

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 505**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2011** **PCT/US2011/049448**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2012** **WO12027721**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2011** **E 11820759 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019** **EP 2608809**

54 Título: **Anticuerpos contra la metaloproteinasa 9 de la matriz**

30 Prioridad:

27.08.2010 US 377886 P

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

31.01.2020

73 Titular/es:

GILEAD BIOLOGICS, INC. (100.0%)
333 Lakeside Drive
Foster City, CA 94404, US

72 Inventor/es:

MCCAULEY, SCOTT ALAN y
VAYSBERG, MARIA

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 739 505 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra la metaloproteinasa 9 de la matriz

5 CAMPO

Esta divulgación se encuentra en el campo de las enzimas extracelulares, enzimas de la matriz extracelular, proteasas e inmunología.

10 INTRODUCCIÓN

Las metaloproteinasas de la matriz (MMP) son una familia de enzimas extracelulares involucradas en la formación y remodelación de la matriz extracelular. Estas enzimas contienen un dominio catalítico conservado en el que un átomo de zinc está coordinado por tres residuos de histidina. Actualmente, se conocen más de 20 miembros de esta familia, organizados en una serie de grupos que incluyen colagenasas, gelatinasas, estromelisin, matrilisinas, enamelinisinas y MMP de membrana.

MMP2 y MMP9 pertenecen al grupo de gelatinasas de metaloproteinasas de la matriz. Además de contener dominios de péptido señal, propéptido, catalítico, de unión a zinc y similares a la hemopexina comunes a la mayoría de las MMP, las gelatinasas también contienen una pluralidad de dominios similares a la fibronectina y un dominio O-glicosilado.

Se ha demostrado que la actividad anormal de ciertas MMP desempeña un papel en el crecimiento tumoral, metástasis, inflamación y enfermedades vasculares. Ver, por ejemplo, Hu et al. (2007) Nature Reviews: Drug Discovery 6:480-498. Debido a esto, puede ser deseable inhibir la actividad de una o más MMP en ciertos entornos terapéuticos. Sin embargo, se requiere a menudo la actividad de ciertas otras MMP para la función normal. Dado que la mayoría de los inhibidores de las MMP están dirigidos al dominio catalítico conservado y, como resultado, inhiben una serie de MMP diferentes, su uso terapéutico ha provocado efectos secundarios debido a la inhibición de MMP no relacionadas con patógenos esenciales.

A pesar de este problema, ha resultado difícil desarrollar inhibidores que sean específicos de una MMP particular, ya que la inhibición de la actividad enzimática requiere generalmente que el inhibidor se dirija al dominio catalítico. En consecuencia, es probable que la mayoría de los inhibidores de la actividad enzimática de las metaloproteinasas de la matriz reaccionen con más de una MMP, debido a las homologías en sus dominios catalíticos. La WO2009/111450 divulga anticuerpos anti-MMP9 humanos y humanizados que inhiben la actividad enzimática de la MMP 9. Por tanto, sigue habiendo una necesidad de reactivos terapéuticos que inhiban específicamente la actividad catalítica de una única MMP, y que no reaccionen con otras MMP.

40 SUMARIO

En la presente se divulgan composiciones y métodos de uso que implican proteínas de unión, por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos de los mismos que se unen a la proteína metaloproteinasa-9 de la matriz (MMP9) (la MMP9 también es conocida como gelatinasa-B), en donde las proteínas de unión comprenden una cadena pesada de inmunoglobulina (Ig) (o fragmento funcional de la misma) y una cadena ligera de Ig (o fragmento funcional de la misma). Además, se divulgan proteínas de unión a MMP9 que se unen específicamente a MMP9 y no a otras metaloproteinasas de la matriz relacionadas. Tales proteínas de unión a MMP9 encuentran uso en aplicaciones en las que es necesario o deseable obtener una modulación específica (por ejemplo, inhibición) de MMP9, por ejemplo, sin afectar directamente la actividad de otras metaloproteinasas de la matriz. Por tanto, se divulga además un anticuerpo anti-MMP9 que es un inhibidor específico de la actividad de MMP9. En particular, las proteínas de unión a MMP9 divulgadas en la presente serán útiles para la inhibición de MMP9 a la vez que permiten la función normal de otras metaloproteinasas de la matriz relacionadas.

Por consiguiente, la presente invención proporciona, entre otras cosas:

55 1. Una proteína de unión a MMP9 aislada, en donde la proteína de unión es un anticuerpo anti-metaloproteinasa 9 de la matriz (MMP9) o un fragmento de unión al antígeno del mismo, dicho anticuerpo o fragmento comprende:

60 un polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina o un fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 13-15, y

un polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina o un fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende las CDR de la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 16-18.

65 2. La proteína de unión a MMP9 aislada de la realización 1, en donde la proteína de unión a MMP9 se une al

epítipo de MMP9 humana que comprende los residuos de aminoácidos R162, E111, D113 e I198.

3. La proteína de unión a MMP9 aislada de la realización 1 o 2, en donde el polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 3 y 5-8, y el polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 4 y 9-12.

4. La proteína de unión a MMP9 aislada de cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en donde el polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y el polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.

5. La proteína de unión a MMP9 aislada de la realización 1, en donde el polipéptido de cadena pesada o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 1, 3 y 5-8.

6. La proteína de unión a MMP9 aislada de la realización 1 o la realización 5, en donde el polipéptido de cadena ligera o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 2, 4 y 9-12.

7. La proteína de unión a MMP9 aislada de cualquiera de las realizaciones 1 a 6, en donde el polipéptido de cadena pesada es una IgG y/o en donde el polipéptido de cadena ligera es una cadena kappa.

8. Un ácido nucleico aislado, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica:

(a) la proteína de unión a MMP9 de cualquiera de las realizaciones 1-7, en donde la proteína de unión a MMP9 es un anticuerpo anti-MMP9 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, o

(b) un polipéptido de cadena pesada o un fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende las CDR de las SEQ ID NO: 13-15 y/o un polipéptido de cadena ligera o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende las CDR de las SEQ ID NO: 16-18.

9. El ácido nucleico aislado de la realización 8(b), en donde el polipéptido de cadena pesada o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 1, 3 y 5-8 o el polipéptido de cadena ligera o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 2, 4 y 9-12.

10. El ácido nucleico aislado de la realización 8(b) o la realización 9, en donde la secuencia de nucleótidos comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 19-26.

11. El ácido nucleico aislado de cualquiera de las realizaciones 8(b)-10, en donde el polipéptido de cadena pesada o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y el polipéptido de cadena ligera o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.

12. Un vector que comprende el ácido nucleico aislado de cualquiera de las realizaciones 8-11.

13. Una célula que comprende el vector de la realización 12.

14. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión a MMP9 de cualquiera de las realizaciones 1-7, el vector de la realización 12, o la célula de la realización 13.

15. La proteína de unión a MMP9 aislada de cualquiera de las realizaciones 1-7 para uso terapéutico.

16. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión a MMP9 de cualquiera de las realizaciones 1-7 para su uso en el tratamiento de un tumor.

17. Un método para detectar la expresión de MMP9, que comprende:

poner en contacto una muestra de tejido obtenida de un sujeto con una proteína de unión a MMP9 de cualquiera de las realizaciones 1-7; y

detectar la presencia o ausencia de MMP9;

en donde la presencia de MMP9 en la muestra de tejido indica que la MMP9 se expresa en tejido.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-MMP9 monoclonal de ratón (AB0041), junto con las secuencias de aminoácidos de variantes humanizadas de la cadena pesada (VH1-VH4), alineadas para mostrar diferencias en la secuencia de aminoácidos del marco resultantes de la humanización. Las CDR se muestran en cursiva, y los aminoácidos que son diferentes en las variantes humanizadas, en comparación con el monoclonal de ratón original, están subrayados.

La **Figura 2** muestra la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo anti-MMP9 monoclonal de ratón (AB0041), junto con las secuencias de aminoácidos de variantes humanizadas de esta cadena ligera (Vk1-Vk4), alineadas para mostrar las diferencias en la secuencia de aminoácidos del marco resultantes de la humanización. Las CDR se muestran en cursiva y los aminoácidos que son diferentes en las variantes humanizadas, en comparación con el monoclonal de ratón original, están subrayados.

La **Figura 3** muestra un diagrama esquemático de la proteína MMP9.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La puesta en práctica de la presente divulgación emplea, a menos que se indique lo contrario, métodos estándar y técnicas convencionales en los campos de biología celular, toxicología, biología molecular, bioquímica, cultivo celular, inmunología, oncología, ADN recombinante y campos relacionados que están dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se describen en la bibliografía y están por lo tanto disponibles para los expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Alberts, B. et al., "Molecular Biology of the Cell," 5ª edición, Garland Science, New York, NY, 2008; Voet, D. et al. "Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level," 3ª edición, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2008; Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; Ausubel, F. et al., "Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley & Sons, New York, 1987 y actualizaciones periódicas; Freshney, R.I., "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique," 4ª edición, John Wiley & Sons, Somerset, NJ, 2000; and la serie "Methods in Enzymology," Academic Press, San Diego, CA.

Ver también, por ejemplo, "Current Protocols in Immunology" (R. Coico, editor de la serie), Wiley, última actualización de agosto de 2010.

PROTEÍNAS DE UNIÓN A MMP9

En la presente se divulgan proteínas de unión, por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se unen a la proteína metaloproteinasa-9 de la matriz (MMP9) (MMP9 también se conoce como gelatinasa-B). Las proteínas de unión divulgadas en la presente comprenden generalmente una cadena pesada de inmunoglobulina (Ig) (o un fragmento funcional de la misma) y una cadena ligera de Ig (o un fragmento funcional de la misma).

También se divulgan proteínas de unión a MMP9 que se unen específicamente a MMP9 y no a otras metaloproteinasas de la matriz como MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13. Tales proteínas de unión a MMP9 específicas, por lo tanto, generalmente no son significativa o detectablemente reactivas de manera cruzada con metaloproteinasas de la matriz que no son MMP9. Las proteínas que se unen a MMP9 que se unen a MMP9 específicamente encuentran uso en aplicaciones en las que es necesario o deseable para obtener una modulación específica (por ejemplo inhibición) de MMP9, por ejemplo, sin afectar directamente la actividad de otras metaloproteinasas de la matriz.

Además, se divulga un anticuerpo anti-MMP9 que es un inhibidor de la actividad de MMP9, y puede ser un inhibidor específico de MMP9. En particular, las proteínas de unión a MMP9 divulgadas en la presente serán útiles para la inhibición de MMP9 a la vez que permiten la función normal de otras metaloproteinasas de la matriz relacionadas. "Un inhibidor de MMP" o "inhibidor de la actividad de MMP9" puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que inhibe directa o indirectamente la actividad de MMP9, incluyendo, pero no limitado a, el procesamiento enzimático, inhibición de la acción de MMP9 sobre su sustrato (por ejemplo, inhibiendo la unión al sustrato, la escisión del sustrato, y similares), y similares.

Se divulgan además proteínas de unión a MMP9 que se unen específicamente a MMP9 no de ratón, como MMP9 humana, MMP9 de mono Cynomolgus, y MMP9 de rata.

Se divulgan además proteínas de unión a MMP9 (por ejemplo, anticuerpos anti-MMP9 y fragmentos funcionales de los mismos) que actúan como inhibidores no competitivos. Un "inhibidor no competitivo" se refiere a un inhibidor que se une en un sitio alejado del sitio de unión al sustrato de una enzima, y por tanto puede unirse a la enzima y efectuar la actividad inhibidora independientemente de si la enzima está o no unida a su sustrato. Dichos inhibidores no competitivos pueden, por ejemplo, proporcionar un nivel de inhibición que puede ser sustancialmente independiente de la concentración de sustrato.

Las proteínas de unión a MMP9 (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos) divulgadas en la presente incluyen aquellas que se unen a MMP9, particularmente MMP9 humana, y que tienen un polipéptido de cadena pesada (o fragmento funcional del mismo) que tiene por lo menos aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 95% o más de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido de cadena pesada divulgado en la presente.

Las proteínas de unión a MMP9 (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos) divulgadas en la presente incluyen aquellas que se unen a MMP9, particularmente MMP9 humana, y que tienen un polipéptido de cadena ligera (o fragmento funcional del mismo) que tiene por lo menos aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 95% o más de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido de cadena pesada divulgado en la presente.

Las proteínas de unión a MMP9 (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos) divulgadas en la presente incluyen aquellas que se unen a MMP9, particularmente MMP9 humana, y que tienen un polipéptido de cadena pesada (o fragmento funcional del mismo) que tiene la regiones determinantes de la complementariedad ("CDR") de polipéptido de cadena pesada y las CDR de un polipéptido de cadena ligera (o fragmento funcional del mismo) como se divulga en la presente.

"Homología" o "identidad" o "similitud" como se usa en la presente en el contexto de ácidos nucleicos y polipéptidos se refiere a la relación entre dos polipéptidos o dos moléculas de ácido nucleico en base a una alineación de las secuencias de aminoácidos o secuencias de ácidos nucleicos, respectivamente. La homología y la identidad pueden determinarse cada una comparando una posición en cada secuencia que puede alinearse con fines de comparación. Cuando una posición equivalente en las secuencias comparadas está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esa posición; cuando el sitio equivalente está ocupado por el mismo residuo de aminoácido o uno similar (por ejemplo, similar en naturaleza estética y/o electrónica), entonces las moléculas pueden denominarse homólogas (similares) en esa posición. La expresión como un porcentaje de homología/similitud o identidad se refiere a una función del número de aminoácidos idénticos o similares en las posiciones compartidas por las secuencias comparadas. Al comparar dos secuencias, la ausencia de residuos (aminoácidos o ácidos nucleicos) o la presencia de residuos extra también disminuye la identidad y la homología/similitud.

Como se usa en la presente, "identidad" significa el porcentaje de residuos de nucleótidos o aminoácidos idénticos en las posiciones correspondientes en dos o más secuencias cuando las secuencias están alineadas para maximizar la coincidencia de secuencias, es decir, teniendo en cuenta los huecos e inserciones. Las secuencias generalmente están alineadas para una correspondencia máxima sobre una región designada, por ejemplo, una región de por lo menos aproximadamente 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o más aminoácidos o nucleótidos de longitud, y puede ser de hasta la longitud total del aminoácido o nucleótido de referencia. Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un programa informático, se designan las coordenadas de la subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencias calcula luego el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia(s) de prueba en relación con la secuencia de referencia, en base a los parámetros de programa designados.

Ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 y Altschul et al. (1977) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, respectivamente. El software para realizar los análisis de BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov). Algoritmos ejemplares adicionales incluyen ClustalW (Higgins D., et al. (1994) Nucleic Acids Res 22: 4673-4680), disponible en www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html.

Las posiciones de residuos que no son idénticas pueden diferir por sustituciones de aminoácidos conservadoras. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas-de hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina.

La identidad de secuencia entre dos ácidos nucleicos también se puede describir en términos de hibridación de dos moléculas entre sí bajo condiciones rigurosas. Las condiciones de hibridación se seleccionan siguiendo métodos estándar en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda edición, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.). Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas es la hibridación a 50° C o más y 0,1 X SSC (cloruro sódico 15 mM/citrato de sodio 1,5 mM). Otro ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas es la incubación durante la noche a 42° C en una solución: 50% de formamida, 5 X SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 X solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón recortado desnaturalizado, seguido de lavado de los filtros en 0,1 X SSC a aproximadamente 65° C. Las condiciones de hibridación rigurosas son condiciones de hibridación que son por lo menos tan rigurosas como las condiciones representativas anteriores, donde se considera que las condiciones son por lo menos tan rigurosas si son por lo menos aproximadamente el 80% tan rigurosas, típicamente por lo menos el 90% tan rigurosas como las condiciones rigurosas específicas anteriores.

Por consiguiente, se divulgan, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que comprenden un polipéptido de la región variable de la cadena pesada que tiene por lo menos un 80%, 85%, 90%, 95% o más identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada descrita en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO: 1 o 5-8), y un polipéptido de cadena ligera

variable que tiene por lo menos un 80%, 85%, 90%, 95% o más identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de cadena ligera como se establece en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 o 9-12).

5 Los ejemplos de anticuerpos anti-MMP9 se describen con más detalle a continuación.

Anticuerpos

10 Las proteínas de unión a MMP9 de la presente invención son anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos. Como se usa en la presente, el término "anticuerpo" significa un agente de unión a polipéptido aislado o recombinante que comprende secuencias de péptidos (por ejemplo, Secuencias de la región variable) que se unen específicamente a un epítipo antigénico. El término se usa en su sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, nanocuerpos, diacuerpos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos incluyendo, pero no limitados a, Fv, scFv, Fab, Fab' F(ab')₂ y Fab₂, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada. El término "anticuerpo humano" se refiere a anticuerpos que contienen secuencias de origen humano, excepto por posibles regiones CDR no humanas, y no implica que esté presente la estructura completa de una molécula de inmunoglobulina, solo que el anticuerpo tiene un efecto inmunogénico mínimo en un humano (es decir, no induce la producción de anticuerpos por sí mismo).

25 Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, la región de unión al antígeno o variable de un anticuerpo de longitud completa. Tales fragmentos de anticuerpo también pueden ser referidos en la presente "fragmentos funcionales" o "fragmentos de unión al antígeno". Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata et al. (1995) Protein Eng. 8(10): 1057-1062); moléculas de anticuerpos de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento "Fc" residual. una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y aún es capaz de reticular el antígeno.

35 "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión al antígeno. Esta región consiste 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 regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o una región de V_H o V_L aislada que comprende sólo tres de las seis CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque generalmente a una menor afinidad a la que la hace el fragmento F_v completo.

45 El fragmento "Fab" también contiene, además de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH₁) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab se observaron originalmente después de la digestión con papaína de un anticuerpo. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en que los fragmentos F(ab') contienen varios residuos adicionales en el extremo terminal carboxi del dominio CH₁ de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Los fragmentos F(ab')₂ contienen dos fragmentos Fab unidos, cerca de la región bisagra, por enlaces disulfuro, y se observaron originalmente tras la digestión con pepsina de un anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente para los fragmentos Fab' en los que el residuo(s) de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

50 Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2.

60 Los fragmentos de anticuerpos de "Fv de cadena sencilla" o "sFv" o "scFv" comprenden los dominios V_H y V_L de anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptidos. En algunas realizaciones, el polipéptido de Fv comprende además un conector de polipéptido entre los dominios V_H y V_L, que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv, ver Pluckthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113 (Rosenburg and Moore eds.) Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión al antígeno, tales fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptidos (V_H-V_L). Al usar un conector 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, creando de este modo dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen adicionalmente, por ejemplo, en la EP 404.097; la WO 93/11161 y Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448.

Un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes de su entorno natural pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En algunas realizaciones, un anticuerpo aislado se purifica (1) a más del 95% en peso de anticuerpo como se determina por el método de Lowry, por ejemplo, más del 99% en peso, (2) a un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna, por ejemplo, mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante electroforesis en gel (por ejemplo, SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras o no reductoras, con detección por tinción con azul de Coomassie o plata. El término "anticuerpo aislado" incluye un anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. En ciertas realizaciones, el anticuerpo aislado se prepara mediante por lo menos un paso de purificación.

Como se usa en la presente, "inmunorreactivo" se refiere a anticuerpos o fragmentos de los mismos que son específicos para una secuencia de residuos de aminoácidos ("sitio de unión" o "epítipo"), pero si son reactivos de manera cruzada para otros péptidos/proteínas, no son tóxicos a niveles en los que se formulan para su administración para uso humano. "Epítipo" se refiere a la porción de un antígeno capaz de formar una interacción de unión con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo. Un epítipo puede ser una secuencia de péptidos lineal (es decir, "continua") o puede estar compuesta de secuencias de aminoácidos no contiguas (es decir, "conformacional" o "discontinua"). El término "se une preferentemente" significa que el agente de unión se une al sitio de unión con mayor afinidad que con la que se une a secuencias de aminoácidos no relacionadas.

Los anticuerpos anti-MMP9 pueden describirse en términos de las CDR de las cadenas pesada y ligera. Como se usa en la presente, se entiende que el término "CDR" o "región determinante de la complementariedad" significa los sitios de combinación de antígenos no contiguos encontrados dentro de la región variable de polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. Estas regiones particulares han sido descritas por Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991); por Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); y MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), donde las definiciones incluyen superposición o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Sin embargo, se pretende que la aplicación de cualquiera de las definiciones para referirse a una CDR de un anticuerpo o anticuerpos injertados o variantes de los mismos esté dentro del alcance del término como se define y se usa en la presente. Los residuos de aminoácidos que abarcan las CDR como se definen en cada una de las referencias citadas anteriormente se exponen a continuación en la Tabla 1 como una comparación.

Tabla 1: Definiciones de CDR

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
V_H CDR1	31-35	26-32	30-35
V_B CDR2	50-65	53-55	47-58
V_H CDR3	95-102	96-101	93-101
V_L CDR1	24-34	26-32	30-36
V_L CDR2	50-56	50-52	46-55
V_L CDR3	89-97	91-96	89-96
¹ La numeración de los residuos sigue la nomenclatura de Kabat et al., <i>Supra</i>			
² La numeración de los residuos sigue la nomenclatura de Chothia et al., <i>Supra</i>			
³ La numeración de los residuos sigue la nomenclatura de MacCallum et al., <i>Supra</i>			

Como se usa en la presente, el término "marco" cuando se usa en referencia a una región variable de anticuerpo se entiende que significa todos los residuos de aminoácidos fuera de las regiones CDR dentro de la región variable de un anticuerpo. Un marco de región variable es generalmente una secuencia de aminoácidos discontinua entre aproximadamente 100-120 aminoácidos de longitud, pero se pretende que haga referencia solo a aquellos aminoácidos fuera de las CDR. Como se usa en la presente, el término "región marco" se entiende que significa cada dominio del marco que está separado por las CDR.

En algunas realizaciones, un anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de

una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata o conejo que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. Por tanto, las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos) son inmunoglobulinas quiméricas que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Las secuencias no humanas están localizadas principalmente en las regiones variables, particularmente en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). En algunas realizaciones, los residuos del marco Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las CDR o secuencias marco importadas. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las CDR se corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Para los propósitos de la presente divulgación, los anticuerpos humanizados también incluyen fragmentos de inmunoglobulinas, como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión al antígeno de anticuerpos.

El anticuerpo humanizado también puede comprender por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Ver, por ejemplo, Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-329; y Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596.

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él desde una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos son referidos a menudo como residuos "importados" o "donantes", que típicamente se obtienen de un dominio variable "importado" o "donante". Por ejemplo, la humanización puede realizarse esencialmente de acuerdo con el método de Winter y colaboradores, sustituyendo las CDR de roedor o las secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Ver, por ejemplo, Jones et al., *Supra*; Riechmann et al., *Supra* y Verhoeyen et al. (1988) *Science* 239:1534-1536. En consecuencia, tales anticuerpos "humanizados" incluyen anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En ciertas realizaciones, los anticuerpos humanizados son anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y opcionalmente algunos residuos de la región marco están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor (por ejemplo, anticuerpos monoclonales murinos).

Los anticuerpos humanos también pueden producirse, por ejemplo, usando bibliotecas de presentación de fagos. Hoogenboom et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581. Otros métodos para preparar anticuerpos monoclonales humanos se describen por Cole et al. (1985) "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, p. 77 y Boerner et al. (1991) *J. Immunol.* 147:86-95.

Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente. Tras el desafío inmunológico, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la reorganización de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al. (1992) *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg et al. (1994) *Nature* 368:856-859; Morrison (1994) *Nature* 368:812-813; Fishwald et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851; Neuberger (1996) *Nature Biotechnology* 14:826; y Lonberg et al. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93.

Los anticuerpos pueden madurarse por afinidad usando métodos conocidos de selección y/o mutagénesis como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, los anticuerpos madurados por afinidad tienen una afinidad que es cinco veces o más, diez veces o más, veinte veces o más, o treinta veces o más que la del anticuerpo de partida (generalmente murino, de conejo, de pollo, humanizado o humano) a partir del cual se prepara el anticuerpo madurado.

Un anticuerpo también puede ser un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos son monoclonales, y pueden ser anticuerpos humanos o humanizados que tienen especificidades de unión para por lo menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, las dos especificidades de unión diferentes pueden dirigirse a dos MMP diferentes, o a dos epítomos diferentes en una única MMP (por ejemplo, MMP9).

Un anticuerpo como se divulga en la presente también puede ser un inmunoconjugado. Tales inmunoconjugados comprenden un anticuerpo (por ejemplo, contra MMP9) conjugado con una segunda molécula, como una indicadora. Un inmunoconjugado puede comprender también un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico como un agente quimioterapéutico, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

Un anticuerpo que "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido particular es uno que se une a ese polipéptido o epítipo particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo de polipéptido. En algunas realizaciones, un anticuerpo de la presente divulgación se une específicamente a MMP9 humana con una constante de disociación (K_d) igual o menor que 100 nM, opcionalmente menor que 10 nM, opcionalmente menor que 1 nM, opcionalmente menor que 0,5 nM, opcionalmente inferior a 0,1 nM, opcionalmente menor que 0,01 nM, u opcionalmente menor que 0,005 nM; en la forma de anticuerpo monoclonal, scFv, Fab u otra forma de anticuerpo medida a una temperatura de aproximadamente 4° C, 25° C, 37° C o 42° C.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de la presente divulgación se une a uno o más sitios de procesamiento (por ejemplo, los sitios de escisión proteolítica) en MMP9, bloqueando de este modo efectivamente el procesamiento de la proenzima o preproenzima a la enzima catalíticamente activa, y reduciendo por tanto la actividad proteolítica de la MMP9.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación se une a MMP9 con una afinidad por lo menos 2 veces, por lo menos 5 veces, por lo menos 10 veces, por lo menos 25 veces, por lo menos 50 veces, por lo menos 100 veces, por lo menos 500 veces, o por lo menos 1000 veces mayor que su afinidad de unión para otra MMP. La afinidad de unión puede medirse por cualquier método conocido en la técnica y se puede expresar como, por ejemplo, constante asociada, constante disociada, constante de disociación (K_d), constante de equilibrio (K_{eq}) o cualquier término en la técnica.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación es un inhibidor no competitivo de la actividad catalítica de MMP9. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación se une dentro del dominio catalítico de MMP9. En realizaciones adicionales, un anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación se une fuera del dominio catalítico de MMP9.

Además, se divulgan anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que compiten con anticuerpos anti-MMP9 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos descritos en la presente para unirse a MMP9. Por tanto, se contemplan además anticuerpos anti-MMP9, y fragmentos funcionales de los mismos, que compiten para la unión con, por ejemplo, un anticuerpo que tiene un polipéptido de cadena pesada de cualquiera de las SEQ ID NO: 1 o 5-8, un polipéptido de cadena ligera de las SEQ ID NO: 2 o 9-12, o combinaciones de los mismos. Además, se divulga que el anticuerpo anti-MMP9, o fragmento funcional del mismo, compite por la unión a MMP9 humana con el anticuerpo descrito en la presente como AB0041.

Secuencia de MMP9

La secuencia de aminoácidos de la proteína MMP9 humana es la siguiente:

MSLWQPLVLV	LLVLGCCFAA	PRQRQSTLVL	FPGDLRTNLT	DRQLAEEYLY	50
RYGYTRVAEM	RGESKSLGPA	LLLLQKQLSL	PETGELDSAT	LKAMRTPRCG	100
VPDLGRFQTF	EGDLKWHHHN	ITYWIQNYSE	DLPRAVIDDA	FARAFALWSA	150
VTPLTFTRVY	SRDADIVIQF	GVAEHGDGYP	FDGKDGLLAH	AFPPGPGIQG	200
DAHFDDELW	SLGKGVVPT	RFGNADGAAC	HFPFIFEGRS	YSACTTDGRS	250
DGLPWCSTTA	NYDTDDRFGF	CPSERLYTRD	GNADGKPCQF	PFIFQGQSYS	300
ACTTDGRSDG	YRWCATTANY	DRDKLFGFCP	TRADSTVMGG	NSAGELCVFP	350
FTFLGKEYST	CTSEGRGDGR	LWCATTSNFD	SDKKWGFCPD	QGYSLFLVAA	400
HEFGHALGLD	HSSVPEALMY	PMYRFTEGPP	LHKDDVNGIR	HLYGPRPEPE	450
PRPPTTTTPQ	PTAPPTVCPT	GPPTVHPSER	PTAGPTGPPS	AGPTGPPTAG	500
PSTATTVPLS	PVDDACNVNI	FDAIAEIGNQ	LYLFKDGKYW	RFSEGRGSRP	550
QGPFLIADKW	PALPRKLDSD	FEEPLSKKLF	FFSGRQVWVY	TGASVLGPRR	600
LDKLGGLGADV	AQVTGALRSG	RGKMLLFSGR	RLWRFDVKAQ	MVDPRSASEV	650
DRMFGVPLD	THDVFYREK	AYFCQDRFYW	RVSSRSELNQ	VDQVGYYTYD	700
ILQCPED	(SEQ ID NO: 27)				

Los dominios de proteínas se muestran esquemáticamente en la Figura 3 y se indican a continuación:

Aminoácidos N°	Característica
1-19	Péptido señal
38-98	Dominio de unión a peptidoglicano
5 R98/C99	Sitio de escisión del propéptido (dependiente de la enzima de escisión)
112-445	Dominio de metaloproteínasa dependiente de Zn
223-271	Dominio de fibronectina tipo II (dominio de unión a gelatina)
281-329	Dominio de fibronectina tipo II (dominio de unión a gelatina)
10 340-388	Dominio de fibronectina tipo II (dominio de unión a gelatina)
400-411	Región de unión a Zn
521-565	Dominio similar a la hemopexina
567-608	Dominio similar a la hemopexina
15 613-659	Dominio similar a la hemopexina
661-704	Dominio similar a la hemopexina

La secuencia de aminoácidos de MMP9 humana de longitud completa madura (que es la secuencia de aminoácidos del propeptido de la SEQ ID NO: 27 sin el péptido señal) es:

```

PRQRQSTLVL FPGDLRTNLT DRQLAEEYLY RYGYTRVAEM RGESKSLGPA
LLLLQKQLSL PETGELDSAT LKAMRTPRCG VPDLGRFQTF EGDWKWHHHN
25 ITYWIQNYSE DLPRVIDDA FARAFALWSA VTPLTFTRVY SRDADIVIQF
GVAEHGDGYP FDGKDGLLAH AFPPGPGIQG DAHFDDDELW SLGKGVVVP
RFGNADGAAC HFPFIFEGRS YSACTTDGRS DGLPWCSTTA NYDTDDRFGF
CPSERLYTRD GNADGKPCQF PFIFQGSYS ACTTDGRSDG YRWCATTANY
30 DRDKLFGFCP TRADSTVMGG NSAGELCVFP FTFLGKEYST CTSEGRGDGR
LWCATTSNFD SDKKWGFCPD QGYSLFLVAA HEFGHALGLD HSSVPEALMY
PMYRFTEGPP LHKDDVNGIR HLYGPRPEPE PRPPTTTTPQ PTAPPTVCPT
GPPTVHPSER PTAGPTGPPS AGPTGPPTAG PSTATTVPLS PVDDACNVNI
35 FDAIAEIGNQ LYLFDKGKYW RFSEGRGSRP QGPFLIADKW PALPRKLDSV
FEEPLSKKLF FFSGRQVWVY TGASVLGPRR LDKLGLGADV AQVTGALRSG
RGKMLLFSGR RLWRFDVKAQ MVDPRSASEV DRMFPGVPLD THDVFQYREK
AYFCQDRFYW RVSSRSELNQ VDQVGVTYD ILQCPED (SEQ ID NO:28)

```

donde la secuencia de aminoácidos del péptido señal es MSLWQPLVLV LLVLGCCFAA (SEQ ID NO: 29).

En la presente se divulgan proteínas de unión a MMP9 que se unen a cualquier porción de MMP9, por ejemplo, MMP9 humana, con proteínas de unión a MMP9 que se unen preferencialmente a MMP9 en relación con otras MMP que son de particular interés.

Los anticuerpos anti-MMP9, y fragmentos funcionales de los mismos, pueden generarse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. A continuación se proporcionan ejemplos de anticuerpos anti-MMP9. (Los ejemplos que no están abarcados por las reivindicaciones se dan solo con fines comparativos).

Anti-MMP9 monoclonal de ratón

Se obtuvo un anticuerpo monoclonal de ratón para MMP9 humana como se describe en el Ejemplo 1. Este anticuerpo contiene una cadena pesada de IgG2b de ratón y una cadena ligera kappa de ratón, y se denota AB0041.

La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de AB0041 es la siguiente:

MAVLVLFLCLVAFPSCVLSQVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLLSYGVHW
 VRQPPGKGLEWLGVWITGGTTNYSALMSRLSISKDDSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYY
 5 CARYYYGMDYWGQGTSTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGCGDITGSSVTLGCLVKGYFPESVTV
 TWNSGSLSSSVHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDKKLEPSGPIS
 10 TINPCPPCKECKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMISLTPKVTCVVVDVSEDDPDVRISWF
 VNNVEVHTAQTTQTHREDYNSTIRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKIKG
 15 LVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSGDSY
 FIYSKLDIKTSKWEKTD SFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK (SEQ ID NO:1)

La secuencia de señal está subrayada y la secuencia de la región constante de IgG2b se presenta en cursiva.

La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de AB0041 es la siguiente:

25 MESQIQVFVFVFLWLSGVDGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVRNTVA
 WYQQKTGQSPKLLIYSSSYRNTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYFCQQHYIT
 PYTFGGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQN
 30 GVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID
 NO:2)

La secuencia de la señal está subrayada y la secuencia de la región constante kappa se presenta en cursiva.

La siguiente secuencia de aminoácidos comprende las regiones marco y las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de la cadena pesada de IgG2b de AB0041 (con las CDR subrayadas):

40 QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLLSYGVHWVRQPPGKGLEWLGVWITGGTTN
 45 YNSALMSRLSISKDDSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCARYYYGMDYWGQGTSTVTVSS
 (SEQ ID NO:3)

La siguiente secuencia de aminoácidos comprende las regiones marco y las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable de la cadena ligera kappa de AB0041 (con las CDR subrayadas):

50 DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVRNTVAWYQQKTGQSPKLLIYSSSYRNTGV
 55 PDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYFCQQHYITPYTFGGGGTKLEIK (SEQ ID NO:4)

Variantes de cadena pesada

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de AB0041 se modificaron por separado, alterando las secuencias de la región marco en las regiones variables de la cadena pesada y ligera. El efecto de estas alteraciones de secuencia fue agotar el anticuerpo de epítopos de células T humanas, reduciendo o anulando de este modo su inmunogenicidad en humanos (Antitope, Babraham, Reino Unido).

Se construyeron cuatro variantes de cadena pesada, en un fondo de cadena pesada de IgG4 humana que contiene un cambio de aminoácido S241P que estabiliza el dominio de bisagra (Angal et al. (1993) Molec. Immunol,

30:105-108), y se denotan VH1, VH2, VH3 y VH4. Las secuencias de aminoácidos de sus regiones marco y CDR son las siguientes:

VH1

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLLSYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWTG
GTTNYSALMSRLTISKDDSKSTVYLKMNSLKTEDTAIYYCARYYYGMDYWGQGTSV
TVSS (SEQ ID NO:5)

VH2

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLLSYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWTG
GTTNYSALMSRLTISKDDSKNTVYLKMNSLKTEDTAIYYCARYYYGMDYWGQGTLV
TVSS (SEQ ID NO:6)

VH3

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLLSYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWTG
GTTNYSALMSRFTISKDDSKNTVYLKMNSLKTEDTAIYYCARYYYGMDYWGQGTLV
TVSS (SEQ ID NO:7)

VH4

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLLSYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWTG
GTTNYSALMSRFTISKDDSKNTLYLKMNSLKTEDTAIYYCARYYYGMDYWGQGTLV
TVSS (SEQ ID NO:8)

La Figura 1 muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesadas humanizadas e indica las diferencias en las secuencias de aminoácidos en las regiones marco entre las cuatro variantes.

Variantes de cadena ligera

Se construyeron cuatro variantes de cadena ligera, en un fondo de cadena kappa humana, y se denotan Vk1, Vk2, Vk3 y Vk4. Las secuencias de aminoácidos de sus regiones marco y CDR son las siguientes:

Vk1

DIVMTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQDVRNTVAWYQQKTGKAPKLLIYSSSYR
NTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYFCQQHYITPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID
NO:9)

Vk2

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVRNTVAWYQQKPGKAPKLLIYSSSYR
NTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYFCQQHYITPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID
NO:10)

Vk3

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVRNTVAWYQQKPGKAPKLLIYSSSYR
 5 NTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYFCQQHYITPYTFGGGGTKVEIK (SEQ ID
 NO:11)

10 **Vk4**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVRNTVAWYQQKPGKAPKLLIYSSSYR
 15 NTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYITPYTFGGGGTKVEIK (SEQ ID
 NO:12)

20 La Figura 2 muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas ligeras humanizadas e indica las diferencias en las secuencias de aminoácidos en las regiones marco entre las cuatro variantes.

25 Las cadenas pesada y ligera humanizadas se combinan en todas las combinaciones posibles por parejas para generar una serie de anticuerpos anti-MMP9 humanizados funcionales.

30 También se proporcionan secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada adicionales que tienen un 75% o más, un 80% o más, un 90% o más, un 95% o más, o un 99% o más de homología con las secuencias de la región variable de cadena pesada divulgadas en la presente. Además, también se proporcionan secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera adicionales que tienen un 75% o más, un 80% o más, un 90% o más, un 95% o más, o un 99% o más de homología con las secuencias de la región variable de cadena ligera divulgadas en la presente.

35 También se proporcionan secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada adicionales que tienen un 75% o más, un 80% o más, un 90% o más, un 95% o más, o un 99% o más de identidad de secuencia con las secuencias de la región variable de cadena pesada divulgadas en la presente. Además, también se proporcionan secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera adicionales que tienen un 75% o más, un 80% o más, un 90% o más, un 95% o más, o un 99% o más de identidad de secuencia con las secuencias de la región variable de cadena ligera divulgadas en la presente.

40 **Regiones determinantes de la complementariedad (CDR)**

Las CDR de la cadena pesada de un anticuerpo anti-MMP9 como se divulga en la presente tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

45 CDR1: GFSLLSYGVH (SEQ ID NO:13)
 CDR2: VIWTGGTTNYSALMS (SEQ ID NO:14)
 CDR3: YYYGMDY (SEQ ID NO: 15)

50 Las CDR de la cadena ligera de un anticuerpo anti-MMP9 como se divulga en la presente tienen las siguientes secuencias de aminoácidos:

55 CDR1: KASQDVRNTVA (SEQ ID NO:16)
 CDR2: SSSYRNT (SEQ ID NO:17)
 CDR3: QQHYITPYT (SEQ ID NO:18)

Ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-MMP9

60 Además, se divulgan ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-MMP9 y fragmentos funcionales de los mismos. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un polinucleótido (ácido nucleico) aislado que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno como se describe en la presente, vectores que contienen tales polinucleótidos, y células huésped y sistemas de expresión para transcribir y traducir tales polinucleótidos en polipéptidos.

65 Se contemplan además constructos en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o expresión que comprenden por lo menos un polinucleótido como anteriormente.

Se divulga además una célula huésped recombinante que comprende uno o más constructos como los anteriores, así como los métodos de producción del anticuerpo o fragmentos de unión al antígeno del mismo descritos en la presente, tal método comprende la expresión de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de cadena pesada y un polipéptido de cadena ligera (en la misma o diferentes células huésped, y del misma o diferentes constructos) en una célula huésped de recombinación. La expresión puede lograrse mediante el cultivo bajo condiciones apropiadas de células huésped recombinantes que contienen el ácido nucleico. Después de la producción por expresión, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno puede aislarse y/o purificarse usando cualquier técnica adecuada, y luego usarse como sea apropiado.

Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de diferentes células huésped son bien conocidos. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamíferos, levaduras y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de cría de hámster, células de melanoma de ratón NSO y muchas otras. Un huésped bacteriano común es *E. coli*.

Pueden elegirse o construirse vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, que incluyen secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y/u otras secuencias, operativamente enlazadas como sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, virus por ejemplo fago, o fagémido, como sea apropiado. Para detalles adicionales, consultar, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª edición, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo en la preparación de constructos de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen con detalle en Short Protocols in Molecular Biology, segunda edición, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992.

El ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés se integra en el genoma de la célula huésped o puede mantenerse como un elemento episomal estable o transitorio.

Puede usarse cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de expresión - secuencias que controlan la expresión de una secuencia de ADN enlazada operativamente a ella - en estos vectores para expresar las secuencias de ADN. Por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés puede enlazarse operativamente a un promotor, y proporcionarse en un constructo de expresión para su uso en métodos de producción de proteínas de MMP9 recombinantes o porciones de las mismas.

Los expertos en la técnica saben que los ácidos nucleicos que codifican las cadenas de anticuerpos divulgados en la presente pueden sintetizarse usando conocimiento y procedimientos estándar en biología molecular.

Los ejemplos de secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera divulgadas en la presente son los siguientes:

VH1: CAGGTGCAGC TGCAGGAATC CGGCCCTGGC CTGGTCAAGC CCTCCGAGAC

ACTGTCCCTG ACCTGCACCG TGTCCGGCTT CTCCCTGCTG TCCTACGGCG

TGCACTGGGT CCGACAGCCT CCAGGGAAGG GCCTGGAATG GCTGGGCGTG

ATCTGGACCG GCGGCACCAC CAACTACAAC TCCGCCCTGA TGTCCCGGCT

GACCATCTCC AAGGACGACT CCAAGTCCAC CGTGTACCTG AAGATGAACT

CCCTGAAAAC CGAGGACACC GCCATCTACT ACTGCGCCCG GTACTACTAC

GGCATGGACT ACTGGGGCCA GGGCACCTCC GTGACCGTGT CCTCA (SEQ ID NO:19)

VH2: CAGGTGCAGC TGCAGGAATC CGGCCCTGGC CTGGTCAAGC CCTCCGAGAC
 ACTGTCCCTG ACCTGCACCG TGTCCGGCTT CTCCCTGCTG TCCTACGGCG
 5 TGCACTGGGT CCGACAGCCT CCAGGCAAAG GCCTGGAATG GCTGGGCGTG
 ATCTGGACCG GCGGCACCAC CAACTACAAC TCCGCCCTGA TGTCCCGGCT
 10 GACCATCTCC AAGGACGACT CCAAGAACAC CGTGTACCTG AAGATGAACT
 CCCTGAAAAC CGAGGACACC GCCATCTACT ACTGCGCCCG GTACTACTAC
 GGCATGGACT ACTGGGGCCA GGGCACCCTG GTCACCGTGT CCTCA (SEQ ID NO:20)

VH3: CAGGTGCAGC TGCAGGAATC CGGCCCTGGC CTGGTCAAGC CCTCCGAGAC
 ACTGTCCCTG ACCTGCACCG TGTCCGGCTT CTCCCTGCTG TCCTACGGCG
 20 TGCACTGGGT CCGACAGCCT CCAGGCAAAG GCCTGGAATG GCTGGGCGTG
 ATCTGGACCG GCGGCACCAC CAACTACAAC TCCGCCCTGA TGTCCCGGTT
 25 CACCATCTCC AAGGACGACT CCAAGAACAC CGTGTACCTG AAGATGAACT
 CCCTGAAAAC CGAGGACACC GCCATCTACT ACTGCGCCCG GTACTACTAC
 30 GGCATGGACT ACTGGGGCCA GGGCACCCTG GTCACCGTGT CCTCA (SEQ ID NO:21)

VH4: CAGGTGCAGC TGCAGGAATC CGGCCCTGGC CTGGTCAAGC
 35 CCTCCGAGAC ACTGTCCCTG ACCTGCACCG TGTCCGGCTT CTCCCTGCTG
 TCCTACGGCG TCACTGGGT CCGACAGCCT CCAGGCAAAG GCCTGGAATG
 GCTGGGCGTG ATCTGGACCG GCGGCACCAC CAACTACAAC TCCGCCCTGA
 40 TGTCCCGGTT CACCATCTCC AAGGACGACT CCAAGAACAC CCTGTACCTG
 AAGATGAACT CCCTGAAAAC CGAGGACACC GCCATCTACT ACTGCGCCCG
 45 GTACTACTAC GGCATGGACT ACTGGGGCCA GGGCACCCTG GTCACCGTGT CCTCA (SEQ
 ID NO:22)

Vk1: GACATCGTGA TGACCCAGTC CCCCAGCTTC CTGTCCGCCT
 CCGTGGGCGA CAGAGTGACC ATCACATGCA AGGCCTCTCA GGACGTGCGG
 AACACCGTGG CCTGGTATCA GCAGAAAACC GGCAAGGCCC CCAAGCTGCT
 55 GATCTACTCC TCCTCCTACC GGAACACCGG CGTGCCCGAC CGGTTTACCG
 GCTCTGGCTC CGGCACCGAC TTTACCCTGA CCATCAGCTC CCTGCAGGCC
 60 GAGGACGTGG CCGTGTACTT CTGCCAGCAG CACTACATCA CCCCCTACAC
 CTTTCGGCGGA GGCACCAAGG TGGAAATAAA A (SEQ ID NO:23)

Vk2: GACATCGTGA TGACCCAGTC CCCCTCCAGC CTGTCCGCCT CTGTGGGCGA
 CAGAGTGACC ATCACATGCA AGGCCTCTCA GGACGTGCGG AACACCGTGG
 5 CCTGGTATCA GCAGAAGCCC GGCAAGGCCC CCAAGCTGCT GATCTACTCC
 TCCTCCTACC GGAACACCGG CGTGCCCGAC CGGTTTACCG GCTCTGGCTC
 CGGCACCGAC TTTACCCTGA CCATCAGCTC CCTGCAGGCC GAGGACGTGG
 10 CCGTGTACTT CTGCCAGCAG CACTACATCA CCCCCTACAC CTTCGGCGGA
 GGCACCAAGG TGGAAATAAA A (SEQ ID NO:24)

Vk3: GACATCCAGA TGACCCAGTC CCCCTCCAGC CTGTCCGCCT CTGTGGGCGA
 CAGAGTGACC ATCACATGCA AGGCCTCCCA GGACGTGCGG AACACCGTGG
 20 CCTGGTATCA GCAGAAGCCC GGCAAGGCCC CCAAGCTGCT GATCTACTCC
 TCCTCCTACC GGAACACCGG CGTGCCCGAC CGGTTCTCTG GCTCTGGAAG
 25 CGGCACCGAC TTTACCCTGA CCATCAGCTC CCTGCAGGCC GAGGACGTGG
 CCGTGTACTT CTGCCAGCAG CACTACATCA CCCCCTACAC CTTCGGCGGA
 GGCACCAAGG TGGAAATAAA A (SEQ ID NO:25)

Vk4: GACATCCAGA TGACCCAGTC CCCCTCCAGC CTGTCCGCCT CTGTGGGCGA
 CAGAGTGACC ATCACATGCA AGGCCTCTCA GGACGTGCGG AACACCGTGG
 35 CCTGGTATCA GCAGAAGCCC GGCAAGGCCC CCAAGCTGCT GATCTACTCC
 TCCTCCTACC GGAACACCGG CGTGCCCGAC CGGTTCTCTG GCTCTGGAAG
 40 CGGCACCGAC TTTACCCTGA CCATCAGCTC CCTGCAGGCC GAGGACGTGG

CCGTGTACTA CTGCCAGCAG CACTACATCA CCCCCTACAC CTTCGGCGGA
 45 GGCACCAAGG TGGAAATAAA A (SEQ ID NO:26)

Debido a quela estructura de los anticuerpos, incluyendo la yuxtaposición de las CDR y las regiones marco en la región variable, la estructura de las regiones marco y la estructura de las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera, es bien conocida en la técnica, está bien establecido en la habilidad de la técnica obtener ácidos nucleicos relacionados que codifican anticuerpos anti-MMP9. Por consiguiente, también se divulgan polinucleótidos que comprenden secuencias de ácido nucleico tienen por lo menos un 75%, por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 98% y por lo menos un 99% de homología con cualquiera de las secuencias de nucleótidos divulgadas en la presente. Por consiguiente, también se divulgan polinucleótidos que comprenden secuencias de ácido nucleico que tienen por lo menos un 75%, por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 98% y por lo menos un 99% de identidad con cualquiera de las secuencias de nucleótidos divulgadas en la presente.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Las proteínas de unión a MMP9, así como el ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) que codifica las proteínas de unión a MMP9, pueden proporcionarse como una composición farmacéutica, por ejemplo, combinados con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones farmacéuticas son útiles para, por ejemplo, la administración a un sujeto *in vivo* o *ex vivo*, y para diagnosticar y/o tratar a un sujeto con las proteínas de unión a MMP9.

Los portadores farmacéuticamente aceptables son fisiológicamente aceptables para el paciente administrado y retienen las propiedades terapéuticas de los anticuerpos o péptidos con los que se administra. Los portadores farmacéuticamente aceptables y sus formulaciones se describen en general en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (18ª edición, ed. A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA 1990). Un portador farmacéutico ejemplar es la solución salina fisiológica. Cada portador es "farmacéuticamente aceptable" en el sentido de que es compatible con los otros ingredientes de la formulación y no es sustancialmente perjudicial para el paciente.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para ser compatibles con una vía de administración particular, sistémica o local. Por tanto, las composiciones farmacéuticas incluyen portadores, diluyentes o excipientes adecuados para la administración por varias vías.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir aditivos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de aditivos incluyen, pero no están limitados a, un azúcar como manitol, sorbitol, glucosa, xilitol, trehalosa, sorbosa, sacarosa, galactosa, dextrano, dextrosa, fructosa, lactosa y mezclas de los mismos. Los aditivos farmacéuticamente aceptables pueden combinarse con portadores y/o excipientes farmacéuticamente aceptables como la dextrosa. Los aditivos también incluyen surfactantes como polisorbato 20 o polisorbato 80.

La formulación y los métodos de administración se adaptarán generalmente de acuerdo con el sitio y la enfermedad a tratar. Las formulaciones ejemplares incluyen, pero no están limitadas a, aquellas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo, administración intravenosa, intra-arterial, intramuscular o subcutánea.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen, por ejemplo, agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, solución de Hank, solución de Ringer, dextrosa/solución salina y soluciones de glucosa. Las formulaciones pueden contener sustancias auxiliares para aproximarse a condiciones fisiológicas como agentes de tamponamiento, agentes de ajuste de tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares. Los aditivos también pueden incluir ingredientes activos adicionales, como agentes bactericidas o estabilizantes. Por ejemplo, la solución puede contener acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán u oleato de trietanolamina. Formulaciones y métodos parenterales adicionales se describen en Bai (1997) J. Neuroimmunol. 80:65 75; Warren (1997) J. Neurol. Sci. 152:31 38; y Tonegawa (1997) J. Exp. Med. 186:507 515. La preparación parenteral se puede incluir en ampollas, jeringuillas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas para administración intradérmica o subcutánea pueden incluir un diluyente estéril como agua, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes como ácido ascórbico, glutatión o bisulfito de sodio; agentes quelantes como ácido etilendiaminotetraacético; tampones como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa.

Las composiciones farmacéuticas para inyección incluyen soluciones acuosas (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersión inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de surfactantes. Los agentes antibacterianos y antifúngicos incluyen, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal. Pueden incluirse en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes como manitol, sorbitol y cloruro de sodio. Las soluciones resultantes pueden envasarse para su uso tal como están, o pueden liofilizarse; la preparación liofilizada puede combinarse posteriormente con una solución estéril antes de la administración.

Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden contener un compuesto que estabiliza, aumenta o retrasa la absorción o la depuración. Tales compuestos incluyen, por ejemplo, carbohidratos como glucosa, sacarosa o dextranos; proteínas de bajo peso molecular; composiciones que reducen la depuración o hidrólisis de péptidos; o excipientes u otros estabilizantes y/o tampones. Los agentes que retrasan la absorción incluyen, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. También pueden usarse detergentes para estabilizar o para aumentar o disminuir la absorción de la composición farmacéutica, incluyendo los portadores liposomales. Para protegerlo de la digestión, el compuesto se puede complejar con una composición que lo haga resistente a la hidrólisis ácida y enzimática, o el compuesto se puede complejar en un portador apropiadamente resistente como un liposoma. Los medios para proteger compuestos de la digestión son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Fix (1996) Pharm Res. 13:1760 1764; Samanen (1996) J. Pharm. Pharmacol 48:119 135; y la Patente de Estados Unidos N° 5.391.377, que describen composiciones lipídicas para administración oral de agentes terapéuticos).

Las composiciones de la presente invención pueden combinarse con otras fracciones terapéuticas o fracciones de formación de imágenes/diagnóstico como se proporciona en la presente. Las fracciones terapéuticas y/o fracciones de formación de imágenes pueden proporcionarse como una composición separada, o como una fracción conjugada presente en una proteína de unión a MMP9.

Las formulaciones para administración *in vivo* son generalmente estériles. En una realización, las composiciones farmacéuticas están formuladas para estar libres de pirógenos de tal manera que sean aceptables para la administración a pacientes humanos.

Los expertos en la técnica conocerán varias otras composiciones y técnicas farmacéuticas para su preparación y uso a la luz de la presente divulgación. Para un listado detallado de las composiciones farmacológicas adecuadas y las técnicas administrativas asociadas, puede referirse a las enseñanzas detalladas en la presente, que pueden suplementarse adicionalmente con textos como Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20^a Ed. (Lippincott, Williams & Wilkins 2003).

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse en base a las características físicas del paciente/sujeto que necesita tratamiento, la vía de administración y similares. Tales pueden envasarse en un envase farmacéutico adecuado con etiquetas apropiadas para la distribución a hospitales y clínicas en donde la etiqueta es para la indicación de tratar un trastorno como se describe en la presente en un sujeto. Los medicamentos pueden envasarse en unidades individuales o múltiples. Las instrucciones para la dosificación y administración de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluirse con los envases y kits farmacéuticos descritos a continuación.

MÉTODOS DE USO

Las proteínas de unión a MMP9 de la presente divulgación pueden usarse en, por ejemplo, métodos de detección de MMP9 en una muestra, métodos de tratamiento (por ejemplo, como en métodos de inhibición de la angiogénesis), y métodos de diagnóstico. A continuación se describen ejemplos de métodos de uso.

Métodos de tratamiento

En la presente se divulgan métodos para tratar enfermedades y trastornos asociados con la actividad de MMP9. Las enfermedades y los trastornos incluyen, pero no están limitados a, tumores (por ejemplo, primarios o metastásicos) que se expresan o están dispuestos en un tejido que expresa MMP9.

Como se usa en la presente, "tratar" o "tratamiento" significa la estasis o un aplazamiento del desarrollo de los síntomas asociados a una enfermedad o trastorno descrito en la presente. Los términos incluyen, además, mejorar los síntomas no controlados o no deseados existentes, prevenir síntomas adicionales, y mejorar o prevenir las causas metabólicas subyacentes de los síntomas. Por tanto, los términos denotan que se ha conferido un resultado beneficioso a un sujeto mamífero con una enfermedad o síntoma, o con la posibilidad de desarrollar dicha enfermedad o síntoma. Se logra una respuesta cuando el paciente experimenta alivio parcial o total, o reducción de signos o síntomas de la enfermedad, e incluye específicamente, sin limitación, la prolongación de la supervivencia. Los tiempos de supervivencia sin progresión esperados se pueden medir en meses o años, dependiendo de los factores de pronóstico que incluyen el número de recaídas, etapa de la enfermedad, y otros factores.

Se contemplan además composiciones farmacéuticas para su uso en relación con tales métodos. Las composiciones pueden ser adecuadas para la administración local o sistémica por cualquier vía adecuada.

En general, las proteínas de unión a MMP9 se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz, por ejemplo, en una cantidad para efectuar la inhibición del crecimiento tumoral en un sujeto y/o para inhibir la metástasis.

Como se usa en la presente, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un agente terapéutico que cuando se administra solo o en combinación con otro agente terapéutico para un sujeto es eficaz para prevenir o mejorar la condición de la enfermedad o la progresión de la enfermedad. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere además a esa cantidad del compuesto suficiente para dar como resultado una mejora de los síntomas, por ejemplo, tratamiento, curación, prevención o mejora de la afección médica relevante, o un aumento en la tasa de tratamiento, curación, prevención o mejora de tales afecciones. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual administrado solo, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a ese ingrediente solo. Cuando se aplica a una combinación, una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos que dan como resultado el efecto terapéutico, ya sea administrados en combinación, en serie o simultáneamente. Por ejemplo, cuando se emplea la administración *in vivo* de un anticuerpo anti-MMP9, las cantidades de dosificación normales pueden variar de aproximadamente 10 ng/kg a hasta 100 mg/kg de peso corporal de mamífero o más por día, preferiblemente de aproximadamente 1 µg/kg/día a 50 mg/kg/día, opcionalmente de aproximadamente 100 µg/kg/día a 20 mg/kg/día, de 500 µg/kg/día a 10 mg/kg/día, o de 1

mg/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración.

El régimen de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad de la proteína de unión a MMP9, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con la composición particular empleada, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y el historial médico anterior del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Un practicante clínico con experiencia ordinaria en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz (ED₅₀) de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario puede comenzar las dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles más bajos que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta lograr el efecto deseado.

Como se usa en la presente, el término "sujeto" significa sujetos mamíferos. Los sujetos ejemplares incluyen, pero no están limitados a, humanos, monos, perros, gatos, ratones, ratas, vacas, caballos, cabras y ovejas. En algunas realizaciones, el sujeto tiene cáncer y puede tratarse con el agente de la presente invención como se describe a continuación.

Si es necesario, para tratamientos contra el cáncer, los métodos como se divulgan en la presente pueden incluir además la eliminación quirúrgica del cáncer y/o la administración de un agente o tratamiento anticanceroso, además de una proteína de unión a MMP9. La administración de dicho agente o tratamiento anticanceroso puede ser concurrente con la administración de las composiciones divulgadas en la presente.

Métodos de detección de MMP9

Además, se contemplan métodos para detectar MMP9 en un sujeto, por ejemplo, para detectar tumor o tejido asociado a tumor que expresa MMP9. Por tanto, se proporcionan métodos para diagnosticar, monitorizar, estadificar o detectar un tumor que tiene actividad de MMP9.

Las muestras de un individuo que se sospecha que tiene un tumor asociado con la expresión de MMP9 pueden recogerse y analizarse detectando la presencia o ausencia de unión de una proteína de unión a MMP9. Este análisis puede realizarse antes del inicio del tratamiento usando una proteína de unión a MMP9 como se describe en la presente, o puede hacerse como parte de la monitorización del progreso del tratamiento del cáncer. Dicho análisis de diagnóstico puede realizarse usando cualquier muestra, incluyendo pero no limitado a, tejidos, células aisladas de tales tejidos y similares. Las muestras de tejido incluyen, por ejemplo, secciones de tejido fijadas con formalina o congeladas.

Se empleará cualquier método adecuado para la detección y análisis de MMP9. Se pueden adaptar varias técnicas de ensayo de diagnóstico conocidas en la técnica con dicho propósito, como ensayos de unión competitiva, ensayos en sándwich directos o indirectos y ensayos de inmunoprecipitación realizados en fases heterogéneas u homogéneas.

Las proteínas de unión a MMP9 para su uso en métodos de detección pueden marcarse con una fracción detectable. La fracción detectable produce directa o indirectamente una señal detectable. Por ejemplo, la fracción detectable puede ser cualquiera de los descritos en la presente como, por ejemplo, un radioisótopo, como ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S o ¹²⁵I, un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, como el isotiocianato de fluoresceína (FITC), rojo Texas, cianina, fotocian, rodamina o luciferina, o una enzima como fosfatasa alcalina, β-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante.

La detección puede lograrse poniendo en contacto una muestra bajo condiciones adecuadas para la unión de la proteína de unión a MMP9 a MMP9, y la evaluación de la presencia (por ejemplo, nivel) o ausencia de complejos de proteína de unión a MMP9-MMP9. Un nivel de MMP9 en la muestra en comparación con un nivel de una muestra de referencia puede indicar la presencia de un tumor o tejidos asociados a tumores que tienen actividad de MMP9. La muestra de referencia puede ser una muestra tomada del sujeto en un punto temporal anterior o una muestra de otro individuo.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación de anticuerpos contra MMP-9 humana.

La proteína de MMP9 humana de longitud completa sin un péptido señal, que es la SEQ ID NO: 28, se usó para inmunizar ratones. Se fusionaron células de bazo de ratones inmunizados con células de mieloma para generar una biblioteca de hibridomas. Se prepararon cultivos monoclonales y se seleccionaron para identificar cultivos que

expresan un anticuerpo monoclonal anti-MMP9.

El anticuerpo (AB0041) se purificó a partir de uno de los cultivos y se caracterizó. El anticuerpo contenía una cadena pesada de IgG2b y una cadena ligera kappa. La caracterización incluyó pruebas para la unión de AB0041 con otras MMP humanas y a las proteínas de MMP9 de otras especies, incluyendo mono cynomolgus, rata y ratón. Se descubrió que el anticuerpo AB0041 se unía fuertemente a MMP9 humano y de cynomolgus, que se unía menos fuertemente a MMP9 de rata, y que no se unía a MMP9 murino o a muchas de las metaloproteinasas de la matriz no MMP humanas.

Tabla 2. Reactividad cruzada de AB0041 y AB0045.

MMP probada	Constante de disociación (Kd)	
	AB0045	AB0041
MMP1 humana	> 100 nM	> 100 nM
MMP2 humana	> 100 nM	> 100 nM
MMP2 de ratón	> 100 nM	> 100 nM
MMP3 humana	> 100 nM	> 100 nM
MMP7 humana	> 100 nM	> 100 nM
MMP8 humana	> 100 nM	> 100 nM
MMP9 humana	0.168 ± 0.117 nM	0.133 ± 0.030 nM
MMP9 de mono Cynomolgus	0.082 ± 0.022 nM	0.145 ± 0.16 nM
MMP9 de ratón	> 100 nM	> 100 nM
MMP9 de rata	0.311 ± 0.017 nM	0.332 ± 0.022 nM
MMP10 humana	> 100 nM	> 100 nM
MMP12 humana	> 100 nM	> 100 nM
MMP13 humana	> 100 nM	> 100 nM

La caracterización adicional incluyó el ensayo de la unión del anticuerpo a MMP9 de ratón en el que ciertos aminoácidos se alteraron para corresponderse más estrechamente a la secuencia de MMP9 humana. Además, la proteína de MMP9 humana se mutagenizó, y se probaron los varios mutantes para determinar su capacidad para unirse al anticuerpo, para determinar los aminoácidos importantes para la unión del anticuerpo y definir de este modo el epítipo terapéutico. Este análisis identificó un residuo de arginina en la posición 162 de la secuencia de aminoácidos de MMP9 (R162) como importante para la unión del anticuerpo. Otros residuos de aminoácidos en MMP9 que son importantes para la unión del anticuerpo AB0041 incluyen E111, D113 e I198. La estructura cristalina reciente de MMP9 mostró que E111, D113, R162 y I198 se agruparon cerca entre ellos alrededor de un bolsillo de unión a iones de Ca²⁺ de MMP9. Sin estar atado a ninguna teoría científica específica, AB0041 puede unirse a la región en MMP9 en la que se encuentran estos residuos. Alternativamente, estos residuos de MMP9 pueden tener contacto directo con AB0041.

En un ensayo enzimático para MMP9, se descubrió que el anticuerpo AB0041 actúa como un inhibidor no competitivo.

Ejemplo 2: humanización de anticuerpos contra MMP9 humana

Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo AB0041 de ratón se alteraron en ciertas localizaciones en el marco (es decir, no CDR) de sus regiones variables para generar proteínas que son menos inmunogénicas en humanos. Estos cambios en la secuencia de aminoácidos se muestran en las Figuras 1 y 2. La reactividad cruzada del anticuerpo humanizado (denominado AB0045) se muestra en la Tabla 2 anterior.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de unión a MMP9 aislada,
 5 en donde la proteína de unión es un anticuerpo anti-metaloproteinasa 9 de la matriz (MMP9) o un fragmento de unión al antígeno del mismo, dicho anticuerpo o fragmento comprende:
 - un polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina o un fragmento de unión al antígeno del mismo que
 10 comprende las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 13-15, y
 - un polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina o un fragmento de unión al antígeno del mismo que
 comprende las CDR de la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 16-18.
2. La proteína de unión a MMP9 aislada de la reivindicación 1, en donde la proteína de unión a MMP9 se une al
 15 epítipo de MMP9 humana que comprende los residuos de aminoácidos R162, E111, D113, e I198.
3. La proteína de unión a MMP9 aislada de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el polipéptido de
 cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una secuencia de
 aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 3 y 5-8 y el polipéptido de cadena ligera de
 20 inmunoglobulina o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos
 seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 4 y 9-12.
4. La proteína de unión a MMP9 aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el polipéptido de cadena
 pesada de inmunoglobulina o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de
 25 la SEQ ID NO: 7 y el polipéptido de cadena ligera de inmunoglobulina o fragmento de unión al antígeno del mismo
 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.
5. La proteína de unión a MMP9 aislada de la reivindicación 1, en la que el polipéptido de cadena pesada o el
 fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que
 30 consiste de las SEQ ID NO: 1, 3 y 5-8.
6. La proteína de unión a MMP9 aislada de la reivindicación 1 o la reivindicación 5, en la que el polipéptido de
 cadena ligera o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos
 seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 2, 4 y 9-12.
7. La proteína de unión a MMP9 aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el polipéptido de cadena
 35 pesada es una IgG y/o en la que el polipéptido de cadena ligera es una cadena kappa.
8. Un ácido nucleico aislado, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica:
 - (a) la proteína de unión a MMP9 de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la proteína de unión a
 MMP9 es un anticuerpo anti-MMP9 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, o
 - (b) una proteína de unión a MMP9 que es un anticuerpo anti-MMP9 o un fragmento de unión al antígeno del
 mismo que tiene un polipéptido de cadena pesada o un fragmento de unión al antígeno del mismo que
 40 comprende las CDR de las SEQ ID NO: 13-15 y un polipéptido de cadena ligera o un fragmento de unión al
 antígeno del mismo que comprende las CDR de las SEQ ID NO: 16-18.
9. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 8(b), en el que el polipéptido de cadena pesada o el fragmento de
 unión al antígeno del mismo comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las
 45 SEQ ID NO: 1, 3 y 5-8 o el polipéptido de cadena ligera o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprende
 una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 2, 4 y 9-12.
10. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 8(b) o la reivindicación 9, en el que la secuencia de nucleótidos
 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 19-26.
11. El ácido nucleico aislado de cualquiera de las reivindicaciones 8(b)-10, en el que el polipéptido de cadena
 55 pesada o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7
 y el polipéptido de cadena ligera o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprende la secuencia de
 aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.
12. Un vector que comprende el ácido nucleico aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 8-11.
13. Una célula que comprende el vector de la reivindicación 12.
14. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión a MMP9 de cualquiera de las
 65 reivindicaciones 1-7, el vector de la reivindicación 12, o la célula de la reivindicación 13.

15. La proteína de unión a MMP9 aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para uso terapéutico.

5 16. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de unión a MMP9 de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en el tratamiento de un tumor.

17. Un método para detectar la expresión de MMP9, el método que comprendiendo:

10 poner en contacto una muestra de tejido obtenida de un sujeto con una proteína de unión a MMP9 de cualquiera de las reivindicaciones 1-7; y
detectar la presencia o ausencia de MMP9;

en donde la presencia de MMP9 en la muestra de tejido indica que la MMP9 se expresa en el tejido.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

Cadenas pesadas humanizadas anti-MMP9

AB0041	QVQLKESGPG	LVAPQSLSI	TCTVSGFSLL	SYGVHWVRQP	PGKGLEWLG
VH1	QVQLQESGPG	LVPSE ETLSL	TCTVSGFSLL	SYGVHWVRQP	PGKGLEWLG
VH2	QVQLQESGPG	LVPSE ETLSL	TCTVSGFSLL	SYGVHWVRQP	PGKGLEWLG
VH3	QVQLQESGPG	LVPSE ETLSL	TCTVSGFSLL	SYGVHWVRQP	PGKGLEWLG
VH4	QVQLQESGPG	LVPSE ETLSL	TCTVSGFSLL	SYGVHWVRQP	PGKGLEWLG
AB0041	IWTGGTTN	SALMSRLSIS	KDDSKSQVFL	KMNSLQTDDT	AIYYCARYY
VH1	IWTGGTTN	SALMSRLTIS	KDDSKSTVYL	KMNSLKTEDT	AIYYCARYY
VH2	IWTGGTTN	SALMSRLTIS	KDDSKNTVYL	KMNSLKTEDT	AIYYCARYY
VH3	IWTGGTTN	SALMSRFTIS	KDDSKNTVYL	KMNSLKTEDT	AIYYCARYY
VH4	IWTGGTTN	SALMSRFTIS	KDDSKNTLYL	KMNSLKTEDT	AIYYCARYY
AB0041	GMDYWGQGT	VTSS	(SEQ ID NO:3)		
VH1	GMDYWGQGT	VTSS	(SEQ ID NO:5)		
VH2	GMDYWGQGT	VTSS	(SEQ ID NO:6)		
VH3	GMDYWGQGT	VTSS	(SEQ ID NO:7)		
VH4	GMDYWGQGT	VTSS	(SEQ ID NO:8)		

FIGURA 2

Cadenas ligeras humanizadas Anti-MMP9

AB0041	DIVMTQSHKF	MSTSVGDRVS	ITCKASQDVR	NTVAWYQQKT	GQSPKLLIYS
Vk1	DIVMTQSPSF	LSASVGDRVT	ITCKASQDVR	NTVAWYQQKT	GKAPKLLIYS
Vk2	DIVMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCKASQDVR	NTVAWYQQKP	GKAPKLLIYS
Vk3	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCKASQDVR	NTVAWYQQKP	GKAPKLLIYS
Vk4	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCKASQDVR	NTVAWYQQKP	GKAPKLLIYS
AB0041	SSYRNTGVDP	RFTGSGSGTD	FTFTISSVQA	EDLAVYFCQQ	HYITPYTFGG
Vk1	SSYRNTGVDP	RFTGSGSGTD	FTLTISSLQA	EDVAVYFCQQ	HYITPYTFGG
Vk2	SSYRNTGVDP	RFTGSGSGTD	FTLTISSLQA	EDVAVYFCQQ	HYITPYTFGG
Vk3	SSYRNTGVDP	RFSGSGSGTD	FTLTISSLQA	EDVAVYFCQQ	HYITPYTFGG
Vk4	SSYRNTGVDP	RFSGSGSGTD	FTLTISSLQA	EDVAVYFCQQ	HYITPYTFGG
AB0041	GTKLEIK	(SEQ ID NO:4)			
Vk1	GTKVEIK	(SEQ ID NO:9)			
Vk2	GTKVEIK	(SEQ ID NO:10)			
Vk3	GTKVEIK	(SEQ ID NO:11)			
Vk4	GTKVEIK	(SEQ ID NO:12)			

FIGURA 3

