

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 480**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2007 PCT/US2007/010155**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.11.2007 WO07127317**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2007 E 07756072 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2010571**

54 Título: **Anticuerpo c-Kit humanizado**

30 Prioridad:

24.04.2006 US 794771 P

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

25.03.2019

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive M/S 28-2-C
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**NG, GORDON y
SHEN, WENYAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 705 480 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

Anticuerpo c-Kit humanizado

5 Campo técnico

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/794.771, presentada el 24 de abril de 2006.

10 La presente invención se refiere a composiciones para tratar enfermedades inflamatorias, fibróticas, autoinmunes y cancerosas asociadas con c-Kit y a composiciones que contienen anticuerpos c-Kit humanizados.

Antecedentes de la invención

15 Los mastocitos han sido implicados en la mediación de afecciones inflamatorias tales como asma, artritis reumatoide y enfermedad inflamatoria del intestino, y el papel en la inflamación alérgica es ampliamente reconocido. Los mastocitos aumentan en número en los explantes de pulmón de los asmáticos graves y son la principal fuente de mediadores inflamatorios clínicamente relevantes, como los leucotrienos, la histamina y las citoquinas Th2. Los mastocitos son la fuente principal de TNF preformado en tejidos enfermos.

20 El factor de células madre (SCF) es una glicoproteína que señala a través de la célula y el receptor de tirosina quinasa asociado a la membrana que se define en adelante como c-Kit, y esta vía de señalización desempeña un papel clave en la hematopoyesis, actuando como regulador positivo y negativo, a menudo en sinergia con otras citoquinas. Un receptor c-Kit de cobertura soluble puede desempeñar un papel en la regulación de SCF. C-Kit se expresa en células madre hematopoyéticas pluripotentes que son las precursoras de las células maduras que pertenecen a linajes linfoides y eritroides. A diferencia de otras células hematopoyéticas, los precursores de mastocitos y los mastocitos maduros conservan altos niveles de expresión de c-Kit. Por lo tanto, la señalización de SCF a través de c-Kit es vital para el desarrollo, la función, el tráfico y la supervivencia de los mastocitos. También juega un papel en la gametogénesis y la melanogénesis. Los ratones que inactivan las mutaciones de c-Kit en el locus *W* prácticamente no tienen mastocitos. La activación de las mutaciones de c-Kit en el hombre se asocia con mastocitosis.

35 Las células madre hematopoyéticas pluripotentes positivas para c-Kit son precursoras de múltiples tipos de células que incluyen células mesenquimales, fibroblastos y mastocitos. La enfermedad fibrótica se caracteriza en parte por la excesiva actividad y proliferación de los fibroblastos que resulta en el depósito de la matriz extracelular. Se ha informado que las células madre hematopoyéticas pluripotentes de médula ósea positivas para c-Kit son una fuente de fibroblastos y mastocitos en los tejidos fibróticos.

40 Los mastocitos pueden proporcionar una fuente sostenida de mediadores inflamatorios, angiogénicos, mitogénicos y fibrogénicos. Los mastocitos están acoplados funcional y anatómicamente a los fibroblastos y tienen un papel directo en la activación de los fibroblastos. Los mastocitos aumentan la cinética y la magnitud de la contracción del colágeno mediada por los fibroblastos, la deposición de la matriz extracelular y pueden transformar los fibroblastos en miofibroblastos. Los fibroblastos a su vez secretan SCF para activar y expandir aún más los mastocitos, y ambos tipos de células son componentes de la red fibrogénica.

45 El número de mastocitos y los mediadores de mastocitos están significativamente elevados en la mayoría de las enfermedades fibróticas humanas, incluyendo fibrosis pulmonar idiopática (IPF) y esclerodermia. Los fenotipos diferenciales de los mastocitos se detectan en algunos pacientes con esclerodermia y en el modelo de esclerodermia en ratones *Tsk*. Una forma sistémica agresiva de mastocitosis puede caracterizarse por mielofibrosis que indica que los mastocitos pueden ser células efectoras en la fibrosis.

50 Gleevec^{MR} y otros en la clase como Sutent^{MR} son inhibidores del receptor de tirosina quinasa con múltiples objetivos que pueden dirigir la actividad de señalización de c-Kit, pero inhibir una serie de otras quinastas. Estos inhibidores de quinasa están indicados para el entorno oncológico. Se han notificado casos de mielosupresión, anemia y una serie de efectos secundarios incluidos cardiotoxicidad y edema periférico, para Gleevec. Por lo tanto, estas moléculas pueden no tener el mejor beneficio para el perfil de riesgo para el tratamiento crónico de enfermedades asociadas con la señalización de c-Kit. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevas terapias y reactivos, particularmente aquellos que sean más potentes y selectivos, y que posean mejores perfiles de seguridad para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y fibróticas asociadas con c-Kit. Dicho compuesto también podría mostrar perfiles de eficacia y seguridad significativamente mejores en enfermedades oncológicas como la leucemia mieloide, enfermedades asociadas con mutaciones de c-Kit como *GIST* y mastocitosis, enfermedades asociadas con la sobreexpresión de c-kit y/o excesiva actividad autocrina del SCF como en el melanoma y varios SCLC. Actualmente, faltan terapias y reactivos dirigidos a c-Kit humano y capaces de afectar un beneficio terapéutico sin efectos adversos significativos.

65 Sumario de la invención

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

5 La invención proporciona agentes que son antagonistas y antagonistas neutrales de SCF en el receptor c-Kit de la membrana y asociado a la célula, tales como anticuerpos monoclonales. En una realización más específica, se proporcionan anticuerpos monoclonales humanizados (no murinos) que se unen a c-Kit. Los anticuerpos humanizados de la invención comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada de las expuestas en las SEQ ID NOs 2 y 4. También se divulgan ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los anticuerpos anteriores o agentes de unión específicos. También se divulga un vector que comprende cualquiera de las secuencias de ácido nucleico mencionadas anteriormente. También se divulga una célula huésped que comprende cualquiera de los ácidos nucleicos o vectores mencionados anteriormente.

15 Los agentes de unión a c-Kit y los antagonistas neutros son anticuerpos IgG1 aglicosilados que se unen específicamente a c-Kit y que comprenden una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2; o una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4. En tales realizaciones, la variación de la secuencia en relación con la SEQ ID NO: 2 o 4, respectivamente, puede representar, por ejemplo, una sustitución conservadora de la región marco correspondiente de una IgG usando un aminoácido humano alternativo en esa posición.

20 Los anticuerpos mencionados anteriormente muestran una avidéz caracterizada por una k_d inferior a 1×10^{-8} , o 1×10^{-9} , según lo determinado por resonancia de plasmón de superficie (análisis BIAcore).

25 Los anticuerpos mencionados anteriormente pueden exhibir una IC_{50} antagonista neutral inferior a 1×10^{-2} , o inferior a 1×10^{-3} , o 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} o 1×10^{-9} , según lo determinen los ensayos celulares. En una realización particular, la afinidad y potencia funcional del anticuerpo humanizado es al menos comparable a la afinidad y potencia de un anticuerpo murino parental. En una realización preferida, el anticuerpo humanizado no es un agonista del receptor c-Kit y no activa los mastocitos, lo que podría provocar reacciones anafilactoides y debería mostrar un PD/PK y un perfil de inmunogenicidad que sea al menos comparable al anticuerpo murino original.

35 Se contemplan numerosos procedimientos en la presente divulgación. Por ejemplo, se divulga un procedimiento para producir un anticuerpo mencionado anteriormente o un agente de unión específico que comprende cultivar la célula huésped mencionada de manera tal que el ácido nucleico se expresa para producir el anticuerpo o agente. Tales procedimientos también pueden comprender la etapa de recuperar el anticuerpo o agente del cultivo de la célula huésped. También se divulga un anticuerpo o agente aislado producido por el procedimiento mencionado anteriormente.

40 La invención proporciona además cualquiera de los anticuerpos precedentes o agentes de unión específicos, por ejemplo, para su uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno asociado con c-Kit mediante la administración de una cantidad eficaz de los mismos. Un ejemplo de tal trastorno a tratar es una enfermedad fibrótica.

45 Breve descripción de las figuras

Figura 1: SR-1 inhibe los mastocitos en el modelo activado por una herida.

Figura 2: Conteos de mastocitos en un modelo de cicatrización de heridas.

50 Figura 3: Las isoformas SR-1 humanizadas inhiben la activación inducida por el factor de células madre (SCF) de c-Kit y la posterior fosforilación a través de c-Kit.

Descripción detallada

55 El anticuerpo c-Kit anti-humano murino SR-1 se describe en la patente de Estados Unidos No. 5.919.911 y en la patente de Estados Unidos No. 5.489.516. SR-1 mostró propiedades de unión adecuadas para c-kit y bloqueó la señalización del receptor mediada por SCF, sin embargo, esta molécula no posee todas las características que se desearían en una terapéutica humana más allá de los problemas obvios de inmunogenicidad. Broudy informó que SR-1 poseía una actividad similar a la del agonista que podría conducir a la internalización del receptor y la fosforilación. J Cell Physiol. Marzo de 1994; 158 (3): 545-54. Estas actividades funcionales hacen que la molécula sea menos eficaz y menos segura. Si bien la humanización de los monoclonales es una metodología establecida y que generalmente se espera que las actividades biológicas se traduzcan de manera apropiada, la conformación del anticuerpo humanizado SR-1 que depende del marco humano puede generar diferentes actividades intrínsecas en c-Kit y, por lo tanto, funciones biológicas. En este ejemplo particular, se buscarán las propiedades farmacológicas deseadas pero no las propiedades "agonistas" no deseadas, aunque no se ha publicado la metodología para lograrlo. Las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo SR-1 se insertaron en una

combinación única de las cadenas ligera y pesada humanas de IgG1 e IgG2 e IgG4 estructuralmente diferentes, mientras que sorprendentemente mantienen una afinidad similar por c-Kit. Sin embargo, cada una de estas regiones marco demostró tener desventajas.

- 5 El SR-1 humanizado en el entorno de IgG2 demostró tener una alta afinidad por c-Kit, pero en múltiples tipos de células no pudo bloquear completamente la internalización del receptor mediada por SCF y en ensayos de mastocitos cultivados condujo a la fosforilación de c-Kit, una señal de supervivencia, y el agrupamiento inusual mediado de las células. Estas propiedades son potencialmente indeseables, ya que el objetivo de una estrategia terapéutica es agotar de forma apoptótica los mastocitos y los precursores mediante el bloqueo de la señal de SCF de supervivencia y evitar la activación de los mastocitos que podría conducir a reacciones anafilactoides in vivo.
- 10 Cuando se insertaron las regiones CDR de SR-1 de ratón en el marco de IgG1 humana, también se mantuvieron la afinidad y la potencia funcional, pero este entorno es menos deseable debido a la activación del complemento y la citotoxicidad mediada por células que se encuentra a menudo con este isotipo de anticuerpo. Cuando se insertaron las regiones CDR de SR-1 de ratón en el marco de IgG4 humana, también se mantuvieron la afinidad y la potencia funcional, pero inesperadamente esta molécula mostró una agregación significativa tras la purificación y el aumento de escala.

De este modo, los presentes inventores intentaron superar las deficiencias en cada una de estas moléculas creando un anticuerpo que no tiene activación del complemento, y no activa c-kit y mastocitos mientras mantiene la afinidad deseada, la potencia antagonista neutral por el receptor c -Kit de la membrana, y no el receptor c-kit soluble. Este anticuerpo también debe mostrar una PD/PK apropiada y es eficaz para agotar los mastocitos y sin evidencia de agonismo de mastocitos in vivo.

25 Cadena ligera kappa de SR-1 humanizado

La SEQ ID NO: 1 representa el ácido nucleico que codifica la cadena ligera kappa de SR-1 humanizado.

ATGGTGTTCAGACCCAGGTCTTCATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGCCCTACGGGGACATCGTGA
 TGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCAACTGCAGAGCCAGTGA
 AAGTGTGATATTTATGGCAATAGTTTTATGCACTGGTACCAGCAGAAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTG
 CTCATTTACCTTGCATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGACCGATTTCAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAG
 ATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAAAATAATGA
 GGATCCGTACACGTTCCGAGGTGGGACCAAGGTGAAATAAAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
 ATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT
 ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT
 CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC
 GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA
 ACAGGGGAGAGTGT**TGA** (SEQ ID NO:1)

- 30 La SEQ ID NO: 2 es la siguiente en la que la negrita representa las CDR (por ejemplo, CDR1 son los aminoácidos 43 a 58 de la SEQ ID NO: 2, CDR2 son los aminoácidos 74 a 80 de la SEQ ID NO: 2 y CDR3 son los aminoácidos 113 a 121 de la SEQ ID NO: 2):

1 MVLQTQVFIS LLLWISGAYG **D**IVMTQSPDS LAVSLGERAT **INCRASESVD**
 51 **IYGNSEFMHWY** QQKPGQPPKL LIY**LASNLES** GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS
 101 SLQAEDVAVY YC**QQNNEDPY** TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK
 151 SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS
 35 201 STLTLISKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:2).

Una cadena ligera kappa humanizada madura son los aminoácidos 20 a 248 de la SEQ ID NO: 2.

40 Cadena pesada aglico-IgG1 de SR-1 humanizado

SEQ ID NO: 3

ES 2 705 480 T3

ATGGACTGGACCTGGAGGGTCTTCTGCTTGCTGGCAGTGGCCCCAGGTGCCCACTCCCAGGTGC
AGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGG
ATACACCTTCACCAGTTACAATATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGA
GTTATTTATTTCAGGAAATGGTGATACTTCTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAGGGTCACCATTACCGCTG
ACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTG
TGCGAGAGAGAGGGGATACTCGTTTTGGTAACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACCGTCTCTAGTGCCTCC
ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG
GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGG
CGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC
TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA
AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAACTCCTGGG
GGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTG
ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG
AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTACCGTGTGGTGCAGCGTCT
CACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA
GCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC
CATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA
CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT
TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG
TAAATGA (SEQ ID NO:3).

Las CDR se representan en negrita (por ejemplo, CDR1 son los aminoácidos 50 a 54 de la SEQ ID NO: 4, CDR2 son los aminoácidos 69 a 85 de la SEQ ID NO: 4 y la CDR 3 son los aminoácidos 118 a 125 de la SEQ ID NO: 4):

5

1 MDWTWRVFCL LAVAPGAHSQ VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYTFTS
51 **YNMHWVRQAP** GQGLEWMGVI **YSGNGDTSYN** **QKFKGRVTIT** ADKSTSTAYM
101 ELSSLRSEDV AVYYCARE**RD** **TRFGNWQGT** LVTVSSASTK GPSVFPLAPS
151 SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS
201 LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKKVEPKSCD KTHTCPPCPA
251 PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
301 VEVHNAKTKP REEQYQSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNAKALPAP
351 IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPDSIAVEW
401 ESNQGPENNY KTTTPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA
451 LHNHYTQKSL SLSPGK (Seq Id No: 4)

10 Cadena pesada de IgG2 de SR-1 humanizado

ES 2 705 480 T3

ATGGACTGGACCTGGAGGGTCTTCTGCTTGCTGGCAGTGGCCCCAGGTGCCCACTCCCAGGTGCAGCTGG
TGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACAC
CTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGTTATT
TATTCAGGAAATGGTGATACTTCTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAGGGTCACCATTACCGCTGACAAAT
CCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAG
AGAGAGGGATACTCGTTTTGGTAACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACCGTCTCTAGTGCCTCCACCAAG
GGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC
TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCA
CACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC
AACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAG
TTGAGCGCAAATGTTGTGTGCGAGTGGCCACCGTGGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCT
CTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTCGCTGGTGGTGGAC
GTGAGCCACGAAGACCCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
CAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTTGTGCACCAGGA
CTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACC
ATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGA
CCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC
ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (Seq Id No: 5)

La siguiente es la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada de IgG2 de SR-1, y las CDR están representadas en negrita:

5

1 MDWTWRFVCL LAVAPGAHSQ VQLVQSGAEV KKPASVKVS CKASGYTFTS
 51 **YNMHWRQAP** GQGLEWMGVI **YSGNGDTSYN** **QKFKGRVTIT** ADKSTSTAYM
 101 ELSSLRSEDV AVYYCARE**RD** **TRFGN**WGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPC
 151 SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS
 201 LSSVTVPSV NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV
 251 AGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NQYVDGVEVH
 301 NAKTKPREEQ FNSTFRVSV LTVVHQDNLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT
 351 ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG
 401 QPENNYKTP PMLDSGSEFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN
 451 YTQKSLSLSP **GK** (Seq Id No: 6)

10 MULC de SR-1

ES 2 705 480 T3

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCACAGG**TAA**CATTGTGT
TGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCTGAGGGCCACCATATCCTGCAGAGCCAGTGA
AAGTGTGATATTTATGGCAATAGTTTTATGCACTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTC
CTCATCTATCTTGCATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTT**CAGTGGCAGTGGGTCTAGGACAG**
ACTTCACCCTCACCATTGATCCTGTGGAGGCTGATGATGCTGCAACCTATTACTGT**CAGCAAAAATAATGA**
GGATCCGTACACGTTCCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCC
ATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAAC**TCT**
ACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTG
GACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTAT
GAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGGCCACTCACAAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCA
ACAGGAATGAGTGT**TGA** (SEQ ID NO: 7)

Las CDR están representadas en negrita:

1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG NIVLTQSPAS LAVSLGLRAT ISCRASE**SVD**
51 **IYGNSEFMHWY** QQKPGQPPKL LIY**LASNLES** GVPARFSGSG SRTDFTLTID
101 PVEADDAATY YC**QQNNEDPY** **TFGGG**TKLEI K RADAAPTVS IFPPSSEQLT
151 SGGASVVCFL NNFYPKDINV KWKIDG**SERQ** NGVLNSWTDQ DSKDSTYSMS
5 201 STLTLTKDEY ERHNSYTCEA THKTSTSP**IV** KSFNRNEC (Seq Id No: 8)

Cadena pesada de mulG2a de SR-1

ATGGGATGGAGTTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCC**AGG**TGCAACTGC
AGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCTTGCAAGGCTTCTGGCTACAC
ATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAGCAGACACCTGGACAGGGCCTGGAATGGATTGGAGTTATT
TATTCAGGAAATGGTGATACTTCTTACAATCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACAT**TGACTGCAGACAAAT**
CCTCCAGCACAGCCTACATGCAAATCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAG
AGAGAGGGATACTCGTTTTGGTAACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACA
10 GCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCCTGTGTGTGGAGATACAACTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCC
TGGTCAAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACCTTGATCCCTGTCCAGTGGTGTGCA
CACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACCCTCAGCAGCTCAGTACTGTAACCTCGAGCACC
TGGCCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATGTGGCCCACCCGGCAAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTG
AGCCCAGAGGGCCACAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACC
ATCCGTCTTCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGT
GTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGT**TTGTGAACAACGTGGAAGTAC**
ACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGTGGT**CAGTGCCCTCCCAT**
CCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCC
ATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGT**CAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAG**
AAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCCTGACCTGCATGGT**CACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTA**
CGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGA**AACTGAACCAGTCCCTGGACTCTGAT**
GGTCTTACTT**CATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTC**ct
gttcagtggtccacgaggggtctgcacaatcaccacacgactaagagcttctcccggactccgggtaaa**tg**
A (Seq Id No: 9)

1 MGWSCIIIFL VATATGVHSQ VQLQOPGAEL VKPGASVKMS CKASGYTFTS **YNMH**VWKQTP
 61 GQGLEWIGVI **YSGNGDTSYN QKFKG**KATLT ADKSSSTAYM QINSLTSEDS AVYYCARE**RD**
 121 **TRFCN**WGQGT LVTVSAAKTT APSVYPLAPV CGDTTGSSVT LGCLVKGYFP EPVTLTWN**SG**
 181 SLSSGVHTFP AVLQSDLYTL SSSVTVTSST WPSQSITCNV AHPASSTKVD KKIEPRGPTI
 241 KPCPPCKCPA P~~N~~LLGGPSVF IFPPKIKDVL MISLSPIVTC VVVDVSEDDP DVQISW**FVNN**
 301 VEVHTAQTQT HREDYNSTLR VVSALPIQHQ DWMSGKEFKC KVN**NK**DL**PAP** IERTISK**PKG**
 361 SVRAPQVYVL PPPEEEMTKK QVTLTCMVTD FMPEDIYVEW T**NNG**KTELNY KNTEPVLDSD
 421 GSYFMYSKLR VEKKNWVERN SYSCSVVHEG LHNHHTTKSF SRTPGK (Seq Id No:
 10)

5 La CDR1 de cadena ligera de SR-1 es RASESVDIYGNSFMH (aminoácidos 44 a 58 de la SEQ ID NO: 8), CDR2 es LASNLES (aminoácidos 74 a 80 de la SEQ ID NO: 8) y CDR3 es QQNNEDPYT, (aminoácidos 111 a 121 de la SEQ ID NO: 8). La CDR1 de cadena pesada es SYNMH, (aminoácidos 50 a 54 de la SEQ ID NO: 10), CDR2 es VIYSGNGDTSYNQKFKG, (aminoácidos 69 a 85 de la SEQ ID NO: 10), CDR3 es RDTRFCN, (aminoácidos 118 a 125 de la SEQ ID NO: 10).

10 Se entiende que cada una de las cadenas pesada y ligera representadas en la presente solicitud se procesan en la célula hasta una forma madura. Por consiguiente, los péptidos señal se escinden y en el caso de cadenas pesadas de anticuerpos, la lisina C-terminal se escinde. Por consiguiente, la forma madura se procesa proteolíticamente y también incluye otras modificaciones postraduccionales, como la glicosilación, si se expresa en células de mamíferos. El péptido señal para cada cadena pesada y ligera son los aminoácidos 1 a 20 de las SEQ ID NO: 2 y 15 10, y los aminoácidos 1 a 19 de las SEQ ID NO: 4, 6 y 10.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la cadena ligera de SR-1 murino se exponen en la SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 8. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la cadena pesada de SR-1 murino son expuestas en la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 10. Las variantes con sustituciones adicionales (por ejemplo, sustituciones conservadoras de los aminoácidos murinos) también pueden retener la alta afinidad de unión. Las sustituciones, 20 eliminaciones o inserciones en posiciones dentro de las CDR y el marco pueden realizarse sin afectar la afinidad.

En una realización, el anticuerpo humanizado comprende una cadena ligera que retiene las CDR murinas originales de SR-1 murino, por ejemplo, posiciones aproximadamente 44-58, aproximadamente 74-80 y aproximadamente 113- 25 121 de la SEQ ID NO: 8. En otras realizaciones, el anticuerpo humanizado comprende una cadena pesada que retiene las CDR murinas de SR-1 murino, por ejemplo, posiciones aproximadamente 50-54, aproximadamente 68-85 y aproximadamente 118-125 de la SEQ ID NO: 10, y tiene una región marco derivada humana. Tal como se usa en el presente documento, se entiende que el término "aproximadamente" contempla de dos a cinco cambios de posición de aminoácidos, siempre que se mantenga la afinidad con c-Kit.

30 Tales agentes comprenden una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 y una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4; o una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 y una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 35 más idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2. En tales realizaciones, la variación de la secuencia en relación con la SEQ ID NO: 2 o 4, respectivamente, puede representar, por ejemplo, una sustitución conservadora de la región marco correspondiente de una IgG usando un aminoácido humano alternativo en esa posición.

40 Los anticuerpos mencionados anteriormente muestran una avidéz caracterizada por una k_d inferior a 10^{-8} , o 10^{-9} , según se determina por resonancia de plasmón de superficie (análisis BIAcore). En otra realización, los anticuerpos mencionados anteriormente muestran una potencia antagonista neutra IC_{50} inferior a 1×10^{-2} , o inferior a 1×10^{-3} , o 1×10^{-4} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9} , según lo determinado por los ensayos celulares.

45 La presente invención proporciona una variedad de agentes antagonistas de unión específica y neutros, que incluyen, entre otros, anticuerpos específicos de c-Kit humanos o humanizados, que se derivan de SR-1 murino y conservan características deseables como K_d (constante de velocidad de disociación) para c-Kit en el intervalo de 1×10^{-8} o inferior, o hasta 1×10^{-9} o inferior, y/o IC_{50} de antagonista neutral para c-Kit en el intervalo de 1×10^{-2} o inferior, o con un intervalo inferior a 1×10^{-9} o inferior (por ejemplo, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} o inferior) 50 y/o la capacidad de reducir los síntomas de un trastorno asociado con c-Kit. También se divulgan ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos de agentes de unión específicos, vectores y células huésped recombinantes que comprenden dichos ácidos nucleicos, procedimientos para producir dichos agentes de unión específicos, formulaciones farmacéuticas que incluyen dichos agentes de unión específicos, procedimientos para preparar las

formulaciones farmacéuticas y procedimientos para tratar pacientes con las formulaciones farmacéuticas y compuestos.

Los ácidos nucleicos que codifican estas regiones variables modificadas de la cadena ligera se construyeron y se expresaron conjuntamente con los ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada injertada a la CDR o humanizada y viceversa, y opcionalmente se pueden enlazar a regiones constantes. Cualquier cadena pesada y ligera, humanizada o quimérica, se puede combinar siempre que se mantenga una afinidad de unión adecuada. Los genes deseados se introdujeron en células de mamíferos y los productos de inmunoglobulina recombinantes resultantes se expresaron, purificaron y caracterizaron.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio e incluye anticuerpos completamente ensamblados, anticuerpos monoclonales (incluidos los anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos que pueden unirse a antígeno (por ejemplo, Fab', F'(ab)₂, Fv, anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos), que comprenden las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los anteriores, siempre que exhiban la actividad biológica deseada. El término "anticuerpo" excluye explícitamente el anticuerpo murino (es decir, un anticuerpo producido por un hibridoma murino o que tiene la misma secuencia que un anticuerpo producido por un hibridoma murino) del alcance del término.

El término "agente de unión específico" incluye anticuerpos como se definió anteriormente y péptidos recombinantes u otros compuestos que contienen secuencias derivadas de CDR que tienen las propiedades de unión a antígeno deseadas. Se incluyen específicamente en el término los péptidos que contienen secuencias de aminoácidos que son al menos 80%, 90% o 100% idénticas a una o más CDR de SR-1 murino, que incluyen preferiblemente CDR3 de cadena pesada.

Como se usa en el presente documento, se entiende que el término "antagonista neutro" significa un agente de unión específico que es capaz de inhibir una actividad agonista. Estos agentes incluyen anticuerpos como se definió anteriormente y péptidos recombinantes u otros compuestos que contienen secuencias derivadas de CDR que tienen la propiedades deseadas de unión al antígeno. Se incluyen específicamente en el término los péptidos que contienen secuencias de aminoácidos que son al menos 80%, 90% o 100% idénticas a una o más CDR de SR-1 murino, que incluyen preferiblemente CDR3 de cadena pesada.

También se incluyen en el término "pepticuerpos" que son moléculas que comprenden un dominio Fc de anticuerpo como el "vehículo" unido a al menos un péptido de unión a antígeno. Las CDR del anticuerpo del anticuerpo SR-1 pueden ser adecuadas para su incorporación en un pepticuerpo, incluyendo particularmente la CDR3 de la cadena pesada. La producción de pepticuerpos se describe en general en la publicación PCT WO 00/24782, publicada el 4 de mayo de 2000. Los péptidos se pueden enlazar en tándem (es decir, secuencialmente), con o sin enlazadores. Los péptidos que contienen un residuo de cisteinilo pueden estar entrecruzados con otro péptido que contiene Cys, uno cualquiera o ambos de los cuales pueden estar enlazados a un vehículo. Cualquier péptido que tenga más de un residuo de Cys también puede formar un enlace disulfuro dentro del péptido. Cualquiera de estos péptidos puede formar derivados, por ejemplo, el terminal carboxilo se puede proteger con un grupo amino, las cisteínas se pueden proteger o los residuos de aminoácidos se pueden sustituir con restos distintos de los de aminoácidos (véase, por ejemplo, Bhatnagar et al., J Med. Chem. 39: 3814-9 (1996), y Cuthbertson et al., J. Med. Chem. 40: 2876-82 (1997)). Las secuencias peptídicas pueden optimizarse, análogamente a la maduración por afinidad de los anticuerpos, o alterarse de otro modo mediante el escaneo de alanina o la mutagénesis aleatoria o dirigida, seguida de selección para identificar los mejores aglutinantes. Lowman, Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26: 401-24 (1997).

Se pueden insertar varias moléculas en la estructura del agente de unión específico, por ejemplo, dentro de la porción peptídica en sí misma o entre las porciones de péptido y vehículo de los agentes de unión específica, mientras se mantiene la actividad deseada del agente de unión específico. Se puede insertar fácilmente, por ejemplo, moléculas tales como un dominio Fc o un fragmento del mismo, polietilenglicol u otras moléculas relacionadas tales como dextrano, un ácido graso, un lípido, un grupo de colesterol, un pequeño carbohidrato, un péptido, un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, un resto detectable como se describe en el presente documento (incluidos los agentes fluorescentes, radiomarcadores tales como radioisótopos), un oligosacárido, oligonucleótido, un polinucleótido, ARN de interferencia (u otros), enzimas, hormonas o similares. Los expertos en la técnica apreciarán otras moléculas adecuadas para inserción de esta manera, y se incluyen dentro del alcance de la invención. Esto incluye la inserción, por ejemplo, de una molécula deseada entre dos aminoácidos consecutivos, opcionalmente unidos por un enlazador adecuado.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado de un componente de la célula que lo expresó. Los componentes contaminantes de la célula son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95% en peso de anticuerpo, y lo más preferiblemente más de 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna, o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo de origen natural aislado incluye el anticuerpo

in situ dentro de las células recombinantes, ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

5 El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y se dirigen contra un sitio antigénico o epítipo individual, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes epítopos.

10 Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas humanas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse en subclases o isotipos, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Diferentes isotipos tienen diferentes funciones efectoras; por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 tienen actividad de ADCC.

15 El término región "hipervariable" se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión del antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una región determinante de complementariedad o CDR [es decir, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada como se describe por Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md. (1991)]. Incluso una sola CDR puede reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad más baja que el sitio de unión al antígeno completo que contiene todas las CDR. Se entiende que la CDR de un anticuerpo puede incluir secuencias adicionales o menos fuera de los límites especificados anteriormente, siempre que el anticuerpo retenga su capacidad para unirse a la molécula objetivo.

20 Una definición alternativa de residuos de un "bucle" hipervariable es descrita por Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987) como residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada.

25 Los residuos "marco" o FR son aquellos residuos de región variable distintos de los residuos de la región hipervariable.

30 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa intacta, preferiblemente la región variable o de unión a antígeno del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata et al., Protein Eng., 8 (10): 1057-1062 (1995)); moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

35 La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual que contiene la región constante. El fragmento Fab contiene todo el dominio variable, así como el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (C_H1) de la cadena pesada. El fragmento Fc muestra los carbohidratos y es responsable de muchas funciones efectoras de anticuerpos (como el complemento de unión y los receptores celulares), que distinguen una clase de anticuerpo de otra.

40 El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "sFv" que comprenden los dominios V_H y V_L de los anticuerpos, en donde estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica sencilla. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la inclusión de unos pocos residuos adicionales en el terminal carboxilo del dominio C_H1 de la cadena pesada, que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el Fv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 1 13, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994).

45 "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión al antígeno. Esta región consta de un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y una ligera en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H V_L. En conjunto, las seis CDR confieren especificidad de unión al antígeno con el anticuerpo. Sin embargo, un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad más baja que el sitio de unión completo.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica ($V_H V_L$). Al utilizar un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más detalladamente, por ejemplo, en los documentos EP 404,097; WO 93/11161; y 30 Hollinger et al., Proc. Natl Acad Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron a través de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos, pero también pueden producirse directamente por células huésped recombinantes. Véase, por ejemplo, Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988); Skerra et al. Science 240: 1038-1041 (1988); Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992).

Como se establece en el presente documento, las composiciones y procedimientos de tratamiento de trastornos inflamatorios, autoinmunes, oncológicos y fibróticos pueden utilizar uno o más agentes terapéuticos anti-c-Kit utilizados individualmente o en combinación con otros agentes terapéuticos para lograr los efectos deseados. Los ejemplos de agentes antifibróticos adecuados para su uso de acuerdo con la invención incluyen citoquinas en los que la citoquina se selecciona de entre el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), interleuquina 4 (IL-4), interleuquina 5 (IL-5), interleuquina 9 (IL-9), interleuquina 13 (IL-13), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina 1 beta (IL-1 β), factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), interleuquina 6 (IL-6), oncostatina M (OSM), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (CCL2/MCP-1) y quimioquina pulmonar y regulada por activación (CCL18/PARC).

Los anticuerpos derivados de SR-1 de acuerdo con la presente invención se producen preferiblemente mediante una metodología de ADN recombinante utilizando uno de los sistemas de expresión de anticuerpos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)). Dichos anticuerpos también son preferiblemente proteínas de fusión quiméricas que tienen secuencias variables derivadas de inmunoglobulinas y regiones constantes humanas, o más preferiblemente son anticuerpos monoclonales más parecidos a los humanos (tales como anticuerpos humanos o humanizados) que comprenden residuos de anticuerpos humanos pero preferiblemente retienen al menos las CDR de SR-1 murino. Además de las moléculas intactas de longitud completa, el término "anticuerpo" también se refiere a fragmentos de los mismos o multímeros o agregados de moléculas intactas y/o fragmentos que se unen a c-Kit.

La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo derivado de un anticuerpo no humano, típicamente un anticuerpo monoclonal de ratón. Alternativamente, un anticuerpo humanizado puede derivarse de un anticuerpo quimérico que retiene o conserva sustancialmente las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo parental, no humano, pero que muestra inmunogenicidad disminuida en comparación con el anticuerpo parental cuando se administra a humanos. La expresión "anticuerpo quimérico", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia que contiene un anticuerpo derivado de dos anticuerpos diferentes (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567) que típicamente se originan de diferentes especies. Más típicamente, los anticuerpos quiméricos comprenden fragmentos de anticuerpos humanos y murinos, generalmente regiones constantes humanas y variables de ratón.

45 Producción de anticuerpos recombinantes

La secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina de interés puede determinarse por secuenciación directa de proteínas, y las secuencias de nucleótidos codificantes adecuadas pueden diseñarse de acuerdo con una tabla universal de codones.

Alternativamente, el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales puede aislarse y secuenciarse a partir de células de hibridoma usando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). La determinación de la secuencia generalmente requerirá el aislamiento de al menos una parte del gen o ADNc de interés. Por lo general, esto requiere la clonación del ADN o, preferiblemente, el ARNm (es decir, el ADNc) que codifica los anticuerpos monoclonales. La clonación se lleva a cabo utilizando técnicas estándar (véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, vols. 1-3, Cold Spring Harbor Press). Por ejemplo, una biblioteca de ADNc puede construirse por transcripción inversa de ARNm poliA+, preferiblemente ARNm asociado a membrana, y la biblioteca puede seleccionarse utilizando sondas específicas para secuencias de genes de polipéptidos de inmunoglobulina humana. Sin embargo, en una realización preferida, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se usa para amplificar los ADNc (o porciones de ADNc de longitud completa) que codifican un segmento de interés del gen de inmunoglobulina (por ejemplo, un segmento variable de cadena ligera). Las secuencias amplificadas pueden clonarse fácilmente en cualquier vector adecuado, por ejemplo, vectores de expresión, vectores de minigenes, o vectores de presentación en fagos. Se apreciará que el procedimiento particular de clonación utilizado no es crítico, siempre que sea posible determinar la secuencia de alguna porción del polipéptido de inmunoglobulina de interés.

Como se usa en el presente documento, una molécula de ácido nucleico "aislada" o una secuencia de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que (1) se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que normalmente se asocia en la fuente natural del ácido nucleico o (2) se clona, amplifica, etiqueta o bien, se distingue de los ácidos nucleicos de fondo, de modo que se pueda determinar la secuencia del ácido nucleico de interés. Una molécula de ácido nucleico aislada es diferente de la forma o configuración en la que se encuentra en la naturaleza. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan el anticuerpo en la que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una ubicación cromosómica diferente de la de las células naturales.

Una fuente para el ARN utilizado para la clonación y secuenciación es un hibridoma producido mediante la obtención de una célula B del ratón transgénico y la fusión de la célula B con una célula inmortal. Una ventaja de usar hibridomas es que se pueden detectar fácilmente y se puede seleccionar un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal humano de interés. Alternativamente, el ARN puede aislarse de células B (o de bazo completo) del animal inmunizado. Cuando se usan fuentes distintas a los hibridomas, puede ser deseable buscar secuencias que codifiquen inmunoglobulinas o polipéptidos de inmunoglobulina con características de unión específicas. Un procedimiento para tal detección es el uso de la tecnología de presentación en fagos. La presentación en fagos se describe, por ejemplo, en Dower et al., WO 91/17271, McCafferty et al., WO 92/01047, y Caton y Koprowski, Proc. Natl Acad Sci. USA, 87: 6450-6454 (1990). En una realización que utiliza tecnología de presentación en fagos, se aísla el ADNc de un ratón transgénico inmunizado (por ejemplo, ADNc total de bazo), la reacción en cadena de la polimerasa se usa para amplificar secuencias de ADNc que codifican una parte de un polipéptido de inmunoglobulina, por ejemplo, regiones CDR, y las secuencias amplificadas se insertan en un vector fago. Los ADNc que codifican péptidos de interés, por ejemplo, péptidos de región variable con características de unión deseadas, se identifican mediante técnicas estándar tales como encuadramiento.

A continuación, se determina la secuencia del ácido nucleico amplificado o clonado. Normalmente, se determina la secuencia que codifica una región variable completa del polipéptido de inmunoglobulina, sin embargo, a veces será adecuado secuenciar solo una parte de una región variable, por ejemplo, la parte que codifica CDR. Normalmente, la porción secuenciada tendrá una longitud de al menos 30 bases, más a menudo se secuenciarán las bases que codifican para al menos aproximadamente un tercio o al menos aproximadamente la mitad de la longitud de la región variable.

La secuenciación puede llevarse a cabo en clones aislados de una biblioteca de ADNc, o, cuando se usa PCR, después de subclonar la secuencia amplificada o mediante secuenciación directa por PCR del segmento amplificado. La secuenciación se lleva a cabo utilizando técnicas estándar (véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Guide, vols. 1-3, Cold Spring Harbor Press, y Sanger, F. et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467). Al comparar la secuencia del ácido nucleico clonado con las secuencias publicadas de los genes de inmunoglobulina humana y los ADNc, un experto podrá determinar fácilmente, dependiendo de la región secuenciada, (i) el uso del segmento de línea germinal del polipéptido de inmunoglobulina del hibridoma (incluido el isotipo de la cadena pesada) y (ii) la secuencia de las regiones variables de la cadena pesada y ligera, incluidas las secuencias resultantes de la adición de la región N y el proceso de mutación somática. Una fuente de información sobre la secuencia del gen de inmunoglobulina es el Centro Nacional de Información de Biotecnología, Biblioteca Nacional de Medicina, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md.

Una vez aislado, el ADN puede unirse operativamente a secuencias de control de la expresión o colocarse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra manera no producen proteína de inmunoglobulina, para dirigir la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. La producción de anticuerpos recombinantes es bien conocida en la técnica.

Las secuencias de control de expresión se refieren a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está unido operativamente cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o un líder secretor está unido operativamente al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia de codificación si está posicionado de modo que facilite la traducción. En general, operativamente enlazado significa que las secuencias de ADN que están enlazadas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se realiza mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan de acuerdo con la práctica convencional.

Célula, línea celular y cultivo celular a menudo se usan de manera intercambiable y todas las designaciones de este tipo incluyen la progenie. Los transformantes y las células transformadas incluyen la célula sujeto principal y los cultivos derivados de ellos sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Se incluyen la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que la seleccionada en la célula originalmente transformada.

La invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican agentes o anticuerpos de unión específica de la invención, opcionalmente unidos de forma operable a secuencias de control reconocidas por una célula huésped, vectores y células huésped que comprenden los ácidos nucleicos, y técnicas recombinantes para la producción de los agentes de unión específicos o anticuerpos, que pueden comprender cultivar la célula huésped para que el ácido nucleico se exprese y, opcionalmente, recuperar el agente o anticuerpo de unión específica del cultivo de la célula huésped o medio de cultivo.

Se conocen muchos vectores en la técnica. Los componentes del vector pueden incluir uno o más de los siguientes: una secuencia señal (que puede, por ejemplo, dirigir la secreción del agente o anticuerpo de unión específica), un origen de replicación, uno o más genes marcadores selectivos (que pueden, por ejemplo, conferir resistencia a los antibióticos u otros medicamentos, complementar deficiencias auxotróficas, o suministrar nutrientes críticos no disponibles en los medios), un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción, todos los cuales son bien conocidos en la técnica.

Las células huésped adecuadas incluyen células procariotas, levaduras o células eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este propósito incluyen eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhimurium*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*. Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tal como los hongos filamentosos o la levadura, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores de codificación de agentes de unión específicos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadero común, es el más comúnmente usado entre los microorganismos huésped eucariotas inferiores. Sin embargo, muchos otros géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en la presente invención, tales como *Pichia*, por ejemplo, *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces*, *Yarrowia*; *Cándida Trichoderma reesia*; *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, huéspedes de *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células huésped adecuadas para la expresión de un agente de unión específico glicosilado o anticuerpo se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células huésped permisivas de insectos de huéspedes como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas virales para la transfección de tales células están disponibles públicamente, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV.

Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamíferos útiles son células de ovario de hámster chino, que incluyen células CHOK1 (ATCC CCL61), DXB-11, DG-44 y células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, [Graham et al., J. Gen Virol. 36: 59 (1977)]; células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células de hepatoma humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals NY Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5 o células FS4.

Las células huésped se transforman o se transfectan con los ácidos nucleicos o vectores descritos anteriormente para la producción de anticuerpos o agentes de unión específicos y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Además, los vectores nuevos y las líneas celulares transfectadas con múltiples copias de unidades de transcripción separadas por un marcador selectivo son particularmente útiles y preferidas para la expresión de agentes de unión específicos o anticuerpos.

Las células huésped usadas para producir el agente o anticuerpo de unión específica de esta invención pueden cultivarse en una variedad de medios. Los medios disponibles comercialmente, como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para el cultivo de las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980), patentes de Estados Unidos Nos. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655 o 5.122.469; documentos WO90103430; WO 87/00195; o la patente de Estados Unidos Re No. 30.985 se pueden usar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico, sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), reguladores (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco Gentamicina^{MR}), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos usualmente presentes en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro complemento necesario también se puede incluir en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son aquellas utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para expresión, y serán evidentes para el experto en la materia. Los vectores de expresión, pDC323 y pDC324, como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 20030082735, que contienen el par apropiado respectivo de cadena ligera y cadena pesada, se transfirieron en la línea de células huésped CS9.

Tras cultivar las células huésped, el agente o anticuerpo de unión específica puede producirse intracelularmente, en el espacio periplasmático, o secretarse directamente en el medio. Si el agente o anticuerpo de unión específica se produce intracelularmente, como primer paso, los residuos particulados, ya sea de las células huésped o de los fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración.

El agente de unión específico o la composición del anticuerpo se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de intercambio catiónico o aniónico, o preferiblemente cromatografía de afinidad, usando el antígeno de interés o proteína A o proteína G como ligando de afinidad. La proteína A se puede usar para purificar agentes o anticuerpos de unión específica que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss et al., EMBO J. 5: 15671575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es con mayor frecuencia agarosa, pero hay otras matrices disponibles. Matrices mecánicamente estables, como el vidrio de poro controlado o el poli(estireno-divinil)benceno, permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con la agarosa. Cuando el agente o anticuerpo de unión específica comprende un dominio C_{H3}, la resina Bakerbond ABX^{MR} (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. También son posibles otras técnicas para la purificación de proteínas, tal como la precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía de intercambio, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio, dependiendo del agente de unión específico o del anticuerpo que se recuperará.

Anticuerpos quiméricos y humanizados

Los anticuerpos monoclonales quiméricos, en los cuales los dominios variables de Ig de un anticuerpo monoclonal de roedor se fusionan con los dominios de Ig constantes humanos, se pueden generar usando procedimientos estándar conocidos en la técnica (véase Morrison, SL, et al. (1984) Chimeric Human Antibody Molecules; Mouse Antigen Binding Domains with Human Constant Region Domains, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6841-6855; y, Boulianne, G. L., et al, Nature 312, 643-646 (1984)). Aunque algunos anticuerpos monoclonales quiméricos han demostrado ser menos inmunogénicos en los seres humanos, los dominios de Ig variables en roedores todavía pueden conducir a una respuesta significativa antirroedor humana.

Los anticuerpos humanizados se pueden lograr mediante una variedad de procedimientos que incluyen, por ejemplo: (1) injertar las regiones determinantes de complementariedad no humanas (CDR) en un marco humano y una región constante (un proceso denominado en la técnica como humanización a través de "injerto de CDR"), o, alternativamente, (2) trasplante de todos los dominios variables no humanos, pero "cubriéndolos" con una superficie similar a la humana mediante el reemplazo de residuos de superficie (un proceso denominado en la técnica "revestimiento"). Estos procedimientos se describen, por ejemplo, en Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986); Morrison et al., Proc. Natl Acad Sci., U.S.A., 81: 6851-6855 (1984); Morrison y Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyer et al., Science 239: 1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28: 489-498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31 (3): 169-217 (1994); y Kettleborough, C.A. et al., Protein Eng. 4 (7): 773-83 (1991).

En particular, un anticuerpo de roedor en la administración in vivo repetida en el hombre solo o como un conjugado provocará una respuesta inmune en el receptor contra el anticuerpo de roedor; la llamada respuesta HAMA (anticuerpo humano antirroedor). La respuesta del HAMA puede limitar la eficacia del producto farmacéutico si se requieren dosis repetidas. La inmunogenicidad del anticuerpo puede reducirse mediante la modificación química del anticuerpo con un polímero hidrofílico como el polietilenglicol o utilizando los procedimientos de ingeniería genética para hacer que la estructura de unión al anticuerpo sea más humana.

El injerto de CDR implica la introducción de una o más de las seis CDR de los dominios de Ig variables de cadena ligera y pesada de ratón en las regiones marco apropiadas de un dominio de Ig variable humano. Esta técnica (Riechmann, L., et al., Nature 332, 323 (1988)), utiliza las regiones marco conservadas (FR1-FR4) como un andamio para soportar los bucles de CDR que son los contactos principales con el antígeno. Sin embargo, una desventaja significativa del injerto de CDR es que puede dar como resultado un anticuerpo humanizado que tiene una afinidad de unión sustancialmente menor que el anticuerpo de ratón original, porque los aminoácidos de las regiones marco pueden contribuir a la unión al antígeno, y porque los aminoácidos de los bucles de CDR pueden influir en la asociación de los dos dominios de Ig variables. Los anticuerpos quiméricos SR-1 no mostraron una potencia funcional apropiada en los ensayos basados en células.

Para mantener la afinidad del anticuerpo monoclonal humanizado, la técnica de injerto de CDR puede mejorarse eligiendo regiones marco humanas que se parezcan más a las regiones marco del anticuerpo de ratón original, y mediante mutagénesis dirigida al sitio de aminoácidos individuales dentro del marco o las CDR ayudados por el modelado por ordenador del sitio de unión al antígeno (por ejemplo, Co, MS, et al. (1994), J. Immunol. 152, 2968-2976).

Un procedimiento de humanización de anticuerpos comprende alinear las secuencias de cadena pesada y ligera no humanas con secuencias de cadena pesada y ligera humana, seleccionando y reemplazando el marco no humano con un marco humano basado en dicha alineación, modelación molecular para predecir la conformación de la secuencia humanizada y comparación con la conformación del anticuerpo parental. Este proceso es seguido por una repetida mutación de residuos en la región CDR que perturba la estructura de las CDR hasta que la conformación predicha del modelo de secuencia humanizada se aproxima mucho a la conformación de las CDR no humanas del anticuerpo original no humano. Dichos anticuerpos humanizados pueden derivarse adicionalmente para facilitar la captación y eliminación, por ejemplo, a través de los receptores de Ashwell (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.530.101 y 5.585.089).

Se han reportado varias humanizaciones de anticuerpos monoclonales de ratón mediante diseño racional (véase, por ejemplo, 20020091240 publicado el 11 de julio de 2002, el documento WO 92/11018 y la patente de Estados Unidos No. 5.693.762, la patente de Estados Unidos No. 5.766.866. Ingeniería humana de anticuerpos también se ha descrito, por ejemplo, en Studnicka et al., patente de Estados Unidos No. 5.766.886; Studnicka et al. Protein Engineering 7: 805-814 (1994).

Producción de variantes de anticuerpos

Las variantes de la secuencia de aminoácidos del agente de unión específico deseado o el anticuerpo pueden prepararse introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN codificador, o mediante síntesis de péptidos. Tales variantes incluyen, por ejemplo, eliminaciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos de los agentes de unión específicos o anticuerpos. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución se realiza para llegar al constructo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos postraduccionales del agente de unión específico o del anticuerpo humanizado o variante, tal como cambiar el número o la posición de los sitios de glicosilación.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencia de aminoácidos del agente o anticuerpo de unión específica se preparan mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Tales procedimientos incluyen la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), la mutagénesis por PCR y la mutagénesis en casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del agente o anticuerpo de unión específica.

Un procedimiento útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del agente o anticuerpo de unión específica que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina", como lo describen Cunningham y Wells Science, 244: 1081-1085 (1989). Aquí, se identifican un residuo o grupo de residuos objetivo (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con antígeno. Esas ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones luego se refinan mediante la introducción de otras variantes en los sitios de sustitución. Por lo tanto, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación en sí no necesita ser predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio determinado, se realiza un escaneo de ala o mutagénesis aleatoria en el codón o región objetivo y se seleccionan las variantes expresadas por la actividad deseada.

Normalmente, las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo específico tendrán una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con el agente de unión específico original o secuencias de aminoácidos del anticuerpo (murino o humanizado), ya sea de la cadena pesada o la ligera, o al menos 95% de identidad, incluyendo por ejemplo, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y 100%. La identidad u homología con respecto a esta secuencia se define aquí como el porcentaje de residuos

de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a la secuencia original, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora (como se define en la Tabla 1 a continuación) como parte de la identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, eliminaciones o inserciones N-terminales, C-terminales o internas, en el agente de unión específico o secuencia de anticuerpo se debe interpretar como que afecta la identidad de secuencia u homología. Por lo tanto, la identidad de secuencia puede determinarse mediante procedimientos estándar que se usan comúnmente para comparar la similitud en la posición de los aminoácidos de dos polipéptidos. Usando un programa de ordenador tal como BLAST o FASTA, dos polipéptidos se alinean para un emparejamiento óptimo de sus respectivos aminoácidos (a lo largo de la longitud completa de una o ambas secuencias, o a lo largo de una porción predeterminada de una o ambas secuencias). Los programas proporcionan una penalización predeterminada de apertura y una penalización predeterminada por hueco, y una matriz de puntuación tal como PAM 250 [una matriz de puntuación estándar; véase, Dayhoff et al., en Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, suplemento 3 (1978)] se puede utilizar junto con el programa de ordenador. Por ejemplo, el porcentaje de identidad se puede calcular como: el número total de coincidencias idénticas multiplicado por 100 y luego dividido por la suma de la longitud de la secuencia más larga dentro del tramo coincidente y el número de huecos introducidos en las secuencias más largas con el fin de alinear las dos secuencias.

Inserciones

Las inserciones de la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino-terminales y/o carboxilo-terminales que varían en longitud desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones dentro de la secuencia de residuos de aminoácidos simples o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un agente o anticuerpo de unión específica con un residuo de metionilo N-terminal o el agente o anticuerpo de unión específica (incluido el fragmento de anticuerpo) fusionado a una etiqueta de epítipo o un epítipo de receptor de rescate. Otras variantes de inserción del agente de unión específico o molécula de anticuerpo incluyen la fusión a un polipéptido que aumenta la semivida en suero del agente o anticuerpo de unión específica, por ejemplo, en el extremo N-terminal o C-terminal.

Los ejemplos de etiquetas de epítipo incluyen el polipéptido etiqueta HA de la influenza y su anticuerpo 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de la misma [Evan et al., Mol. Cell. Biol. 5 (12): 3610 - 3616 (1985)]; y la etiqueta de glicoproteína D (gD) del virus del herpes simple y su anticuerpo [Paborsky et al., Protein Engineering 3 (6): 547-553 (1990)]. Otros ejemplos de etiquetas son una secuencia de poli-histidina, generalmente alrededor de seis residuos de histidina, que permite el aislamiento de un compuesto así etiquetado utilizando quelación de níquel. Otras marcas y etiquetas, como la etiqueta FLAG® (Eastman Kodak, Rochester, NY) son bien conocidas y se usan habitualmente en la técnica.

El término "epítipo de unión al receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que es responsable de aumentar la semivida en suero in vivo de la molécula de IgG.

Sustituciones

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en el agente de unión específico o molécula de anticuerpo removido y un residuo diferente insertado en su lugar. Se contempla la mutagénesis de sustitución dentro de cualquiera de las regiones hipervariables o CDR o regiones marco. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1. La sustitución más conservadora se encuentra bajo el encabezado "sustituciones preferidas". Si tales sustituciones no producen cambios en la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "ejemplos de sustituciones" en la Tabla 1, o como se describe más adelante en referencia a las clases de aminoácidos, y los productos se seleccionan.

Tabla 1

Original	Ejemplo	Sustituciones preferidas de residuos
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp; lys; gln	arg
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	
His (H)	asn; gln; lys; arg	leu norleucina
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe	ile
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	arg
Lys (K)	arg; gln; asn	leu
Met (M)	leu; phe; ile	

Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	
Pro (P)	ala	
Ser (S)	thr	
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Se realizan modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del agente de unión específico o del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto en mantener (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos según las propiedades comunes de la cadena lateral:

(1) hidrófobas: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrófilicas neutras: cys, ser, thr;

(3) ácidas: asp, glu;

(4) básicas: asn, gln, his, lys, arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y

(6) aromáticas: trp, tyr, phe.

Las sustituciones conservadoras implican reemplazar un aminoácido con otro miembro de su clase. Las sustituciones no conservadoras implican reemplazar un miembro de una de estas clases con un miembro de otra clase.

Cualquier residuo de cisteína que no esté involucrado en el mantenimiento de la conformación adecuada del agente de unión específico o del anticuerpo humanizado o variante también puede sustituirse, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir el entrecruzamiento aberrante. Por el contrario, el enlace o enlaces de cisteína se pueden agregar al agente de unión específico o al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Maduración de afinidad

La maduración de la afinidad implica preparar y seleccionar un agente de unión específico o variantes de anticuerpos que tienen mutaciones (eliminaciones, inserciones o sustituciones) dentro de las CDR de un agente de unión específico parental o anticuerpo, y seleccionar variantes que tengan propiedades biológicas mejoradas, tales como afinidad de unión en relación con el agente de unión específico parental o anticuerpo. Una forma conveniente de generar tales variantes de sustitución es la maduración de afinidad utilizando la presentación en fagos. En resumen, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones de amino en cada sitio. El agente de unión específico o las variantes de anticuerpos así generadas pueden presentarse de forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se examinan luego para determinar su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión).

La mutagénesis de barrido de alanina se puede realizar para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión del antígeno. Alternativamente, o además, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el agente o anticuerpo de unión específica y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan tales variantes, el panel de variantes se somete a selección como se describe en este documento y se pueden seleccionar agentes o anticuerpos de unión específica con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para un desarrollo adicional.

Las técnicas que utilizan la mezcla de genes y la evolución dirigida también se pueden usar para preparar y seleccionar agentes de unión específicos o variantes de anticuerpos para la actividad deseada. Por ejemplo, Jermutus et al., Proc Natl Acad Sci US A. Ene 2 de 2001; 98 (1): 75-80 informa que las estrategias de selección *in vitro* adaptadas con base en la presentación de ribosomas se combinaron con la diversificación *in vitro* mediante la combinación aleatoria de ADN para evolucionar la estabilidad de velocidad o termodinámica de los fragmentos de anticuerpo Fv de cadena sencilla (scFv); Fermer et al., Tumor Biol., enero a abril de 2004; 25 (1-2): 7-13 informa que el uso de la presentación en fagos en combinación con la mezcla aleatoria de ADN aumentó la afinidad en casi tres órdenes de magnitud.

Glicosilación alterada

5 También pueden producirse variantes de anticuerpos o agentes de unión específicos que tienen un patrón de glicosilación modificado con respecto al agente o anticuerpo de unión específica parental, por ejemplo, eliminar uno o más restos de carbohidratos encontrados en el agente o anticuerpo de unión específica, y/o agregar uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el agente o anticuerpo de unión específica.

10 La glicosilación de polipéptidos que incluyen anticuerpos está típicamente ligada a N o ligada a O. Ligado a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. La presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio potencial de glicosilación. Por lo tanto, los sitios de glicosilación unidos a N se pueden agregar a un agente o anticuerpo de unión específica al alterar la secuencia de aminoácidos de modo que contenga una o más de estas secuencias tripeptídicas. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. Los sitios de glicosilación unidos a O se pueden agregar a un agente o anticuerpo de unión específica insertando o sustituyendo uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del agente de unión específico original o anticuerpo.

Otras modificaciones

25 El residuo o residuos de cisteína se pueden eliminar o introducir en la región Fc, eliminando así o aumentando la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El agente de unión específico homodimérico o el anticuerpo generado de este modo pueden tener una capacidad de internalización mejorada y/o un aumento de la destrucción celular mediada por el complemento y una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Véase Caron et al., J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). Los agentes de unión específicos homodiméricos o anticuerpos también pueden prepararse utilizando entrelazadores heterobifuncionales como se describe en Wolff et al., Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, puede modificarse un agente o anticuerpo de unión específica que tenga regiones Fc duales y, por lo tanto, puede tener una lisis complementaria mejorada y capacidades ADCC. Véase Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989).

35 Se ha demostrado que las secuencias dentro de la CDR pueden hacer que un anticuerpo se una al MHC Clase II y desencadenar una respuesta de células T auxiliares no deseada. Una sustitución conservadora puede permitir que el agente o anticuerpo de unión específica retengan la actividad de unión y, a la vez, reduzcan su capacidad para desencadenar una respuesta de células T no deseada.

40 También se contempla que se eliminan uno o más de los 20 aminoácidos N-terminales de la cadena pesada o ligera.

45 Las modificaciones para aumentar la semivida en suero también pueden ser deseables, por ejemplo, mediante la incorporación o adición de un epítipo de unión al receptor de rescate (por ejemplo, por mutación de la región apropiada o incorporando el epítipo en una etiqueta peptídica que luego se fusiona al agente o anticuerpo de unión específica en el extremo o en el medio, por ejemplo, mediante síntesis de ADN o péptido) (véase, por ejemplo, el documento WO96/32478) o adición moléculas tales como PEG u otros polímeros solubles en agua, incluyendo polímeros de polisacáridos.

50 El epítipo de unión al receptor de rescate constituye preferiblemente una región en la que uno cualquiera o más de los residuos de aminoácidos de uno o dos bucles de un dominio Fc se transfieren a una posición análoga del agente de unión específico, o anticuerpo o fragmento. Incluso más preferiblemente, se transfieren tres o más residuos de uno o dos bucles del dominio Fc. Aún más preferido, el epítipo se toma del dominio C_{H2} de la región Fc (por ejemplo, de una IgG) y se transfiere a la región C_{H1}, C_{H3} o V_H, o más de una de estas regiones, del agente o anticuerpo de unión específica. Alternativamente, el epítipo se toma del dominio C_{H2} de la región Fc y se transfiere a la región C_L o la región V_L, o ambas, del agente de unión específico o del fragmento de anticuerpo. Véanse también las solicitudes internacionales WO 97/34631 y WO 96/32478 que describen variantes de Fc y su interacción con el receptor de rescate.

60 La regulación de la homeostasis de IgG *in vivo* depende de su unión al FcRn. Se ha informado que la modificación de la interacción entre el dominio Fc de IgG y FcRn mejora la semivida en suero de los anticuerpos monoclonales. Serían preferibles las mutaciones en el Fc que dan como resultado una mayor afinidad de unión al receptor de Fc neonatal FcRn y una degradación más lenta y un mejor perfil de PK. El sitio de unión de FcRn en IgG se encuentra en la interfaz del dominio C_{H2}-C_{H3}. Mutaciones de residuos en esta área (M428L y T250Q/M428L, T250Q/M428L, P257I/Q311I, M252Y/S254T/T256E, H433K/N434F/Y436F o M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F/Y436H) resulta en una mayor afinidad de IgG1 para FcRn humano a pH 6,0 y pH 7,3. Además, algunas de estas mutaciones dieron

como resultado propiedades farmacocinéticas mejoradas (eliminación más lenta, semivida más larga) cuando se administran por vía intravenosa a monos.

Se han identificado otros sitios de la región constante que son responsables de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), tal como el sitio de unión a C1q y/o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) [véase, por ejemplo, Molec. Immunol. 29 (5): 633-9 (1992); Shields et al., J. Biol. Chem., 276 (9): 6591-6604 (2001)]. La mutación de residuos dentro de los sitios de unión del receptor Fc puede dar como resultado una función efectora alterada (es decir, aumentada o disminuida), tal como la actividad alterada de ADCC o CDC, o semivida alterada. Como se describió anteriormente, las posibles mutaciones incluyen la inserción, eliminación o sustitución de uno o más residuos, incluida la sustitución con alanina, una sustitución conservadora, una sustitución no conservadora o el reemplazo con un residuo de aminoácido correspondiente en la misma posición de una subclase diferente (por ejemplo, reemplazando un residuo de IgG1 con un residuo correspondiente de IgG2 en esa posición).

Otras modificaciones covalentes

Las modificaciones covalentes del agente o anticuerpo de unión específica también se incluyen dentro del alcance de esta invención. Se pueden hacer por síntesis química o por escisión enzimática o química del agente de unión específico o del anticuerpo, si corresponde. Se pueden introducir otros tipos de modificaciones covalentes en el agente o anticuerpo de unión específica haciendo reaccionar residuos de aminoácidos específicos con un agente de derivación orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N-terminales o C-terminales.

Los residuos de cisteinilo se hacen reaccionar más comúnmente con α -haloacetatos (y las aminas correspondientes), tales como ácido cloro acético o cloro acetamida, para producir derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos de cisteinilo también se derivatizan por reacción con bromotrifluoroacetona, α -bromo- β -(5-imidazolil) propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alkilmaleimidias, 3-nitro-2-piridil disulfuro, metil 2-piridil disulfuro, p- cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Los residuos de histidilo se derivan por reacción con dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0 porque este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. El bromuro de para-bromofenacilo también es útil; la reacción se realiza preferiblemente en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 6,0.

Los residuos de lisinilo y amino-terminal se hacen reaccionar con anhídridos succínicos u otros ácidos carboxílicos. La derivación con estos agentes tiene el efecto de revertir la carga de los residuos lisinilo. Otros reactivos adecuados para la derivación de residuos que contienen α -amino incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobenzenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona y y reacción catalizada con transaminasa con glioxilato.

Los residuos de arginilo se modifican por reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivación de residuos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al alto pKa del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como con el grupo épsilon-amino de arginina.

La modificación específica de los residuos de tirosilo puede realizarse, con particular interés en la introducción de marcadores espectrales en los residuos de tirosilo por reacción con compuestos aromáticos de diazonio o tetranitrometano. Más comúnmente, se usan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados de 3-nitro, respectivamente. Los residuos de tirosilo se yodan utilizando ^{125}I o ^{131}I para preparar proteínas marcadas para su uso en radioinmunoensayo.

Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente por reacción con carbodiimidias (R-N.dbd.C.dbd.N-R'), en las que R y R' son grupos alquilo diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos de aspartilo y glutamilo se convierten en residuos de asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones de amonio.

Los residuos de glutaminilo y asparaginilo se desamidán con frecuencia hasta los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo, respectivamente. Estos residuos se desamidán bajo condiciones neutras o básicas. La forma desamidada de estos residuos cae dentro del alcance de esta invención.

Otras modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de los grupos hidroxilo de los residuos serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (TE Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, WH Freeman & Co., San Francisco, páginas 79-86 (1983)), acetilación de la amina N-terminal y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente implica el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al agente o anticuerpo de unión específica. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren la producción del agente o anticuerpo de unión específica en una célula huésped que tiene capacidades de glicosilación para la glicosilación

ligada a N u O. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar o azúcares se pueden unir a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos como los de fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos procedimientos se describen en el documento WO87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., páginas 259-306 (1981).

La eliminación de cualquier resto de carbohidrato presente en el agente o anticuerpo de unión específica se puede realizar química o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición del agente o anticuerpo de unión específica al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o todos los azúcares, excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras se deja intacto el agente o anticuerpo de unión específica. La desglicosilación química es descrita por Hakimuddin, et al., Arch. Biochem. Biofis 259: 52 (1987) y por Edge et al., Anal. Biochem., 118: 131 (1981). La escisión enzimática de los restos de carbohidratos en un agente o anticuerpo de unión específica se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo y exo-glicosidasas tal como lo describen Thotakura et al., Meth Enzymol. 138: 350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente del agente de unión específica o anticuerpo comprende unir el agente o anticuerpo de unión específica a uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioles polioxietilados, sorbitol polioxietilado, glucosa polioxietilada, glicerol polioxietilado, polioxialquilenos o polímeros polisacáridos como el dextrano. Tales procedimientos son conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Las patentes de Estados Unidos Nos 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192, 4.179.337, 4.766.106, 4.179.337, 4.495.285, 4.609.546 o el documento EP 315 456.

Usos terapéuticos

"Tratamiento" es una intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo o alterar la patología de un trastorno. Por consiguiente, "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como aquellos en los que se va a prevenir el trastorno.

"Mamífero" para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es humano.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" pretende referirse a una cantidad de anticuerpo c-Kit humanizado terapéutico o profiláctico que proporciona una reducción en el número y/o actividad de mastocitos o células progenitoras, reducción en elementos fibroides o sus precursores, o que proporciona una reducción en la gravedad o progresión de los síntomas asociados con la enfermedad asociada con c-kit (es decir, que proporciona "eficacia terapéutica"). Los mastocitos y las células madre pluripotentes hematopoyéticas progenitoras son los tipos de células primarias que expresan c-Kit y, por lo tanto, se contempla que las células derivadas de HSC, tal como los mastocitos y que están involucradas en enfermedades, pueden tratarse con las composiciones y procedimientos de la invención.

La expresión "actividad reductora fibrótica" se refiere a la capacidad de inhibir, total o parcialmente y revertir la inflamación resultante de la activación del sistema inmunológico y la fibrosis.

Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad o trastorno fibrótico" se refiere a afecciones que implican fibrosis en uno o más tejidos. Como se usa en el presente documento, el término "fibrosis" se refiere a la formación aberrante o al desarrollo de tejido conjuntivo fibroso en exceso en un órgano o tejido como un proceso reactivo, a diferencia de la formación de tejido fibroso como un constituyente normal o la curación de un órgano o tejido. La fibrosis se caracteriza por la acumulación de fibroblastos y la deposición de colágeno en exceso de la deposición normal en cualquier tejido en particular. Como se usa en el presente documento, el término "fibrosis" se usa como sinónimo de "curación aberrante, que involucra la transformación de células fibroblásticas mesenquimales, proliferación excesiva de fibroblastos, actividad y deposición de colágenos y otras proteínas de la matriz extracelular".

Los fibroblastos son células de tejido conectivo, que se dispersan en el tejido conectivo en todo el cuerpo. Los fibroblastos secretan una matriz extracelular no rígida que contiene colágeno tipo I y/o tipo III. En respuesta a una lesión en un tejido, los fibroblastos cercanos o las células precursoras mesenquimales en circulación migran hacia la herida, pueden activarse alternativamente bajo la influencia de otras células como los mastocitos y sus mediadores, proliferan y producen grandes cantidades de matriz extracelular de colágeno. El colágeno es una proteína fibrosa rica en glicina y prolina que es un componente importante de la matriz extracelular y el tejido conectivo, el cartílago y el hueso. Las moléculas de colágeno son estructuras helicoidales de triple cadena llamadas cadenas α , que se enrollan entre sí en una hélice similar a una cuerda. El colágeno existe en varias formas o tipos; de estos, el tipo I, el más común, se encuentra en la piel, los tendones y los huesos; y el tipo III se encuentra en la piel, los vasos sanguíneos y los órganos internos.

Las enfermedades fibróticas asociadas a los mastocitos incluyen fibrosis patológica o cicatrización (incluida la esclerosis endocárdica), fibrosis intersticial idiopática, fibrosis pulmonar intersticial, fibrosis perimuscular, fibrosis de Symmers, fibrosis pericentral, hepatitis, dermatofibroma, cirrosis biliar, cirrosis alcohólica, fibrosis pulmonar aguda, fibrosis pulmonar idiopática, síndrome de dificultad respiratoria aguda, fibrosis renal/nefropatía diabética, esclerodermia/sistémica, esclerodermia/local, queloides, cicatrices hipertróficas, adherencias articulares severas/artritis, mielofibrosis, cicatrización de la córnea, fibrosis quística, distrofia muscular (de Duchenne), fibrosis cardíaca, fibrosis muscular/separación retiniana, estenosis esofágica y enfermedad de Peyronie. Otros trastornos fibróticos pueden ser inducidos o iniciados por cirugía, incluyendo revisión de cicatrices/cirugías plásticas, glaucoma, fibrosis de catarata, cicatrización de la córnea, adherencias en las articulaciones, enfermedad injerto contra huésped, cirugía de tendones, atrapamiento de nervios, contractura de Duputren, adherencias OB/GYN/fibrosis, adherencias pélvicas, fibrosis peridural, restenosis. También se contempla que las condiciones fibróticas en las que la deposición de fibronectina es un factor causante se pueden tratar de acuerdo con la invención. La fibrosis pulmonar idiopática, la bleomicina pulmonar, la fibrosis quística y la nefropatía glomerular, incluida la enfermedad caracterizada por depósitos de Fn en los riñones que finalmente conducen a insuficiencia renal, son ejemplos de afecciones que también pueden tratarse de acuerdo con la presente invención. La inflamación que involucra la activación del sistema inmunológico y donde los mastocitos secretan citoquinas inflamatorias como el TNF, y pueden activarse e interactuar directamente con los linfocitos, también pueden tratarse de acuerdo con la presente invención.

Se cree que la esclerodermia es una enfermedad autoinmune del tejido conectivo que resulta en un trastorno fibrótico caracterizado por un engrosamiento e induración de la piel causado por la sobreproducción de colágeno nuevo por los fibroblastos en la piel y otros órganos. La esclerodermia puede ocurrir como una enfermedad local o sistémica que afecta a varios órganos. La esclerodermia también se conoce como esclerosis sistémica. El desarrollo de patologías de esclerodermia se asocia con un aumento en el número de mastocitos en los tejidos/órganos afectados por la enfermedad.

La esclerosis sistémica se caracteriza por la formación de tejido fibroso colagenoso hialinizado y engrosado, con engrosamiento de la piel y adhesión a los tejidos subyacentes, especialmente de las manos y la cara. La enfermedad también se puede caracterizar por disfagia debido a la pérdida de peristalsis y fibrosis submucosa del esófago, disnea debida a fibrosis pulmonar, fibrosis miocárdica y cambios vasculares renales (Stedman's Medical Dictionary, vigesimosexta edición, Williams & Wilkins, 1995)). La fibrosis pulmonar afecta del 30 a 70% de los pacientes con esclerodermia, lo que a menudo resulta en una enfermedad pulmonar restrictiva (Atamas et al. Cytokine and Growth Factor Rev 14: 537-550 (2003)). Algunos pacientes tienen una superposición de esclerodermia y otras enfermedades del tejido conectivo, tal como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y polimiositis. Cuando las características de la esclerodermia están presentes junto con las características de la polimiositis y el lupus eritematoso sistémico, la afección se conoce como enfermedad mixta del tejido conectivo (MCTD).

Se sabe que los síntomas presentes en algunas formas de dermatitis son causados por la desgranulación de los mastocitos cutáneos, lo que resulta, entre otras cosas, en la liberación de histamina. Por lo tanto, otro trastorno asociado a los mastocitos adecuado para el tratamiento de acuerdo con la invención es la urticaria pigmentosa. Este trastorno presenta lesiones cutáneas características que son máculas o nódulos pigmentados únicos o múltiples que pican al frotar y contienen grandes cantidades de mastocitos. Existen diferentes formas de dermatitis asociada (inflamación de la piel), tales como eritema, edema, erupciones papulares y prurito que pueden estar presentes en dermatitis de humanos y animales, todas las cuales se pueden tratar de acuerdo con la invención.

La mastocitosis es en muchos casos una enfermedad neoplásica e implica un crecimiento de mastocitos nuevo o anormal y puede ser una consecuencia de la señalización autocrina de SCF elevada o de una mutación activadora de c-Kit. La mastocitosis puede ser limitada o sistémica y afecta a múltiples órganos, como la médula ósea. Los mastocitos liberan ciertos mediadores, o compuestos químicos, de los cuales uno es la histamina, en el cuerpo en respuesta a ciertos eventos. Las personas con mastocitosis sistémica desarrollan un aumento en el número de mastocitos, o desarrollan mastocitos de forma anormal, que pueden no funcionar correctamente. Además, los mastocitos no mueren cuando se supone que deben hacerlo, lo que aumenta aún más la carga total de los mastocitos. Cuando los mastocitos se desgranulan y liberan su contenido, puede causar muchas afecciones o enfermedades agudas y potencialmente graves. Los trastornos de los mastocitos también incluyen trastornos proliferativos que resultan en una enfermedad localizada, como el mastocitoma cutáneo solitario hasta la enfermedad más grave de la leucemia de mastocitos. Los ejemplos incluyen mastocitoma cutáneo, mastocitosis agresiva, mastocitosis indolente, mastocitosis con trastorno hematológico asociado, urticaria pigmentosa, telangiectasia macularis eruptiva perstans (tmep), enfermedad sistémica de mastocitos, leucemia de mastocitos, leucemia mieloide, mastocitosis sistémica (con o sin manifestaciones cutáneas tales como urticaria pigmentosa), síndrome/trastorno de activación de mastocitos y trastornos pediátricos más comunes causados por mastocitos, tales como mastocitoma solitario y mastocitosis cutánea difusa.

El síndrome o trastorno de activación de los mastocitos se caracteriza por un número normal o casi normal de mastocitos. Sin embargo, los mastocitos se activan fácilmente para liberar su contenido, lo que resulta en muchos de los mismos síntomas. El peligro de anafilaxis y conmoción está presente en este trastorno, pero a diferencia de los

- 5 trastornos proliferativos de los mastocitos, este síndrome puede no tener el potencial de progresar a una etapa más agresiva o maligna. Los ejemplos de tales trastornos asociados con la desgranulación de los mastocitos pueden incluir dolor abdominal, urticaria y erupciones cutáneas, anafilaxia, inflamación del esófago, cambios en la presión arterial y conmoción, cólicos intestinales y distensión abdominal, dolor en los huesos (leve a severo/debilitante), picazón, y sin erupciones, dolor en el pecho, hígado, bazo y otros órganos involucrados, dificultades cognitivas/confusión cerebral, mala absorción, enfermedad discal degenerativa, migrañas, diarrea, dolor muscular, mareos/vértigo/aturdimiento, náuseas, desmayos, osteoporosis/osteopenia, fatiga, neuropatía periférica y parestesias, enrojecimiento, frecuencia cardíaca rápida, reflujo gastroesofágico y vómitos.
- 10 El papel de los mastocitos en las enfermedades alérgicas ha sido validado clínicamente por fármacos que bloquean mediadores específicos de los mastocitos, tales como la histamina y los corticosteroides, que entre sus actividades causan la apoptosis de los mastocitos. Las enfermedades adicionales relacionadas con los mastocitos incluyen reacciones alérgicas mediadas por histamina que pueden tratarse mediante la inhibición de la desgranulación de mastocitos y basófilos inducida por quimiocinas y la liberación de histamina. Los ejemplos de trastornos o enfermedades asociadas a los mastocitos que pueden tratarse eficazmente con los procedimientos y composiciones objetivo también incluyen, entre otros, dermatitis de contacto, dermatitis atópica, dermatitis alérgica, dermatitis eccematosas y dermatitis causada por picaduras de insectos.
- 15 Otras indicaciones relacionadas con los mastocitos adecuadas para el tratamiento mediante los procedimientos y composiciones de la invención incluyen afecciones inflamatorias pulmonares en enfermedades pulmonares intersticiales, por ejemplo sarcoidosis, síndrome de dificultad respiratoria neonatal (RDS), displasia broncopulmonar (BPD) y afecciones caracterizadas por una elevación de la actividad de la PLA2 en suero, como el RDS adulto (ARDS).
- 20 Los mastocitos también se han publicado para mostrar funciones en la artritis. Los mastocitos aumentan en los tejidos sinoviales inflamados de los pacientes con RA y OA, y se ha demostrado que Gleevec causa apoptosis de mastocitos en explantes sinoviales y los estudios de casos en humanos muestran eficacia en pacientes con RA. Los mastocitos tienen funciones en el choque séptico, pancreatitis, enfermedades vasculares del colágeno, insuficiencia renal aguda, peritonitis y uveítis autoinmune.
- 25 Los estudios también sugieren que los mastocitos participan en la fisiopatología de la esclerosis múltiple. Se cree que los mastocitos en el cerebro liberan aminas vasoactivas que pueden causar desmielinización. La histamina liberada por los mastocitos puede alterar la integridad de los vasos sanguíneos y causar una ruptura parcial de la barrera hematoencefálica nuevamente implicada en la etiología de la esclerosis múltiple. Por lo tanto, se contempla que los procedimientos y composiciones de la invención son adecuados para el tratamiento o la mejora de la morbilidad asociada con la esclerosis múltiple.
- 30 C-kit también se expresa en ciertas células no inmunes como los melanocitos y las células intestinales, así como los espermatocitos. La invención puede tener utilidad en el tratamiento del melanoma y GIST y puede tener utilidad como anticonceptivo masculino.
- 35
- 40

Administración y preparación de formulaciones farmacéuticas.

- 45 Los agentes o anticuerpos de unión específica anti-c-Kit utilizados en la práctica de un procedimiento de la invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo adecuado para el procedimiento de administración deseado. Los vehículos adecuados incluyen cualquier material que, cuando se combina con el agente o anticuerpo antagonista neural y de unión específica anti-c-Kit, retiene la unión de alta afinidad y potencia en c-Kit y no es reactivo con los sistemas inmunes del sujeto. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de una serie de vehículos farmacéuticos estándar tales como soluciones salinas estériles reguladas con fosfato, agua bacteriostática y similares. Se puede usar una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua regulada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3% y similares, y pueden incluir otras proteínas para mejorar la estabilidad, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc., sometidas a modificaciones químicas o similares.
- 50 Los ejemplos de concentraciones de anticuerpos en la formulación pueden variar desde aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 180 mg/ml o desde aproximadamente 0,1 mg/ml hasta aproximadamente 50 mg/ml, o desde aproximadamente 0,5 mg/ml hasta aproximadamente 25 mg/ml, o alternativamente de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml. Una formulación acuosa del anticuerpo puede prepararse en una solución tamponada de pH, por ejemplo, un pH que varía de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,5, o de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,5, o alternativamente a aproximadamente 5,0. Los ejemplos de reguladores que son adecuados para un pH dentro de este intervalo incluyen acetato (por ejemplo, acetato de sodio), succinato (tal como el succinato de sodio), gluconato, histidina, citrato y otros reguladores ácidos orgánicos. La concentración de regulador puede ser de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 200 mM, o de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 60 mM, dependiendo, por ejemplo, del regulador y la isotonicidad deseada de la formulación.
- 55
- 60
- 65 Un agente de tonicidad, que también puede estabilizar al anticuerpo, puede incluirse en la formulación. Los ejemplos de agentes de tonicidad incluyen polioles, tales como manitol, sacarosa o trehalosa. Preferiblemente, la formulación

acuosa es isotónica, aunque pueden ser adecuadas soluciones hipertónicas o hipotónicas. Los ejemplos de concentraciones del poliol en la formulación pueden variar de aproximadamente 1% a aproximadamente 15% p/v.

También se puede añadir un tensioactivo a la formulación de anticuerpos para reducir la agregación del anticuerpo formulado y/o minimizar la formación de partículas en la formulación y/o reducir la adsorción. Los ejemplos de tensoactivos incluyen tensoactivos no iónicos tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbato 20, o polisorbato 80) o poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188). Los ejemplos de concentraciones de tensoactivo pueden variar de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,5%, o de aproximadamente 0,005% a aproximadamente 0,2%, o alternativamente de aproximadamente 0,004% a aproximadamente 0,01% p/v.

En una realización, la formulación contiene los agentes identificados anteriormente (es decir, anticuerpo, tampón, poliol y tensoactivo) y está esencialmente libre de uno o más conservantes, tales como alcohol bencílico, fenol, m-cresol, clorobutanol y bencetonio Cl. En otra realización, se puede incluir un conservante en la formulación, por ejemplo, en concentraciones que varían de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 2%, o alternativamente de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 1%. Uno o más portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, tales como los descritos en la decimosexta edición del Remington's Pharmaceutical Sciences, Osol, A. Ed. (1980) pueden incluirse en la formulación siempre que no afecten adversamente las características deseadas de la formulación. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas e incluyen: agentes reguladores adicionales; codisolventes; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína Zn); polímeros biodegradables tales como poliésteres; y/o contraiones que forman sales tales como el sodio.

Las formulaciones terapéuticas del anticuerpo se preparan para el almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, Decimosexta edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen reguladores como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, como la albúmina sérica, la gelatina o las inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, maltosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones que forman sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína Zn); y/o tensoactivos no iónicos como TWEEN^{MR}, PLURONICS^{MR} o polietilenglicol (PEG).

En una realización, una formulación adecuada de la invención reivindicada contiene un regulador isotónico tal como un regulador de fosfato, acetato o TRIS en combinación con un agente de tonicidad tal como un poliol, sorbitol, sacarosa o cloruro de sodio que se tonifica y se estabiliza. Un ejemplo de tal agente de tonicidad es el sorbitol al 5% o sacarosa. Además, la formulación podría incluir opcionalmente un tensoactivo para prevenir la agregación y para la estabilización a razón de 0,01 a 0,02% p/v. El pH de la formulación puede oscilar entre 4,5-6,5 o 4,5 a 5,5. Otros ejemplos de descripciones de formulaciones farmacéuticas para anticuerpos se pueden encontrar en el documento US 2003/0113316 y en la patente de Estados Unidos No. 6.171.586.

La formulación en este documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar además un agente inmunosupresor. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito previsto.

Los ingredientes activos también pueden estar atrapados en una microcápsula preparada, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en la decimosexta edición de Remington's Pharmaceutical Sciences, Osol, A. Ed. (1980).

También se contemplan suspensiones y formas cristalinas de anticuerpos. Los expertos en la técnica conocen procedimientos para hacer suspensiones y formas cristalinas.

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Las composiciones de la invención pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Por ejemplo, la esterilización se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Las soluciones

resultantes pueden envasarse para su uso o filtrarse en condiciones asépticas y liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una solución estéril antes de la administración.

5 El proceso de liofilización se emplea a menudo para estabilizar los polipéptidos para el almacenamiento a largo plazo, particularmente cuando el polipéptido es relativamente inestable en composiciones líquidas. Un ciclo de liofilización generalmente se compone de tres etapas: congelación, secado primario y secado secundario; Williams y Polli, *Journal of Parenteral Science and Technology*, Volumen 38, Número 2, páginas 48-59 (1984). En la etapa de congelación, la solución se enfría hasta que se congela adecuadamente. El agua a granel en la solución forma hielo en esta etapa. El hielo se sublima en la etapa de secado primario, que se realiza reduciendo la presión de la cámara por debajo de la presión de vapor del hielo, utilizando vacío. Finalmente, el agua absorbida o unida se elimina en la etapa de secado secundario a una presión reducida de la cámara y una temperatura elevada en el estante. El proceso produce un material conocido como una torta liofilizada. Posteriormente, la torta se puede reconstituir antes de su uso.

15 La práctica de reconstitución estándar para material liofilizado es volver a agregar un volumen de agua pura (típicamente equivalente al volumen eliminado durante la liofilización), aunque a veces se usan soluciones diluidas de agentes antibacterianos en la producción de productos farmacéuticos para administración parenteral; Chen, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, volumen 18, números 11 y 12, páginas 1311-1354 (1992).

20 En algunos casos, se ha observado que los excipientes actúan como estabilizantes para productos liofilizados; Carpenter et al., *Developments in Biological Standardization*, Volume 74, páginas 225-239 (1991). Por ejemplo, los excipientes conocidos incluyen polioles (incluyendo manitol, sorbitol y glicerol); azúcares (incluyendo glucosa y sacarosa); y aminoácidos (incluyendo alanina, glicina y ácido glutámico).

25 Además, los polioles y azúcares también se usan a menudo para proteger los polipéptidos del daño inducido por la congelación y el secado y para mejorar la estabilidad durante el almacenamiento en estado seco. En general, los azúcares, en particular los disacáridos, son efectivos tanto en el proceso de liofilización como durante el almacenamiento. Otras clases de moléculas, incluidos los mono y di-sacáridos y polímeros tales como PVP, también se han reportado como estabilizantes de productos liofilizados.

30 Para inyección, la formulación farmacéutica y/o el medicamento pueden ser un polvo adecuado para reconstitución con una solución apropiada como se describió anteriormente. Los ejemplos de estos incluyen, pero no se limitan a, polvos liofilizados, secados por rotación o secados por atomización, polvos amorfos, gránulos, precipitados o partículas. Para inyección, las formulaciones pueden contener opcionalmente estabilizadores, modificadores de pH, tensoactivos, modificadores de biodisponibilidad y combinaciones de estos.

35 Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinil alcohol)), poliálidos (Patente de Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de vinil etileno no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el Lupron Depot^{MR} (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxitútrico. Mientras que los polímeros tales como el acetato de vinil etileno y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante mucho tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, lo que resulta en una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es una formación de enlace S-S intermolecular a través del intercambio de tio-disulfuro, la estabilización se puede lograr modificando los residuos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones específicas de matriz de polimérica.

55 Las formulaciones de la invención pueden diseñarse para ser de acción corta, de liberación rápida, de acción prolongada o de liberación sostenida como se describe en el presente documento. Por lo tanto, las formulaciones farmacéuticas también pueden formularse para liberación controlada o para liberación lenta.

60 Las dosis específicas se pueden ajustar según las condiciones de la enfermedad, la edad, el peso corporal, las condiciones generales de salud, el sexo y la dieta del sujeto, los intervalos de dosis, las vías de administración, la tasa de excreción y las combinaciones de fármacos. Cualquiera de las formas de dosificación anteriores que contienen cantidades efectivas están dentro de los límites de la experimentación rutinaria y, por lo tanto, están dentro del alcance de la presente invención.

65 El agente o anticuerpo de unión específica se administra por cualquier medio adecuado, incluidos la administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento local,

administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica o subcutánea. Además, el agente o anticuerpo de unión específica se administra adecuadamente mediante infusión por pulsos, particularmente con dosis decrecientes del agente o anticuerpo de unión específica. Preferiblemente, la dosificación se administra mediante inyecciones, lo más preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. Se contemplan otros procedimientos de administración, incluida la administración tópica, particularmente transdérmica, transmucosal, rectal, oral o local, por ejemplo, a través de un catéter colocado cerca del sitio deseado. Lo más preferiblemente, el agente o anticuerpo de unión específica de la invención se administra por vía intravenosa en una solución fisiológica a una dosis que oscila entre 0,01 mg/kg y 100 mg/kg con una frecuencia que varía desde diaria hasta semanalmente o hasta mensualmente (por ejemplo, todos los días, cada dos días, cada tercer día, o 2, 3, 4, 5 o 6 veces por semana), preferiblemente una dosis que varía de 0,1 a 45 mg/kg, de 0,1 a 15 mg/kg o de 0,1 a 10 mg/kg con una frecuencia de 2 o 3 veces por semana, o hasta 45 mg/kg una vez al mes.

Administración con otros agentes

Los anticuerpos de la invención también pueden administrarse simultáneamente con otros agentes terapéuticos antiinflamatorios. La administración concurrente incluye la administración de los dos agentes terapéuticos diferentes en diferentes momentos y en diferentes rutas, siempre que haya alguna superposición en el tiempo durante el cual los agentes están ejerciendo sus efectos terapéuticos. Los ejemplos de agentes anti-c-Kit conocidos en la técnica incluyen el mesilato de imatinib (Gleevec^{MR}). Cabe señalar que el mesilato de imatinib también antagoniza la señalización de la tirosina quinasa Abl y, por lo tanto, no es un inhibidor específico de c-Kit.

Ejemplos

Los ejemplos que no están dentro del alcance de las reivindicaciones son solo para fines ilustrativos.

Humanización de SR-1

SR-1 se humanizó mediante un injerto directo de CDR, sorprendentemente sin retromutaciones requeridas para mantener la afinidad, aunque quedó por demostrarse la actividad funcional deseada. Las estructuras humanas que mantuvieron la mayoría de los residuos canónicos, y que no introdujeron residuos de prolina adicionales, se eligieron como secuencias aceptoras. Con base en estos criterios, la secuencia del aceptor de cadena pesada fue VH1 1-46 para los marcos I y II y VH1 1-e para el marco III, con JH4 como la región J más cercana (también conocida como marco IV). La secuencia del aceptor de la cadena ligera fue la secuencia de la línea germinal VK4 B3 con JK2 como la región J más cercana.

Se realizó el cambio de isotipo para producir formas IgG2, IgG1, IgG4P humanas e IgG1 aglicosilada del anticuerpo humanizado. El sitio de consenso de glicosilación unido a N se eliminó de la secuencia de la región constante de IgG1 humana mediante la mutación de un único residuo de asparagina por ácido glutámico en la posición 297 (numeración de Kabat).

SR-1 humanizado en la forma IgG1 aglicosilada (hSR-1 algG1) se une de una manera deseada con mayor afinidad a c-Kit de la membrana en comparación con el c-kit soluble, y es un antagonista neutro altamente potente de SCF y no media el agonismo de c-Kit directamente en todos los ensayos con base en células probados utilizando lecturas proximales y distales de la señalización de c-Kit. El isotipo aglicosilado IgG1 se eligió para evitar la función efectora y la destrucción celular a través de los efectos espectadores. Este anticuerpo mostró una semivida inesperada y deseada, PK no lineal y eliminación de anticuerpos mediado por un objetivo saturable en monos. También agota los mastocitos *in vivo* como se espera.

Unión al dímero de c-Kit

La activación de c-Kit tras la unión por el factor de células madre (SCF) conduce a la dimerización/oligomerización, autofosforilación e internalización del receptor, muy probablemente a través de una vía dependiente de clatrina. El anticuerpo monoclonal SR-1 se une al dímero c-Kit con una afinidad 1.000 veces mayor en comparación con el monómero de dominio extracelular soluble de c-Kit según lo determinado por Biacore. El modelado cinético sugiere que SR-1 se uniría preferentemente al receptor nativo asociado a la membrana incluso en presencia de ng/ml del monómero del receptor de cobertura soluble.

Los carbohidratos presentes en una glicoproteína pueden influir en las propiedades biológicas y funcionales. La humanización de SR-1 a una forma de IgG1 aglicosilada mostró que los parámetros de unión se conservaron. SR-1 a IgG1 humanizado se unió a Fc del receptor de c-Kit recombinante con una Kd de unión de equilibrio KinExA de 1,0 pM y, utilizando el ensayo de Biacore, hSR-1 algG1 bloqueó al factor de células madre (SCF) uniéndose con una Ki = 70 pM. hSR-1 algG1 se une con alta afinidad al dímero receptor frente al monómero. Esta es una característica importante que no se predice que se traducirá con certeza con la humanización y que el monómero de c-Kit soluble tiene menos probabilidades de actuar como un sumidero para el anticuerpo *in vivo*.

Inhibición de la supervivencia celular dependiente de c-Kit y señalización del receptor

La línea celular megacarioblástica humana UT-7 depende de SCF para la supervivencia y la eliminación de SCF o su inhibición da como resultado una pérdida rápida de la viabilidad y una proliferación reducida. Este ensayo es adecuado para la determinación de la potencia de IC₅₀ de los antagonistas de SCF. hSR-1 algG1 exhibió una IC₅₀ media de 35 pM.

El hSR-1 algG1 inhibió en forma potente la fosforilación y la internalización de c-Kit mediada por SCF en células MO7e, lo que indica que el anticuerpo puede bloquear los eventos de señalización de c-Kit mediados por SCF. En contraste con los hallazgos de que SR-1 es capaz de mediar intrínsecamente la internalización y fosforilación de c-Kit, sorprendentemente, no se detectó evidencia de agonismo en la lectura de fosforilación proximal del receptor c-Kit en MO7e para hSR-1 algG1. Notablemente, hSR-1 IgG2, el anticuerpo IgG2 fue ligeramente menos potente y no inhibía completamente la internalización del receptor de c-Kit mediado por SCF.

hSR-1 algG1 muestra la neutralización con 1,0 ug/ml del efecto sinérgico de SCF en la formación de colonias derivadas de GM-CSF utilizando células de médula ósea CD34+, CD117+ (c-Kit) humanas primarias aisladas. En concordancia con el hallazgo novedoso de que hSR-1 algG1 no media la internalización o la fosforilación de c-Kit, y no se observó actividad de supervivencia agonística intrínseca de hSR-1 algG1 hasta una concentración de 10 ug/ml del anticuerpo en este ensayo. De hecho, el anticuerpo fue capaz de inhibir la supervivencia por debajo de la línea base.

Falta de agregación de mastocitos, CDC y actividad de FcR

Se usaron mastocitos humanos cultivados derivados de células CD34+ de médula ósea para evaluar la potencia aparente y el orden de clasificación de los compuestos. hSR-1 algG1 inhibió la supervivencia de mastocitos dependiente de SCF, no confirió ninguna señal de supervivencia a los mastocitos, no medió la fosforilación del receptor c-Kit (Figura 3) y no mostró capacidad para mediar en la agregación de mastocitos homotípicos. Por el contrario, el hSR-1 IgG2 fue capaz de bloquear la supervivencia de los mastocitos de SCF, pero en sí misma mostró una actividad agonista parcial que confiere una señal de supervivencia, que media en la fosforilación del receptor c-Kit y dio como resultado un efecto reproducible en la agrupación de mastocitos. No se observaron anomalías inesperadas para hSR-1 algG1 cuando este anticuerpo se administró *in vivo* hasta 30 mg/kg una vez por semana durante 4 semanas o hasta 150 mg/kg por vía subcutánea una vez por semana durante 2 semanas en primates no humanos.

hSR-1 algG1 no muestra una unión no específica detectable de FcR a células U-937 que expresan el receptor I de Fcγ = CD64, el receptor II de Fcγ = CD32 y el receptor III de Fcγ = CD16. Por el contrario, la unión de los isotipos de IgG1 e IgG4P de SR-1 se detectó presumiblemente con la FcγRI de alta afinidad. Por lo tanto, no se predice ninguna actividad de ADCC para hSR-1 algG1, y los datos experimentales hasta la fecha no muestran una muerte celular citotóxica dependiente del complemento. Se ha informado que los anticuerpos IgG1 de ratón/humano quiméricos aglicosilados retienen alguna función efectora (Hybridoma. Abril de 1991; 10 (2): 211-7) y, por lo tanto, no se esperan estas actividades deseadas de hSR-1 algG1. Los datos muestran que la aplicación de metodologías estándar y, por lo tanto, la elección de isotipos típicos de IgG2 o IgG1 o IgG4 no habrían producido una molécula con características apropiadas, es decir, un aglutinante de alta afinidad, un antagonista neutro funcional en c-kit y que no activara mastocitos.

Farmacocinética

Se realizó un estudio preliminar de PK para comparar PK de hSR-1 IgG2 y hSR-1 algG1 en monos cynomolgus machos después de una única administración IV o SC de 3 mg/kg. Los perfiles de tiempo indican una PK no lineal para ambos. Las concentraciones disminuyeron más rápidamente a concentraciones más bajas. Los dos anticuerpos mostraron exposiciones similares, según lo medido por C₀/C_{máx} y AUC_{duración0-t}, después de una única administración IV o SC en monos cynomolgus. Con base en AUC_{duración0-t}, la eliminación del suero fue aproximadamente ≤ 0,3 ml/h/kg para ambos anticuerpos humanizados. La biodisponibilidad fue aproximadamente del 82% y 69% para las versiones SR-1 humanizadas hSR-1 algG1 y hSR-1 IgG2, respectivamente, después de la dosificación SC.

De acuerdo con los datos preliminares de exposición de SR-1 y anticuerpos humanizados en monos verdes africanos después de una dosis repetida una vez por semana, los anticuerpos humanizados lograron exposiciones más altas en comparación con SR-1. Notablemente hSR1-algG1 mostró el mejor resultado en el grupo PK y se ha demostrado previamente que el grado de glicosilación de una molécula puede alterar sus propiedades farmacocinéticas y, en el caso de un anticuerpo, su metabolismo y otras propiedades biológicas, Cancer Immunol Immunother. 1992; 35 (3): 165-74.

Tabla 1. Estimaciones de parámetros farmacocinéticos después de una administración IV o SC única de hSR-1 IgG2 o hSR-1 algG1 con 3 mg/kg a monos Cynomolgus macho

Artículo de prueba	Ruta de dosificación	C ₀ /C _{máx} (µg/ml)	T _{máx} (h)	AUC _{duración0-t} (h*µg/ml)	CL o CL/F ^a (ml/h/kg)	% de F
hSR-1 algG1	IV	103	-	9710	≤ 0,309	-
hSR-1 IgG2	IV	107	-	10600	≤ 0,283	-
hSR-1 algG1	SC	36,4	72	7970	≤ 0,376	82,1
hSR-1 IgG2	SC	36,7	60	7290	≤ 0,412	68,8

C₀ = concentración inicial estimada después de dosificación IV
 C_{máx} = concentración máxima después de dosificación SC
 T_{máx} = tiempo de C_{máx}
 AUC_{duración0-t} = área bajo la curva de concentración-tiempo desde tiempo 0 hasta el último punto de tiempo con una concentración cuantificable
 CL = eliminación después de dosificación IV; CL/F = eliminación aparente después de la dosificación SC
 % de F = % de biodisponibilidad
^a Eliminación calculada con base en AUC_{duración0-t}
 - no aplicable
 C₀, C_{máx}, AUC_{duración0-t}, CL, CL/F y % de F% reportados hasta la tercera cifra significativas.

Proyecciones de dosis humanas

5 La dosis mínima efectiva en el modelo PD de la herida de la expansión de los mastocitos es <0,3 mg/kg administrada una vez a la semana durante 2 semanas en monos. Con base en una conversión de dosis basada en el área de la superficie corporal, se proyecta que la dosis mínima efectiva en humanos sea <0,1 mg/kg con un régimen de dosificación equivalente. Sin embargo, esta es una estimación preliminar, ya que la PK y la relación farmacodinámica entre el grado y la duración de la inhibición de c-kit en humanos por hSR-1 algG1 y los puntos finales clínicos son desconocidos en este momento. Se realizará una proyección más precisa cuando haya más datos farmacocinéticos y farmacodinámicos disponibles.

Potencia *in vivo*: agotamiento de los mastocitos basales de pulmón y colon en monos con SR-1 y hSR-1 alGg1

15 En humanos, los mastocitos MCt que expresan triptasa y carecen de quimasa se localizan principalmente en tejidos de la mucosa como el pulmón y el colon, y este subtipo se ha detectado en la piel y en niveles más altos de algunos pacientes con esclerodermia, lo que sugiere una posible activación alternativa de mastocitos en esta afección. Los mastocitos MCt que expresan tanto triptasa como quimasa también están localizados conjuntamente en algunos de estos tejidos y, de manera similar, se han asociado con esclerodermia y otras afecciones fibróticas. Por lo tanto, 20 ambos subtipos representarían los objetivos principales para un inhibidor de c-Kit en enfermedades que involucran la mucosa y los tejidos conectivos (por ejemplo, IPF, SSc, asma, AR e IBD). El agente terapéutico también tendría que ser muy potente, eficaz y tener un buen volumen de distribución y PK, ya que los mastocitos son generalmente de larga duración y son residentes del tejido. Además, los mastocitos son en gran medida inactivos hasta que se activan para desgranularse y sintetizar de nuevo mediadores donde luego desempeñan un papel clave en la respuesta inflamatoria.

25 Los objetivos de los estudios *in vivo* fueron demostrar el agotamiento de la mucosa basal y los mastocitos del tejido conjuntivo, como los presentes en el pulmón y el colon, y determinar los efectos sobre la hematopoyesis y los efectos sobre las células precursoras, así como el impacto sobre la eritropoyesis, la melanogénesis y los efectos sobre las células precursoras, así como el impacto sobre la eritropoyesis, la melanogénesis y la espermatogénesis (por lo tanto, utilidad en la anticoncepción masculina) después de una inhibición fraccional sostenida y alta de c-Kit. El anticuerpo monoclonal SR-1 se seleccionó en función de su potencia funcional equivalente en c-Kit humano y de mono en el ensayo CFU de células de médula ósea CD34+ (inhibición con 1,0 µg/ml) y su PK de mono.

35 Se administró SR-1 en dosis que oscilaron entre 3 mg/kg y 30 mg/kg una vez a la semana durante 4 semanas. En estudios a lo largo del tiempo, se demostró que los mastocitos basales de colon se agotaban al máximo después de 2 dosis el día 14 (C_{más baja alcanzada} > 800 veces la IC₅₀ de la célula) y, por lo tanto, el día 14 se eligió como el momento para determinar la actividad farmacológica de antagonistas de c-Kit en mastocitos basales de colon. Por razones prácticas, los mastocitos basales pulmonares se evaluaron el día 28 en el momento de la necropsia y la finalización del estudio.

45 A una dosis de 3,0 mg/kg de SR-1 administrado una vez a la semana, se observó un agotamiento de mastocitos basales de pulmón a un nivel de C_{más baja alcanzada} de PK > 200 veces la IC₅₀ celular de UT-7. No se evaluaron los efectos de dosis más bajas de SR-1 en mastocitos basales de colon y pulmón, melanogénesis y espermatogénesis.

Sin embargo, se realizó un estudio de dosis más baja con hSR-1 algG1 a 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg. El día 14 los niveles de $C_{\text{más baja alcanzada}}$ fueron > 200, > 2000, y > 8000 veces la IC_{50} de la célula y estos niveles de $C_{\text{más baja alcanzada}}$ no correspondieron a ninguna eficacia, cerca de la mitad del agotamiento (69%) y casi el agotamiento completo (96%) de mastocitos basales de colon (resumido en la Tabla 1). La exposición, la potencia celular y la relación de efecto para hSR-1 algG1 están en correspondencia con los hallazgos de SR-1 reportados.

Eficacia *in vivo* de SR-1 y hSR-1 algG1 en el modelo farmacodinámico de herida de expansión de mastocitos en monos

El daño a la piel es seguido por una respuesta inflamatoria robusta, en la cual los primeros neutrófilos y luego los macrófagos y los mastocitos emigran de los tejidos cercanos y desde la circulación, granulación y reepitelización de tejidos y la contracción asociada a los fibroblastos de tejidos conectivos de la herida subyacente (Diegelmann RF, et al., Front. Biosci. 1 de enero de 2004; 9: 283-9). La lesión cutánea por herida es un modelo para estudiar los mecanismos que pueden ser relevantes en la fibrosis, ya que muchos de los tipos de células involucradas están asociados con esta enfermedad. Además, se ha reportado que en humanos se ha acoplado con un aumento en el SCF derivado de fibroblastos y la activación y el aumento de las densidades de los mastocitos (Trautmann A, et al, J. Pathol. Enero de 2000; 190 (1): 100-6) . Después de la lesión de la herida cutánea en monos, el número de mastocitos aumenta de manera dependiente del tiempo con una meseta que se alcanza 14 días después de la herida, que es comparable al paradigma humano.

Las dosis de 0,3, 1 o 3 mg/kg de SR-1 administradas una vez a la semana condujeron a una inhibición casi máxima de la expansión activada por la herida de mastocitos en el día 14 (Figura 1). La inhibición máxima se define como la capacidad de bloquear el 100% del aumento de los mastocitos con respecto a los números de referencia en el día 14 después de la herida. Los niveles de $C_{\text{más baja alcanzada}}$ para la dosis de 0,3 mpk fueron > 7 veces la IC_{50} de UT-7 en el día 14 (Tabla 2). A las 3 semanas, los niveles en suero eran aproximadamente 2 veces la IC_{50} de UT-7, y en esta exposición solo se observó una inhibición parcial (Figura 1). A las 3 semanas, todavía se observó una eficacia máxima para las cohortes de 1 y 3 mg/kg en las que los niveles de $C_{\text{más baja alcanzada}}$ se mantuvieron > 200 veces la IC_{50} . Estos estudios sugieren que es probable que se requiera una exposición sostenida de $C_{\text{más baja alcanzada}}$ > 7 veces la concentración IC_{50} para inhibición máxima de los mastocitos expandidos por la herida.

Las dosis de 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg de hSR-1 algG1 se evaluaron en función de la eficacia máxima mostrada para SR-1 en este modelo. En la dosis más baja probada (0,3 mg/kg), se observó una inhibición máxima de la expansión de mastocitos inducida por la herida en 2 semanas. Los niveles de $C_{\text{más baja alcanzada}}$ en suero en este momento eran > 200 veces la IC_{50} de UT-7 (Tabla 2).

Tabla 2: resume los efectos de PD/PK de SR-1 y hSR-1 algG1 en el modelo PD de herida.

Fármaco	IC_{50} de UT-7 (ng/ml)	Dosis	$C_{\text{más baja alcanzada}}$ (ng/ml)	Veces la IC_{50} de UT-7	Inhibición de mastocitos activados de piel	Agotamiento de mastocitos basales en colon
SR-1	3,6	0,3 mg/kg	30	8	>95%	ND
		1,0 mg/kg	994	276	>80%	ND
		3,0 mg/kg	1873	520	>80%	ND
hSR-1 algG1	4,5	0,3 mg/kg	910	>200	>95%	Sin efecto
		1,0 mg/kg	12,400	>2000	>95%	>65%
		3,0 mg/kg	44,500	>7000	>95%	>95%

Se realizó una herida por incisión seguida de una biopsia por punción hasta el día 21 en primates humanos (izquierda) o no humanos (derecha) (Figura 2). Los mastocitos y/o los fibroblastos que expresan SCF fueron revelados por tinción cromogénica o IHC respectivamente. En humanos, la expresión de SCF aumenta y vuelve a la línea base y es seguida temporalmente por un aumento transitorio en el número de mastocitos durante la cicatrización normal de la herida. En monos se observa una respuesta similar de los mastocitos a la herida. Durante la fibrosis y la cicatrización aberrante de heridas, la expresión de SCF y el número de mastocitos permanecen elevados (Figura 2).

Hematopoyesis y melanogénesis.

La genética del ratón muestra que c-Kit desempeña un papel en la hematopoyesis durante el desarrollo embrionario, pero en mutaciones de c-Kit heterocigóticas inactivadas y/o con pérdida de función en sujetos Picazo no se ha relacionado con anomalías hematológicas. SCF y c-Kit son importantes en la hematopoyesis humana ya que SCF se usa en combinación con G-CSF para la movilización de células madre hematopoyéticas. Además, el inhibidor de múltiples quinasas Gleevec que se dirige principalmente a BCR-ABL, PDGFR y c-Kit tiene como su efecto farmacológico primario mielosupresión, y se han notificado anemias y trombocitopenias de grado 3-4 grave en pacientes con GIST (Hensley ML, et al. , Semin. Hematol. Abril de 2003; 40 (2 Suppl 2): 21-5).

La genética del ratón indica que c-Kit desempeña un papel en la migración de los melanoblastos desde la cresta neural durante la embriogénesis, y este papel se apoya en la característica Picazo humana. Se ha informado que Gleevec causa despigmentación de "bandas" en el cabello en un número menor de pacientes con GIST, pero esto no ha sido un hallazgo consistente y también se ha reportado hiperpigmentación. La contribución de otras quinasas como PDGF no puede ser excluida. Los estudios en ratones con inhibidores de la multiquinasa y un anticuerpo c-Kit muestran que la inhibición de la pigmentación del pelo es totalmente reversible, lo que sugiere que la inhibición de c-Kit afecta la función de los melanocitos y no la supervivencia en el entorno postnatal (Moss et al, 2003).

Se utilizó SR-1 en estudios de intervalo de dosis de 3 a 30 mg/kg administrados una vez a la semana durante 4 semanas para determinar las exposiciones necesarias para inhibir la hematopoyesis, la espermatogénesis y la melanogénesis activa. Se realizó un panel de sangre completo que incluía diferenciales celulares en muestras de sangre tomadas al inicio del estudio, días 4, 7, 14, 21 y 28 después del inicio del estudio. El análisis de muestras de sangre recién aisladas se realizó en el laboratorio de hematología clínica del Hospital Queen Elizabeth, Barbados.

No se detectó un impacto significativo de SR-1 en comparación con los sujetos control y los valores de referencia en ninguno de los parámetros hematológicos analizados, aunque hubo disminuciones no significativas en los RBC en animales tratados con fármaco 4 semanas después de comenzar la dosificación. Con la dosis más alta probada, 30 mg/kg una vez a la semana durante 4 semanas, se lograron niveles de exposición > 70.000 veces la potencia de IC₅₀ de UT-7. La falta de efecto significativo sobre los parámetros hematológicos se confirmó mediante un análisis histopatológico de la médula ósea que no mostró diferencias entre las cohortes tratadas con el fármaco y el control y el agotamiento de las células madre hematopoyéticas positivas para CD117, lo que sugiere posibles vías redundantes para la hematopoyesis en la especie de NHP de mono verde africano. El efecto de 3-30 mpk administrado una vez a la semana durante 4 semanas en la melanogénesis también se examinó, ya que puede ser útil en el melanoma. Para evaluar los efectos sobre los melanocitos activados que pueden reflejar mejor el estado de una enfermedad, el pelo fue depilado para activar la melanogénesis. El color del pelo normal de la capa no se vio visiblemente afectado en ninguna cohorte. Sin embargo, se observó una inhibición de la pigmentación del pelo en grados variables en el pelo recién crecido en monos que recibieron la dosis de 30 mg/kg. No se observó ningún efecto en la cohorte de 10 mg/kg, lo que sugiere que la dosis sin efecto está entre 10-30 mg/kg. En la cohorte de 10 mg/kg, las exposiciones a SR-1 fueron > 8.000 veces la IC₅₀ de UT-7. La eficacia máxima para el agotamiento de los mastocitos se logró con > 7 veces la IC₅₀ de UT-7. Estos datos sugieren que la inhibición de c-Kit afecta la función de los melanocitos y que se pueden necesitar dosis/exposiciones más altas para bloquear las enfermedades caracterizadas por una actividad excesiva de los melanocitos.

Espermatogénesis

Los estudios en ratones han demostrado que c-Kit es importante para el mantenimiento y la proliferación de espermatogonias positivas para el receptor de c-kit diferenciado, pero no para la etapa inicial de diferenciación de células espermatogoniales. Los sujetos Picazo macho y hembra que son heterocigotos para un alelo del receptor de c-Kit inactivos, son fértiles, lo que sugiere que este grado de inactivación de c-Kit no parece afectar el desarrollo de células germinales primordiales, espermatogénesis u ovogénesis.

SR-1 mostró una inhibición dependiente de la dosis de espermatogénesis de 0,3-30 mg/kg. La dosis semanal de 0,3 mg/kg es menor que el efecto máximo observado en las dosis más altas, y se requieren estudios de intervalo de dosis más bajos para definir la ED₅₀. Las exposiciones alcanzadas son 7 veces la IC₅₀ de UT-7, que es la exposición requerida para una eficacia máxima en el modelo de herida de expansión de mastocitos. La extrapolación de PK sugirió que el anticuerpo probablemente se eliminaría 1 mes después de la última dosis, pero se seleccionaron 9 meses como un punto temporal conservador para evaluar la recuperación. La espermatogénesis normal se encontró en todos los animales dosificados a los 9 meses, lo que demuestra que el uso de una molécula tipo hSR-1 algG1 es útil como anticonceptivo masculino.

Sumario

El anticuerpo IgG1 anti-c-Kit aglicosilado humanizado (hSR-1 algG1) es un anticuerpo altamente potente y específico que se neutraliza en todos los ensayos basados en células analizados utilizando lecturas proximales y distales de señalización de c-Kit. Intrínsecamente, no media la internalización o fosforilación del receptor c-Kit como se informó para el anticuerpo SR-1 monoclonal murino parental. La selección del isotipo IgG1 aglicosilado sobre los isotipos IgG1, IgG2 e IgG4 humanizados no se habría predicho con base en enfoques estándar. hSR-1 algG1 se eligió empíricamente mediante una experimentación novedosa para mostrar que exhibía las características

farmacológicas apropiadas en el receptor c-Kit de la membrana, evitar la actividad agonista con c-Kit y en mastocitos, careciendo de función efectora y muerte celular a través de los efectos espectadores. Este anticuerpo mostró buena biodisponibilidad s.c. y semivida, PK no lineal y eliminación de anticuerpos mediada por el objetivo saturable y agotamiento de mastocitos en monos. Estos datos predecirían una dosis adecuada de agotamiento de mastocitos eficaces humanos.

La dosis mínima eficaz del anticuerpo monoclonal parental de SR-1 de ratón en el modelo PD de herida de mono es <math><0,3 \text{ mg/kg}</math> ($C_{\text{más baja alcanzada}} > 7$ veces la IC_{50} de las células), y una exposición ligeramente mayor ($C_{\text{más baja alcanzada}} > 800$ -veces la IC_{50} de la célula) también fue eficaz en el agotamiento de los mastocitos basales de piel, colon y pulmón. De manera similar, se requieren niveles de exposición superiores a > 8.000 veces la IC_{50} de la célula antes de que se puedan observar los impactos cualitativos sobre la pigmentación capilar en pelo recién crecido. La inhibición de la pigmentación del pelo en pelo recién crecido se ha reportado con inhibidores de múltiples quinasas y para el anticuerpo c-Kit en roedores y hSR-1 algG1 puede tener utilidad en enfermedades asociadas con la actividad excesiva de los melanocitos. El efecto es reversible al cesar el tratamiento. Se demostró un efecto por debajo del máximo en la inhibición de la espermatogénesis a niveles > 7 veces la IC_{50} de la célula, la exposición que confiere la máxima eficacia en el modelo de PD de la herida.

Listado de secuencias

<110> Amgen Inc.

<120> Anticuerpo c-Kit humanizado

<130> A-1126-WO-PCT

<150> 60794771

<151> 2006-04-24

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 717

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgggtgttgc agaccaggt cttcatttct ctggtgctct ggatctctgg tgcctacggg	60
gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc	120
atcaactgca gagccagtga aagtgtgat atttatggca atagttttat gcactggtac	180
cagcagaaac caggacagcc tcctaagctg ctcatttacc ttgcatcaa cctagaatct	240
ggggtcctg accgattcag tggcagcggg tctgggacag atttactct caccatcagc	300
agcctgcagg ctgaagatgt ggcagtttat tactgtcagc aaaataatga ggatccgtac	360
acgttcggag gtgggaccaa ggtggaata aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc	420
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg	480
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg	540
ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc	600
agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc	660
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttga	717

<210> 2

<211> 238

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser
35 40 45

Val Asp Ile Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

10

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 3

15 <211> 1401

ES 2 705 480 T3

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <400> 3

```

atggactgga cctggagggg cttctgcttg ctggcagtgg ccccaggtgc cactcccag      60
gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc      120
tgcaaggctt ctggatacac cttcaccagt tacaatatgc actgggtgcg ccaggcccct      180
ggacaagggc ttgagtggat gggagttatt tattcaggaa atggtgatac ttcctacaat      240
cagaagttca aaggcagggg caccattacc gctgacaaat ccaccagcac agcctacatg      300
gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgagag agagagggat      360
actcgttttg gtaactgggg ccaagggact ctggtcaccg tctctagtgc ctccaccaag      420
ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc      480

ctgggctgcc tggccaagga ctacttcccc gaaccgggta cgggtgctgtg gaactcaggc      540
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc      600
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac      660
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac      720
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc      780
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc      840
gtgggtggtg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc      900
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtaccagag cacgtaccgt      960
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc     1020
aaggtctcca acaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg     1080
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac     1140
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatcca gcgacatcgc cgtggagtgg     1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac     1260
ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac     1320
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc     1380
tcctgtctc cgggtaaata a

```

10

<210> 4

<211> 466

15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

20

ES 2 705 480 T3

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

ES 2 705 480 T3

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 145 150 155 160
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 210 220
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 225 230 235 240
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 245 250 255
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 275 280 285
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 340 345 350
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

ES 2 705 480 T3

370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 450 455 460

Gly Lys
 465

<210> 5

5 <211> 1389

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<400> 5

atggactgga cctggagggg cttctgcttg ctggcagtgg ccccaggtgc ccaactcccag 60

gtgcagctgg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120

tgcaaggctt ctggatacac cttcaccagt tacaatatgc actgggtgcg ccaggcccct 180

ggacaagggc ttgagtggat gggagttatt tattcaggaa atggtgatac ttcctacaat 240

cagaagttca aaggcagggg caccattacc gctgacaaat ccaccagcac agcctacatg 300

gagctgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgagag agagagggat 360

actcgttttg gtaactgggg ccaagggact ctggtcaccg tctctagtgc ctccaccaag 420

ggcccatcgg tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 480

ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgctgtg gaactcaggc 540

gctctgacca gcggcgtgca caccttccca gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600

ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc aacttcggca cccagacctc cacctgcaac 660

gtagatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagacag ttgagcgaat atgtttgtgtc 720

gagtgcccac cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttctt cttcccccca 780

aaaccaaggg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgctg ggtggtggac 840

gtgagccacg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat 900

aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc 960

ctcaccgttg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 1020

ES 2 705 480 T3

aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctcaaaa ccaaagggca gccccgagaa 1080
 ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1140
 acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1200
 cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctcttcttc 1260
 ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1320
 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg 1380
 ggtaaataga 1380

<210> 6

5 <211> 462

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 6

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

			180					185				190			
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
		195					200					205			
Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys
	210					215					220				
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val
225					230					235					240
Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
				245					250					255	
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
			260					265					270		
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
		275					280					285			
Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
	290					295					300				
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val
305					310					315					320
Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
				325					330					335	
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
			340					345					350		
Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
		355					360					365			
Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
	370					375					380				
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
385					390					395					400
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp
				405					410					415	
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
			420					425					430		
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
		435					440					445			

ES 2 705 480 T3

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 7

5 <211> 717

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<400> 7

atggagacag	acacactcct	gctatgggtg	ctgctgctct	gggtccagg	ttccacaggt	60
aacattgtgt	tgaccaatc	tccagcttct	ttggctgtgt	ctctagggct	gagggccacc	120
ataticctgca	gagccagtga	aagtgttgat	atttatggca	atagttttat	gcaactgtac	180
cagcagaaac	caggacagcc	acccaaactc	ctcatctatc	ttgcatcaa	cctagaatct	240
ggggtccctg	ccaggttcag	tggcagtggg	tctaggacag	acttcaccct	caccattgat	300
cctgtggagg	ctgatgatgc	tgcaacctat	tactgtcagc	aaaataatga	ggatccgtac	360
acgttcggag	gggggaccaa	gctggaaata	aaacgggctg	atgctgcacc	aactgtatcc	420
atcttccac	catccagtga	gcagttaaca	tctggagggtg	cctcagtcgt	gtgcttcttg	480
aacaacttct	accccaaaga	catcaatgtc	aagtggaaga	ttgatggcag	tgaacgacaa	540
aatggcgtcc	tgaacagttg	gactgatcag	gacagcaaag	acagcaccta	cagcatgagc	600
agcaccctca	cgttgaccaa	ggacgagtat	gaacgacata	acagctatac	ctgtgaggcc	660
actcacaaga	catcaacttc	acccattgtc	aagagcttca	acaggaatga	gtgttga	717

15 <210> 8

<211> 238

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 20 25 30
 Val Ser Leu Gly Leu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
 35 40 45
 Val Asp Ile Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 130 135 140
 Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu
 145 150 155 160
 Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
 165 170 175
 Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser
 180 185 190
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp
 195 200 205
 Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
 210 215 220
 Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230 235

- 5 <210> 9
- <211> 1401
- <212> ADN
- 10 <213> Homo sapiens

ES 2 705 480 T3

<400> 9

```

atgggatgga gttgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactcccag      60
gtgcaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatgtcc      120
tgcaaggctt ctggctacac atttaccagt tacaatatgc actgggtaaa gcagacacct      180
ggacagggcc tggaatggat tggagttatt tattcaggaa atggtgatac ttcctacaat      240
cagaagttca aaggcaaggc cacattgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg      300
caaatcaaca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag agagagggat      360
actcgttttg gtaactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgcage caaaacaaca      420
gccccatcgg tctatccact ggccccctgtg tgtggagata caactggctc ctcggtgact      480
ctaggatgcc tgggtcaaggg ttatttccct gagccagtga ccttgacctg gaactctgga      540
tccctgtcca gtggtgtgca caccttccca gctgtcctgc agtctgacct ctacaccctc      600
agcagctcag tgactgtaac ctcgagcacc tggcccagcc agtccatcac ctgcaatgtg      660
gcccacccgg caagcagcac caaggtggac aagaaaattg agcccagagg gcccaaatc      720
aagccctgtc ctccatgcaa atgccagca cctaacctct tgggtggacc atccgtcttc      780

atcttccctc caaagatcaa ggatgtactc atgatctccc tgagcccat agtcacatgt      840
gtggtggtgg atgtgagcga ggatgacca gatgtccaga tcagctggtt tgtgaacaac      900
gtggaagtac acacagctca gacacaaacc catagagagg attacaacag tactctccgg      960
gtggtcagtg ccctccccat ccagcaccag gactggatga gtggcaagga gttcaaatgc     1020
aaggtcaaca acaaagacct cccagcggcc atcgagagaa ccatctcaa acccaaaggg     1080
tcagtaagag ctccacaggt atatgtcttg cctccaccag aagaagagat gactaagaaa     1140
caggtcactc tgacctgcat ggtcacagac ttcatgcctg aagacattta cgtggagtgg     1200
accaacaacg ggaaaacaga gctaaactac aagaacactg aaccagtcct ggactctgat     1260
ggttcttact tcatgtacag caagctgaga gtggaaaaga agaactgggt ggaaagaaat     1320
agctactcct gttcagtggt ccacgagggg ctgcacaatc accacacgac taagagcttc     1380
5   tcccggactc cgggtaaattg a                                             1401

```

<210> 10

<211> 466

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 10

ES 2 705 480 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Val Ile Tyr Ser Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Ile Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Asp Thr Arg Phe Gly Asn Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val
 130 135 140
 Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr

ES 2 705 480 T3

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu
420 425 430

Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His
435 440 445

Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro
450 455 460

Gly Lys
465

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo IgG1 aglicosilado humanizado que se une específicamente a c-Kit y que comprende
- A) (i) una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2, y (ii) la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4; o
- 10 B) (iii) la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2, y (iv) una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4,
- en el que el anticuerpo exhibe una K_d de avidez para c-Kit inferior a 10^{-8} , según lo determinado por el análisis de resonancia de plasmón de superficie.
- 15 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende (i) la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2, y (ii) la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, que tiene al menos una sustitución conservadora de aminoácidos en la región determinante de complementariedad, en la que se mantiene la afinidad del anticuerpo por c-Kit.
- 20 4. El anticuerpo de la reivindicación 3, en el que hay una sustitución conservadora de aminoácidos.
5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para su uso como un medicamento para reducir o tratar enfermedades o trastornos en un sujeto con fibrosis, inflamación, autoinmunidad o cáncer relacionados con c-Kit.
- 25 6. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el trastorno o enfermedad es fibrosis.
- 30 7. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el trastorno fibrótico se selecciona del grupo que consiste en esclerodermia, enfermedad pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis derivada de hepatitis B o C crónica, fibrosis inducida por radiación y fibrosis derivada de cicatrización de heridas.
- 35 8. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, comprendiendo además el medicamento un segundo antagonista para una citoquina profibrótica, en el que la citoquina se selecciona de entre el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), interleuquina 4 (IL-4), interleuquina 5 (IL-5), interleuquina 9 (IL-9), interleuquina 13 (IL-13), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina 1 beta (IL-1 β), factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), interleuquina 6 (IL-6), oncostatina M (OSM), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (CCL2/MCP-1) y quimioquina pulmonar y regulada por activación (CCL18/PARC).
- 40 9. Una composición farmacéutica para reducir o prevenir la fibrosis en un sujeto que padece un trastorno fibrótico que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 45

Figura 1

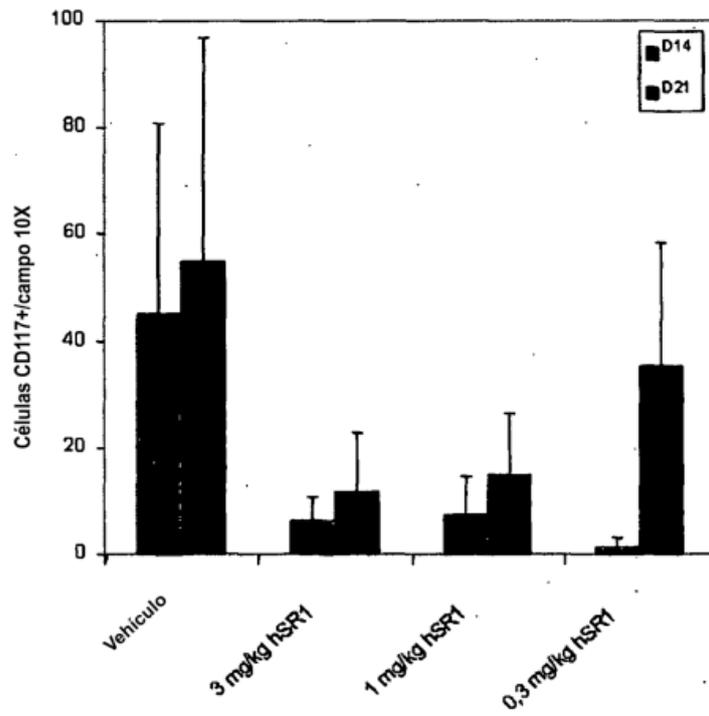
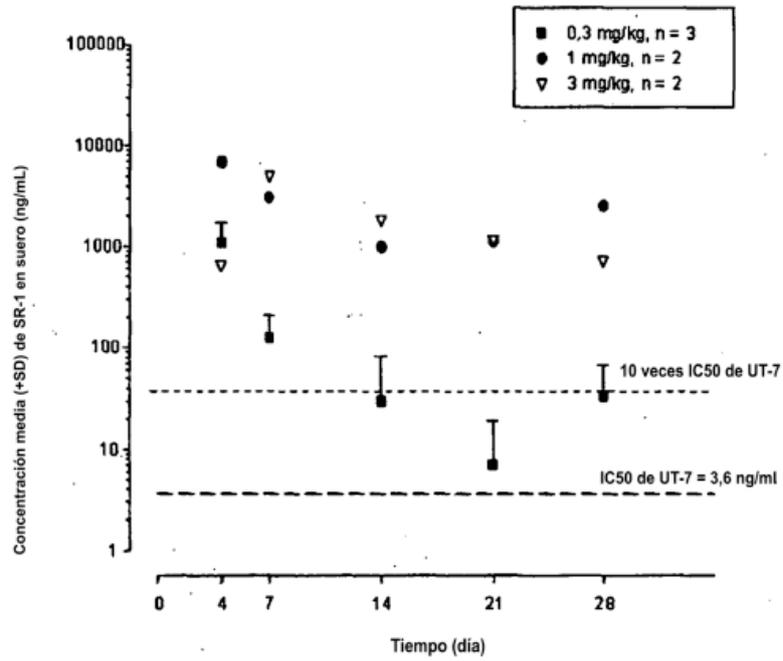
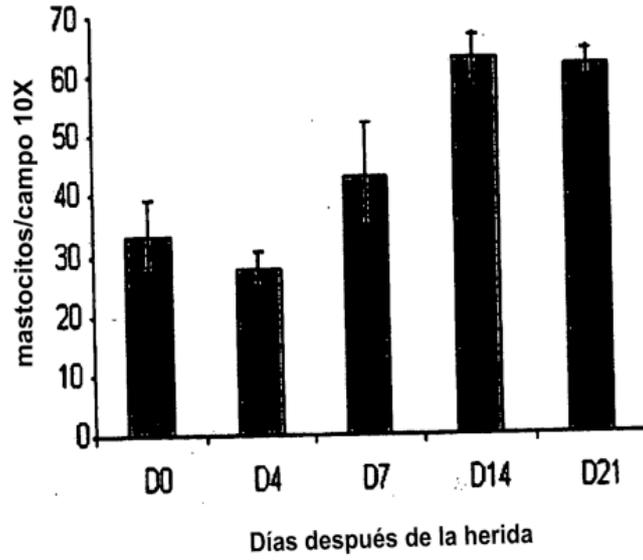


Figura 2

Mono Verde Africano



Humano

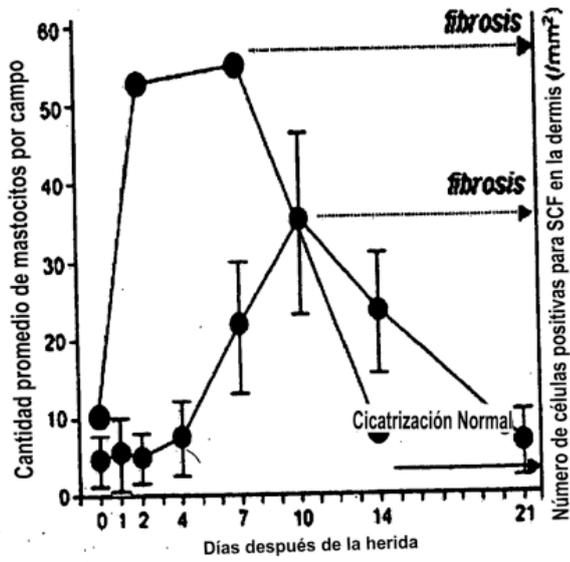


Figura 3

