de 8 días. Mientras que el anticuerpo quimérico SYN0014, que es una versión quimérica de IgG4 Fc de ratón-humano del anticuerpo murino H1M1/SYN0012 parental, indujo proliferación en el 28 % de los donantes, el anticuerpo SDP051 no indujo la proliferación de ningún donante de linfocitos T. Estos resultados apoyan el anterior descubrimiento in silico de que SDP051 tiene un bajo perfil de inmunogenicidad.

Los resultados del ensayo de proliferación en el curso del tiempo de inmunogenicidad con el anticuerpo quimérico SYN0014 de control y el anticuerpo SDP051 humanizado se muestran en las Figuras. 45A y B, respectivamente. El anticuerpo quimérico SYN0014 de ratón-humano estimuló las respuestas en 7 de los 25 donantes (28 % de los donantes) estando una de las respuestas del donante en el límite (1,98 para el donante 16) pero significativamente

diferente del fondo ( $p < 0,05$ , Figura 45A). El anticuerpo humanizado SDP051 no estimuló ninguna respuesta en ninguno de los donantes (0 del 25 o 0 % de los donantes), lo que indica su baja inmunogenicidad potencial.

**Ejemplo 16: SDP051, un anticuerpo humanizado Anti- EC1 de cad-11 inhibe la invasión de sinoviocitos y la expresión de MMP3**

Materiales y procedimientos

Ensayo de invasión de FLS

las líneas de FLS humanas primarias se cultivaron en medio FLS MM (DMEM, 10 % de FCS, 1 % de penicilina/estreptomicina, 1 % de L-Glutamina, 0,05 % de gentamicina, 1 % de HEPES) hasta llegar a un 90-100 % de confluencia. El día antes de comenzar el ensayo, se privó a los FLS de suero durante 24 horas en medio FLS sin suero. El día del ensayo se retiró el medio de los FLS privados de suero y las células se eliminaron del matraz usando Tripsina-EDTA al 0,05 % y después se lavaron 2 veces con HBS con calcio. Los FLS tripsinizados se resuspendieron en medio MM a  $4 \times 10^5$  células/ml. Se colocaron insertos recubiertos de Matrigel preparados en la placa de 24 pocillos que contenía medio MM con suero de ternera fetal al 5 % (FCS) que actúa como un quimioatrayente para los FLS. En el otro lado de la cámara se colocaron 50  $\mu$ l de medio MM que contenía 6  $\mu$ g/ml o 06  $\mu$ g/ml de SDP051 (el doble de la concentración de trabajo) o 6  $\mu$ g/ml del anticuerpo de control AC1-P, al que se añadieron 50  $\mu$ l de  $4 \times 10^5$  células/ml de suspensión celular a cada pocillo. Las cámaras con los FLS y los anticuerpos se incubaron durante 18 horas en una incubadora a 37 °C.

Tras 24 horas, los insertos con células se fijaron en metanol al 100 % durante 30' a -20 °C y los FLS no invasivos pegados al interior de la membrana recubierta con Matrigel se eliminaron usando un bastoncillo de algodón. Las membranas se secaron y luego se tiñeron con yoduro de propidio (PI) durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La tinción con PI se retiró y los insertos se lavaron con D-glucosa (1 mg/ml) y luego se secaron en la oscuridad. Las membranas se cortaron e imprimieron en portaobjetos usando un microscopio de fluorescencia y se cuantificó el número de FLS que migraron a la membrana.

Resultados

La Cad-11 es una cadherina crucial necesaria para la biología de FLS. Como resultado, se espera que los antagonistas de Cad-11 inhiban la capacidad de los FLS primarios humanos para degradarse e invadir una capa de matrigel, separando dos pocillos. Matrigel consiste en diversas proteínas de la matriz extracelular. Este modelo *in vitro* de la biología de FLS reproduce aspectos de la biología de los FLS, incluida su capacidad para degradarse y perforar el cartilago.

SDP051 inhibió significativamente la invasión de FLS en matrigel. 0,3  $\mu$ g/ml de anticuerpo SDP051 fue suficiente para inhibir el 50 % de la invasión de FLS humanos primarios en la membrana de Matrigel en comparación con el anticuerpo de control de isotipo (Figura 46).

Los FLS expresan MMP3, que se cree que es una de las enzimas involucradas en la degradación del cartilago *in vivo* y matrigel en el ensayo de invasión *in vitro*. Los sobrenadantes del ensayo de invasión se recogieron antes de la fijación de las células y se congelaron a -80 °C. Estos sobrenadantes se descongelaron y se analizó la presencia de MMP3 en el medio de cultivo. Los niveles de MMP3 aumentaron significativamente en los FLS tratados con anticuerpo de control (AC1-P) que se estimularon para migrar con FCS (Figura 47). Los niveles de MMP3 se redujeron significativamente en los FLS tratados con SDP051 estimulados con FCS. Los niveles se redujeron aproximadamente en un 50 % en comparación con las células tratadas con anticuerpo de control.

**Ejemplo 17: SDP051, un anticuerpo humanizado anti- EC1 de cad-11 Inhibe la inflamación articular en un modelo animal de artritis**

Para analizar el anticuerpo SDP051 en un modelo animal de artritis, se eligió el modelo de artritis de transferencia sérica K/BxN desarrollado por D. Mathis y C. Benoist (Korganow AS, Ji H, Mangialaio S, Duchatelle V, Pelanda R, Martin T, et al. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* 1999;10:451-61). Este modelo presenta una sinovitis extensa y, por lo tanto, fue una buena prueba de las propiedades antiinflamatorias y protectoras de las articulaciones del anticuerpo SDP051.

Se inyectó a ratones C57B1/6 de seis a ocho semanas de edad por vía intraperitoneal (IP) 75  $\mu$ l de sueros KBN (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) el día 0 y el día 2. Se administró a los ratones IP 10 mg/kg de SDP051 o control (AC1-P) los Días -1, 0, 1, 2, 4 y 6. Se midió la inflamación de las articulaciones o el grosor de los tobillos en los maléolos de ambos tobillos posteriores de cada ratón que sostenía el tobillo en una posición totalmente flexionada los días 0, 2, 4, 6, 8 y 10 del estudio, utilizando calibradores de pue de rey accionados por resorte (medidor de espesor Mitutoyo modelo 7308, Long Island Indicator Service, Hauppauge, NY). Se determinó el diferencial entre el espesor de la articulación el día 0 y el día de la medición. Los cambios en el grosor del tobillo en el transcurso del estudio se representan en la Figura 48. Las diferencias en las puntuaciones del grosor del tobillo fueron significativas

en los días 6, 8 y 10. El día 10, la inflamación del tobillo en el grupo de SDP051 fue un 47 % menor que la tumefacción en el grupo de control.

El día 10, se recolectó suero de una hemorragia terminal de cada ratón de estudio. El suero se congeló en hielo seco y se almacenó a -80 °C. Los niveles séricos de SDP051 se determinaron analizando sueros en un ELISA usando un péptido Cad-11 como reactivo de captura, y luego detectando SDP051 con una IgG antihumana. SDP051 se pudo detectar fácilmente en los sueros de ratones (figura 49).

Los tobillos se cosecharon el día 10 y se evaluó la histopatología. La gravedad de la erosión del cartílago, la erosión ósea y la inflamación (infiltrado celular) se evaluaron con una puntuación de 0-5 por un técnico cualificado enmascarado para los grupos de estudio. Los resultados de la histopatología el día 10 se resumen en la tabla 5. Los animales tratados con SDP051 demostraron una reducción del 35 % en las puntuaciones de erosión del cartílago, una reducción del 27 % en las puntuaciones de erosión ósea y una reducción del 25 % en las puntuaciones de inflamación.

Tabla 5. Resultados histopatológicos el día 10 (KBN013)

Anticuerpo	Histopat. del tobillo Puntuación: Erosión de cartílago	Histopat. del tobillo Puntuación: Erosión ósea	Histopat. del tobillo Puntuación: Inflamación
AC1-P	3,1 ( $\pm$ 0,3)	3,7 ( $\pm$ 0,3)	4,4 ( $\pm$ 0,3)
SDP051	2,0 ( $\pm$ 0,4)*	2,7 ( $\pm$ 0,4)	3,3 ( $\pm$ 0,5)

\* =  $p < 0,05$ ;  $\pm$  = Error estándar de la media

#### Ejemplo 18: Respuesta de la dosis SDP051 en el modelo de artritis KBN

A los ratones se administraron sueros KBN los días 0 y 2. Los ratones recibieron dosis IP de 10, 3 o 1 mg/kg de SDP051 o AC3-1-P de control los días 0, 2, 4 y 6. Los cambios en el grosor del tobillo se muestran en la Figura 50. Se observó una tendencia a la reducción del grosor del tobillo en ratones tratados con 3 o 10 mg/kg de SDP051. La reducción de la inflamación del tobillo en el grupo de 10 mg/kg fue significativa los días 6, 8 y 10. El día 10, la inflamación del tobillo en este grupo fue un 44 % menor que la inflamación en el grupo de control. En una serie de estudios, 10 mg/kg de SDP051 redujeron significativamente la inflamación del tobillo. A 3 mg/kg hubo una tendencia a la reducción de la inflamación del tobillo.

#### Ejemplo 19. SDP051 reduce las citocinas implicadas en la patología de la artritis reumatoide

Se administró a los ratones a través de la vena de la cola IV 10 mg/kg de SDP051 o anticuerpo de control AC3-1-P los días 0, 1, 2, 4 y 6. El día 6, el grupo de SDP051 demostró un 33 % menor de inflamación de la articulación del tobillo que el grupo de control (Tabla 6). El análisis de citocinas se realizó en los tobillos obtenidos el día 7 a partir de estos ratones de la siguiente manera: se extrajeron las articulaciones del tobillo, se retiraron la piel y el pelaje y las articulaciones se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. A continuación, se solubilizaron las articulaciones en tampón de homogeneización (tampón de homogeneización de tejido Affymetrix (parte n.º PC6002), suplementado con PMSF 2 mM (Sigma parte n.º P7626) y 1X cóctel de inhibidor de proteasa (Sigma n.º de parte P8340), indometacina 0,1 M) y se centrifugó, y los sobrenadantes resultantes se analizaron para determinar los niveles de varias citocinas y quimiocinas en ensayos múltiples (OceanRidge Biosciences).

El grupo de tratamiento de SDP051 demostró una reducción del 29 % al 51 % en los niveles del factor de diferenciación de los osteoclastos, el activador del receptor soluble del factor nuclear Kappa-B (sRANKL), la quimiocina osteoclástica/linfoide, la proteína inflamatoria macrófaga-1 (MIP1 $\alpha$ ), la proteína quimiotáctica de monocitos de quimiocina de monocitos (MCP1), el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y la quimiocina de leucocitos, regulada tras la activación, células T normales expresadas y secretadas (RANTES) (Tabla 6). Poco o ningún efecto se observó en los niveles de IL-6 o TNF $\alpha$ . Se observó un aumento modesto en el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) mientras que IL-23 no se pudo detectar en los grupos de prueba.

El mecanismo de acción propuesto de SDP051 es que el anticuerpo se une a cad-11 en los sinoviocitos similares a los fibroblastos en la articulación del ratón, dando como resultado una expresión reducida de citocinas y quimiocinas proinflamatorias. De hecho, en los ratones tratados con SDP051, hubo una reducción en varias quimiocinas de leucocitos que se sugiere que están implicadas en la biología de los FLS, incluyendo MCP-1, RANTES y MIP1 $\alpha$ , en las articulaciones de pacientes con AR (García-Vicuna R, Gomez-Gavero M, Dominguez-Luis M, Pec M, Gonzalez-Alvaro M, Alvaro-Gracia M y Diaz-Gonzalez F, 2004 Arth & Rheum, 50, pág. 3866-3877) (Tabla 6). Además, sRANKL es un mediador importante del desarrollo de osteoblastos y la expresión de RANKL es inducida en FLS por varias citocinas inflamatorias (Hashizume M, Hayakawa N y Mihara M, 2008, Rheumatology 47 pág. 1635-1640). Los ratones tratados con SDP051 demostraron una reducción en los niveles de sRANKL en sus articulaciones (Tabla 6). Si bien estos efectos fueron modestos, los efectos locales-regionales de estos cambios en la región local podrían amplificarse.

Tabla 6. Resultados de citocinas del día 7 del estudio KBN018

Grupo de prueba	Cambio de espesor del tobillo (1/100 mm)	GM-CSF	IL-23	IL-6	MCP-1	MIP1 alfa	RANTES	sRANKL	TNF alfa	VEGF
AC3-1-P	39,29 ( $\pm$ 8,3)	4,9	0,0	26,1	188,0	99,5	20,5	327,7	2,2	17,3
SDP051	26,07 ( $\pm$ 8,6)	3,4	0,0	24,0	126,9	58,5	14,5	154,0	2,2	20,1
No expuestos	n/a	2,3	5,4	1,7	21,8	10,7	11,1	17,2	0,1	15,5

Aunque la presente invención se ha mostrado y se ha descrito haciendo particular referencia a las realizaciones, a modo de ejemplo de la misma, los expertos en la materia entenderán que pueden realizarse diversos cambios en la forma y los detalles sin desviarse del alcance de la invención englobada en las reivindicaciones adjuntas.

5

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado que se une específicamente a un dominio EC1 de una proteína cadherina-11 de mamífero y antagoniza dicha proteína cadherina-11 de mamífero, que comprende una región variable de la cadena pesada de anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 69 y una región variable de la cadena ligera de anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 71.
2. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo completo.
3. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo inhibe una o más actividades mediadas por la cadherina-11 seleccionadas del grupo que consiste en la unión de la proteína cadherina-11 de mamífero a una o más proteínas cadherina-11, agregación de células que expresan la proteína de cadherina-11 de mamífero, inducción de la expresión de enzimas, inducción de la expresión de citocinas, inducción de la expresión del factor de crecimiento, migración de células que expresan la proteína cadherina-11 de mamífero y destrucción de cartilago.
4. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, preferentemente en donde el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un Fab, un Fab', un F(ab')<sub>2</sub> y un scFv.
5. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humanizado que se une específicamente a un dominio EC1 de una proteína cadherina-11 de mamífero y antagoniza dicha proteína cadherina-11 de mamífero, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 69 y una región variable de la cadena ligera de anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 71.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en la que el anticuerpo inhibe la agregación de células que expresan dicha cadherina-11 de mamífero o en la que el anticuerpo es un anticuerpo completo o en la que el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, que comprende además un fármaco antiinflamatorio modificador de la enfermedad, preferentemente en la que el fármaco antiinflamatorio modificador de la enfermedad es metotrexato.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, que comprende además un agente antiinflamatorio, preferentemente en la que el agente antiinflamatorio es un AINE o un esteroide.
9. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo humanizado de la reivindicación 1.
10. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 9, en donde dicho ácido nucleico está presente en un vector.
11. Una célula aislada que expresa el anticuerpo humanizado de la reivindicación 1.
12. Un anticuerpo humanizado que se une específicamente a un dominio EC1 de una proteína cadherina-11 de mamífero, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 69 y una región variable de la cadena ligera de anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 71 y en donde el anticuerpo antagoniza dicha proteína cadherina-11 de mamífero para su uso en el tratamiento de un trastorno mediado por la cadherina-11 seleccionado del grupo que consiste en un trastorno inflamatorio, una fibrosis y cáncer en un sujeto mamífero que lo necesite.
13. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la agregación de células que expresan dicha proteína cadherina-11 de mamífero está inhibida en una o más articulaciones de dicho sujeto o en donde el anticuerpo es un anticuerpo completo o en donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo o en donde el trastorno mediado por cadherina-11 es un trastorno inflamatorio de las articulaciones seleccionado del grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis psoriásica, síndrome de Reiter, espondilitis anquilosante, artritis juvenil crónica, enfermedad de Lyme crónica y artritis articular asociada a lupus eritematoso sistémico, o en donde el sujeto mamífero es un ser humano, o en donde el anticuerpo se administra sistémicamente, o en donde el anticuerpo se administra por vía intravenosa, o en donde el anticuerpo se administra por inyección directa en una articulación, o en donde el anticuerpo inhibe la migración, la adhesión, la invasión del cartilago o la señalización intercelular de células que expresan dicha proteína cadherina-11 de mamífero en una o más articulaciones de dicho sujeto, o en donde el anticuerpo inhibe la inducción de la expresión o la actividad de una enzima seleccionada del grupo que consiste en una colagenasa, una serina proteasa y una metaloproteinasas de la matriz en células que expresan dicha proteína cadherina-11 de mamífero en una o más articulaciones de dicho sujeto, o en donde el anticuerpo inhibe la inducción de la expresión o la actividad de una citocina o un factor de crecimiento seleccionados del grupo que consiste en un IL-6, IL-8, RANKL y TRANCE en células que expresan dicha proteína cadherina-11 de mamífero en una o más articulaciones de dicho sujeto, o en donde el anticuerpo se administra en combinación con al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en un fármaco antiinflamatorio modificador de la enfermedad y un agente

antiinflamatorio.

- 5 14. Uso de un anticuerpo humanizado en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno mediado por la cadherina-11 seleccionado del grupo que consiste en un trastorno inflamatorio, una fibrosis y un cáncer en un sujeto mamífero que lo necesite, en donde el anticuerpo se une específicamente a un dominio EC1 de una proteína cadherina-11 de mamífero y comprende una región variable de cadena pesada del anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 69 y una región variable de la cadena ligera del anticuerpo que comprende la SEQ ID NO: 71.
- 10 15. El uso de la reivindicación 14 o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el trastorno mediado por cadherina-11 es un trastorno inflamatorio, preferentemente en donde el trastorno inflamatorio es un trastorno inflamatorio articular, tal como en donde el trastorno articular inflamatorio es artritis reumatoide.
- 15 16. El uso de la reivindicación 14 o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el trastorno mediado por cadherina-11 es fibrosis o en donde el trastorno mediado por cadherina-11 es cáncer.

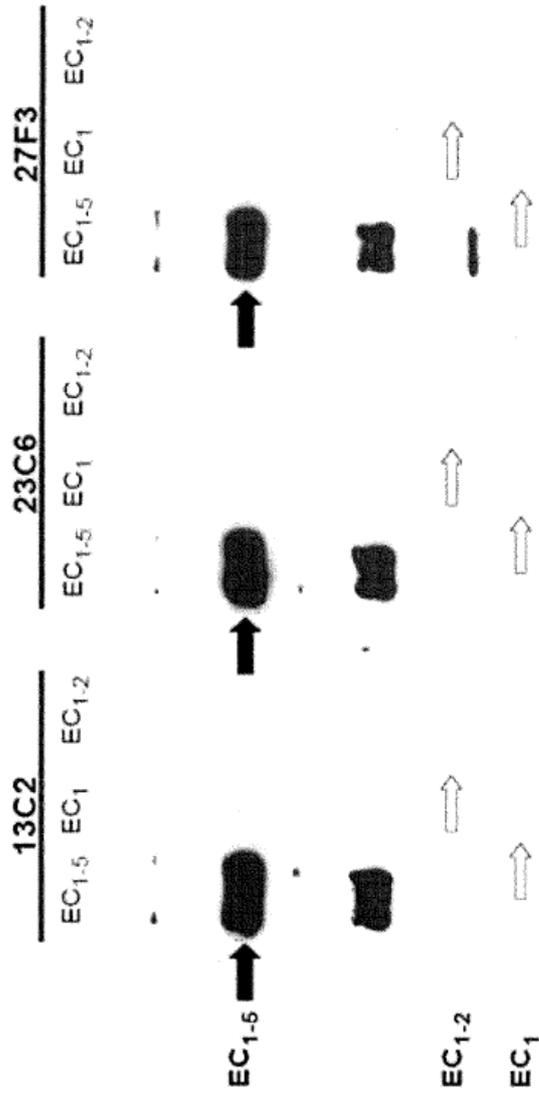


FIG. 1A

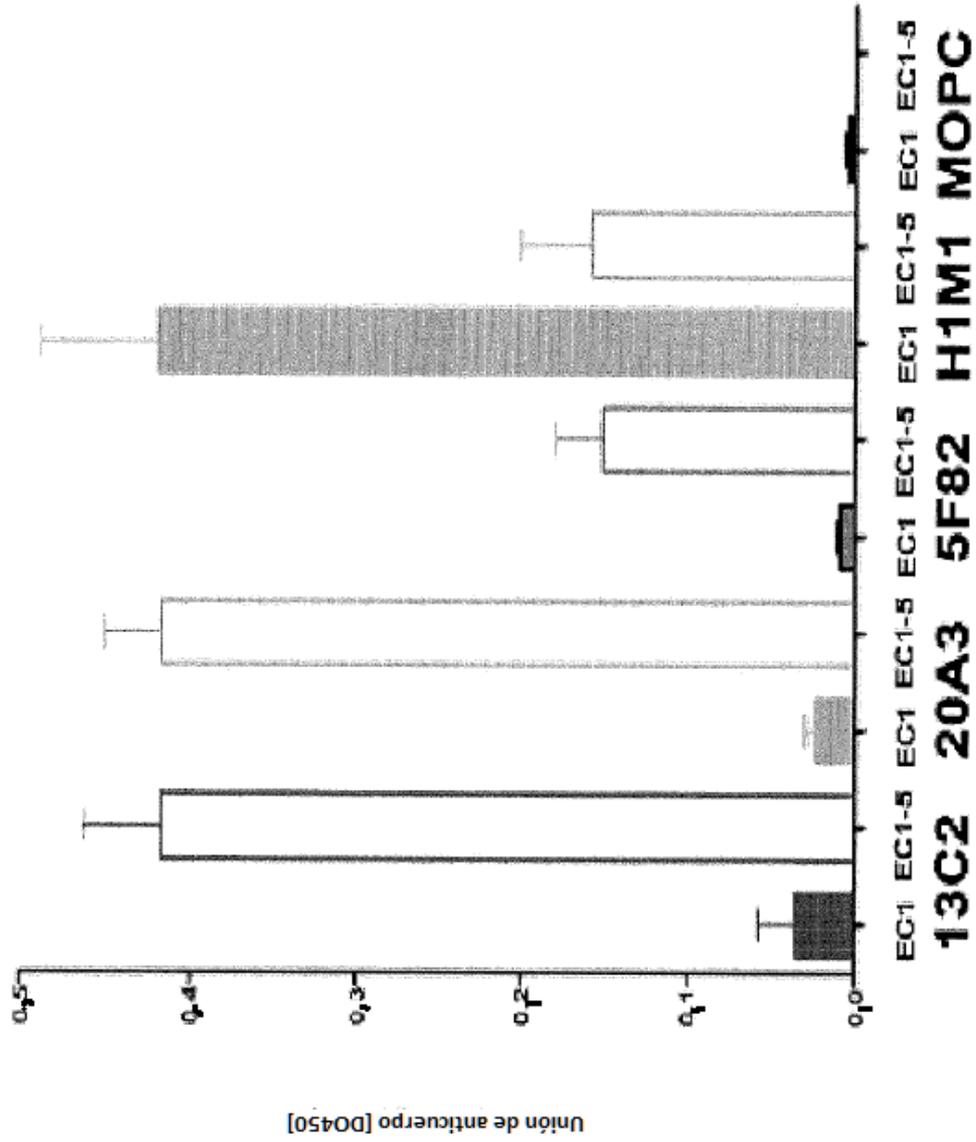


FIG. 1B

<b>Cad-11 humana</b>	<u>GWVWN</u> <u>QEEVI</u>	<u>EEYTG</u> <u>PDPYL</u> <u>VGRLH</u> <u>SDIDS</u> <u>GDGN</u>	(SEQ ID NO:3)
<b>Cad-8 humana</b>	GWVWN QMFVL	EEFSG PEPIL VGRLH TDLDP GSKK	(SEQ ID NO:4)
<b>MIN-Cad humana</b>	SWVWN QFFVL	EEYTG TDPLY VGKLH SMDR GDGS	(SEQ ID NO:5)

FIG. 2

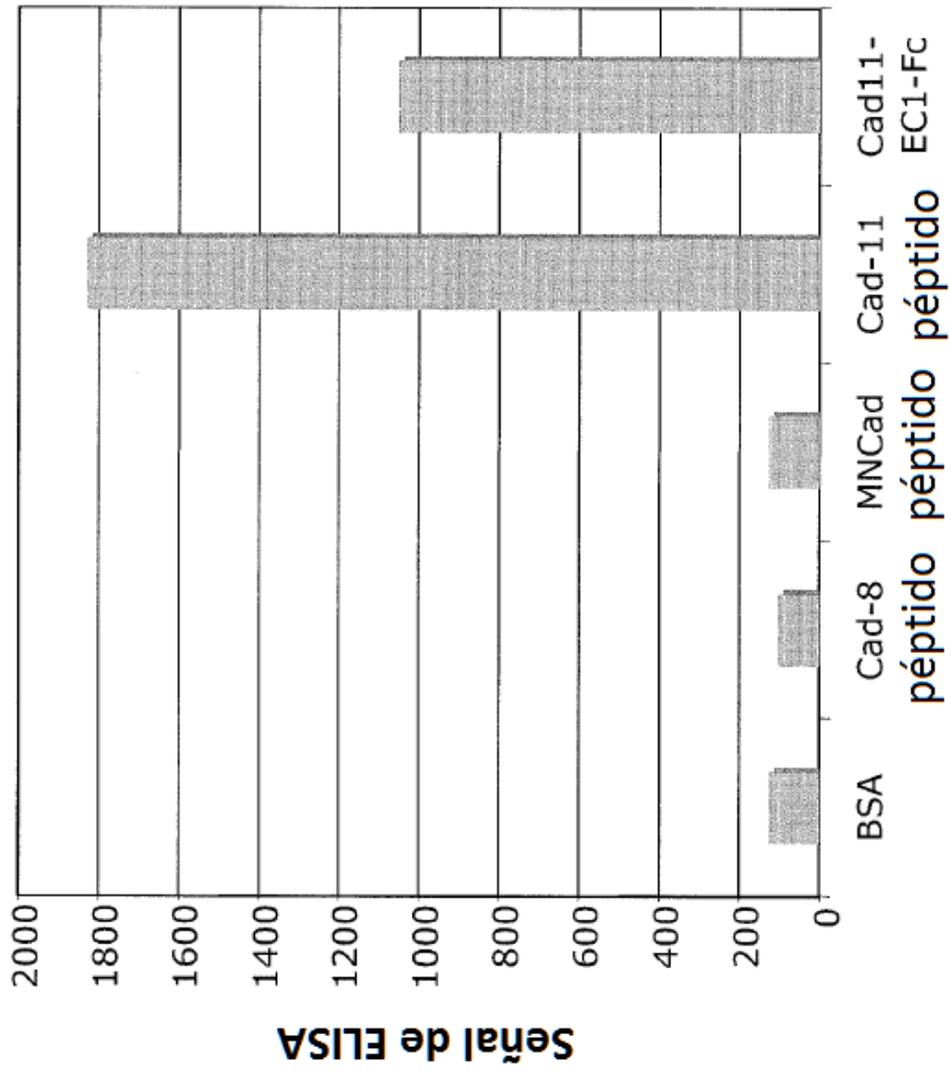
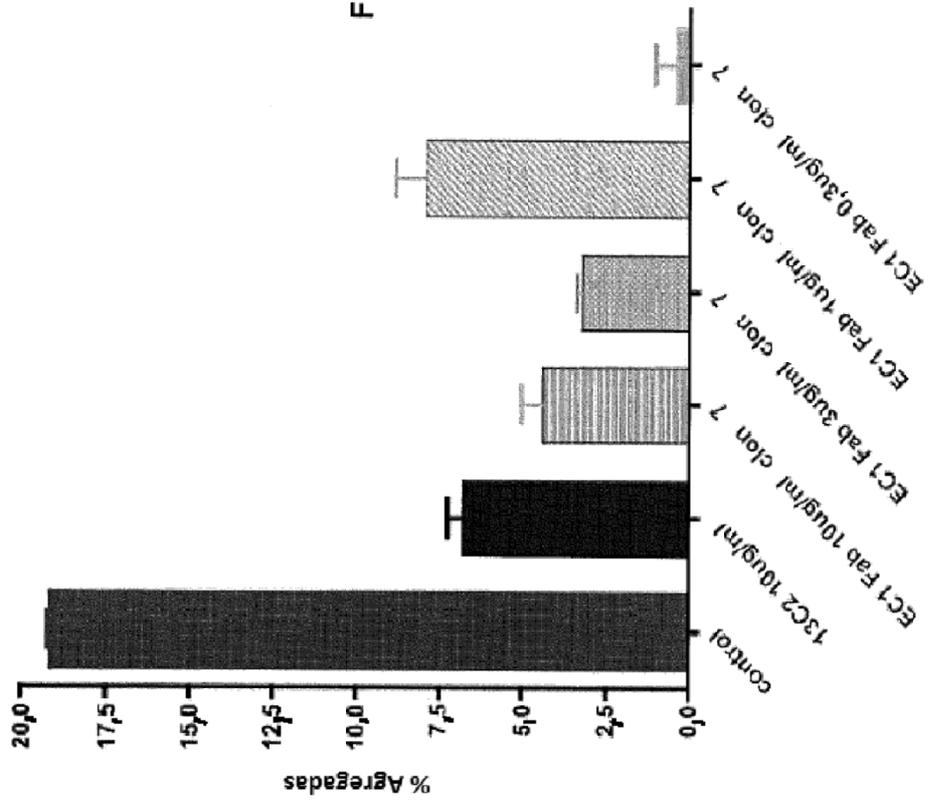


FIG. 3

FIG. 4



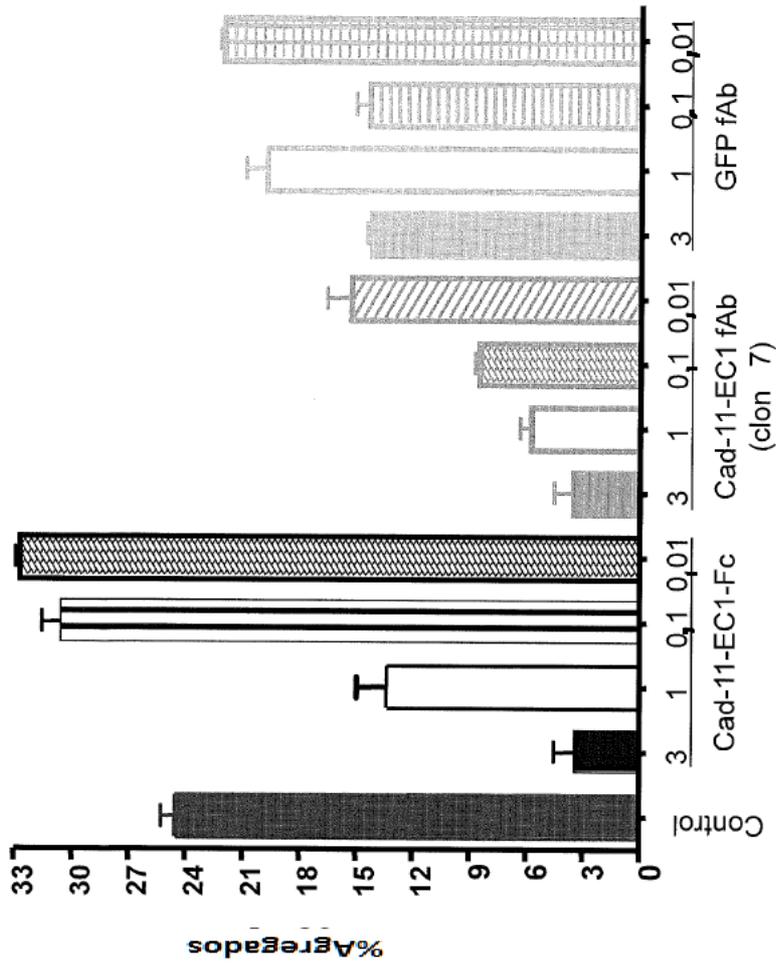


FIG. 5

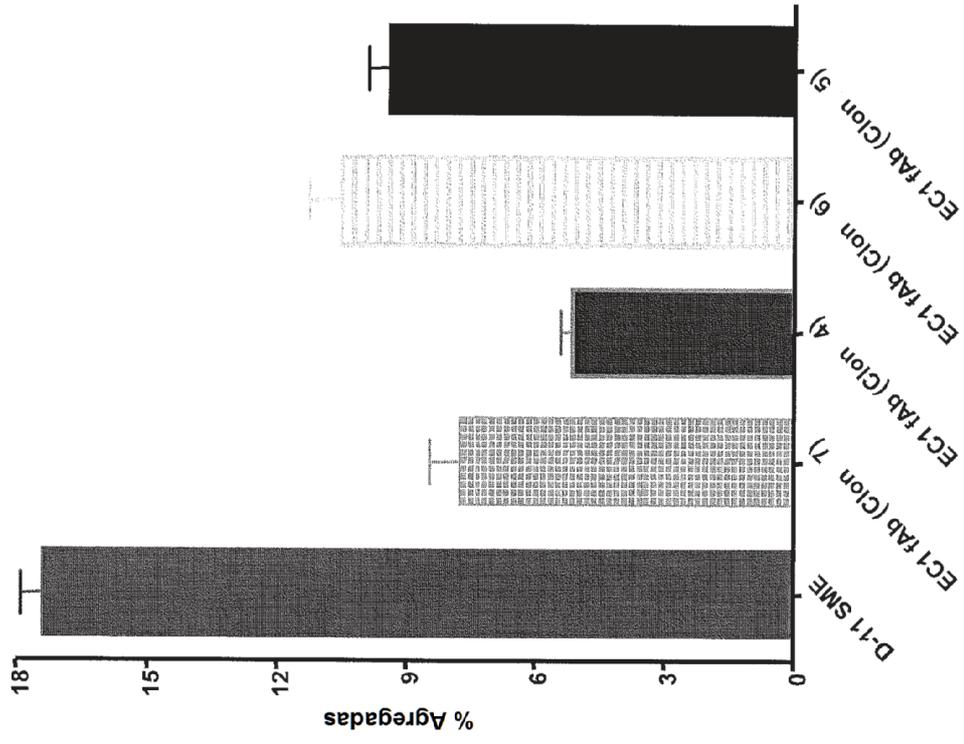


FIG. 6

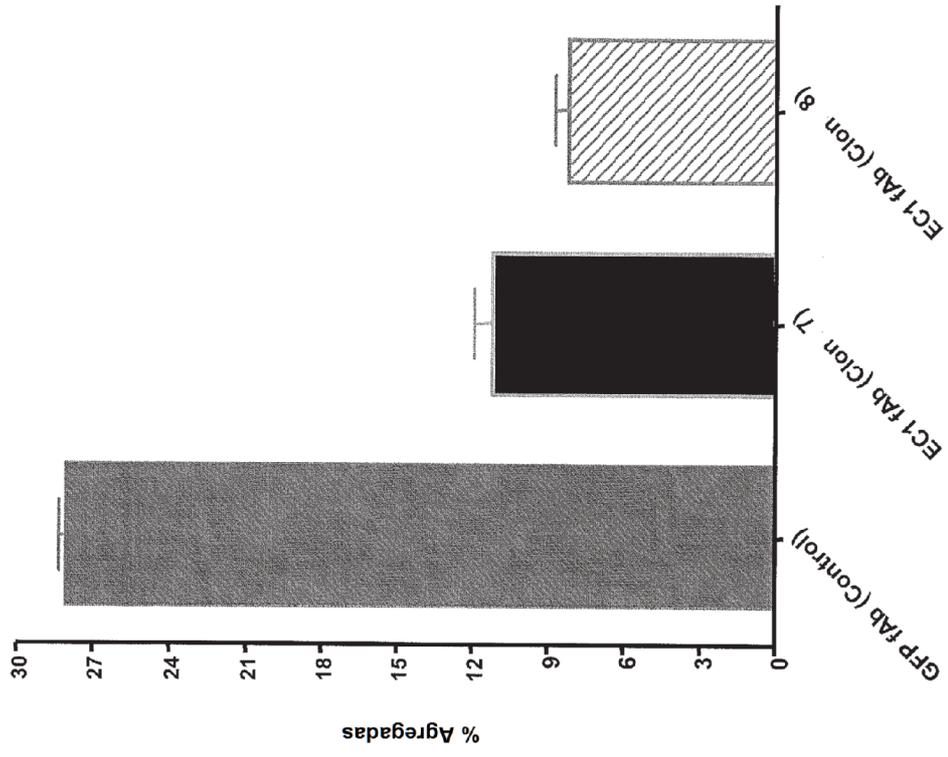


FIG. 7

ATGAAGGAGAACTACTGTTTACAAGCCGCCCTGGTGTGCCCTGGGCATGCTGTGCCACAGCCATGCCCTTTGC  
 CCCAGAGCGGGGGGCACCTGCGGGCCCTCCCTCCATGGGCACCATGAGAAGGGCAAGGAGGGGCAGGT  
 GCTACAGCGCTCCAAGCGTGGCTGGTCTGGAACCAAGTTCTCGTGATAGAGGAGTACACGGGCCCTGAC  
 CCCGTGCTTGTGGGCAGGCTTCATTAGATAATTGACTCTGGTGATGGGAACATTAATATACATTCCTCAGGGG  
 AAGGAGCTGGAACCATTTTTGTGATTGATGACAAATCAGGGAACATTCATGCCACCAAGACGTTGGATCGAG  
 AAGAGAGAGCCAGTACACGTTGATGGCTCAGGCCGGTGACAGGGACACCAATCGGCCACTGGAGCCACC  
 GTCGGAATTCATTGTCAAGGTCCAGAGATCIGTGGAGTGCCCACTTGCCCAAGCACCACTGTGGCAGGA  
 CCTTCAGTCTTCCCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCCCTGATGATCTCCAGAACCCCTGAGGTCACGT  
 GCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCAGTTCAACTGGTACGTTGGACGGCATGGAG  
 GTGCATAATGCCAAGACAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCCGTGTGGTCAAGCGTCCCTC  
 ACCGTCGTGCACCGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAGGCCCTCCC  
 AGCCCCATCGAAGAAACCATCTCCA A AAGGGCAGCCCGAGAACCAAGGTGTACACCCCTGCC  
 CCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAAGGTACGCTGACCTGGTCA AAGGCTTCTACCCCCAG  
 CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAACCTCCCATGCT  
 GGACTCCGACGGCTCCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAAGACAGGTGGCAGCAGGGGAA  
 CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAAGAGCCCTCCTCCCTGTCT  
 CCGGGTAAATGAGTGCCACGGCTAGCTGG (SEQ ID NO:6)

FIG. 8

MKENYCLQAALVCLGMLCHSHAFAPERRGHLRPSFHGHHEKGEQVLQRSKR  
GWWWNQFFVIEEYTGPDPLVGRHLHSDIDSGDGNIKYILSGEGAGTIFVDDKSGNI  
HATKTLDREERAQYTLMAQAVDRDTNRPLEPPSEFIVKVQ  
RSVECPCAPPVAGPSVFLFPPKDKTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVQFN  
WYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYCKVSNKGLP  
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT  
QKSLSLSPGKVPRLA (SEQ ID NO:7)

FIG. 9

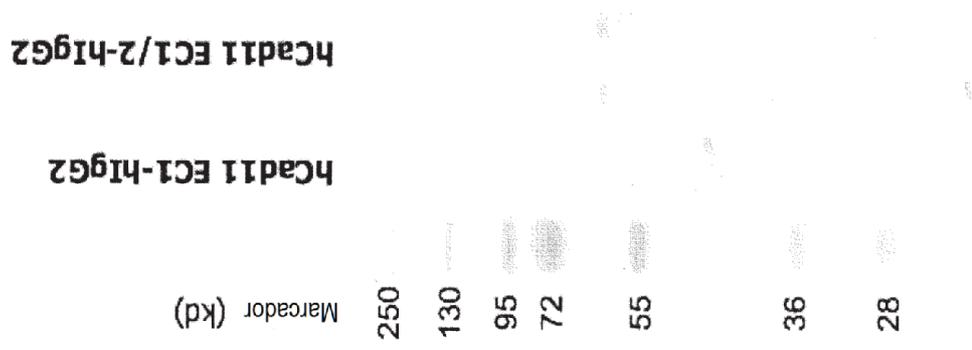


FIG. 10

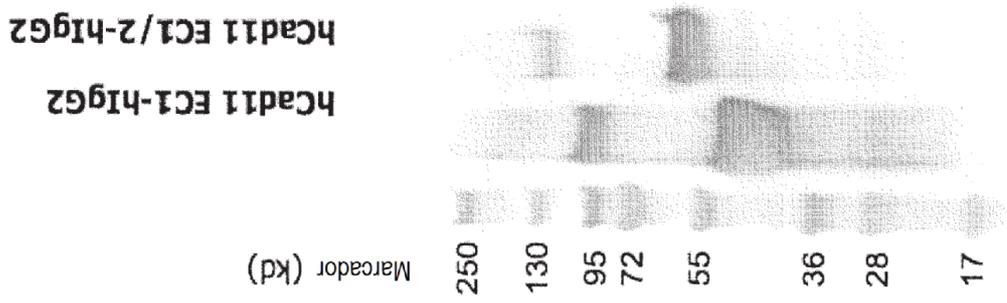


FIG. 11

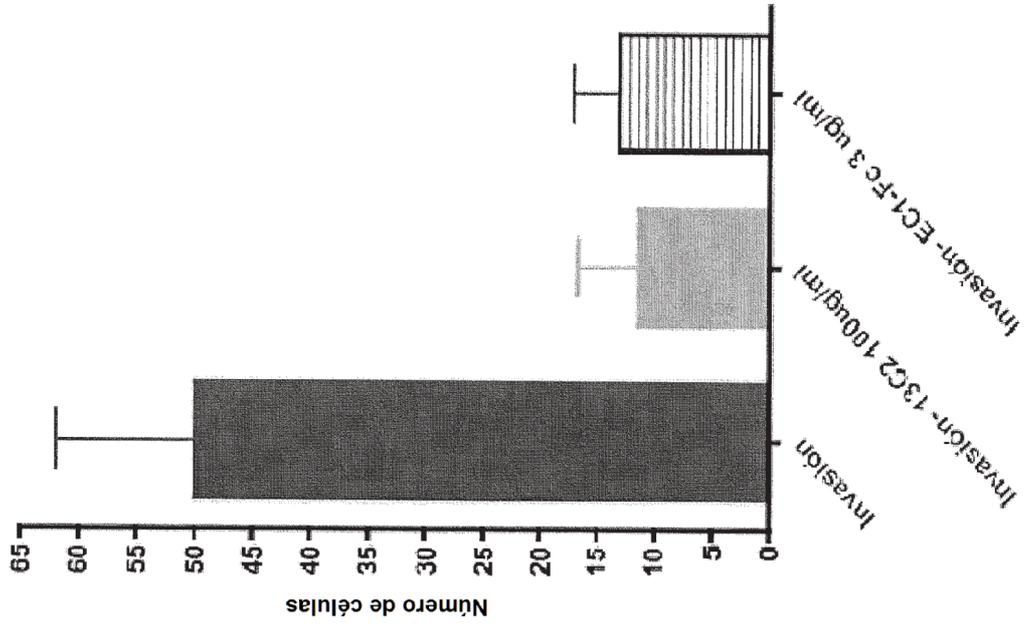


FIG. 12

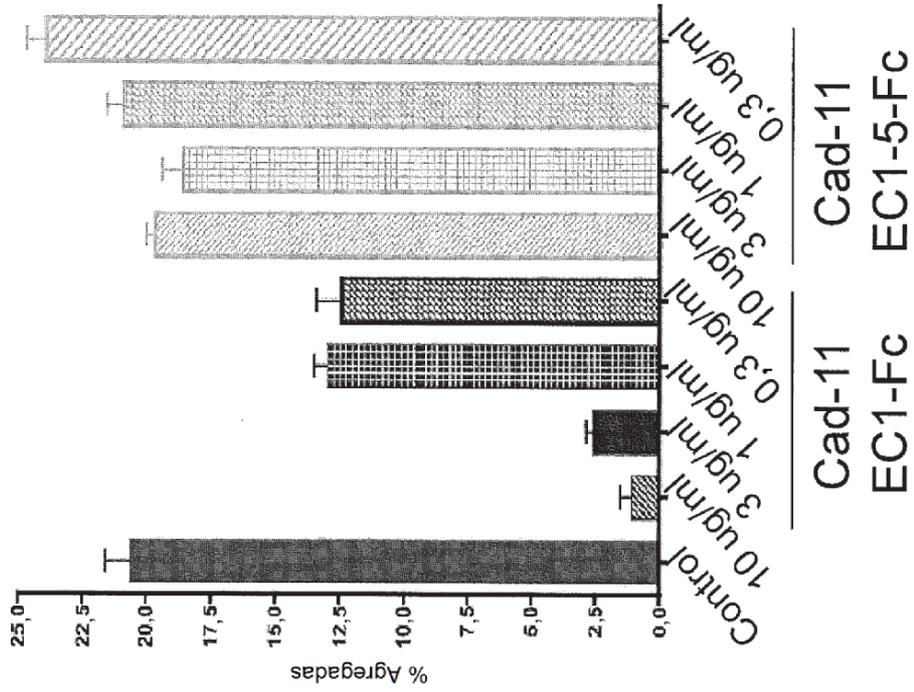


FIG. 13B

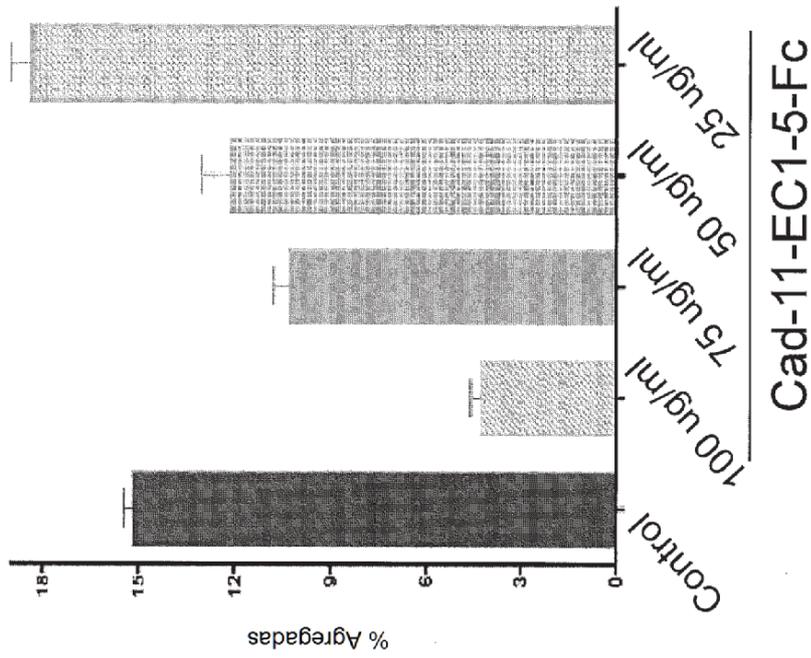


FIG. 13A

# ES 2 665 317 T3

1 agatgccgcg ggggccgctc gcagccgccc ctgacttctg aatgggaccg ggactggggc  
61 cgggactgac accgcagcgc ttgccctgcg ccagggactg gcggctcggg ggttgcgctc  
121 accctcaagg gccccagaaa tcaactgtgtt ttcagctcag cggccctgtg acattccttc  
181 gtgttgatcat ttgttgagtg accaatcaga tgggtggagt gtgttacaga aattggcagc  
241 aagtatccaa tgggtgaaga agaagctaac tggggacgtg ggcagccctg acgtgatgag  
301 ctcaaccagc agagacattc catoccaaga gaggtctgcg tgacgcgtcc gggaggccac  
361 cctcagcaag accaccgtac agttgggtga aggggtgaca gctgcattct cctgtgctta  
421 ccacgtaacc aaaaatgaag gagaactact gtttacaagc cggccctggtg tgcctgggca  
481 tgctgtgcca cagccatgcc tttgcccag agcggcgggg gcacctgccc cctccttcc  
541 atgggcacca tgagaagggc aaggagggc aggtgctaca gcgctccaag cgtggctggg  
601 tctggaacca gttcttcgtg atagaggagt acaccgggcc tgaccocgtg cttgtgggca  
661 ggcttcattc agatattgac tctggtgatg ggaacattaa atacattctc tcaggggaag  
721 gagctggaac catttttctg attgatgaca aatcagggaa cattcatgcc accaagacgt  
781 tggatcgaga agagagagcc cagtacacgt tgatggctca ggcggtggac agggacacca  
841 atcggccact ggagccaccg tcggaattca ttgtcaaggt ccaggacatt aatgacaacc  
901 ctccggagtt cctgcacgag acctatcatg ccaacgtgcc tgagaggtcc aatgtgggaa  
961 cgtcagtaat ccaggtgaca gcttcagatg cagatgacct cacttatgga aatagcgcca  
1021 agttagtgtg cagtatcctc gaaggacaac cctatcttcc ggtggaagca cagacaggta  
1081 tcatcagaac agccctaccc aacatggaca gggaggccaa ggaggagtac caogtgggtg  
1141 tccaggccaa ggacatgggt ggacatatgg cgggactctc agggacaacc aaagtgacga  
1201 tcacactgac cgatgtcaat gacaaccac caaagtttcc gcagagcgta taccagatgt  
1261 ctgtgtcaga agcagccgtc cctggggagg aagtaggaag agtgaaagct aaagatccag  
1321 acattggaga aatggctta gtcacatata atattgttga tggagatggt atggaatcgt  
1381 ttgaaatcac aacggactat gaaacacagg agggggtgat aaagctgaaa aagcctgtag  
1441 attttgaac caaaagagcc tatagcttga aggttagaggc agccaacgtg cacatcgacc  
1501 cgaagtttat cagcaatggc cctttcaagg aactgtgac cgtcaagatc tcagtagaag  
1561 atgctgatga gcccctatg ttcttggccc caagttacat ccacgaagtc caagaaaatg  
1621 cagctgctgy cacogtgggt gggagagtgc atgcccaga cctgatgct gccaacagcc

FIG. 14A

ES 2 665 317 T3

1681 cgataaggta ttccatcgat cgtcacactg acctcgacag atttttcact attaatccag  
 1741 aggatgggtt tattaaaact acaaaacctc tggatagaga ggaaacagcc tggctcaaca  
 1801 tcaactgtctt tgcagcagaa atccacaate ggcacagga agccaaagtc ccagtggcc  
 1861 ttagggctct tgatgtcaac gataatgctc ccaagtttgc tgcccttat gaaggtttca  
 1921 tctgtgagag tgatcagacc aagccacttt ccaaccagcc aattgttaca attagtgcag  
 1981 atgacaagga tgacacggcc aatggaccaa gatttatctt cagcctacc cctgaaatca  
 2041 ttcacaatcc aaatttcaca gtcagagaca accgagataa cacagcaggc gtgtacgccc  
 2101 ggggtggagg gttcagtcgg cagaagcagg acttgtacct tctgccata gtgatcagcg  
 2161 atggcggcat cccgccatg agtagcacca acaccctcac catcaaagtc tgcgggtgcg  
 2221 acgtgaacgg ggcactgctc tctgcaacg cagaggcta cattctgaac gccggcctga  
 2281 gcacaggogc cctgatcgcc atcctcgct gcatcgctat tctcctggtc attgtagtat  
 2341 tgtttgtgac cctgagaagg caaaagaaag aaccactcat tgtctttgag gaagaagatg  
 2401 tccgtgagaa catcattact tatgatgatg aaggggggtgg ggaagaagac acagaagcct  
 2461 ttgatattgc caccctccag aatcctgatg gtatcaatgg atttatcccc cgcaaagaca  
 2521 tcaaacctga gtatcagtac atgcctagac ctgggctccg gccagcgcgc aacagcgtgg  
 2581 atgtcgatga cttcatcaac acgagaatac aggaggcaga caatgacccc acggctcctc  
 2641 cttatgactc cattcaaate tacggttatg aaggcagggg ctcaagtggc gggtcctga  
 2701 gctccctaga gtcggccacc acagattcag acttggacta tgattatcta cagaactggg  
 2761 gacctggtt taagaaacta gcagatttgt atggttccaa agacactttt gatgacgatt  
 2821 cttaacaata acgatacaaa tttggcctta agaactgtgt ctggcgttct caagaatcta  
 2881 gaagatgtgt aaacaggtat tttttaaat caaggaaagg ctcatttaaa acaggcaaag  
 2941 ttttacagag aggatacatt taataaaaact gcgaggacat caaagtggta aatactgtga  
 3001 aatacctttt ctcaaaaaa ggcaaatatt gaagttgttt atcaactctg ctagaaaaaa  
 3061 aaaacacttg gcatacaaaa tatttaagtg aaggagaagt ctaacgctga actgacaatg  
 3121 aagggaaatt gtttatgtgt tatgaacatc caagtcttct tctttttta agttgtcaaa  
 3181 gaagcttcca caaaattaga aaggacaaca gttctgagct gtaatttcgc cttaaactct  
 3241 ggacactcta tatgtagtgc atttttaaac ttgaaatata taatattcag ccagcttaaa  
 3301 cccatacaat gtatgtacaa tacaatgtac aattatgtct cttgagcact aatcttgta  
 3361 ctgctgattc ttgtaaactt ttttgcttct actttcatct taaactaata cgtgocagat

FIG. 14B

# ES 2 665 317 T3

3421 ataactgtct tgtttcagtg agagagccc tatttctatg tcatttttaa tgtatctatt  
3481 tgtacaatth taaagttctt atthtagtat acgtataaat atcagtattc tgacatgtaa  
3541 gaaaatgtta cggcatcaca cttatattth atgaacattg tactgttgct ttaatatgag  
3601 cttcaatata agaagcaatc tttgaaataa aaaaagattt ttttttaaaa aaaa (SEQ ID  
NO:1)

FIG. 14C

# ES 2 665 317 T3

1 mkenyclqaa lvclgmlchs hafaperrgh lrpsfhghhe kgkegqvlqr skrgwvwnqf  
61 fvieeytgpđ pvlvgrlhsd idsgdgniky ilsgegagti fviddksgni hatktldree  
121 raqytlmaqa vdrđtnrple ppsefivkvq dindnppefl hetyhanvpe rsnvgtsviq  
181 vtasdaddpt ygnsaklvys ilegqpyfsv eaqtgiirta lpmndreake eyhvviqakd  
241 mgghmgglsg ttkvtitltd vndnppkfpq svyqmsvsea avpgeevgrv kakdpdigen  
301 glvtynivdg dgmesfeitt dyetqegvik lkkpvdfetk rayslkveaa nvhidpkfis  
361 ngpfkđvtv kisvedadep pmflapsyih evqenaaagt vvgrvhakđp daanspirys  
421 idrhtđldrf ftinpedgfi kttkpldree tawlnitvfa aeihnrhgea kvpvairvld  
481 vndnapkfaa pyegficesd gtkplsnqpi vtisaddkđđ tangprfifs lppeiinhpn  
541 ftvrđnrđnt agvyarrggf srqkđdlyll pivisdggip pmsstntlti kvcgcdvnga  
601 llscnaeayi lnaglđgal iailacivil lvivvlfvtl rrqkkepliv feeđvreni  
661 ityđdegge edteafđiat lqnpđgingf iprkđikpey qymprpđlp apnsvdvđđf  
721 intriqeādn dptappysđi qiygyegrgs vagslssles attdsđldyd ylnwgpřfk  
781 kladlygskđ tfđđđđ (SEQ ID NO: 2)

FIG. 15

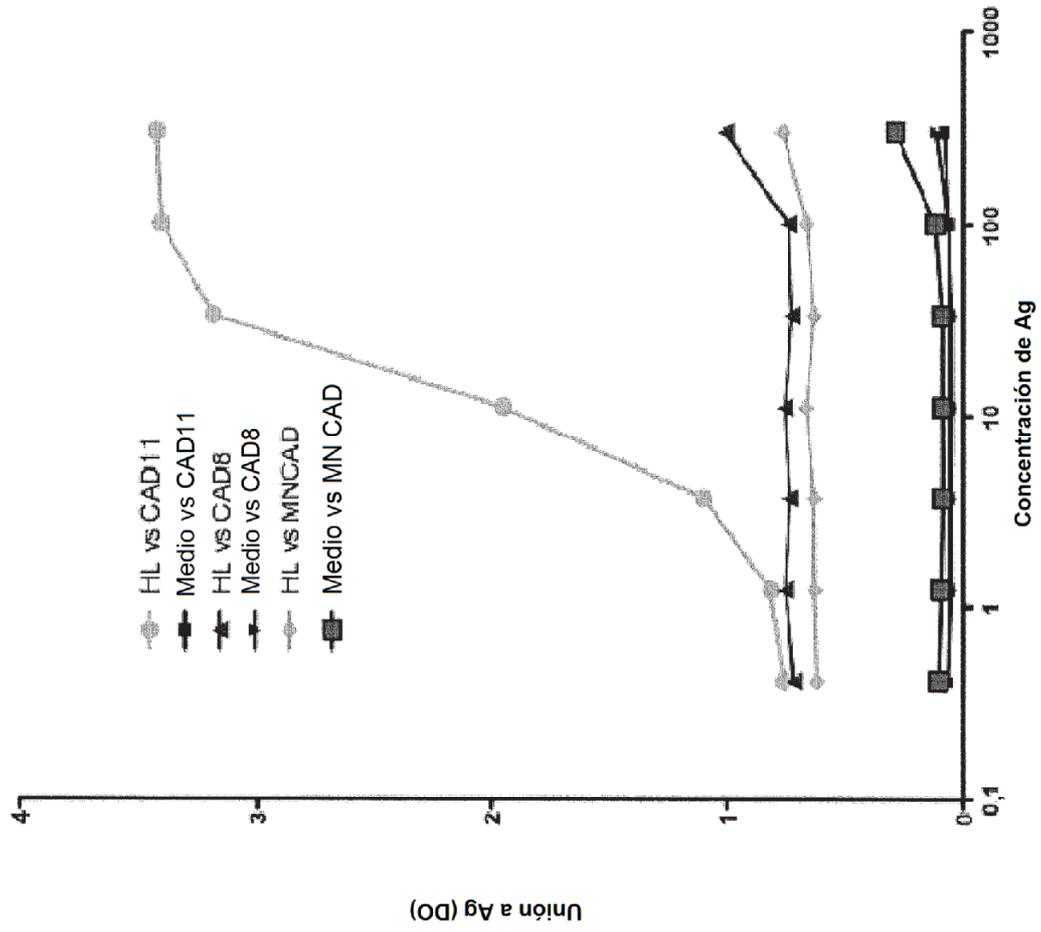


FIG. 16

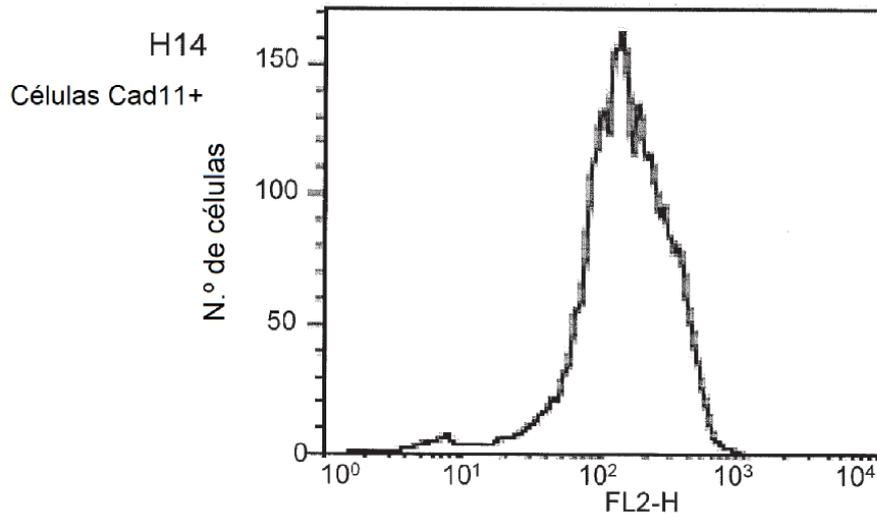


FIG. 17A

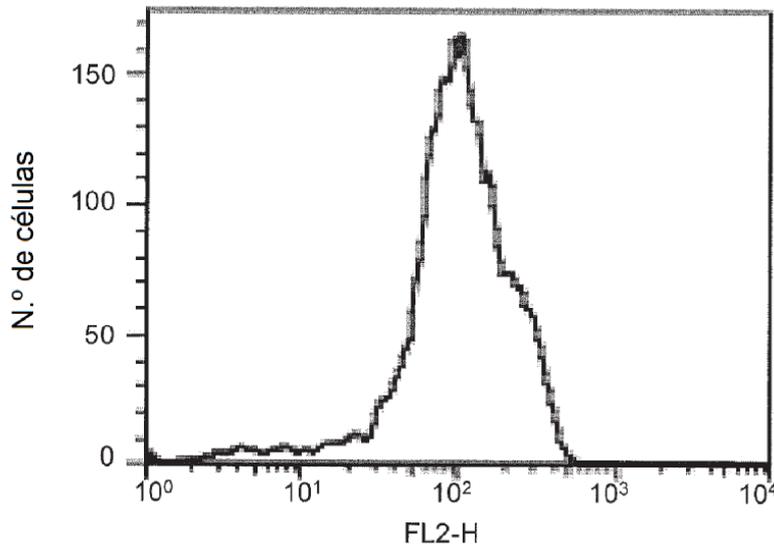


FIG. 17B

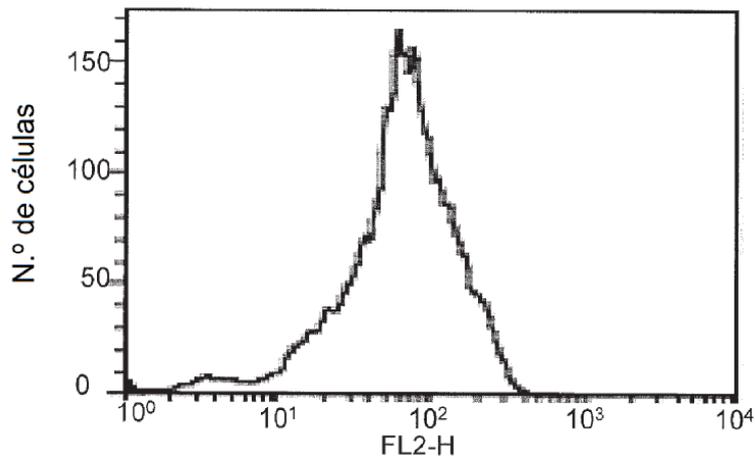
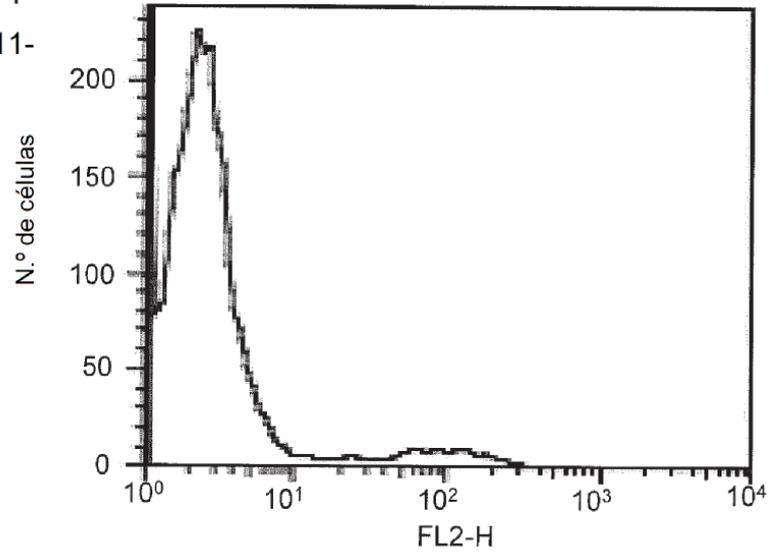
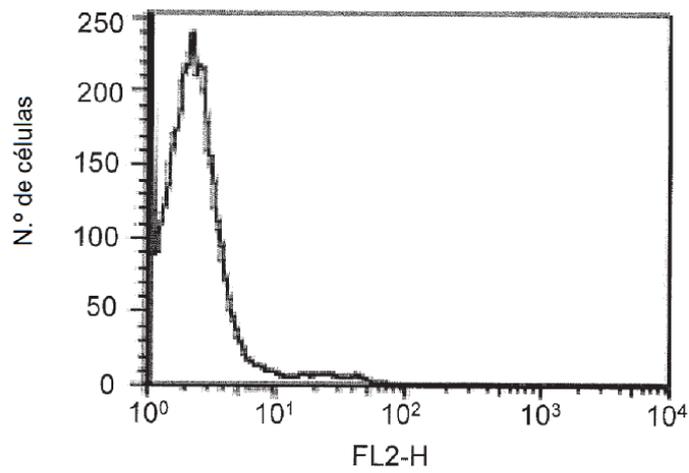


FIG. 17C

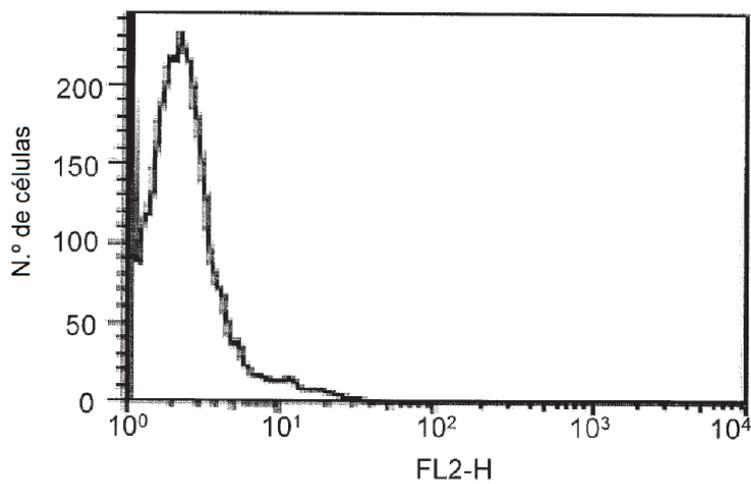
H14  
Células Cad11-



**FIG. 17I**

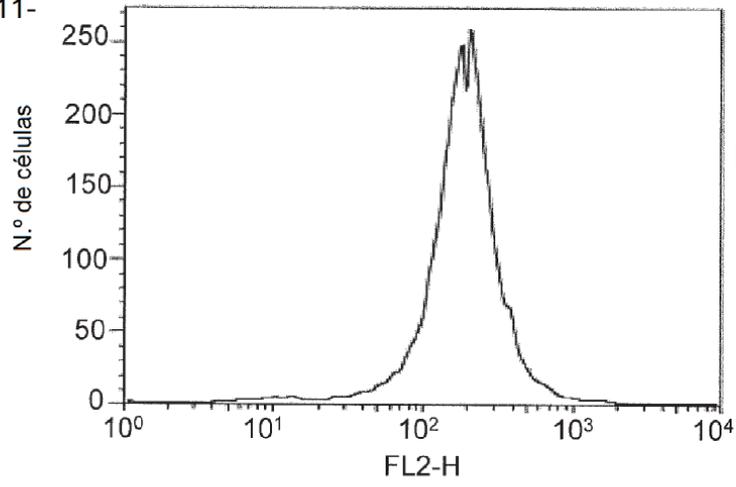


**FIG. 17E**

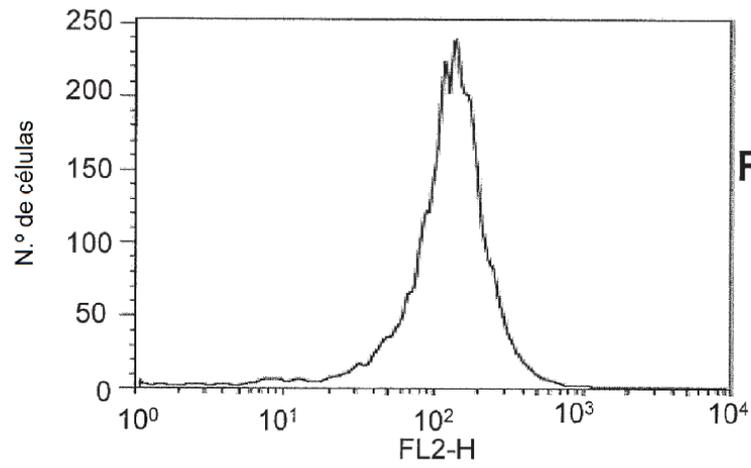


**FIG. 17F**

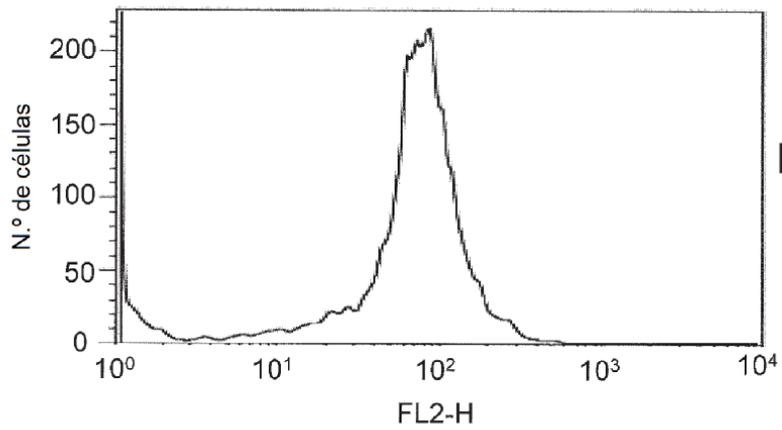
H1M1  
Células Cad11-



**FIG. 17G**



**FIG. 17H**



**FIG. 17I**

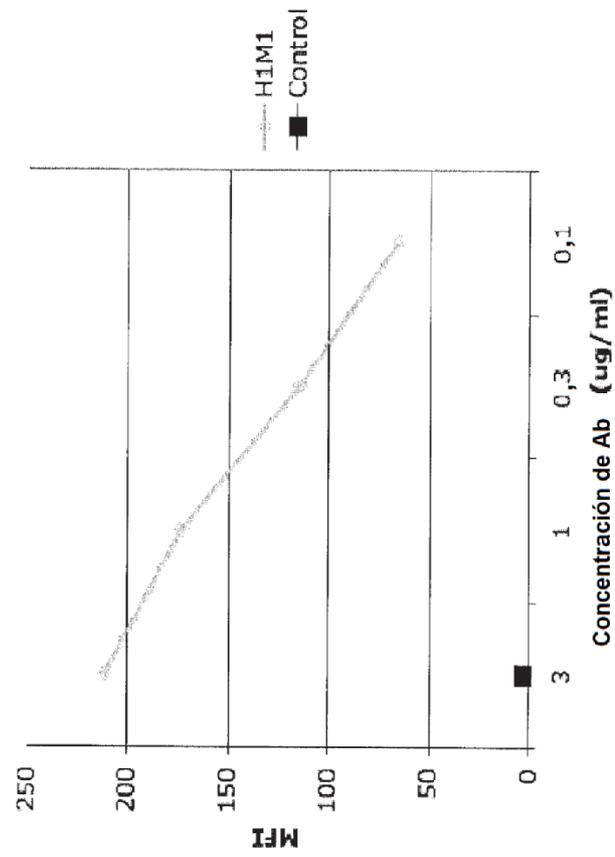


FIG. 18B

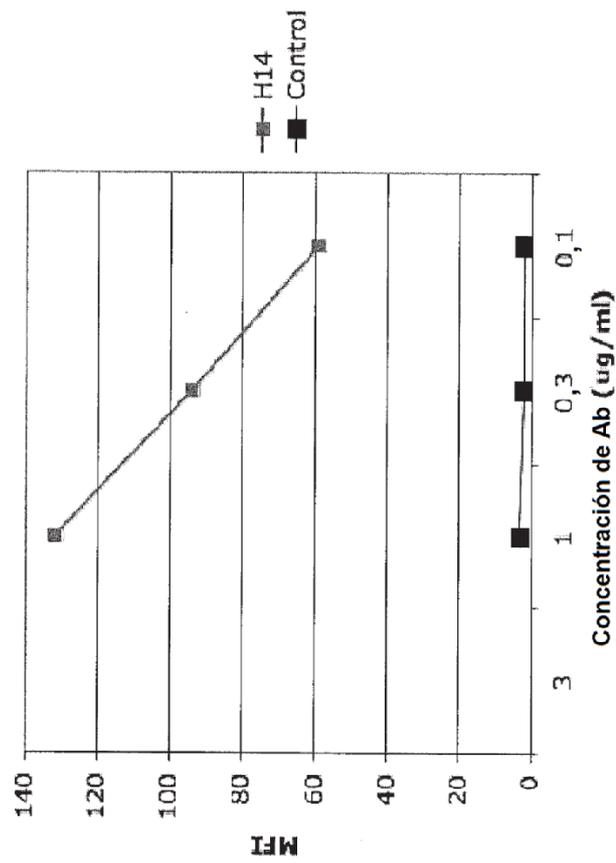
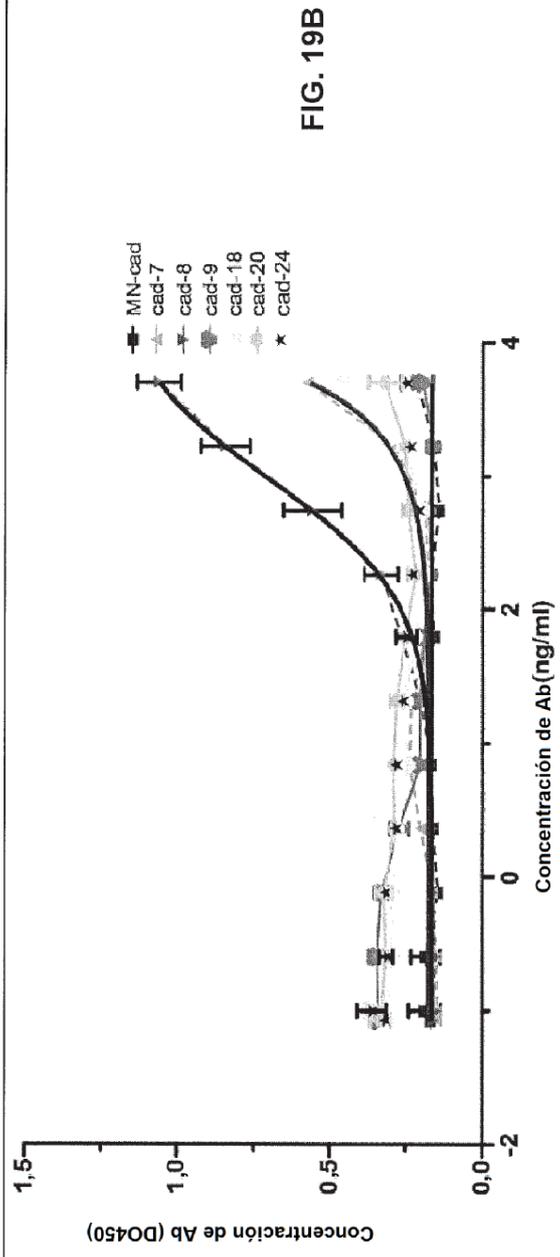
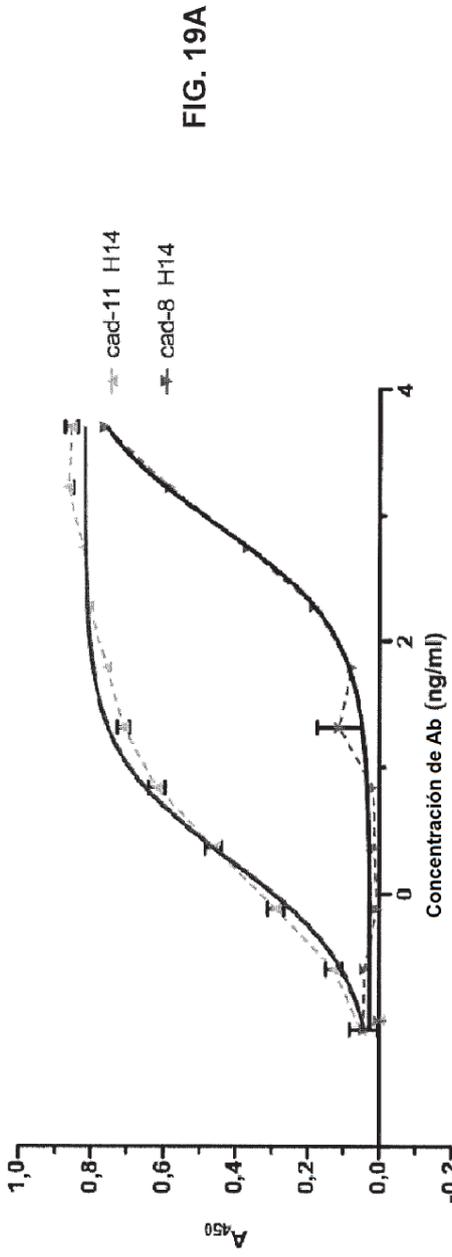


FIG. 18A



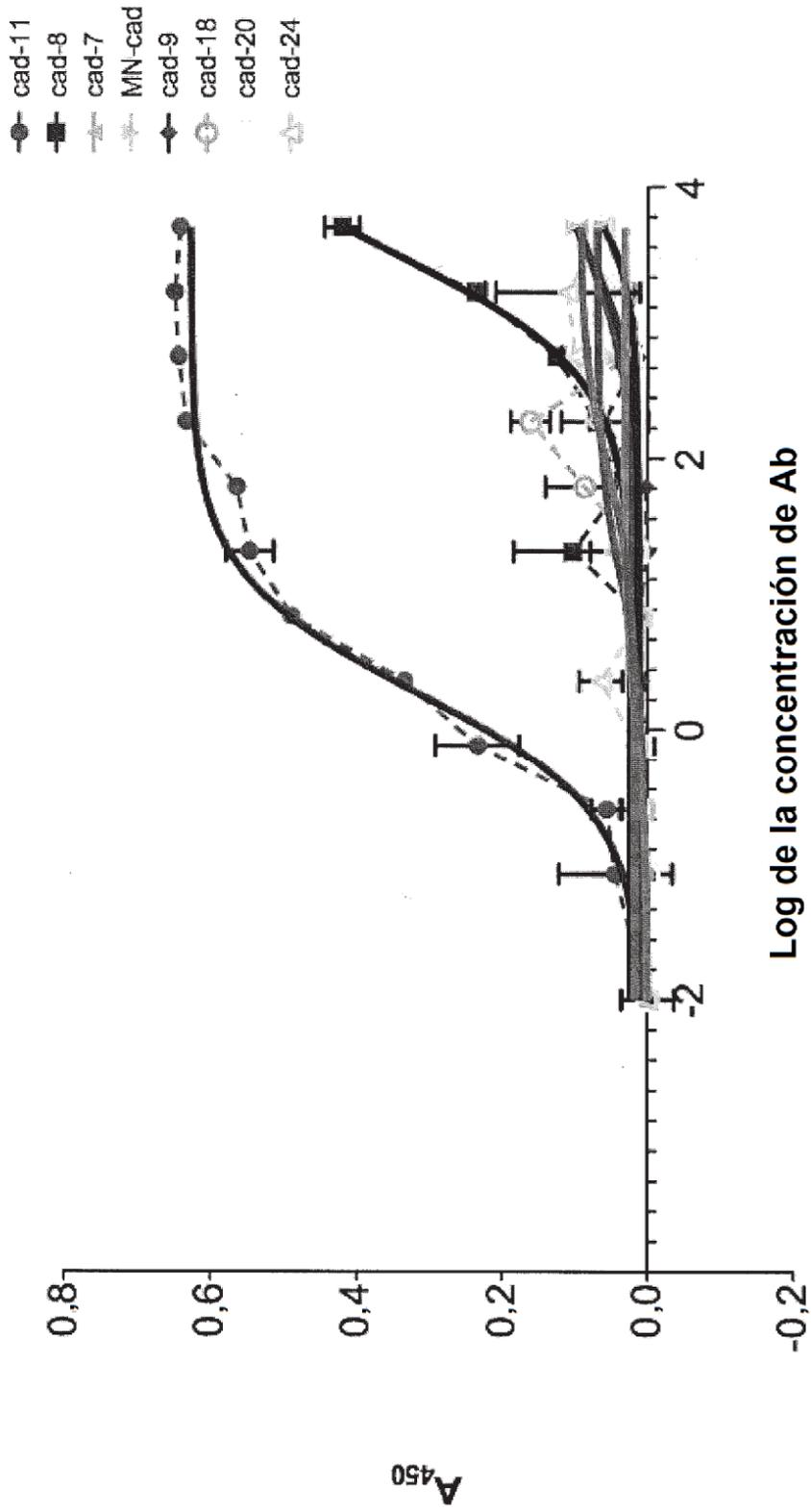
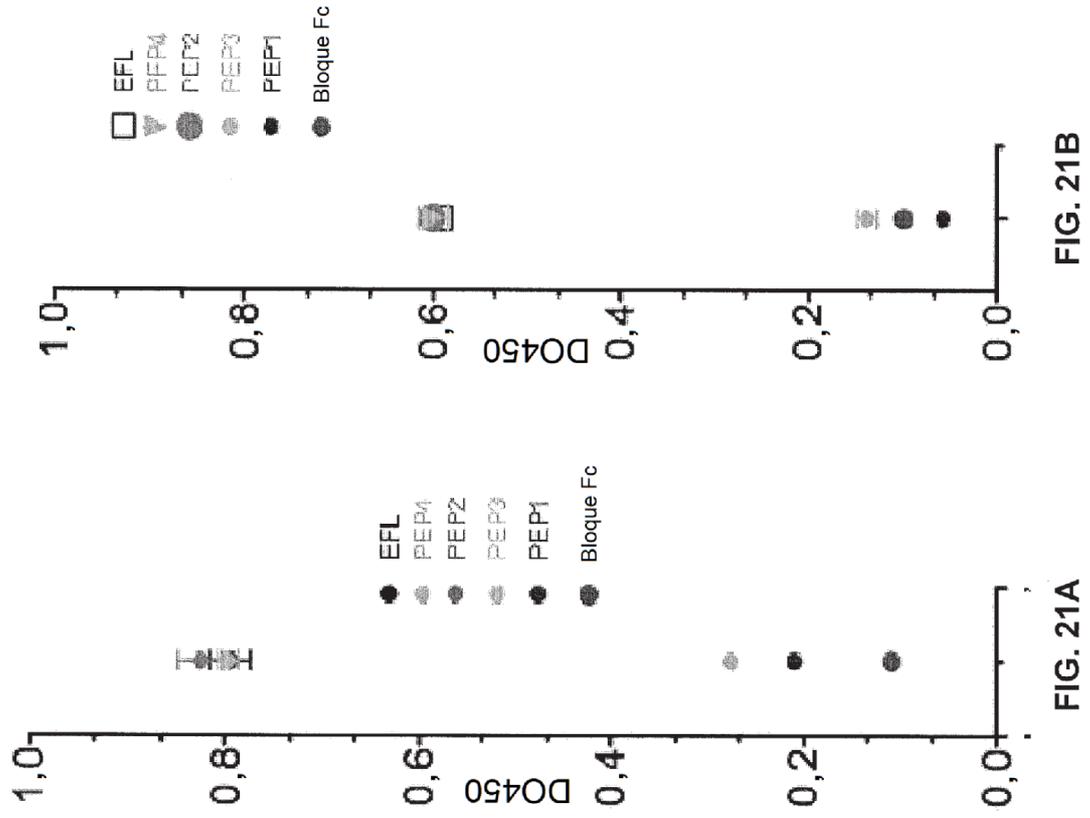


FIG. 20



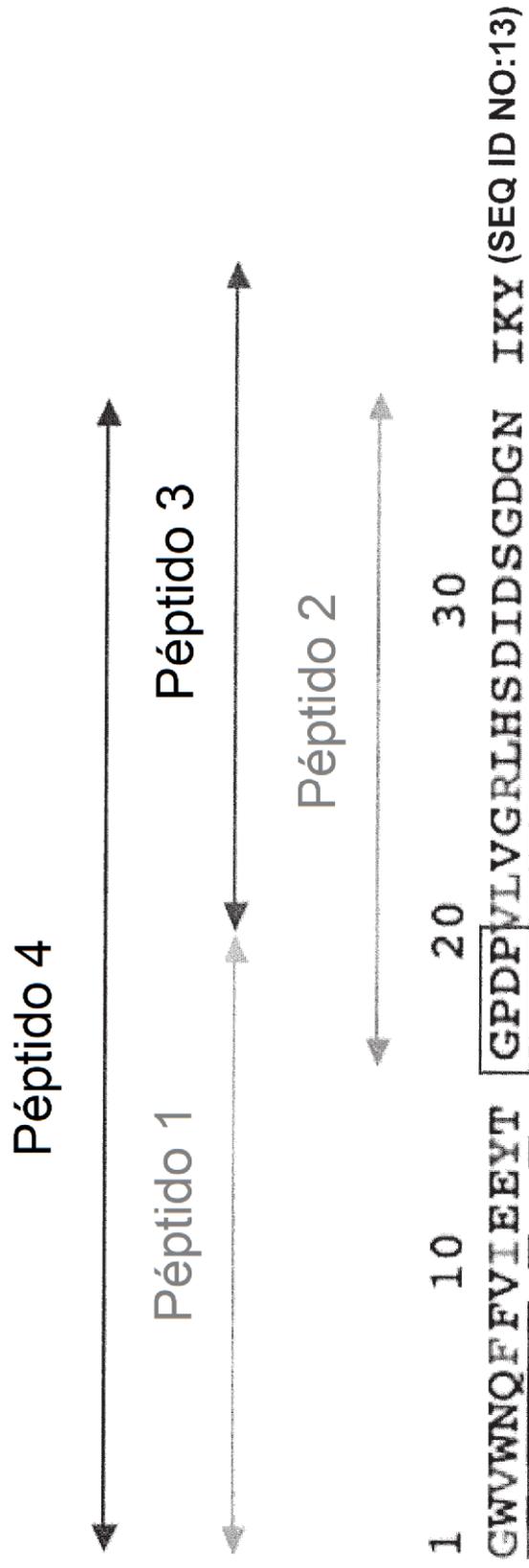


FIG. 22

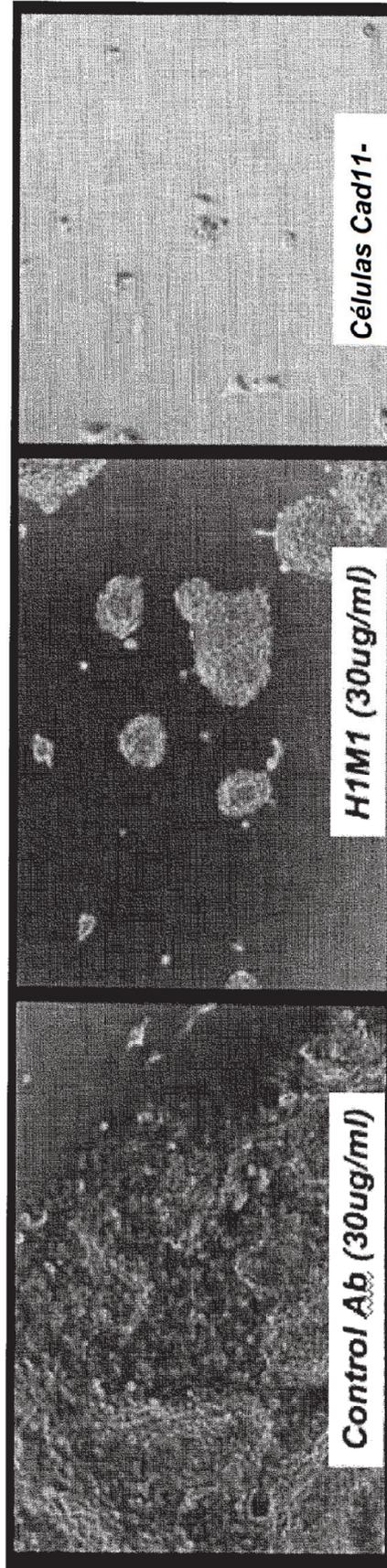
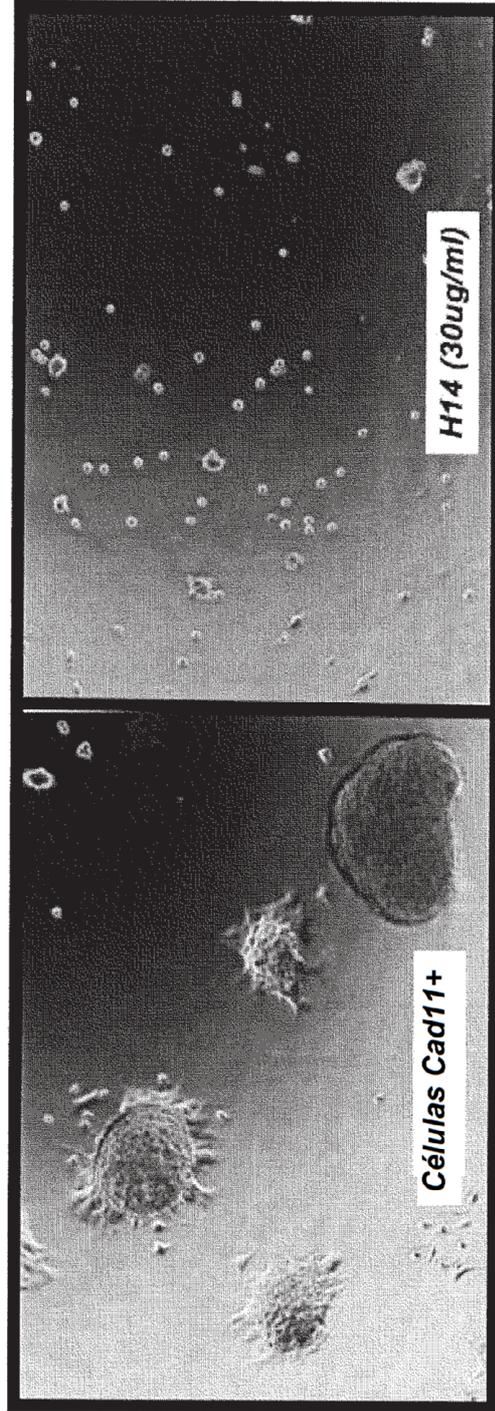


FIG. 23A

FIG. 23B

FIG. 23C

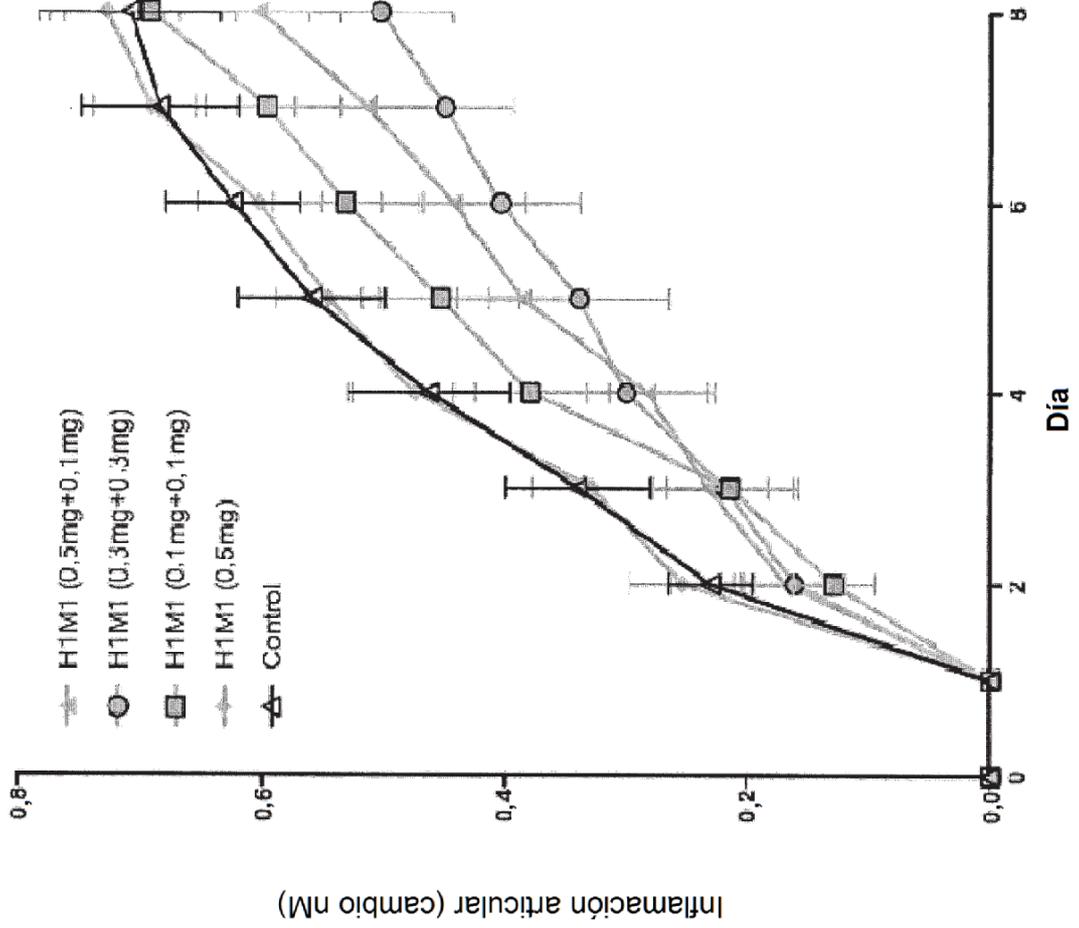


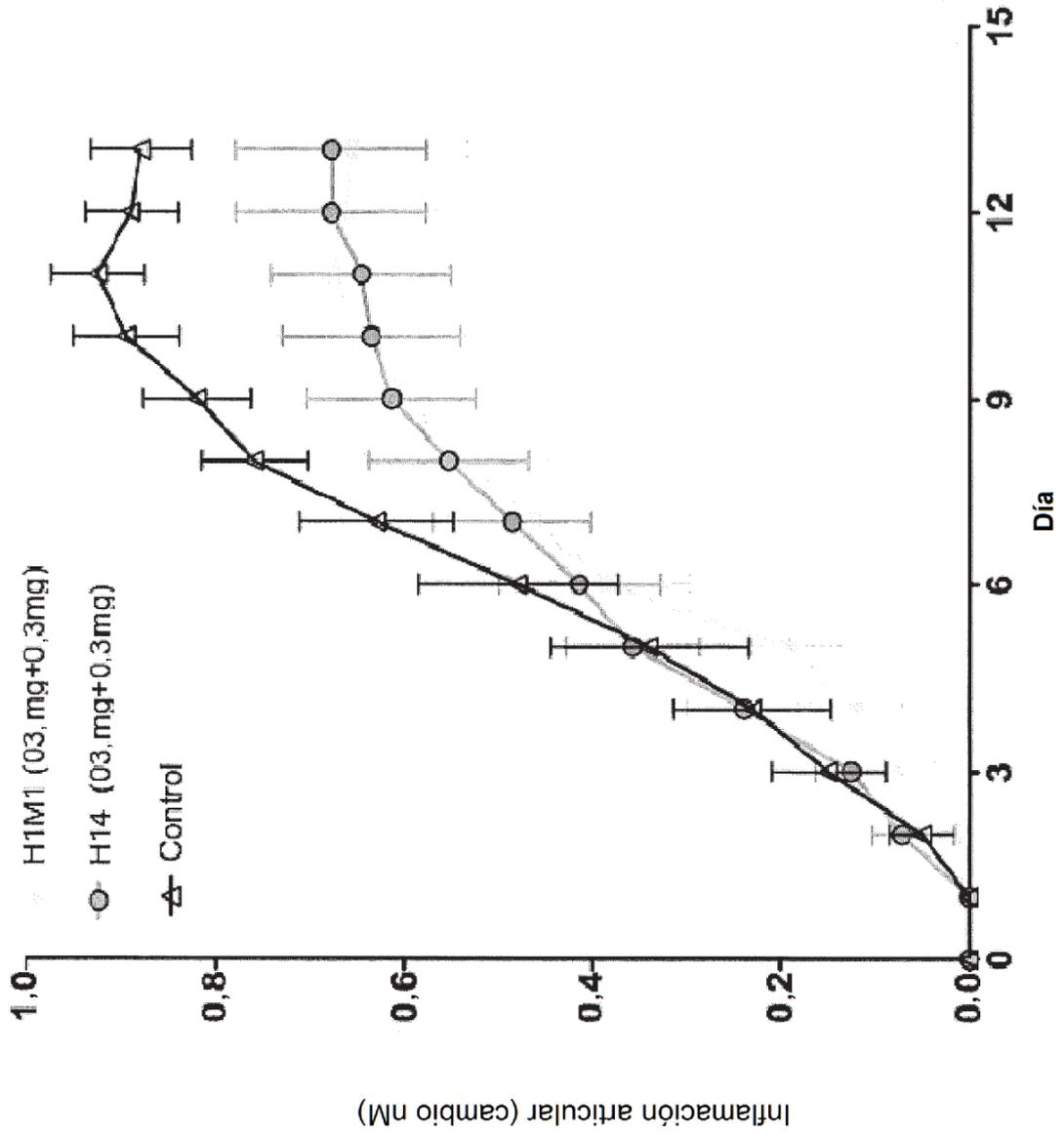
40X

FIG. 24A

FIG. 24B

FIG. 25





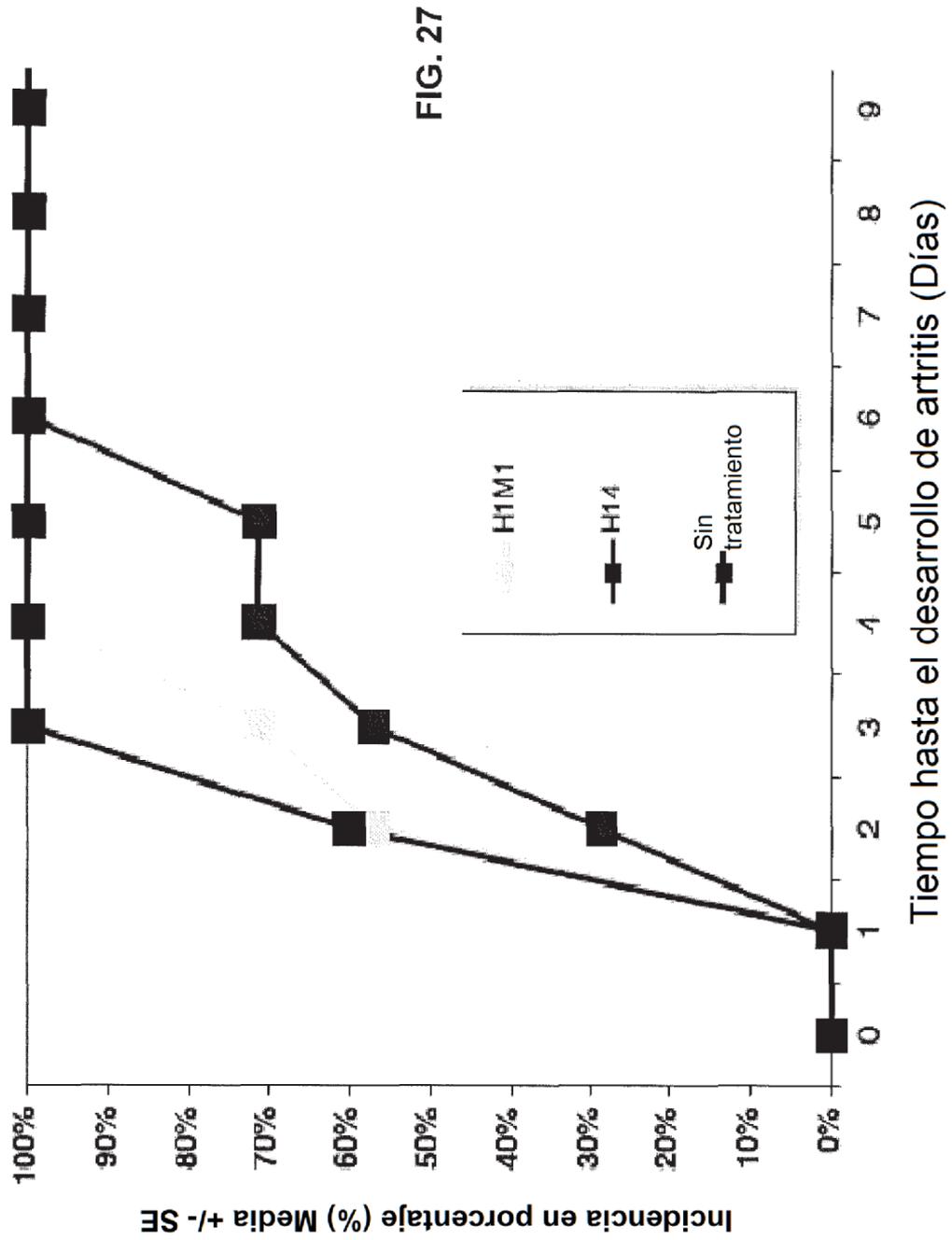
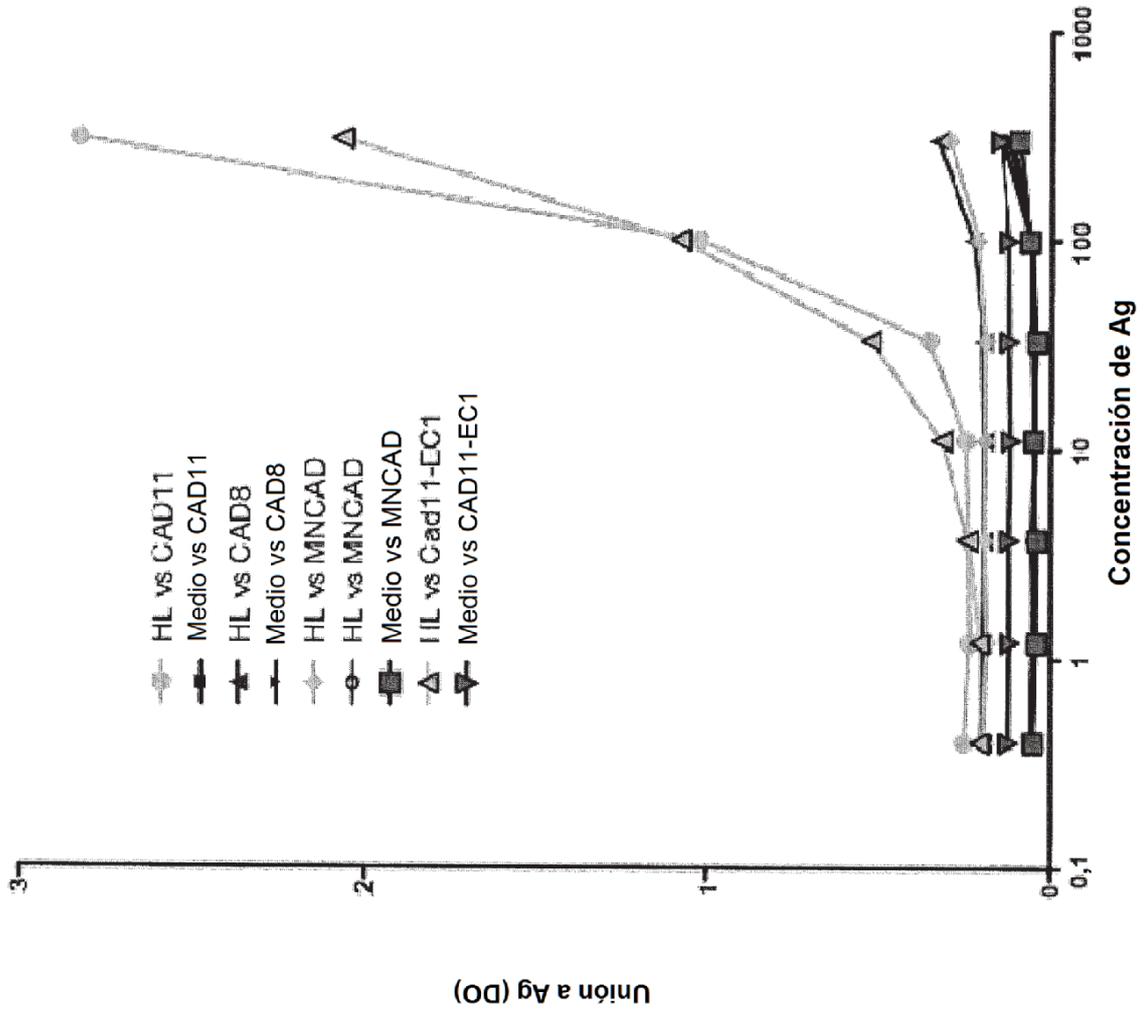


FIG. 28



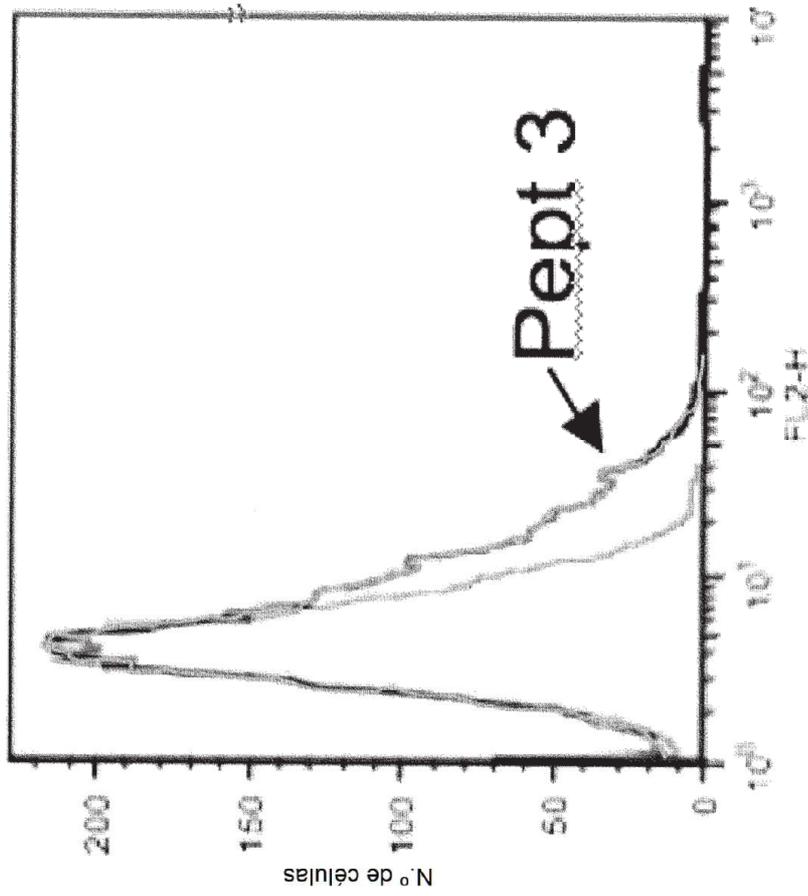


FIG. 29

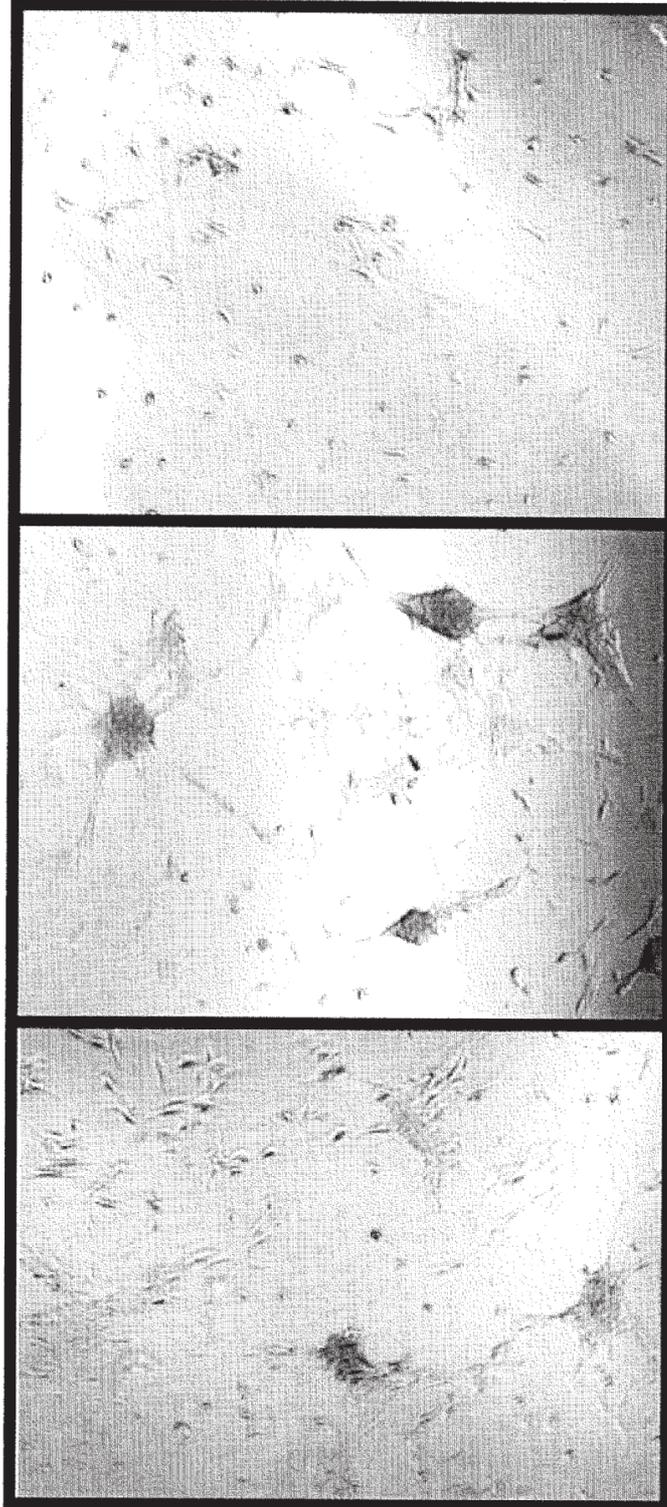


FIG. 30C

FIG. 30B

FIG. 30A

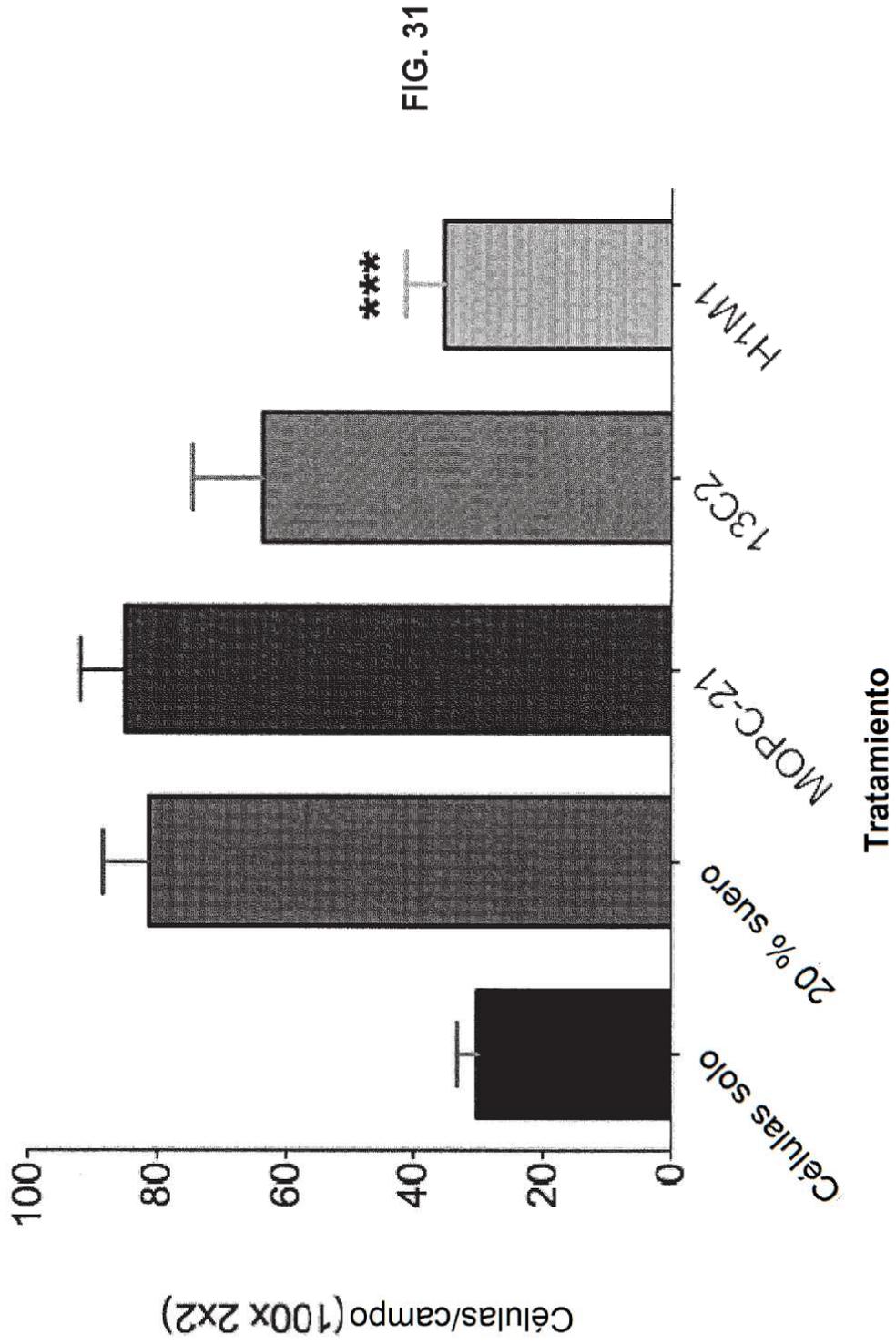
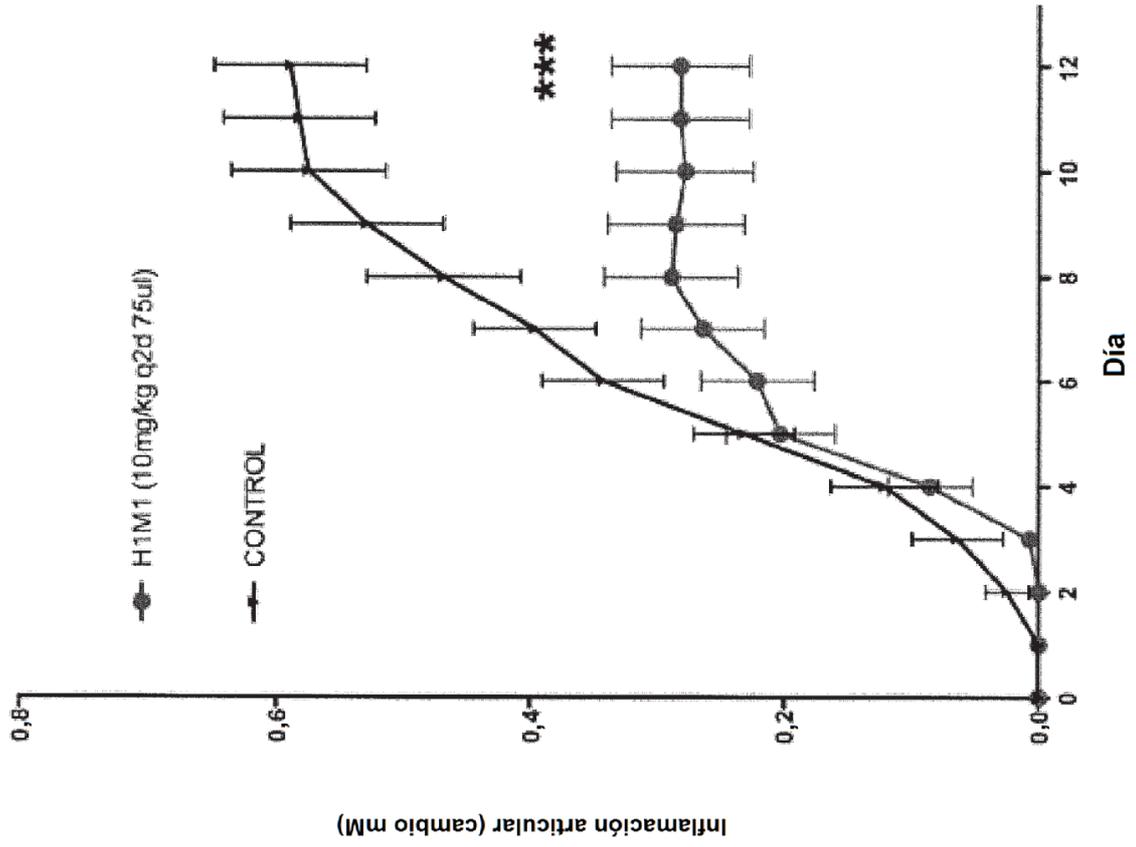


FIG. 32



```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGGTTCAAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCGGTTACTCATTTACTGGCTACTTTA
E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S C K A S G Y S F T G Y F
10      20      30
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
TGAAGTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCCTGAGTGGATTGGACGATTAATCCTTACACTGGGTGATACITTTCTACAAACCAGAAGTTCAGAGGGCAA
M N W V K Q S H G K S L E W I G R I N P Y T G D T F Y N Q K F K G K
40      50      60
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GGCCACATTGACTGTGACAAAATCCTCTAGCACAGCCCAATGGAGCTCCTGAGCCTGTCACTGAAAGACTCTGCAGTCTATTAATTGTGGACGACTCGGT
A T L T V D K S S S T A H M E L L S L S E D S A V Y Y C G R L G
70      80      82 82a b c
310     320     330     340     350
AGTAGGTAAGTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCAAGGTCACCCGTCCTC (SEQ ID NO:50)
S R Y W Y F D V W G A G T T V T V S S (SEQ ID NO:51)
100 a b 110

```

CDR1: GYFMN (SEQ ID NO:52)  
 CDR2: RINPYTGDTFYNQKFKG (SEQ ID NO:53)  
 CDR3: LGSRYWYFDV (SEQ ID NO:54)

FIG. 33

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GATGTTTGTGATGACCCCAAACCTCCACTCTCCCTGCTCCCTGCTGAGTCTTTGGAGATCAAGCCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCAATTATACATAGTAATG
D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S I I H S N
10
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GAAACACCTATTAGAAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGTCTCCTGATCTACAAAAGTTCCAAAGTTCCAAAGTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT
G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F
30      40      50      60
CACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTAACTGCTTTCAAAGTTCCACATGTTCCCT
T G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P
70      80      90
310     320     330
TGGACGTTTCGGTGGAGGCCAACCAAGCTGGAATCAAA (SEQ ID NO:55)
W T F G G T K L E I K (SEQ ID NO:56)
100      106 106a

```

CDR1: RSSQSIHSNGNTYLE (SEQ ID NO:57)  
CDR2: KVSNRFS (SEQ ID NO:58)  
CDR3: FQGSHVPWT (SEQ ID NO:59)

FIG. 34

Secuencias de la VH1 de la cadena pesada de anti-EC1 CAD11

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GAGGTTGAGCTGGTGGACCTGGAGCTGAGAGAGCCCTGGGGCTTCAGTCAAGATATCCCTGCAAGGCTTCGGTTACTCANTTACTGSSCTACTPITA
E V Q L V Q S G P E L K K P G A S V K I S C K A S G Y S F T G Y F
10
110    120    130    140    150    160    170    180    190    200
TGAACTGGGTGAAGCAGCCCAATGGACAGGGCCCTTCAGTGGATGGATGGATTCCTTACACCTGGGIGATACCTTTCIACACACCCAGAGATTCGAAGGGCAG
M N W V Z Q A H C Q G L E W I G R I N P Y T C D T F Y N Q K F K C R
40
210    220    230    240    250    260    270    280    290    300
EGCCACATTTGACTGTTGACAAATCCCTTACACACAGCCCTACATGGAGCTCGTGGAGCCCTGCAATCTGGAGACTCTGSCAGTCTATATTATGTGGACGACTGGGI
A T L T V D K S S S T A Y K E L V S L S E D S A V Y C G R L G
70
310    320    330    340    350
ASTAGGTACTGGTACTTCGATGTTGGGECACGGGGACCCACGGTCAACCGTCTCTCA (SEQ ID NO:60)
S R Y W Y F D V W G Q G T T V T V S S (SEQ ID NO:61)
100 a b 110

```

Las definiciones de las CDR y la numeración de la secuencia proteica conforme a Kabat. Las secuencias de nucleótidos y proteicas de las CDR están resaltadas en rojo

FIG. 35A



Secuencias de la VH3 de la cadena pesada de anti-EC1 CAD11

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GARGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGACCGAGGTTGAGAAAGCCCTGGGGCTTCAGATGAGAAATACCTGTCGCAAGAGCTTCGTTACGATTTACTGGGCGAATTTA
E V Q L Y Q S G A E V K K P G A S V K I S C K A S G Y S F T G Y F
10
110    120    130    140    150    160    170    180    190    200
TGMNCTGGGTGAGGCGCCCTGGACAGGSCCTTGGAGTGGATGGACGGAATTAATCCCTTACACTGSGTGAATCTTCTTACAAACCCAGAGATTCMAAGGCGCAG
M N W W R Q A F G Q G L E W L G K L A F Y Z V G D V S Y M Q K F K G R
40
210    220    230    240    250    260    270    280    290    300
GGCCACATTCAGCTGTTGACAAATCCACAGCAGCCATACATGGAGCTTCTCCAGCCTGAGATCTGAGACACCCGACGTCGATTAATTTGTGGACGACTCGGT
A T L Z V D K S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y C G R L G
70
310    320    330    340    350
AGTAAAGTACTGGTGGTACTTTCGATGATGTTGGCCAGAGGACCCAGGCTCACCCTGCTCTGCTGCA (SEQ ID NO:64)
S R Y W Y E D V W G Q G T T V T V S S (SEQ ID NO:65)
100 a b
110

```

FIG. 35C



Secuencias de la VH5 de la cadena pesada de anti-EC1 CAD11

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GARGTTCAGCTTGGTGGCAGTCTTGGAGCCGACAGGTTGAAAGAGCCCTGRRRRTTCARGTGAAAGCCCTGCTGGCTTACTTCATTTACTGTCGCTACTTTA
E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y S F T G Y F
10
110    120    130    140    150    160    170    180    190    200
TSMACTGGGTGAGGCAGGCCCTTGGACAGGGCCCTTGGAGTGGATTGGACGTAATTAACTCCCTTACACTGGTCACTTTCTACAAACCCAGAGCTTCCAGGGCCAG
M N W V R Q A P G Q G L E W I G R I N P Y I G D F Y N Q K F K G R
40
210    220    230    240    250    260    270    280    290    300
GGTGGACAATCACTGTGACAAATCCACAGLADAGCCCTACATGGAGCTCCUAGCCCTGGAGATCTGAAAGACAAUUGCCAGTCTCATTTATTTGGAGAGACTGGGT
V T I T V D K S T S T A Y M E L S S L R S E D T A W Y Y C G R L G
70
310    320    330    340    350
ASTAGGTACTGGTACTTCGATGTCTTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCCGTCCTCTCA (SEQ ID NO:68)
S R Y W Y F D V W G Q G T T V T V S S (SEQ ID NO:69)
100 a b
110

```

FIG. 35E



Secuencias de la VK2 de la cadena ligera de anti-EC1 CAD11

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
CATGTTTGAAGACCCAACTCCACACTCCCTCCCTGCGCCCTTGGACAGCCAGCCCTCCACTCTCTCCAGATCTAAGTCCAGAGCAATATACATAGTAAATG
D V L M I Q T P L S S P V T L G Q P A S I S C R S S Q S I I H S N
10
110    120    130    140    150    160    170    180    190    200
GAAACACCTAATTTAGAAATGGTACCTGCGAGAAACCCAGGCGCCAGTCTCCACAGCTCCCTGATCTACAAAGTTCGAAACCCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT
G N T Y L L E W Y L Q K P G Q S F Q L L I Y A V S N K F S G V F D R F
30      40      50      60
CAGCGGCACTGGATCAGGGACAGAAATTCACACTCAAGATCAGGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGCTTTATTAAGTCTTTCAGAGTTCAGAAATGCTT
S G S G S G T D F T L K I S K V E A E D V G V Y Y C F W G S H V F
70      80      90
TGGACGTTCCGGTCAGGGCACCCAGCTGGAATCGAA (SEQ ID NO:72)
W T F G Q G T K L E I K (SEQ ID NO:73)
100      106 a

```

FIG. 35G

Secuencias de la VK3 de la cadena ligera de anti-EC1 CAD11

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GATGTTGTAIGAGCCAAACIUACATCTCCUCCUCCIGTCACAUUUTGGACAGUUCAGCCICCATCTTCACAGATCTIAGICAGAAUATTAACAAAGATTAAG
D V V M T Q T P L S S P V T L G Q P A S I S C R S S Q S I I H S N
10
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
GAAACAGCTAATTTASAAATGGTAUUTGGACGMAAUCAGGCCAGTCTCCACAGCTTCTGATCTACAAAAGTTICLAAUUGGATTTTTGGGCTCCAGACAGGFTT
G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F S G V P D R F
30      40      50      60      70      80      90
CAGCGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGGAGGATGGTGGAGTTTATTACTGCTTTCAGGTTCCACATGTTCTT
S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F Q G S H V E
70      80      90
310     320     330
IGGACGTTCCGGTCAGGGCACCCAGCCAGCIGGEMATCMAA (SEQ ID NO:74)
W T F G Q G T K L E I K (SEQ ID NO:75)
100     106 a

```

FIG. 35H

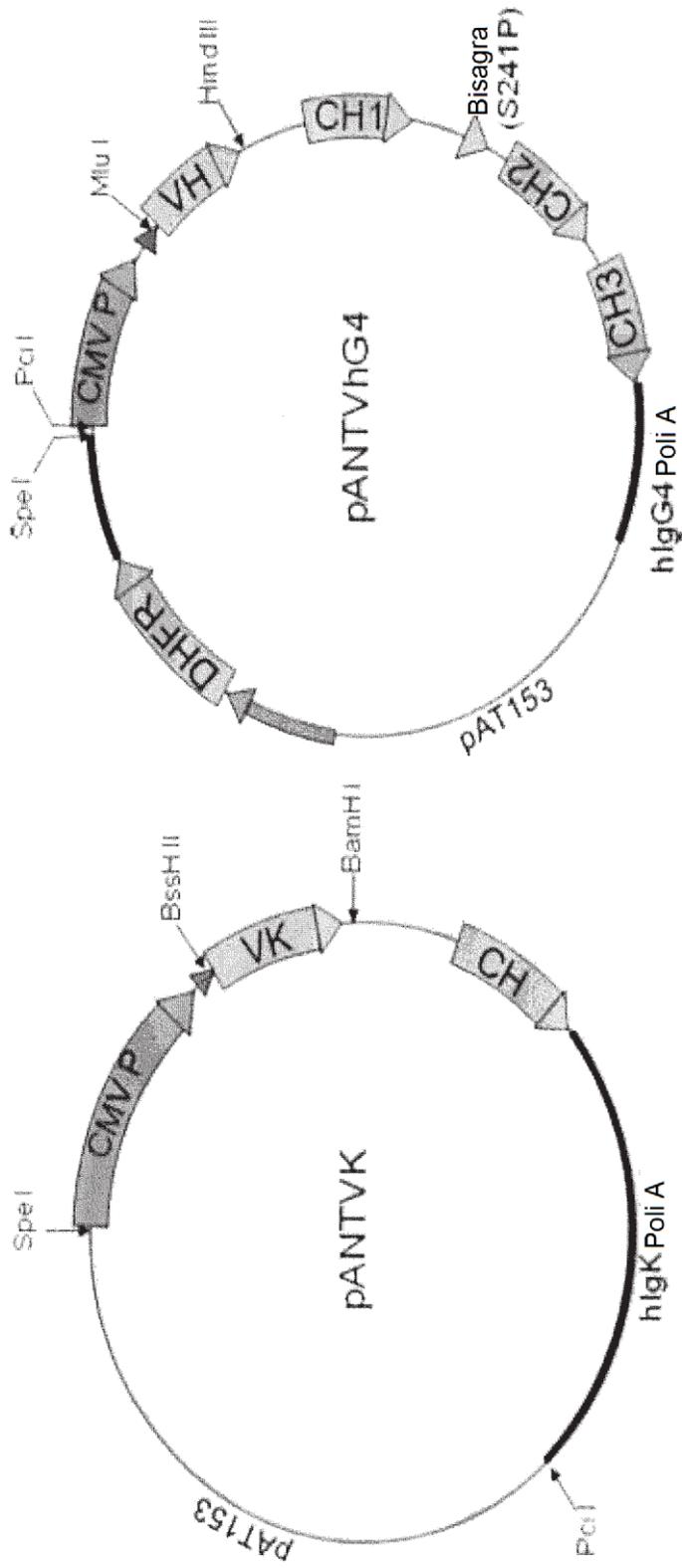


FIG. 36

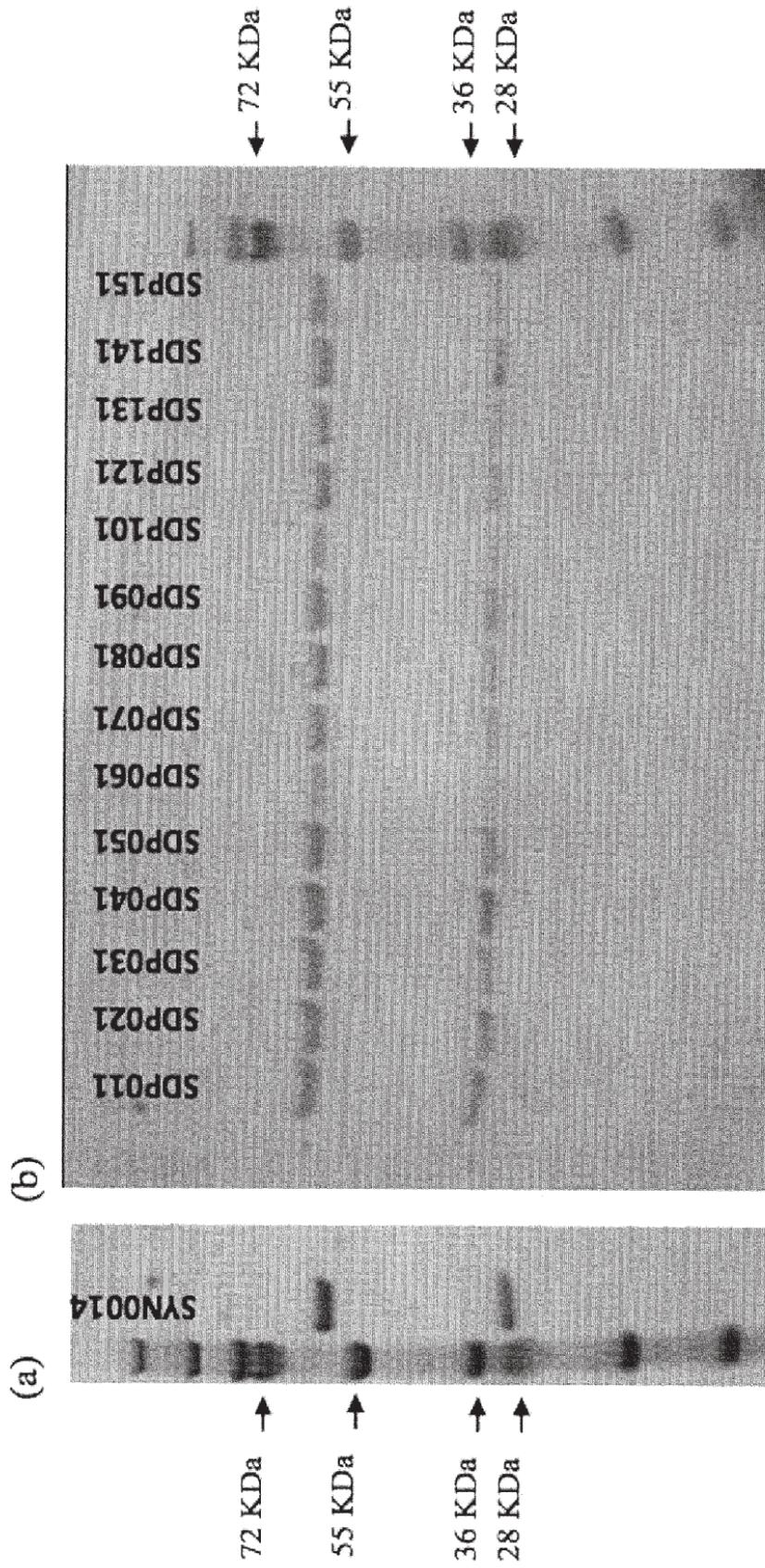


FIG. 37

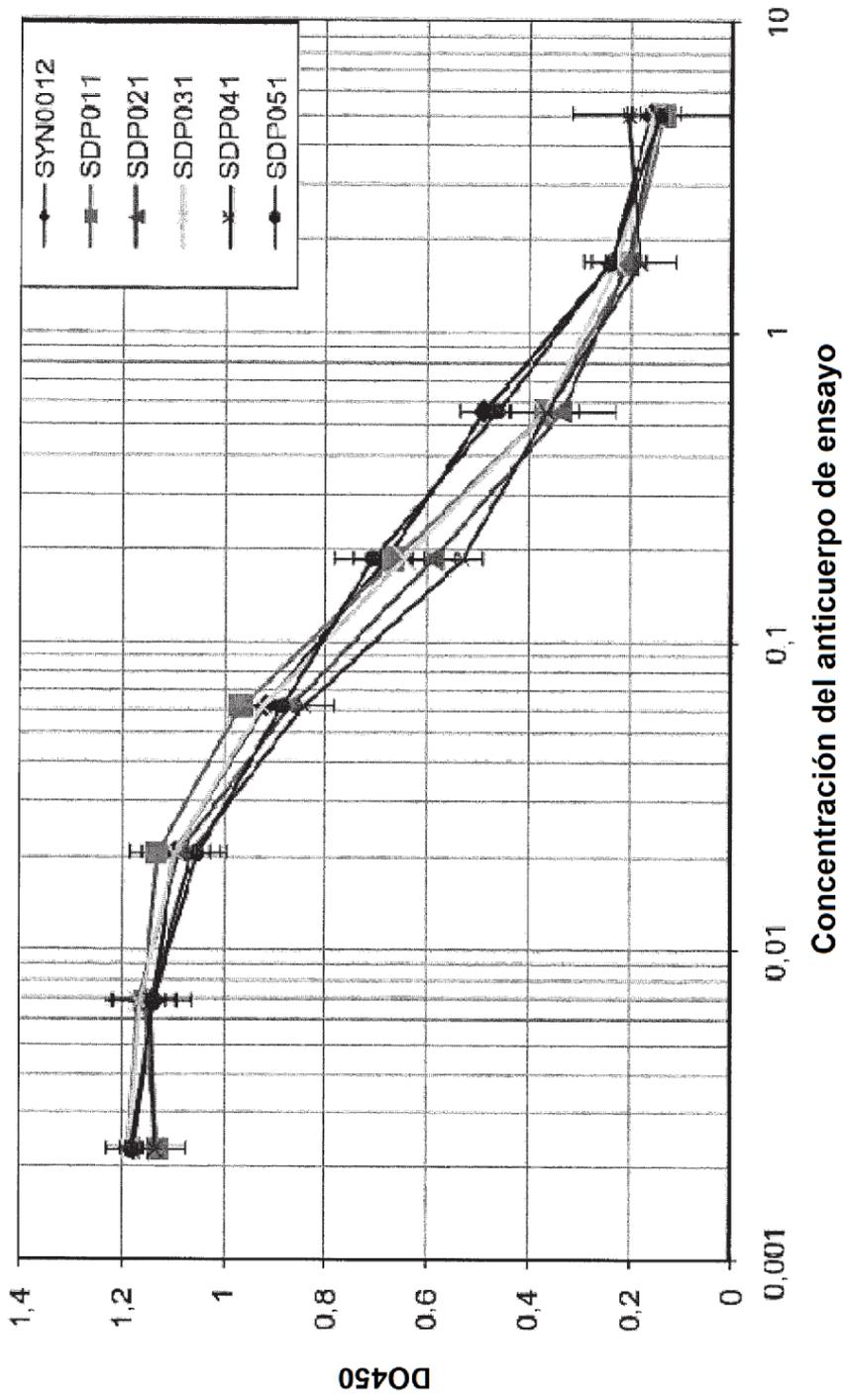


FIG. 38A

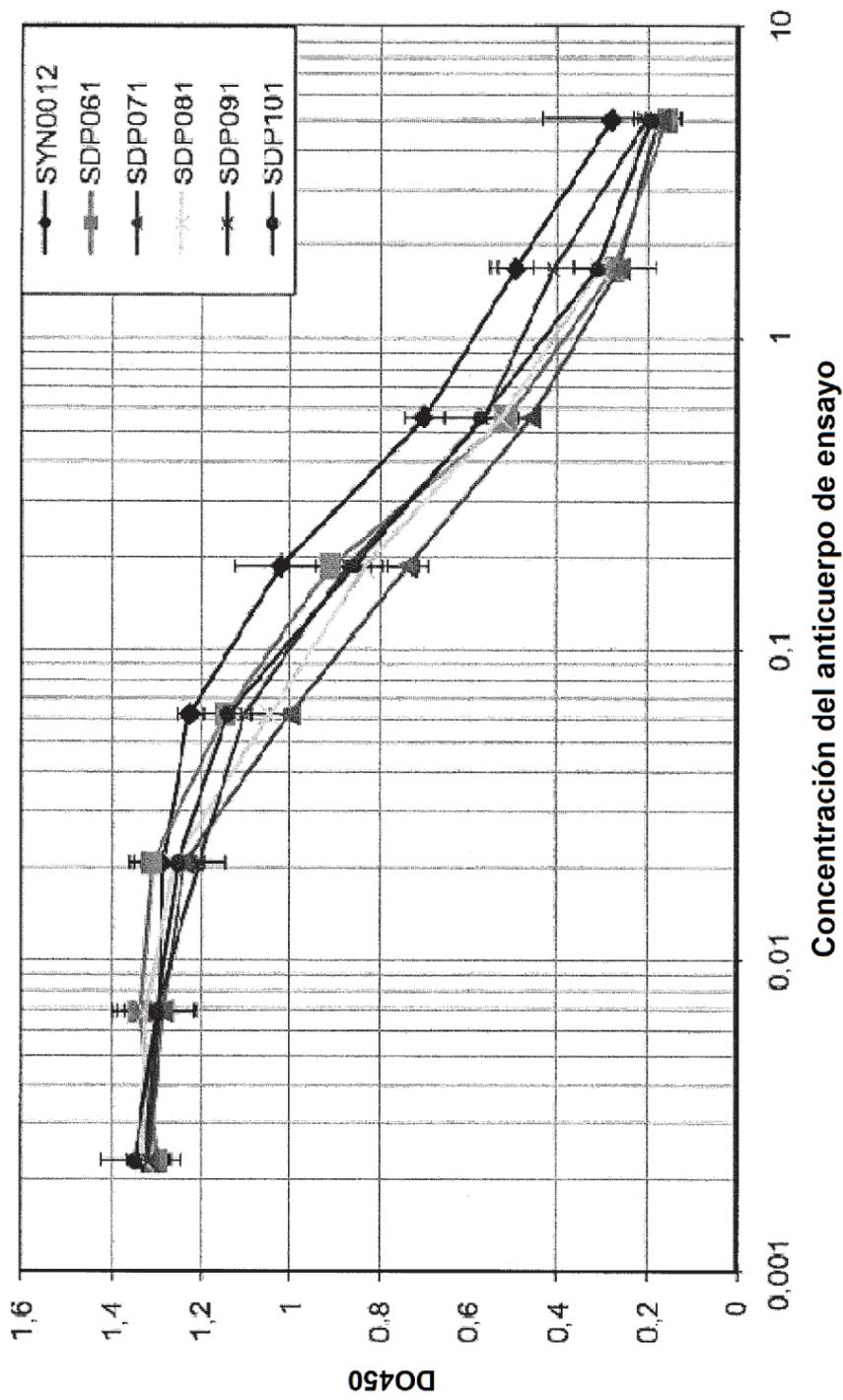


FIG. 38B

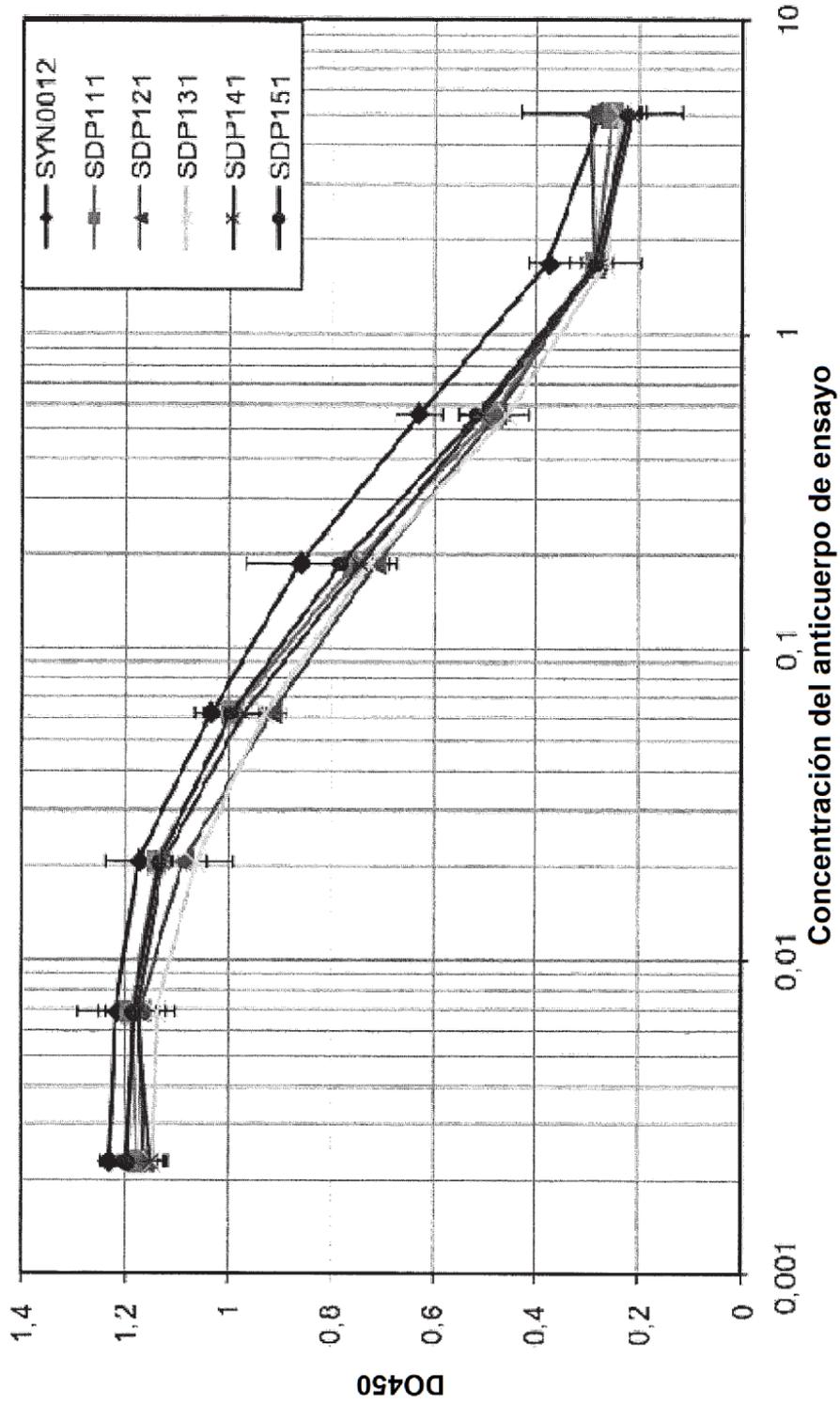


FIG. 38C

# ELISA de especificidad 10/28/09: SDP 011

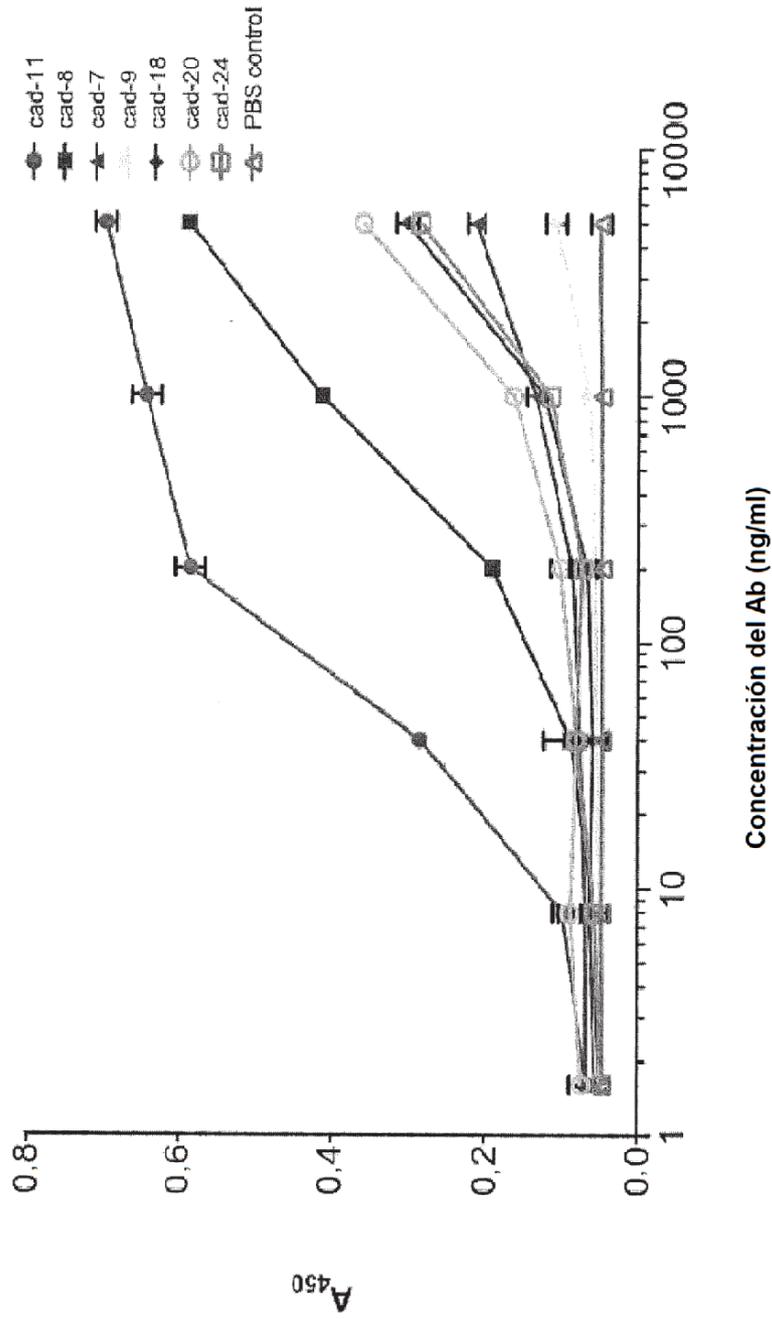


FIG. 39A

# ELISA de especificidad 10/28/09: SDP 021

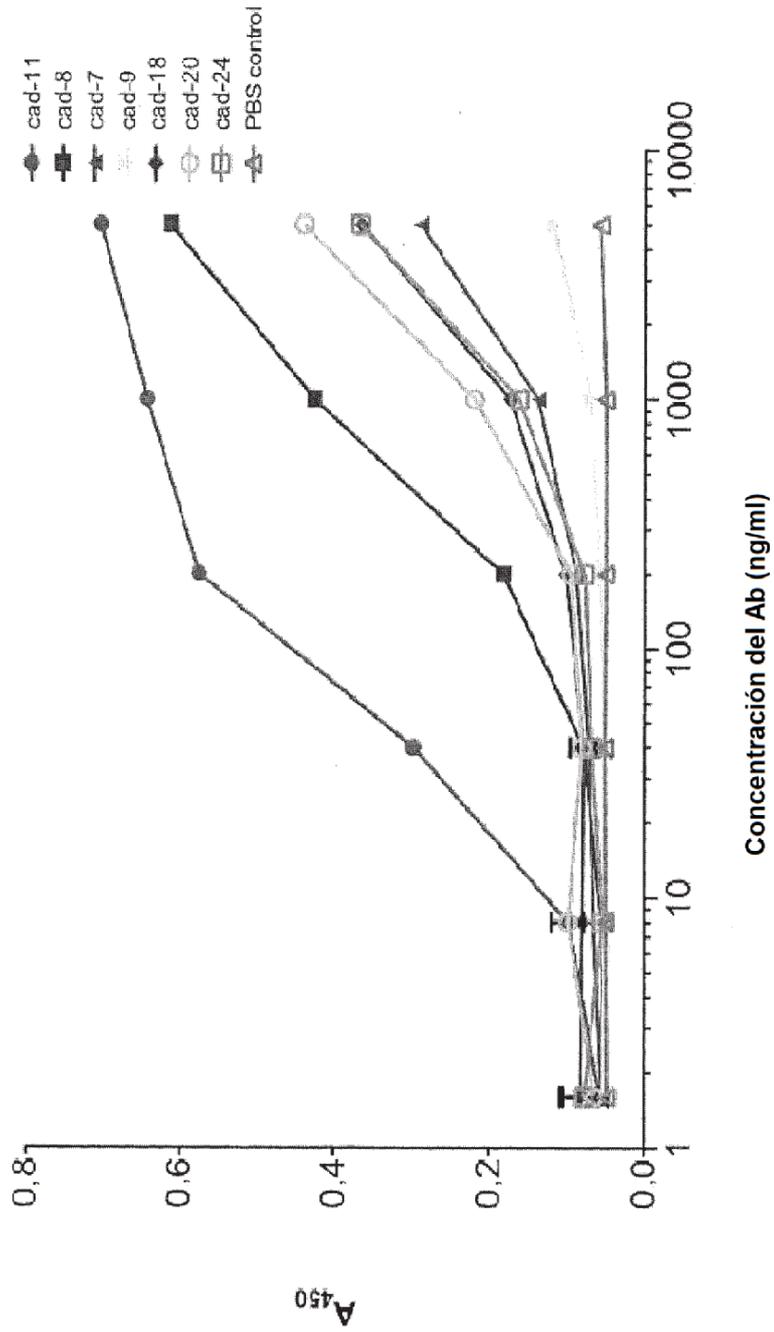


FIG. 39B

# ELISA de especificidad 10/28/09: SDP 031

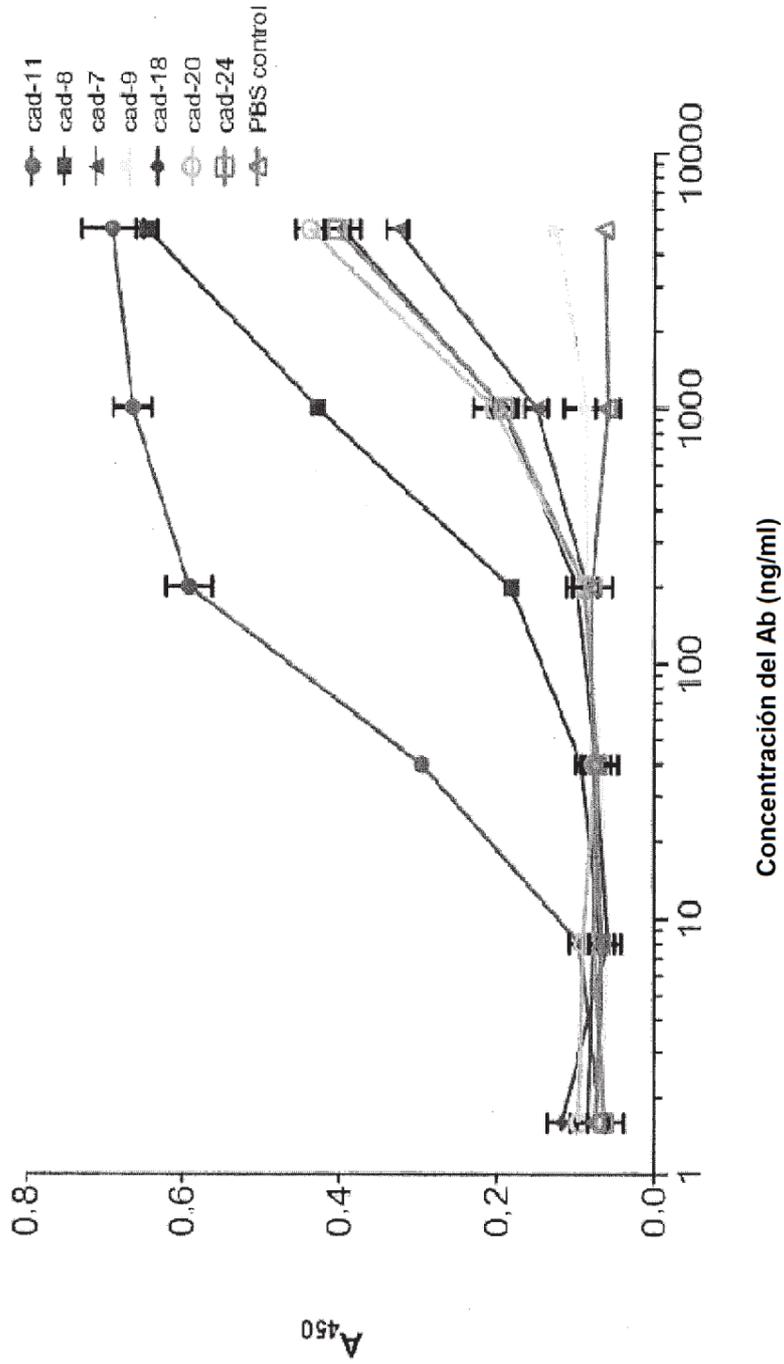


FIG. 39C

# ELISA de especificidad 10/28/09: SDP 041

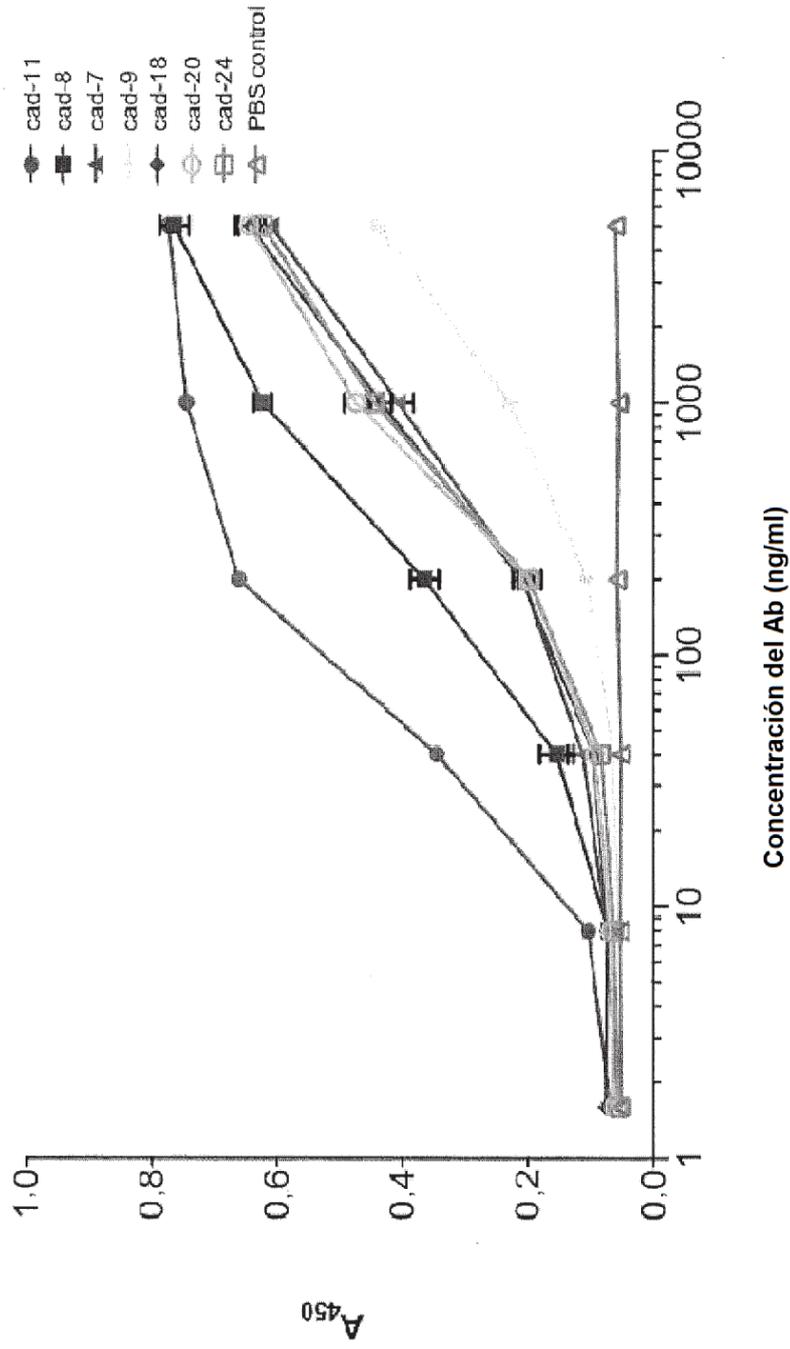


FIG. 39D

# ELISA de especificidad 10/28/09: SDP 051

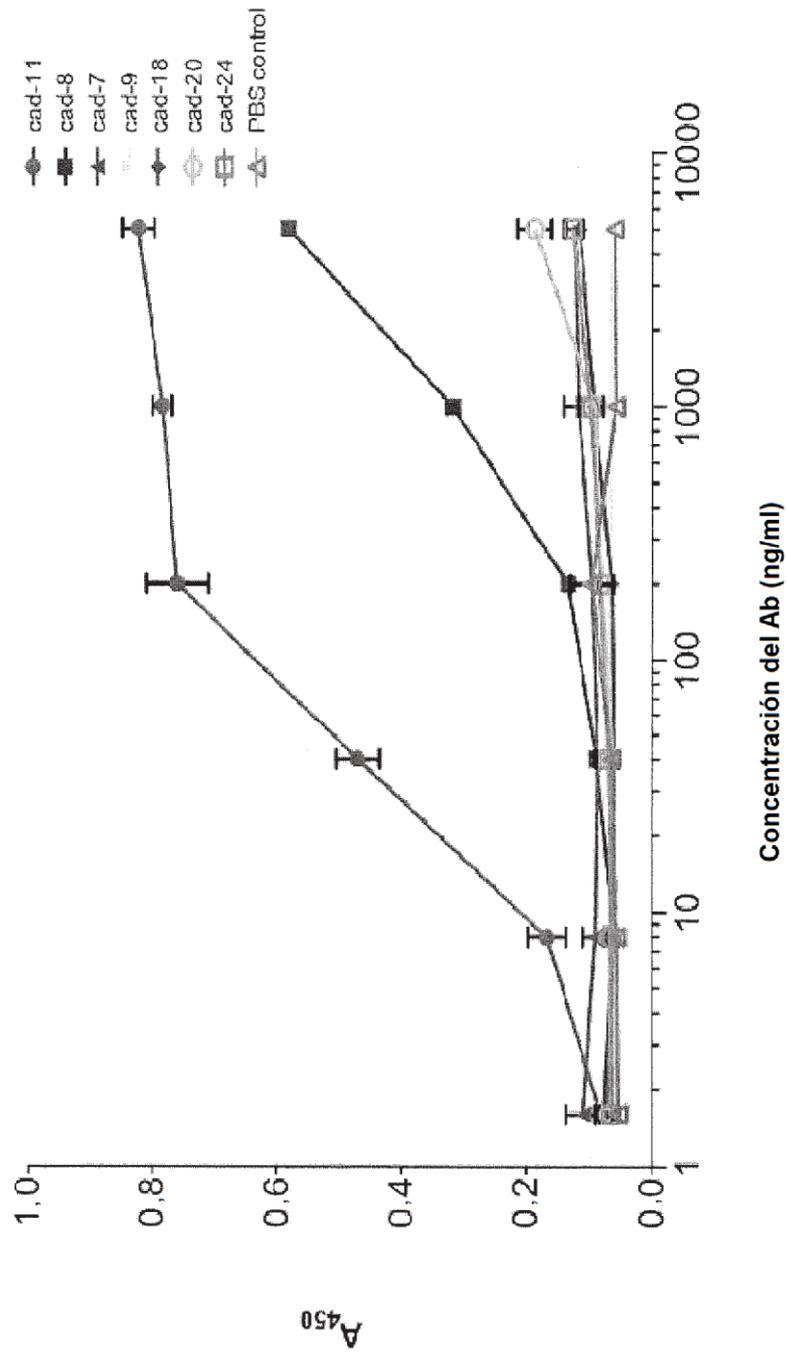


FIG. 39E

# ELISA de especificidad 10/29/09: SDP 061

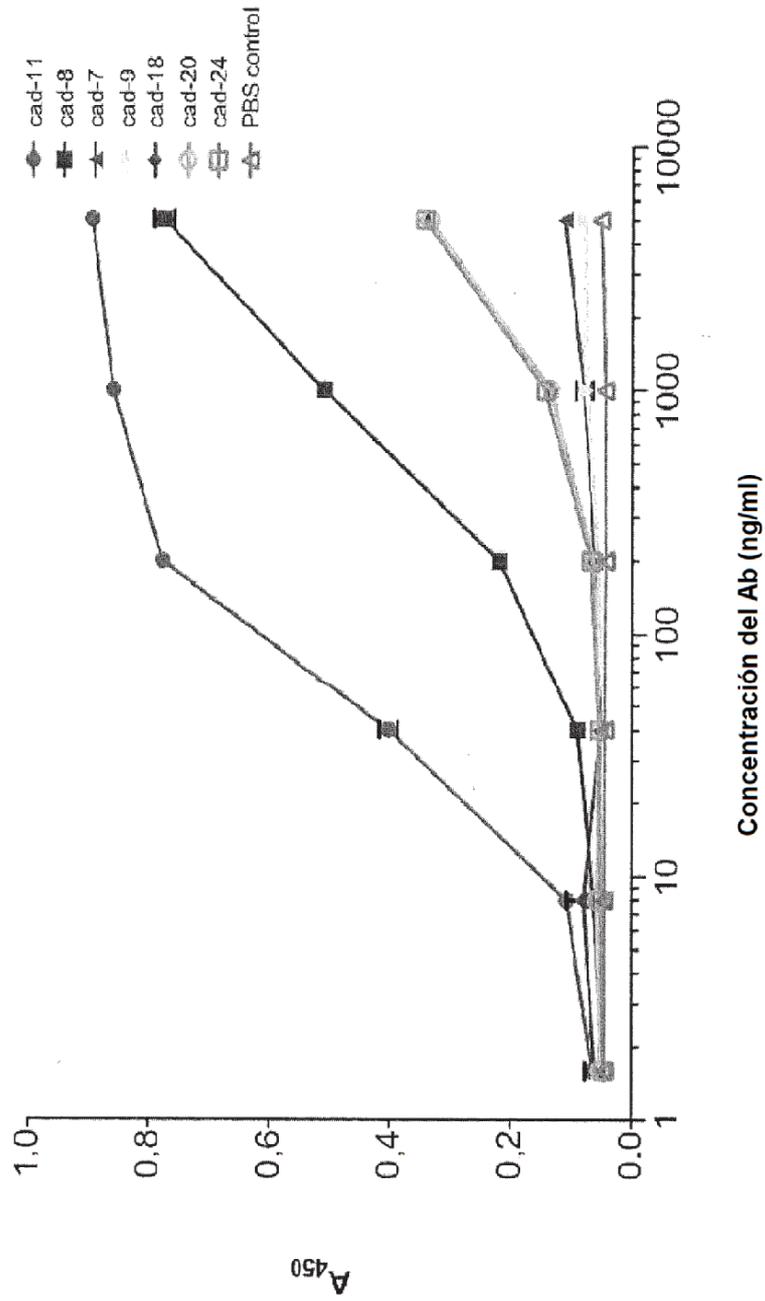


FIG. 39F

# ELISA de especificidad 10/29/09: SDP 071

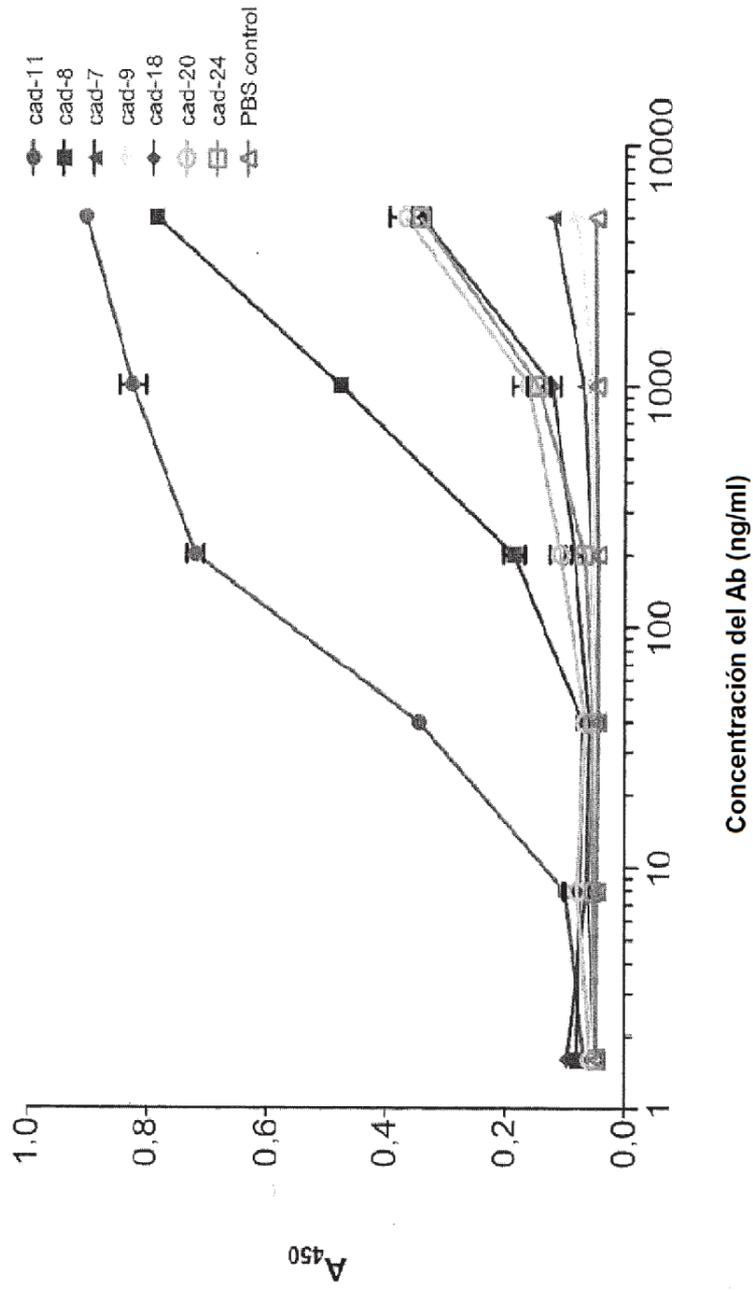


FIG. 39G

# ELISA de especificidad 10/29/09: SDP 081

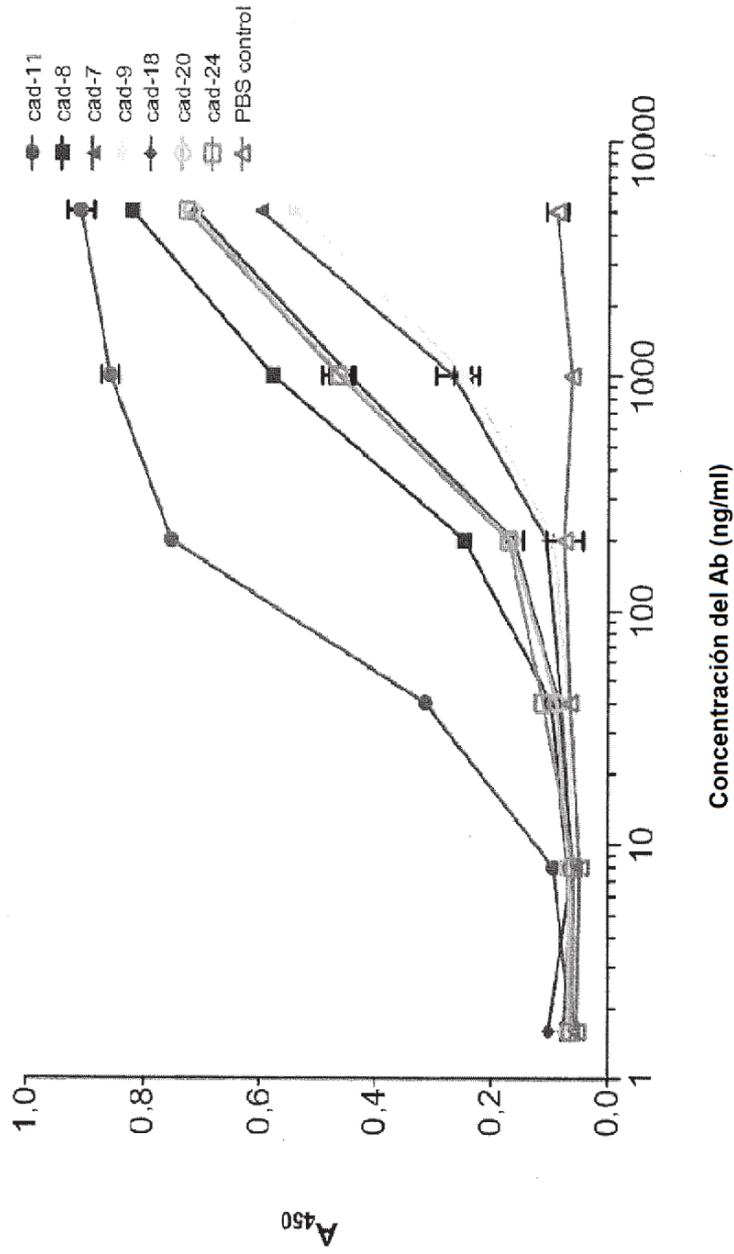


FIG. 39H

# ELISA de especificidad 10/29/09: SDP 091

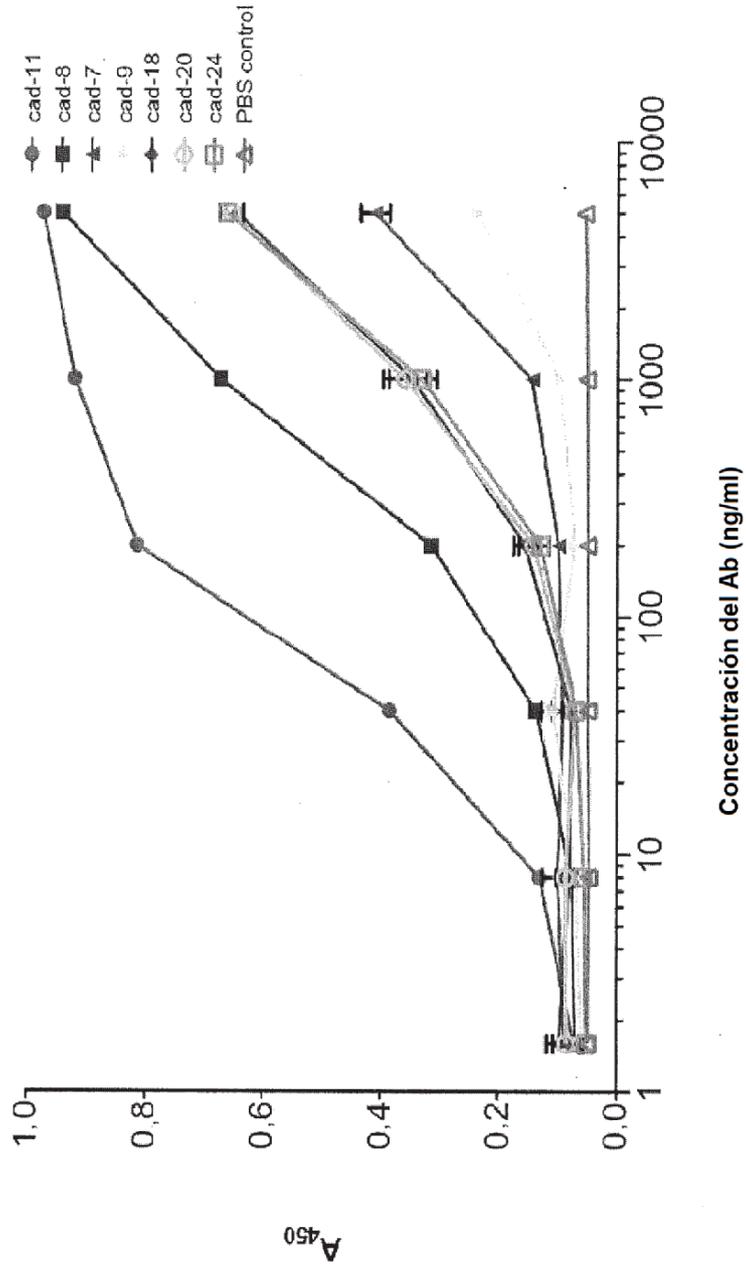


FIG. 39I

# ELISA de especificidad 10/29/09: SDP 101

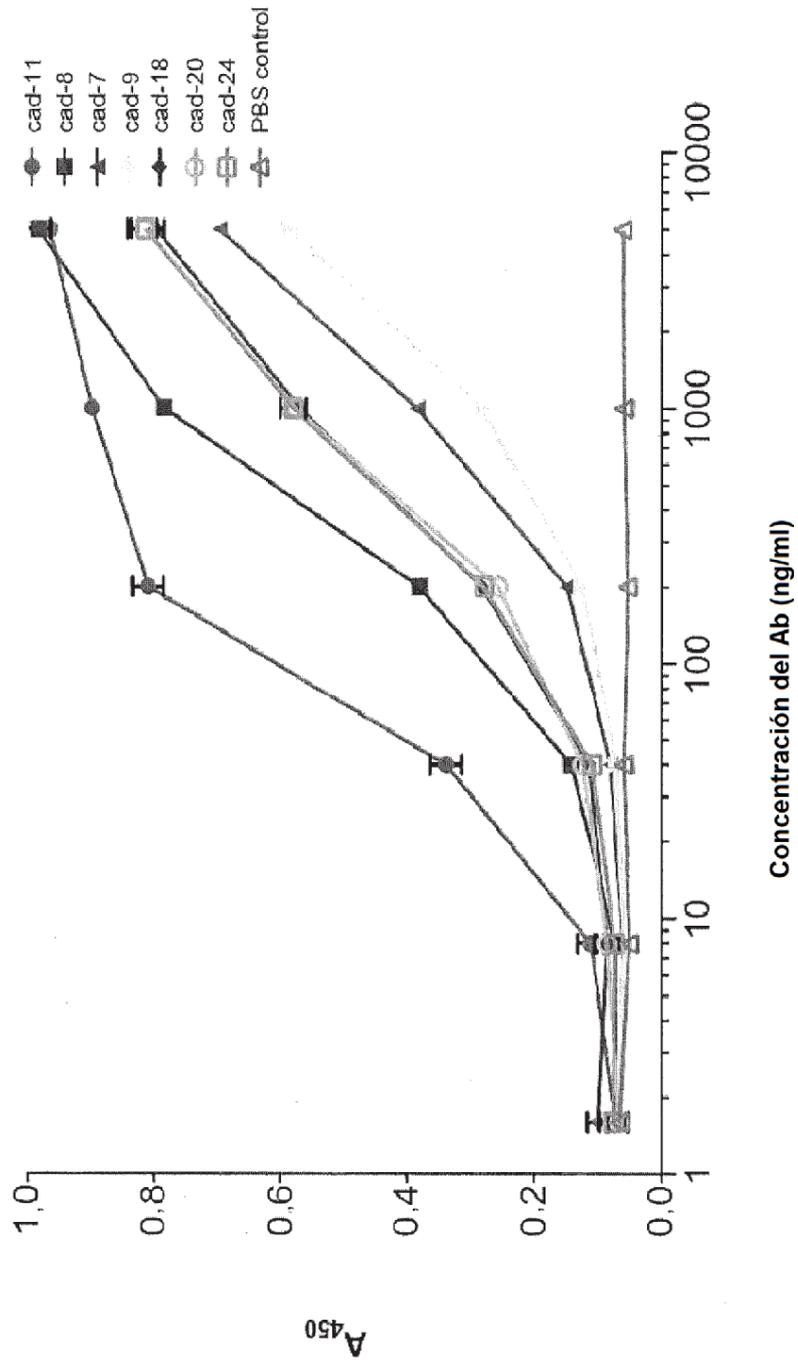


FIG. 39J

# ELISA de especificidad 10/30/09: SDP 111

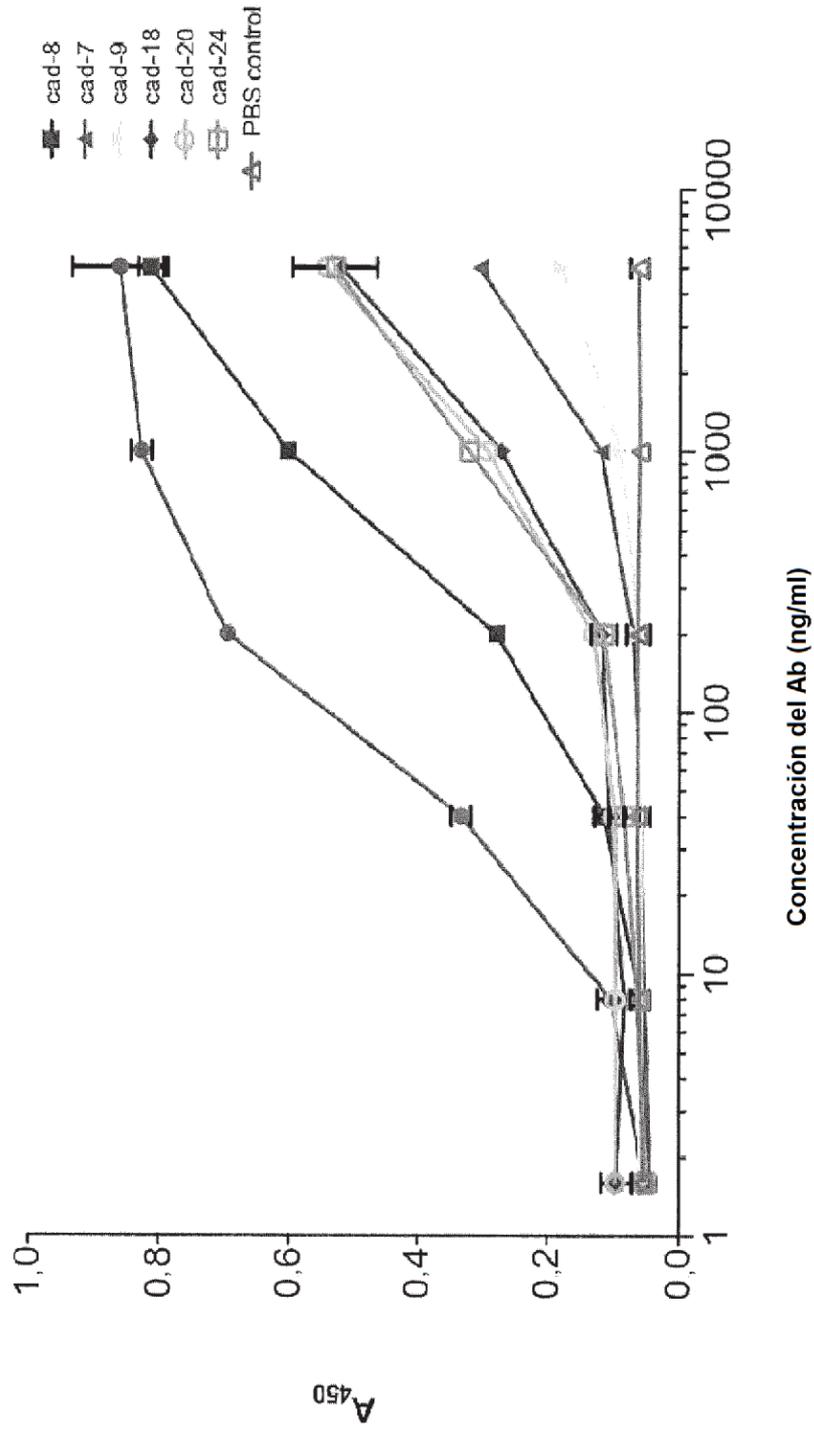


FIG. 39K

# ELISA de especificidad 10/30/09: SDP 121

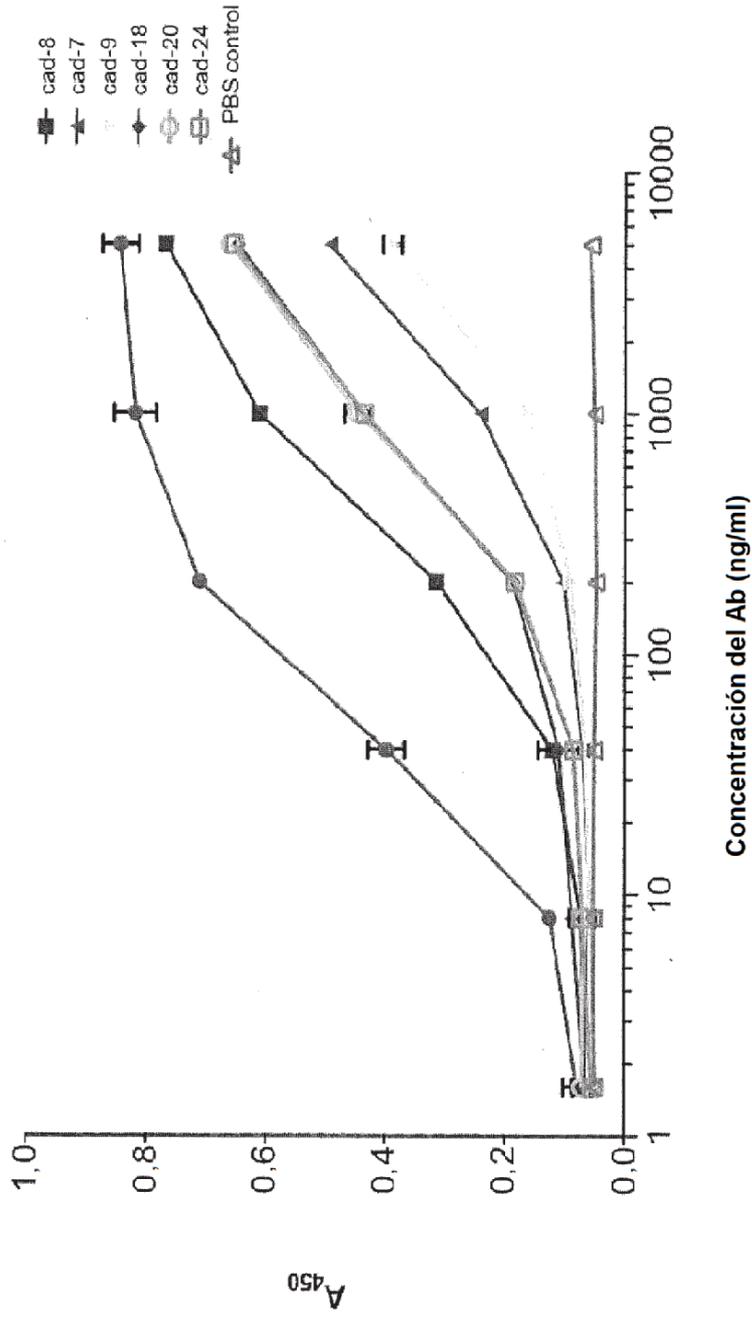


FIG. 39L

# ELISA de especificidad 10/30/09: SDP 131

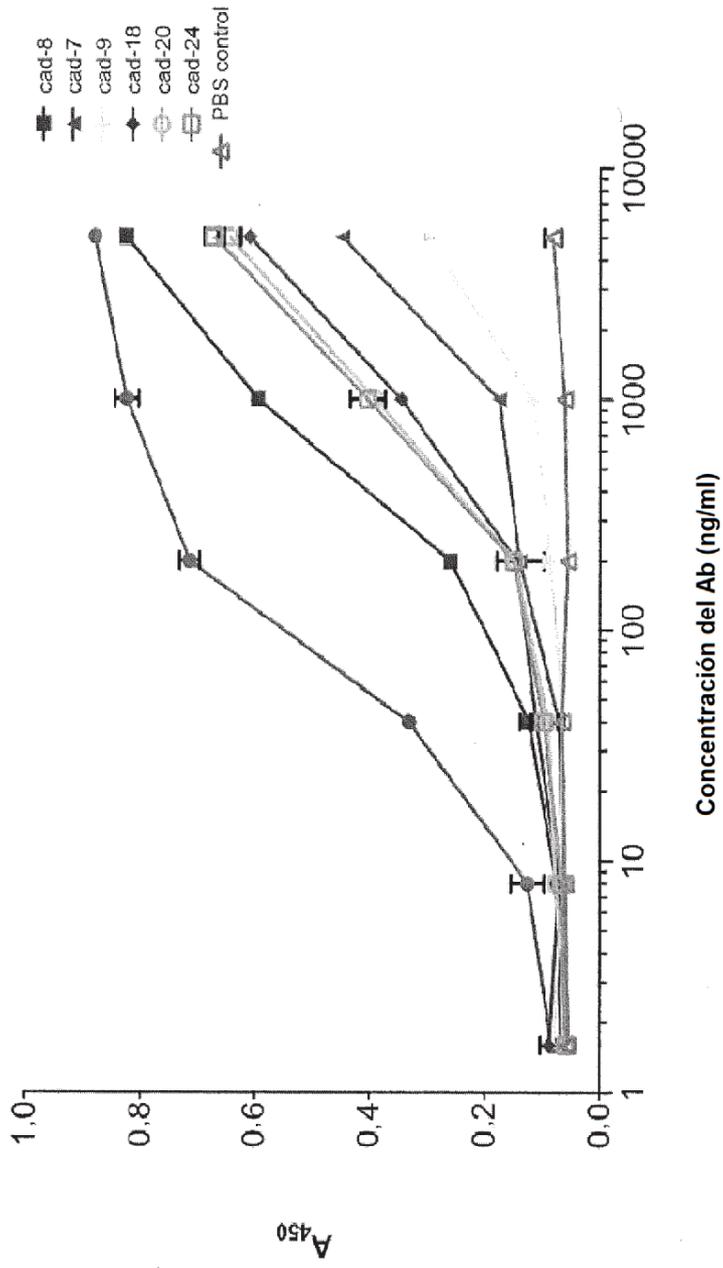


FIG. 39M

# ELISA de especificidad 10/30/09: SDP 141

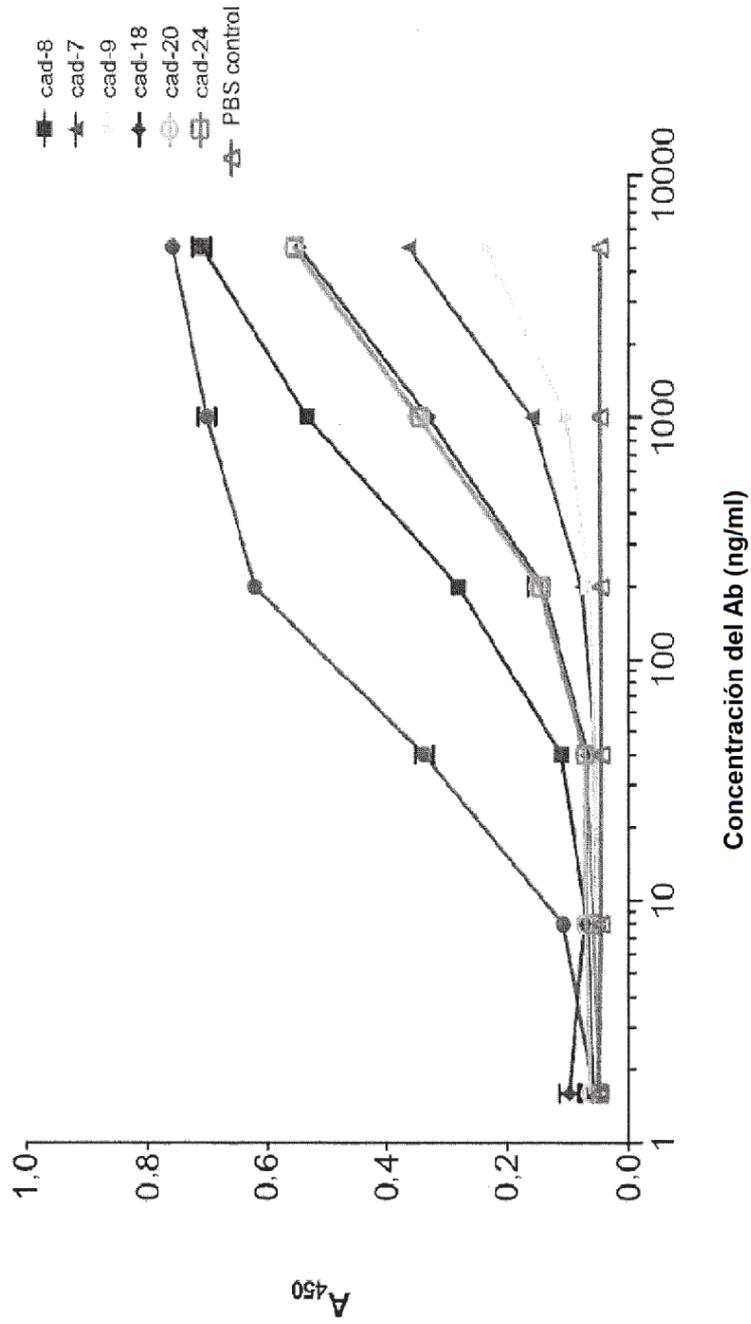


FIG. 39N

# ELISA de especificidad 10/30/09: SDP 151

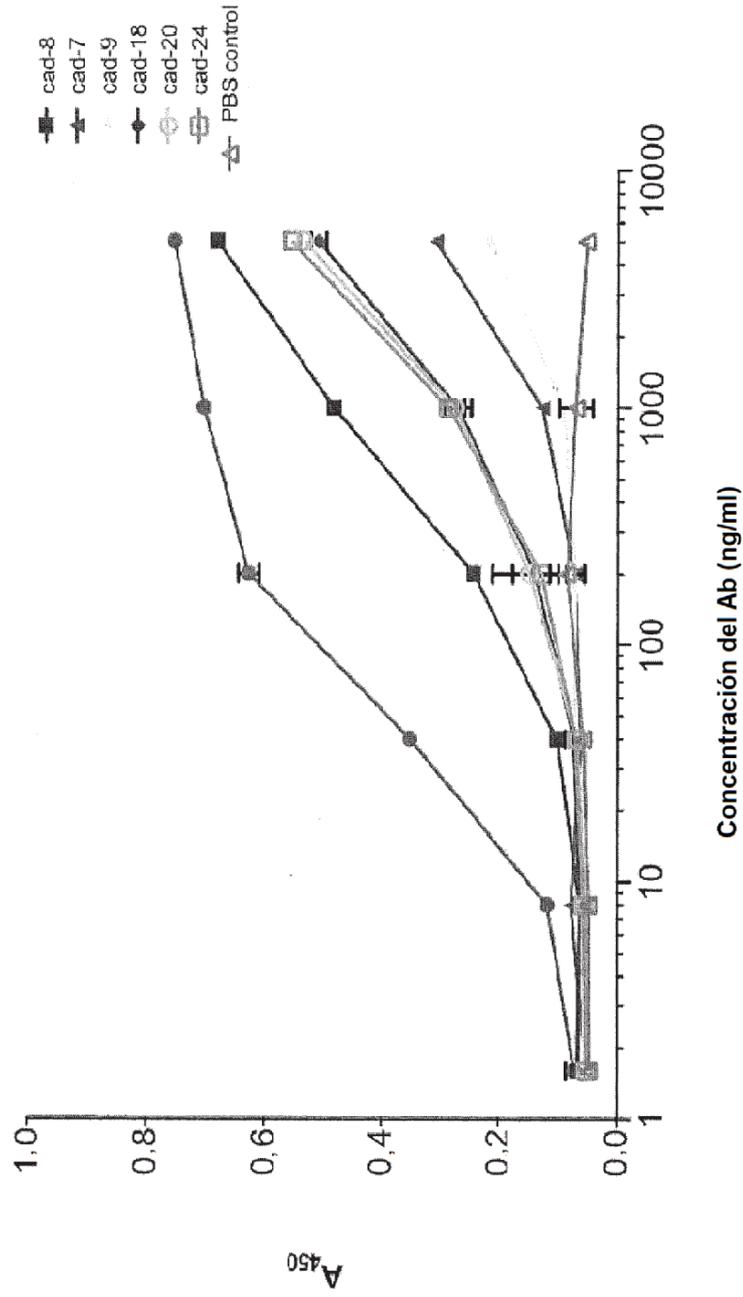


FIG. 390

>CADENA LIGERA DE SDP031  
DVLMTQTPLSPPVTLGQPASISCRSSQSIHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVS  
NRFSGVPDRFTGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGGGTKLEIK  
(SEQ ID NO:71)

>CADENA PESADA DE SDP031  
EVQLVQSGAEVKKPGASVKISKASGYSFTGYFMNWRQAPGGLEWIGRINPYT  
GDTFYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRLGSRYWYFDVWG  
QGTTTVTVSS (SEQ ID NO:65)

FIG. 40A

>CADENA LIGERA DE SDP051  
DVLMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIHSNGNTYLEWYLQKPGQQSPQLLIYKVS  
NFSGVPDRFTGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVYCFQGSHPWTFGQGTKLEIK  
(SEQ ID NO:71)

>CADENA PESADA DE SDP051  
EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYSTGYFMNWRQAPGQGLEWIGRINPYT  
GDTFYNQKFKGRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRLGSRYYWYFDVWGQ  
GTTVTVSS (SEQ ID NO:69)

FIG. 40B

>CADENA LIGERA DE SDP061

DVLMQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSIHSNGNTYLEWYLQKPGQQSPQLLIYKVSNRF  
SGVPDRFRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPWTFGGTKLEIK (SEQ ID  
NO:73)

>CADENA PESADA DE SDP061

EVQLVQSGPELKKPGASVKISKASGYSFTGYFMNWVKQAHGQGLEWIGRINPYTGDT  
FYNQKFGRATLTVDKSSSTAYMELVSLSSDSAVYYCGRGLGSRYWYFDVWGQGTITV  
VSS (SEQ ID NO:61)

FIG. 40C

>CADENA LIGERA DE SDP071  
DVLMTQTLSPVTLGQPASISCRSSQSIHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVDP  
RFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCFQGSHVPWTFGGTKLEIK (SEQ ID NO:73)

>SDP071\_ CADENA PESADA DE SDP071  
EVQLVQSGAEVKKPGASVKISKASGYSFTGYFMNHWKQAPGQGLEWIGRINPYTGDTFYNQK  
FKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRLGSRYYWYFDVWVGQGTTVTVSS (SEQ ID  
NO:63)

FIG. 40D

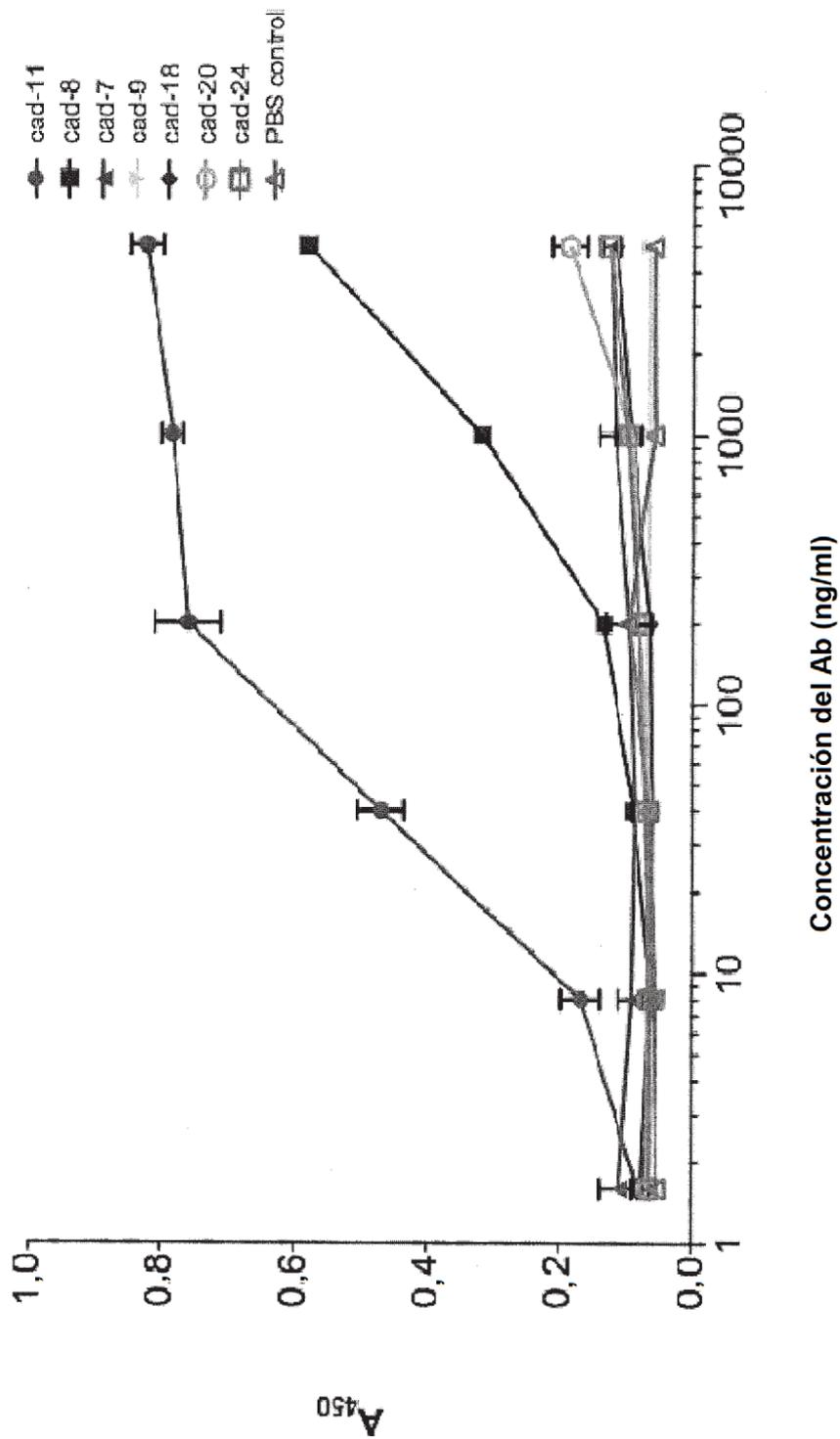
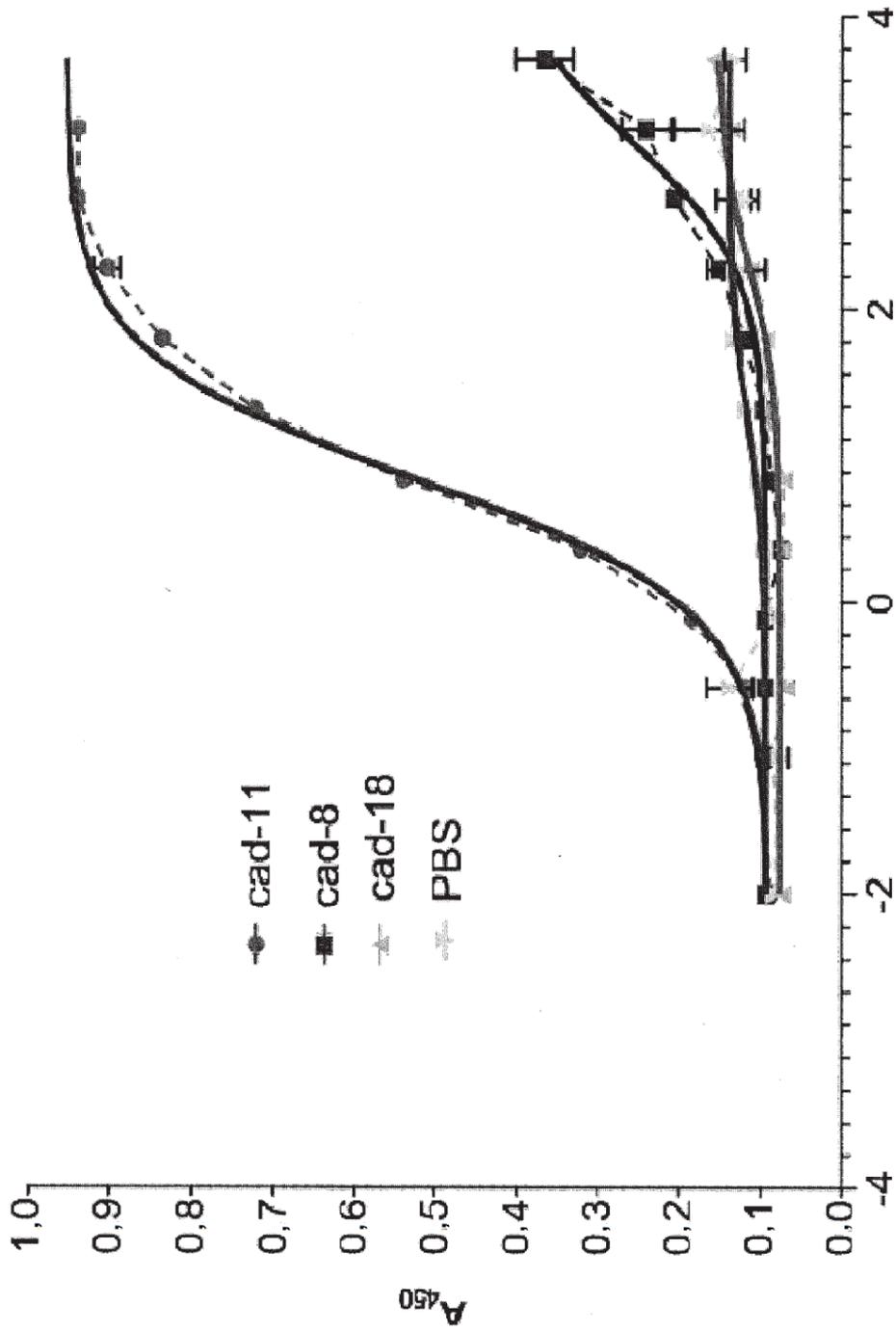


FIG. 41A



Log de la concentración del Ab

FIG. 41B

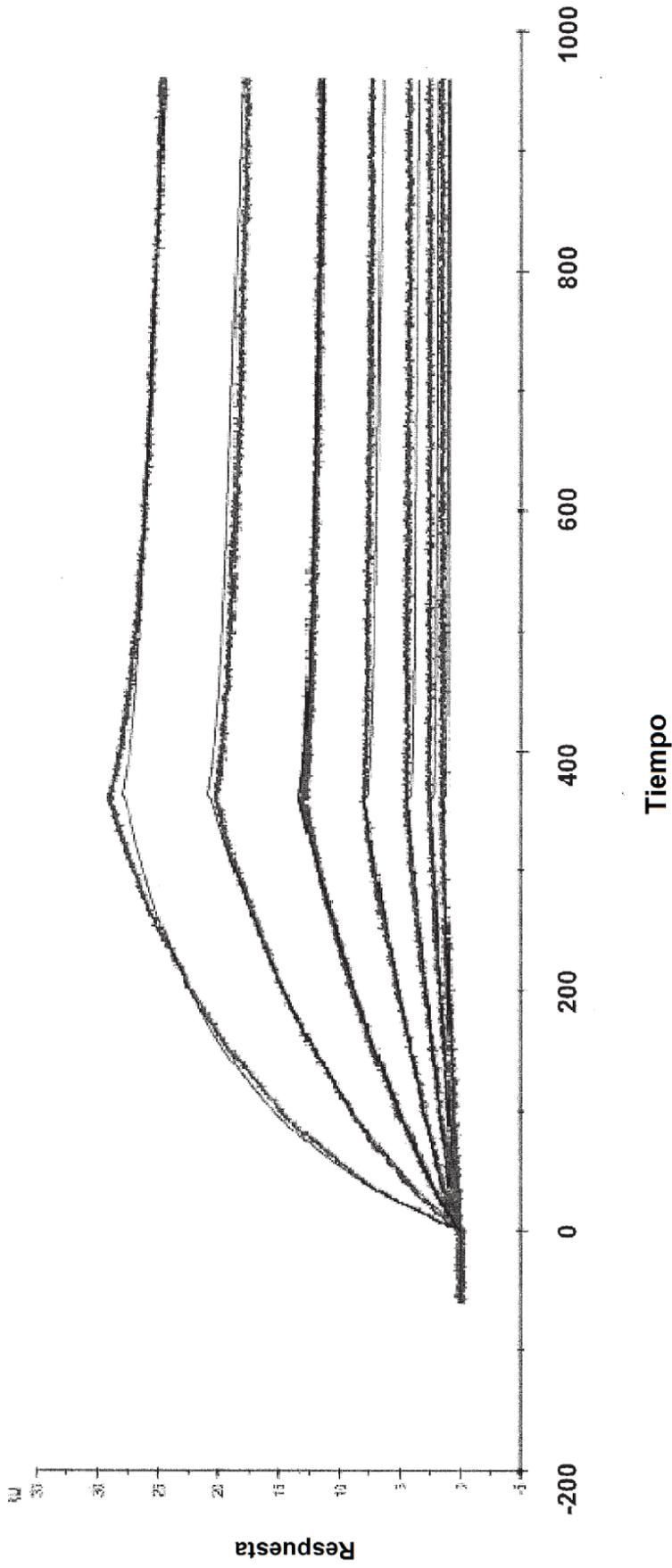


FIG. 42

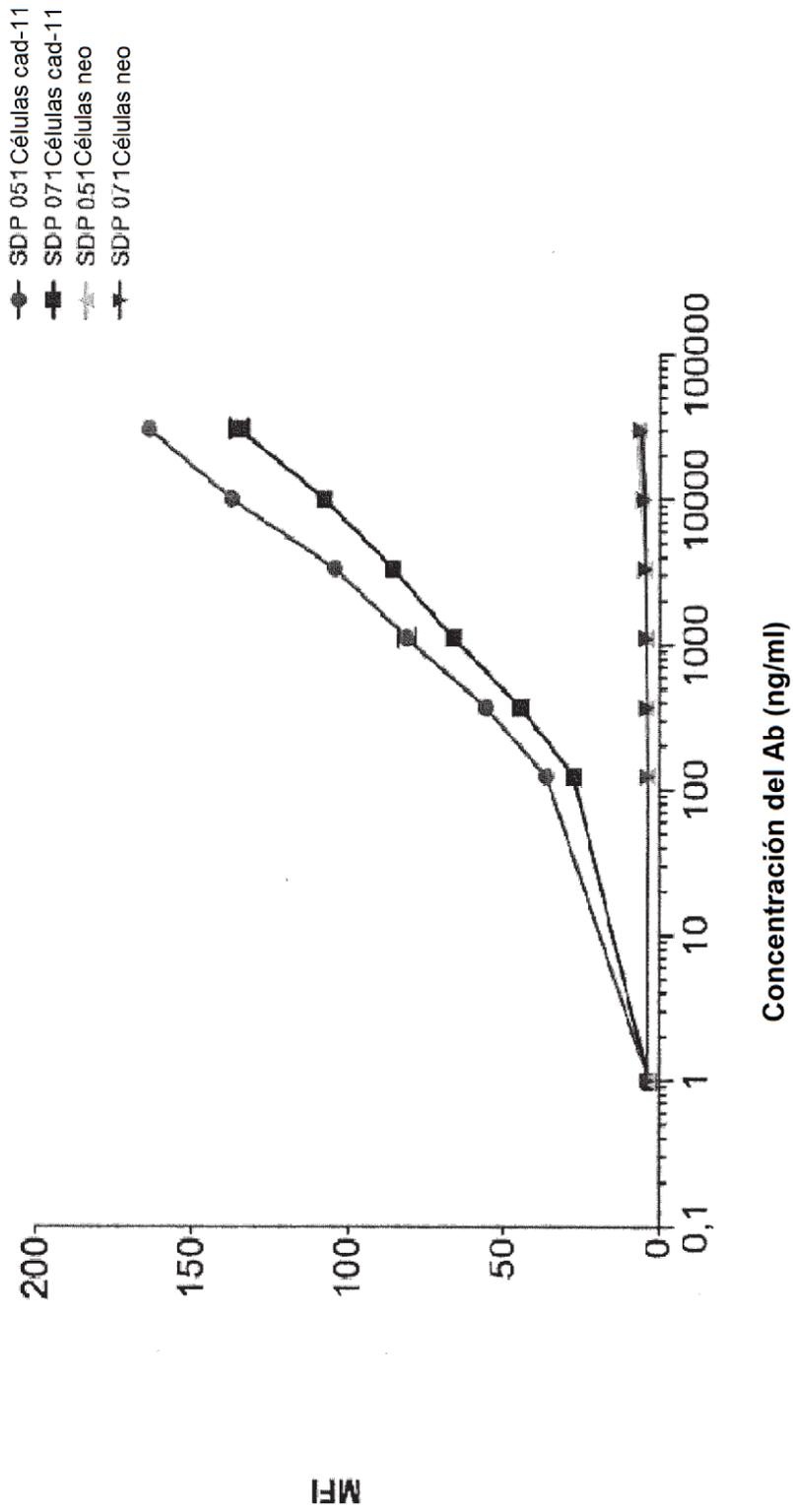


FIG. 43

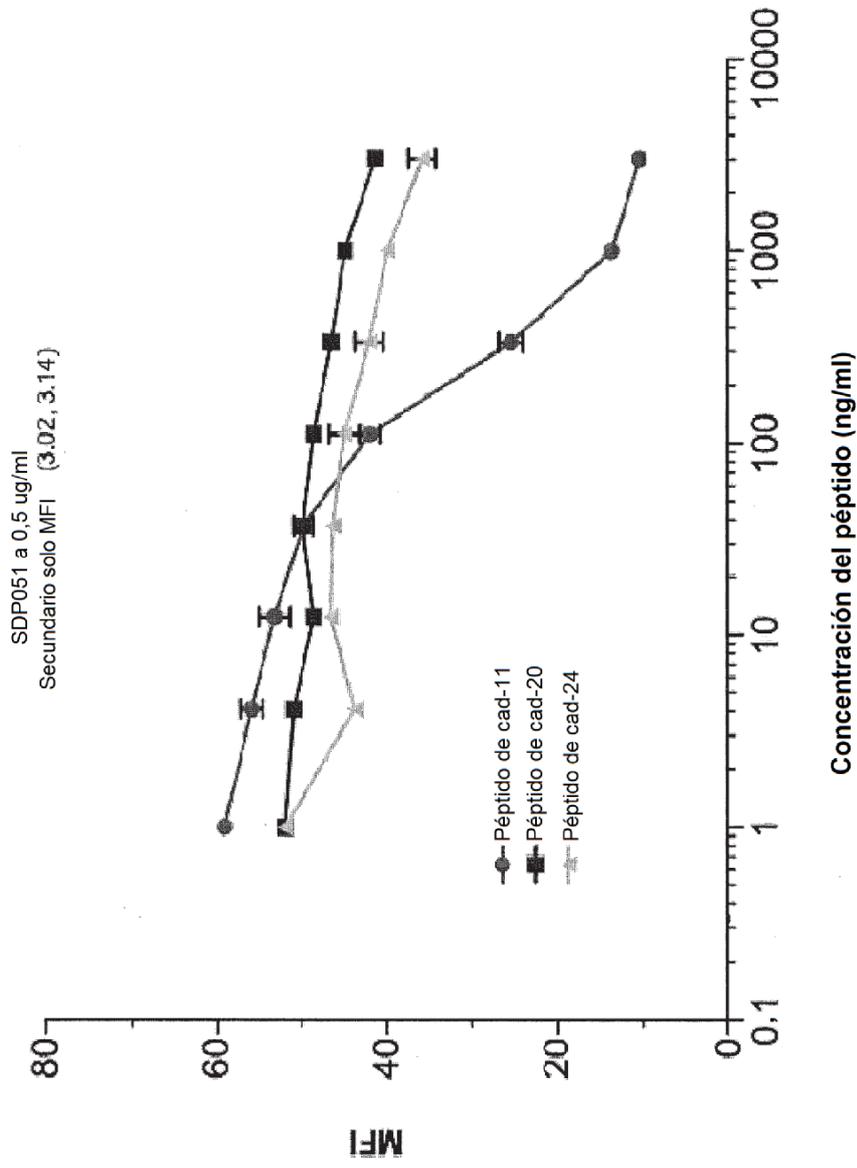


FIG. 44A

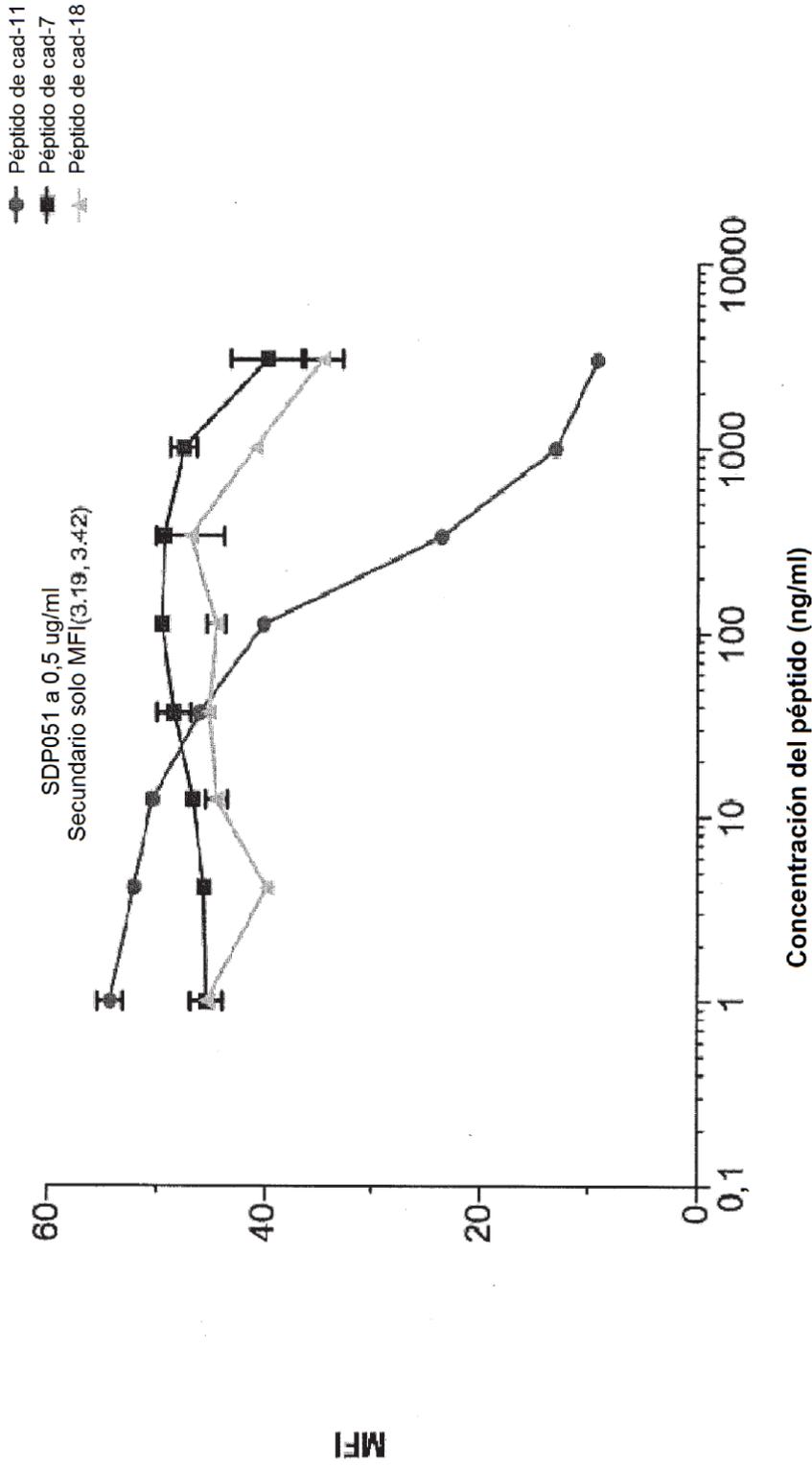


FIG. 44B

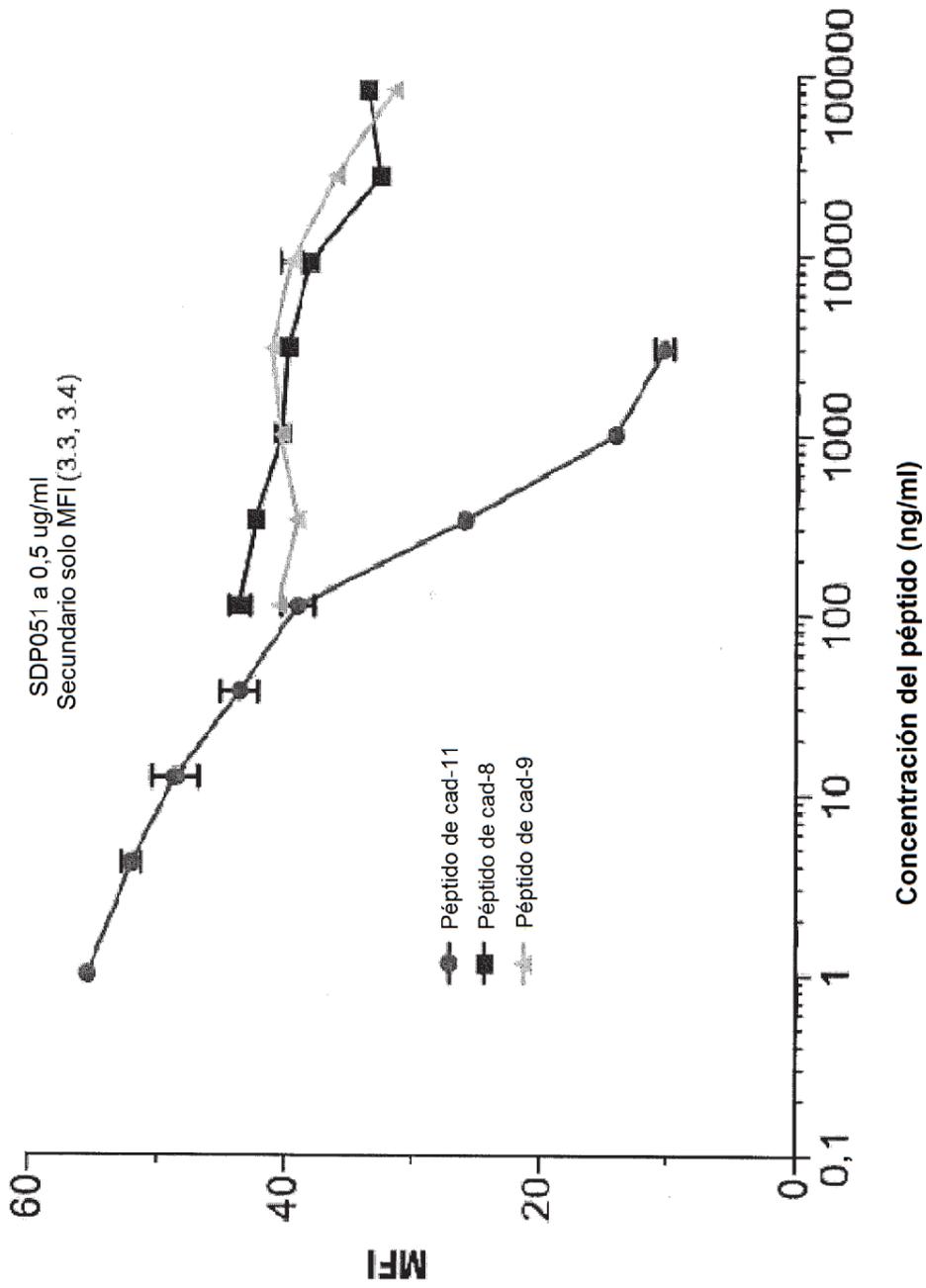


FIG. 44C

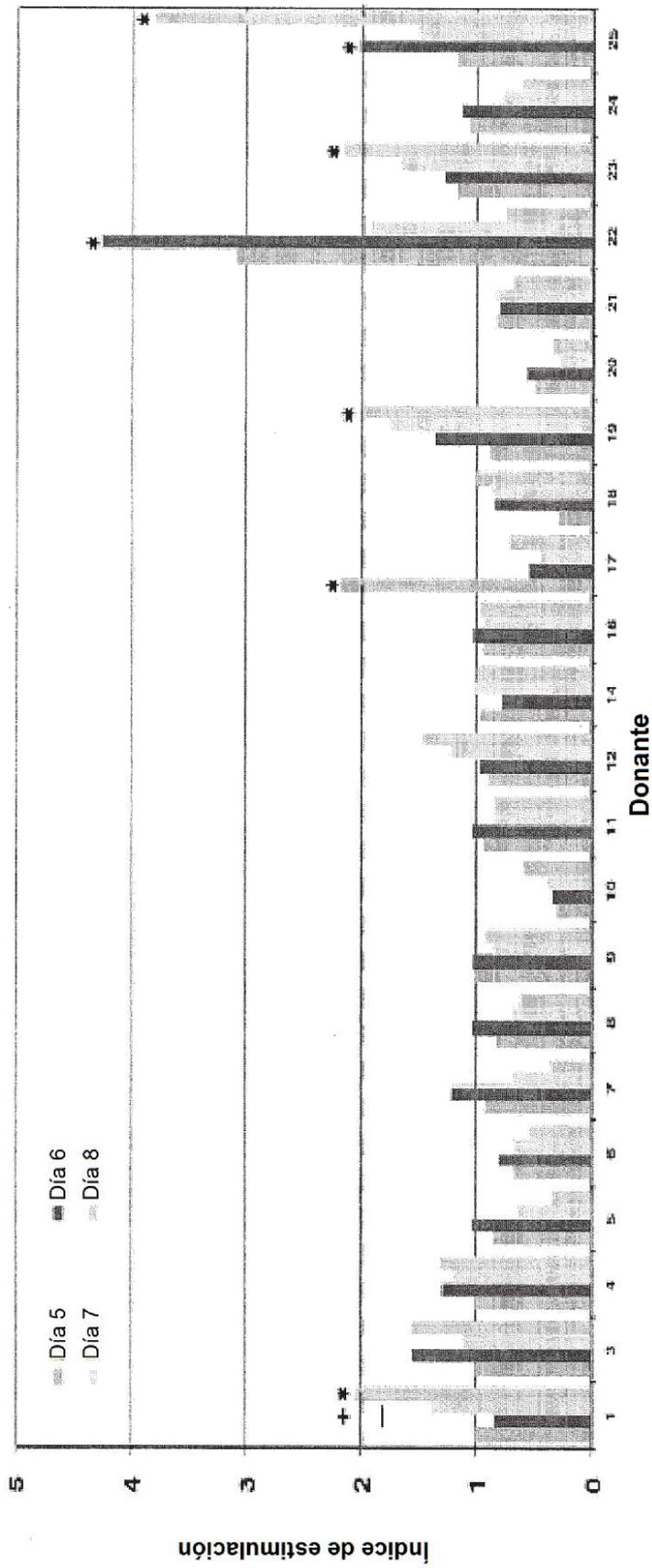


FIG. 45A

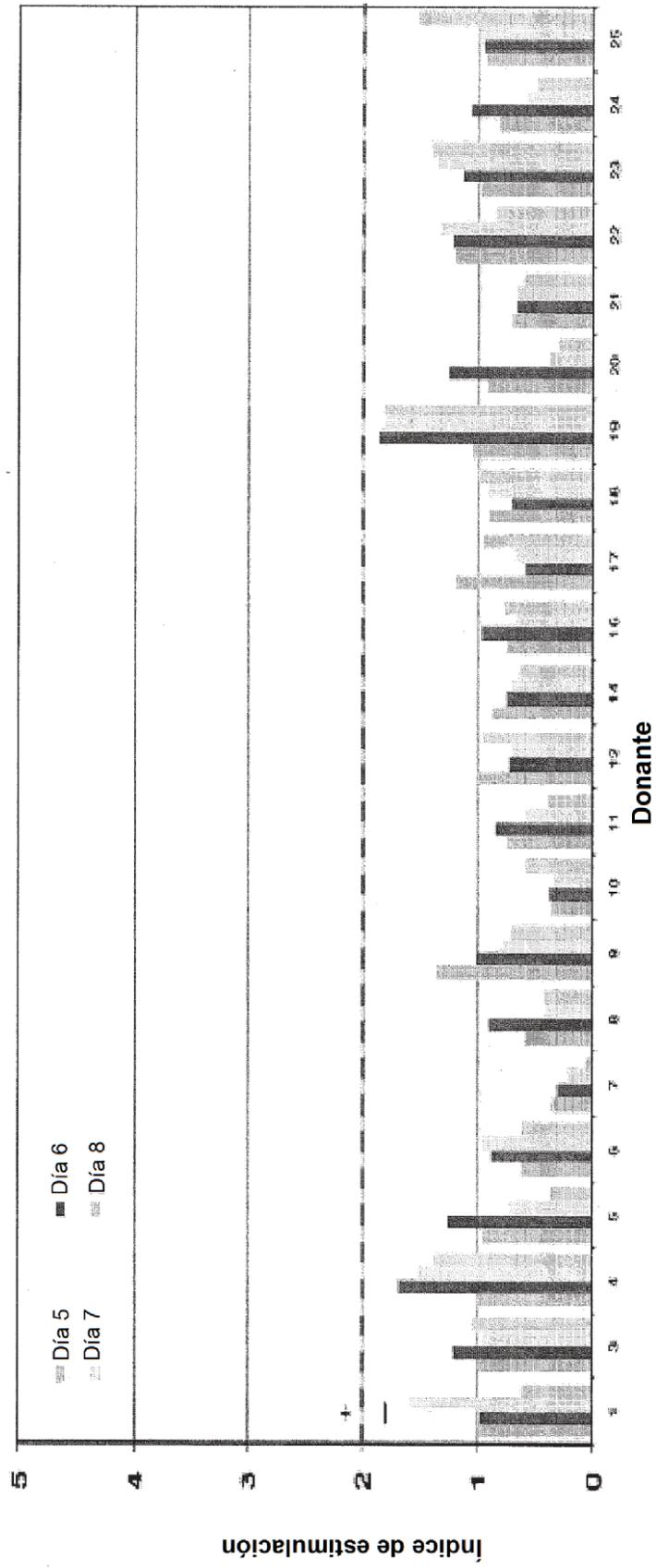


FIG. 45B

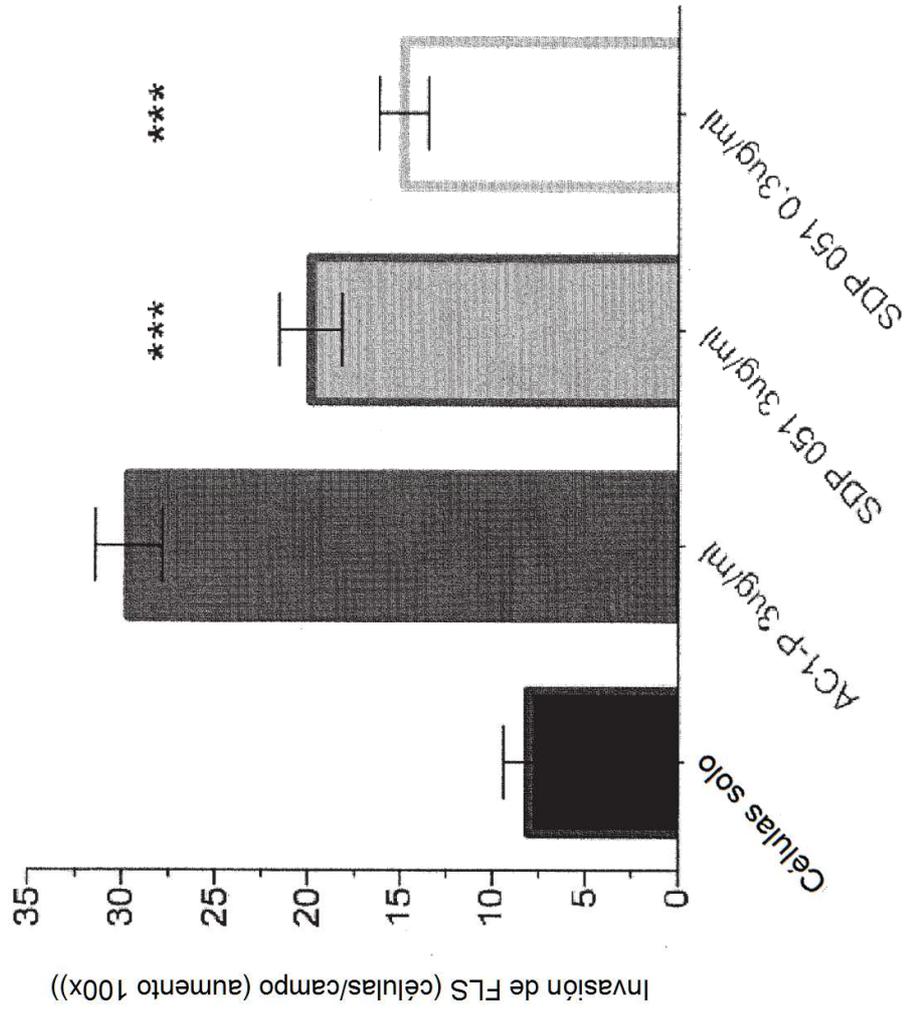


FIG. 46

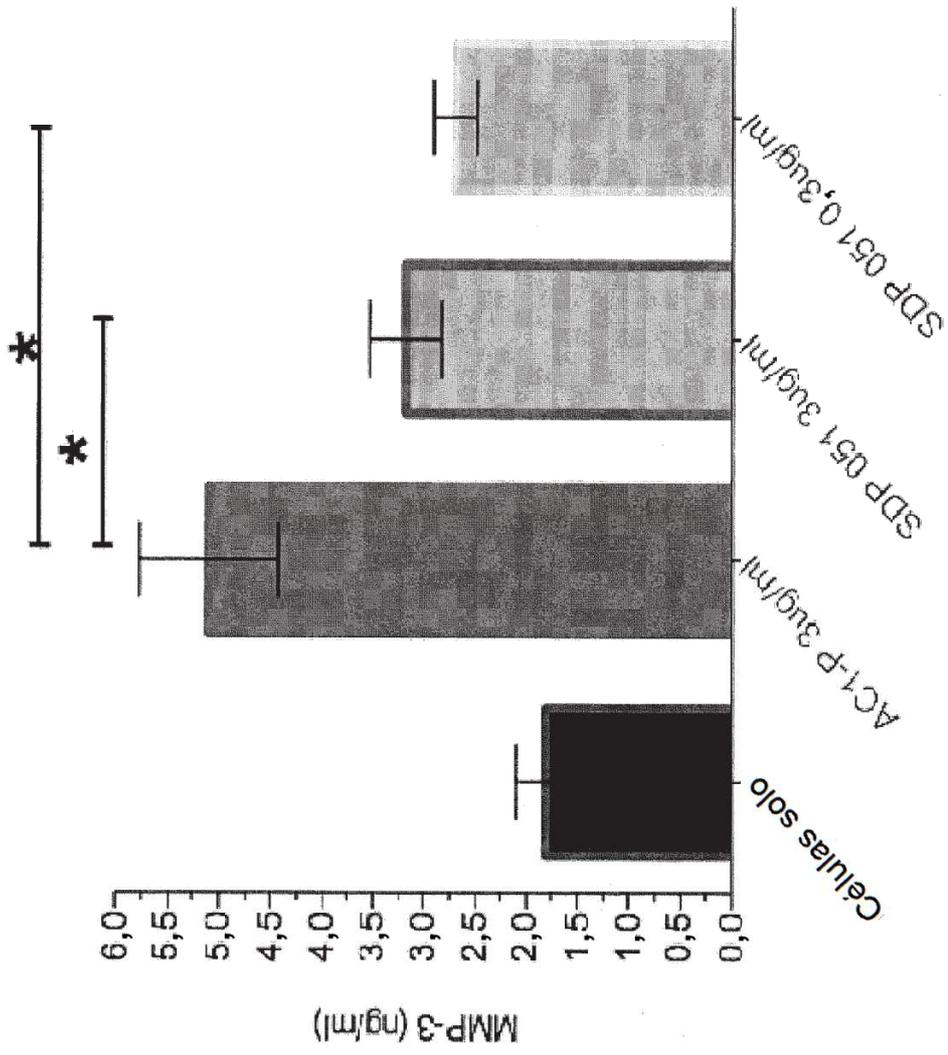


FIG. 47

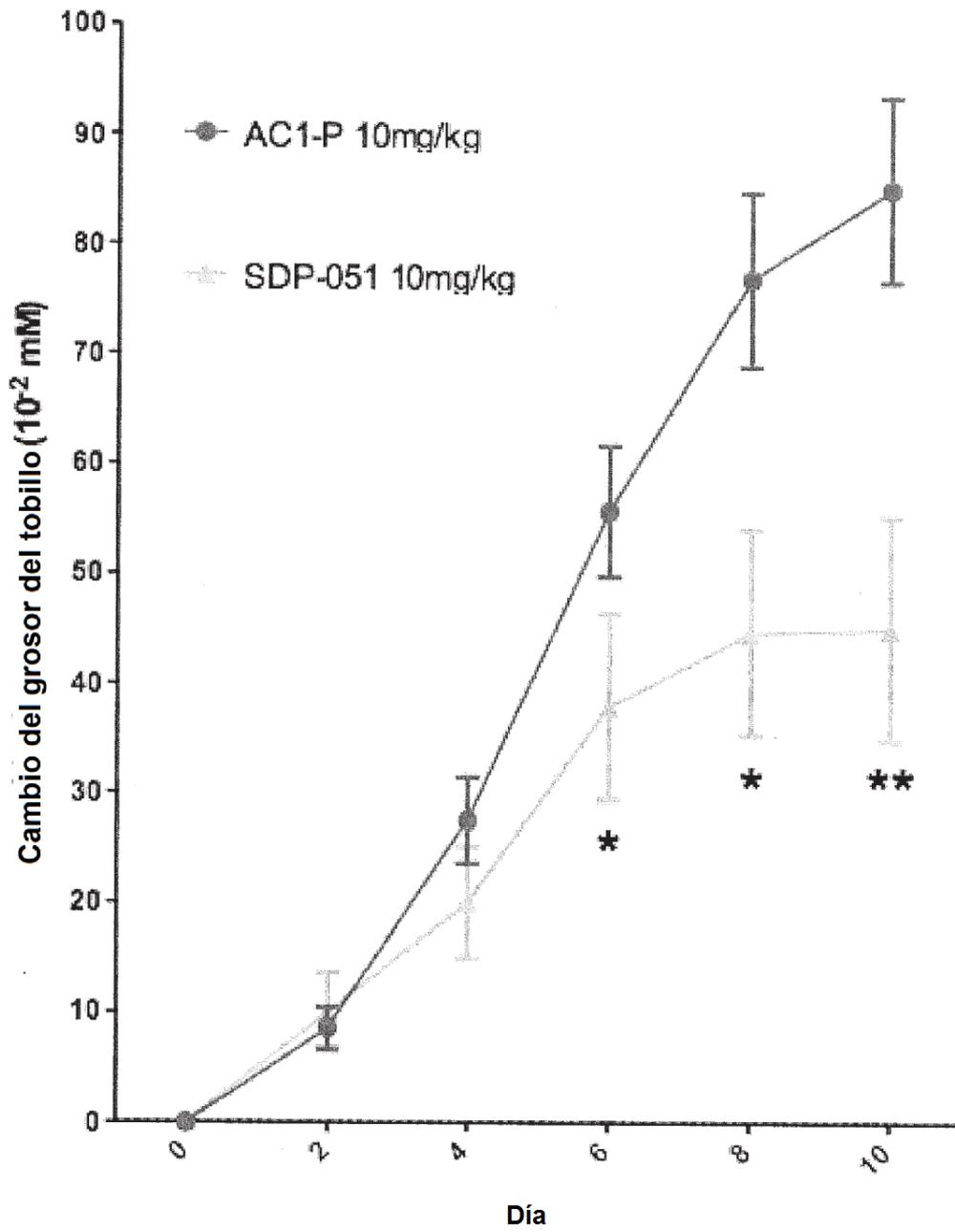


FIG. 48

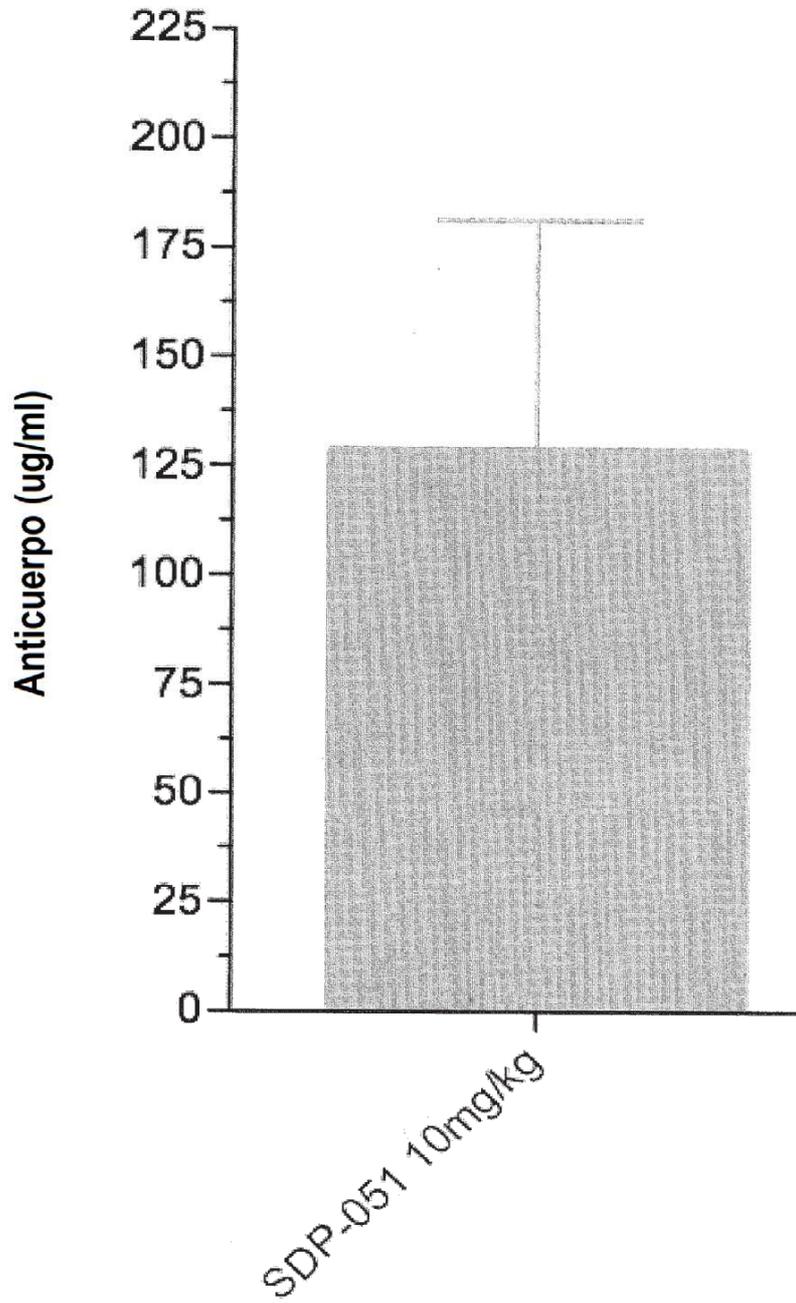


FIG. 49

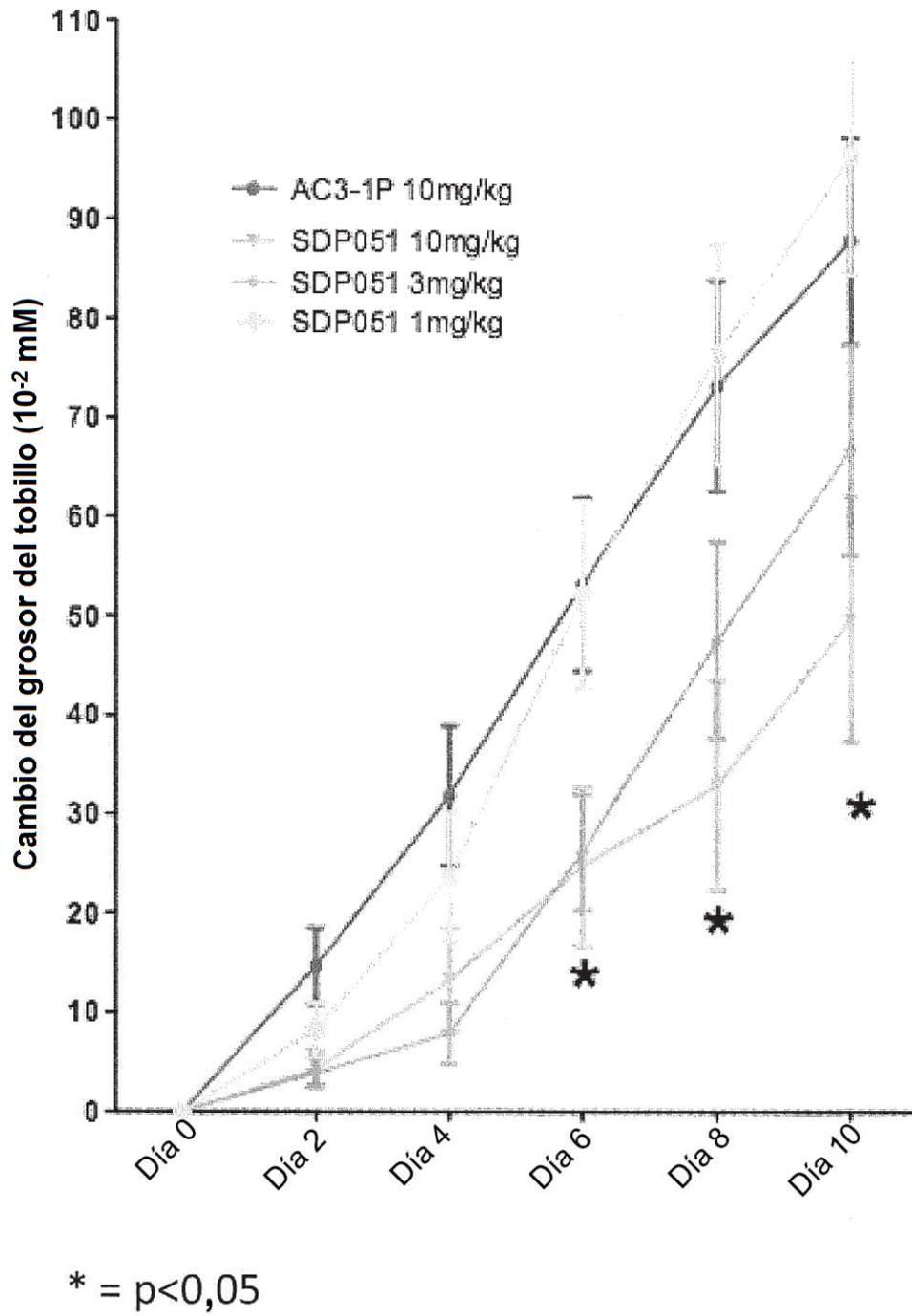


FIG. 50