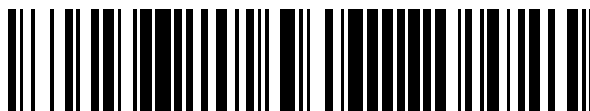


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 647**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2012 PCT/EP2012/060524**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012 WO12168199**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2012 E 12725447 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2718322**

54 Título: **Anticuerpos terapéuticos**

30 Prioridad:

06.06.2011 EP 11168787
07.07.2011 US 201161505137 P
13.03.2012 EP 12159172

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.12.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ZAHN, STEFAN;
ZEUTHEN, LOUISE HJERRILD;
HANSEN, ANKER JON;
KJÆRGAARD, KRISTIAN y
LUND, SØREN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 693 647 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 terapéuticos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere al campo de anticuerpos terapéuticos.

Antecedentes

10

La proteólisis de cada una de las proteínas del complemento C3-C5 da lugar a fragmentos catiónicos amino terminales con moléculas de señalización denominadas anafilotoxinas. La más potente de éstas, C5a, desencadena las respuestas más amplias. Considerando a los componentes de la respuesta inflamatoria como marginación e infiltración de leucocitos, liberación de enzimas proteolíticas unidas a gránulos, producción de oxígeno activado y radicales derivados de nitrógeno, cambios en el flujo sanguíneo y extravasación capilar, junto con la capacidad de contraer el músculo liso, la molécula C5a es el mediador proinflamatorio "completo". A niveles de subnanomolares a nanomolares, la molécula de C5a induce la quimiotaxis de todos los linajes mieloides (neutrófilos, eosinófilos y basófilos, macrófagos y monocitos) y produce permeabilidad vascular que se potencia notablemente por las prostaglandinas y leucocitos circulantes. Mayores concentraciones nanomolares inducen desgranulación y activación de la NADPH oxidasa. Esta amplitud de bioactividad contrasta con otros mediadores inflamatorios. C5a está implicada en la patogénesis de diversos trastornos entre los que se incluyen artritis reumatoide, psoriasis, septicemia, lesión de reperusión y síndrome de distrés respiratorio del adulto (Gerard y Gerard, 1994; Murdoch y Finn, 2000).

25

Las actividades de C5a están mediadas por la unión de C5a a su receptor (C5aR). C5aR pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G de siete dominios transmembrana. C5aR es un receptor de alta afinidad por C5a, con una Kd de ~1 nM y está localizado en varios tipos celulares diferentes entre los que se incluyen los leucocitos. El número de receptores por célula es extremadamente alto, de hasta 200.000 sitios por leucocito. La activación biológica del receptor se produce por encima del intervalo que satura la unión.

30

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

35

40

La inhibición de las respuestas de C5a con antagonistas de C5aR reduce la respuesta inflamatoria aguda mediada por C5a sin afectar a otros componentes del complemento. Con este fin, se han descrito previamente antagonistas peptídicos de C5aR y anticuerpos anti-receptor de C5a (Watanabe et al., 1995; Pellas et al., 1998; Konteatis et al., 1994; Kaneko et al., 1995; Morgan et al., 1993). Por ejemplo, el documento WO 95/00164 describe anticuerpos dirigidos contra un péptido N-terminal (restos 9-29) de C5aR. Los documentos WO 03/062278 y WO 2008/022390 también describen anticuerpos dirigidos contra C5aR. Tres de estos anticuerpos de ratón se denominaron 7F3, 6C12 y 12D4. Se demostró que estos anticuerpos tenían excelentes propiedades, tales como ser muy eficaces en el bloqueo de la unión de C5a a su receptor, detener la migración dirigida por C5a de neutrófilos *in vitro* y prevenir la inflamación en modelos animales. Para controlar enfermedades crónicas, puede ser necesario administrar el anticuerpo en ocasiones sucesivas durante meses o años. Sin embargo, un inconveniente de administrar anticuerpos de ratón es que el sistema inmunitario humano puede generar sus propios anticuerpos dirigidos contra el anticuerpo de ratón (la respuesta HAMA). La respuesta HAMA puede neutralizar los anticuerpos de ratón eliminándolos rápidamente de la sangre, impidiendo de esta manera que el anticuerpo de ratón se una a su diana. Para evitar el desarrollo de una respuesta HAMA, una estrategia que se ha adoptado es "humanizar" el anticuerpo de ratón reemplazando el máximo de restos "extraños" en las regiones de unión que no pertenecen al epítipo con secuencias humanas.

50

55

Un problema importante de los procedimientos de humanización ha sido una pérdida de afinidad por el antígeno (Jones et al., 1986), en algunos casos hasta 10 veces o más, especialmente cuando el antígeno es una proteína (Verhoeven et al., 1988). La pérdida de afinidad es, por supuesto, muy indeseable. Como mínimo, significa que tendrá que inyectarse en el paciente más del anticuerpo humanizado, a un mayor coste y con mayor riesgo de efectos adversos. Incluso más críticamente, un anticuerpo con afinidad reducida puede tener peores funciones biológicas, tales como lisis del complemento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o neutralización de virus. Aunque enfrentada a estas dificultades, se ha descrito la humanización satisfactoria de anticuerpos anti-C5aR humanos en el documento WO 2009/103113.

60

65

Se ha creado una pluralidad de estrategias durante los años para minimizar adicionalmente el riesgo de cualquier reacción secundaria indeseada de la administración de anticuerpos a pacientes, entre las que se incluyen la

reducción de la probabilidad de formación de anticuerpos anti-fármaco en los pacientes mediante la generación de anticuerpos "completamente" humanos.

- 5 Incluso hoy en día, la identificación de anticuerpos adecuados para aplicaciones terapéuticas es una tarea desafiante. Por lo tanto, siguen teniendo un gran interés antagonistas de C5aR alternativos y/o mejorados que puedan usarse en métodos de diagnóstico y/o terapéuticos.

Sumario

- 10 La presente invención se refiere a anticuerpos anti-C5aR que se unen al 2° bucle de C5aR humano y a su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno inmunológico. La región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia con al menos una identidad del 90 % con la SEQ ID NO: 12, y comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, que comprenden las secuencias de SEQ ID 9, 10 y 11. La región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia con al menos una identidad del 90 % con la SEQ ID NO: 16, y comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3, que comprenden las secuencias de SEQ ID 13, 14 y 15. El anticuerpo tiene una región bisagra Fc de isotipo IgG1.

- 20 Los inventores han identificado una serie de anticuerpos que se unen a C5aR humano que son, en varios aspectos, funcionalmente superiores a los anticuerpos anti-C5aR descritos previamente.

- 25 Como se demuestra en el presente documento, los inventores han identificado una serie de anticuerpos humanos que se unen a C5aR humano (hC5aR) y pueden desplazar la unión de hC5a a hC5aR e inhibir la migración de neutrófilos mediada por hC5a. Además, los inventores han convertido satisfactoriamente restos no humanos presentes en la región marco de uno de estos anticuerpos anti-hC5aR en restos de línea germinal humana sin afectar a la potencia del anticuerpo.

- 30 Además, mediante la alteración de la región Fc, los inventores han establecido un anticuerpo anti-hC5aR que no induce la fagocitosis, ADCC o CDC *in vitro*. Los detalles de la invención serán evidentes a partir de la descripción de las realizaciones ejemplares.

- En una realización, el anticuerpo anti-C5aR es un anticuerpo humano que se une específicamente a hC5aR, en donde dicho anticuerpo se une preferentemente al segundo bucle extracelular de hC5aR.

- 35 En una realización, el anticuerpo anti-C5aR se une específicamente a hC5aR, y su región Fc de anticuerpo se ha modificado en comparación con secuencias de referencia IgG1, IgG2, IgG4 e IgG4/G2 reduciendo la capacidad del anticuerpo de inducir la fagocitosis, ADCC y/o CDC a través de la interacción con el receptor FcγR. En una realización particular, la región Fc del anticuerpo es IgG1 y, en otra realización particular, la región Fc comprende uno o más de los siguientes grupos de mutaciones puntuales

- 40 I) N297Q y/o
II) L234A y L235E y/o
III) G236R y L328R y/o
IV) N297Q, L234A y L235E y/o
V) N297Q, L234A, L235E y G237A y/o
45 VI) L234A, L235E, G237A, A330S y P331S

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de los anticuerpos de acuerdo con la invención para el tratamiento de una enfermedad o trastorno inmunológico.

- 50 En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo de la invención para uso en un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno que comprende la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad terapéutica del anticuerpo como se describe en el presente documento.

- 55 En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo de la invención para uso en un método para tratar o prevenir un trastorno en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto el anticuerpo de la invención. En una realización, el trastorno es un trastorno inmunopatológico tal como un a enfermedad autoinmunitaria.

- 60 Otros aspectos y realizaciones de la invención serán evidentes a partir de la divulgación del presente documento, incluyendo las realizaciones ejemplares. De las divulgaciones se deduce que la invención proporciona nuevos anticuerpos terapéuticos con los diversos beneficios y ventajas que se caracterizan en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

- 65 La figura 1 muestra alineamientos de las regiones variables de una selección de anticuerpos monoclonales aislados y caracterizados en la solicitud.

La figura 2 muestra la especificidad de unión de una selección de anticuerpos por quimeras de C5aR humanas y de ratón. Unión de 32F3A6, 35F12A2 y 35F32A3 a C5aR quimérico de humano/ratón en comparación con la unión de Ref Ab Q. Se muestran esquemáticamente receptores quiméricos. Las regiones derivadas de C5aR humano y de ratón se muestran con una línea fina y con una línea gruesa, respectivamente.

La figura 3 muestra alineamientos de las regiones variables de un anticuerpo con las secuencias variables pesadas y ligeras más próximas de línea germinal humana. "/" indica una "rotura en la secuencia, tal como entre segmentos V, D o J.

Figura 4 Puntuaciones clínicas de tres grupos de tratamiento que han recibido una sola dosis principal (flecha) de 0,5, 1,5 o 10 mg/kg i.p. 5 días después de la inflamación establecida en el modelo de transferencia de suero K/BxN-hC5aR-KO/KI, seguido de 9 dosis diarias de 0,25, 0,5 o 2 mg/kg, respectivamente, representando las barras de error $\pm$ SD. Los controles recibieron IgG1 3G12.

Figura 5 Expresión de proteína C5a en líquido sinovial de pacientes con Artritis Psoriásica y Osteoartritis (controles). El nivel de C5a estaba elevado significativamente en el grupo de pacientes con artritis psoriásica ($p = 0,001$; Mann-Whitney).

Figura 6 Análisis semicuantitativo de la expresión de la proteína C5aR en enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. La expresión de la proteína C5aR se investigó por inmunohistoquímica y se analizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis con prueba posterior de comparaciones múltiples de Dunn en GraphPad Prism 5, y se consideró significativo un valor de $P < 0,05$. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Definiciones

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

Como se usa en el presente documento, "receptor de C5a", "C5aR", "C5aRI" o "C5aR humano" y variaciones de los mismos, se refieren al receptor 1 del componente 5 del complemento humano que también se conoce en la técnica como receptor de anafilotoxina C5a y el antígeno CD88. C5aR pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G de siete dominios transmembrana y se une a C5a (Gerard y Gerard, 1991). Se proporciona un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de un C5aR humano en la SEQ ID NO:41, sin embargo, como sabrá el experto en la materia, existen variantes alélicas naturales de esta molécula que también se incluyen en el término "C5aR". Los diversos dominios de C5aR se definen como se indica a continuación:

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

El término "tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a la terapia médica de cualquier sujeto humano u otro sujeto animal que lo necesite. Es de esperar que dicho sujeto se haya sometido a un examen físico por un médico o veterinario, que ha recibido un diagnóstico provisional o definitivo que indicaría que el uso de dicho tratamiento específico es beneficioso para la salud de dicho sujeto humano u otro sujeto animal. La programación de tiempos y el objetivo de dicho tratamiento puede variar de un individuo a otro, según el estado de salud del sujeto en ese momento. Por tanto, dicho tratamiento puede ser profiláctico, paliativo, sintomático y/o curativo. En términos de la presente invención, Los tratamientos profilácticos, paliativos, sintomáticos y/o curativos pueden representar aspectos separados de la invención.

En relación con el tratamiento médico, el término "sujeto", como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a cualquier animal, en particular, mamíferos, tales como seres humanos, caballos, vacas, gatos y perros, y pueden, cuando sea adecuado, usarse indistintamente con el término "paciente". Preferentemente, el sujeto es un ser humano. Tal como se usan en el presente documento, los términos "tratamiento" o "tratar" y variaciones de los mismos incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención suficiente para reducir o eliminar al menos un síntoma del trastorno.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "prevención" o "prevenir" o variaciones de los mismos se refieren a la protección de un sujeto del desarrollo de al menos un síntoma de una enfermedad, o a la reducción de la gravedad de un síntoma de un trastorno.

Como se usa en el presente documento, la expresión "exposición en la célula" se refiere a proporcionar el anticuerpo de tal manera que sea capaz de contactar/unirse a C5aR humano siempre que esté presente en la célula C5aR.

La expresión "concentración efectiva del 50 por ciento" (abreviada como "CE50") representa la concentración de un anticuerpo de la invención que se necesita para conseguir el 50 por ciento de un efecto dado de la molécula a la que se dirige el anticuerpo (por ejemplo, inhibición/desplazamiento de la unión de C5a humana a C5aR humano). Un experto en la materia entenderá que un valor inferior de CE50 corresponde a un anticuerpo más potente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "inhibición" se refiere a una reducción significativa y, posiblemente, una anulación completa, de la actividad definida. Preferentemente, la actividad definida se reduce o se inhibe al menos un 50 por ciento, más preferentemente al menos un 75 por ciento e, incluso más preferentemente, al menos un 90 por ciento.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, se entenderá que la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "comprendiendo", implican la inclusión de un elemento, número entero o etapa indicados, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

En una realización, una molécula consiste esencialmente en la secuencia definida.

En otra realización, una molécula consiste en la secuencia definida.

En una realización, la molécula, tal como un anticuerpo o secuencia de ADN es una molécula aislada. La expresión "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que se ha separado y/o recuperado de otro/otros componentes de su entorno natural y/o purificado de una mezcla de componentes en su entorno natural.

El término "anticuerpo", como se cita en el presente documento, incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, la "parte de unión a antígeno") o las cadenas individuales de los mismos. Los anticuerpo de longitud completa (o anticuerpos enteros) comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada (CH). Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera (CL). La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con el antígeno. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (en el presente documento abreviada como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, llamadas regiones flanqueantes (FR).

Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del hospedador, incluyendo varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema del complemento clásico.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se usa para describir anticuerpos enteros y cualquier fragmento de unión a antígeno de los mismos (es decir, la "parte de unión a antígeno") o cadenas individuales del mismo que se unen específicamente a su antígeno correspondiente. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂S, Fv (habitualmente, los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo), Fv monocatenario (scFv; véase, por ejemplo, Bird et al., Science 1988; 242:42S-426; y Huston et al. PNAS 1988; 85:5879-5883), dsFv, Fd (habitualmente el dominio VH y CHI), y dAb (habitualmente un dominio VH); dominios VH, VL, VhH y V-NAR; moléculas monovalentes que comprenden una sola VH y una sola cadena VL; minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y cuerpos kappa (véase, por ejemplo, III et al. Protein Eng 1997; 10:949-57); IgG de camélido; IgNAR; así como una o más CDR aisladas o un paratopo funcional, donde las CDR aisladas o restos de unión a antígeno o polipéptidos pueden asociarse o unirse entre sí

para formar un fragmento de anticuerpo funcional. Se han descrito o revisado varios tipos de fragmentos de anticuerpo en, por ejemplo, Holliger y Hudson, *Nat Biotechnol* 2005;2S:1126-1136; documento WO2005040219 y Publicaciones de Solicitudes de Patente de Estados Unidos 20050238646 y 20020161201.

la expresión "región determinante de complementariedad" ("CDR") o "región hipervariable", cuando se usan en el presente documento, se refiere a los restos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. Las CDR generalmente están compuestas por los restos de aminoácido 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; (Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, Departamento de salud y servicios humanos de Estados Unidos, Publicación NIH n.º 91-3242) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol* 1987;196:901-917). Típicamente, la numeración de restos de aminoácido en esta región se realiza por el método descrito en Kabat *et al.*, anteriormente citado. Frases tales como "posición de Kabat", "resto de Kabat" y "de acuerdo con Kabat" en el presente documento hacen referencia a este sistema de numeración para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera. Usando el sistema de numeración de Kabat, la secuencia de aminoácidos lineal real de un péptido puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento o inserción en una región marco (FR) o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir inserciones de aminoácidos (resto 52a, 52b y 52c de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de CDR H2 y restos insertados (por ejemplo, los restos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto 82 de la FR de la cadena pesada. La numeración de Kabat de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado por alineación en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "convencional".

La expresión restos de la "región marco" o "FR" se refiere a los restos de aminoácido de VH o VL que no están dentro de las CDR, como se define en el presente documento.

La región del fragmento cristizable ("región Fc"/"dominio Fc") de un anticuerpo es la región de "cola" de un anticuerpo que interacciona con receptores de la superficie celular denominados receptores Fc, así como algunas proteínas del sistema del complemento.

Los anticuerpos monoclonales habitualmente se obtienen fusionando células de mieloma con las células de bazo de un ratón que se ha inmunizado con el antígeno deseado. Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales humanos a partir de animales transgénicos (por ejemplo, ratones u otras especies adecuadas) que codifican anticuerpos humanos. Como alternativa, pueden fabricarse anticuerpos monoclonales recombinantes que implican tecnologías denominadas clonación de repertorio o presentación en fagos/presentación en levaduras. La ingeniería de anticuerpos recombinantes implica el uso de virus o levaduras para crear anticuerpos, en lugar de ratones.

La expresión "anticuerpo humanizado", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo quimérico humano/no humano que contiene secuencias, normalmente al menos las regiones determinantes de complementariedad (secuencias de CDR mínimas) derivadas de una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal no humana. Un anticuerpo humanizado es, por lo tanto, una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que se han reemplazado restos de una región hipervariable del receptor por restos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como un ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas.

Los anticuerpos humanizados que comprenden al menos regiones CDR no derivadas de secuencias de la línea germinal humana también pueden denominarse "anticuerpos quiméricos" si los genes de cadena ligera y pesada del anticuerpo se han construido, típicamente por ingeniería genética, a partir de genes de región constante y variable de inmunoglobulina que proceden de diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables de genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes humanos.

La expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco como las regiones CDR provienen de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Debe tenerse en cuenta que dichos anticuerpos, sin embargo, comprenden restos de aminoácido que no se encuentran en las secuencias de la línea germinal humana debido a mutaciones que se producen a causa de la maduración *in vivo* o *in vitro*. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también proviene principalmente de las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir, sin embargo, restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria y específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Por otro lado, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos o regiones de unión a antígeno alternativas en las que las secuencias de CDR proceden de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón y se han injertado posteriormente en secuencias marco humanas (véase el anticuerpo humanizado anteriormente). El anticuerpo humano puede ser un anticuerpo monoclonal humano. Dicho anticuerpo monoclonal humano puede producirse por un hibridoma que incluye una

célula B obtenida a partir de un animal transgénico no humano, *por ejemplo*, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionado a una célula inmortalizada. También pueden aislarse anticuerpos humanos de bibliotecas de secuencias construidas sobre selecciones de secuencias de la línea germinal humana, diversificadas adicionalmente con diversidad de secuencias naturales y sintéticas. Pueden prepararse anticuerpos humanos por inmunización *in vitro* de linfocitos humanos seguido de transformación de los linfocitos con virus de Epstein-Barr. La secuencia del anticuerpo humano puede identificarse permitiendo la producción del anticuerpo por métodos recombinantes.

Además, los anticuerpos humanizados, humanos y completamente humanos pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se efectúan para refinar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo.

La expresión "derivados de anticuerpo" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo, tal como un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

El término "antígeno" se refiere a la entidad molecular usada para la inmunización de un vertebrado inmunocompetente para producir un anticuerpo que reconozca al antígeno. En el presente documento, el término antígeno se usa en sentido más amplio y, en general, se entiende que incluye moléculas diana que se reconocen específicamente por el anticuerpo, incluyendo de esta manera fragmentos o miméticos de la molécula usada en el proceso de inmunización para inducir el anticuerpo o las moléculas usadas para el cribado tras la inmunización y también moléculas usadas para el cribado en casos en los que se obtienen anticuerpos por métodos alternativos tales como la tecnología de presentación en fagos.

El término "epítipo", como se usa en el presente documento, se define en el contexto de una interacción molecular entre un "polipéptido de unión a antígeno", tal como un anticuerpo, y su "antígeno" correspondiente. En general, "epítipo" se refiere al área o región de un antígeno al que se une específicamente un anticuerpo, es decir, el área o región en contacto físico con el anticuerpo. Un epítipo proteico puede comprender restos de aminoácido en el antígeno que están implicados directamente en la unión al anticuerpo (también denominado componente inmunodominante del epítipo) y otros restos de aminoácido que no están implicados directamente en la unión, tales como restos de aminoácido del antígeno que se bloquean de manera eficaz por el Ac (en otras palabras, el resto de aminoácido está dentro de la "superficie excluida al disolvente" y/o la "huella dactilar" del anticuerpo). Un antígeno dado puede comprender varios epítipos diferentes, que pueden incluir, sin limitación; determinantes antigénicos de péptidos lineales, determinantes antigénicos conformacionales que consisten en uno o más aminoácidos no contiguos localizados de manera que están cercanos entre sí en la conformación nativa (madura); y determinantes antigénicos post-traduccionales que consisten, en su totalidad o en parte, en estructuras moleculares unidas covalentemente al antígeno, tales como grupos de carbohidrato.

A partir del hecho de que las descripciones y definiciones de epítipos, dependiendo del método de mapeo de epítipos utilizado, se obtienen a diferentes niveles de detalle, se deduce que puede realizarse una comparación de epítipos para diferentes Ac en el mismo Ag de manera similar a diferentes niveles de detalle.

Los términos "unión", "que se une específicamente" y "especificidad de unión" se usan en el presente documento para describir la selectividad de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden unirse específicamente a C5aR, lo que indica que el anticuerpo tiene una afinidad significativamente menor por otros antígenos, donde significativamente menor puede ser tal como una afinidad al menos 2 veces menor o 5 veces menor o 10 veces menor. El anticuerpo puede ser además específico de especie, de tal manera que el anticuerpo se una específicamente a C5aR humano pero no a C5aR de ratón con alta afinidad.

La expresión "afinidad de unión" se usa en el presente documento como una medida de la fuerza de una interacción covalente entre dos moléculas, por ejemplo, un anticuerpo, o fragmento del mismo, y un antígeno. La expresión "afinidad de unión" se usa para describir interacciones monovalentes (actividad intrínseca). La afinidad de unión entre dos moléculas, por ejemplo, un anticuerpo, o fragmento del mismo, y un antígeno, a través de una interacción monovalente puede cuantificarse mediante la determinación de la constante de disociación (K_D). A su vez, la K_D puede determinarse mediante la medición de la cinética de la formación y disociación del complejo, por ejemplo, mediante el método SPR. Las constantes de velocidad correspondientes a la asociación y disociación de un complejo monovalente se denominan constante de velocidad de asociación k_a (o k_{on}) y constante de velocidad de disociación k_d (o k_{off}), respectivamente. K_D se relaciona con k_a y k_d mediante la ecuación $K_D = k_d / k_a$.

Además, "afinidad" se refiere a la fuerza de la unión entre un solo sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y un ligando (por ejemplo, un antígeno). La afinidad de una molécula X por un ligando Y está representada por la constante de disociación (K_d), que es la concentración de Y que se requiere para ocupar los sitios de combinación de la mitad de las X moléculas presentes en una solución. Una K_d más pequeña indica una interacción más fuerte o de mayor afinidad y se necesita una menor concentración de ligando para ocupar los sitios. De manera similar, la especificidad de una interacción puede evaluarse mediante la determinación y comparación

del valor de K_D para la interacción de interés, tal como una interacción específica entre un anticuerpo y un antígeno, con el valor de K_D de una interacción que no es de interés.

- 5 Típicamente, la K_D para el anticuerpo con respecto a la diana será 2 veces, preferentemente 5 veces, más preferentemente 10 veces menor que la K_D con respecto a la otra molécula no diana, tal como un material no relacionado o acompañante en el entorno o control. Más preferentemente, la K_D será 50 veces menor, tal como 100 veces menor o 200 veces menor; incluso más preferentemente 500 veces menor, tal como 1.000 veces menor o 10.000 veces menor.
- 10 El valor de esta constante de disociación puede determinarse directamente por métodos bien conocidos y puede calcularse incluso para mezclas complejas por métodos tales como, por ejemplo, los establecidos en Caceci et al. (Byte 9:340-362, 1984). Por ejemplo, la K_D puede establecerse usando un ensayo de unión de filtro de nitrocelulosa de doble filtro tal como el desvelado por Wong & Lohman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5428-5432, 1993). En la
- 15 técnica se incluyen otros ensayos convencionales para evaluar la capacidad de unión de ligandos tales como anticuerpos hacia dianas, entre los que se incluyen, por ejemplo, ELISA, transferencias Western, RIA y análisis de citometría de flujo. La cinética de unión y la afinidad de unión del anticuerpo también puede evaluarse por ensayos convencionales conocidos en la técnica, tales como SPR.
- 20 Puede realizarse un ensayo de unión competitivo en el que la unión del anticuerpo a la diana se compara con la unión de la diana por otro ligando de esa diana, tal como otro anticuerpo. La concentración a la que se produce un 50 % de inhibición se conoce como K_i . En condiciones ideales, la K_i es equivalente a la K_D . El valor de K_i nunca será menor que la K_D , de manera que la medición de la K_i puede sustituirse convenientemente para proporcionar un límite superior para la K_D .
- 25 Tal como apreciará el experto en la materia, la "avidez" se refiere a la fuerza total de interacción entre dos moléculas, tales como un anticuerpo y un antígeno. La avidez depende tanto de la afinidad como de la valencia de las interacciones.
- 30 Otros ensayos para determinar la funcionalidad de un anticuerpo dado pueden incluir un ensayo basado en células que es específico para el antígeno dado y el efecto de unión del anticuerpo.
- El término "identidad", como se conoce en la técnica, se refiere a la relación entre las secuencias de dos o más polipéptidos, determinada por comparación de las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre polipéptidos, determinada por el número de coincidencias entre cadenas de dos o
- 35 más restos de aminoácido. La "identidad" mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre la más pequeña de dos o más secuencias con alineamientos de huecos (si existen) dirigidos por un modelo matemático o programa informático particular (es decir, "algoritmos"). La identidad de polipéptidos relacionados puede calcularse fácilmente por métodos conocidos. Dichos métodos incluyen, aunque no de forma limitativa, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and
- 40 Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., ed., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., ed., M. Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988).
- 45 Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias ensayadas. En programas informáticos disponibles públicamente se describen métodos para determinar la identidad. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen el paquete de programas GCG, incluyendo GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res. 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)). El programa BLASTX está disponible públicamente en el National Center for
- 50 Biotechnology Information (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., citado anteriormente). También puede usarse el algoritmo de Smith Waterman bien conocido para determinar la identidad.
- 55 Por ejemplo, usando el algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), dos polipéptidos para los que se va a determinar el porcentaje de identidad de secuencia se alinean para una coincidencia óptima de sus respectivos aminoácidos (el "rango de coincidencias", determinado por el algoritmo). Junto con el algoritmo se usan una penalización de apertura de hueco (que se calcula como 3 veces la diagonal media; la "diagonal media" es la media de la diagonal de la matriz de comparación que se está usando; la "diagonal"
- 60 es la puntuación o número asignado a cada coincidencia perfecta de aminoácido por la matriz de comparación particular) y una penalización por extensión de hueco (que normalmente es la {fracción (1/10)} multiplicada por la penalización de apertura de hueco), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62. El algoritmo también usa una matriz de comparación estándar (véase Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, sup. 3 (1978) para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 89, 10915-10919 (1992) para la matriz de comparación BLOSUM 62).
- 65

Los parámetros preferidos para una comparación de secuencias de péptidos incluyen los siguientes: Algoritmo: Needleman et al., J. Mol. Biol. 48, 443-453 (1970); Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff et al., PNAS USA 89, 10915-10919 (1992); Penalización por hueco: 12, Penalización por longitud de hueco: 4, Umbral de similitud: 0.

El programa GAP es útil con los parámetros anteriores. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de péptidos (junto con ausencia de penalización para huecos finales) que usan el algoritmo de GAP.

Una "sustitución de aminoácido conservativa" puede implicar una sustitución de un resto de aminoácido por otro resto, de forma que haya poco o ningún efecto sobre la polaridad o carga del resto de aminoácido en esa posición. Esto se ejemplifica por los siguientes grupos de aminoácidos, con lo que las sustituciones de un aminoácido por un aminoácido diferente del mismo grupo se consideran sustituciones conservativas: Hidrófilos: Ala, Pro, Gli, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, Thr. Alifáticos: Val, Ile, Leu, Met. Básicos: Lys, Arg, His. Aromáticos: Phe, Tyr, Trp. Además, a menudo puede sustituirse cualquier resto por alanina.

Además, si se desea, pueden introducirse aminoácidos no naturales o análogos de aminoácidos químicos como una sustitución o adición en la cadena de anticuerpo y/o inmunoglobulina de la presente invención. Estos aminoácidos incluyen, aunque no de forma limitativa, los isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido α -amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 2-aminobutírico, ácido 6-amino hexanoico, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butiladonina, fenilglicina, ciclohexilalanina, beta-alanina, fluoraminoácidos, aminoácidos diseñadores tales como beta-metil aminoácidos, Ca-metil aminoácidos, Na-metil aminoácidos y análogos de aminoácidos en general.

Pueden prepararse mutantes de la secuencia de aminoácidos de la cadena de anticuerpo y/o inmunoglobulina de la presente invención introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en un ácido nucleico de la presente invención o mediante síntesis *in vitro* del polipéptido deseado. Estos mutantes incluyen, por ejemplo, delecciones, inserciones y sustituciones de restos dentro de la secuencia de aminoácidos. Puede realizarse una combinación de delección, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que el producto polipeptídico final posea las características deseadas. Pueden prepararse polipéptidos mutantes (alterados) usando cualquier técnica conocida en este campo. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede someterse a mutagénesis *in vitro*. Dichas técnicas de mutagénesis *in vitro* incluyen la subclonación del polinucleótido en un vector adecuado, la transformación del vector en una cepa "mutadora" tal como la cepa XL-I red de E. coli (Stratagene) y la propagación de las bacterias transformadas durante un número adecuado de generaciones. Los productos derivados del ADN mutado/alterado pueden cribarse fácilmente usando técnicas descritas en el presente documento para determinar si tienen actividad de unión al receptor y/o inhibidora.

Para diseñar mutantes de secuencias de aminoácidos, la localización del sitio de la mutación y la naturaleza de la mutación dependerán de la característica o características a modificar. Los sitios para la mutación pueden modificarse individualmente o en serie, por ejemplo, mediante (1) la sustitución en primer lugar con elecciones de aminoácidos conservativas y después con selecciones más radicales dependiendo de los resultados conseguidos, (2) delección del resto diana o (3) inserción de otros restos adyacentes al sitio localizado.

Las delecciones de la secuencia de aminoácidos generalmente varían de aproximadamente 1 a 15 restos, más preferentemente de aproximadamente 1 a 10 restos y típicamente de aproximadamente 1 a 5 restos contiguos.

Descripción

Los inventores han identificado varios aspectos de relevancia para la funcionalidad y eficacia de agentes terapéuticos biológicos y anticuerpos particulares, y el área principal de la presente invención es anticuerpos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias mediante la inhibición de la unión de C5a a C5aR.

Un aspecto de la divulgación se refiere a uno o más de una serie de anticuerpos que se caracterizan por su funcionalidad y/o la secuencia de aminoácidos de las CDR, la región variable de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras y/o la secuencia del dominio Fc.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa que incluye los dominios de anticuerpo y regiones convencionales.

En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, pudiendo obtenerse dichos fragmentos usando técnicas convencionales de ingeniería de proteínas o recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo de la invención pueden fabricarse por truncamiento, por ejemplo, mediante la eliminación de uno o más aminoácidos de los extremos N y/o C de un polipéptido. También pueden generarse fragmentos por una o más delecciones internas. Un anticuerpo de la invención puede ser, o puede comprender, un fragmento de uno cualquiera de los anticuerpos en los que se basa esta invención. Un anticuerpo de la invención puede ser, o puede comprender, una parte de unión a

antígeno de uno de esos anticuerpos, o variantes de los mismos. Por ejemplo, el anticuerpo de la invención puede ser un fragmento Fab de uno de esos anticuerpos o variantes de los mismos, o puede ser un anticuerpo monocatenario derivado de uno de estos anticuerpos, o una variante del mismo.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser de diferentes especies entre las que se incluyen especies de mamífero tales como ratón, rata, conejo, cerdo o primate no humano. El anticuerpo puede ser un anticuerpo de roedor y, más particularmente, un anticuerpo de ratón. Como alternativa, el anticuerpo puede proceder de una especie que no es un mamífero, tal como un pollo. El anticuerpo puede ser además un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

Un anticuerpo puede tener la capacidad de competir con un anticuerpo de la invención por la unión a C5aR como se describe en el presente documento. Dichos anticuerpos de competición cruzada pueden identificarse basándose en su capacidad de competir de manera cruzada con un anticuerpo conocido de la invención en ensayos de unión convencionales. Dicha competición cruzada puede sugerir que los dos anticuerpos se unen a epítomos idénticos, parcialmente coincidentes o similares.

Anticuerpos humanos

Como se describe en los ejemplos del presente documento, los inventores han identificado una serie de anticuerpos anti-C5aR derivados de ratones transgénicos que incluyen los loci de la línea germinal de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos se aíslan como anticuerpos monoclonales de hibridoma y se evalúan las características de unión. Como se ha mencionado, C5aR es un GPCR con siete dominios transmembrana y no es posible producir una forma soluble que retenga la conformación nativa. Para inducir anticuerpos humanos que bloqueen la unión de hC5a a hC5aR, se inmunizaron ratones transgénicos con células que expresaban hC5aR nativo. Sin embargo, fue muy difícil obtener anticuerpos bloqueantes y los inventores realizaron 32 fusiones antes de identificar un anticuerpo humano que tuviera las propiedades bloqueantes deseadas. A partir de 35 fusiones y el cribado de más de 100.000 sobrenadantes de hibridoma, se obtuvo un total de 11 anticuerpos bloqueantes.

Además, debido a la naturaleza de hC5aR, no fue posible determinar la afinidad de los anticuerpos por un análisis Biacore convencional y, por lo tanto, se establecieron análisis basándose en las lecturas dependientes de hC5aR funcional, a partir de las cuales se determinaron los valores de CI50 y CE50 como se describe en el ejemplo 2 y el ejemplo 7.

En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo humano que se une a C5aR y además se prefiere que el anticuerpo se una específicamente a hC5aR, de manera que la unión a hC5aR sea más fuerte que la unión a C5aR de otra especie tal como, en particular, C5aR de ratón. El anticuerpo se une al 2º bucle de C5aR humano. En una realización, el anticuerpo se une al 2º bucle extracelular de C5aR humano pero no al 2º bucle extracelular de C5aR murino. En otras realizaciones, el anticuerpo de acuerdo con la invención puede unirse al 2º bucle extracelular de C5aR únicamente en la conformación nativa.

La funcionalidad de un anticuerpo anti-C5aR depende de la capacidad de dicho anticuerpo de inhibir o reducir significativamente la unión de C5a a C5aR.

En una realización, el anticuerpo de la invención es capaz de inhibir significativamente o reducir la unión de C5a a C5aR. Esto puede determinarse por un ensayo de desplazamiento (SPA) como se describe en el ejemplo 2 del presente documento, a partir del cual pueden determinarse los valores de CI50. Como es evidente por la tabla 1, los 11 anticuerpos aislados y descritos tienen una concentración CI50 menor de 50 nM. En otra realización de la invención, el anticuerpo es capaz de desplazar hC5a en un ensayo SPA, con una CI50 inferior a 50 nM, tal como inferior a 40 nM, tal como inferior a 30 nM, tal como inferior a 20 nM, tal como inferior a 10 nM, tal como inferior a 5 nM o incluso inferior a 4 nM, o con una CI50 inferior a 3 nM o incluso inferior a 2,5 nM o 2,0 nM.

En otros ensayos se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-C5aR de inhibir la migración dependiente de C5a de neutrófilos humanos y se observó que algunos de los anticuerpos humanos identificados eran inhibidores más potentes de la migración de neutrófilos mediada por C5a que un anticuerpo de C5aR descrito previamente (Q del documento WO 2009/103113). En una realización, el anticuerpo de la invención es capaz de inhibir significativamente la migración de neutrófilos humanos. En una realización, el anticuerpo inhibe la migración a un valor inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 % o inferior al 10 % en comparación con el nivel de migración observado en presencia de C5a 10 nM y sin anticuerpo anti-C5aR. En esta realización, la migración se mide después de 30 minutos en presencia de C5a 10 nM y anticuerpo en comparación con el nivel de migración observado después de 30 minutos en presencia de C5a 10 nM y sin anticuerpo. Como alternativa, la capacidad de un anticuerpo de inhibir la migración de neutrófilos puede expresarse usando valores de CI50 basándose en la misma configuración. En esta realización, la CI50 es inferior a 2,5 µg/ml, tal como inferior a 2,5 µg/ml, tal como inferior a 1,5 µg/ml, tal como inferior a 1,2 µg/ml o incluso inferior a 1,0 µg/ml.

Como alternativa al análisis Biacore convencional, la funcionalidad de los anticuerpos de hC5aR puede determinarse por un ensayo de unión competitiva en neutrófilos como se describe en el ejemplo 7. Esta funcionalidad se denomina

afinidad del anticuerpo y se mide por el ensayo de unión al ligando con competición, pero también podría considerarse la medición de la afección de la interacción. En una realización, la afinidad o afección del anticuerpo medida por el ensayo de unión al ligando con competición en neutrófilos es inferior a 0,80 nM, 0,70 nM, 0,60 nM, tal como inferior a 0,50 nM, 0,45 nM, 0,40 nM o 0,35 nM.

Se exploró otra opción para caracterizar los anticuerpos usando un ensayo de flujo de calcio, que mide la capacidad de un anticuerpo de inhibir la activación de neutrófilos inducida por C5a *ex vivo*, descrita de forma similar en el ejemplo 7. En una realización adicional, la CI50 del anticuerpo determinada en un ensayo de flujo de calcio es inferior a 7,0 µg/ml, tal como inferior a 50 µg/ml, tal como inferior a 2,5 µg/ml.

Pueden usarse otros ensayos *ex vivo* adicionales para determinar la capacidad de un anticuerpo de inhibir o neutralizar la maduración de neutrófilos inducida por C5a basándose en efectos secundarios tales como la expresión de CD11b y CD62L. CD11b y CD62L son marcadores de la maduración de neutrófilos ya que se regulan de manera positiva y negativa, respectivamente, tras la activación por la interacción C5a/C5aR.

Se determinó el efecto en un ensayo de regulación positiva de CD11b. En una realización, la CI50 determinada en un ensayo de regulación de CD11b es inferior a 3,5 µg/ml, tal como 3,0 µg/ml, tal como inferior a 2,5 µg/ml, tal como inferior a 2,0 µg/ml o tal como 1,5 µg/ml o incluso inferior a 1,0 µg/ml.

Asimismo, se determinó el efecto del anticuerpo en un ensayo de regulación negativa de CD62L. En una realización, la CI50 determinada en un ensayo de regulación negativa de CD62L es inferior a 1,8 µg/ml, tal como inferior a 1,5 µg/ml, tal como inferior a 1,2 µg/ml o incluso inferior a 1,0 µg/ml.

Se seleccionaron cuatro anticuerpos monoclonales para secuenciación para determinar la secuencia de las regiones variables y, en particular, las secuencias de CDR. En la figura 1 se presenta un alineamiento de secuencias y las secuencias se incluyen asimismo en el listado de secuencias adjunto.

El listado de secuencias incluye las siguientes secuencias relacionadas con anticuerpos aislados:

SEQ ID NO:1-3: 35F32A3 de Vh CDR 1-3

SEQ ID 4: 35F32A3 de Vh

SEQ ID NO:5-7: 35F32A3 de VI CDR 1-3

SEQ ID 8: 35F32A3 de VI

De manera similar, las SEQ ID NO: 9 -16 describen 32F3A6

De manera similar, las SEQ ID NO: 17 -24 describen 35F12A2

De manera similar, las SEQ ID NO: 25 -32 describen 35F24A3

Anticuerpos definidos por regiones variables o secuencias de CDR

Por lo tanto, un anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación puede definirse basándose en las secuencias de CDR, las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras y modificaciones minoritarias de las mismas que pueden realizarse por el experto en la materia sin alterar la funcionalidad del anticuerpo. Esto incluye sustituciones de aminoácidos, deleciones o inserciones de uno o más, tales como uno, dos o tres restos de aminoácido dentro de cada una de las secuencias de CDR.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo que se une a C5aR definido por la secuencia de las regiones CDR, en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas de los siguientes grupos:

a) SEQ ID 1, 2 y 3, donde ninguna, una, dos o tres de dichas secuencias comprenden 1, 2 o 3 aminoácidos sustituidos con un resto de aminoácido diferente; y

b) SEQ ID 9, 10 y 11, donde ninguna, una, dos o tres de dichas secuencias comprenden 1, 2 o 3 aminoácidos sustituidos con un resto de aminoácido diferente; y

c) SEQ ID 17, 18 y 19, donde ninguna, una, dos o tres de dichas secuencias comprenden 1, 2 o 3 aminoácidos sustituidos con un resto de aminoácido diferente; y

d) SEQ ID 25, 26 y 27, donde ninguna, una, dos o tres de dichas secuencias comprenden 1, 2 o 3 aminoácidos sustituidos con un resto de aminoácido diferente.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo que se une a C5aR, definido por la secuencia de las regiones CDR, en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3;

en donde dicha secuencia de CDR1 comprende las SEQ ID 1, 9, 17, 25 o una de dichas secuencias en donde 1, 2 o 3 aminoácidos están sustituidos con un resto de aminoácido diferente; y

en donde dicha secuencia de CDR2 comprende las SEQ ID 2, 10, 18, 26 o una de dichas secuencias en donde 1, 2 o 3 aminoácidos están sustituidos con un resto de aminoácido diferente; y
 en donde dicha secuencia de CDR3 comprende las SEQ ID 3, 11, 19, 27 o una de dichas secuencias en donde 1, 2 o 3 aminoácidos están sustituidos con un resto de aminoácido diferente.

5 En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo que se une a C5aR definido por la secuencia de las regiones CDR, en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas de los siguientes grupos

- 10 a) SEQ ID 5, 6 y 7, donde ninguna, una, dos o tres de dichas secuencias comprenden 1, 2 o 3 aminoácidos sustituidos con un resto de aminoácido diferente; y
 b) SEQ ID 13, 14 y 15, donde ninguna, una, dos o tres de dichas secuencias comprenden 1, 2 o 3 aminoácidos sustituidos con un resto de aminoácido diferente; y
 15 c) SEQ ID 21, 22 y 23, donde ninguna, una, dos o tres de dichas secuencias comprenden 1, 2 o 3 aminoácidos sustituidos con un resto de aminoácido diferente; y
 d) SEQ ID 29, 30 y 31, donde ninguna, una, dos o tres de dichas secuencias comprenden 1, 2 o 3 aminoácidos sustituidos con un resto de aminoácido diferente.

20 En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo que se une a C5aR, definido por la secuencia de las regiones CDR, en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3; en donde dicha secuencia de CDR1 comprende las SEQ ID 5, 13, 21, 29 o una de dichas secuencias en donde 1, 2 o 3 aminoácidos están sustituidos con un resto de aminoácido diferente; y
 en donde dicha secuencia de CDR2 comprende las SEQ ID 6, 14, 22, 30 o una de dichas secuencias en donde 1, 2 o 3 aminoácidos están sustituidos con un resto de aminoácido diferente; y
 25 en donde dicha secuencia de CDR3 comprende las SEQ ID 7, 15, 23, 31 o una de dichas secuencias en donde 1, 2 o 3 aminoácidos están sustituidos con un resto de aminoácido diferente.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo donde las CDR de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID 1, 2 y 3 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos y donde las CDR de la cadena ligera variable comprenden las SEQ ID 5, 6 y 7 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos.

35 En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo donde las CDR de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID 9, 10 y 11 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos y donde las CDR de la cadena ligera variable comprenden las SEQ ID 13, 14 y 15 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos.

40 En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo donde las CDR de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID 17, 18 y 19 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos y donde las CDR de la cadena ligera variable comprenden las SEQ ID 21, 22 y 23 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos.

45 En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo donde las CDR de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID 25, 26 y 27 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos y donde las CDR de la cadena ligera variable comprenden las SEQ ID 29, 30 y 31 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos.

50 Por lo tanto, un aspecto de la divulgación se refiere a un anticuerpo, en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR comprenden uno de los siguientes grupos de secuencias; SEQ ID 1, 2 y 3, SEQ ID 9, 10 y 11, SEQ ID 17, 18 y 19, SEQ ID 25, 26 y 27 o dichas secuencias con hasta dos sustituciones, delecciones y/o inserciones por secuencia y en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR comprenden uno de los siguientes grupos de secuencias; SEQ ID 5, 6 y 7, SEQ ID 13, 14 y 15, SEQ ID 21, 22 y 23, SEQ ID 29, 30 y 31 o dichas secuencias con hasta dos sustituciones, delecciones y/o inserciones por secuencia.

60 Por lo tanto, un aspecto de la divulgación se refiere a un anticuerpo, en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR comprenden uno de los siguientes grupos de secuencias; SEQ ID 1, 2 y 3, SEQ ID 9, 10 y 11, SEQ ID 17, 18 y 19, SEQ ID 25, 26 y 27 o dichas secuencias con hasta una sustitución, delección y/o inserción por secuencia y en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR comprenden uno de los siguientes grupos de secuencias; SEQ ID 5, 6 y 7, SEQ ID 13, 14 y 15, SEQ ID 21, 22 y 23, SEQ ID 29, 30 y 31 o dichas secuencias con hasta una sustitución, delecciones y/o inserciones por secuencia.

65

Por lo tanto, un aspecto de la divulgación se refiere a un anticuerpo, en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR comprenden uno de los siguientes grupos de secuencias; SEQ ID 1, 2 y 3, SEQ ID 9, 10 y 11, SEQ ID 17, 18 y 19, SEQ ID 25, 26 y 27, y en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR comprenden uno de los siguientes grupos de secuencias; SEQ ID 5, 6 y 7, SEQ ID 13, 14 y 15, SEQ ID 21, 22 y 23, SEQ ID 29, 30 y 31.

Un aspecto de la divulgación se refiere a un anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 80, 85, 90 o 94 % idéntica a la SEQ ID NO: 4, 12, 20 o 28.

En un aspecto, en una realización de la divulgación, la invención se refiere a un anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4, 12, 20 o 28.

Un aspecto de la divulgación se refiere a un anticuerpo en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 80, 85, 90 o 94 % idéntica a la SEQ ID NO 8, 16, 24 o 32.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO 8, 16, 24 o 32.

Por lo tanto, una realización de la divulgación se refiere a un anticuerpo, en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 80, 85, 90 o 94 % idéntica a la SEQ ID NO: 4, 12, 20 o 28 y/o en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 80, 85, 90 o 94 % idéntica a la SEQ ID NO 8, 16, 24 o 32.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo, en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 y/o en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO 8.

En una realización, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo de la invención comprende una secuencia al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 12 y la región variable de la cadena ligera del anticuerpo de la invención comprende una secuencia al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO 16.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo, en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 20 y/o en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO 24.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo, en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 28 y/o en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO 32.

En una realización, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo de la invención comprende una secuencia al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO 39 y la región variable de la cadena ligera del anticuerpo de la invención comprende una secuencia al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO 40.

En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo se identifica por la SEQ ID NO 39 y en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo se identifica por la SEQ ID NO 40.

Durante la maduración de los anticuerpos, pueden producirse mutaciones espontáneas en la región marco, como se describe en el presente documento en los Ejemplos 6 y 7, la región variable de uno de los anticuerpos monoclonales se comparó con secuencias de la línea germinal de anticuerpo humano para identificar la secuencia de líneas germinales humanas más parecida tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. Para minimizar el riesgo de reacción inmunológica, por lo tanto, se decidió optimizar adicionalmente los anticuerpos introduciendo mutaciones puntuales en la región marco para construir un anticuerpo con secuencia de línea germinal humana en las regiones marco, como puede verse en los experimentos, esto no afectó a la funcionalidad del anticuerpo. En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo definido por identidad de secuencia con respecto a una región variable de un anticuerpo de referencia como se describe anteriormente en el presente documento, en donde la región variable de la cadena pesada y/o ligera de dicho anticuerpo comprende una o más mutaciones en la región marco. Puede ser conveniente introducir una o más mutaciones para aumentar la identidad con respecto a la secuencia de línea germinal humana más parecida, aunque también pueden considerarse otras mutaciones. Dicha mutación o mutaciones pueden ser mutaciones conservativas.

Anticuerpos definidos por la región Fc

- La región Fc permite a los anticuerpos activar el sistema inmunitario y pueden modificarse anticuerpos por ingeniería genética para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más de sus propiedades funcionales, tales como la semivida en suero, la fijación del complemento, unión a receptor de Fc, estabilidad de proteínas y/o citotoxicidad dependiente de antígeno o ausencia de la misma. Además, un anticuerpo de la invención se puede modificar químicamente (por ejemplo, se pueden unir uno o más grupos químicos al anticuerpo) se puede modificar para alterar su glucosilación, para alterar de nuevo una o más propiedades del anticuerpo.
- En una realización, el anticuerpo de la invención comprende una región Fc, en donde la región Fc ha reducido o perdido la afinidad de unión a uno o más FcγR.
- En una realización, el anticuerpo de la invención presenta una afinidad de unión reducida a uno o más FcγR en comparación con secuencias de referencia de Fc de IgG1, IgG2, IgG2/4 o IgG4 como se definen por las SEQ ID NO 33, 34, 35 y 36 respectivamente. Como ciertos aminoácidos específicos pueden ser responsables de la interacción de FcγR y de los efectos sobre los que se reflexiona en el presente documento, puede ser ventajoso aplicar un anticuerpo donde dichos restos de aminoácido específicos de la región Fc se hayan sustituido por un aminoácido diferente.
- En una realización, dicha región Fc incluye una o más mutaciones puntuales en comparación con secuencias de referencia de Fc de IgG1, IgG2, IgG4/G2 o IgG4 como se definen en las SEQ ID 33, 34, 35 y 36 respectivamente, reduciendo la afinidad por uno o más receptores de Fcγ o componentes del complemento.
- Para evaluar el resultado de introducir mutaciones puntuales en la región Fc, se evaluaron las funciones efectoras para una serie de anticuerpos anti-C5aR como se describe en el ejemplo 4. Se estableció un ensayo de fagocitosis para medir el papel de la región Fc sobre la capacidad de los anticuerpos anti-hC5aR de inducir la fagocitosis de neutrófilos (que expresaban hC5aR) por monocitos humanos. Como puede verse en la tabla 2, varias variantes de Fc reducen el nivel de fagocitosis inducida por los anticuerpos anti-C5aR en el ensayo descrito.
- En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención no induce significativamente la fagocitosis de neutrófilos *in vitro*, lo que significa que el nivel de fagocitosis no está significativamente por encima del nivel de referencia cuando se mide en ausencia de un anticuerpo anti-C5aR. En una realización, el anticuerpo no produce ninguna inducción detectable de fagocitosis. El ensayo para evaluar el nivel de fagocitosis puede realizarse usando neutrófilos humanos como se describe en el ejemplo 4.
- En ensayos alternativos, se evaluó la capacidad de anticuerpos anti-hC5aR de inducir ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) y CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). Los ensayos se establecieron para ensayar la capacidad de las variantes de Fc de mediar la depleción de células a través de mecanismos dependientes de ADCC o CDC, y se asumió que eran capaces de imitar actividades en un escenario *in vivo*.
- Los ensayos aplican células que expresan hC5aR como células diana y células efectoras (PMBC de las que se han eliminado monocitos) o sueros que contienen complemento para inducir las respuestas descritas en el ejemplo 4.
- En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención no induce significativamente la ADCC, lo que significa que el nivel de ADCC no está significativamente por encima del nivel de referencia cuando se mide en ausencia de un anticuerpo anti-C5aR. En una realización, el anticuerpo no produce ninguna inducción detectable de ADCC, es decir, el nivel de ADCC no está por encima del nivel de referencia.
- En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención no induce significativamente la CDC. En una realización, el anticuerpo no produce ninguna inducción detectable de CDC, es decir, el nivel de CDC no está por encima del nivel de referencia.
- En una realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención comprende una región Fc donde la secuencia se ha modificado para alterar la función o funciones de las células efectoras. La modificación de la secuencia de Fc puede obtenerse por mutaciones puntuales en la secuencia de aminoácidos. La región Fc de cadena pesada puede ser IgG1, IgG2, IgG4 o una secuencia quimérica de IgG2/4. Las secuencias de referencia se definen en el listado de secuencias como se indica a continuación; IgG1 por SEQ ID NO:33, IgG2 por SEQ ID NO:34, IgG2/4 por SEQ ID NO: 35 e IgG4 por SEQ ID NO: 36.
- En una realización, la región Fc es una IgG1 (SEQ ID NO: 33), IgG2 (SEQ ID NO: 34), IgG2/4 (SEQ ID NO: 35) o IgG4 (SEQ ID NO: 36), con una o más de las siguientes mutaciones puntuales
- a. E233P
 - b. L234A o V234A o F234L o F234V
 - c. L235E o L235A
 - d. G236R o G236A

- e. G237A
- f. S239D
- g. S254W
- h. N297Q
- i. L328R
- j. A330S
- k. P331S
- l. I332E

- 5
- 10 La diferencia entre las variantes de Fc reside en su capacidad de interaccionar con FcγR o componentes del sistema de complemento como se ha descrito anteriormente. Las diferencias de secuencia en la región Fc afectan además a la estructura y flexibilidad del anticuerpo, que también pueden afectar a la función del anticuerpo. Tal como se describe en el ejemplo 5 y en la tabla 3, los inventores demuestran además que los anticuerpos anti-hC5aR en los que la región Fc es del tipo IgG1 con o sin mutaciones puntuales adicionales, son inhibidores más potentes de los efectos mediados por hC5aR que anticuerpos correspondientes con la región Fc del tipo IgG4. En consecuencia, los anticuerpos de la invención tienen una región bisagra Fc de isotipo IgG1.

- 20 En una realización, la región Fc de IgG1 comprende de 1 a 10 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de referencia de Fc de IgG1 como se define en la SEQ ID NO.33. Se prefiere que las regiones Fc comprendan menos mutaciones, tales como de 1 a 8 sustituciones de aminoácidos dentro de AA 231 a 240, o tales como de 1 a 5 sustituciones de aminoácidos dentro de AA 328 a 334. Las sustituciones de aminoácidos se seleccionan preferentemente entre sustituciones que reducen la capacidad del anticuerpo de inducir significativamente la fagocitosis de neutrófilos, la ADCC y/o la CDC *in vitro* como se ha descrito anteriormente.

- 25 En una realización, la región Fc de anticuerpo es una IgG1 que comprende una o más de las siguientes mutaciones puntuales:

- 30
- a) N297Q y/o
 - b) L234A y/o
 - c) L235E o L235A y/o
 - d) G236R o G236A y/o
 - e) G237A y/o
 - f) L328R y/o
 - g) A330S y/o
 - h) P331S.
- 35

En una realización, la región Fc de anticuerpo es una IgG1 que comprende uno o más de los siguientes grupos de mutaciones puntuales:

- 40
- a) N297Q y/o
 - b) L234A y L235E y/o
 - c) L234A y G236R y/o
 - d) L235E y G236R y/o
 - e) L234A, L235E y G236R y/o
 - 45 f) G236R y L328R y/o
 - g) N297Q, L234A y L235E y/o
 - h) N297Q, L234A, L235E y G236R y/o
 - i) N297Q, L234A, L235E y G237A y/o
 - j) L234A, L235E, G237A, A330S y P331S.
 - 50 k) N297Q, L234A, L235E, G237A, A330S y P331S.

En una realización, la región Fc de anticuerpo es una IgG1 que comprende uno o más de los siguientes grupos de mutaciones puntuales:

- 55
- a) N297Q y/o
 - b) L234A y L235E y/o
 - c) G236R y L328R y/o
 - d) N297Q, L234A y L235E y/o
 - e) N297Q, L234A, L235E y G237A y/o
 - 60 f) L234A, L235E, G237A, A330S y P331S.

- 65 Será evidente para el experto en la materia que pueden introducirse mutaciones puntuales dentro de la región marco de las cadenas tanto pesadas como ligeras basándose en criterios convencionales para sustituir restos de aminoácido. Pueden usarse ensayos funcionales como los descritos en el presente documento para confirmar que dichas mutaciones no influyen en la funcionalidad del anticuerpo.

Como será evidente de lo anterior, la especificidad de unión de los anticuerpos identificados se proporciona por las regiones variables o CDR, y es evidente que la invención incluye diferentes tipos de anticuerpos que poseen una región de unión a antígeno similar.

En una realización de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. En una realización de la invención, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo monocatenario. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Como se describe en la parte de definición de la solicitud, un anticuerpo humanizado incluye al menos regiones CDR no derivadas de la secuencia de línea germinal humana. Como es evidente además de lo anterior, un anticuerpo humano puede comprender una o más mutaciones puntuales en comparación con la secuencia de línea germinal, pero generalmente se considera que la secuencia debería tener, al menos en la región marco o región Fc, al menos un 95 % de identidad con secuencias de la línea germinal humana.

Formulaciones farmacéuticas

La presente invención incluye además composiciones/formulaciones farmacéuticas, que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polipéptido o anticuerpo de acuerdo con la invención, así como kits que comprenden dichas composiciones.

El anticuerpo de acuerdo con la invención, en un aspecto de la invención, puede formularse en una composición farmacéutica. Dicha composición farmacéutica puede prepararse basándose en el conocimiento general en el campo, tal como en la Farmacopea o en Remington.

En una realización, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La formulación puede estar en forma de una formulación acuosa o una formulación seca que se reconstituye en agua o una composición de tampón acuoso antes de la administración.

Una composición farmacéutica de anticuerpos de acuerdo con la invención puede comprender una sal y/o tampón, tales como las composiciones descritas en el documento WO2011/104381.

En otras realizaciones, la composición farmacéutica de anticuerpos de acuerdo con la invención puede ser adecuada para múltiples usos, tales como las composiciones descritas en el documento WO2011/147921.

Método de tratamiento

Un aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo de la invención para uso en un método para tratar o prevenir un trastorno en un sujeto, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéutica de un anticuerpo como se describe en el presente documento. Como se ha descrito en publicaciones previas tales como el documento WO 2009/103113, los anticuerpos anti-C5aR se pueden utilizar/son adecuados para el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos. Por lo tanto, una realización de la invención se refiere a un anticuerpo de la invención para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno inmunológico, en particular, una enfermedad inflamatoria. El ejemplo 8 del presente documento confirma esto adicionalmente demostrando la funcionalidad de un anticuerpo anti-C5aR de acuerdo con la invención en un modelo de artritis en ratones. Los ejemplos 9-11 demuestran la regulación positiva de C5aR en muestras de tejido de pacientes con artritis psoriásica, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. También se demuestra que un anticuerpo anti-C5aR puede inhibir la migración celular de PMN inducida por líquido sinovial de pacientes con artritis psoriásica.

Un método de tratamiento puede tener como objetivo la curación de una enfermedad o trastorno, pero en relación con algunas enfermedades entre las que se incluyen enfermedades inmunológicas e inflamatorias, tales como una enfermedad o trastorno crónico, también se considera un tratamiento el alivio de uno o más síntomas, lo cual puede ser una mejoría significativa del sujeto incluso si solo se obtiene un alivio parcial de los síntomas o el efecto es solo temporal o parcial.

El anticuerpo de la invención puede usarse en el tratamiento de una o más enfermedades entre las que se incluyen, pero sin limitación, artritis reumatoide (AR), psoriasis, artritis psoriásica, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis por lupus, diabetes de tipo I, enfermedad de Grave, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn (EC), colitis ulcerosa (CU), síndrome del intestino irritable, esclerosis múltiple (EM), miocarditis autoinmunitaria, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de las arterias coronarias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad pulmonar intersticial, tiroiditis autoinmunitaria, esclerodermia, esclerosis sistémica, osteoartritis, dermatitis atópica, vitíligo, enfermedad de injerto contra hospedador, síndrome de Sjogren, nefritis autoinmunitaria, síndrome de Goodpasture, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, vasculitis asociada a ANCA, uveítis, esclerodermia, pénfigo ampolloso, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Huntington, fibrosis quística, gota, degeneración macular asociada a la edad, alergia, asma y otras enfermedades autoinmunitarias que son el resultado de una inflamación aguda o crónica. En otra realización, la enfermedad o trastorno es una inflamación aguda o crónica, en donde el trastorno puede ser una enfermedad autoinmunitaria. En

una realización, el trastorno es artritis reumatoide (AR), artritis psoriásica, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis por lupus, enfermedad inflamatoria intestinal (EII) incluyendo enfermedad de Crohn (EC) o colitis ulcerosa (CU) o síndrome del intestino irritable. En otras realizaciones, el trastorno es AR o LES. Aparte de en enfermedades crónicas, los anticuerpos anti-C5aR pueden ser pertinentes en relación con indicaciones agudas tales como trasplantes, lesión de isquemia/reperfusión (por ejemplo, infarto de miocardio agudo, ictus), septicemia (por ejemplo, SRIS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), SDMO (síndrome de disfunción multiorgánica), LPA (lesión pulmonar aguda)), aterosclerosis y hemorragia intracerebral (HIC).

En otro aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo, un anticuerpo aislado o composición de anticuerpo como se describe en el presente documento, para el tratamiento de una enfermedad o trastorno. En otra realización, dicho anticuerpo, anticuerpo aislado o composición de anticuerpo es para el tratamiento de una o más de las enfermedades y trastornos descritos en el presente documento anteriormente en relación con un método de tratamiento.

Un aspecto de la invención se refiere al uso de un anticuerpo, un anticuerpo aislado o composición de anticuerpo como se describe en el presente documento, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, en donde la enfermedad o trastorno puede ser como se ha descrito anteriormente en el presente documento en relación con un método de tratamiento.

MODO DE ADMINISTRACIÓN

Un anticuerpo de la invención se puede administrar por vía parenteral, tal como por vía intravenosa, tal como por vía intramuscular, tal como por vía subcutánea. Como alternativa, un anticuerpo de la invención se puede administrar por una vía no parenteral, tal como por vía peroral o tópica. Un anticuerpo de la invención se puede administrar profilácticamente. En una realización preferida, el anticuerpo se administra por vía intravenosa o subcutánea.

La dosificación y programación de tiempos de administración dependerá muy probablemente de diversos factores entre los que se incluyen la enfermedad/trastorno o los síntomas de interés así como el sujeto en cuestión. En general, es de esperar que el anticuerpo se administre en dosis de desde 0,010 mg/kg hasta 4-6 mg/kg. Análogamente, el régimen de dosificación del anticuerpo también dependerá del sujeto individual y de la patología de dicho sujeto, pero es deseable de acuerdo con la invención emplear un tratamiento en el que el anticuerpo (o composición de anticuerpo) se administre al sujeto una vez por semana o cada 2 semanas o, incluso, a intervalos inferiores, tales como una vez al mes.

Un anticuerpo de la invención se puede administrar a petición, es decir, el anticuerpo se puede administrar basándose en la experiencia de los pacientes, por ejemplo, cuando aparecen síntomas particulares o cuando la cantidad de biomarcadores particulares alcanza un nivel predefinido.

TRATAMIENTOS COMBINADOS ESPECÍFICOS

Los anticuerpos de la invención pueden coadministrarse con uno o más de otros agentes terapéuticos o formulaciones. El otro agente puede ser un agente que potencie los efectos de los anticuerpos de la invención. El otro agente puede estar destinado a tratar otros síntomas o afecciones del paciente. Por ejemplo, el otro agente puede ser un analgésico, un inmunosupresor o un agente antiinflamatorio. El otro agente puede ser otro anticuerpo monoclonal, tal como uno de los descritos en las solicitudes de patente internacional WO 2008/022390 y WO 2009/103113.

La administración combinada de dos o más agentes puede conseguirse de varias maneras diferentes. En una realización, el anticuerpo y el otro agente pueden administrarse juntos en una sola composición. En otra realización, el anticuerpo y el otro agente pueden administrarse en composiciones separadas como parte de una terapia combinada. Por ejemplo, el modulador puede administrarse antes, después o al mismo tiempo que el otro agente.

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden administrarse junto con otros fármacos (por ejemplo, metotrexato, dexametasona y prednisona) y/u otros fármacos biológicos. En una realización de acuerdo con la invención, un anticuerpo puede coadministrarse con uno o más agentes terapéuticos seleccionados del código ATC clase M01C de fármacos antirreumáticos y del código ATC L04 de inmunosupresores como se describe en el documento WO 2009/103113 entre los que se incluyen, pero sin limitación, azatioprina, cloroquina, hidroxiclороquina, ciclosporina, D-penicilamina, sales de oro (aurotiomalato sódico, auranofin), leflunomida, metotrexato, minociclina, sulfasalazina y ciclofosfamida, glucocorticosteroides, ácido micofenólico o micofenolato y tacrolimus y, en una realización distinta, uno o más de Plaquenil, Azulfidina y Metotrexato, dexametasona y/o prednisona.

En otro ejemplo, los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse en combinación con otros anticuerpos (por ejemplo, en combinación con anticuerpos que se unen a receptores de quimiocinas, incluyendo, pero sin limitación, CCR2 y CCR3) o con anti-TNF u otros agentes antiinflamatorios o con productos de plasma sanguíneo existentes, tales como productos de gammaglobulinas e inmunoglobulinas disponibles en el mercado

usados en tratamientos profilácticos o terapéuticos. Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse como composiciones administradas por separado proporcionadas junto con antibióticos y/o agentes antimicrobianos.

Por consiguiente, pueden administrarse anticuerpos en combinación con agentes tales como agentes que ya se están usando en autoinmunidad que incluyen, aunque no de forma limitativa, inmunomoduladores tales como IFN-beta, Orencia™ (CTLA4-Ig), Humira™ (anti-TNF), Cimzia™ (anti-TNF, PEG Fab), Tysabri™ (mAb de integrina α4), Simponi™, Rituxan/MabThera™, Actemra/RoActemra™, Kineret™, Raptiva, Ustekinumab, antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tales como Asprin™, Ibuprofen™ etc., Corticosteroides, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDS) tales como Plaquenil™, Azulfidine™, Methotrexate™, etc., Copaxone™ (acetato de glatiramer), Gilneya™ (fingolimod), antibióticos tales como Flagyl™, Cipro™, medicamentos tópicos (aplicados a la piel) entre los que se incluyen corticosteroides tópicos, cremas de análogos de vitamina D (Dovonex™), retinoides tópicos (Tazorac™), hidratantes, inmunomoduladores tópicos (tacrolimus y pimecrolimus), alquitrán, antralina y otros, y adicionalmente, también puede combinarse con el tratamiento que usa anticuerpos de acuerdo con la invención, fototerapia tal como PUVA, UVB y CellCept™ (micofenolato mofetil).

Es posible que el sujeto a tratar ya se esté tratando con uno o más fármacos distintos, en este caso el anticuerpo de la invención puede añadirse a dicho régimen de tratamiento.

Método para la preparación de anticuerpos

Un anticuerpo puede prepararse por diversos métodos conocidos en la técnica, principalmente basándose en clones de hibridoma para la producción del anticuerpo o expresión del anticuerpo en un hospedador recombinante, describiéndose esto último en el documento WO2010/000864. Basándose en el conocimiento en la técnica, puede construirse una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena de anticuerpo deseada y usarse para expresión recombinante de un anticuerpo donde la cadena pesada y ligera pueden expresarse a partir de uno o dos polinucleótidos separados.

La presente invención, en un aspecto adicional, se refiere a uno o más polinucleótidos aislados que codifican una secuencia polipeptídica de una cadena de anticuerpo de un anticuerpo descrito en el presente documento.

Otro aspecto se refiere a una célula hospedadora que comprende uno o más polinucleótidos que codifican una o más secuencias polipeptídicas de una cadena de anticuerpo de un anticuerpo descrito en el presente documento.

La invención se refiere además a un proceso para producir un anticuerpo de acuerdo con la invención, que comprende cultivar una célula hospedadora descrita anteriormente en condiciones que soportan la expresión de una o más secuencias polipeptídicas de una cadena de anticuerpo. El proceso puede incluir además que las cadenas de anticuerpo se codifiquen por dos marcos de lectura abiertos separados en un polinucleótido contiguo y, opcionalmente, que el anticuerpo se recupere a partir de dicho cultivo de células hospedadoras.

La presente divulgación incluye además los siguientes aspectos.

1. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dicha secuencia de CDR1 comprende la SEQ ID 1 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos y/o en donde dicha secuencia de CDR2 comprende la SEQ ID 2 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos y/o en donde dicha secuencia de CDR3 comprende la SEQ ID 3 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos.

2. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR comprenden las SEQ ID 1, 2 y 3 o variantes de dichas secuencias, en donde 1, 2 o 3 aminoácidos están sustituidos por un resto de aminoácido diferente.

3. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR son idénticas a las SEQ ID 1, 2 y 3.

4. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dicha secuencia de CDR1 comprende la SEQ ID 5 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos y/o en donde dicha secuencia de CDR2 comprende la SEQ ID 6 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos y/o en donde dicha secuencia de CDR3 comprende la SEQ ID 7 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, delecciones o inserciones de aminoácidos.

5. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR comprenden las SEQ ID 5, 6 y 7 o

variantes de dichas secuencias en donde 1, 2 o 3 aminoácidos están sustituidos por un resto de aminoácido diferente.

6. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR son idénticas a las SEQ ID 5, 6 y 7.

7. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada se define como en cualquiera de 1, 2 o 3 y en donde la región variable de la cadena ligera se define como en cualquiera de 4, 5 o 6.

8. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dicha secuencia de CDR1 comprende la SEQ ID 9 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos y/o en donde dicha secuencia de CDR2 comprende la SEQ ID 10 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos y/o en donde dicha secuencia de CDR3 comprende la SEQ ID 11 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos.

9. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR comprenden las SEQ ID 9, 10 y 11 o variantes de dichas secuencias, en donde 1, 2 o 3 aminoácidos están sustituidos por un resto de aminoácido diferente.

10. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR son idénticas a las SEQ ID 9, 10 y 11.

11. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dicha secuencia de CDR1 comprende la SEQ ID 13 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos y/o

en donde dicha secuencia de CDR2 comprende la SEQ ID 14 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos y/o en donde dicha secuencia de CDR3 comprende la SEQ ID 15 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos.

12. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR comprenden las SEQ ID 13, 14 y 15 o variantes de dichas secuencias, en donde 1, 2 o 3 aminoácidos están sustituidos por un resto de aminoácido diferente.

13. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR son idénticas a las SEQ ID 13, 14 y 15.

14. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada se define como en cualquiera de 8, 9 o 10 y en donde la región variable de la cadena ligera se define como en cualquiera de 11, 12 o 13.

15. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dicha secuencia de CDR1 comprende la SEQ ID 17 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos y/o en donde dicha secuencia de CDR2 comprende la SEQ ID 18 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos y/o en donde dicha secuencia de CDR3 comprende la SEQ ID 19 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos.

16. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR comprenden las SEQ ID 17, 18 y 19 o variantes de dichas secuencias, en donde 1, 2 o 3 aminoácidos están sustituidos por un resto de aminoácido diferente.

17. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR son idénticas a las SEQ ID 17, 18 y 19.

18. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dicha secuencia de CDR1 comprende la SEQ ID 21 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos y/o en donde dicha secuencia de CDR2 comprende la SEQ ID 22 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos y/o en donde dicha secuencia de CDR3 comprende la SEQ ID 23 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos.

19. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR comprenden las SEQ ID 21, 22 y 23 o variantes de dichas secuencias, en donde 1, 2 o 3 aminoácidos están sustituidos por un resto de aminoácido diferente.
20. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR son idénticas a las SEQ ID 21, 22 y 23.
21. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada se define como en cualquiera de 15, 16 o 17 y en donde la región variable de la cadena ligera se define como en cualquiera de 18, 19 o 20.
22. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dicha secuencia de CDR1 comprende la SEQ ID 25 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos y/o en donde dicha secuencia de CDR2 comprende la SEQ ID 26 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos y/o en donde dicha secuencia de CDR3 comprende la SEQ ID 27 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos.
23. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR comprenden las SEQ ID 25, 26 y 27 o variantes de dichas secuencias, en donde 1, 2 o 3 aminoácidos están sustituidos por un resto de aminoácido diferente.
24. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR son idénticas a las SEQ ID 25, 26 y 27.
25. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dicha secuencia de CDR1 comprende la SEQ ID 29 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos y/o en donde dicha secuencia de CDR2 comprende la SEQ ID 30 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos y/o en donde dicha secuencia de CDR3 comprende la SEQ ID 31 o dicha secuencia con 1, 2 o 3 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos.
26. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR comprenden las SEQ ID 29, 30 y 31 o variantes de dichas secuencias, en donde 1, 2 o 3 aminoácidos están sustituidos por un resto de aminoácido diferente.
27. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR son idénticas a las SEQ ID 29, 30 y 31.
28. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada se define como en cualquiera de 2, 23 o 24 y en donde la región variable de la cadena ligera se define como en cualquiera de 25, 26 o 27.
29. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 80, 85, 90 o 94 % idéntica a la SEQ ID NO: 4, 12, 20 o 28.
30. El anticuerpo de acuerdo con 29, en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una o más mutaciones en la región marco.
31. El anticuerpo de acuerdo con 29, en donde dicha o dichas mutaciones son mutaciones conservativas.
32. El anticuerpo de acuerdo con 29, en donde dicha o dichas mutaciones aumentan la identidad con la secuencia de la línea germinal humana más parecida.
33. El anticuerpo de acuerdo con 32, en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo se identifica por la SEQ ID NO 39.
34. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 80, 85, 90 o 94 % idéntica a la SEQ ID NO: 8, 16, 24 o 32.
35. El anticuerpo de acuerdo con 34, en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una o más mutaciones en la región marco.

36. El anticuerpo de acuerdo con 35, en donde dicha o dichas mutaciones son mutaciones conservativas.
37. El anticuerpo de acuerdo con 35, en donde dicha o dichas mutaciones aumentan la identidad con la secuencia de la línea germinal humana más parecida.
38. El anticuerpo de acuerdo con 34, en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo se identifica por la SEQ ID NO 40.
39. Un anticuerpo en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 80, 85, 90 o 94 % idéntica a la SEQ ID NO: 4, 12, 20 o 28 y en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 80, 85, 90 o 94 % idéntica a la SEQ ID NO: 8, 16, 24 o 32.
40. El anticuerpo de acuerdo con 39, en donde la secuencia de dichas regiones variables de cadena pesada tiene al menos un 96 %, tal como un 97 %, tal como un 98 % o tal como un 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 4, 12, 20 o 28 y en donde la secuencia de dicha región variable de cadena ligera tiene al menos un 96 %, tal como un 97 %, tal como un 98 % o tal como un 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 8, 16, 24 o 32.
41. El anticuerpo de acuerdo con 39 o 40, en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una o más mutaciones en la región marco y/o en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una o más mutaciones en la región marco.
42. El anticuerpo de acuerdo con 41, en donde dicha o dichas mutaciones son mutaciones conservativas.
43. El anticuerpo de acuerdo con 41, en donde dicha o dichas mutaciones aumentan la identidad con la secuencia de la línea germinal humana más parecida.
44. El anticuerpo de acuerdo con 41, en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo se identifica por la SEQ ID NO 39 y/o en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo se identifica por la SEQ ID NO 40.
45. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1 a 44, en donde dicho anticuerpo se une a C5aR.
46. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1 a 45, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo monocatenario.
47. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-46, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
48. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-47, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humano, de ratón, rata, conejo, cerdo o primate no humano.
49. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-48, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo de ratón o humano.
50. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-49, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.
51. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-50, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humano.
52. Un anticuerpo humano que se une a C5aR.
53. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-52, en donde dicho anticuerpo se une a C5aR humano.
54. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-53, en donde dicho anticuerpo se une al segundo bucle extracelular de C5aR.
55. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-54, en donde dicho anticuerpo se une al segundo bucle extracelular de C5aR.
56. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-55, en donde dicho anticuerpo se une a C5aR humano pero no a C5aR murino.
57. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-56, en donde dicho anticuerpo se une al segundo bucle extracelular de C5aR humano pero no al segundo bucle extracelular de C5aR murino.

58. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-57, en donde dicho anticuerpo se une al segundo bucle extracelular de C5aR humano únicamente en la conformación nativa.
- 5 59. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-58, en donde el anticuerpo inhibe o reduce significativamente la unión de C5a a C5aR humano.
60. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-59, en donde el anticuerpo es capaz de desplazar a C5a en un ensayo SPA, con una CI50 inferior a 10 nM o inferior a 5 nM o, preferentemente, inferior a 3 nM.
- 10 61. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-60, en donde al anticuerpo inhibe significativamente la migración de neutrófilos humanos *in vitro*.
- 15 62. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-61, en donde el anticuerpo reduce la migración a un valor inferior al 50 %, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 15 % o inferior al 10 %, cuando se mide después de 30 minutos en presencia de C5a 10 nM en comparación con el nivel de migración observado después de 30 minutos en presencia de C5a 10 nM y en ausencia de anticuerpo o en donde la CI50 en el mismo escenario está por debajo de 2,5 µg/ml, tal como por debajo de 2,5 µg/ml, tal como por debajo de 1,5 µg/ml, tal como por debajo de 1,2 µg/ml o incluso por debajo de 1,0 µg/ml.
- 20 63. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-62, en donde la afinidad del anticuerpo medida por un ensayo de unión competitiva a ligando sobre neutrófilos está por debajo de 0,80 nM, tal como por debajo de 0,50 µM o 0,35 µM.
- 25 64. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-63, en donde el anticuerpo neutraliza la activación de neutrófilos inducida por C5a *ex vivo* con un valor de CI50, determinado en un ensayo de flujo de calcio, inferior a 7,0 µg/ml, tal como inferior a 5,0 µg/ml, tal como inferior a 2,5 µg/ml.
- 30 65. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-64, en donde el anticuerpo inhibe la maduración de neutrófilos inducida por C5a *ex vivo* con
- 35 a. una CI50 determinada en un ensayo de regulación positiva por CD11b inferior a 3,5 µg/ml, tal como inferior a 2,5 µg/ml, tal como inferior a 1,5 µg/ml o incluso inferior a 1,0 µg/ml o
- b. una CI50 determinada en un ensayo de regulación negativa por CD62L inferior a 1,8 µg/ml, tal como inferior a 1,5 µg/ml, tal como inferior a 1,2 µg/ml o incluso inferior a 1,0 µg/ml.
- 40 66. Un anticuerpo que se une a C5aR, en donde la región Fc tienen una afinidad reducida/unión reducida a uno o más receptores de Fcy en comparación con secuencias de referencia de Fc de IgG1, IgG2, IgG4 o IgG4/G2 como se definen por las SEQ ID NO 33, 34, 35 y 36, respectivamente.
- 45 67. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-66, en donde la región Fc incluye una o más mutaciones puntuales en comparación con secuencias de referencia de Fc de IgG1, IgG2, IgG4 o IgG4/G2 como se definen por las SEQ ID 33, 34, 35 y 36 respectivamente, reduciendo la afinidad por uno o más receptores de Fcy.
68. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-67, en donde el anticuerpo no induce significativamente la fagocitosis de neutrófilos *in vitro*.
69. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-68, en donde el anticuerpo no induce significativamente la ADCC *in vitro*.
- 50 70. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-69, en donde el anticuerpo no induce significativamente la CDC *in vitro*.
- 55 71. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-70, en donde la región Fc es IgG1 (SEQ ID NO: 33), IgG2 (SEQ ID NO: 34), IgG2/4 (SEQ ID NO: 35) o IgG4 (SEQ ID NO: 36), con una o más de las siguientes mutaciones puntuales
- 60 a. E233P
- b. L234A o V234A o F234L o F234V
- c. L235E o L235A
- 65 d. G236R o G236A
- e. G237A
- f. N297Q
- g. L328R
- h. A330S
- i. P331S

72. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-71, en donde la región Fc es IgG1 o un mutante de IgG1.
- 5 73. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-72, en donde la región Fc es un mutante de Fc de IgG1 que comprende de 1 a 10 sustituciones de aminoácidos en comparación con la referencia de Fc de IgG1 como se define en la SEQ ID NO. 33.
- 10 74. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-73, en donde la región Fc es un mutante de Fc de IgG1 que comprende de 1 a 8 sustituciones de aminoácidos en AA 231 a 240 en donde la secuencia de referencia de Fc de IgG1 es como se define en la SEQ ID NO. 33.
- 15 75. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-74, en donde la región Fc es un mutante de Fc de IgG1 que comprende de 1 a 5 sustituciones de aminoácidos en comparación con AA 328 a 334 en donde la secuencia de referencia de Fc de IgG1 es como se define en la SEQ ID NO. 33.
- 20 76. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-75, en donde la región Fc del anticuerpo es IgG1, con uno o más de los siguientes grupos de mutaciones puntuales
- a. N297Q y/o
 - b. L234A y L235E y/o
 - c. G236R y L328R y/o
 - d. N297Q, L234A y L235E y/o
 - e. N297Q, L234A, L235E y G237A y/o
 - f. L234A, L235E, G237A, A330S y P331S.
- 25 77. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 52-76, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo monocaténario.
- 30 78. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-77, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 35 79. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-78, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humano, de ratón, rata, conejo, cerdo o primate no humano.
80. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-79, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo de ratón o humano.
- 40 81. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-80, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado.
82. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-81, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humano.
- 45 83. un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1-82 para el tratamiento de una enfermedad o trastorno inmunológico.
84. El anticuerpo de acuerdo con 83, en donde la enfermedad es una enfermedad inflamatoria.
- 50 85. El anticuerpo de acuerdo con 83, en donde el trastorno es una inflamación aguda o crónica.
86. El anticuerpo de acuerdo con 83, en donde el trastorno es una enfermedad autoinmunitaria.
- 55 87. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 83-86, en donde el anticuerpo se administra por vía intravenosa o subcutánea.
88. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 83-87, en donde el anticuerpo se administra en dosis de 0,010 mg/kg hasta 6 mg/kg.
- 60 89. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 83-88, en donde el anticuerpo se administra una vez por semana o cada 2 semanas.
90. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 83-89, en donde el anticuerpo se administra en combinación con otro fármaco.
- 65 91. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 83-90 en donde la enfermedad o trastornos es artritis reumatoide (AR), artritis psoriásica, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis por lupus, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn (EC), colitis ulcerosa (CU) o síndrome del intestino irritable.

92. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 83-91, en donde el paciente se está tratando con otro fármaco tal como metotrexato.
- 5 93. Un método para tratar o prevenir un trastorno en un sujeto, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéutica de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1 a 82.
94. El método de acuerdo con 93, en donde el trastorno es una enfermedad o trastorno inmunológico.
- 10 95. El método de acuerdo con 93 o 94, en donde el anticuerpo se administra por vía intravenosa o subcutánea.
96. El método de acuerdo con cualquiera de 93-95, en donde el anticuerpo se administra en dosis de desde 0,010 mg/kg hasta 6 mg/kg.
- 15 97. El método de acuerdo con cualquiera de 93-96, en donde el anticuerpo se administra una vez por semana o cada 2 semanas.
98. El método de acuerdo con cualquiera de 93-97, en donde el anticuerpo se administra junto con al menos otro fármaco.
- 20 99. El método de acuerdo con cualquiera de 93-98, en donde el trastorno es un trastorno inmunopatológico tal como una enfermedad autoinmunitaria.
100. el método de acuerdo con cualquiera de 93-99, en donde el sujeto es un paciente que padece artritis reumatoide (AR), artritis psoriásica, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis por lupus, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn (EC), colitis ulcerosa (CU) o síndrome del intestino irritable.
- 25 101. El método de acuerdo con cualquiera de 93-101, en donde el paciente se está tratando con otro fármaco.
102. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1 a 82 opcionalmente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 103. La composición farmacéutica de acuerdo con 102, en forma de una formulación acuosa o una formulación seca que se reconstituye en agua/un tampón acuoso antes de la administración.
- 35 104. Un polinucleótido aislado que codifica una o más secuencias polipeptídicas de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1 a 82.
105. Una célula hospedadora que comprende uno o más polinucleótidos de acuerdo con 104.
- 40 106. Un proceso para producir un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1 a 82, que comprende cultivar una célula hospedadora de acuerdo con 105 en condiciones que soportan la expresión de una o más secuencias polipeptídicas de dicho anticuerpo.
- 45 107. El procedimiento de acuerdo con 106, en donde la cadena pesada y la cadena ligera se codifican por dos marcos de lectura abiertos separados en un polinucleótido contiguo.
108. El proceso de acuerdo con 106 o 107, que comprende además recuperar dicho anticuerpo del cultivo de la célula hospedadora.
- 50 109. Uso de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1 a 82 para la fabricación de un medicamento.
110. Uso de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de 1 a 82 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastornos inmunológico tal como artritis reumatoide (AR), artritis psoriásica, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis por lupus, enfermedad inflamatoria intestinal (EII) o síndrome del intestino irritable.
- 55

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos anti hC5aR humanos

Inmunización y cribado

En general, la producción de anticuerpos contra GPCR es difícil porque es muy difícil, si no imposible, producir proteínas solubles que tengan la conformación de la proteína nativa correcta. Tradicionalmente, se han usado células que sobreexpresan GPCR para inmunización, pero las respuestas de anticuerpo resultantes suelen ser muy inespecíficas, lo que hace que sea difícil identificar anticuerpos que tengan el perfil deseado, es decir, que sean

capaces de bloquear la unión al ligando y la señalización de GPCR. De hecho, los inventores observaron que era muy difícil desarrollar anticuerpos anti-hC5aR humanos que pudieran bloquear C5a al unirse a C5aR, y se aplicaron varias estrategias de inmunización antes de identificar estos anticuerpos.

Se inmunizaron ratones HumAb (Medarex) con células L1.2 de ratón (una línea de linfoma de células B de ratón) con alta expresión de C5aR humano (~80.000 copias por célula) (Lee et al Nat. Biotechnol, 2006; 10:1279-1284) y se usaron esplenocitos de ratones inmunizados para fusiones celulares usando procedimientos convencionales. Debido a la ausencia de hC5aR soluble, no pudieron cribarse los sobrenadantes en un ensayo ELISA convencional y, por lo tanto, se estableció un ensayo de unión basado en células. Los sobrenadantes de hibridoma obtenidos se ensayaron con respecto a la unión a una línea de células de rata transfectadas (RBL) que expresaban de manera estable un alto número (~1.000.000 copias por célula) de hC5aR nativo por análisis de FACS como se describe en el documento WO2008/022390. En general, los sobrenadantes de hibridoma se incubaron con una mezcla de células no transfectadas (marcadas con CellTracker) y células transfectadas con hC5aR, o neutrófilos de ratones knock-out/knock-in (KOKI) para hC5aR (documento WO 2005/060739) y se incubaron con F(ab')₂ de cabra anti-IgG humana, conjugado con APC (IgG-APC). Se identificaron los sobrenadantes que se unían a células transfectadas con hC5aR pero no a células no transfectadas, y se subclonaron y ensayaron los hibridomas que producían anti-hC5aR con respecto a la unión a neutrófilos humanos y neutrófilos derivados de médula ósea aislados de ratones KOKI (datos no mostrados). Se purificaron anticuerpos anti-hC5aR a partir de los sobrenadantes de hibridoma usando proteína A sepharose y protocolos convencionales.

Ejemplo 2: Identificación y caracterización de anticuerpos anti-hC5aR

Como ya se ha mencionado, el proceso de obtención de anticuerpos anti-hC5aR humanos fue problemático y tenían que realizarse 32 fusiones antes de identificar un anticuerpo bloqueante de hC5a/hC5aR. A partir de 35 fusiones y del cribado de más de 100.000 sobrenadantes de hibridoma, solo se identificaron 11 clones que pudieran bloquear la unión de hC5a a hC5aR. A continuación se describen los ensayos aplicados en la caracterización de los anticuerpos. El anticuerpo de referencia (Ref. Ab Q) se describe en el documento WO2009/103113. Además, en el ejemplo 7 se describen ensayos adicionales adecuados para determinar la afinidad y funcionalidad en un ensayo de flujo de calcio y en la regulación positiva por CD11b.

Ensayo de desplazamiento

Se aplicó un ensayo de centelleo por proximidad (SPA) para determinar la potencia de los anticuerpos anti-hC5aR de desplazar la unión de hC5a a hC5aR. En la patente de Estados Unidos 4568649 se proporciona una descripción detallada del SPA y protocolos proporcionados por el fabricante (Amersham Biosciences). En resumen, se unen fragmentos de membrana que llevan receptor, purificados a partir de células RBL-hC5aR, a micropartículas de centelleo recubiertas con aglutinina de germen de trigo (WGA). Después de la adición de un trazador de hC5a radiomarcado (¹²⁵I), la unión a los receptores producirá la emisión de luz desde las partículas. De forma específica para el principio del SPA, solo emitirán luz los radioisótopos y partículas que se encuentren en proximidad inmediata entre sí. Es decir, solo la hC5a radiomarcada unida a un receptor está suficientemente próxima a una partícula de WGA como para producir luz. Por lo tanto, la cantidad de luz emitida es una expresión de la cantidad de ¹²⁵I-hC5a unida al receptor. El ensayo es un ensayo competitivo, en el que anti-hC5aR/hC5a sin marcar compite con el trazador por la unión a los receptores. En el ensayo, se añade una cantidad fija de C5a marcado con ¹²⁵I a partículas de WGA y receptores C5aR dando como resultado la emisión de una cierta cantidad de luz medida como cuentas por minuto (cpm). Si se añade C5a no marcado o anti-C5aR, su unión a los receptores producirá un menor número de cpm debido al desplazamiento de ¹²⁵I C5a. El % de desplazamiento se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{S - S_{\text{máx.}}}{S_0 - S_{\text{máx.}}} \cdot 100 \%$$

S: Muestra

S_{máx.}: Unión no específica. Medida añadiendo hC5a no marcado en una cantidad suficiente para desplazar a ¹²⁵I-hC5a unido específicamente.

S₀: Unión máxima. Se añade hC5a no marcado.

El valor de CI50 se define como la concentración que desplaza el 50 % de C5a. El número de cpm se mantuvo constante entre experimentos, por lo tanto, los valores de CI50 son relativos ya que el trazador se desintegra con el tiempo. Se determinó la potencia (CI50) de los anticuerpos anti-hC5aR humanos para desplazar ¹²⁵I-hC5a y los datos se proporcionan en la tabla 1.

Ensayo de migración de neutrófilos (quimiotaxis)

La potencia de los anticuerpos para inhibir la migración de neutrófilos dependiente de hC5a (o mC5a) se analizó en una cámara Boyden. Se tiñeron con calceína neutrófilos aislados de sangre humana o animal y se añadieron al compartimento superior de la cámara Boyden y se mezclaron con los anticuerpos. Se aplicaron hC5a o mC5a al compartimento inferior de la cámara Boyden y actuaron como quimioatrayentes para los neutrófilos. La capacidad de

los neutrófilos de migrar a la cámara inferior se determinó mediante el recuento del número de neutrófilos marcados con calceína que pasaron a través de una membrana fluoroblok de 3 o 5 μm .

Se obtuvieron PMN (leucocitos PoliMorfoNucleares; granulocitos) humanos a partir de muestras de sangre humana extraída en viales que contenían EDTA. Las células sanguíneas se separaron por centrifugación de sangre (4 partes) a través de un gradiente de Ficoll-Paque PLUS (GE Health Care) (3 partes) durante 30 min (400 x g) a temperatura ambiente. La capa que contenía PMN se suspendió en PBS (solución salina tamponada con fosfato) que contenía dextrano-500 (Sigma) durante 1 h para retirar los eritrocitos contaminantes. El sobrenadante se centrifugó durante 5 min (250 x g) a temperatura ambiente y los eritrocitos restantes se lisaron por ósmosis usando NaCl al 0,2 % durante 55 s. La solución se hizo isotónica mediante NaCl al 1,2 % + PBS y se centrifugó a 250 x g durante 5 min, antes de repetir la lisis osmótica. Después de la centrifugación, los PMN se resuspendieron en mezcla de reacción (MR): HBSS (n.º de cat. 14175 Gibco) contiene NaCl 137mM, KCl 5,3 mM, Na_2HPO_4 0,33 mM, NaHCO_3 4 mM, KH_2PO_4 0,44 mM, Glucosa 5 mM; complementado con $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,4 mM, MgCl_2 0,5 mM, CaCl_2 0,5 mM, HEPES 20 mM. La densidad celular se determinó por NucleoCounter (Chemometec). La suspensión de PMN contenía >95 % de neutrófilos, lo cual se evaluó por microscopía de muestras teñidas con Giemsa.

Carga de PMN: se disolvió calceína, AM, (Fluka) en DMSO (dimetil sulfóxido) y se diluyó 1000 veces en RM con células (2×10^6 células por ml) produciendo una concentración de 10 μM . La suspensión se incubó durante 30 min en una incubadora a 37 °C y después se lavó 3 veces con RM para eliminar el exceso de calceína. Finalmente, las células se resuspendieron en RM (4×10^6 células/ml).

La migración se evaluó por la técnica de la cámara Boyden usando FluoroBlok®, tamaño de poro 3 μm , 96 pocillos (n.º cat. 351161.BD Falcon (VWR)). La cámara superior, es decir, los insertos que contenían membrana Fluoroblok se recubrieron con fibrinógeno humano (n.º cat. F3879-1G, Sigma) en PBS a 1 mg/ml a 37 °C durante 2 h. Después del lavado, las membranas se bloquearon con una solución que contenía un 2 % de albúmina de suero bovino (BSA), en PBS. Después de otro lavado usando RM, se añadieron a cada pocillo 10^5 PMN cargados con calceína con o sin los anticuerpos de hC5aR y se pusieron en la placa receptora (cámara inferior) que contenía la solución de control o el quimioatrayente hC5a (Sigma, C5788). Cada grupo estaba compuesto por al menos 6 pocillos. Posteriormente, la placa se midió a 485/538 nm, 37 °C cada 5 min durante 60 min en un lector de placas (SpectraMax, Molecular devices, o Fluoroscanner, Thermo Labsystems.). El valor a 30 min en unidades relativas de fluorescencia se usó como medida de la migración.

Ajuste de curvas. La capacidad de los anticuerpos de inhibir la migración se expresó por la CI50 determinada usando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.)

La tabla 1 incluye los datos del ensayo de desplazamiento y el ensayo de quimiotaxis que ensayó la capacidad de 10 $\mu\text{g/ml}$ de mAb humanos de inhibir la migración dependiente de hC5a (10 nM) de neutrófilos humanos. El valor obtenido en ausencia de anticuerpo se fijó a 100. Se recopilaron datos de 3 donantes. En la tabla 1 se incluyen los valores medios. Los tres mAb 32F3A6, 35F12A2 y 35F32A3 mostraron la máxima potencia en los dos ensayos, que fue igual o ligeramente superior a la potencia de un anticuerpo de control Ref. Ab Q descrito en el documento WO2009/103113.

Tabla 1. Características funcionales de anticuerpos anti hC5aR.

Ac	CI50 de desplazamiento de hC5a (SPA) (nM)	Migración de neutrófilos humanos (en % en comparación con la migración en ausencia de anticuerpo).
35F32A3	0,95	11
32F3A6	1,90	2
35F12A2	2,04	19
35F24A3	2,97	30
35F16A2	3,90	22
35F3A1	10,7	38
35F34A1	18,6	35
35F6A1	22,9	ND
34F12A5	32,1	> 70
35F33A1	33,4	> 70

34F12A3	46,6	> 70
hC5a	4,1	100
Ref. Ab Q	3,7	20-21

Caracterización de secuencias de CDR de mAb anti hC5aR

- 5 Se clonaron de manera recombinante las regiones variables de los Ac anti-hC5aR 35F32A3, 32F3A6, 35F12A2 y 35F24A3 y se caracterizaron las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos usando métodos convencionales. Las secuencias de aminoácidos se incluyen en la figura 1 y en la lista de secuencias adjunta.

Caracterización de especificidad de unión

- 10 Se usaron construcciones quiméricas de C5aR de humano-ratón para determinar la región de unión de C5aR. Los receptores quiméricos se expresaron de manera transitoria en células HEK y se determinó la unión de los anticuerpos individuales por FACS como se describió previamente en el documento WO 2008/022390, excepto por el cambio de línea celular. La unión de 32F3A6, 35F32A3 y 35F12A2 fue dependiente de la secuencia humana del bucle extracelular 2, mientras que el extremo N humano era prescindible (figura 2).

- 15 Ejemplo 3. Generación de variantes de Fc

- 20 Las cuatro subclases de IgG humanas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) comparten más de un 95 % de homología en las regiones Fc, pero muestran diferencias importantes en la región bisagra. La región Fc media funciones efectoras, tales como citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En la ADCC, la región Fc de un anticuerpo se une a receptores de Fc de activación (FcγR) en la superficie de células efectoras inmunitarias tales como células asesinas naturales y monocitos, conduciendo a la fagocitosis o lisis de las células establecidas como dianas. En la CDC, la región Fc se une al complemento en un sitio diferente de los sitios de unión a FcγR y los anticuerpos destruirán las células establecidas como diana desencadenando la cascada del complemento en la superficie celular. Las diversas isoformas de IgG ejercen diferentes niveles de funciones efectoras que aumentan en el orden IgG4 < IgG2 < IgG1 < IgG3. Se generaron varias variantes de Fc de IgG, comprendiendo todas ellas la región variable de Ref Ab Q, por mutagénesis dirigida usando el kit de mutagénesis dirigida QuickChange® (n.º de cat. 200518, Stratagene) y se caracterizaron como se describe en el ejemplo 4.

- 30 Ejemplo 4: Caracterización de funciones efectoras de variantes de Fc

Afinidad de unión de variantes de Fc a FcγR

- 35 La afinidad de las variantes de Fc por FcγR se determinó por mediciones de resonancia de plasmones superficiales (SPR) que se realizaron en un instrumento BIACore T100 usando un chip sensor CM5 (GE). Las variantes de Fc se inmovilizaron en celdas de flujo usando química de acoplamiento de amina. Para la SPR cinética que mide la afinidad de FcγR por las variantes de Fc, se usaron His-FcγR como analitos y se inyectaron en celdas de flujo en tampón HBS-EP. El receptor de alta afinidad FcγRI se inyectó con un caudal de 40 µl/min, un tiempo de contacto de 180 segundos y un tiempo de disociación de 300 segundos. Los otros FcγRI se inyectaron con un caudal de 40 µl/min, un tiempo de contacto de 30 segundos y un tiempo de disociación de 120 segundos. Las superficies de los chips se regeneraron con una solución que contenía NaOH 10 mM y NaCl 500 mM. Las afinidades (valores de Kd) se presentan en la tabla 2A.

- 45 Tabla 2A. Resumen de los resultados obtenidos a partir del análisis de la afinidad de las variantes de Fc por FcγR (Kd en M). (-= sin unión; 0 = sin cambio en la unión; nd^a = Kd no calculada debido a una unión demasiado débil). (1) una variante de Fc de IgG2/IgG4 que comprende la región CH1 y la región bisagra inferior de IgG2, y la región CH2-CH3 restante de IgG4; (2) mutante de IgG4 que incluye la mutación puntual S228P.

IgG	Región Fc de anticuerpo	FcγRI	FcγRIIA (131R)	FcγRIIA (131H)	FcγRIIB	FcγRIII (158F)	FcγRIII (158V)
IgG1	L234A, L235E, G237A, A330S y P331S	-	-	-	2,10E-6	-	-
	N297Q, L234A, L235E, G237A	-	-	-	-	-	-
	N297Q, L234A, L235E	-	-	-	-	-	-
	G236R, L328R	-	-	-	-	-	-

IgG	Región Fc de anticuerpo	FcyRI	FcyRIIA (131R)	FcyRIIA (131H)	FcyRIIB	FcyRIII (158F)	FcyRIII (158V)
	L234A, L235E	nd ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a	0,96E-6
	N297Q	0,36E-6	-	-	-	-	-
	referencia de IgG1	6,64E-10	0,95E-6	0,64E-6	0,42E-6	0,33E-6	0,07E-6
IgG2	N297Q	-	nd ^a	nd ^a	-	-	-
	referencia de IgG2	-	2,79E-6	0,22E-6	1,54E-6	-	1,50E-6
IgG2/4 ⁽¹⁾	N297Q	-	-	-	-	-	-
	V234A, G236A	-	-	-	5,34E-6	-	-
	referencia de IgG2/IgG4	-	nd ^a	1,03E-6	1,83E-6	-	-
IgG4 ⁽²⁾	N297Q, F234L, L235A	nd ^a	-	-	-	-	-
	N297Q, E233P, F234V, L235A	-	-	-	-	-	-
	E233P, F234V, L235A	0,38E-6	-	-	nd ^a	-	nd ^a
	N297Q	0,13E-6	-	-	-	-	-
	referencia de IgG4 ⁽²⁾	2,71E-9	0,80E-6	3,52E-6	1,08E-6	-	nd ^a

Ensayo de fagocitosis

- 5 Para identificar variantes de Fc con capacidades reducidas o nulas de mediar la fagocitosis de neutrófilos, se estableció un ensayo de fagocitosis *in vitro*. El ensayo de fagocitosis descrito a continuación implica el marcaje de neutrófilos humanos aislados de sangre humana periférica (la célula diana para la fagocitosis) con un colorante fluorescente, CMFDA, y su adición a un cultivo de monocitos humanos, también aislados de sangre periférica humana. Los neutrófilos marcados con CMFDA se recubren previamente con mAb de ensayo (o PBS) y, después de la incubación con los monocitos humanos, se determina por FACT el número de monocitos doblemente positivos para CD14/CMFDA. En la tabla 2B se presentan los resultados de diversas variantes de Fc.

Todos los anticuerpos ensayados incluyen las regiones variables del anticuerpo Q descrito en el documento WO2009/103113 y usado como Ref Ab anteriormente.

- 15 Se observó que tanto los monocitos como los macrófagos eran capaces de mediar la fagocitosis dependiente de anticuerpo de neutrófilos y se establecieron ensayos de fagocitosis usando los dos tipos celulares. Los resultados fueron cualitativamente similares en los dos ensayos, pero como el ensayo de macrófagos fue más variable, el análisis se realizó principalmente usando monocitos.

20 Preparación de monocitos humanos

- Se aislaron linfocitos y monocitos humanos a partir de sangre venosa periférica recogida de voluntarios humanos sanos en tubos que contenían EDTA como anticoagulante (K2E, BD Biosciences, n.º de cat. 367525) usando centrifugación en gradiente de percoll. 100 ml de sangre generalmente proporcionan ~8 - 20 x 10⁷ células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Se añadieron al menos 3 volúmenes de dPBS a las células aisladas que posteriormente se centrifugaron a 100 x g durante 10 min a temperatura ambiente (TA). Después de desechar el sobrenadante, la capa de linfocitos/monocitos se resuspendió en el mismo volumen de una mezcla 50:50 de dPBS:Medio de Cultivo que en la etapa previa y se centrifugó de nuevo a 100 x g durante 10 min a TA. El sobrenadante se desechó y la capa de linfocitos/monocitos se resuspendió a 1 - 2 x 10⁶ células/ml en Medio de Cultivo. Las células resuspendidas se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos (Corning, Costar n.º de cat. 3516) a 2 ml/pocillo con 4 x 10⁶ células/pocillo y se incubaron durante 2 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %. Las células no adherentes (linfocitos y células muertas) se retiraron por aspiración y las células adheridas (monocitos) se lavaron cuatro veces en 1 ml de Medio de Cultivo (RPMI 1640 (Invitrogen-GIBCO, n.º de cat. 11875) + FCS al 10 % (Invitrogen-GIBCO, n.º de cat. 16000) inactivado térmicamente a 56 °C durante 30 min + Hepes 25 mM (Invitrogen-GIBCO, n.º de cat. 15630) + Pen/Estrep al 1 % (Invitrogen-GIBCO, n.º cat. 15070)) con agitación suave en círculos antes de la aspiración del medio de lavado. Después de lavar los monocitos derivados de sangre, se añadió 1 ml de Medio de Cultivo nuevo a cada pocillo. Se rasparon células de un pocillo y se suspendieron en Medio de Cultivo para estimar el número de monocitos por pocillo.

Preparación de neutrófilos humanos

Se aislaron neutrófilos humanos a partir de sangre venosa periférica recogida a partir de voluntarios sanos) usando centrifugación en gradiente de percoll y se tiñeron con CellTracker™ Green (diacetato de 5-clorometilfluoresceína, CMFDA). 100 ml de sangre generalmente proporcionan $\sim 10 - 20 \times 10^7$ neutrófilos. La tinción se realizó disolviendo CMFDA CellTracker™ Green en DMSO hasta una concentración final 10 mM. Los neutrófilos se resuspendieron a 1×10^7 células/ml en dPBS y se añadió CMFDA a una concentración final de 2 μ M. Las células y el colorante se incubaron durante 15 min a 37 °C. El exceso de colorante se retiró lavando las células 3 veces con 10 ml de dPBS (por centrifugación a 300 x g durante 5 min a TA). Se realizó un recuento celular después de la última etapa de lavado. Los neutrófilos marcados con CMFDA se resuspendieron a 2×10^6 células/ml en dPBS y se incubaron con anticuerpo (concentración final 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 o 100 μ g/ml) o PBS (para el control sin anticuerpo). En algunos ensayos (cuando se indica), la etapa de incubación de neutrófilo + Ac también contenía 4 mg/ml de IgG humana. Se incubaron células más anticuerpo durante 30 min a 37 °C. Los neutrófilos se lavaron dos veces con dPBS después de la centrifugación a 300 x g durante 5 minutos a TA y se resuspendieron en Medio de Cultivo a 1×10^7 células/ml.

Análisis FACS

Se añadieron neutrófilos marcados con CMFDA, recubiertos previamente con anticuerpo (preparado como se ha descrito anteriormente) a monocitos (como se ha descrito anteriormente) a la concentración deseada en 1 ml de Medio de Cultivo. El volumen total en cada pocillo de la placa de 6 pocillos fue de 2 ml. En algunos ensayos (cuando se indica), el medio de cultivo también contenía 4 mg/ml de IgG humana. Generalmente se usó una relación de 5:1 (neutrófilos:monocitos). Si el número de células adherentes era menor de 4×10^5 por pocillo, se añadían 2×10^6 neutrófilos (es decir, la relación neutrófilo:monocito excedía de 5:1). Si el número de monocitos excedía de 4×10^5 por pocillo, entonces se añadía cinco veces el número de neutrófilos para mantener la relación de neutrófilos:monocitos a 5:1. Los cultivos se incubaron durante 1 hora a 37 °C en una incubadora con un 5 % de CO₂.

Después de la incubación, se aspiró el medio para retirar los neutrófilos no adherentes y no ingeridos. Los monocitos adherentes se lavaron (con agitación suave en círculos) tres veces con 1 ml/pocillo de Medio de Cultivo. Los monocitos se recogieron en tubos de 15 ml raspando las células en Medio de Cultivo de los pocillos con raspadores de células (Corning, n.º de cat. CP3010). Las células se centrifugaron a 300 x g durante 5 min a TA y se retiró el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió en 160 μ l de paraformaldehído al 1 % (p/v) en PBS para fijarlo antes del FACS.

Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). Los neutrófilos marcados con CMFDA se identificaron y se midieron en FL-1 (canal de fluorescencia 1) usando isotiocianato de fluoresceína (FITC), y los monocitos se identificaron por tinción de una muestra solo con monocitos con anti-CD14 marcado con ficoeritrina, y se midieron en FL-2 (canal de fluorescencia 2). Se definió una selección de monocitos usando el perfil de FSC (dispersión directa) frente a SSC (dispersión lateral) de la muestra de solo monocitos y se amplió (a lo largo de los ejes de FSC y SSC) para incluir monocitos cuyo tamaño había aumentado durante la incubación. Esta selección excluía la región del perfil de FSC frente a SSC que contenía neutrófilos como se define en el perfil de FSC frente a SSC en una muestra solo de neutrófilos. Se calculó que el grado de fagocitosis era el porcentaje de monocitos FL-1⁺ en la selección de monocitos total.

El nivel de referencia de fagocitosis no específica fue el porcentaje de monocitos FL-1⁺ en una muestra que contenía neutrófilos marcados con CMFDA no recubiertos con anticuerpo (muestra "No Ac"). Se restó el nivel de referencia de cada muestra con Ac antes de introducir los datos (% monocitos FL-1⁺ frente a concentración de Ac) en un Prism (v4.0c, GraphPad Software Inc) para obtener gráficos. Los datos se sometieron a regresión no lineal usando la curva de dosis-respuesta sigmoidea (pendiente variable), es decir, una ecuación logística de 4 parámetros para determinar los valores de CE50 cuando fuera apropiado.

Los datos se presentan en la tabla 2B. "-" representa ausencia de fagocitosis detectable y "+" to "++++" representa un nivel de bajo a alto de fagocitosis medido en los ensayos.

Ensayos de ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo) y CDC (citotoxicidad dependiente del complemento)

Los siguientes ensayos *in vitro* se establecieron para ensayar la capacidad de las variantes de Fc de mediar la depleción de células a través de mecanismos dependientes de ADCC o CDC.

Células diana

En estos ensayos, las células diana eran células Ramos del clon E2 que expresaban hC5aR o neutrófilos humanos. Las células Ramos del clon E2 que expresaban hC5aR se desarrollaron transfectando de manera estable células Ramos del clon E2 con un vector que codificaba hC5aR usando procedimientos convencionales. La línea celular resultante expresa altos niveles de C5aR humano (5-7 veces más que los neutrófilos humanos) y de CD20. Los neutrófilos humanos se obtuvieron como se ha descrito anteriormente en relación con el ensayo de fagocitosis.

Las células diana se tiñeron con el tinte fluorescente de membrana celular, PKH-26. El número requerido de células diana (5×10^4 /muestra/pocillo x4) se diluyó hasta 15 ml en dPBS y se centrifugó a 1.200 rpm durante 5 min a TA. Después, las células se resuspendieron en PKH-26 $2 \mu\text{M}$ ($100 \mu\text{l}$ de solución por cada 1×10^6 células diana). Se dejó que prosiguiera el marcaje a temperatura ambiente durante exactamente 3 minutos antes de añadir un volumen igual de FCS inactivado con calor (o suero humano inactivado con calor (Millipore)) para detener la reacción de marcaje. Después de exactamente 1 min, se añadió RPMI a un volumen total de 15 ml. Las células se centrifugaron como anteriormente y se resuspendieron a 2×10^6 células/ml en medio de ensayo. Para el recubrimiento con alícuotas de anticuerpo ($25 \mu\text{l}$, es decir, 5×10^4), se dispensaron células diana marcadas con PKH-26 en pocillos de una placa estéril de 96 pocillos de fondo en U que contenía $25 \mu\text{l}$ de anticuerpo a $200 \mu\text{g/ml}$ diluido en medio de ensayo (concentración final $100 \mu\text{g/ml}$) y se incubaron a 37°C en CO_2 al 5 % durante 30 min.

Células efectoras

Las células efectoras eran PMBC de las que se habían eliminado monocitos. Las PMBC se obtuvieron como se ha descrito anteriormente. Las células resuspendidas (linfocitos/monocitos) se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos (Corning) a 2 ml/pocillo con $\sim 4 \times 10^6$ células/pocillo o en matraces T75 (Corning) a 20 ml por matraz y se incubaron durante 2 horas a 37°C en CO_2 al 5 %. Las células no adherentes (incluyendo los linfocitos y células NK) se retiraron por aspiración y se centrifugaron a $100 \times g$ durante 10 min a TA. Las células se resuspendieron en 20 ml de medio que contenía 100 ng/ml de IL-2 humana recombinante para aumentar el número de linfocitos y células asesinas naturales (NK). Las células se incubaron durante una noche a 37°C en CO_2 al 5 %. Al día siguiente, las células se centrifugaron a 1.400 rpm durante 10 min a TA y después se resuspendieron en medio de ensayo a $2,5 \times 10^7$ células/ml para usarse como células efectoras en el ensayo de ADCC.

Ensayo ADCC

Después del marcaje de las células diana con PKH-26 y del recubrimiento con anticuerpo, se añadieron $100 \mu\text{l}$ de células efectoras o $100 \mu\text{l}$ de medio de ensayo (control, solo células diana) directamente a $50 \mu\text{l}$ de células diana. Las muestras se incubaron durante 3 horas más a 37°C con 5 % de CO_2 . Las muestras se transfirieron a tubos FACS de microtitulación de $1,2 \text{ ml}$ que contenían $10 \mu\text{l}$ de tinte de viabilidad To-Pro-3 (TP-3) $10 \mu\text{M}$ para una concentración final de -625 nM y las muestras se analizaron por FACS. En un gráfico de FSC frente a SSC, se seleccionaron todas las células excluyendo los desechos. Las células seleccionadas se analizaron en el FL-2 frente a FSC y se seleccionaron las células positivas para FL-2 (es decir, células diana marcadas con PKH-26). Los datos de FACS se analizaron usando el software FlowJo (Tree Star, Inc. v6.3.4).

La ADCC específica se calculó restando el % medio de 'Dianas Solo' TP3^+ (A) del % medio de 'Dianas+Efectoras' TP3^+ (B) de muestras correspondientes después de restar el % medio de 'Dianas Sin Ac Solo' TP3^+ (C) y el % medio de 'Dianas Sin Ac+Efectoras' TP3^+ (D) respectivamente; es decir,

$$\text{ADCC específica} = (B - D) - (A - C) \text{ o } (B - A) - (D - C) \quad \text{Ecuación 1}$$

Los resultados presentados en la tabla 2B, se obtuvieron usando PBMC humanas estimuladas con IL-2 de las que se habían retirado monocitos, predominantemente células NK, pero incluyendo células B, células T y células dendríticas, como población de células efectoras. Las células diana fueron una línea celular transfectada Ramos E2 que expresaba tanto hC5aR como CD20 que permitía el uso del anticuerpo anti-CD20 rituximab como control positivo. Los resultados varían desde "+++", que es indicativo de una variante de Fc que induce la ADCC con una potencia igual al Rituximab, "+/-" que es indicativo de una variante de Fc para la que se observó un alto grado de variación del donante y "-" que es indicativo de una variante de Fc para la que no se detectó una inducción significativa de ADCC. Una variante de Fc que mediaba un aumento de la ADCC (IgG1_S239D, I332E) (Chu SY, Vostiar I, Karki S et al; Mol Immunol, 2008, 45(15):3926-3933) se incluyó como control positivo para el ensayo.

Ensayo CDC

Las variantes de Fc también se analizaron con respecto a su potencia para inducir la CDC. La configuración experimental fue esencialmente como se ha descrito para el ensayo de ADCC con la excepción de que las células efectoras se reemplazaron por suero humano.

Se mezclaron células diana, tales como células Ramos E2 (2×10^6 células/ml) en medio con suero de conejo con actividad del complemento al 3 %, con un volumen igual de solución de anticuerpo 2x ($200 \mu\text{g/ml}$), que contenía suero de conejo con actividad del complemento al 3 %, en una placa de cultivo de tejidos de fondo en U de 96 pocillos. Un conjunto duplicado de pocillos contenía $25 \mu\text{l}$ de células Ramos E2 (2×10^6 células/ml) mezcladas con $25 \mu\text{l}$ de solución de anticuerpo 2x ($200 \mu\text{g/ml}$) en medio sin complemento. Un conjunto de 3 pocillos contenía $25 \mu\text{l}$ de células Ramos E2 (2×10^6 células/ml) más $25 \mu\text{l}$ de medio de ensayo (muestras 'sin Ab') en suero de conejo con actividad del complemento al 3 %. Otro conjunto de 3 pocillos contenía $25 \mu\text{l}$ de células Ramos E2 (2×10^6 células/ml) más $25 \mu\text{l}$ de medio de ensayo (muestras 'sin Ab') sin complemento. Antes de la incubación, se añadieron a cada pocillo $100 \mu\text{l}$ de medio de ensayo, con o sin suero de conejo con actividad del complemento al 3 %, según fue apropiado. Las muestras se incubaron durante 3 horas a 37°C con 5 % de CO_2 .

Determinación de la viabilidad de las células diana

El tinte de viabilidad fluorescente To-Pro-3 (Molecular Probes), se añadió a cada muestra inmediatamente antes del análisis por citometría de flujo. La concentración final de To-Pro-3 en cada tubo fue de -62,5 nM. Las células positivas para To-Pro-3 (TP3+) se definieron como no viables o lisadas.

Citometría de flujo y análisis de datos

Se analizaron muestras en un FACSCalibur (BD Biosciences) y los datos adquiridos se analizaron usando el software FlowJo (v6.3.4, TreeStar Inc.). En el gráfico de dispersión de FSC frente a SSC, seleccionando todas las células excepto los desechos, se recogieron 5.000 acontecimientos de células diana para cada muestra. Se creó un histograma de las células diana seleccionadas en el canal FL-4 que mostró el nivel de captación de To-Pro-3 por las células. Se determinó el número de células TP3+ (es decir, células no viables) en cada muestra - estas se definieron como células en el lado derecho del pico principal - y este número se expresó como un porcentaje de células diana totales en la muestra.

Las muestras, ensayadas por triplicado, pudieron clasificarse en una de 4 categorías, A, B, C y D, tal como se muestra más adelante en la visión general de categorías.

Visión general de categorías

Células diana incubadas con:	100 µg/ml de Ac	Sin Ac
Sin Complemento	A	B
Suero de conejo con actividad del complemento	C	D

Categorías de muestras analizadas

para cada muestra que contenía anticuerpo, se realizaron reacciones con o sin complemento. Las muestras que contenían anticuerpo sin complemento dieron el nivel de lisis de referencia específica de anticuerpo. Las muestras de las categorías B y D dieron la lisis de referencia no específica de anticuerpo o tanto de anticuerpo como del complemento.

El porcentaje de células diana no viables TP3+ (% de lisis) se calculó para cada muestra con un 3 % de complemento y para cada muestra sin complemento. Para cada anticuerpo y control 'sin Ac', se promediaron los datos de las muestras por triplicado.

Para calcular la actividad de CDC específica para cada anticuerpo, se restó la lisis específica de anticuerpo en ausencia del complemento (% medio de lisis en muestras 'A') del % de lisis de la muestra de Ac con complemento (muestras 'C_{1/2/3}') antes de restar la lisis de referencia no específica. La lisis de referencia no específica era la lisis en muestras 'sin Ac' con complemento (% medio de lisis n muestras 'D') menos la lisis en muestras 'sin Ab' y sin complemento (% medio de lisis en muestras 'B'). Como control positivo para el ensayo se incluyó la variante de Fc que aumentaba la CDC (IgG1_S254W) (documento WO08030564).

$$CDC \text{ específica (\% lisis)} = (C-A)-(D-B) [o =(C-D)-(A-B)] \quad \text{Ecuación 2}$$

Se realizó un análisis estadístico en GraphPad Prism (v4.0) para determinar si las diferencias entre cualquiera de los grupos eran significativas. La actividad de CDC específica de cada muestra de los 4 ensayos se introdujo en una hoja de cálculo de acuerdo con el anticuerpo usado. Los grupos se compararon usando un ensayo paramétrico: un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de un ensayo posterior de comparación múltiple de Tukey.

Los resultados se incluyen en la tabla 2B. Los resultados varían desde "+++", que es indicativo de una variante de Fc que induce la CDC con una potencia igual al mutante de IgG1 S254W. "+/-" que es indicativo de una variante de Fc para la que se observó un alto grado de variación y "-" que es indicativo de una variante de Fc para la que no se detectó una inducción significativa de CDC.

Tabla 2B. Actividad de variantes de Fc en ensayos de la función efectora basados en células.

IgG	Región Fc de anticuerpo	Fagocitosis	ADCC	CDC
IgG1	L234A_L235E_G237A_A330S_P331S	-	-/+	-
	N297Q_L234A_L235E_G237A	-	++	-
	N297Q_L234A_L235E	-	++	-
	G236R_L328R	-	+++	-

IgG	Región Fc de anticuerpo	Fagocitosis	ADCC	CDC
	L234A_L235E	+	+++	-
	N297Q	++	+	-
	referencia de IgG1	+++	+++	-
	S239D_I332E	+++	+++	-
	S254W	++++	+++	+++
IgG2	N297Q	-	++	-
	referencia de IgG2	++	-	-
IgG2/4 ⁽¹⁾	N297Q	-	-	-
	V234A_G236A	-	-	-
	referencia de IgG2/IgG4	+	-	-
IgG4 (S228P) ⁽²⁾	N297Q_F234L_L235A	-	-/+	-
	N297Q_E233P_F234V_L235A	-	-	-
	E233P_F234V_L235A	+	-	-
	N297Q	+	-/+	-
	L235A	++	+	-/+
	F234L_L235A	++	+	/+
	referencia de IgG4	+++	+	/+

Resumen de los resultados obtenidos a partir del análisis de las variantes de Fc en ensayos de fagocitosis, ADCC y CDC. (- = sin función efectora; + = función efectora). (1) una variante de Fc de IgG2/IgG4 que comprende la región CH1 y la región bisagra inferior de IgG2, y la región CH2-CH3 restante de IgG4; (2) mutación S228P introducida en la región Fc de IgG4 para eliminar la formación de hemianticuerpos.

Ejemplo 5: Caracterización de la potencia de variantes de Fc anti-hC5aR

Para ensayar si mutaciones en la región Fc afectan a la potencia de los anticuerpos para inhibir la unión de hC5a a hC5aR y la migración de neutrófilos mediada por hC5a, respectivamente, se ensayaron las diferentes variantes de Fc en los ensayos de desplazamiento y migración descritos anteriormente. El ensayo de migración de neutrófilos se realizó como se ha descrito anteriormente con la excepción de que los PMN usados fueron PMN de ratón aislados de ratones hC5aR-KO/KI (knock-out para el receptor de mC5a/knock-in para C5aR humano, documento WO 2005 060739). Las células se obtuvieron del siguiente modo. Se aislaron PMN de médula ósea a partir de fémures y tibias de dos ratones hC5aR-KO/KI. Las células de médula se extrajeron de los huesos por lavado usando PBS antes de filtrar la suspensión de células a través de un filtro de células (BD Falcon, 352350; malla de nailon de 70 micrómetros) en un tubo de 50 ml y centrifugarla (10 min, 1600 rpm). Las células se resuspendieron en medio y se depositaron cuidadosamente como una capa sobre 3 ml de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) en un tubo estéril de 15 ml. Después de la centrifugación durante 20 minutos a 600 x g a temperatura ambiente, se aísla el sedimento de neutrófilos/eritrocitos. Los eritrocitos se lisan usando tampón de lisis (Sigma, R7757; 8,3 g/l de cloruro amónico en Tris-HCl 10 mM pH 7,5) durante 1 min. Después de dos ciclos de centrifugación y lavado, el sedimento celular se resuspende en mezcla de reacción. La suspensión contenía >95 % de neutrófilos, lo cual se evaluó por microscopía de muestras teñidas con Giemsa. La región variable de los anticuerpos ensayados fue idéntica a la región variable de Ref. Ab Q. Los datos se proporcionan en la tabla 3.

En el análisis SPA se observó una diferencia significativa en la potencia para inhibir la unión de hC5a a hC5aR (tabla 3, columna 1). Se analizó una versión de IgG1 del Ref. Ab Q junto con variantes de Fc de IgG Fc adicionales, y los datos mostraron que las variantes de Fc de IgG1 en general inhibían la unión de hC5a de manera más potente que las variantes de Fc tanto IgG4 como IgG2/IgG4. En el análisis también se incluyó un fragmento F(ab')₂ de Ref. Ab Q y se observó que inhibía la unión a hC5a en la misma medida que Ref. Ab Q de longitud completa (IgG4). Estos descubrimientos indicaban que la región bisagra es importante para la capacidad de los anticuerpos de inhibir la unión de hC5a y esta idea se confirmó por el hecho de que fragmentos F(ab')₂ podían inhibir la migración de los neutrófilos en la misma medida que Ref. Ab Q (Tabla 3). Además, se descubrió que las variantes de IgG1 eran más potentes en la inhibición de la migración de los neutrófilos que las IgG que comprendían las regiones bisagra IgG2 o IgG4 (Tabla 3, columna 2).

La mayor potencia de las versiones de IgG1 de Ref. Ab con respecto a las versiones de IgG4 podía estar relacionada con la mayor avidéz debida a la mayor flexibilidad de la región bisagra de IgG. Para investigar esto, se analizó por FACS la unión de las versiones de IgG1 e IgG4 del Ref. Ab a neutrófilos de referencia. Los datos demostraron que la versión de IgG1 se unía a los neutrófilos con mayor avidéz que la versión de IgG4. Datos no mostrados.

En conjunto, estos descubrimientos confirman que una mayor flexibilidad en las regiones bisagra de IgG1 contribuyen a una mayor unión a hC5aR, que conduce a una mayor potencia.

Tabla 3. Efecto de variantes de Fc sobre la unión de hC5a (SPA) y la migración de neutrófilos hacia hC5a. (+ = baja actividad, ++ = actividad media, +++/+ alta).

Región Fc de anticuerpo	Desplazamiento de hC5a (SPA)	Inhibición de la migración de neutrófilos humanos
IgG4	++	++
IgG1	+++	ND
IgG1(L234A_L235E_G237A_A330S_P331S)	+++	+++
IgG1 (S239D, I332E)	+++	++++
IgG2/4	+	ND
IgG2/4 (V234A, G236A)	+	+
Ref. Ab Q como F(ab) ₂	++	++

Ejemplo 6. Generación y caracterización de anticuerpos anti-hC5aR "completamente" humanos.

En los análisis descritos en el ejemplo 2, se seleccionó el anticuerpo 32F3A6 para estudios adicionales. Durante la clonación recombinante de este anticuerpo, se identificaron siete mutaciones en la región marco de VH que diferían de las secuencias de la línea germinal humana, aunque no se encontraron mutaciones de la región marco en la LC (Figura 3). Las mutaciones se encontraron alineando las secuencias de VH y VL de 32F3A6 con todas las secuencias de la línea germinal humana disponibles.

Para hacer que el anticuerpo se pareciera aún más al humano, las siete mutaciones puntuales en la región VH de 32F3A6 se retromutaron a los restos de la línea germinal humana y se injertaron en la región Fc de IgG1 que comprendía las cinco mutaciones L234A_L235E_G237A_A330S_P331S que, según se demostró, anulaban la inducción de la fagocitosis, la ADCC y la CDC como se ha descrito anteriormente. El compuesto se denomina 32F3A6 GL.

La potencia del anticuerpo retromutado se comparó con la del anticuerpo original y no se observó ninguna diferencia en la potencia para inhibir la unión de hC5a a hC5aR (ensayo en SPA) o en la potencia para inhibir la migración de neutrófilos mediada por hC5a entre 32F3A6 o 32F3A6 GL (datos no mostrados).

La capacidad de los anticuerpos completamente humanos descritos anteriormente para inducir la fagocitosis de neutrófilos, ADCC o CDC se evaluó como se ha descrito en el ejemplo 4 y los resultados se resumen en la tabla 4.

Los resultados relacionados con la ADCC específica incluidos en la tabla 4 se obtuvieron usando PBMC humanas de las que se han retirado monocitos como células efectoras y neutrófilos humanos como células diana.

Tabla 4. Funciones efectoras celulares mediadas por Fc de anticuerpos anti-C5aR. "+" representa ausencia de función efectora detectable y "+" a "+++" representa un nivel de bajo a alto de funciones efectoras medidas en los ensayos descritos en el ejemplo 4. ND (no determinado).

Compuesto	Fagocitosis	ADCC específica	CDC específica
PBS como control	-	ND	-
Región variable	Región Fc		
3G12 (antígeno irrelevante)	IgG1	+	-
32F3A6 GL	IgG1AEASS	+	-
32F3A6 GL	IgG1	+++	ND
Sigma	IgG4	+	ND

Como se ha observado previamente, las 5 mutaciones puntuales en la región Fc de IgG1 anula la fagocitosis, la ADCC y la CDC en comparación con la región Fc de IgG1 de tipo silvestre.

Ejemplo 7. Caracterización adicional de anticuerpo anti-hC5aR humano (32F3A6 GL)

Para esclarecer adicionalmente la funcionalidad de los anticuerpos identificados y determinar la afinidad y la potencia, se realizaron ensayos adicionales usando uno de los anticuerpos anti-C5aR en comparación con Ref AB Q. La afinidad se determinó por un ensayo de unión competitiva de ligando en neutrófilos humanos. Se hace referencia a esta funcionalidad como afinidad del anticuerpo medida por ensayo de unión competitiva de ligando, pero también podría considerarse una medición de la afección de la interacción. Los ensayos *ex-vivo* miden la capacidad de los anticuerpos de neutralizar las acciones mediadas por C5a en un escenario *in-vitro*. Los ensayos de potencia midieron la neutralización del flujo de Ca inducido por C5a, la regulación positiva del receptor de CD11b y la regulación negativa de CD62L, respectivamente, en neutrófilos humanos. Los datos obtenidos para 32F3A6GL se proporcionan en la tabla 5.

Mediciones de afinidad

Aislamiento de neutrófilos de sangre humana fresca

Se diluyó sangre en 1:1 con PBS + 2 % de FBS y se depositó como una capa sobre Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare #17-1440-03) a una relación de 3 partes de Ficoll y 4 partes de sangre (15 ml de Ficoll y 20 ml de sangre en un tubo de 50 ml) y posteriormente se estratificó por centrifugación a 400 x g durante 30 minutos a TA. La banda intermedia de PBMC se retiró suavemente mediante aspiración. Los granulocitos estratificados sobre los glóbulos rojos empaquetados se aspiraron con una pipeta Pasteur de plástico. Los granulocitos y los glóbulos rojos se transfirieron y se sedimentaron en un nuevo tubo de 50 ml. El sedimento se diluyó a 40 ml con PBS 1x y se añadieron 10 ml de una solución de DEXTRAN 500 al 4 % (sigma, 31392) en PBS (proporción 1:5) y se mezclaron suavemente por inversión. Después de 20-30 min, el sobrenadante rico en granulocitos obtenido se transfirió a un nuevo tubo y se centrifugó a 250 x g durante 5 min a TA. Los glóbulos rojos contaminantes se retiraron con lisis osmótica mediante resuspensión del sedimento celular en 7,5 ml de NaCl al 0,2 % y mezcla suave durante 55-60 segundos. Posteriormente, se añadieron 17,5 ml de NaCl al 1,2 % y después se diluyeron a 50 ml con PBS y se centrifugaron a 250 x g durante 5 min. esta etapa se repitió una vez. Los sedimentos celulares posteriormente se resuspendieron en 1 ml de mezcla de reacción (dPBS/RPMI). La viabilidad y el recuento de células se supervisaron usando NucleoCounter®.

Ensayo de unión competitiva al ligando en neutrófilos.

Se purificaron neutrófilos humanos, se lavaron y se resuspendieron en tampón de unión (HEPES 50 mM, pH 7,5, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM y albúmina de suero bovino al 0,5 % (Fracción V IgG libre)) a ~5 x 10⁶ células/ml. Para cada muestra, se sembraron 40 µl de suspensión celular (1 x 10⁵ células/pocillo) en una placa de 96 pocillos con forma de V (Greiner, n.º de cat. 651101). Los estudios competitivos se realizaron usando 12 concentraciones de ligando competitivo no marcado en diluciones semilogarítmicas empezando con 1 µM como la concentración más alta. Se añadieron 40 µl de anticuerpo considerando un volumen de ensayo final de 120 µl. Se añadieron 40 µl de radioligando [¹²⁵I]-hC5a (Perkin Elmer, n.º de cat. NEX250) a todas las muestras excepto al control de referencia. La concentración final de radioligando en el ensayo fue de 1 nM y el volumen final fue 120 µl. Todas las muestras se procesaron por triplicado y se incubaron durante 4 h a 4 °C. Después, las células se recogieron por centrifugación a 1200 rpm, a 4 °C durante 2 min y se lavaron tres veces en 100 µl de tampón de lavado (HEPES 50 mM, pH 7,5, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 5 mM, NaCl 150 mM y albúmina de suero bovino al 0,5 % (Fracción V IgG libre)). Por último, las células se resuspendieron en 30 µl de tampón de lavado y se transfirieron a una OptiPlate (Perkin Elmer, n.º de cat. 6005290) y se añadieron a cada pocillo 150 µl de MicroScint 20 (Perkin Elmer, n.º de cat. 6013621). Las placas se cubrieron, se mezclaron bien y se contaron en un Top Counter calibrado con 1 h de retraso. En una placa separada se determinó la cantidad total de radioligando añadido al ensayo. El número de cuentas en cada muestra se expresó como valores normalizados en porcentaje, siendo el 100 % el nivel máximo de cuentas cuando se añade [¹²⁵I]-hC5a 1 nM y no se añade anticuerpo frío, y siendo el 0 % la unión inespecífica determinada en presencia de hC5a frío 1 µM. Los datos se analizaron por regresión no lineal usando PRISM (GraphPad).

Ensayo de flujo de calcio

Tinción de neutrófilos humanos con tinte de células Fluo-4 AM

Se centrifugaron neutrófilos y se lavaron en PBS, después se resuspendieron a 1 x 10⁷ células/ml en tinte de células y se incubaron a temperatura ambiente durante 40 min en la oscuridad. Las células se centrifugaron y se lavaron (para retirar el exceso de tinte), se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron a 2 x 10⁶ células/ml en tampón celular. Las células (0,5 ml) se dividieron en alícuotas en tubos FACS de vidrio no estériles - un tubo para cada muestra - se almacenaron a temperatura ambiente y se usaron antes de que hubieran transcurrido dos horas. Cada muestra usó 1 x 10⁶ neutrófilos.

Ensayo

El ensayo de flujo de calcio se llevó a cabo del siguiente modo. En resumen, se analizaron 1×10^6 neutrófilos con Fluo-4 AM en 0,5 ml de tampón celular en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences), seleccionando los neutrófilos usando FSC en el eje x frente a SSC en el eje y. El canal FL-1 (FITC) se usó para medir la fluorescencia de neutrófilos después de la adición de diversos reactivos al tubo (por ejemplo, anticuerpos, C5a, ionomicina - disuelta a 10 veces la concentración final en tampón celular en lugar de I-MGB o C-MGB). La fluorescencia de la muestra se midió de manera continua adquiriéndose el valor de intensidad media de fluorescencia (MFI) cada segundo. Estos datos se guardaron en un fichero CellQuest (BD Biosciences) y se transfirieron a Excel (Microsoft) y Prism (v4.0c, GraphPad Software Inc.) para un procesamiento y análisis adicional. El orden de adición de reactivos a los neutrófilos y los tiempos de incubación variaron de acuerdo con el tipo de ensayo realizado.

Ensayo de neutralización de C5a

Se preparó una dilución seriada de 3 veces 10x de anticuerpo, con concentraciones que variaban de 1000 µg/ml a 1,37 µg/ml. Se incubaron neutrófilos cargados con Fluo-4 AM (1×10^6 en 0,5 ml de tampón celular) con 50 µl de solución de anticuerpo 10x (concentración final de Ac en el tubo: 100 - 0,137 µg/ml) durante 10 min a temperatura ambiente. Las células más el anticuerpo se analizaron por FACS durante ~60 s para establecer la fluorescencia basal. Después, se añadieron 50 µl de C5a 10 nM para dar una concentración final de ~1 nM y la medición de la fluorescencia se continuó durante otros ~60 s. Si el anticuerpo bloqueaba la liberación de Ca^{2+} inducida por C5a, no había un pico de fluorescencia. Si el anticuerpo no neutralizaba C5a, entonces había un pico de fluorescencia. Por último, se añadieron 50 µl de ionomicina a 1 µg/ml a una concentración final de 0,1 µg/ml y la medición de fluorescencia se continuó durante otros ~60 s para asegurar que las células aún respondían.

Regulación positiva de receptores de CD11b

Configuración del ensayo

La siguiente configuración se diseñó para determinar la capacidad de los anticuerpos identificados de neutralizar la activación de neutrófilos inducida por C5a mediante la medición de cambios en la expresión de CD11b.

Se diluyó anti-C5aR y anticuerpo de control de isotipo en PBS a una concentración final 2x en una dilución seriada de 3 veces (desde 600 a 0,003387 µg/ml) y se dispensaron 50 µl por duplicado en pocillos de placas de 96 pocillo de fondo en U. A cada pocillo se le añadió una alícuota de 50 µl de sangre entera heparinizada. Cuatro series de pocillos de control (por duplicado) contenían 50 µl de PBS más 50 µl de sangre únicamente. Las placas se incubaron durante 20 min a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 5 %. Para activar los neutrófilos, se añadieron 50 µl de C5a humana, concentración final 10 o 100 nM según se especifique, a los pocillos que contenían Ac y a una serie de pocillos de control sin anticuerpo. Se añadió PBS (50 µl) a una segunda serie de pocillos de control sin anticuerpo. A una tercera serie de pocillos de control sin anticuerpo se le añadió acetato miristato de forbol (PMA), concentración final 5 µg/ml. Las placas se incubaron de nuevo 20 min a 37 °C en una incubadora con un 5 % de CO₂. Finalmente, se añadieron 50 µl de una mezcla de anti-CD11b-PE (BD Biosciences, n.º de cat. 555388) diluido 1/50 en PBS (concentración final 1/200) a todos los pocillos (excepto a la 4ª serie de 2 pocillos de control sin Ac y sin C5a o PMA - estas muestras proporcionaron los valores de MFI basales). Las placas se incubaron de nuevo durante 20 min a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 5 % y después se centrifugaron durante 3 min a 2.000 rpm para sedimentar las células sanguíneas. El sobrenadante (150 µl) se retiró y los sedimentos se resuspendieron en 200 µl de solución de lisis FACS 1x para lisar los glóbulos rojos. Después de 5 min a temperatura ambiente, las placas se centrifugaron de nuevo, se retiraron 200 - 225 µl de sobrenadante y los sedimentos se resuspendieron en 160 µl de solución de lisis FACS 1x. Las células se transfirieron a tubos de microtitulación para el análisis por citometría de flujo.

FACS y análisis de datos

El citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) se configuró con parámetros de compensación establecidos para canales FL-2. Las muestras se seleccionaron para excluir células muertas y desechos. Los neutrófilos se identificaron como células que tenían alta FSC y SSC y se seleccionaron. Se calculó la intensidad de fluorescencia media (MFI) de los neutrófilos seleccionados en el canal FL-2 (CD11b-PE).

Los resultados se expresaron como un porcentaje de expresión máxima de CD11b restando el valor de referencia. la expresión máxima de CD11b (MaxCD11b) era la MFI media de los neutrófilos incubados con C5a pero sin Ac. La expresión mínima de CD11b (referencia) (MinCD11b) era la MFI media de los neutrófilos incubados sin C5a y sin Ac. La fórmula usada para calcular el % de expresión máxima de CD11b para cada muestra fue:

$$\% \text{ Máx}_{\text{muestra}} = (\text{MFI}_{\text{muestra}} - \text{MFI}_{\text{Mín}}) / (\text{MFI}_{\text{Máx}} - \text{MFI}_{\text{Mín}}) \times 100$$

Los datos se introdujeron en GraphPad Prism (v4.0) y se ajustaron a la curva sigmoidea de dosis-respuesta (pendiente variable), es decir, una ecuación logística de 4 parámetros usando regresión no lineal para calcular la CE50.

Regulación negativa de receptores de CD62L

Configuración del ensayo

- 5 La siguiente configuración se diseñó para determinar la capacidad de los anticuerpos identificados de neutralizar la activación de neutrófilos inducida por C5a mediante la medición de cambios en la expresión de CD62L.

10 El ensayo de *CD11b* anterior se adaptó para la detección de CD62L usando un anticuerpo conjugado que reconoce CD62L (BD Biosciences, n.º de cat. 559772). Los detalles experimentales específicos para CD62L se proporcionan a continuación.

FACS y análisis de datos

- 15 El citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) se configuró con parámetros de compensación establecidos para el canal FL-4. Las muestras se seleccionaron para excluir células muertas y desechos. Los neutrófilos se identificaron como células que tenían alta FSC y SSC y se seleccionaron. Se calculó la intensidad de fluorescencia media (MFI) de los neutrófilos seleccionados en el canal FL-4 (CD62L-APC).

- 20 Los resultados se expresaron como un porcentaje de expresión máxima de CD62L restando el valor de referencia. La expresión máxima de CD62L (MaxCD62L) era la MFI media de los neutrófilos incubados sin C5a y sin Ac. La expresión mínima de CD62L (referencia) (MinCD62L) era la MFI media de los neutrófilos incubados con C5a pero sin Ac. La fórmula usada para calcular el % de expresión máxima de CD62L para cada muestra fue:

$$25 \quad \% \text{ Máx}_{\text{muestra}} = (\text{MFI}_{\text{muestra}} - \text{MFI}_{\text{Min}}) / (\text{MFI}_{\text{Máx}} - \text{MFI}_{\text{Min}}) \times 100$$

- Los datos se introdujeron en GraphPad Prism (v4.0) y se ajustaron a la curva sigmoidea de dosis-respuesta (pendiente variable), es decir, una ecuación logística de 4 parámetros usando regresión no lineal para calcular la CE50.

- 30 Los resultados de los ensayos anteriores se resumen a continuación en la tabla 5.

Tabla 5. datos obtenidos en ensayo de afinidad, Ensayo de flujo de calcio, Ensayo de CD11b y CD62L.

	Ensayo de afinidad de unión competitiva de ligando	Ensayo de flujo de calcio CI50	Regulación positiva de CD11b CI50	Regulación negativa de CD62L CI50
32F3A6GL	0,34 nM	1,8 µg/ml	0,7 µg/ml	0,5 µg/ml
Ref. Ab Q	0,84 nM	7,3 µg/ml	3,6 µg/ml	1,9 µg/ml

- 35 Los datos confirmaron que 32F3A6 GL inhibe la acción de C5a de una manera dependiente de la dosis. La inhibición de la liberación de Ca^{2+} en los neutrófilos aumentó al aumentar las concentraciones de 32F3A6 GL y con una mayor eficacia que Ref. Ab Q como se observa por el menor valor de CI50.

- De manera similar, 32F3A6 GL también es más eficaz que Ref. Ab Q en el ensayo de regulación de CD11b y CD62L presentando una potencia 4-5 veces mayor que Ref. Ab Q.

- 40 El ensayo adicional de 32F3A6 GL en el ensayo de migración de neutrófilos (quimiotaxis) también mostró una dependencia de la dosis con un valor de CI50 de 1,0 µg/ml.

- 45 Ejemplo 8. Modelo de ratones *in vivo* de artritis

- El efecto *in vivo* se ensayó en un modelo K/BxN en ratones hC5aR KO/KI (documento WO 2009/103113 y Lee et al, Nat Biotechnol. Octubre de 2006; 24(10):1279-84). Los ratones K/BxN desarrollan espontáneamente una enfermedad de tipo autoinmunitaria mediada por Ac circulantes contra GPI (auto-antígeno glucosa 6-fosfato isomerasa). El suero de ratones K/BxN artríticos induce la enfermedad en otras cepas de ratones con muchas características típicas de la AR humana, entre las que se incluyen enfermedad progresiva crónica con destrucción articular.

Animales

- 55 Ratones transgénicos C5aR humano KO/KI (C57BL/6; H-2b; C5aR+/+ humano / C5aR-/- de ratón; abreviatura de la cepa: H5Rtg) de 8 - 27 semanas de edad.

Suero K/BxN

para producir suero para los experimentos, se cruzaron ratones KRNtg macho con ratones NOD hembra. La descendencia F1 (8-10 semanas de edad) que portaba el transgén KRN, que desarrollaba articulaciones inflamadas, se sacrificó y se recogió sangre por punción cardiaca. Después de 2 horas de incubación a 37 °C y centrifugación durante 10 min a 4.000 rpm, se recogió el suero. Se reunió suero de múltiples ratones, se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C. Todos los ratones se inyectaron con el mismo lote de suero K/BxN.

Inducción de artritis y puntuación

Se indujo una artritis inflamatoria en ratones H5Rtg receptores inyectando 150 µl de suero K/BxN i.p. tanto el día 0 como el día 2. El progreso de la enfermedad se supervisó diariamente midiendo el tamaño de la pata y determinando una puntuación clínica basada en el grado de inflamación en las patas delanteras y traseras y en las articulaciones del tobillo. El cambio en el tamaño medio de la pata desde el día 0 se calculó como se indica a continuación. El grosor (en mm) de los tobillos en cada una de las patas traseras se midió diariamente usando un calibre. La media de dichas una o dos lecturas de cada una de las patas traseras fue el tamaño medio diario de la pata (PS). El tamaño medio de la pata el día 0 se restó del tamaño medio diario de la pata para dar el cambio medio en el tamaño de la pata (ΔPS) para cada día del experimento. Se calculó una puntuación clínica para cada pata de cada ratón basándose en el sistema de puntuación mostrado en la tabla 6. La puntuación de las 4 patas se sumó para dar la puntuación clínica total (CS) para cada ratón en cada día del experimento.

Tabla 6. Sistema de puntuación clínica de artritis

Puntuación	Aspecto
0	articulación normal
1	inflamación leve/moderada del tobillo y/o un dedo inflamado
2	tobillo inflamado o inflamación en dos o más dedos
3	inflamación severa a lo largo de todos los aspectos de la pata o los cinco dedos

Para determinar qué ratón entraba en la fase de tratamiento el día 5, se calculó una "Puntuación de AR" para cada ratón multiplicando la puntuación clínica por el cambio en el tamaño de la pata desde el día 0 (en mm). Generalmente, solo los ratones que tenían una Puntuación RA > 0,7 entraban en la fase de tratamiento del estudio.

Tratamiento terapéutico con 32F3A6 GL

Después del inicio de la enfermedad (día 0), los ratones KO/KI hC5aR recibieron una dosis de carga de 32F3A6 GL el día 5 y después 9 dosis diarias. Las dosificaciones de carga fueron 10, 1,5 y 0,5 mg/kg y las dosificaciones diarias 2, 0,5 y 0,25 mg/kg. Las puntuaciones clínicas (media $\pm$ SD) para cada grupo de tratamiento se muestran en la figura 4. El tratamiento con NNC0215-0384 produjo una reducción dependiente de la dosis en la inflamación en comparación con los ratones tratados con un anticuerpo de control irrelevante. Se observó un efecto similar basado en cambios en el tamaño medio de la pata (no mostrados)

Ejemplo 9. Nivel de expresión de C5a en pacientes con artritis psoriásica

Se midió C5a en muestras de líquido sinovial de 11 pacientes con artritis psoriásica y 12 pacientes con osteoartritis como controles. Se siguió el protocolo de un kit ELISA de C5a comercial (BD OptEIA™, kit II ELISA de C5a humana (BD Biosciences; n.º de cat. 557965)). Los datos se proporcionan en la figura 5 y se resumen en la tabla 7 mostrada a continuación. El nivel de C5a estaba elevado significativamente en el grupo de pacientes con artritis psoriásica ($p = 0,001$; Mann-Whitney), lo que indica que C5a puede ser un inductor de la inflamación sinovial en la artritis psoriásica.

Tabla 7. Niveles de detección de C5a en líquido sinovial de controles y pacientes con artritis psoriásica.

	Controles (pacientes con osteoartritis)	Pacientes con artritis psoriásica
Nivel medio de C5a ($\pm$ SEM)	7,989 $\pm$ 0,6999	64,17 $\pm$ 34,53

Ejemplo 10. Expresión de C5aR en sinovio de pacientes con artritis psoriásica

Se obtuvieron cortes de micromatrices de tejidos (TMA) que contenían biopsias sinoviales fijadas con formalina e incluidas en parafina de pacientes con PsA (n=9) y pacientes dentro de los límites normales (n=5), del Biochain Institute Inc. /BioCat GmbH, Heidelberg, Alemania. Una muestra de PsA de la colaboración con el Dr. Bliddal (Frederiksberg Hospital, Dinamarca) y el Dr. SØe (Gentofte Hospital, Dinamarca). Todos los materiales humanos se obtuvieron con un consentimiento informado de los donantes o parientes cercanos y con aprobación por los comités de ética locales pertinentes BioCat Ge, comunicación personal; Cambridge BioSciences, Información del proveedor:

Tissue Supply Network (www. bioscience. co.uk). La muestra de los Dr. Bliddal/SØe se obtuvo bajo el permiso ético n.º H-4-2009-117. Se usaron los anticuerpos siguientes: Monoclonal de ratón anti-C5aR humano (R&D Systems, MAB3648 clon 347214 (IgG2a)). Control específico de isotipo IgG2a de ratón (Dako, X0943, clon DAK-GO5). Anticuerpo de burro anti-ratón conjugado con biotina Jackson ImmunoResearch (715-065-150).

La inmunohistoquímica se realizó del siguiente modo. Se eliminó la parafina de las secciones en xileno y se rehidrataron en concentraciones decrecientes de alcoholes. La recuperación del antígeno se realizó en tampón Tris-EGTA (10 mM; 0,5 mM), pH 9,0 en un horno microondas durante 15 min. La actividad peroxidasa endógena se bloqueó con H₂O₂ al 3 % y la biotina exógena se bloqueó por incubación con soluciones de bloqueo de avidina y biotina durante 10 min, respectivamente, de acuerdo con el fabricante. La unión no específica se bloqueó por incubación con TBS que contenía un 3 % de leche desnatada, un 7 % de suero de burro, un 3 % de suero humano y 3,2 mg/ml de Poli-L-Lisina (PLL) durante 30 min. Los anticuerpos primarios y secundarios se diluyeron en un tampón Tris que contenía un 0,5 % de leche desnatada, un 7 % de suero de burro y un 3 % de suero humano, y la incubación se realizó durante una noche a 4 °C y durante 60 min a temperatura ambiente, respectivamente. La primera etapa de amplificación se realizó por incubación con kit de peroxidasa Vectastain ABC, diluido en tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 7,5) que contenía Reactivo Bloqueante de Du Pont (TNB) al 0,5 % durante 30 min, seguida de una segunda etapa de amplificación con incubación en Tyramide biotinilado durante 6 min. La amplificación final se realizó mediante una incubación adicional con el kit de peroxidasa Vectastain ABC, diluido como se ha descrito anteriormente durante 30 min. La reacción cromogénica se consiguió con diaminobencidina. Los núcleos se contratiñeron con hematoxilina y las secciones se rehidrataron, se limpiaron en xileno y se montaron con Eukitt. La evaluación de las TMA para la expresión de la proteína C5aR en AR, OA y sinovio normal se realizó con un diseño ciego para el observador. Para evaluar las secciones se utilizó un microscopio Olympus BX51 equipado con una cámara digital DP70 (Olympus Denmark A/S; Ballerup, Dinamarca).

Resultados

Se encontraron células inmunopositivas para C5aR entremezcladas en agregados linfoides en la capa situada por debajo del revestimiento sinovial en 8 de 10 pacientes con artritis psoriásica, y en el estroma de 10 de 10 pacientes con artritis psoriásica. Los controles no presentaron ninguna tinción de C5aR en estos compartimentos sinoviales (0/5). Se detectaron sinoviocitos inmunopositivos para C5aR en las células de la capa de revestimiento en 4 de 5 controles así como en 10 de 10 pacientes con artritis psoriásica. Los resultados se resumen en la tabla 8 mostrada a continuación.

Tabla 8. detección de células C5aR⁺ en el sinovio normal y el sinovio de pacientes con artritis psoriásica. Valor de P (prueba exacta de Fischer) para la diferencia entre la expresión de C5aR en pacientes con artritis psoriásica en comparación con el sinovio normal: 0,007 (agregados linfoides) y 0,0003 (estroma).

Compartimento sinovial	Normal	Pacientes con artritis psoriásica
Células C5aR ⁺ infiltrantes en agregados linfoides en el tejido por debajo del revestimiento sinovial	0/5	8/10
células C5aR ⁺ en el estroma	0/5	10/10
sinoviocitos C5aR ⁺ en la capa de revestimiento	4/5	10/10

Ejemplo 11. inhibición de la migración de neutrófilos inducida por líquido sinovial de pacientes con artritis psoriásica por anti-C5aR.

Ensayo de migración de granulocitos neutrófilos (quimiotaxis)

La potencia de los anticuerpos para inhibir la migración dependiente de hC5a de granulocitos neutrófilos humanos (PMN (leucocitos PoliMorfoNucleares) humanos) se analizó en un ensayo de cámara Boyden usando sistemas de inserto de 96 pocillos BD FluoroBlok.

Se obtuvieron PMN humanos a partir de muestras de sangre humana extraída en viales que contenían EDTA. Las células sanguíneas se separaron por centrifugación de sangre (4 partes) a través de un gradiente de Ficoll-Paque PLUS (GE Health Care) (3 partes) durante 30 min (400 x g) a temperatura ambiente. La capa que contenía PMN se suspendió en PBS (solución salina tamponada con fosfato) que contenía dextrano-500 (Sigma) durante 1 h para retirar los eritrocitos contaminantes. El sobrenadante se centrifugó durante 5 min (250 x g) a temperatura ambiente y los eritrocitos restantes se lisaron por ósmosis usando NaCl al 0,2 % durante 55 s. La solución se hizo isotónica mediante NaCl al 1,2 % + PBS y se centrifugó a 250 x g durante 5 min, antes de repetir la lisis osmótica. Después de la centrifugación, los PMN se resuspendieron en mezcla de reacción (MR): HBSS (n.º de cat. 14175 Gibco) contiene NaCl 137mM, KCl 5,3 mM, Na₂HPO₄ 0,33 mM, NaHCO₃ 4 mM, KH₂PO₄ 0,44 mM, Glucosa 5 mM; complementado con MgSO₄·7H₂O 0,4 mM, MgCl₂, 0,5 mM, CaCl₂ 0,5 mM, HEPES 20 mM. La densidad celular se determinó por NucleoCounter (Chemometec). La suspensión de PMN contenía >95 % de neutrófilos, lo cual se evaluó por microscopía de muestras teñidas con Giemsa.

Carga de PMN: se disolvió calceína, AM, (Fluka) en DMSO (dimetil sulfóxido) y se diluyó 1000 veces en RM con células (2×10^6 células por ml) produciendo una concentración de $10 \mu\text{M}$. La suspensión se incubó durante 30 min en una incubadora a 37°C y después se lavó 3 veces con RM para eliminar el exceso de calceína. Finalmente, las células se resuspendieron en RM (4×10^6 células/ml).

Se obtuvo líquido sinovial (SF) humano de 2 pacientes con artritis psoriásica por punción en la rodilla. Después de retirar las células por centrifugación, las muestras se congelaron y se almacenaron a -80°C . Para los experimentos de migración, las muestras se descongelaron y se diluyeron 2 veces usando RM que contenía un 0,2 % de EDTA.

La migración se evaluó por la técnica de la cámara Boyden usando FluoroBlok®, tamaño de poro $3 \mu\text{m}$, 96 pocillos (n.º cat. 351161.BD Falcon (VWR)). La cámara superior, es decir, los insertos que contenían membrana Fluoroblok se recubrieron con fibrinógeno humano (n.º cat. F3879-1G, Sigma) en PBS a 1 mg/ml a 37°C durante 2 h. Después del lavado, las membranas se bloquearon con una solución que contenía un 2 % de albúmina de suero bovino (BSA), en PBS. Después de otro lavado usando RM, se añadieron a cada pocillo 10^5 PMN cargados con calceína con o sin los anticuerpos de hC5aR ($100 \mu\text{g/ml}$) y se pusieron en la placa receptora (cámara inferior) que contenía la solución de control o la solución de quimioatrayente (hC5a (Sigma, o muestras de líquido sinovial)). Cada grupo estaba compuesto por 4 - 6 pocillos. La cuantificación de la migración celular se consigue midiendo la fluorescencia de las células en la cámara inferior. Como la membrana FluoroBlok bloquea eficazmente el paso de luz de 490-700 nm, la fluorescencia de las células que no han entrado en la cámara inferior no se detecta a 485/530 nm. la placa se leyó a longitudes de onda de excitación/emisión de 485/538 nm, a 37°C cada 5 min durante 60 min en un lector de placas de fluorescencia con capacidades de lectura de fondo (SpectraMax, Molecular devices, o Fluoroscanner, Thermo Labsystems).

La migración se evaluó por valores de fluorescencia a 60 min expresados como valores de fluorescencia relativa. En la tabla 9, La migración en presencia de anticuerpo de isotipo se fija al 100 % y se calcula la capacidad del anticuerpo anti-C5aR de inhibir la migración. La migración se atenúa claramente por el anticuerpo de hC5aR. la migración inducida por hC5a 10 nM se inhibió un 83 %. Los valores para las tres muestras de SF fueron: 15 %, 70 % y 48 %. Los resultados demuestran que el anticuerpo de C5aR inhibía el efecto quimioatrayente de SF de pacientes con artritis psoriásica.

Tabla 9. Migración de PMN en respuesta a hC5a o líquido sinovial de tres pacientes con artritis psoriásica y su inhibición por anticuerpo de hC5aR (anticuerpo Ref Q). Todos los valores se normalizaron para la migración detectada cuando se incubó con anticuerpo de isotipo.

	hC5a (C5a 10 nM)	donante 1 de muestra SF	donante 1 de muestra SF	donante 1 de muestra SF
Anticuerpo de isotipo	100	100	100	100
Anti-C5aR	17	85	30	52

Ejemplo 12. Expresión de C5aR en el intestino de pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa

Se obtuvieron muestras de tejido intestinal dentro de límites normales ($n=14$), de pacientes con colitis ulcerosa ($n=21$) y enfermedad de Crohn ($n=25$) de Cambridge Bioscience (Cambridge, Reino Unido). Todos los materiales humanos se obtuvieron con un consentimiento informado de los donantes o parientes cercanos y con aprobación por los comités de ética locales pertinentes BioCat Ge, Información del proveedor: Tissue Supply Network (www.bioscience.co.uk). Los anticuerpos usaron un protocolo de inmunohistoquímica como se describe en el Ejemplo 9.

Puntuación semicuantitativa

Las células inmunopositivas para C5aR (C5aR+) se puntuaron semicuantitativamente como se indica a continuación: Los compartimentos linfoides asociados a la mucosa se puntuaron individualmente: Mucosa (M): compartimento de linfocito intraepitelial (IEL) (epitelio de la superficie), lamina propia y epitelio asociado a folículo (FAE). Submucosa (SM): folículos linfoides (solitarios) (ILF), placas de Peyer (íleon)/IEL colónico (colon) y linfocitos infiltrantes aislados. Muscularis Externa (ME): IEL y linfocitos infiltrantes aislados. Cada compartimento se puntuó en una escala de 0-4: 0, ausencia; 1, pocas; 2 una cantidad moderada; 3, muchas y 4, una cantidad abundante de células C5aR+. Se calculó una puntuación acumulada para cada capa intestinal (M, SM, ME) y en total (M+SM+ME) para el intestino entero. Puntuación máx.: M=12, SM=12, ME=8 y para el intestino entero 32. La puntuación semicuantitativa de los datos inmunohistoquímicos para la expresión de la proteína C5aR se analizó por el ensayo de Kruskal-Wallis con ensayo posterior de comparación múltiples de Dunn en GraphPad Prism 5. Un valor de $P < 0,05$ se consideró significativo.

Resultados

Se encontraron células de tipo mieloide y neutrófilos positivos para C5aR en el compartimento de linfocitos intraepiteliales, en el epitelio asociado a folículo y como células solitarias en la lámina propia de la mucosa en 23 de

25 pacientes con EC (enfermedad de Crohn), 19 de 21 pacientes con CU (colitis ulcerosa) y en 7 de 14 muestras intestinales normales (valores de P (prueba exacta de Fisher) 0,005 y 0,015, respectivamente). Además, se encontraron células positivas para C5aR en placas de Peyer/folículos linfoides colónicos; folículos linfoides aislados (solitarios) y como células solitarias de la submucosa en 21 de 25 pacientes con EC y 18 de 21 pacientes con CU en comparación con 7 de 14 muestras intestinales normales (valores de P (ensayo exacto de Fisher) 0,03 y no significativo, respectivamente). Por último, se encontraron células positivas para C5aR que infiltraban la capa muscularis externa de pacientes con EC y CU, así como en el intestino normal. Los resultados se presentan en la figura 6 y se resumen en la tabla 10. Basándose en el análisis semicuantitativo, se descubrió que C5aR tiene una expresión significativamente mayor en el intestino de pacientes con EC ($P < 0,01$) y CU ($P < 0,05$) en comparación con el intestino normal en la pared intestinal entera, por ejemplo, la puntuación acumulada en las tres capas intestinales (mucosa, submucosa y muscularis externa).

Tabla 10. Resumen de la expresión de C5aR en el intestino de pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa en comparación con el intestino normal.

Diagnóstico	expresión de C5aR en		
	Mucosa	Submucosa	Muscularis Externa
Normal	7/14	7/14	8/14
Enfermedad de Crohn	23/25	21/25	19/25
Colitis ulcerosa	19/21	18/21	11/21

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novo Nordisk A/S

<120> ANTICUERPOS TERAPÉUTICOS

<130> 8318.204-WO

<160> 41

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

<400> 1

Asp Tyr Gly Met His
1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

<400> 2

Val Ile Trp Phe Asp Gly Ile Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

5 <210> 3
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia sintética

 10 <400> 3

 Thr Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Thr Glu Phe Phe Gln His
 1 5 10

 15 <210> 4
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia sintética
 20 <400> 4

 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Arg
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asp Tyr
 20 25 30

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

 Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ile Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

 Val Gly Thr Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Thr Glu Phe Phe Gln His Trp
 100 105 110

 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 25 <210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia sintética
 30

ES 2 693 647 T3

<400> 5

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

5 <210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 6

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

15 <210> 7
<211> 8

20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

25 <400> 7

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
1 5

30 <210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Secuencia sintética

<400> 8

ES 2 693 647 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
100 105

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

<400> 9

Ser Tyr Val Met His
1 5

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

<400> 10

Ala Ile Asp Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

<400> 11

Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Ser Gly Ser Tyr Tyr Lys Ala Phe Asp Ile
1 5 10 15

5

<210> 12

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia sintética

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Asp Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Ser Gly Ser Tyr Tyr Lys Ala Phe Asp
100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

15

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

25

<400> 13

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 10
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 15
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 15
 <400> 15
 20
 Gln Gln Tyr Gly Ser Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 16
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 25
 <400> 16
 30
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

ES 2 693 647 T3

5 <210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 10 <400> 17
 Asn Tyr Gly Met His
 1 5
 15 <210> 18
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintética
 20 <400> 18
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ile Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 25 <210> 19
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Secuencia sintética
 <400> 19
 Thr Tyr Tyr Thr Ser Gly Ser Ser Lys His Phe Gln Pro
 1 5 10
 35 <210> 20
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Secuencia sintética
 45 <400> 20

ES 2 693 647 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ile Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Gly Thr Tyr Tyr Thr Ser Gly Ser Ser Lys His Phe Gln Pro Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

<400> 21

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

<400> 22

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 693 647 T3

<220>

<223> Secuencia sintética

<400> 23

5

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
1 5

<210> 24

<211> 107

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética

15

<400> 24

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
100 105

20

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia sintética

<400> 25

Asn Tyr Asp Met Ser
1 5

30

ES 2 693 647 T3

5 <210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia sintética

 10 <400> 26

 Ala Phe Ser Ser Asp Gly Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Leu Lys
 1 5 10 15

 15 <210> 27
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia sintética

 20 <400> 27

 His Ala Asp Tyr Ala Asn Tyr Pro Val Met Asp Tyr
 1 5 10

 25 <210> 28
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Secuencia sintética

 <400> 28

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

 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 35

ES 2 693 647 T3

Ala Ala Phe Ser Ser Asp Gly Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg His Ala Asp Tyr Ala Asn Tyr Pro Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

<400> 29

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

<400> 30

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

<400> 31

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 32

<211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia sintética
 <400> 32

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
          20           25           30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
          35           40           45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
          85           90           95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100          105
    
```

<210> 33
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 33

```

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

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

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

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

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

Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
			85						90					95		
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
			100					105					110			
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
		115					120					125				
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
	130					135					140					
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
145					150					155					160	
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
			165						170					175		
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
			180					185					190			
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
		195					200					205				
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
	210					215					220					
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
225					230					235					240	
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
			245						250					255		
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
			260					265					270			
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
		275					280					285				
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
	290					295					300					
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
305					310					315					320	
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							

ES 2 693 647 T3

325

330

5

<210> 34
<211> 326
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 34

ES 2 693 647 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

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

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

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

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

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

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu

ES 2 693 647 T3

210	215	220
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn 225 230 235 240		
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile 245 250 255		
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr 260 265 270		
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys 275 280 285		
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys 290 295 300		
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu 305 310 315 320		
Ser Leu Ser Pro Gly Lys 325		

<210> 35
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética

<400> 35

ES 2 693 647 T3

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

ES 2 693 647 T3

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

	<210> 36
	<211> 327
	<212> PRT
5	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Secuencia sintética
10	<400> 36

ES 2 693 647 T3

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	1	5	10	15
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	20	25	30	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	65	70	75	80
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	100	105	110	
Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	115	120	125	
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	130	135	140	
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	145	150	155	160
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	165	170	175	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	180	185	190	
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	195	200	205	
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	210	215	220	

ES 2 693 647 T3

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 37
<211> 120
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 37

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Gly Thr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120

<210> 38
<211> 105
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 38

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

<210> 39
<211> 124
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

<400> 39

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

ES 2 693 647 T3

Ser Ala Ile Asp Thr Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Ala Ser Gly Ser Tyr Tyr Lys Ala Phe Asp
100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 40
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia sintética

<400> 40

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Pro Leu
85 90 95

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

<210> 41
<211> 350
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 693 647 T3

<400> 41

```

Met Asp Ser Phe Asn Tyr Thr Thr Pro Asp Tyr Gly His Tyr Asp Asp
1          5          10          15

Lys Asp Thr Leu Asp Leu Asn Thr Pro Val Asp Lys Thr Ser Asn Thr
          20          25          30

Leu Arg Val Pro Asp Ile Leu Ala Leu Val Ile Phe Ala Val Val Phe
          35          40          45

Leu Val Gly Val Leu Gly Asn Ala Leu Val Val Trp Val Thr Ala Phe
50          55          60

Glu Ala Lys Arg Thr Ile Asn Ala Ile Trp Phe Leu Asn Leu Ala Val
65          70          75          80

Ala Asp Phe Leu Ser Cys Leu Ala Leu Pro Ile Leu Phe Thr Ser Ile
          85          90          95

Val Gln His His His Trp Pro Phe Gly Gly Ala Ala Cys Ser Ile Leu
          100          105          110

Pro Ser Leu Ile Leu Leu Asn Met Tyr Ala Ser Ile Leu Leu Leu Ala
          115          120          125

Thr Ile Ser Ala Asp Arg Phe Leu Leu Val Phe Lys Pro Ile Trp Cys
130          135          140

Gln Asn Phe Arg Gly Ala Gly Leu Ala Trp Ile Ala Cys Ala Val Ala
145          150          155          160

Trp Gly Leu Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Ser Phe Leu Tyr Arg Val
          165          170          175

Val Arg Glu Glu Tyr Phe Pro Pro Lys Val Leu Cys Gly Val Asp Tyr
          180          185          190

Ser His Asp Lys Arg Arg Glu Arg Ala Val Ala Ile Val Arg Leu Val
          195          200          205

Leu Gly Phe Leu Trp Pro Leu Leu Thr Leu Thr Ile Cys Tyr Thr Phe
210          215          220

Ile Leu Leu Arg Thr Trp Ser Arg Arg Ala Thr Arg Ser Thr Lys Thr
225          230          235          240

Leu Lys Val Val Val Ala Val Val Ala Ser Phe Phe Ile Phe Trp Leu

```

ES 2 693 647 T3

				245					250					255		
Pro	Tyr	Gln	Val	Thr	Gly	Ile	Met	Met	Ser	Phe	Leu	Glu	Pro	Ser	Ser	
			260					265					270			
Pro	Thr	Phe	Leu	Leu	Leu	Lys	Lys	Leu	Asp	Ser	Leu	Cys	Val	Ser	Phe	
		275					280					285				
Ala	Tyr	Ile	Asn	Cys	Cys	Ile	Asn	Pro	Ile	Ile	Tyr	Val	Val	Ala	Gly	
	290					295					300					
Gln	Gly	Phe	Gln	Gly	Arg	Leu	Arg	Lys	Ser	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Arg	
305					310					315					320	
Asn	Val	Leu	Thr	Glu	Glu	Ser	Val	Val	Arg	Glu	Ser	Lys	Ser	Phe	Thr	
				325					330					335		
Arg	Ser	Thr	Val	Asp	Thr	Met	Ala	Gln	Lys	Thr	Gln	Ala	Val			
			340					345					350			

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se une al segundo bucle extracelular de C5aR humano, en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR comprenden las secuencias SEQ ID 9, 10 y 11, y en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia de CDR1, una de CDR2 y una de CDR3, en donde dichas secuencias de CDR comprenden las secuencias SEQ ID 13, 14 y 15, en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 12, en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 16, y en donde el anticuerpo tiene una región bisagra Fc de isotipo IgG1.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 94 % idéntica a la SEQ ID NO: 12 y en donde la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 94 % idéntica a la SEQ ID NO: 16.
3. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde
 - i. la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 12 y
 - ii. la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 16.
4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, en donde
 - i. la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende la secuencia identificada por la SEQ ID NO: 12 y
 - ii. la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende la secuencia identificada por la SEQ ID NO: 16.
5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde
 - i. la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 39 y
 - ii. la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende una secuencia al menos un 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 40.
6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, en donde
 - i. la región variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende la secuencia identificada por la SEQ ID NO: 39 y
 - ii. la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende la secuencia identificada por la SEQ ID NO: 40.
7. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde la afinidad del anticuerpo medida por un ensayo de unión competitiva a ligando sobre neutrófilos está por debajo de 0,80 nM.
8. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde el anticuerpo es capaz de desplazar a C5a en un ensayo de centelleo por proximidad (SPA), con una CI50 inferior a 10 nM.
9. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde el anticuerpo inhibe o reduce significativamente la unión de C5a a C5aR.
10. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde al anticuerpo inhibe significativamente la migración de neutrófilos humanos *in vitro*.
11. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde el anticuerpo reduce la migración a menos del 20 % en comparación con el nivel de migración observada en presencia de C5a 10 nM y sin anticuerpo.
12. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde el anticuerpo tiene una región bisagra Fc del isotipo IgG1.
13. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde la región Fc tienen una afinidad de unión reducida a uno o más receptores de Fcγ en comparación con secuencias de referencia de IgG1tal como se definen por la SEQ ID NO 33.
14. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde el anticuerpo no induce significativamente la ADCC, la CDC y/o la fagocitosis de neutrófilos *in vitro*.

15. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde la región Fc es un mutante de Fc de IgG1 que comprende de 1 a 5 sustituciones de aminoácidos en AA 328 a 334, en donde la secuencia de referencia de Fc de IgG1 Fc es tal como se define en la SEQ ID NO. 33.
- 5 16. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde la región Fc es IgG1 (SEQ ID NO: 33) con uno o más de los siguientes grupos de mutaciones puntuales
- 10 a. N297Q y/o
b. L234A y L235E y/o
c. G236R y L328R y/o
d. N297Q, L234A y L235E y/o
e. N297Q, L234A, L235E y G237A y/o
f. L234A, L235E, G237A, A330S y P331S.
- 15 17. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde la región Fc es IgG1 (SEQ ID NO: 33) con las siguientes mutaciones puntuales: L234A, L235E, G237A, A330S y P331S.
18. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.
- 20 19. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas para uso médico.
20. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno inmunológico, tal como la artritis reumatoide (AR), artritis psoriásica, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis por lupus, enfermedad inflamatoria del intestino (EII) o síndrome del intestino irritable.
- 25

Fig. 1**Regiones variables de cadena pesada**

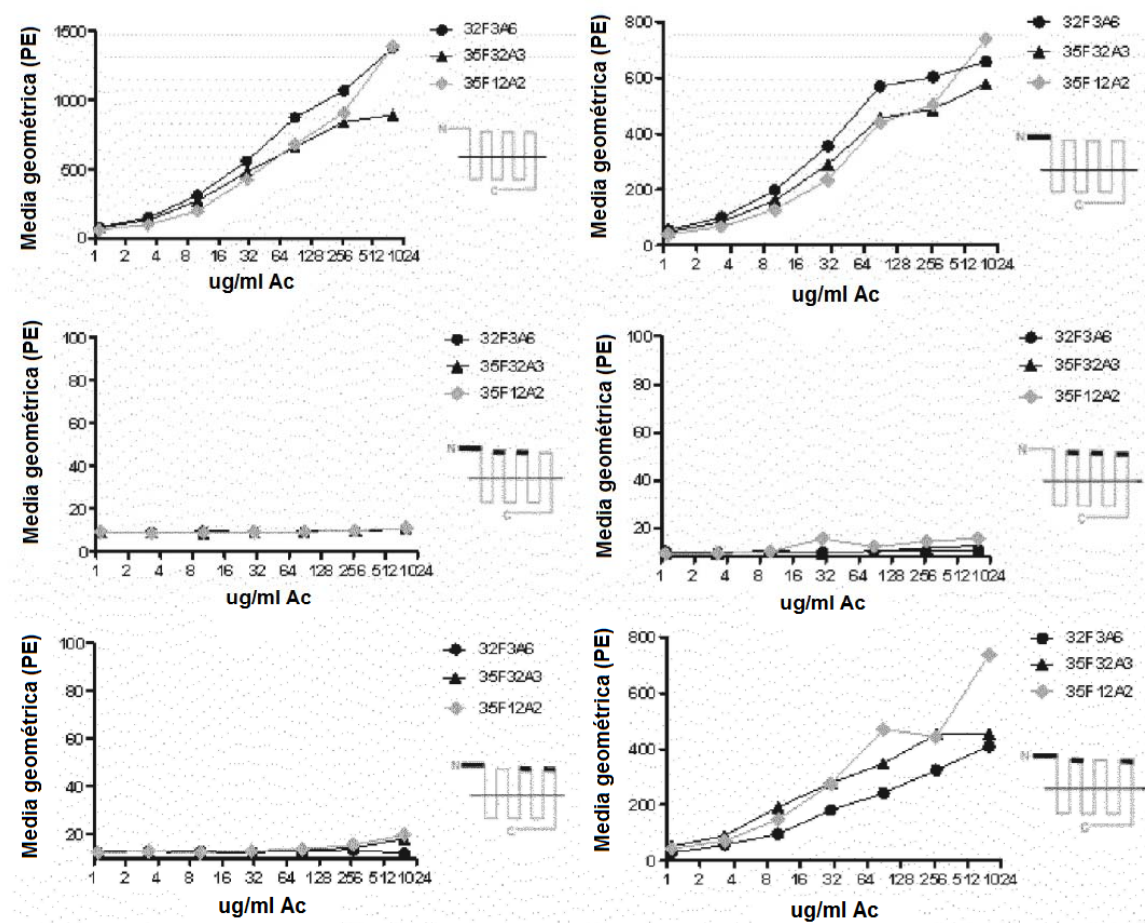
	CDR1	CDR2
35F12A2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFS NYGMH WVRQAPGKGLEWVA VIWYD GINKYY	
35F32A3	QVQLVESGGGLVRPGRSLRLSCAASGFTFR DYGMH WVRQAPGKSLEWVA VIWFD GINKYY	
32F3A6	EVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFS SYVMH WVRQAPGKGLEWVSA IDTGG -GTTY	
35F24A3	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSASGFAFS NYDMS WVRQTPEKRLEWVA AFSSD G-YTFY	
	:*:**:*****:*:** *:*** .***:* . * * *****: * * *****:.: . * .:*	
	CDR3	
35F12A2	ADSVK GRFTISRDNSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAG-- TYTSGSS - KHFQ PWGQGTL	
35F32A3	GDSVK GRFTISRDNSTLYLQMNSLRAEDTAMYYCVG-- TYFGPGTT - EFFQ HWGQGTL	
32F3A6	ADSVK GRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARDY YYYASGSYYKAFD IWGQGT	
35F24A3	PDSLK GRFTISRDNARNTLYLQMSSLSGSEDTALYCCAR---- HADYANY PVMDYWGQGT	
	:*:***:.:*:*****. ** : ** * : * * . . . : : : *****	
35F12A2	VTVSS	
35F32A3	VTVSS	
32F3A6	VTVSS	
35F24A3	VTVSS	

Regiones variables de cadena ligera

	CDR1	CDR2
35F12A2	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSS -YLSWYQQKPGQAPRLLIY DASNRAT GIP	
35F32A3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSS -YLAWYQQKPGQAPRLLIY DASNRAT GIP	
32F3A6	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC RASQSVSS RYLAWYQQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIP	
35F24A3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQGISS -WLAWYQQKPEKAPKSLIY AASSLQSGVP	
	:* :****.:** * *:*.*:*:*****.:** :*:***** :*: *** ** . :*:*	
	CDR3	
35F12A2	ARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYC QQRSNWP -TFGPGTKVDIKR	
35F32A3	ARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYC QQRSNWP -TFGPGTKVDIKR	
32F3A6	DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGSPL -TFGQGTKLEIKR	
35F24A3	SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYNSYPRT FGQGTKVEIKR	
	***** * :*****.***** .. *** ***:***	

Fig. 2

A



B

Receptor quimérico	N	N	N	N	N	N
Ac Ref	+	+	+	-	-	-
32F3A6	+	+	+	-	-	-
35F12A2	+	+	+	-	-	-
35F32A3	+	+	+	-	-	-

Cadena pesada

Cadena ligera

	1	2	3	4	5	6
	CDR1			CDR2		
12345678901234567890123456789012345678901234567890						
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQS			VSSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD			
EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQS			VSSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD			
			*			
	7	8	9	10		
	CDR3					
1234567890123456789012345678901234567890123456789						
RFGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS			LTFGQGTKLEIKR			
RFGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS			TFGQGTKLEIK			
			*	*		

Fig. 4

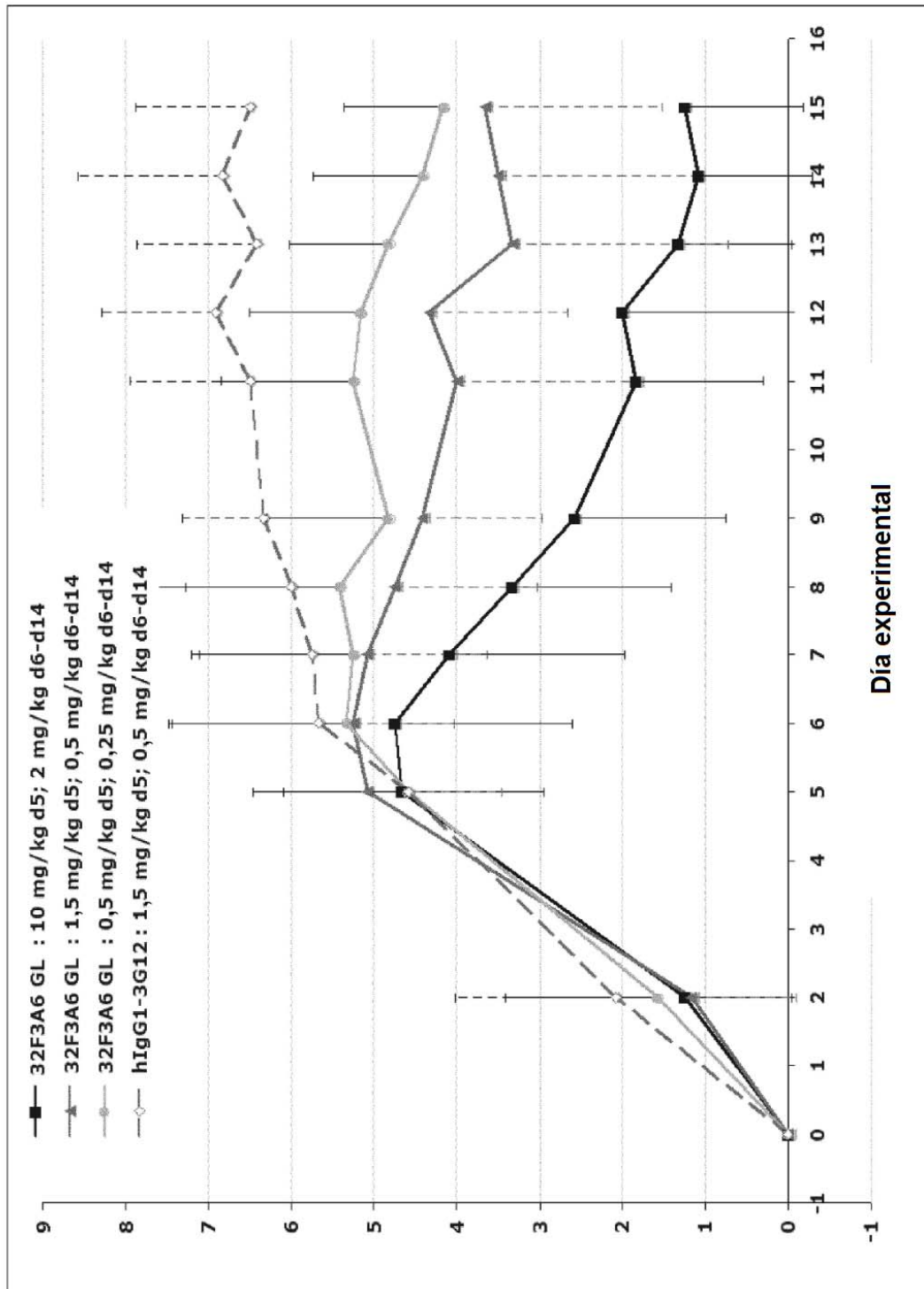


Fig. 5

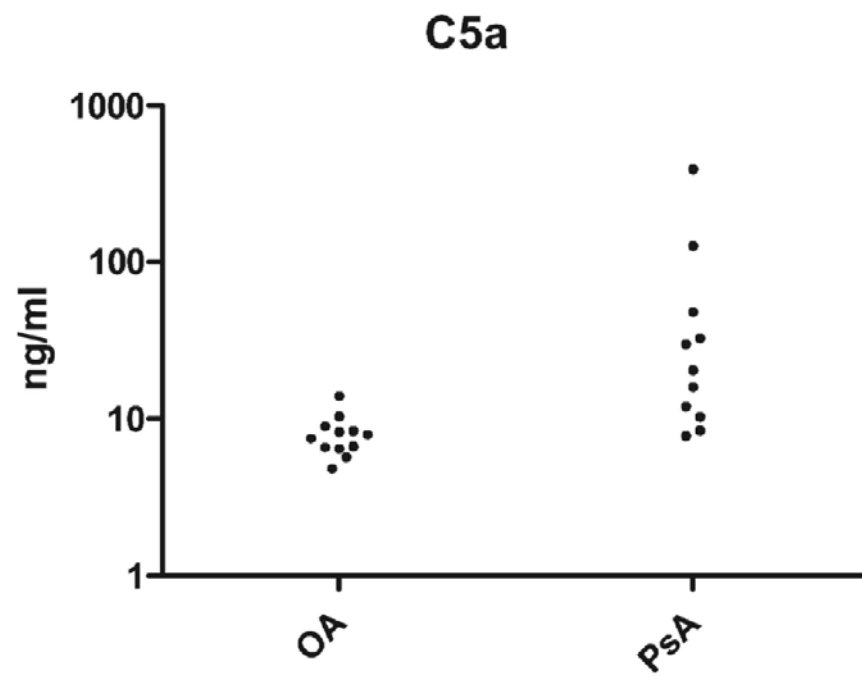


Fig. 6

