

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 209**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2014 PCT/EP2014/073377**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015 WO15063228**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2014 E 14795593 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3062817**

54 Título: **Bloqueo de IL-3 en lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple**

30 Prioridad:

31.10.2013 EP 13005166

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

02.06.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM REGENSBURG
(100.0%)
Franz-Josef-Strauss-Allee 11
93053 Regensburg, DE**

72 Inventor/es:

**MACK, MATTHIAS;
RENNER, KERSTIN y
BRÜHL, HILKE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

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

ES 2 764 209 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

Bloqueo de IL-3 en lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-IL-3, o fragmentos de unión a IL-3 de los mismos, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune que es lupus eritematoso sistémico, y a composiciones farmacéuticas que comprenden tal anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Las enfermedades autoinmunes surgen cuando el sistema inmune ataca inapropiadamente a sustancias o tejidos que normalmente están presentes en el cuerpo. Se conoce una gran cantidad de enfermedades autoinmunes. Los ejemplos incluyen diabetes mellitus tipo 1 (diabetes mellitus insulino dependiente), esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, enfermedad de Addison, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, lupus eritematoso sistémico (LES), y alergias.

De estas, el lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune sistémica (o enfermedad autoinmune del tejido conectivo) que puede afectar a cualquier parte del cuerpo. El ataque del sistema inmune a las células y tejidos del cuerpo provoca inflamación y daño tisular. El curso clínico del LES es variable y en la mayoría de los casos se caracteriza por periodos de remisiones y recaídas. El LES suele dañar el corazón, articulaciones, piel, pulmones, vasos sanguíneos, hígado, riñones, el sistema hematológico y el sistema nervioso. El LES afecta principalmente a mujeres con una relación mujer: hombre de 10:1. La prevalencia del LES es de 200-1500/1 millón y la incidencia es de 10-250/1 millón/año. La edad típica de inicio es de 16-55 años (65 % de los casos). Aunque se han descrito varios factores genéticos (por ejemplo, HLA-DR2/3, MFG-E8, IRF4, IRAK1, Stat4, OX40L, PD1, FcγRII, C1q, C4), la causa del LES es en gran medida desconocida. Aproximadamente el 75 % de los pacientes con LES desarrollan enfermedad renal y aproximadamente el 75 % de los pacientes con enfermedad renal tienen el tipo más grave de la clase III/IV de la OMS. El LES se puede diagnosticar, por ejemplo, utilizando los criterios desarrollados por el American College of Rheumatology (Arthritis Rheum. 1997;40(9):1725). No hay cura para el LES disponible en este momento.

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune en la que se dañan las cubiertas aislantes de las células nerviosas en el cerebro y la médula espinal. Este daño altera la capacidad de comunicación de partes del sistema nervioso, lo que da como resultado una amplia gama de signos y síntomas, incluidos problemas físicos, mentales y, a veces, psiquiátricos. Se cree que el mecanismo subyacente implica la destrucción de las células productoras de mielina por el sistema inmune. La EM afecta principalmente a mujeres en edad fértil y descendientes del norte de Europa. La EM se caracteriza por áreas multifocales de desmielinización con pérdida de oligodendrocitos y cicatrización astrogliar. La lesión axonal también es una característica destacada de la EM. La esclerosis múltiple es un diagnóstico clínico. Ciertos criterios (por ejemplo, los criterios de McDonald) se desarrollaron para el diagnóstico (Ann Neurol. 2011;69(2):292). Los hallazgos clínicos en solitario o en combinación con imágenes (IRM) se utilizan para demostrar una diseminación de las lesiones del sistema nervioso central (SNC) tanto en el espacio como en el tiempo. Aunque se ha encontrado que varios factores ambientales y genéticos están asociados con la EM, la causa de la EM es en gran medida desconocida. Actualmente, no existe una cura conocida para la esclerosis múltiple.

En ausencia de una opción de tratamiento específico eficaz, el LES y la EM se tratan principalmente mediante inmunosupresión general. El LES que afecta a órganos como el riñón (OMS III/IV), el pulmón o el SNC se trata principalmente con esteroides, ciclofosfamida, micofenolato, azatioprina, y otros inmunosupresores. Típicamente, menos del 60 % de los pacientes con LES con afectación de órganos (especialmente del riñón) responden a los tratamientos disponibles actualmente. Además, a menudo muestran recaídas después de la reducción de la inmunosupresión.

El tratamiento de la EM depende del patrón de la enfermedad. La esclerosis múltiple recurrente-remitente (EMRR) se trata con esteroides (para ataques agudos) y con agentes inmunomoduladores (por ejemplo, interferones, acetato de glatiramer, natalizumab, alemtuzumab, fingolimod, teriflunomida, ciclofosfamida, daclizumab) para disminuir las tasas de recaída y disminuir la acumulación de lesiones cerebrales. El tratamiento de las formas progresivas de EM (por ejemplo, EM progresiva secundaria (EMPS), EM progresiva primaria (EMPP)) es insuficiente e incluye esteroides, ciclofosfamida, metotrexato y mitoxantrona.

Aunque dichas opciones de tratamiento utilizadas para tratar el LES son solo modestamente eficaces, a menudo tienen efectos secundarios graves, tales como infecciones y desarrollo de tumores.

Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de opciones de tratamiento alternativas para el LES. En particular, existe la necesidad en la técnica de mejorar las opciones de tratamiento para el LES. Además, existe la necesidad en la técnica de opciones de tratamiento para el LES que tengan menos efectos secundarios y/o menos graves.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar opciones de tratamiento alternativas para el LES. Además, un objeto de la presente invención es proporcionar opciones de tratamiento mejoradas para el LES. Además, un objeto de la presente invención es proporcionar opciones de tratamiento para el LES que tengan menos efectos secundarios y/o menos graves. Además, un objeto de la presente invención es proporcionar opciones de tratamiento para LES que sean menos inmunosupresoras que las opciones de tratamiento conocidas de la técnica anterior. Además, un objeto de la presente invención es proporcionar opciones de tratamiento para LES que den lugar a menos infecciones durante el tratamiento que las opciones de tratamiento conocidas de la técnica anterior. Además, un objeto

de la presente invención es proporcionar opciones de tratamiento para LES que tengan un riesgo reducido de inducir tumores en comparación con las opciones de tratamiento conocidas de la técnica anterior. Además, un objeto de la presente invención es proporcionar opciones de tratamiento para LES que puedan combinarse fácilmente con otras opciones de tratamiento. Además, un objeto de la presente invención es proporcionar opciones de tratamiento para el LES a las que responde un mayor porcentaje de pacientes con LES con afectación de órganos (especialmente del riñón) que a los tratamientos conocidos de la técnica anterior. Además, un objeto de la presente invención es proporcionar opciones de tratamiento para LES que muestren una tasa reducida de recaídas después de la reducción de la inmunosupresión en comparación con las opciones de tratamiento conocidas de la técnica anterior. Los objetos de la presente invención se resuelven mediante un anticuerpo anti-IL-3, o un fragmento de unión a IL-3 del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune, que es lupus eritematoso sistémico (LES), de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

Las siguientes realizaciones son, cuando sea aplicable, realizaciones de cualquiera de las soluciones a los objetos de la presente invención. Además, las siguientes realizaciones pueden, siempre que esto no conduzca a contradicciones lógicas, combinarse sin restricciones. Por lo tanto, la presente divulgación abarcará, incluso si no se explica explícitamente a continuación, cualquier combinación factible de las siguientes realizaciones.

En una realización, dicha enfermedad autoinmune está caracterizada por un nivel elevado de IL-3 en plasma en comparación con un estado saludable.

Dicha enfermedad autoinmune es lupus eritematoso sistémico. Preferentemente, dicho lupus eritematoso sistémico está caracterizado por un nivel elevado de IL-3 en plasma en comparación con un estado saludable.

Preferentemente, dicho lupus eritematoso sistémico está caracterizado por un nivel elevado de expresión de IL-3 en comparación con un estado saludable.

En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3, se administra a un paciente que lo necesite. Preferentemente, dicho paciente es un mamífero, más preferentemente dicho paciente es un ratón, rata o ser humano, más preferentemente dicho paciente es un ser humano.

En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, es para su uso en un paciente que tiene un nivel plasmático elevado de IL-3 en comparación con un individuo sano. Preferentemente, dicho nivel plasmático de IL-3 se determina mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3 es un anticuerpo monoclonal, policlonal o quimérico, o una combinación de los mismos. En una realización, dicho fragmento de unión a IL-3 de dicho anticuerpo anti-IL-3 es un fragmento de un anticuerpo monoclonal, policlonal o quimérico, o una combinación de los mismos.

En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, no es inmunógeno en un sujeto humano.

En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3 es un anticuerpo humanizado. En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3 es un anticuerpo humano. En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3 es un anticuerpo sintético.

En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3 es del isotipo de anticuerpo IgG, IgA, IgM, IgD, o IgE. Preferentemente, dicho anticuerpo anti-IL-3 es del isotipo de anticuerpo IgG.

En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3 se obtiene por un procedimiento que comprende la etapa de inmunizar un animal con una proteína o péptido que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, o un fragmento inmunógeno de la misma, o un ácido nucleico o célula huésped que expresa dicha proteína o péptido o fragmento inmunógeno de los mismos, o que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 o un fragmento inmunógeno de la misma, o un ácido nucleico o célula huésped que expresa dicha proteína o péptido o fragmento inmunógeno de los mismos. Preferentemente, dicho anticuerpo anti-IL-3 se obtiene por un procedimiento que comprende la etapa de inmunizar un animal con un fragmento de IL-3 humana que comprende o que consiste en los residuos 17-133, preferentemente los residuos 21-133 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 6, preferentemente SEQ ID NO: 1. Preferentemente, dicho anticuerpo anti-IL-3 se obtiene por un procedimiento que comprende la etapa de inmunizar un animal con un fragmento de IL-3 humana que comprende o que consiste en

- a) residuos 12-15 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (SEQ ID NO: 2),
- b) residuos 29-50 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (SEQ ID NO: 3),
- c) los 18 aminoácidos más N-terminales de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 7, preferentemente SEQ ID NO: 4), o
- d) los 22 aminoácidos más C-terminales de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (SEQ ID NO: 5), más preferentemente b) o d).

Preferentemente, dicho fragmento de IL-3 humana tiene una longitud de al menos 100, más preferentemente al menos 80, más preferentemente al menos 50, más preferentemente al menos 40, más preferentemente al menos 30, más

- preferentemente al menos 22, más preferentemente al menos 20, más preferentemente al menos 10 aminoácidos. Mucho más preferentemente, dicho fragmento de IL-3 humana tiene una longitud de al menos 10 aminoácidos. Preferentemente, dicho fragmento de IL-3 humana tiene una longitud de hasta 100, más preferentemente hasta 80, más preferentemente hasta 50, más preferentemente hasta 40, más preferentemente hasta 30, más preferentemente hasta 22, más preferentemente hasta 20, más preferentemente hasta 10 aminoácidos. Mucho más preferentemente, dicho fragmento de IL-3 humana tiene una longitud de hasta 22 aminoácidos.
- En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3 se obtiene por un procedimiento que comprende la etapa de inmunizar un conejo, rata, ratón, pollo, cabra, cobaya, hámster, caballo, u oveja. En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3 se obtiene por un procedimiento que comprende la etapa de inmunizar un conejo. En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3 se obtiene por un procedimiento que comprende la etapa de inmunizar un ratón.
- En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, se une a la proteína IL-3 humana. En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, es específico para la proteína IL-3 humana. En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, no se une a proteínas IL-3 de otras especies además de seres humanos.
- En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, se une a IL-3, preferentemente a IL-3 humana, con una afinidad (K_D) de al menos 10^{-5} M, preferentemente al menos 10^{-6} M, más preferentemente al menos 10^{-7} M, más preferentemente al menos 10^{-8} M, más preferentemente al menos 10^{-9} M. En una realización preferida, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, se une a IL-3, preferentemente a IL-3 humana, con una afinidad (K_D) de al menos 10^{-7} M.
- En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, es capaz de evitar la unión de IL-3 a y/o la activación de su receptor tras la unión de dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, a IL-3. En una realización, la unión de dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, a IL-3 evita la unión de IL-3 a y/o la activación de su receptor. Preferentemente, dicho receptor es el receptor de interleucina-3. Preferentemente, dicha unión o falta de unión de IL-3 a su receptor se determina mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), más preferentemente mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando la cadena alfa del receptor de IL-3 recombinante, o determinando la unión de la IL-3 marcada, preferentemente IL-3 marcada con una etiqueta fluorescente o radiactiva, a células que expresan el receptor de IL-3, preferentemente por inmunofluorescencia o análisis de inmunotinción/citometría de flujo de células que expresan el receptor de IL-3. Preferentemente, dichas células que expresan el receptor de IL-3 se seleccionan del grupo que consiste en basófilos, células dendríticas plasmacitoides, monocitos y una línea celular (transfectada o no transfectada) que expresa el receptor de IL-3. Preferentemente, dicha unión o falta de unión de IL-3 a su receptor se determina mediante la medición de afinidad (K_D) mediante mediciones de resonancia por plasmón superficial. Preferentemente, dicha unión o falta de unión de IL-3 a su receptor se determina por medición de la afinidad (K_D) por citometría de flujo, ELISA basado en células o detección de radiactividad unida. Preferentemente, dicha capacidad o falta de IL-3 para activar su receptor se determina midiendo las respuestas celulares de las células positivas para el receptor de IL-3, más preferentemente determinando la proliferación inducida por IL-3 de células TF-1 o la activación inducida por IL-3 de basófilos.
- En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, no es capaz de agotar las células que expresan el receptor de IL-3, en el que, preferentemente, dichas células que expresan el receptor de IL-3 son basófilos y/o células dendríticas plasmacitoides (pDC).
- En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, es capaz de disminuir el nivel plasmático de IL-3 no unida en dicho paciente tras la administración de dicho anticuerpo o fragmento del mismo a dicho paciente.
- En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, se une a una porción de la secuencia de aminoácidos de IL-3 cuya porción consiste en
- residuos 12-15 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (SEQ ID NO: 2),
 - residuos 29-50 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (SEQ ID NO: 3),
 - los 18 aminoácidos más N-terminales de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 7, preferentemente SEQ ID NO: 4), o
 - los 22 aminoácidos más C-terminales de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (SEQ ID NO: 5), preferentemente b) o d).
- En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, se une a una porción del aminoácido IL-3 cuya porción consiste en los residuos 17-133, preferentemente los residuos 21-133 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 6, preferentemente SEQ ID NO: 1.
- En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, no se une a una porción del aminoácido de IL-3 cuya porción consiste en los residuos 1-16, preferentemente los residuos 1-20 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 6.

En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, se une a un epítipo dentro de la IL-3 humana cuyo epítipo es capaz de unirse a un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- 5 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems y
- 10 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

preferentemente a un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- 15 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems y
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems.

Preferentemente, dicha unión es unión específica.

20 En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, compite con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- 25 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

preferentemente con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- 30 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- 35 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems

en un ensayo de unión competitiva.

En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, se une a un epítipo dentro de una IL-3 humana que comprende o que consiste en una porción de la secuencia definida por

- a) residuos 12-15 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (SEQ ID NO: 2),
- 40 b) residuos 29-50 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (SEQ ID NO: 3),
- c) los 18 aminoácidos más N-terminales de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 7, preferentemente SEQ ID NO: 4), o
- d) los 22 aminoácidos más C-terminales de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (SEQ ID NO: 5) preferentemente b) o d).

45 En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, se une a un epítipo dentro de la secuencia de IL-3 humana que no se solapa con los 16, preferentemente 20, aminoácidos más N-terminales de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 6, preferentemente SEQ ID NO: 1.

50 En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, se une a un epítipo que se encuentra dentro de los residuos 17-133, preferentemente los residuos 21-133, de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 6, preferentemente SEQ ID NO: 1.

En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, se une a un epítipo dentro de una IL-3 humana cuyo epítipo comprende uno o varios de los aminoácidos S17, N18, D21, E22, T25, E43, M49, R94, P96, R108, F113, y E119 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana mostrada en la SEQ ID NO: 1 o la

SEQ ID NO: 6, preferentemente en la SEQ ID NO: 1.

En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3 se selecciona del grupo que consiste en

- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- 5 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- 10 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

preferentemente del grupo que consiste en

- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- 15 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

y/o dicho fragmento de unión a IL-3 de los mismos es un fragmento de unión a IL-3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- 20 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6;
- 25 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

preferentemente de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- 30 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems.

35 En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3 comprende una secuencia de aminoácidos de al menos un 90 %, preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 98 %, más preferentemente al menos un 99 % idéntica con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- 40 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- 45 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

preferentemente de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- 50 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems.

55 En una realización, dicho fragmento de unión a IL-3 de dicho anticuerpo anti-IL-3 comprende un fragmento de una secuencia de aminoácidos de al menos un 90 %, preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 98 %, más preferentemente al menos un 99 % idéntica con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo

seleccionado del grupo que consiste en

- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- 5 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

10 preferentemente de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- 15 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems.

En una realización, dicho fragmento de unión a IL-3 de dicho anticuerpo anti-IL-3 se une a IL-3 a través de una porción de la secuencia de dicho fragmento de unión a IL-3 que tiene la misma secuencia como una porción de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- 20 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6;
- 25 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

preferentemente de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- 30 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

35 o a través de una porción de la secuencia de dicho fragmento de unión a IL-3 que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos un 90 %, preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 98 %, más preferentemente al menos un 99 % idéntica a una porción de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- 40 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- 45 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

preferentemente de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- 50 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems.

En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3 consiste en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- 55 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;

- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6;
- 5 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

preferentemente de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- 10 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

15 o de una secuencia de aminoácidos de al menos un 90 %, preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 98 %, más preferentemente al menos un 99 % idéntica con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- 20 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- 25 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

preferentemente de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- 30 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems.

En una realización, dicho fragmento de unión a IL-3 de dicho anticuerpo anti-IL-3 es un fragmento de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- 35 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6;
- 40 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

preferentemente de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- 45 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

50 o es un fragmento de una secuencia de aminoácidos de al menos un 90 %, preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 98 %, más preferentemente al menos un 99 % idéntica con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- 55 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;

- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

5 preferentemente de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;

10 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems.

En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región V_H de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- 15 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6;

20 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

preferentemente de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- 25 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

30 o que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 98 %, más preferentemente al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región V_H de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- 35 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- 40 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

preferentemente de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- 45 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems.

En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región V_L de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- 50 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
- 55 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6;
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4;

- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

preferentemente de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- 5
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

10 o que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 98 %, más preferentemente al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región V_L de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- 15
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6;
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4;
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
- 20
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems,

preferentemente de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- 25
- anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-570;
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F14-746;
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F13-267;
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 F15-216;
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems; y
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems.

30 En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, es específica para IL-3. En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, no se une a interleucinas distintas de IL-3.

En una realización, dicha enfermedad autoinmune es lupus eritematoso sistémico, y dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, es capaz de reducir la infiltración celular en el riñón, reducir el daño agudo en el riñón, reducir el daño crónico en el riñón, reducir la deposición de inmunoglobulina en el riñón y reducir la fibrosis en el riñón en dicho paciente tras la administración de dicho anticuerpo, o fragmento del mismo, a dicho paciente.

35 En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, se administra por una ruta seleccionada del grupo que consiste en administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, tópica, oral, rectal e inhalación. En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, se administra por vía intravenosa, preferentemente por inyección, o por vía subcutánea, preferentemente por inyección.

40 En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, se administra diariamente, preferentemente una vez al día. En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, se administra una vez por semana. En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, se administra una vez cada dos semanas. En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, se administra mediante administración en bolo. En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, se administra durante hasta 5 días, preferentemente hasta 4 días, más preferentemente hasta 3 días, más preferentemente hasta 2 días, más preferentemente 1 día. En una realización, dicho anticuerpo anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, se administra durante al menos una semana, preferentemente al menos dos semanas, más preferentemente al menos tres semanas, más preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 8 semanas, más preferentemente al menos 12 semanas.

50 En una realización, simultáneamente con dicha administración de dicho anticuerpo anti-IL-3, o fragmento de unión a IL-3 del mismo, dicho paciente se somete a uno o más tratamientos adicionales para tratar el lupus eritematoso sistémico, en el que, preferentemente, dicho tratamiento consiste en la administración de uno o más inmunosupresores, preferentemente seleccionados del grupo que consiste en esteroides, ciclofosfamida, micofenolato y azatioprina. En una realización, simultáneamente con dicha administración de dicho anticuerpo anti-IL-3, o fragmento de unión a IL-3 del mismo, dicho paciente se somete a uno o más tratamientos adicionales para tratar la esclerosis múltiple, en la que, preferentemente, dicho tratamiento consiste en la administración de uno o más agentes

seleccionados del grupo que consiste en esteroides, ciclofosfamida, metotrexato, mitoxantrona y agentes inmunomoduladores seleccionados preferentemente del grupo que consiste en interferones, acetato de glatiramer, natalizumab, alemtuzumab, fingolimod, teriflunomida, ciclofosfamida y daclizumab.

5 Los objetos de la presente invención también se resuelven mediante una composición farmacéutica que comprende al menos un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo anti-IL-3, o un fragmento de unión a IL-3, como se ha definido anteriormente para su uso en el tratamiento del lupus eritematoso sistémico, de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

En dicha composición farmacéutica, dicho anticuerpo anti-IL-3 y dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, y dicho lupus eritematoso sistémico son como se definen en las realizaciones anteriores.

10 En una realización, dicha composición farmacéutica comprende además un agente eficaz para el tratamiento del lupus eritematoso sistémico, en el que, preferentemente, dicho agente es un inmunosupresor, preferentemente seleccionados del grupo que consiste en esteroides, ciclofosfamida, micofenolato y azatioprina, para uso combinado para tratar el lupus eritematoso sistémico.

15 También se desvela, pero no forma parte de la invención, un procedimiento de tratamiento de una enfermedad autoinmune, comprendiendo dicho procedimiento la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-IL-3, o un fragmento de unión a IL-3, a un paciente que lo necesite.

En dicho procedimiento, dicho anticuerpo anti-IL-3 y dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, dicha enfermedad autoinmune y dicha administración son como se definen en las realizaciones anteriores.

20 También se desvela el uso de un anticuerpo anti-IL-3, o un fragmento de unión a IL-3, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmune.

En una realización, dicho tratamiento se produce mediante la administración de dicho anticuerpo anti-IL-3 o dicho fragmento de unión a IL-3 a un paciente que lo necesite.

En dicho uso y la realización a la que se refiere, dicho anticuerpo anti-IL-3 y dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, dicha enfermedad autoinmune y dicha administración son como se han definido anteriormente.

25 Como se usa en el presente documento, los términos "IL-3" o "interleucina-3" son sinónimos y se refieren a las proteínas de interleucina-3 endógenas de mamífero de origen natural o endógenas y a proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que es la misma que la de una proteína IL-3 de mamífero correspondiente de origen natural o endógena (por ejemplo, proteínas recombinantes, proteínas sintéticas (es decir, producidas usando los procedimientos de la química orgánica sintética)). Dichas proteínas pueden, por ejemplo, recuperarse o aislarse de una fuente que produce IL-3 de forma natural, o pueden producirse mediante procedimientos de expresión de proteínas recombinantes. Los términos "IL-3" o "interleucina-3" comprenden las proteínas IL-3 de diferentes organismos mamíferos, tal como IL-3 humana, de ratón o de rata. En una realización, los términos se refieren exclusivamente a IL-3 humana. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana se proporciona por la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 6 (véase la Figura 14, la SEQ ID NO: 6 se refiere a una forma alélica alternativa conocida con un polimorfismo (en la posición 8, P se reemplaza por S)). Más preferentemente, la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana se proporciona por la SEQ ID NO: 1.

30

35

Los anticuerpos anti-IL-3 que se unen específicamente a la IL-3 humana están disponibles comercialmente, por ejemplo, en R&D System Clones 4806 y 4815 (Catálogo N.º MAB203 y N.º MAB603), y en BD Biosciences Clones BVD3-1 F9 y BVD8-3G11 (Catálogo N.º 554674 IL-3 anti-humana de rata de biotina 0,5 mg; Catálogo N.º 554672 IL-3 anti-humana de rata purificada 0,5 mg) o se han publicado (F14-570, F14-746, J Immunol. 1991, 146:893-898). También se pueden usar otros anticuerpos anti-IL-3.

40

El término "IL-3 no unida", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de proteína IL-3 que no están unidas a un receptor ni a un anticuerpo.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se usa indistintamente con el término "inmunoglobulina" y se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. El término también incluye todas las formas recombinantes de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos expresados en procariotas, anticuerpos no glucosilados y derivados como se describe a continuación. Hay cinco tipos diferentes de cadenas pesadas, que definen los isotipos de anticuerpos de diferente actividad funcional: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como región V_H) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como región V_L) y una región constante de cadena ligera. Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmune (por

45

50

55

ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Un anticuerpo monoclonal muestra una especificidad y afinidad de unión única por un epítipo particular. En una realización, los anticuerpos monoclonales son producidos por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal no humano, por ejemplo, un ratón, fusionado a una célula inmortalizada.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo policlonal" se refiere a un grupo heterogéneo de anticuerpos producidos por varios linfocitos B diferentes. Diferentes anticuerpos en el grupo reconocen y se unen específicamente a diferentes epítopos.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a aquellos anticuerpos en los que una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras se basa en una secuencia en un anticuerpo/secuencias en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase particular, mientras que el segmento restante de la cadena se basa en una secuencia/secuencias en otra. Típicamente, la región variable de las cadenas tanto ligera como pesada imita las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las porciones constantes se basan en secuencias de anticuerpos derivados de otra. Preferentemente, las porciones constantes se basan en secuencias de anticuerpos derivados de seres humanos.

El término "anticuerpo humanizado", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno que se deriva sustancialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana, en la que la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión al antígeno puede comprender dominios variables completos fusionados en dominios constantes o solo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) injertadas en regiones marco apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión a antígeno pueden ser de tipo silvestre o modificados por una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, modificados para parecerse más a las inmunoglobulinas humanas. Algunas formas de anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR del anticuerpo de ratón). Otras formas tienen una o más CDR que están alteradas con respecto al anticuerpo original.

El término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que comprende solo secuencias derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana.

El término "anticuerpo sintético", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se genera usando tecnología de ADN recombinante (tal como mediante presentación en fagos) o síntesis de ADN.

El término "anticuerpo anti-IL-3", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que se une a la proteína IL-3. Preferentemente, dicha unión es unión específica. Si la presente solicitud se refiere a un "fragmento de unión a IL-3" de un anticuerpo anti-IL-3, esto se refiere a un fragmento de ese anticuerpo anti-IL-3 cuyo fragmento es capaz de unirse a la proteína IL-3. Preferentemente, dicha unión es unión específica. El término "anticuerpo anti-IL-3" también incluye anticuerpos monoclonales, policlonales, humanizados, humanos y sintéticos, anticuerpos monocatenarios, biespecíficos y simianizados, así como también aptámeros. En algunas realizaciones, el término "anticuerpo anti-IL-3" no incluye aptámeros.

Los presentes inventores han encontrado que los anticuerpos anti-IL-3 con epítopos que no incluyen el sitio de polimorfismo dentro de la secuencia de IL-3 humana (residuo 8 de la secuencia de IL-3 humana) tienen la mayor probabilidad de unirse a ambas formas polimórficas de IL-3 humana. Dado que los epítopos son a menudo de 8, a veces 10-12 aminoácidos de longitud, esto significa que un anticuerpo generado contra una secuencia de IL-3 que carece de los 16, preferentemente 20, aminoácidos más N-terminales de la secuencia de IL-3 humana (y, por lo tanto, un anticuerpo anti-IL-3 que se une a un epítipo dentro de la secuencia de IL-3 humana que no se solapa con los 16, preferentemente 20, aminoácidos más N-terminales de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana, es decir, un anticuerpo anti-IL-3 que se une a un epítipo que se encuentra dentro de los residuos 17-133, preferentemente los residuos 21-133, de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana) tiene la mayor probabilidad de unirse a ambas formas polimórficas de IL-3 humana.

El término "aptámero", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de ADN o ARN que se han seleccionado de grupos aleatorios en función de su capacidad para unirse a otras moléculas. Se han seleccionado aptámeros que se unen a ácido nucleico, proteínas, pequeños compuestos orgánicos, e incluso organismos enteros. Se mantiene una base de datos de aptámeros en [http // aptamer icmb utexas edu/](http://aptamer.icmb.utexas.edu/). Más específicamente, los aptámeros se pueden clasificar como aptámeros de ADN o ARN o aptámeros peptídicos. Mientras que los primeros consisten en cadenas (generalmente cortas) de oligonucleótidos, los segundos consisten en un dominio peptídico variable corto, unido en ambos extremos a un andamiaje de proteínas. Los aptámeros de ácido nucleico son especies de ácido nucleico que se han diseñado a través de rondas repetidas de selección *in vitro* o, de manera equivalente, SELEX (evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial) para unirse a diversas dianas moleculares, tales como proteínas de moléculas pequeñas, ácidos nucleicos e incluso células, tejidos y organismos. Los aptámeros peptídicos son proteínas diseñadas para interferir con otras interacciones proteicas dentro de las

células. Consisten en un bucle de péptido variable unido en ambos extremos a un andamiaje de proteínas. Esta restricción estructural doble aumenta en gran medida la afinidad de unión del aptámero peptídico (con respecto a un intervalo nanomolar). La longitud del bucle variable es típicamente de 10 a 20 aminoácidos, y el andamiaje puede ser cualquier proteína que tenga buenas propiedades de solubilidad. En la actualidad, la proteína bacteriana Tiorredoxina-A es la proteína de andamiaje más utilizada, insertándose el bucle variable dentro del sitio activo reductor, que es un bucle -Cys-Gly-Pro-Cys en la proteína silvestre, siendo las dos cadenas laterales de cisteína capaces de formar un puente disulfuro. La selección del aptámero peptídico se puede hacer usando diferentes sistemas, pero el más utilizado actualmente es el sistema de dos híbridos de levadura. Los aptámeros ofrecen la utilidad para aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas, ya que ofrecen propiedades de reconocimiento molecular que rivalizan con las de las biomoléculas de uso común. Además de su reconocimiento discriminatorio, los aptámeros ofrecen la ventaja de que pueden diseñarse completamente en un tubo de ensayo, se producen fácilmente mediante síntesis química, poseen propiedades de almacenamiento deseables, y provocan poca o ninguna inmunogenicidad en aplicaciones terapéuticas. Los aptámeros no modificados se eliminan rápidamente del torrente sanguíneo, con una semivida de minutos a horas, principalmente debido a la degradación de la nucleasa y la depuración del cuerpo por los riñones, como resultado del peso molecular inherentemente bajo del aptámero. Las aplicaciones de aptámeros no modificados se centran actualmente en el tratamiento de afecciones transitorias, tal como la coagulación de la sangre, o en el tratamiento de órganos tal como el ojo, en el que es posible la administración local. Esta rápida depuración puede ser una ventaja en aplicaciones tal como diagnóstico por imagen *in vivo*. Varias modificaciones, tal como pirimidinas sustituidas con 2'-flúor, el enlace de polietilenglicol (PEG), etc., están disponibles para los científicos con los que la semivida de los aptámeros se puede aumentar fácilmente al día o incluso a la semana.

Los ejemplos de fragmentos de unión a IL-3 de un anticuerpo anti-IL-3 incluyen cadenas ligeras y pesadas separadas, fragmentos Fab, Fab/c, Fv, Fab', y F(ab')₂, incluyendo fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anticuerpos y fragmentos mencionados anteriormente.

El término "MP2-8F8", como se usa en el presente documento, se refiere a un cierto anticuerpo monoclonal que se generó con IL-3 de ratón recombinante como inmunógeno y es específico para IL-3 de ratón (Abrams y Pearce, J Immunology (1988) 140, 131-137). MP2-8F8 se puede obtener comercialmente, por ejemplo, en BD Biosciences (Catálogo N.º 554379 IL-3 anti-ratón de rata NA/IE purificada 0,5 mg), R&D Systems (Catálogo N.º MAb de IL-3 de ratón MAB403 (Clon MP28F8) 0,5 mg) o Biozol (BLD-503902 IL-3 anti-ratón purificada, clon MP2-8F8, IgG1 de rata kappa 0,5 mg).

Como se usa en el presente documento, el término "epítipo" significa una secuencia/estructura de proteína capaz de unirse a un anticuerpo generado en respuesta a dicha secuencia, en el que el término "unión" en el presente documento se refiere preferentemente a una unión específica.

El término "inmunógeno", como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido que, tras administrarse a un sujeto, o absorberse por el sujeto de otras maneras, provoca una respuesta inmune. Dicha respuesta inmune incluye al menos la generación de anticuerpos que se unen específicamente a la sustancia inmunógena (es decir, una respuesta humoral). Además, una sustancia inmunógena puede provocar una respuesta inmunológica celular.

Producción de anticuerpos policlonales:

Los procedimientos para la producción de anticuerpos policlonales se conocen bien por un experto en la técnica y se pueden encontrar en Harlow & Lane, Antibodies: a Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY: 1988). Se pueden producir anticuerpos policlonales o anticuerpos inyectando a un animal huésped tal como conejo, rata, cabra, ratón u otro animal con un inmunógeno adecuado, por ejemplo, proteína IL-3 de longitud completa, o un fragmento de la misma (como un péptido conjugado con un vehículo que representa; los vehículos comunes son, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana (KLH) o albúmina de suero bovino (BSA)). Los sueros se extraen del animal huésped y se criban para obtener anticuerpos policlonales que son específicos para el inmunógeno. Los procedimientos de cribado de anticuerpos policlonales se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los desvelados en Harlow & Lane, Antibodies: a Laboratory Manual.

Producción de anticuerpos monoclonales:

Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden producirse mediante una diversidad de técnicas, incluyendo la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein. Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B o técnicas de presentación en fagos utilizando bibliotecas de genes de anticuerpos.

El sistema animal preferido para preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales es el sistema murino. La producción de hibridoma en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión se conocen en la técnica. También se conocen los compañeros de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión.

Para detalles de ingeniería de anticuerpos recombinantes, véase M. Welschof y J. Krauss, Recombinant antibodies for cancer therapy, ISBN-0-89603-918-8 y Benny K.C. Lo, Antibody Engineering, ISBN 1-58829-092-1.

Inmunizaciones para la generación de anticuerpos monoclonales:

5 Para generar anticuerpos monoclonales contra IL-3, los ratones pueden inmunizarse con péptidos conjugados con vehículo derivados de la secuencia de IL-3, una preparación enriquecida de antígeno de IL-3 expresado de forma recombinante, o fragmentos del mismo, y/o células que expresan IL-3. Como alternativa, los ratones pueden inmunizarse con ADN que codifica IL-3 humana de longitud completa (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) o fragmentos del mismo.

10 La respuesta inmune se puede controlar en el transcurso del protocolo de inmunización con muestras de plasma y suero obtenidas por venas de la cola o hemorragias retroorbitales. Los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina anti-IL-3 pueden usarse para fusiones. Los ratones se pueden estimular por vía intraperitoneal o intravenosa con IL-3 tres días antes del sacrificio y la extracción del bazo para aumentar la tasa de hibridomas secretores de anticuerpos específicos.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales:

15 Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales contra IL-3, los esplenocitos y las células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados pueden aislarse y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden cribarse entonces para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Los pocillos individuales pueden cribarse entonces mediante ELISA para detectar hibridomas secretores de anticuerpos. Los hibridomas secretores de anticuerpos pueden reemplazarse, cribarse de nuevo, y si aún son positivos para anticuerpos monoclonales anti-IL-3 pueden subclonarse mediante dilución limitante. Los subclones estables se pueden cultivar entonces *in vitro* para generar anticuerpos en medio de cultivo de tejidos para la caracterización.

20

Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales:

Los anticuerpos de la invención también se pueden producir en un transfectoma de células huésped usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y procedimientos de transfección génica como se conocen bien en la técnica.

25 Por ejemplo, en una realización, el gen o genes de interés, por ejemplo, genes de anticuerpos, se pueden ligar en un vector de expresión tal como un plásmido de expresión eucariota tal como el utilizado por el sistema de expresión del gen GS desvelado en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338 841 u otros sistemas de expresión bien conocidos en la técnica. El plásmido purificado con los genes de anticuerpos clonados puede introducirse en células huésped eucariotas tales como células CHO, células NS/O o células HEK293 o, como alternativa, otras células eucariotas como células derivadas de plantas, células fúngicas o de levadura. El procedimiento utilizado para introducir estos genes puede ser procedimientos descritos en la técnica, tales como electroporación, lipofectina, lipofectamina u otros. Después de la introducción de estos genes de anticuerpos en las células huésped, las células que expresan el anticuerpo pueden identificarse y seleccionarse. Estas células representan los transfectomas que después pueden amplificarse para determinar su nivel de expresión y aumentar su escala para producir anticuerpos. Los anticuerpos recombinantes pueden aislarse y purificarse a partir de estos sobrenadantes de cultivo y/o células.

30

35 Como alternativa, los genes de anticuerpos clonados pueden expresarse en otros sistemas de expresión, incluyendo las células procariontas, tales como microorganismos, por ejemplo, *E. coli*.

Uso de secuencias de anticuerpos parciales para expresar anticuerpos intactos (es decir, humanización y quimerización).

40 a) Quimerización

Los anticuerpos murinos no marcados son altamente inmunógenos en el hombre cuando se aplican repetidamente, lo que conduce a la reducción del efecto terapéutico. La inmunogenicidad principal está mediada por las regiones constantes de cadena pesada. La inmunogenicidad de los anticuerpos murinos en el hombre puede reducirse o evitarse por completo si los anticuerpos respectivos se quimerizan o se humanizan.

45 La quimerización de los anticuerpos se logra uniendo las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo murino con la región constante de la cadena pesada y ligera humana (por ejemplo, según lo descrito por Krauss y col., en *Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy*, ISBN-0-89603-918-8). En una realización preferida, los anticuerpos quiméricos se generan uniendo la región constante de cadena ligera kappa humana a la región variable de cadena ligera murina. En una realización también preferida, se pueden generar anticuerpos quiméricos uniendo la región constante de cadena ligera lambda humana a la región variable de cadena ligera murina. Las regiones constantes de cadena pesada preferidas para la generación de anticuerpos quiméricos son IgG1, IgG3 e IgG4. Otras regiones constantes de cadena pesada preferidas para la generación de anticuerpos quiméricos son IgG2, IgA, IgD e IgM.

50

b) Humanización

Los anticuerpos interactúan con los antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácidos que se encuentran en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada y ligera. Por este motivo, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos de origen natural específicos mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo de origen natural específico injertado en secuencias marco de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véase, por ejemplo, Riechmann, L. y col. (1998) *Nature* 332: 323-327). Dichas secuencias marco pueden obtenerse de bases de datos de ADN públicas que incluyen secuencias génicas de anticuerpos de línea germinal. Estas secuencias de línea germinal diferirán de las secuencias génicas de anticuerpos maduros porque no incluirán genes variables completamente ensamblados, que se forman mediante la unión de V(D)J durante la maduración de los linfocitos B. Las secuencias génicas de la línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad en el individuo de manera uniforme en la región variable. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente poco frecuentes en la porción amino terminal de la región marco 1 y en la porción carboxi-terminal de la región marco 4. Además, muchas mutaciones somáticas no alteran significativamente las propiedades de unión del anticuerpo. Por este motivo, no es necesario obtener la secuencia de ADN completa de un anticuerpo particular para recrear un anticuerpo recombinante intacto que tenga propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (véase el documento WO 99/45962). Las secuencias parciales de cadena pesada y ligera que abarcan las regiones CDR son típicamente suficientes para este fin. La secuencia parcial se usa para determinar qué variable de línea germinal y qué segmentos génicos de unión contribuyeron a los genes variables de anticuerpos recombinados. La secuencia de línea germinal se usa para completar las partes faltantes de las regiones variables. Las secuencias líderes de cadena pesada y ligera se escinden durante la maduración de proteínas y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para añadir secuencias faltantes, las secuencias de ADNc clonadas se pueden combinar con oligonucleótidos sintéticos mediante ligadura o amplificación por PCR. Como alternativa, toda la región variable puede sintetizarse como un conjunto de oligonucleótidos cortos y superpuestos y combinarse mediante amplificación por PCR para crear un clon de región variable completamente sintético. Este procedimiento tiene ciertas ventajas, tales como la eliminación o inclusión o sitios de restricción particulares, u optimización de codones particulares.

Las secuencias de nucleótidos de las transcripciones de cadena pesada y ligera de hibridomas se usan para diseñar un conjunto superpuesto de oligonucleótidos sintéticos para crear secuencias V sintéticas con capacidades de codificación de aminoácidos idénticas a las secuencias naturales.

Para las regiones variables tanto de cadena pesada como ligera, la codificación optimizada y las secuencias de cadena no codificantes correspondientes, se descomponen en 30-50 nucleótidos aproximadamente en el punto medio del oligonucleótido no codificante correspondiente. Por lo tanto, para cada cadena, los oligonucleótidos pueden ensamblarse en conjuntos bicatenarios superpuestos que abarcan segmentos de 150-400 nucleótidos. Los grupos se usan entonces como plantillas para producir productos de amplificación por PCR de 150-400 nucleótidos. Típicamente, un único conjunto de oligonucleótidos de región variable se dividirá en dos grupos que se amplifican por separado para generar dos productos de PCR superpuestos. Estos productos superpuestos se combinan entonces mediante amplificación por PCR para formar la región variable completa. También puede ser deseable incluir un fragmento superpuesto de la región constante de cadena pesada o ligera en la amplificación por PCR para generar fragmentos que puedan clonarse fácilmente en las construcciones del vector de expresión.

Las regiones variables de cadena pesada y ligera quimerizadas o humanizadas reconstruidas se combinan entonces con secuencias de promotor clonado, líder, de inicio de la traducción, de región constante, 3' no traducidas, de poliadenilación, y de terminación de la transcripción para formar construcciones de vectores de expresión. Las construcciones de expresión de cadena pesada y ligera pueden combinarse en un solo vector, cotransfectarse, transfectarse en serie, o transfectarse por separado en células huésped que después se fusionan para formar una célula huésped que expresa ambas cadenas. Los plásmidos para su uso en la construcción de vectores de expresión para IgG humana se describen a continuación. Los plásmidos se construyeron de modo que las secuencias de ADNc de cadena pesada V y ligera V kappa amplificadas por PCR pudieran usarse para reconstruir minigenes completos de cadena pesada y ligera. Estos plásmidos pueden usarse para expresar anticuerpos IgG1, Kappa o IgG4, Kappa completamente humanos o quiméricos. Se pueden construir plásmidos similares para la expresión de otros isotipos de cadena pesada, o para la expresión de anticuerpos que comprenden cadenas ligeras lambda.

Por lo tanto, En otro aspecto de la invención, las características estructurales de los anticuerpos anti-IL-3 de la invención, se usan para crear anticuerpos anti-IL-3 humanizados estructuralmente relacionados que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como la unión a IL-3. Más específicamente, una o más regiones CDR de anticuerpos monoclonales de ratón se pueden combinar de forma recombinante con regiones marco humanas conocidas y CDR para crear anticuerpos anti-IL-3 humanizados genomanipulados de forma recombinante adicionales de la invención.

Verificación de la unión de anticuerpos (policlonales o monoclonales) a IL-3:

La capacidad del anticuerpo para unirse a IL-3 se puede determinar usando ensayos de unión estándar, tales como ELISA, transferencia Western, o medición de afinidad (K_D) mediante mediciones de resonancia por plasmón superficial

(por ejemplo, con un dispositivo Biacore™, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ).

Purificación de anticuerpos monoclonales anti-IL-3:

5 Para purificar los anticuerpos anti-IL-3, se pueden cultivar hibridomas seleccionados en matraces giratorios de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Como alternativa, los anticuerpos anti-IL-3 se pueden producir en biorreactores basados en diálisis. Los sobrenadantes pueden filtrarse y, si es necesario, concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína G-sepharose o proteína A-sepharose. La IgG eluido se puede comprobar mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para garantizar la pureza. La solución de tampón se puede intercambiar en PBS, y la concentración se puede determinar por DO280 usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden dividirse en alícuotas y almacenarse a -80 °C.

10 Verificación de la unión del anticuerpo a cierto epítipo

Para determinar si un anticuerpo anti-IL-3 se une a un cierto epítipo dentro de la secuencia de IL-3, se introducen mutaciones de aminoácidos en la secuencia de proteína IL-3 en el sitio del epítipo, por ejemplo, por mutagénesis de sitio dirigido. Posteriormente, se usa un ensayo de unión (por ejemplo, un ELISA) para comprobar si el anticuerpo todavía se une a la proteína IL-3 con el epítipo mutado.

15 Como alternativa, el epítipo del anticuerpo puede mapearse mediante exploración de oligopéptidos basada en matriz. Esta técnica utiliza una biblioteca de secuencias de oligopéptidos de segmentos superpuestos y no superpuestos de la proteína diana (aquí IL-3). Las secuencias de oligopéptidos se preparan sintéticamente mediante técnicas conocidas de síntesis de oligopéptidos. Posteriormente, las pruebas de su capacidad para unir el anticuerpo de interés se realizan mediante procedimientos conocidos por el experto en la técnica, preferentemente mediante ELISA.

20 En algunos casos, la presente solicitud se refiere a una situación en la que un primer anticuerpo "compite" con el segundo anticuerpo "en un ensayo de unión competitiva". Por ejemplo, la solicitud puede indicar que un "anticuerpo anti-IL-3 compite con el anticuerpo monoclonal X en un ensayo de unión competitiva". Dicha unión competitiva se determina preferentemente mediante un ensayo de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica: Uno de los anticuerpos se marca (por ejemplo, está biotinilado) mediante técnicas estándar. El anticuerpo no marcado se inmoviliza, IL-3 de longitud completa se captura por el anticuerpo inmovilizado, y el segundo anticuerpo (marcado) se ensaya en un ensayo ELISA para determinar su capacidad para unirse a la IL-3 capturada.

30 Como alternativa, las mediciones con un dispositivo de resonancia por plasmón superficial (SPR) (por ejemplo, Biacore™, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) se pueden realizar inmovilizando un anticuerpo y midiendo la unión de un complejo de IL-3 con el segundo anticuerpo o midiendo la unión secuencial de IL-3 y el segundo anticuerpo.

35 Los términos "se une" y "que se une", como se usan en el presente documento, se refieren preferentemente a la unión específica. En algunas realizaciones, el término "se une" debe entenderse como "es capaz de unirse", y "que se une" debe entenderse como "capaz de unirse"; por consiguiente, el término "es específico para" debe entenderse como "es capaz de unirse específicamente (a)", el término "se une específicamente" debe entenderse como "es capaz de unirse específicamente (a)" y "unión específica" debe entenderse como "capacidad de unión específica (a)".

40 Los términos "es específico para", "se une específicamente" y "unión específica", como se usan, por ejemplo, en el contexto de una molécula A que es específica para una molécula B o una molécula A que se une específicamente a una molécula B o molécula A que muestra una unión específica para una molécula B, se refiere a una situación en la que la molécula A se une a la molécula B, pero no se une a otras moléculas no relacionadas, o con afinidades sustancialmente reducidas. Dicha unión puede medirse mediante procedimientos de rutina, por ejemplo, mediante ELISA de competición o mediante medición de afinidad (K_D) mediante mediciones de resonancia por plasmón superficial (por ejemplo, con un dispositivo Biacore™, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ). De forma similar, una molécula A que es específica para un epítipo C, o una molécula A que se une específicamente al epítipo C, o una molécula A que muestra una unión específica por el epítipo C, se refieren a una situación en la que la molécula A se une al epítipo C, pero no se une a otros epítipos no relacionados, o con afinidades sustancialmente reducidas.

El término "afinidad (K_D)", como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de equilibrio de disociación de una interacción molecular particular.

50 En algunas ocasiones, la presente solicitud se refiere a una situación en la que la unión de una molécula A a IL-3 "impide que IL-3 se una a su receptor". Si la unión de una molécula A a IL-3 evita que IL-3 se una a su receptor puede determinarse mediante procedimientos bien conocidos por los expertos, por ejemplo, por inmunofluorescencia o análisis de inmunotinción/citometría de flujo de células que expresan el receptor de IL-3, tales como basófilos, células dendríticas plasmacitoides, monocitos o una línea celular transfectada o no transfectada que expresa el receptor de IL-3 (por ejemplo, por preincubación de IL-3 en presencia o ausencia de la molécula A, incubación de células que expresan el receptor de IL-3 con la IL-3 pre-incubada, tinción de las células con un anticuerpo anti-IL-3 para detectar IL-3 unida al receptor en la superficie celular, controlar que el anticuerpo anti-IL-3 pueda reconocer IL-3 incluso si está unida por la molécula A), o por medición de afinidad (K_D) por mediciones de resonancia por plasmón superficial.

Para varios anticuerpos, se sabe que su unión a la IL-3 humana evita que la IL-3 se una a su receptor, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales anti-IL-3 F14-570, F14-746, F13-267 y F15-216 como se publicó en J Immunol. 1991 Feb 1;146(3):893-8; anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6 y anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4 como se describe en la Solicitud de Patente Europea N.º EP12169799.9 (fecha de presentación: 29 de mayo de 2012) y la solicitud de patente internacional PCT/EP2013/061121, depositada el 14 de marzo de 2012, en el DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) con el número de depósito DSM ACC3163 y DSM ACC3164, respectivamente; anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems (Catálogo Número MAB603) y anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems (Catálogo Número MAB203) (véanse también las fichas técnicas de los anticuerpos en <http://www.rndsystems.com/pdf/mab603.pdf> y <http://www.rndsystems.com/pdf/mab203.pdf>).

Además, se sabe que la unión a la IL-3 humana de los anticuerpos que se unen a ciertos epítopos dentro de la IL-3 humana evita que la IL-3 se una a su receptor, por ejemplo, los anticuerpos que se unen a la región de

- a) residuos 12-15 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (véase la Solicitud de Patente Europea N.º EP12169799.9 (fecha de presentación: 29 de mayo de 2012) y la solicitud de patente internacional PCT/EP2013/061121),
- b) residuos 29-50 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (véase J Immunol. 1991 Feb 1; 146(3):893-8),
- c) los 18 aminoácidos más N-terminales de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (véase EMBO J. 1991 Aug;10(8):2125-31), o
- d) los 22 aminoácidos más C-terminales de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (véase EMBO J. 1991 Aug;10(8):2125-31).

La secuencia de aminoácidos de los residuos 12-15 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana se proporciona por la SEQ ID NO: 2.

La secuencia de aminoácidos de los residuos 29-50 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana se proporciona por la SEQ ID NO: 3.

La secuencia de aminoácidos de los 18 aminoácidos más N-terminales de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana se proporciona por la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 7, preferentemente por la SEQ ID NO: 4. La secuencia de aminoácidos de los 22 aminoácidos más C-terminales de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana se proporciona por la SEQ ID NO: 5.

En algunas ocasiones, la presente solicitud se refiere a una situación en la que la unión de una molécula A a IL-3 "impide que IL-3 active su receptor". Esto se refiere a una situación en la que, tras la unión de dicha molécula A a una molécula de proteína IL-3, dicha molécula de proteína IL-3 ya no es capaz de inducir la activación de su receptor fisiológico. Preferentemente, el receptor fisiológico de IL-3 es el receptor de IL-3. La "activación" del receptor de IL-3 representa los procedimientos moleculares que experimenta un receptor de IL-3 al unirse a IL-3 que dan como resultado la transducción de una señal al interior de una célula portadora del receptor de IL-3 para provocar cambios en fisiología celular. Dichos cambios en la fisiología celular en respuesta a la activación del receptor de IL-3 son típicamente la activación de la ruta JAK-STAT, la ruta de la cinasa Ras-MAP y la ruta de la cinasa PI-3 (Oncogene 200, 19:2532-2547). Se sabe que IL-3 activa, por ejemplo, basófilos, monocitos, células dendríticas, linfocitos B, linfocitos T, células endoteliales. Si una molécula evita que IL-3 active su receptor, puede examinarse mediante la inhibición de la proliferación inducida por IL-3 de linfocitos TF-1 o mediante la inhibición de la activación inducida por IL-3 de basófilos.

Para varios anticuerpos, se sabe que su unión a la IL-3 humana evita que la IL-3 active su receptor, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales anti-IL-3 F14-570, F14-746, F13-267 y F15-216 como se publicó en J Immunol. 1991 Feb 1;146(3):893-8; anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6 y anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4 como se describe en la Solicitud de Patente Europea N.º EP12169799.9 (fecha de presentación: 29 de mayo de 2012) y la solicitud de patente internacional PCT/EP2013/061121, depositada el 14 de marzo de 2012, en el DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) con el número de depósito DSM ACC3163 y DSM ACC3164, respectivamente; anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4815 de R&D Systems (Catálogo Número MAB603) y anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 4806 de R&D Systems (Catálogo Número MAB203) (véanse también las fichas técnicas de los anticuerpos en <http://www.rndsystems.com/pdf/mab603.pdf> y <http://www.rndsystems.com/pdf/mab203.pdf>).

Además, se sabe que la unión a la IL-3 humana de los anticuerpos que se unen a ciertos epítopos dentro de la IL-3 humana evita que la IL-3 active su receptor, por ejemplo, los anticuerpos que se unen a la región de

- a) residuos 12-15 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (véase la Solicitud de Patente Europea N.º EP12169799.9 (fecha de presentación: 29 de mayo de 2012) y la solicitud de patente internacional PCT/EP2013/061121),
- b) residuos 29-50 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (véase J Immunol. 1991 Feb 1; 146(3):893-8),
- c) los 18 aminoácidos más N-terminales de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (véase EMBO J. 1991 Aug;10(8):2125-31), o

d) los 22 aminoácidos más C-terminales de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (véase EMBO J. 1991 Aug;10(8):2125-31).

5 En algunas ocasiones, la presente solicitud se refiere a una situación en la que un anticuerpo o fragmento de anticuerpo "no es capaz de agotar" un cierto tipo de célula. Esto significa que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo, si se administra a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz, no causa el agotamiento de dicho tipo de células de la sangre de dicho paciente, según lo determinado por ensayos bien conocidos por el experto (tal como los procedimientos descritos en los Ejemplos), en particular según lo determinado por citometría de flujo con anticuerpos específicos para marcadores de dicho tipo celular (por ejemplo, para los marcadores CD123, CD11b y CD203c en el caso de basófilos (es decir, granulocitos basófilos) o los marcadores CD123, HLA-DR y, en cierta medida, CD4 en el caso de las células dendríticas plasmacitoides).

10 En algunos casos, la presente solicitud se refiere a una determinada enfermedad que se "caracteriza por un aumento en el nivel de IL-3 plasmática en comparación con un estado saludable". Tal aumento del nivel de IL-3 plasmática en comparación con un estado saludable puede detectarse obteniendo una muestra de plasma del paciente considerado para el tratamiento (en ausencia de cualquier tratamiento con un anticuerpo según la invención) según los procedimientos conocidos en la técnica, determinando el nivel de IL-3 en esta muestra de plasma mediante ELISA de IL-3, y comparando el valor obtenido con los valores que se obtienen típicamente mediante el mismo ensayo con muestras de plasma de individuos sanos (es decir, individuos que no tienen ninguna enfermedad que pueda afectar a los niveles de IL-3, preferentemente sin ninguna enfermedad).

15 En algunas situaciones, la presente solicitud puede referirse a una situación en la que cierto compuesto es capaz de "disminuir el nivel plasmático de IL-3 no unida" en un paciente. Dicha capacidad puede determinarse obteniendo una muestra de plasma de dicho paciente antes y después de la administración de dicho compuesto por procedimientos conocidos por el experto en la técnica, determinando el nivel de IL-3 en estas muestras de plasma mediante ELISA de IL-3 o realizando pruebas funcionales, y comparando los resultados obtenidos para ambas muestras.

20 En algunos casos, la aplicación puede referirse a un paciente "que tiene un mayor nivel de IL-3 en plasma en comparación con un individuo sano". Dicho mayor nivel de IL-3 en plasma en comparación con un individuo sano puede detectarse obteniendo una muestra de plasma de dicho paciente (en ausencia de cualquier tratamiento con un anticuerpo según la invención), determinando el nivel de IL-3 en esta muestra de plasma por ELISA de IL-3, y comparando el valor obtenido con los valores típicos obtenidos por el mismo ensayo con muestras de plasma de individuos sanos (es decir, individuos que no tienen ninguna enfermedad que pueda afectar a los niveles de IL-3 en plasma, preferentemente sin ninguna enfermedad).

25 En algunos casos, la presente solicitud se refiere a un porcentaje al que una primera secuencia de aminoácidos es "idéntica" a una segunda secuencia de aminoácidos. Este porcentaje se determina alineando las dos secuencias de aminoácidos usando algoritmos apropiados, que se conocen por el experto en la técnica, usando parámetros por defecto; determinando el número de aminoácidos idénticos en las porciones alineadas; dividiendo ese número por el número total de aminoácidos en la segunda secuencia de aminoácidos; y después multiplicando el número resultante por 100 para obtener el porcentaje de aminoácidos idénticos.

30 Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad autoinmune" designa una enfermedad que es resultado de una respuesta inmunológica contra un auto-tejido o componente tisular, que incluye tanto respuestas de autoanticuerpos como respuestas mediadas por células.

35 Como se usa en el presente documento, el término "lupus eritematoso sistémico" (abreviado "LES") se refiere a una enfermedad autoinmune del tejido conectivo caracterizada por la producción de autoanticuerpos contra ácidos nucleicos, activación del complemento, deposición del complejo inmune (CI) en la microvasculatura de diversos órganos, particularmente de los riñones. El LES es una enfermedad inflamatoria crónica de causa desconocida que puede afectar a la piel, articulaciones, médula ósea y múltiples órganos, incluidos los riñones, los pulmones y el sistema nervioso.

40 El término "nefritis lúpica", como se usa en el presente documento, se refiere a una inflamación de los riñones causada por lupus eritematoso sistémico con afectación renal. La afectación renal generalmente se desarrolla en los primeros años de enfermedad y se caracteriza por la aparición de proteinuria, hematuria y reducción de la tasa de filtración glomerular. La afectación renal y el tipo específico de glomerulonefritis se diagnostican mediante biopsia renal.

45 "Esclerosis múltiple" (abreviada "EM"), como se usa en el presente documento, se refiere a la enfermedad crónica y a menudo incapacitante del sistema nervioso central caracterizada por la destrucción progresiva de la mielina. Hay cuatro formas de EM: esclerosis múltiple remitente-recurrente (EMRR), esclerosis múltiple progresiva primaria (EMPP), esclerosis múltiple progresiva secundaria (EMPS), y esclerosis múltiple progresiva-recurrente (EMPR). La "esclerosis múltiple recurrente-remitente" (EMRR) se caracteriza por recaídas de la enfermedad claramente definidas (también conocidas como exacerbaciones) con recuperación total o con secuelas y déficit residual en los periodos de recuperación entre las recaídas de la enfermedad caracterizadas por una falta de progresión de la enfermedad. Los elementos definitorios de la EMRR son episodios de empeoramiento agudo de la función neurológica seguidos de un grado variable de recuperación, con un curso estable entre los ataques. La "esclerosis múltiple progresiva primaria"

(EMPP) se caracteriza por la progresión de la enfermedad con un deterioro implacable de la función neurológica desde el inicio, lo que permite un estancamiento ocasional y, a veces, mejorías menores en el funcionamiento neurológico. El elemento esencial en la EMPP es una función de empeoramiento gradual y casi continuo que permite fluctuaciones menores pero sin recaídas distintas. La "esclerosis múltiple progresiva secundaria" (EMPS) se caracteriza por seguir un curso inicial de la enfermedad EMRR con progresión, con o sin recaídas ocasionales, remisiones menores, y periodos de estancamiento o mesetas. La EMPS puede verse como un resultado a largo plazo de la EMRR ya que la mayoría de los pacientes con EMPS comienzan inicialmente con EMRR como se ha definido anteriormente. Sin embargo, una vez que el inicio entre las recaídas comienza a deteriorarse progresivamente, el paciente ha cambiado de EMRR a EMPS. La "esclerosis múltiple progresiva recurrente" (EMPR) se caracteriza por una enfermedad progresiva desde el inicio, con recaídas agudas claras, con o sin periodos de recuperación completa entre las recaídas caracterizados por una progresión continua.

El término "tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere al procedimiento de proporcionar a un sujeto un tratamiento farmacéutico, por ejemplo, la administración de un fármaco, de tal forma que al menos un síntoma de la enfermedad disminuye. El tratamiento de una enfermedad puede mejorar la enfermedad y/o curarla.

La frase de que algo/un evento tiene lugar "simultáneamente con dicha administración de dicho anticuerpo anti-IL-3, o fragmento de unión a IL-3 del mismo" pretende designar que el evento tiene lugar (a) al mismo tiempo en que dicho el anticuerpo/fragmento del mismo se aplica al paciente, (b) en un momento que se encuentra entre las administraciones individuales de dicho anticuerpo/fragmento del mismo, si la administración de dicho anticuerpo/fragmento del mismo tiene lugar en varias administraciones individuales, o (c) después de la administración de dicho anticuerpo/fragmento del mismo, mientras que el anticuerpo/fragmento del mismo administrado todavía está presente en el tejido o la sangre del paciente.

El término "vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material diluyente no tóxico, inerte, sólido, semisólido o líquido, o auxiliar de formulación de cualquier tipo. En este contexto, "farmacéuticamente aceptable" pretende designar que dicho vehículo es compatible con los demás ingredientes de la composición farmacéutica y no es perjudicial para el paciente al que se administra la composición farmacéutica. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, agua, soluciones de agua-propilenglicol, o soluciones acuosas de polietilenglicol.

El término "agente eficaz para el tratamiento" de una determinada enfermedad, como se usa en el presente documento en el contexto de un agente eficaz para el tratamiento de una determinada enfermedad, pretende designar un agente que, tras la administración de una cantidad eficaz de dicho agente a un sujeto que padece esa enfermedad, da como resultado la disminución de al menos un síntoma de dicha enfermedad.

El término "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad que produce un efecto de tratamiento deseado en un sujeto. Esta cantidad variará dependiendo de una diversidad de factores, incluyendo, pero sin limitación, las características del compuesto terapéutico (incluida la actividad, farmacocinética, farmacodinámica y biodisponibilidad), la condición fisiológica del sujeto (incluida la edad, sexo, tipo de enfermedad y estadio, estado físico general, capacidad de respuesta a una dosis dada, y tipo de medicamento), la naturaleza del vehículo o vehículos farmacéuticamente aceptables en la formulación, y la vía de administración. Un experto en la técnica podrá determinar una cantidad eficaz a través de la experimentación de rutina, concretamente controlando la respuesta de un sujeto a la administración de un compuesto y ajustando la dosis en consecuencia. Para directrices adicionales, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20^a Edición, Gennaro, Ed., Williams & Wilkins Pennsylvania, 2000.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que mediante la aplicación de un anticuerpo anti-IL-3 se puede tratar el lupus eritematoso sistémico.

La interleucina-3 (IL-3), junto con el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y la interleucina-5 (IL-5) pertenece a una familia de citocinas hematopoyéticas con 4 haces cortos de hélices α . Todas estas citocinas se unen a una subunidad del receptor β común y una subunidad del receptor α única. La IL-3 es producida principalmente por linfocitos T CD4⁺ activados (pero también puede expresarse por neuronas) y promueve la diferenciación de basófilos y mastocitos en la médula ósea y apoya la supervivencia, el crecimiento y la diferenciación de las células progenitoras hematopoyéticas CD34⁺. Junto con interferón- β (IPN β) o IL-4, IL-3 soporta la diferenciación de monocitos en células dendríticas. IL-3 desempeña un papel importante durante la infección parasitaria al aumentar el número de basófilos y mastocitos de tejido. Se ha informado que IL-3 induce y facilita la liberación de histamina e IL-4 de los basófilos.

La IL-3 ejerce sus actividades biológicas a través de la unión a un receptor específico de la superficie celular. El receptor de alta afinidad responsable de la señalización de IL-3 está compuesto por subunidades alfa y beta. La subunidad alfa del receptor de IL-3 es un miembro de la superfamilia de receptores de citocinas y se une a la IL-3 con baja afinidad. Dos subunidades beta distintas, AIC2A (beta_{IL-3}) y AIC2B (beta_c) están presentes en las células de ratón. Beta_{IL-3} también se une a IL-3 con baja afinidad y forma un receptor de alta afinidad con la subunidad alfa. La subunidad beta_c no se une a ninguna citocina sino que forma receptores funcionales de alta afinidad con la subunidad alfa de los receptores IL-3, IL-5 y GM-CSF. Los receptores para IL-3 están presentes en los progenitores de médula ósea,

macrófagos, mastocitos, eosinófilos, megacariocitos, basófilos, células endoteliales, linfocitos B, linfocitos T y diversas células leucémicas mieloides.

Se ha encontrado a través de estudios de mutagénesis que los aminoácidos S17, N18, D21, E22, T25, E43, M49, R94, P96, R108, F113 y E119 de IL-3 humana son residuos críticos que están expuestos a disolventes y son importantes para la unión de la IL-3 humana al receptor de IL-3 (Immunol Rev. 2012 Nov;250(1):277-302).

El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la producción de autoanticuerpos contra ácidos nucleicos, activación del complemento, deposición del complejo inmune (CI) en la microvasculatura de diversos órganos, particularmente de los riñones. El modelo murino de ratones *MRL/lpr* desarrolla una enfermedad autoinmune espontánea que se asemeja mucho al lupus eritematoso sistémico humano y sus diversas características inmunopatológicas, incluida la aparición de autoanticuerpos (tales como anticuerpos anti-ADNbc, anti-Sm y anti-mieloperoxidasa), hipergammaglobulinemia, complejos inmunes circulante, glomerulonefritis del complejo inmunitario y vasculitis sistémica, sialoadenitis, anomalías de las citocinas como aumento de la producción de IL-1, IL-6, y enfermedades inflamatorias de los pulmones y la piel. Además, en los ratones *MRL/lpr*, los títulos plasmáticos de IL-3 aumentan con la progresión de la enfermedad (véase a continuación, Figura 1), lo que refleja la situación en humanos, en la que los pacientes con LES presentan títulos séricos más altos de IL-3 en comparación con los controles sanos (P Fishman y col. 1993. Interleukin-3 immunoassay in systemic lupus erythematosus patients: preliminary data. Int Arch Allergy Immunol 100:215-218). Los ratones portan la mutación *lpr* en el gen Fas relacionado con la apoptosis, lo que conduce a la acumulación de linfocitos T y B autorreactivas, así como de macrófagos activados.

Los inventores han encontrado que el bloqueo de IL-3 en ratones *MRL/lpr* mediante la administración de un anticuerpo anti-IL-3 reduce significativamente la deposición renal de IgG, los índices de actividad y cronicidad en los riñones y la deposición de colágeno I, reduciendo así los síntomas del LES. En cambio, la administración de IL-3 conduce a un depósito de IgG renal significativamente aumentado, una actividad del lupus más grave en los riñones, y un aumento de la fibrosis renal.

Además, los inventores han realizado observaciones que muestran que la neutralización de IL-3 también tiene un efecto beneficioso en la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), mientras que la inyección de IL-3 recombinante produce una exacerbación de EAE. Estos experimentos se realizaron con ratones C57BL/6 con EAE inducida por péptido MOG, un modelo animal para la esclerosis múltiple humana. Se ha informado que en este sistema modelo, IL-3 se produce después de la reestimulación específica de MOG de linfocitos T CD4⁺ esplénicas, o leucocitos totales de ganglios linfáticos, SNC, sangre y bazo (HH Hofstetter y col., The cytokine signature of MOG-specific CD4 cells in the EAE of C57BL/6 mice. J Neuroimmunol 2005; 170:105-14). Esto refleja la situación en los seres humanos, en la que se sabe que el análisis transcripcional de la expresión de citocinas en muestras de cerebro de pacientes con EM y controles sanos da como resultado un aumento de la expresión de IL-3 en lesiones de EM (SE Baranzini, y col. Transcriptional analysis of multiple sclerosis brain lesions reveals a complex pattern of cytokine expression. J Immunol 2000; 165:6576-82). Por lo tanto, las observaciones en el modelo de ratón permiten concluir que el bloqueo de IL-3 es un objetivo para el tratamiento de la esclerosis múltiple humana.

Basándose en los resultados obtenidos del modelo murino, se puede esperar que el bloqueo de IL-3 en pacientes humanos con LES tenga efectos similares al bloqueo de IL-3 en los modelos de lupus murino en ratones *MRL/lpr*. En seres humanos con nefritis lúpica, se anticipa que se observará menos infiltración celular en el riñón, menos daño agudo y crónico en el riñón, menor depósito de Ig y menos fibrosis.

En pacientes con EM, se anticipa que el bloqueo de IL-3 reducirá la infiltración de leucocitos en el cerebro, especialmente durante los ataques agudos, disminuirá la desmielinización y el daño axonal y, por lo tanto, reducirá los signos clínicos y las complicaciones de la EM.

Los ratones deficientes en IL-3 no tienen un fenotipo manifiesto que sugiera que el bloqueo de IL-3 tiene muchos menos efectos secundarios que las opciones de tratamiento conocidas de la técnica anterior. La IL-3 puede medirse en el suero, plasma o líquido cefalorraquídeo de pacientes con LES y EM, y usarse para seleccionar ciertos subgrupos de pacientes para el tratamiento con bloqueo de IL-3.

En lo sucesivo, se hace referencia a las figuras:

Todos los procedimientos mencionados en las descripciones de las figuras a continuación se realizaron como se describe en detalle en los ejemplos.

La Figura 1 muestra datos de un experimento de captura de citocinas *in vivo* que aborda la cuestión de si se produce IL-3 en ratones *MLR/lpr* y si hay un aumento o disminución en la producción de IL-3 durante la progresión de la enfermedad. Se inyectaron 10 µg de anti-IL-3 marcado con biotina en la vena de la cola de *MRL/lpr* de 8 y 20 semanas de edad. Se extrajo sangre 3 horas después y se ensayó la IL-3 por ELISA. El título de IL-3 en plasma aumentó altamente significativo con el aumento de la edad y la progresión de la enfermedad ($p = 8 \times 10^{-5}$). *** indica significancia ($p < 0,001$)

La Figura 2 muestra los efectos del tratamiento anti-IL-3 en ratones *MRL/lpr* según lo determinado por análisis histológico, análisis de expresión génica por PCR en tiempo real, y análisis de citometría de flujo.

Se trataron ratones macho de 18 semanas de edad (n = 9) con inyecciones intraperitoneales diarias de anti-IL-3 o isotipo (IgG de rata purificada) durante 4 semanas.

A: Las secciones de un ratón tratado con anti-IL-3 o control muestran menos hiper celularidad glomerular, esclerosis segmentaria y focal, esclerosis global, infiltración de leucocitos, depósito de IgG subendotelial en los ratones tratados con anti-IL-3 (tinción con IgG, aumento x10, tinción con ácido periódico de Schiff, aumento x20).

B: Resumen de las puntuaciones histológicas. Puntuaciones de deposición de IgG, actividad e índice de cronicidad. Los valores son la media y SEM.

C: La expresión de ARNm de colágeno I en los riñones se midió por PCR en tiempo real. El colágeno I fue aproximadamente un 40 por ciento menos en los ratones tratados con anti-IL-3 en comparación con los ratones de control.

D: Análisis de citometría de flujo de las células infiltrantes en el riñón de ratones tratados con anti-IL-3 frente a controles. Hay significativamente menos monocitos infiltrantes, subpoblaciones de monocitos, linfocitos T (especialmente CD4⁺) y linfocitos B en el grupo tratado con anti-IL-3 en comparación con el control de isotipo.

** indica significancia (p <0,01). * indica significancia (p <0,05).

La Figura 3 muestra los efectos del tratamiento anti-IL-3 en ratones MRL/lpr sobre la producción de autoanticuerpos y la albuminuria según lo determinado por ELISA y sobre la formación de lesiones cutáneas.

A, B: Los ratones (n = 9) se trataron como se describe en la Figura 2.

A: Los autoanticuerpos antinucleosómicos se midieron en el plasma de ratones tratados con anti-IL-3 o isotipo los días 0, 13 y 28 de tratamiento. No se observó un aumento regular de los títulos de anticuerpos antinucleosómicos en ratones tratados con anti-IL-3.

B: Se recogió orina puntual semanal y se midió la albuminuria mediante ELISA. En el grupo anti-IL-3, la albuminuria se mantuvo estable hasta el día 21 de tratamiento, mientras que hubo un aumento significativo en el grupo control.

C: Ratones macho de 16 semanas de edad recibieron diariamente (7 días/semana) inyecciones i.p. de 100 µg de anticuerpo anti-IL-3 (n = 11) o IgG de rata purificada (n = 13) durante 3 semanas. El tratamiento con anti-IL-3 redujo significativamente el desarrollo de lupus como lesiones cutáneas.

** indica significancia (p <0,01). * indica significancia (p <0,05).

La Figura 4 muestra los efectos de la administración de IL-3 sobre el desarrollo de la nefritis lúpica en MRL/lpr según lo determinado por PCR histológica en tiempo real y análisis de citometría de flujo. Se trataron ratones macho de 16 semanas de edad (n = 13) con inyecciones intraperitoneales diarias de IL-3 o control (PBS) durante 3 semanas.

A: Secciones de un ratón tratado con IL-3 o control. Se observa más hiper celularidad glomerular, esclerosis segmentaria y focal, esclerosis global, infiltración de leucocitos, depósito de IgG subendotelial en ratones tratados con IL-3 que en el control tratado con PBS (tinción con IgG, aumento x10, tinción con ácido periódico de Schiff, aumento x20).

B: Resumen de las puntuaciones histológicas. Puntuaciones de deposición de IgG, actividad e índice de cronicidad. Los valores son la media y SEM.

C: El colágeno I en los riñones se midió por PCR en tiempo real y se aumentó en aproximadamente un 45 por ciento en los ratones tratados con IL-3.

D: Análisis de citometría de flujo de células que se infiltran en el riñón de ratones tratados con IL-3 y controles.

** indica significancia (p <0,01).

La Figura 5 muestra los efectos de IL-3 sobre el desarrollo de LES en ratones MRL/lpr según se determina por citometría de flujo.

Los ratones (n = 13) se trataron como se describe en la Figura 4.

Se identificaron monocitos, basófilos, linfocitos B y T mediante análisis de citometría de flujo en el bazo (A) y la médula ósea (B) de ratones tratados con IL-3 o PBS. No se encontraron diferencias significativas en el número de linfocitos T, incluyendo linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en el bazo y la médula ósea. El número de monocitos y basófilos aumentó significativamente en el bazo y la médula ósea. Además, los neutrófilos y la subpoblación de monocitos GR-1⁺ aumentaron significativamente en ratones tratados con IL-3.

*** indica significancia (p <0,001). ** indica significancia (p <0,01). * indica significancia (p <0,05).

La Figura 6 muestra la estrategia de activación del análisis de citometría de flujo de los riñones.

La Figura 7 muestra la estrategia de activación del análisis de citometría de flujo del bazo.

La Figura 8 muestra la estrategia de activación del análisis de citometría de flujo de la médula ósea.

La Figura 9 muestra los efectos de la aplicación de IL-3 y de la aplicación del anticuerpo anti-IL-3 MP2-8F8 sobre

la liberación de IL-4 por células positivas para DX5 según se determina mediante ELISA. IL-3 induce una liberación pronunciada de IL-4 de las células DX5⁺. La preincubación de IL-3 con el anticuerpo anti-IL-3 MP2-8F8 previene la liberación inducida por IL-3 de IL-4. Por lo tanto, el anticuerpo anti-IL-3 MP2-8F8 tiene una actividad neutralizante en IL-3.

5 La Figura 10 muestra los datos de la puntuación de gravedad clínica y el análisis de citometría de flujo que muestran que el bloqueo de IL-3 con un anticuerpo monoclonal reduce el desarrollo de EAE (tratamiento diario i.p. con anti-IL-3 (50 µg) del día 0-19). Se indujo EAE en ratones C57BL/6 por inmunización con péptido MOG el día 0. Los ratones se trataron diariamente por inyección i.p. de 50 µg de un anticuerpo neutralizante anti-IL-3 (anti-IL-3), 50 µg del anticuerpo desglucosilado anti-IL-3 (anti-IL-3 desglucosilado), o la misma cantidad de IgG de rata purificada (Control) del día 0-19.

A, D: Los síntomas clínicos de EAE (puntuación de EAE) son significativamente más bajos ($p < 0,01$) en ratones tratados con anti-IL-3.

15 B: El número de subpoblaciones de leucocitos que se infiltran en el cerebro se cuantificó mediante citometría de flujo el día 20. CD45⁺ indica el número total de leucocitos CD45⁺, CD19⁺, CD8⁺, CD4⁺ y CD11b⁺ indican el número de linfocitos B CD19⁺, linfocitos T CD8⁺, linfocitos T CD4⁺ y monocitos CD11b⁺ respectivamente.

C: El número de subpoblaciones de leucocitos en la sangre periférica se cuantificó por citometría de flujo el día 20. CD19⁺, CD8⁺ y CD4⁺ indican el número de linfocitos B CD19⁺, linfocitos T CD8⁺ y linfocitos T CD4⁺ respectivamente. Monos y PMN indican el número de monocitos y neutrófilos.

20 E: El día 20, los esplenocitos se reestimularon con el péptido MOG 35-55 o PBS como control durante 3 días y se midió el nivel de IFN- γ , IL-6 e IL-17 en el sobrenadante mediante ELISA.

F: Los leucocitos que se infiltran en el cerebro se cuantificaron mediante citometría de flujo el día 20. Los monocitos (Monos) y los leucocitos totales (CD45⁺) se redujeron significativamente por el bloqueo de IL-3, mientras que los linfocitos T CD4⁺, los linfocitos T CD8⁺ y los linfocitos B CD19⁺ se redujeron significativamente y no son diferentes entre los grupos.

25 G: Las subpoblaciones de leucocitos en la sangre periférica se cuantificaron por citometría de flujo el día 20.

** indica significancia ($p < 0,01$). * indica significancia ($p < 0,05$).

30 La Figura 11 representa los datos de la puntuación de gravedad clínica y el análisis de citometría de flujo que muestran que el bloqueo de IL-3 con un anticuerpo monoclonal reduce el desarrollo de EAE (tratamiento diario i.p. con anti-IL-3 (50 µg) del día 5-19). Se indujo EAE en ratones C57BL/6 por inmunización con péptido MOG el día 0. Los ratones se trataron diariamente por inyección i.p. de 50 µg de un anticuerpo neutralizante anti-IL-3 (anti-IL-3) o la misma cantidad de IgG de rata purificada (Control) desde el día 5-19.

A: Los síntomas clínicos de EAE (puntuación de EAE) son más bajos en ratones tratados con anti-IL-3.

B: El número de subpoblaciones de leucocitos que se infiltran en el cerebro se cuantificó mediante citometría de flujo el día 20.

35 * indica significancia ($p < 0,05$).

40 La Figura 12 representa los datos de la puntuación de gravedad clínica y el análisis de citometría de flujo que muestran que el bloqueo de IL-3 con un anticuerpo monoclonal reduce el desarrollo de EAE (tratamiento diario i.p. con anti-IL-3 (50 µg) del día 10-19). Se indujo EAE en ratones C57BL/6 por inmunización con péptido MOG el día 0. Los ratones se trataron diariamente por inyección i.p. de 50 µg de un anticuerpo neutralizante anti-IL-3 (anti-IL-3) o la misma cantidad de IgG de rata purificada (Control) desde el día 10-19.

A: Los síntomas clínicos de EAE (puntuación de EAE) son más bajos en ratones tratados con anti-IL-3.

B: El número de subpoblaciones de leucocitos que se infiltran en el cerebro se cuantificó mediante citometría de flujo el día 20.

* indica significancia ($p < 0,05$).

45 La Figura 13 muestra datos de puntuación de gravedad clínica y análisis de citometría de flujo que muestran que la inyección de IL-3 recombinante exagera el desarrollo de EAE.

Se indujo EAE en ratones C57BL/6 (H-2^b) mediante inmunización con péptido MOG el día 0. Los ratones se trataron diariamente con inyección i.p. de 200 ng de IL-3 recombinante (IL-3) o PBS como control (PBS) desde el día 5-21.

50 A: Los síntomas clínicos de EAE (puntuación de EAE) son significativamente mayores en ratones tratados con IL-3.

B: El número de subpoblaciones de leucocitos que se infiltran en el cerebro se cuantificó mediante citometría de flujo el día 22.

C: El número de subpoblaciones de leucocitos en la sangre periférica se cuantificó por citometría de flujo el día 22.

55 D: El día 22, los esplenocitos se reestimularon con el péptido MOG 35-55 o PBS como control durante 3 días y se midió el nivel de IFN- γ , IL-17 y TNF en el sobrenadante mediante ELISA.

* indica significancia ($p < 0,05$).

La Figura 14 muestra la secuencia de aminoácidos de la IL-3 humana y diversos fragmentos de la misma.

A: SEQ ID NO: 1: Secuencia de aminoácidos de IL-3 humana.

B: SEQ ID NO: 2: Secuencia de aminoácidos de los residuos 12-15 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

C: SEQ ID NO: 3: Secuencia de aminoácidos de los residuos 29-50 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana.

D: SEQ ID NO: 4: Secuencia de aminoácidos de los 18 aminoácidos más N-terminales de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

E: SEQ ID NO: 5: Secuencia de aminoácidos de los 22 aminoácidos más C-terminales de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana.

F: SEQ ID NO: 6: Secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (alelo alternativo).

G: SEQ ID NO: 7: Secuencia de aminoácidos de los 18 aminoácidos más N-terminales de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana de acuerdo con la SEQ ID NO: 6.

H: Secuencia de aminoácidos de los residuos 17-133 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana.

I: Secuencia de aminoácidos de los residuos 21-133 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana.

La Figura 15 muestra la reducción de la infiltración de leucocitos en el cerebro después del bloqueo de IL-3 con un anticuerpo monoclonal.

EAE se indujo en ratones C57BL/6 mediante inmunización con péptido MOG 35-55 el día 0. Desde el día 0-10, los ratones se trataron con un mAb neutralizante anti-IL-3 (anti-IL-3, 50 $\mu\text{g}/\text{día}$) o IgG de rata purificada (Control, 50 $\mu\text{g}/\text{día}$) ($n = 10/\text{grupo}$) y se analizaron el día 11. Un tercer grupo de ratones C57BL/6 no se inmunizó con el péptido MOG 35-55 y no se trató con anticuerpos (no EAE).

A: El día 11 se cuantificaron los leucocitos infiltrados en el cerebro mediante citometría de flujo. El bloqueo de IL-3 redujo los monocitos cerebrales y los leucocitos totales (CD45^+) en más del 50 %. Los linfocitos T CD4^+ y CD8^+ cerebrales se redujeron al nivel de ratones sanos no inmunizados.

B: La expresión de RANTES (CCL5) y CXCL1 se cuantificó en el cerebro mediante RT-PCR cuantitativa. El bloqueo de IL-3 redujo significativamente la expresión cerebral de RANTES en más del 50 %.

C: Se cultivaron los esplenocitos totales (800.000 células/200 μl) durante 24 o 48 h con varias citocinas (todas 10 ng/ml). RANTES se midió en el sobrenadante por ELISA.

D: Los esplenocitos totales o esplenocitos agotados de células CD11b^+ , Ly6C^+ o CCR2^+ (500.000 células/200 μl) se cultivaron durante 24 h con IL-3 (10 ng/ml). RANTES se midió en el sobrenadante por ELISA.

La Figura 16 muestra los datos obtenidos de un experimento basado en la transferencia adoptiva de leucocitos marcados con CFSE a ratones con EAE incipiente.

Los ratones C57BL/6 (H-2^b) se inmunizaron con el péptido MOG 35-55 el día 0 y se trataron desde el día 0-12 con un anticuerpo neutralizante anti-IL-3 (anti-IL-3, 50 $\mu\text{g}/\text{día}$) o IgG de rata purificada (Control, 50 $\mu\text{g}/\text{día}$) ($n = 7/\text{grupo}$). El día 11, se inyectaron por vía intravenosa esplenocitos marcados con CFSE. Estos esplenocitos se obtuvieron el día 11 de ratones C57B1/6 (H-2^b) que se inmunizaron con el péptido MOG 35-55 el día 0, pero no se trataron con mAb.

A: Cuantificación de leucocitos marcados con CFSE en el cerebro de los receptores el día 13. El bloqueo de IL-3 reduce significativamente el número de linfocitos T, linfocitos B y monocitos positivos para CFSE infiltrantes.

B: Relación de leucocitos marcados con CFSE detectados dentro del cerebro y dentro del bazo. Los monocitos migran mucho más eficientemente al cerebro que los linfocitos T y B.

En lo sucesivo, se hace referencia a los ejemplos, que se dan para ilustrar, no para limitar, la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Animales

Se obtuvieron ratones macho *MRL/lpr* de 6-8 semanas de edad de Harlan Winkelmann GmbH y se mantuvieron en condiciones SPF (libre de patógenos específicos).

Tratamiento de los ratones

Ratones macho de 18 semanas de edad recibieron diariamente (6 días/semana) inyecciones i.p. de 50 μg de un anticuerpo de bloqueo IL-3 (clon MP2-8F8) o IgG de rata purificada (Sigma-Aldrich) durante 4 semanas. Como alternativa, ratones macho de 16 semanas de edad recibieron diariamente (7 días/semana) inyecciones i.p. de 100 μg de anticuerpo anti-IL-3 (clon MP2-8F8) o IgG de rata purificada (Sigma-Aldrich) durante 3 semanas.

Para investigar los efectos de IL-3 en el desarrollo de la nefritis lúpica (una inflamación del riñón causada por el lupus eritematoso sistémico), ratones macho de 16 semanas de edad se trataron diariamente (6 días/semana) por inyecciones i.p. de 200 ng de IL-3 recombinante (PeproTech, Rocky Hill, NJ) o una solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 3 semanas.

5 Puntuación de la piel con lupus

La puntuación de la piel con lupus se evaluó antes y en varios momentos después del tratamiento de ratones de 16 semanas de edad con anticuerpo anti-IL-3 o anticuerpo de control de isotipo. Las lesiones cutáneas se puntuaron por patología general utilizando un grado de 0 a 2 (0 = ninguna; 1 = lesiones en el hocico, orejas y cola; 2 = lesiones en el lomo).

10 ELISA y captura de citocinas *in vivo*

Se inyectaron 10 µg de anti-IL-3 conjugado con biotina (MP2-43D11, rata, IgG2a, k, Biolegend) en 200 µl de PBS estéril en la vena de la cola de ratones MRL/lpr de 8 y 20 semanas de edad. Después de 3 horas, se extrajo sangre de ratones anestesiados mediante punción retrobulbar. Las muestras se almacenaron hasta su uso a -20 °C. La IL-3 en plasma se midió entonces mediante ELISA, de acuerdo con el protocolo del fabricante (BD OptEIA).

15 La concentración de albúmina en la orina se midió por ELISA (Bethyl Laboratories).

Evaluación de glomerulonefritis

Los riñones se fijaron en formalina tamponada al 10 % y se incluyeron en parafina. Se prepararon secciones de cinco micrómetros para la tinción periódica con ácido de Schiff (PAS) siguiendo protocolos de rutina. La gravedad de las lesiones renales se calificó de 0 a 3 utilizando los índices de actividad y cronicidad descritos para la nefritis lúpica humana (HA Austin y col. 1984. Diffuse proliferative lupus nephritis: identification of specific pathologic features affecting renal outcome. *Kidney Int* 25:689-695). La gravedad de los depósitos de IgG glomerular se calificó semicuantitativamente de 0 a 4. Toda la calificación se realizó por un observador cegado.

Citometría de flujo y anticuerpos

Los siguientes anticuerpos marcados con fluorocromo se usaron para citometría de flujo y se obtuvieron en BD Biosciences o eBioscience: anti-CD11b (M1/70), anti-FcεRI (MAR-1), anti-Ly6G/Iy6C (RB6-8c5), anti-F4/80 (BM8), anti-CD19 (eBio1D3), anti-CD8 (53-6.7), anti-CD3e (145-2C11), anti-CD3 (eBio500A2) anti-CD4 (RM4-5), anti-CD45 (30-F11), anti-CD49b (DX5). Las células no fijadas de riñón, bazo o médula ósea se preincubaron durante 10 minutos con anti-CD16/32 (2.G4.2, rata, IgG2b, k, BD) a temperatura ambiente y después luego durante 20 minutos a 4 °C con combinaciones de anticuerpos marcados. Después de una etapa de lavado, los glóbulos rojos se lisaron con una solución de lisis FACS (BD Biosciences) y las muestras se analizaron en un FACSCanto II con el software FACSDIVA (BD Biosciences).

Autoanticuerpos contra el lupus

Los niveles de anticuerpos en suero se determinaron mediante ELISA de antinucleosoma: Las placas ELISA NUNC maxisorp se revistieron con histonas (5 µg/ml) y ADN de células madre embrionarias de ratón (1 µg/ml) durante una noche. Antes del revestimiento de los pocillos de muestra con histonas y ADNbc, las placas se estratificaron con poli-L-lisina (Trevigen) durante 1 h a temperatura ambiente seguido de lavado con tampón de lavado. Después del revestimiento nocturno con histonas y ADNbc, las muestras de suero se analizaron para determinar la IgG antinucleosómica utilizando el kit de detección de IgG de ratón (Bethyl Labs). Se usó suero de referencia con IgG específica como control positivo y para calcular las concentraciones de autoanticuerpos.

40 Transcripción inversa y PCR en tiempo real

El ARNm y la proteína total se aislaron de los riñones mediante el kit RNeasy Midi (Qiagen). El ARN total se transcribió inversamente con oligo(dT) y transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen). La PCR en tiempo real se realizó en un TaqMan Vii A7 utilizando el kit de PCR verde SYBR QuantiTect (Qiagen). Los datos se analizaron con el software ViiA7v1.2.1 (Applied Biosystems). Las secuencias de cebadores fueron: Colágeno I: 5'-TGT TCA GCT TTG TGG ACC TC-3' (directo) (SEQ ID NO: 8) y 5'-TCA AGC ATA CCT CGG GTT TC-3' (inverso) (SEQ ID NO: 9). Los controles que consisten en ddH₂O (agua doblemente destilada) eran negativos para el gen diana y constitutivo, HPRT.

Análisis estadístico

Se calcularon los valores medios ± SEM. La significancia de las diferencias grupales se determinó mediante la prueba t de Student unilateral. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron significativos y se marcaron con un asterisco, si eran inferiores a 0,05, o con dos asteriscos, si eran inferiores a 0,01. Los valores de p inferiores a 0,001 se marcaron con tres asteriscos.

Ejemplo 2

Niveles de IL-3 en ratones *MLR/lpr*

Todos los procedimientos mencionados en este ejemplo se realizaron como se describe en el Ejemplo 1.

5 En este Ejemplo, se examinó si se produce IL-3 en ratones *MLR/lpr* y si hay un aumento o disminución en la producción de IL-3 durante la progresión de la enfermedad. Los niveles de IL-3 en plasma se midieron por captura de citocinas *in vivo* en ratones *MRL/lpr* de 8 y 20 semanas de edad ($n = 4$ /punto de tiempo). A las 8 semanas, cuando los ratones no muestran signos de lupus sistémico, los niveles de IL-3 en plasma fueron bajos (20 pg/ml) pero aumentaron significativamente hasta la semana 20 (118 pg/ml) (Figura 1).

Ejemplo 3

El tratamiento con el anticuerpo monoclonal IL-3 en el lupus sistémico temprano mejora la nefritis lúpica

10 Todos los procedimientos mencionados en este ejemplo se realizaron como se describe en el Ejemplo 1.

15 Para investigar si el aumento de los niveles de IL-3 contribuye al desarrollo de la nefritis lúpica, los ratones se trataron con un anticuerpo de bloqueo contra IL-3. Ratones macho de 18 semanas de edad ($n = 9$) recibieron diariamente inyecciones i.p. de 50 μ g de anticuerpo anti-IL-3 (clon MP2-8F8), mientras que el grupo control recibió la misma cantidad de un anticuerpo de control ($n = 9$). Los ratones se trataron durante 28 días y se analizaron un día después de la última inyección. El análisis histológico de los riñones mostró una puntuación significativamente menor para la actividad del lupus y el daño crónico en los animales tratados con anti-IL-3. Además, se encontraron significativamente menos depósitos de IgG en los riñones del grupo tratado con anti-IL-3 (Figura 2 A,B).

20 El análisis por citometría de flujo de la suspensión de células individuales de los riñones (estrategia de activación mostrada en la Figura 6) reveló una disminución significativa de los monocitos CD11b⁺ infiltrantes en ratones tratados con anti-IL-3. Ambos monocitos Gr1⁺ y Gr1⁻ se redujeron. Además, la infiltración de los riñones con los linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺, así como linfocitos B CD19⁺ se redujo significativamente. (Figura 2 D).

La fibrosis renal medida por PCR en tiempo real de colágeno I disminuyó en un 30 % en los ratones tratados con anti-IL-3 (Figura 2 C).

Ejemplo 4

25 El tratamiento anti-IL-3 disminuye la albuminuria urinaria y los autoanticuerpos contra el lupus en el plasma

Todos los procedimientos mencionados en este ejemplo se realizaron como se describe en el Ejemplo 1.

Se recogió orina puntual semanal y se midió la albuminuria mediante ELISA. En el grupo anti-IL-3, la albuminuria permaneció aproximadamente estable hasta el día 21 de tratamiento y fue significativamente menor que en el grupo control. Al final del experimento (día 28) las diferencias ya no eran significativas (Figura 3 B).

30 Se extrajo sangre semanalmente para medir los autoanticuerpos mediante ELISA. No hubo diferencias significativas en la cantidad de autoanticuerpos Smith o ADNbc. Sin embargo, los autoanticuerpos antinucleosómicos fueron significativamente menores en los ratones tratados con anti-IL-3 el día 28 de tratamiento. En el grupo de control hubo un aumento continuo de anticuerpos antinucleosomas desde el día 0 hasta el 28 (Figura 3 A).

Ejemplo 5

35 El tratamiento anti-IL-3 disminuye las manifestaciones de lupus en la piel

Todos los procedimientos mencionados en este ejemplo se realizaron como se describe en el Ejemplo 1.

40 Ratones macho de 16 semanas de edad recibieron diariamente (7 días/semana) inyecciones i.p. de 100 μ g de anticuerpo anti-IL-3 (clon MP2-8F8) o IgG de rata purificada (Sigma-Aldrich) durante 3 semanas. La puntuación de la piel se evaluó en una escala de 0-2. Los ratones tratados con anticuerpos de control desarrollaron lesiones cutáneas similares al lupus, mientras que el tratamiento con anti-IL-3 evitó casi por completo el desarrollo de lesiones cutáneas (Figura 3C).

Ejemplo 6

La administración de IL-3 agrava la nefritis lúpica

Todos los procedimientos mencionados en este ejemplo se realizaron como se describe en el Ejemplo 1.

45 En este Ejemplo, se investigó si la administración de IL-3 durante la progresión de la aparición de la enfermedad aumenta la incidencia y la gravedad de la glomerulonefritis. Se trataron ratones macho de 16 semanas de edad ($n = 12$) durante 21 días con inyecciones i.p. de 100 ng de IL-3 recombinante, mientras que el grupo de control ($n = 13$) recibió el mismo volumen de PBS. La aplicación de IL-3 aumentó significativamente la puntuación histológica para la actividad y depósitos de IgG en los riñones (Figura 4 A,B). También hubo una tendencia a un mayor índice de

cronicidad en los riñones de los ratones tratados con IL-3. El análisis de citometría de flujo no reveló diferencias significativas en el número de células que se infiltran en los riñones (linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ o negativos dobles; la estrategia de activación se muestra en la Figura 6) (Figura 4 D). La fibrosis renal medida por PCR en tiempo real de colágeno I aumentó en un 45 % en ratones tratados con IL-3 (Figura 4 C).

5 **Ejemplo 7**

La administración de IL-3 aumenta la albuminuria urinaria y los autoanticuerpos de lupus en el plasma

Todos los procedimientos mencionados en este ejemplo se realizaron como se describe en el Ejemplo 1.

Se recogió orina puntual semanal y se midió la albuminuria mediante ELISA. No hubo diferencias significativas en la albuminuria entre el grupo tratado con IL-3 y el grupo control.

10 Bajo la administración de IL-3 no se detectaron diferencias significativas entre los títulos de Smith, ADNbc o autoanticuerpos nucleosómicos.

Ejemplo 8

La administración de IL-3 provoca un aumento de monocitos y basófilos en bazo y médula ósea

Todos los procedimientos mencionados en este ejemplo se realizaron como se describe en el Ejemplo 1.

15 Se trataron ratones macho de 16 semanas de edad (n = 13) con inyecciones intraperitoneales diarias de IL-3 o control (PBS) durante 3 semanas.

En los análisis de citometría de flujo, se encontró que la inyección de IL-3 aumenta el número de basófilos, monocitos CD11b⁺ y neutrófilos en el bazo y la médula ósea (Figura 5; estrategias de activación mostradas en las Figuras 7-8). No se observaron diferencias en los linfocitos T, subpoblaciones de linfocitos T o linfocitos B en la médula ósea o el bazo.

20

Ejemplo 9

Actividad neutralizante del anticuerpo anti-IL-3 MP2-8F8

Se aislaron células positivas para DX5 (principalmente basófilos) de la médula ósea de ratones C57BL/6 usando perlas magnéticas (Miltenyi). La IL-3 de ratón recombinante (1 ng/ml) se incubó previamente con diversas concentraciones de anticuerpo anti-IL-3 (MP2-8F8) durante 30 min a temperatura ambiente. Después, se añadieron células DX5⁺ (20.000 células/pocillo) y se incubaron en un volumen total de 200 µl durante 24 h. La IL-4 se midió en el sobrenadante con un ELISA comercial de Becton-Dickinson.

25

Como se puede ver a partir de los datos representados en la Figura 9, IL-3 induce una liberación pronunciada de IL-4 de las células DX5⁺. La preincubación de IL-3 con las concentraciones indicadas de anticuerpo anti-IL-3 MP2-8F8 previene la liberación inducida por IL-3 de IL-4.

30

Ejemplo 10

Inducción de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)

El día 0, se inmunizaron por vía subcutánea ratones C57BL/6 hembra de 8-12 semanas de edad en ambos costados con un total de 100 µl de solución que contenía 200 µg de péptido MOG (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK, también denominado péptido MOG 35-55) en adyuvante completo de Freund (Sigma F5506) que contenía 1 mg de *M. butyricum* (Becton Dickinson 264010). Los días 0 y 2 se inyectaron i.p. ratones con 0,25 µg de toxina pertussis de *B. pertussis* (Sigma P7208) disuelto en 200 µl de PBS que contenía albúmina de suero bovino al 1 %. Se observaron diariamente animales individuales y un investigador cegado evaluó las puntuaciones clínicas de la siguiente manera: 0 = sin enfermedad clínica, 1 = pérdida del tono de la cola solamente, 2 = parálisis parcial de las patas traseras, 3 = parálisis completa de las patas traseras y una pata delantera, 4 = parálisis completa de las patas traseras y parálisis parcial o completa de ambas patas delanteras, y 5 = parálisis completa de todas las patas o muerte. Los ratones se mantuvieron bajo condiciones específicas libres de patógenos (SPF) en la instalación central de animales del University of Regensburg Hospital y obtuvieron agua y alimento a voluntad con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas.

35

40

Tratamiento de los ratones

Los ratones se trataron como se indica en las leyendas de las figuras por inyección i.p. de 50 µg de anticuerpo anti-IL-3 purificado (clon MP2-8F8, Biozol), 50 µg de anticuerpo anti-IL-3 purificado y desglucosilado o la misma cantidad de IgG de rata purificada (Jackson Immunoresearch). Como alternativa, los ratones se trataron diariamente por inyección i.p. de 200 ng de IL-3 recombinante o PBS como control. La desglucosilación del anticuerpo anti-IL-3 se realizó durante la noche a 37 °C con péptido-N-glucosidasa F (New England Biolabs) usando la enzima 2000 U para 1 mg de anticuerpo y posterior dialización contra PBS. Para verificar la desglucosilación completa mediante ELISA,

50

las placas se revistieron durante una noche con diversas concentraciones de anticuerpo anti-IL-3 intacto o desglucosilado, se lavaron con PBS/Tween 20 al 0,05 %, se bloquearon con solución de bloqueo Carbo-Free y se detectaron con aglutinina de Lens Culinaris biotinilada, seguido de Estreptavidina-HRP (Vectorlabs, Burlingame, CA).

Agotamiento de subconjuntos de leucocitos y cultivo de esplenocitos

- 5 Los esplenocitos de ratones inmunizados y no inmunizados se agotaron de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con perlas magnéticas dirigidas contra columnas CD4 y CD8 y LD (Miltenyi Biotec). Para analizar la liberación específica de péptido MOG de citocinas, se cultivaron esplenocitos totales o esplenocitos agotados de un subconjunto de linfocitos T específicos (2 células Mio/pocillo) durante 3 días con o sin péptido MOG (20 µg/ml) en placas de fondo plano de 96 pocillos en un volumen total de 250 µl de medio (RPMI 1640 con FCS inactivado por calor al 10 %, penicilina/estreptomina, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio 1 mM y 2-mercaptoetanol 50 µM). La concentración de citocinas (IL-3, IFN-γ, GM-CSF, IL-6, TNF) en el sobrenadante del cultivo se determinó mediante ELISA (BioLegend y BD Bioscience). Para medir la liberación de RANTES (ELISA de R&D Systems), se incubaron esplenocitos totales o esplenocitos agotados de células CD11b⁺, Ly6C⁺ o CCR2⁺ durante 24 o 48 h con diversas citocinas (todas 10 ng/ml, obtenidas de Peprotech) en un volumen de 200 µl.

15 Citometría de flujo de sangre periférica y tejido cerebral

- Se extrajo sangre periférica del plexo venoso retroorbital de ratones anestesiados y se anticoaguló con EDTA. Las suspensiones de células individuales de tejido cerebral se prepararon de la siguiente manera. Los ratones se sacrificaron con dióxido de carbono y se les perfundieron por vía transcardíaca 20 ml de NaCl al 0,9 %. La mitad del cerebro se cortó en trozos pequeños y se prensó a través de un filtro de células de 100 µm en un volumen total de 1 ml. Después de la centrifugación, las células se resuspendieron en 8 ml de Percoll al 40 %. 2 ml de Percoll al 80 % se recubrieron y se centrifugaron durante 20 minutos a 2.000 rpm. Las células en la interfase se recuperaron y se lavaron una vez en medio RPMI con FCS al 10 %. Para la citometría de flujo, las células se preincubaron durante 10 min en hielo con bloque Fc (clon 2.4G2; 5 µg/ml) y después se tiñeron con combinaciones de anticuerpos directamente marcados durante 25 min. Los siguientes anticuerpos se obtuvieron en BD Bioscience y eBioscience: anti-CD4 (clon RM4-5), anti-CD8 (clon 53-6.7), anti-CD19 (clon eBio1D3), anti-CD11b (clon M1/70), anti-CD45 (clon 30-F11), anti-Ly-6G (clon 1A8). Los glóbulos rojos se lisaron con solución de lisis FACS (BD Biosciences) y las muestras se analizaron en un FACSCantoll (BD Biosciences) con el software FlowJo (Tree Star). Para el análisis, los leucocitos se activaron primero de acuerdo con sus propiedades FSC-SSC y la expresión de marcadores de superficie se mostró en los leucocitos totales. El número de células se cuantificó usando perlas de recuento (Invitrogen).

- 30 Para la tinción intracelular de las citocinas, los esplenocitos se activaron con PMA (10 ng/ml), ionomicina (1 µg/ml) y brefeldina A (5 µg/ml) durante 3 horas. Después de la tinción con anti-CD4 (RM4-5) y anti-CD8 (clon 53-6.7), las células se trataron con soluciones Fix-Perm y Perm-Wash (BD Bioscience) incubadas con bloque Fc (clon 2.4G2; 5 µg/ml) y se tiñeron intracelularmente con anticuerpos contra IL-3 (clon MP2-8F8), GM-CSF (clon MP1-22E9), e IFN-γ (clon XMG1.2).

35 RT-PCR cuantitativa

- El tejido del SNC se congeló en nitrógeno líquido. El ARN total se aisló con un kit RNeasy Mini (Qiagen GmbH, Alemania) y se transcribió inversamente con oligo(dT) y transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen). La PCR en tiempo real se realizó utilizando el kit de PCR verde SYBR QuantiTect (Qiagen GmbH) o ensayos de expresión génica TaqMan (Applied Biosystems) y el sistema de PCR en tiempo real de Applied Biosystems ViiA™ 7. Se usaron los siguientes cebadores: CCL-5 (RANTES), 5'-AGCAGCAAGTGCTCCAATCT-3' (directo) (SEQ ID NO: 10) y 5'-GGGAAGCGTATACAGGGTCA-3' (inverso) (SEQ ID NO: 11); CXCL1, 5'-ATCCAGAGCTTGAAGGTGTTG-3' (directo) (SEQ ID NO: 12) y 5'-GTCTGTCTTCTTTCTCCGTTACTT-3' (inverso) (SEQ ID NO: 13); β-Actina, 5'-ACCCGCGAGCACAGCTTCTTTG-3' (directo) (SEQ ID NO: 14) y 5'-ACATGCCGGAGCCGTTG TCGAC-3' (inverso) (SEQ ID NO: 15). Se usaron las siguientes sondas TaqMan: Mm01545399 (Hprt1), Mm00439631 (IL-3), Mm00439619 (IL-17a), Mm01290062 (GM-CSF) y Mm99999071 (IFN-γ). Los datos se analizaron con el software ViiA™ 7 (Applied Biosystems). La expresión de cada gen se calculó en función de su curva estándar y el umbral del ciclo (CT) de detección de señal y se presenta en relación con la expresión de Hprt1 para IL-3, IL-17, IFN-γ y GM-CSF o β-Actina para CCL-5 y CXCL-1.

Estadística

- 50 Los datos se representan como media. Las barras de error indican el error estándar de la media. La significancia se calculó con una prueba T de Student unilateral. Un asterisco indica p <0,05, dos asteriscos p <0,01 y tres asteriscos p <0,001.

Ejemplo 11

Todos los procedimientos mencionados en este ejemplo se realizaron como se describe en el Ejemplo 10.

- 55 Se indujo EAE en ratones C57BL/6 por inmunización con péptido MOG. La actividad de IL-3 se bloqueó por inyección i.p. de 50 µg de un anticuerpo neutralizante anti-IL-3 (anticuerpo monoclonal MP2-8F8). Como control, se inyectó la

misma cantidad de IgG de rata purificada. El tratamiento de los ratones se inició inmediatamente después de la inmunización (día 0), el día 5 después de la inmunización o 10 días después de la inmunización, y continuó hasta el penúltimo día del experimento (Figura 10: tratamiento i.p. diario con anti-IL-3 (50 µg) del día 0-19; Figura 11: tratamiento i.p. diario con anti-IL-3 (50 µg) del día 5-19; Figura 12: tratamiento i.p. diario con anti-IL-3 (50 µg) del día 10-19).

Como se muestra en la Figura 10A, 11A y 12A, la neutralización de IL-3 redujo significativamente el desarrollo de signos clínicos de EAE. Cuando se inició el tratamiento el día 0, la gravedad de los síntomas de EAE se redujo significativamente del día 10 al día 20. Cuando se inició el tratamiento el día 5, hubo reducciones significativas los días 10, 13 y 16. La inhibición de IL-3 del día 10-19 redujo significativamente los síntomas de EAE los días 16-18. Estos datos sugieren que los efectos beneficiosos de los anticuerpos anti-IL-3 se hacen visibles solo después de un par de días y que el tratamiento es más eficaz si se inicia el día 0. A medida que se produce la infiltración de células en el cerebro antes de que se desarrollen síntomas clínicos de EAE (es decir, antes del día 9), se puede suponer que la IL-3 media procedimientos inflamatorios y autoinmunes tempranos en el cerebro.

El día 20 del experimento que conduce a la Figura 10A, las células infiltrantes en el cerebro se cuantificaron por citometría de flujo. De acuerdo con el curso temporal de la Figura 10A, el número de linfocitos T y B cerebrales fue bajo en ambos grupos. Sin embargo, los monocitos fueron detectables en cantidades considerables y se redujeron en aproximadamente un 35 % en el grupo anti-IL-3 (Figura 10B). La reestimulación de esplenocitos con el péptido MOG 35-55 se realizó para cuantificar la respuesta inmunológica celular contra MOG. La liberación específica de MOG de IFN-γ, IL-17 o IL-6 no se redujo en ratones tratados con anti-IL-3, lo que indica que el bloqueo de IL-3 no interfiere con la eficacia de la inmunización y la respuesta inmunológica contra MOG (Figura 10E).

Se investigó adicionalmente si el anticuerpo anti-IL-3 desglucosilado es tan eficiente como el anticuerpo parental. Para ese fin, se indujo EAE y los ratones se trataron desde el día 0-19 con el anticuerpo anti-IL-3 MP2-8F8 desglucosilado. Como se muestra en las Figuras 10D y 10F, el anticuerpo anti-IL-3 desglucosilado provoca una inhibición significativa de los síntomas de EAE y reduce la infiltración del cerebro con monocitos, lo que indica que el bloqueo de IL-3 es suficiente para suprimir EAE, y el agotamiento de IL-3, por ejemplo, a través de células positivas para el receptor Fc no contribuye a la actividad *in vivo* del anticuerpo IL-3. En la sangre periférica, el número de linfocitos T, linfocitos B o monocitos no se cambió significativamente por el bloqueo de IL-3 (Figura 10G).

En un experimento adicional, los niveles de IL-3 se aumentaron artificialmente diariamente por inyección i.p. de IL-3 recombinante (200 ng) desde el día 5-21. En contraste con la neutralización de IL-3, la inyección de IL-3 recombinante exacerbó significativamente los síntomas de EAE como se observa en los días 17-18 y 20-22 (Figura 13A).

La cuantificación de citometría de flujo de células que se infiltran en el cerebro mostró una reducción del número de leucocitos CD45⁺ totales en ratones tratados con anti-IL-3 (Figura 10B, 11B, 12B). En algunos casos también hubo una reducción en la infiltración de linfocitos T CD4⁺ y monocitos CD11b⁺. En cambio, el tratamiento con IL-3 recombinante aumentó significativamente el número de leucocitos totales infiltrantes, linfocitos B y linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ (Figura 13B).

Al final de los experimentos, se analizó además si el tratamiento con anti-IL-3 (desde el día 0) o IL-3 desde el día 5 altera el número de subconjuntos de leucocitos en la sangre periférica (Figura 10C, 13C). No se observaron cambios después del tratamiento con IL-3 y se observó una ligera reducción en el número de monocitos después del tratamiento con anti-IL-3. IL-3 también afectó a la respuesta inmunológica contra el péptido MOG 35-55, ya que el tratamiento de ratones con IL-3 aumentó la liberación específica de antígeno de IL-17 y TNF de los esplenocitos reestimulados con el péptido MOG 35-55 el día 22 (Figura 13D). Estos datos indican que el número de células que se infiltran en el cerebro y los cambios en los síntomas de EAE no son solo un reflejo del aumento o disminución del número de subconjuntos de leucocitos en la sangre periférica.

Ejemplo 12

Todos los procedimientos mencionados en este ejemplo se realizaron como se describe en el Ejemplo 10.

Se indujo EAE en ratones C57BL/6 por inmunización con péptido MOG el día 0. Los ratones se trataron diariamente por inyección i.p. de 50 µg del anticuerpo neutralizante anti-IL-3 MP2-8F8 (anti-IL-3) o 50 µg de IgG de rata purificada (Control) desde el día 0-10. Los ratones se analizaron el día 11. Además, se analizaron ratones C57BL/6 sanos del mismo sexo y edad, mantenidos en la misma sala sin inducción de EAE (sin EAE inducida).

Como se muestra en la Figura 15A, el número de subpoblaciones de leucocitos que se infiltran en el cerebro se cuantificó mediante citometría de flujo el día 11. CD45⁺ indica el número total de leucocitos CD45⁺, CD19⁺. CD8⁺, CD4⁺ y CD11b⁺ indican el número de linfocitos B CD19⁺, linfocitos T CD8⁺, linfocitos T CD4⁺ y monocitos CD11b⁺ respectivamente. La importancia se calculó en relación con el grupo control. Media +/- SEM.

En ratones inmunizados con MOG, el bloqueo de IL-3 redujo notablemente el influjo cerebral de linfocitos T CD4⁺, linfocitos T CD8⁺, linfocitos B y monocitos (Figura 15A). El número de linfocitos T infiltrantes se redujo casi al nivel de controles sanos. Los monocitos infiltrantes se redujeron en más del 50 % en el grupo anti-IL-3. Por PCR en tiempo real se cuantificó la expresión de CCL-5 (RANTES) y CXCL1 en el cerebro. Se ha descrito anteriormente que ambas

quimiocinas son importantes para la migración de leucocitos al cerebro en este modelo. El bloqueo de IL-3 redujo la expresión cerebral de CCL-5 en aproximadamente un 50 %, pero tuvo poco impacto en la expresión de CXCL-1, lo que sugiere que la inhibición de CCL-5 contribuye a los efectos beneficiosos de los mAb anti-IL-3 (Figura 15B).

5 Para investigar más a fondo el impacto de IL-3 en la liberación de RANTES, se cultivaron esplenocitos de ratones C57BL/6 con IL-3 y se midió la producción de RANTES. Entre una diversidad de citocinas que incluyen IFN- γ , TNF y GM-CSF, IL-3 indujo la liberación más fuerte de RANTES, mientras que IL-4, IL-6 y M-CSF fueron ineficaces o incluso supresores (Figura 15C). Se usó el agotamiento de subconjuntos de leucocitos de esplenocitos aislados para identificar las células diana de IL-3. La mayor parte de la liberación inducida por IL-3 de RANTES se deriva de los monocitos CD11b⁺Ly6C⁺CCR2⁺, ya que el agotamiento de estas células anuló casi por completo la liberación de RANTES (Figura 15D).

Ejemplo 13

Todos los procedimientos mencionados en este ejemplo se realizaron como se describe en el Ejemplo 10.

15 Para demostrar la importancia de IL-3 para la migración de leucocitos hacia el cerebro y excluir que el bloqueo de IL-3 interfiera con la respuesta inmunológica contra MOG, los esplenocitos marcados con CFSE obtenidos de ratones donantes inmunizados con MOG 11 días después de la inmunización con el péptido MOG 35-55 se transfirieron adoptivamente a ratones receptores. Los ratones donantes no se trataron con mAb anti-IL-3. Los receptores se inmunizaron con el péptido MOG 35-55, se trataron diariamente con anti-IL-3 o IgG de rata desde el día 0-12 y se les inyectaron i.v. los esplenocitos marcados con CFSE el día 11. El día 13 se cuantificó el número de leucocitos marcados con CFSE en el cerebro y el bazo. El bloqueo de IL-3 redujo la migración de monocitos al SNC en un 71 %, la migración de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en un 56 % y 68 %, respectivamente, y la migración de linfocitos B en un 68 % (Figura 20 16A). Además, se calculó la relación de células marcadas con CFSE en el SNC y el bazo para determinar si los subconjuntos de leucocitos difieren en su capacidad de migrar al cerebro. Curiosamente, los monocitos migraron aproximadamente 10 veces más eficientemente al cerebro que los linfocitos T y los linfocitos B (Figura 16B). De nuevo, el bloqueo de IL-3 redujo significativamente la migración de leucocitos al cerebro.

25 Las características de la presente invención desveladas en la memoria descriptiva, las reivindicaciones y/o en los dibujos adjuntos pueden, tanto por separado como en cualquier combinación de las mismas, servir de material para realizar la invención en diversas formas de la misma.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Universitätsklinikum Regensburg
- 30 <120> Bloqueo de IL-3 en lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple
- <130> U30520WO
- <150> EP 13 005 166.7
- <151> 31/10/2013
- <160> 15
- 35 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 133
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 40 <400> 1

ES 2 764 209 T3

Ala Pro Met Thr Gln Thr Thr Pro Leu Lys Thr Ser Trp Val Asn Cys
1 5 10 15

Ser Asn Met Ile Asp Glu Ile Ile Thr His Leu Lys Gln Pro Pro Leu
20 25 30

Pro Leu Leu Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gly Glu Asp Gln Asp Ile Leu
35 40 45

Met Glu Asn Asn Leu Arg Arg Pro Asn Leu Glu Ala Phe Asn Arg Ala
50 55 60

Val Lys Ser Leu Gln Asn Ala Ser Ala Ile Glu Ser Ile Leu Lys Asn
65 70 75 80

Leu Leu Pro Cys Leu Pro Leu Ala Thr Ala Ala Pro Thr Arg His Pro
85 90 95

Ile His Ile Lys Asp Gly Asp Trp Asn Glu Phe Arg Arg Lys Leu Thr
100 105 110

Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala Gln Gln Thr Thr Leu
115 120 125

Ser Leu Ala Ile Phe
130

5 <210> 2
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Trp Val Asn
1

10 <210> 3
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Gln Pro Pro Leu Pro Leu Leu Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gly Glu Asp
1 5 10 15

Gln Asp Ile Leu Met Glu
20

15 <210> 4
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 764 209 T3

<400> 4

Ala Pro Met Thr Gln Thr Thr Pro Leu Lys Thr Ser Trp Val Asn Cys
 1 5 10 15

Ser Asn

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Thr Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala Gln Gln Thr Thr
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Ala Ile Phe
 20

<210> 6

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Pro Met Thr Gln Thr Thr Ser Leu Lys Thr Ser Trp Val Asn Cys
 1 5 10 15

Ser Asn Met Ile Asp Glu Ile Ile Thr His Leu Lys Gln Pro Pro Leu
 20 25 30

Pro Leu Leu Asp Phe Asn Asn Leu Asn Gly Glu Asp Gln Asp Ile Leu
 35 40 45

Met Glu Asn Asn Leu Arg Arg Pro Asn Leu Glu Ala Phe Asn Arg Ala
 50 55 60

Val Lys Ser Leu Gln Asn Ala Ser Ala Ile Glu Ser Ile Leu Lys Asn
 65 70 75 80

Leu Leu Pro Cys Leu Pro Leu Ala Thr Ala Ala Pro Thr Arg His Pro
 85 90 95

Ile His Ile Lys Asp Gly Asp Trp Asn Glu Phe Arg Arg Lys Leu Thr
 100 105 110

Phe Tyr Leu Lys Thr Leu Glu Asn Ala Gln Ala Gln Gln Thr Thr Leu
 115 120 125

Ser Leu Ala Ile Phe
 130

<210> 7

ES 2 764 209 T3

<211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Pro Met Thr Gln Thr Thr Ser Leu Lys Thr Ser Trp Val Asn Cys
 1 5 10 15

5 Ser Asn

<210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador directo (Colágeno I)

<400> 8
 tggtcagctt tgtggacctc 20

15 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador inverso (Colágeno I)

20 <400> 9
 tcaagcatac ctcgggtttc 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo (CCL-5)

<400> 10
 agcagcaagt gctccaatct 20

30 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador inverso (CCL-5)

<400> 11
 gggaagcgta tacaggtca 20

40 <210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador directo (CXCL1)

45 <400> 12
 atccagagct tgaaggtgtt g 21

<210> 13
 <211> 24

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador inverso (CXCL1)

 5 <400> 13
 gtctgtcttc tttctccgtt actt 24

 <210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador directo (beta-Actina)

 <400> 14
 acccgcgagc acagcttctt tg 22

 15 <210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Cebador inverso (beta-Actina)

 <400> 15
 acatgccgga gccgttgtcg ac 22

 5

 1

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o un fragmento de unión a IL-3 del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune que es lupus eritematoso sistémico.
- 5 2. El anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o fragmento de unión a IL-3 del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune que es lupus eritematoso sistémico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad autoinmune **está caracterizada por** un nivel elevado de IL-3 en plasma en comparación con un estado saludable.
- 10 3. El anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o fragmento de unión a IL-3 del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune que es lupus eritematoso sistémico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3, se administra a un paciente que lo necesite y en el que dicho paciente es un ser humano.
- 15 4. El anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o fragmento de unión a IL-3 del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune que es lupus eritematoso sistémico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo neutralizante anti-IL-3 es un anticuerpo monoclonal, policlonal o quimérico, o una combinación de los mismos.
- 20 5. El anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o fragmento de unión a IL-3 del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune que es lupus eritematoso sistémico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, no es inmunógeno en un sujeto humano.
- 25 6. El anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o fragmento de unión a IL-3 del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune que es lupus eritematoso sistémico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, se une a la proteína IL-3 humana.
- 30 7. El anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o fragmento de unión a IL-3 del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune que es lupus eritematoso sistémico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, se une a IL-3 humana, con una afinidad (K_D) de al menos 10^{-5} M medida por resonancia por plasmón superficial.
- 35 8. El anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o fragmento de unión a IL-3 del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune que es lupus eritematoso sistémico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la unión de dicho anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, a IL-3 evita que IL-3 se una y/o active el receptor de interleucina-3.
- 40 9. El anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o fragmento de unión a IL-3 del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune que es lupus eritematoso sistémico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en el que dicho anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, es capaz de disminuir el nivel plasmático de IL-3 no unida en dicho paciente tras la administración de dicho anticuerpo o fragmento del mismo a dicho paciente.
- 45 10. El anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o fragmento de unión a IL-3 del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune que es lupus eritematoso sistémico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, se une a una porción de la secuencia de aminoácidos de IL-3, cuya porción consiste en
 - a) residuos 12-15 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (SEQ ID NO: 2),
 - b) residuos 29-50 de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (SEQ ID NO: 3),
 - c) los 18 aminoácidos más N-terminales de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (SEQ ID NO: 4), o
 - d) los 22 aminoácidos más C-terminales de la secuencia de aminoácidos de IL-3 humana (SEQ ID NO: 5).
- 50 11. El anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o fragmento de unión a IL-3 del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune que es lupus eritematoso sistémico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, compete con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6, depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de depósito DSM ACC3163; y
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4, depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de depósito DSM ACC3164;
 en un ensayo de unión competitiva.
12. El anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o fragmento de unión a IL-3 del mismo, para su uso en el tratamiento de una

enfermedad autoinmune que es lupus eritematoso sistémico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región V_H de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- 5 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6, depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de depósito DSM ACC3163; y
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4, depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de depósito DSM ACC3164;

10 o que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 98 %, más preferentemente al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región V_H de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6, depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de depósito DSM ACC3163; y anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4, depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de depósito DSM
 15 ACC3164;

y/o
 en el que dicho anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región V_L de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- 20 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6, depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de depósito DSM ACC3163; y
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4, depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de depósito DSM ACC3164;

25 o que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 90 %, preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 98 %, más preferentemente al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región V_L de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- 30 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6, depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de depósito DSM ACC3163; y
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4, depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de depósito DSM ACC3164.

13. El anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o fragmento de unión a IL-3 del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune que es lupus eritematoso sistémico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo neutralizante anti-IL-3 se selecciona del grupo que consiste en

- 35 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6, depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de depósito DSM ACC3163; y
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4, depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de depósito DSM ACC3164;

y/o dicho fragmento de unión a IL-3 de los mismos es un fragmento de unión a IL-3 de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en

- 40 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 11.14.6, depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de depósito DSM ACC3163; y
 - anticuerpo monoclonal anti-IL-3 Clon 13.4.4, depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) con el número de depósito DSM ACC3164.

45 14. El anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o fragmento de unión a IL-3 del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune que es lupus eritematoso sistémico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores,

50 en el que dicho anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o dicho fragmento de unión a IL-3 del mismo, es capaz de reducir la infiltración celular en el riñón, reducir el daño agudo en el riñón, reducir el daño crónico en el riñón, reducir la deposición de inmunoglobulina en el riñón y reducir la fibrosis en el riñón en dicho paciente tras la administración de dicho anticuerpo, o fragmento del mismo, a dicho paciente.

15. Una composición farmacéutica que comprende al menos un vehículo, diluyente y/o excipiente y un anticuerpo neutralizante anti-IL-3, o fragmento de unión a IL-3 del mismo, como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune que es lupus eritematoso sistémico.

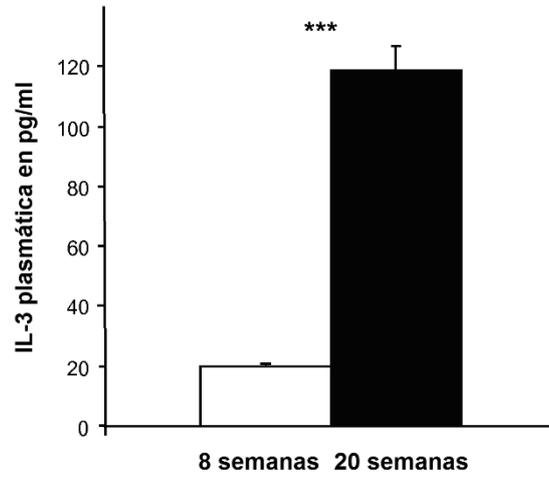
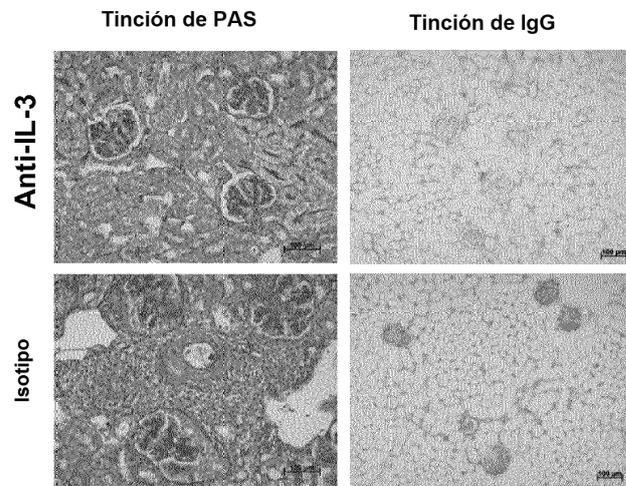


Figura 1

A



B

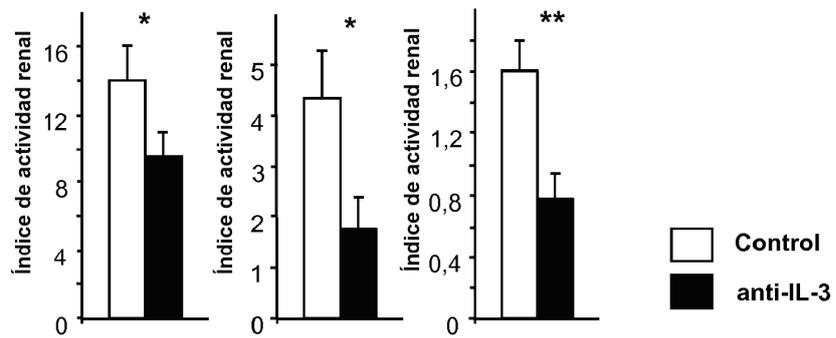


Figura 2 A, B

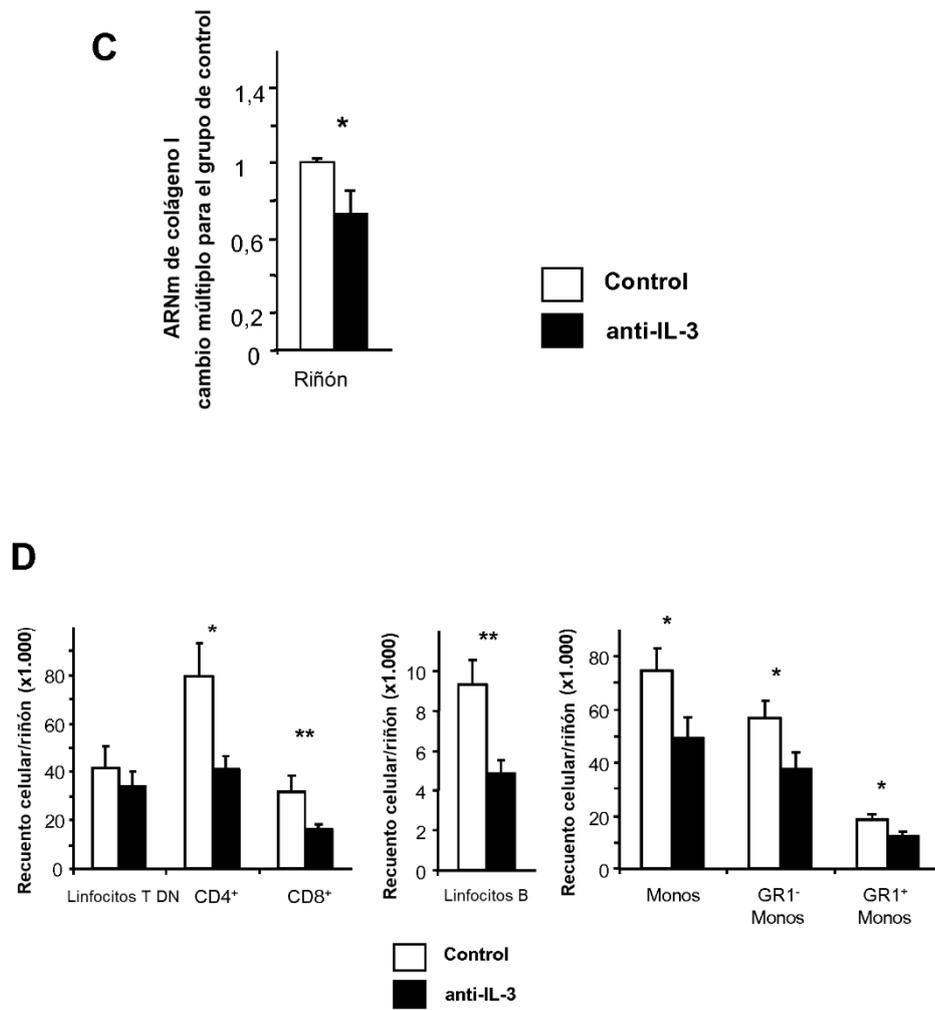


Figura 2 C, D

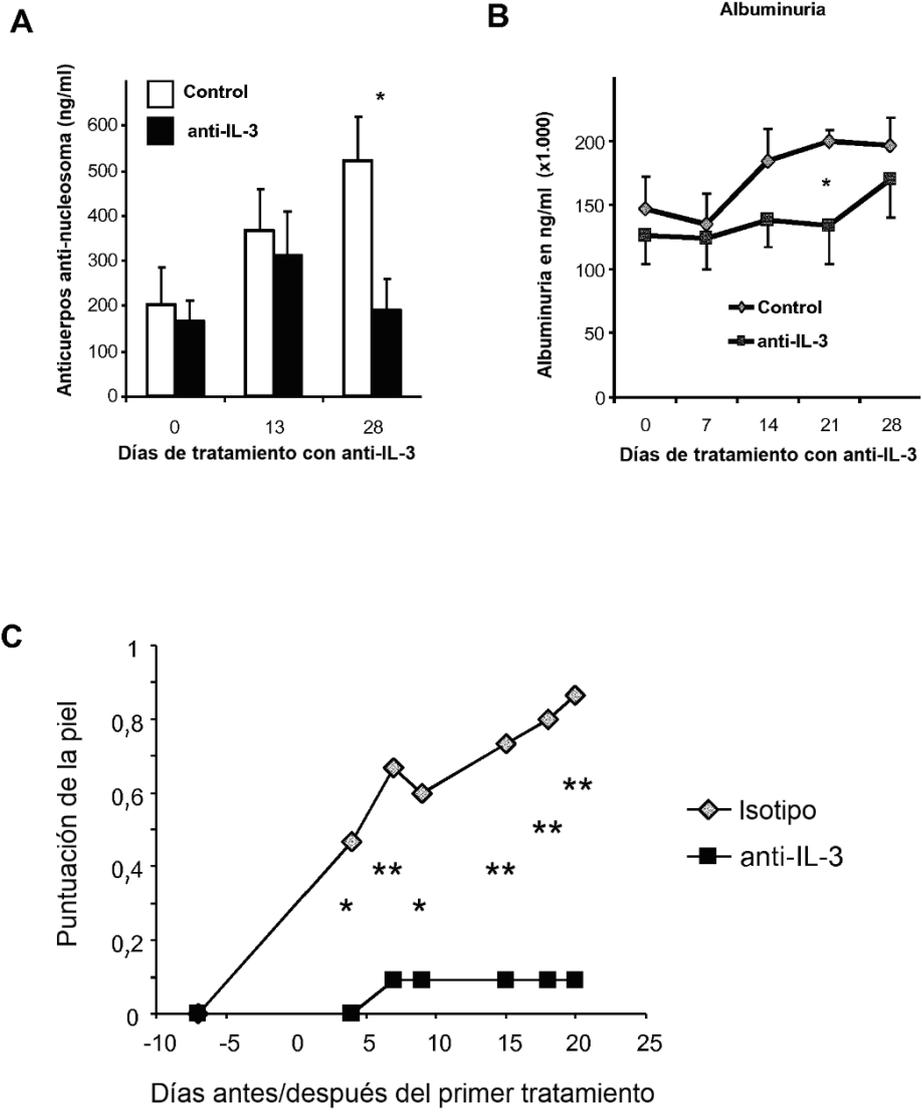


Figura 3

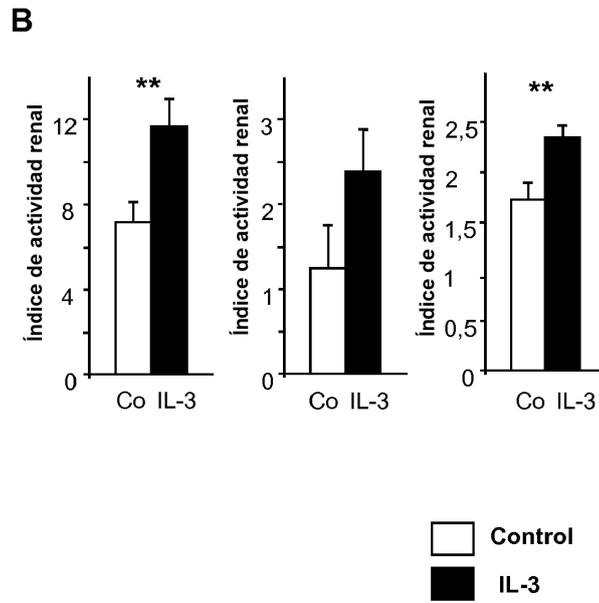
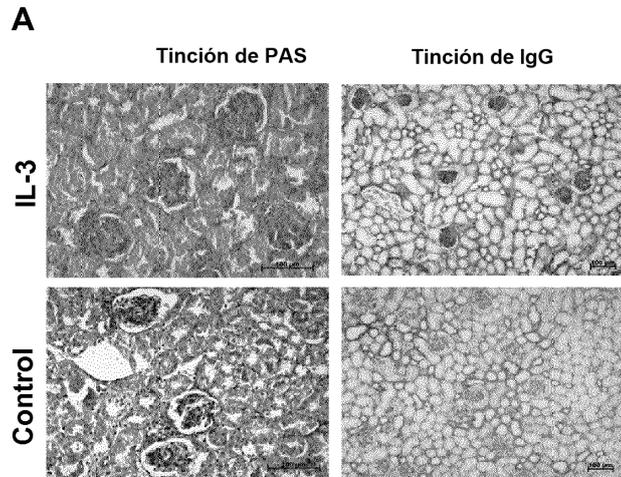


Figura 4 A, B

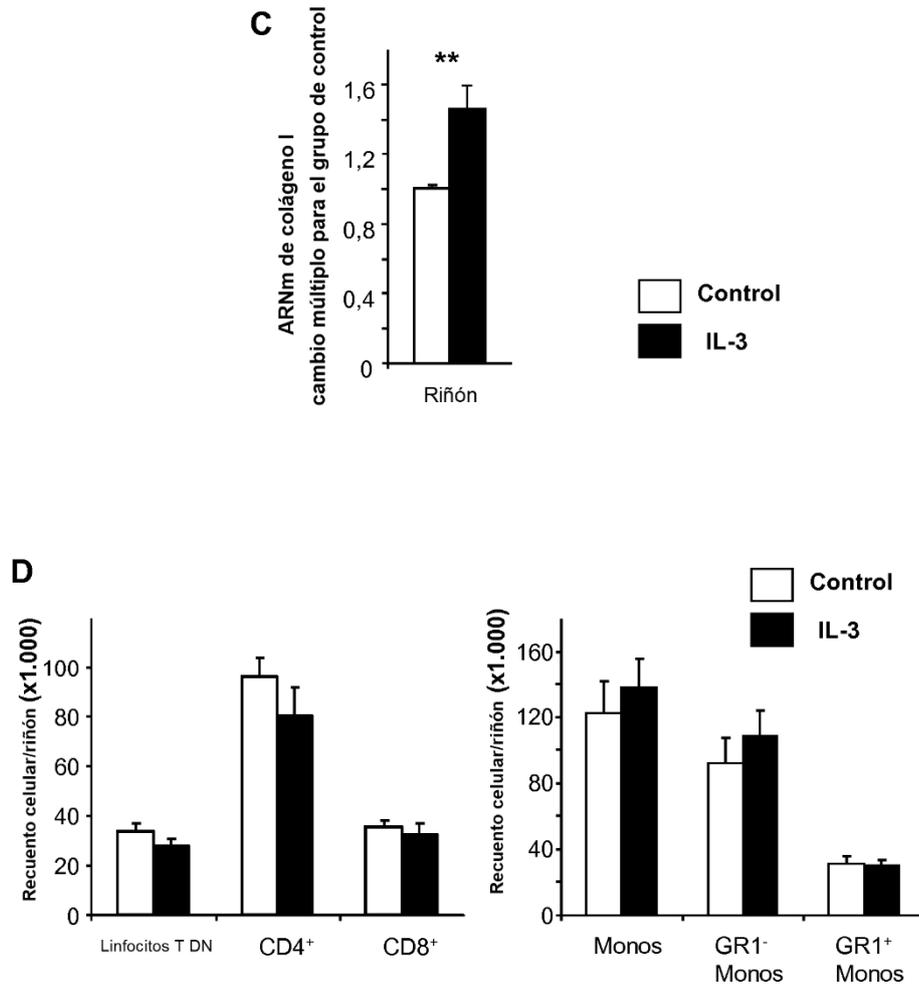


Figura 4 C, D

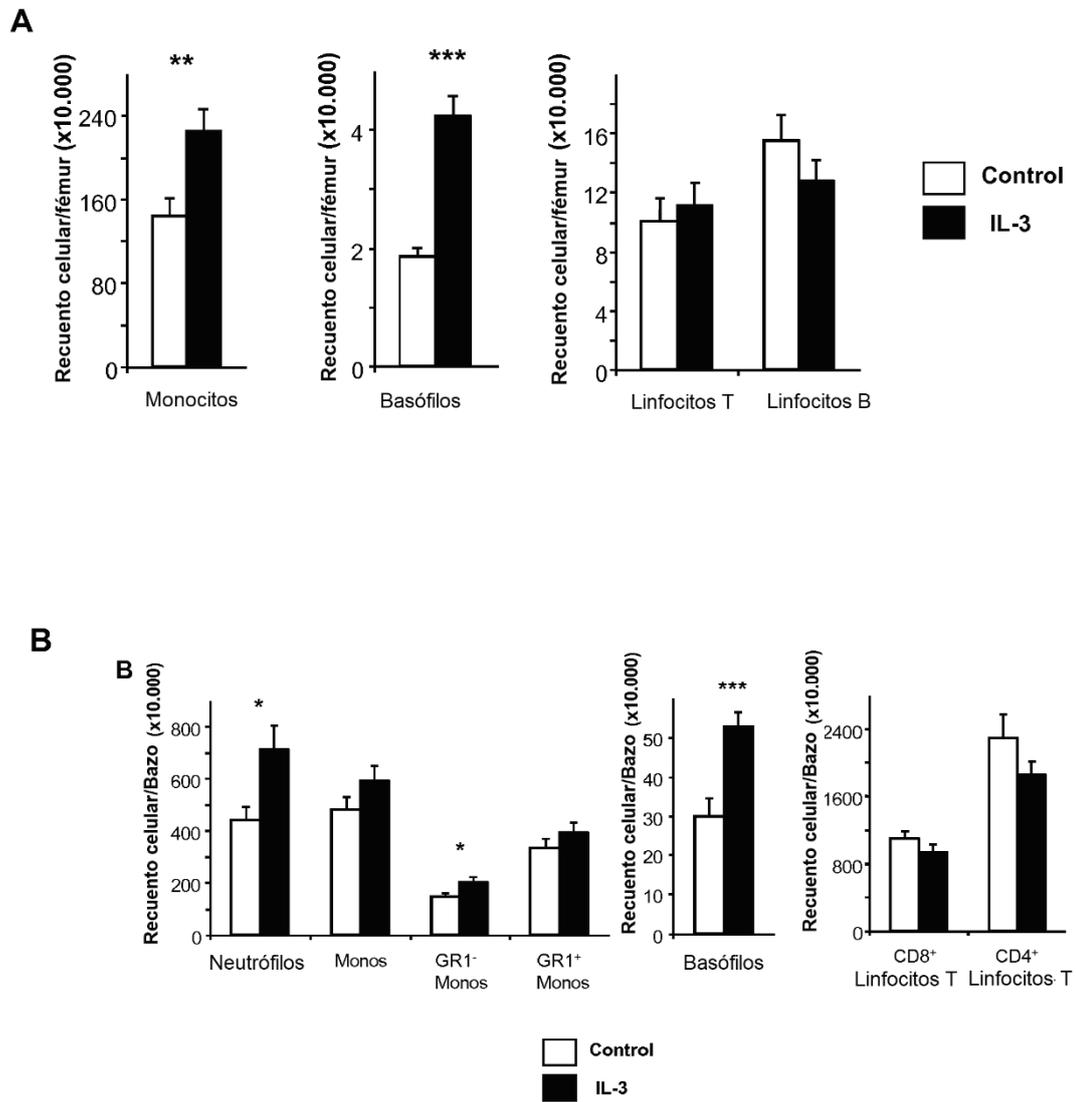


Figura 5

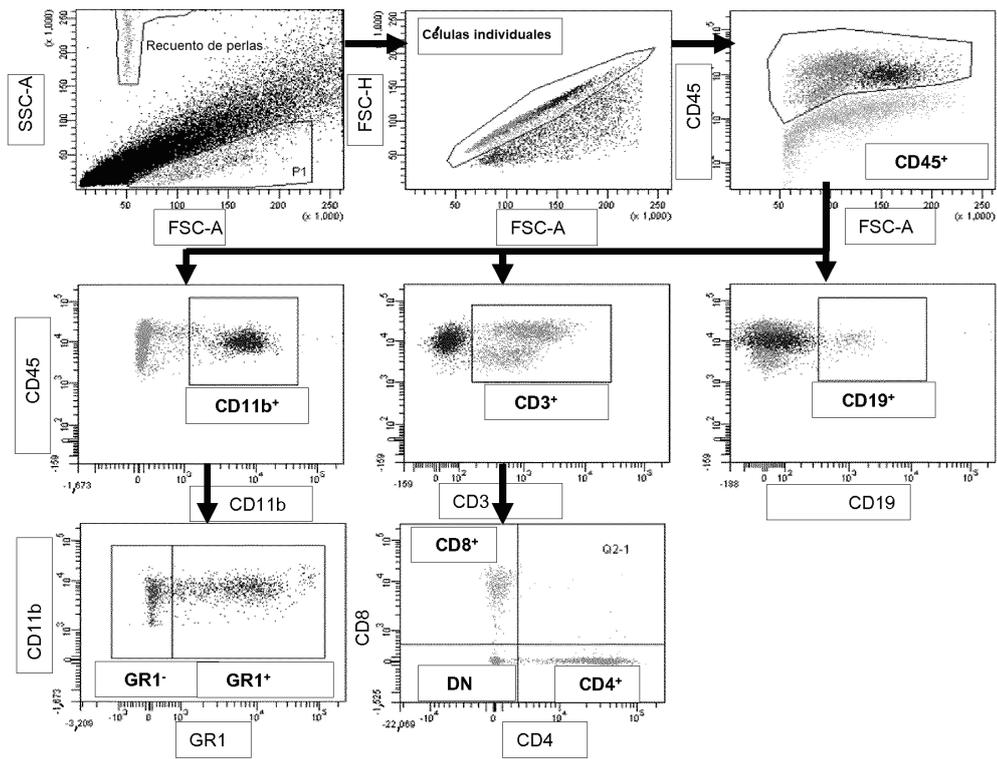


Figura 6

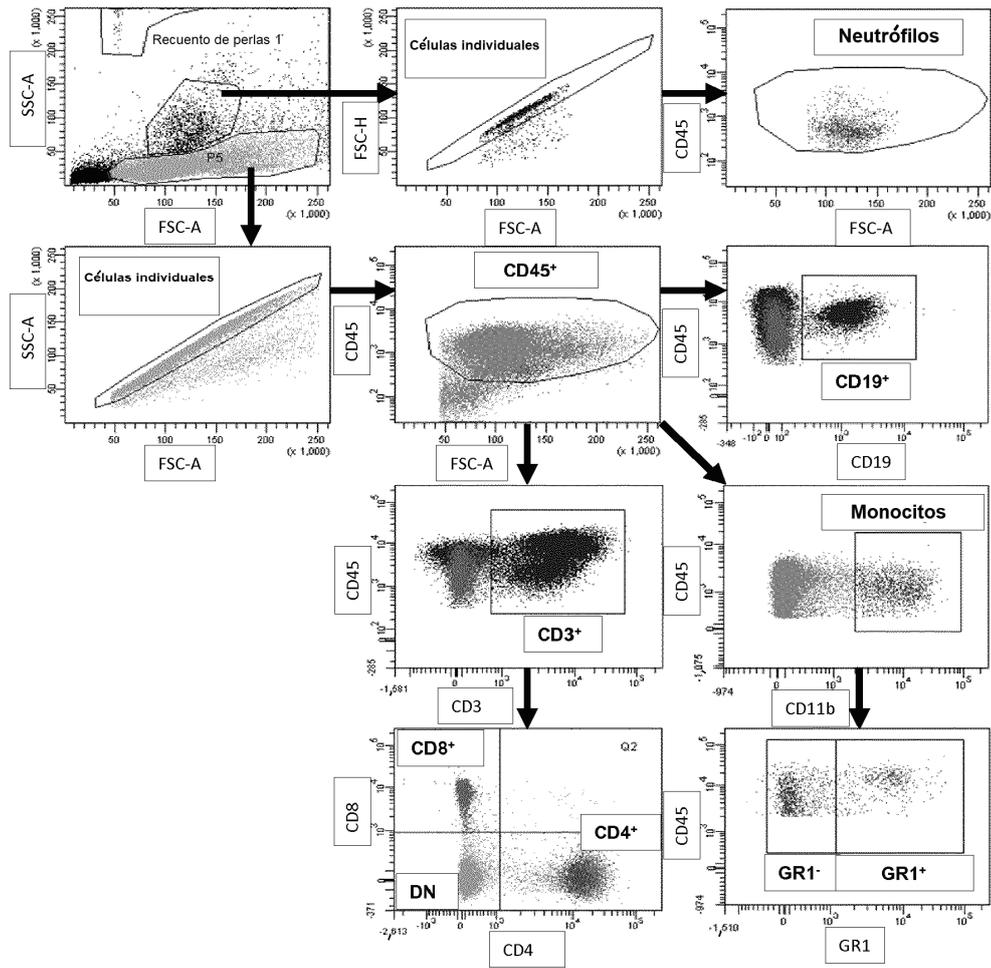


Figura 7

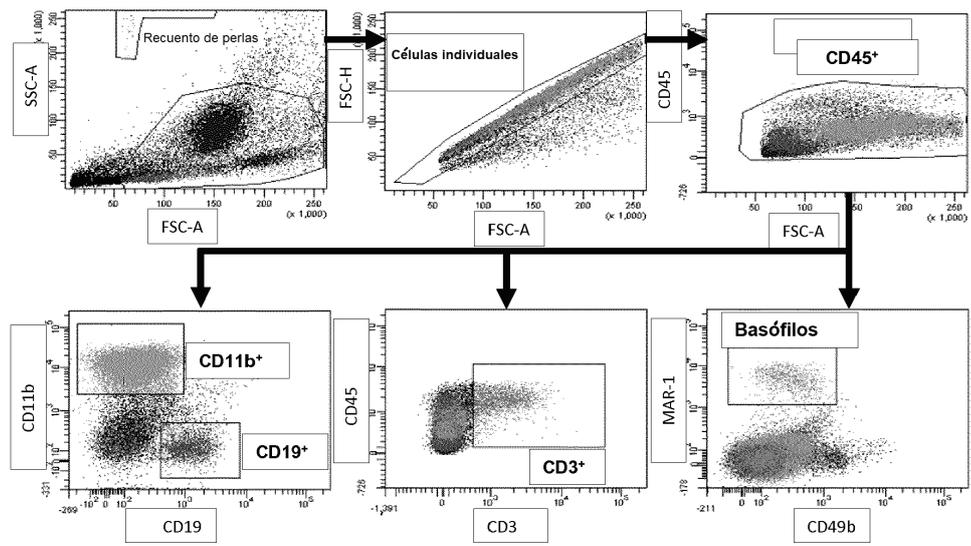


Figura 8

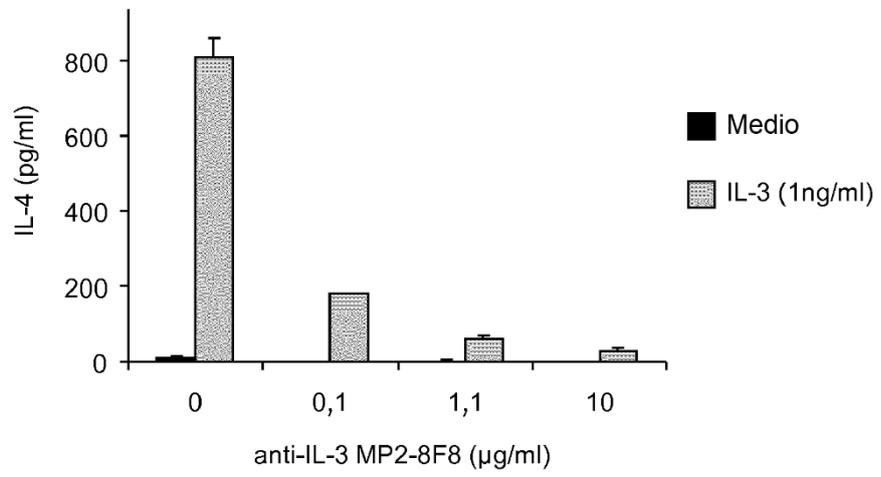


Figura 9

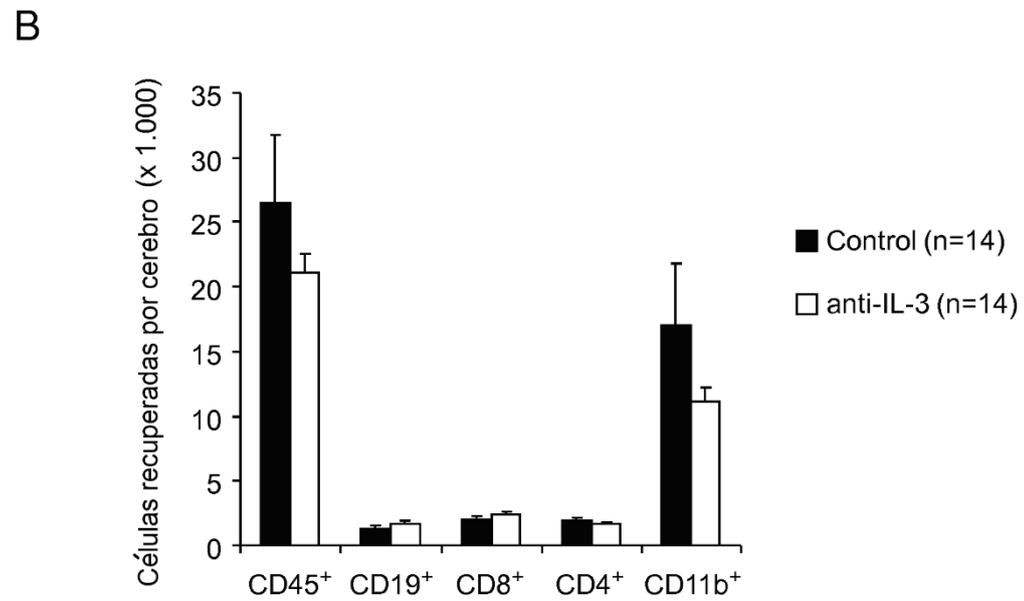
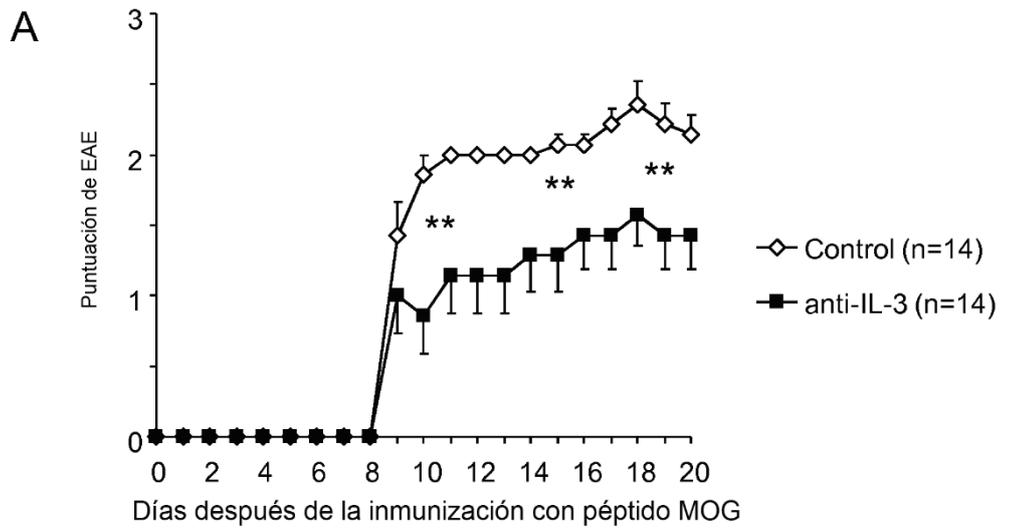


Figura 10 A, B

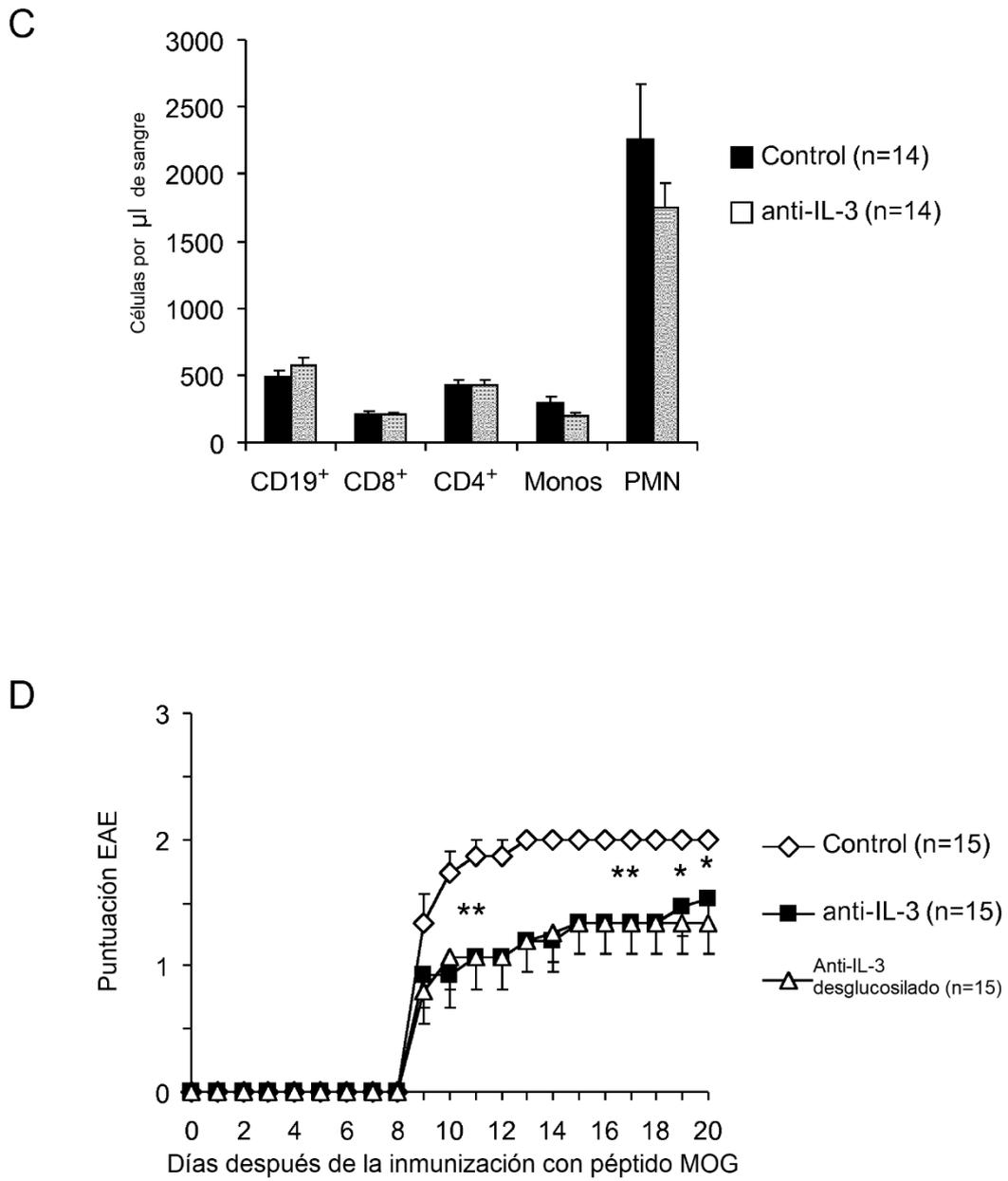


Figura 10 C, D

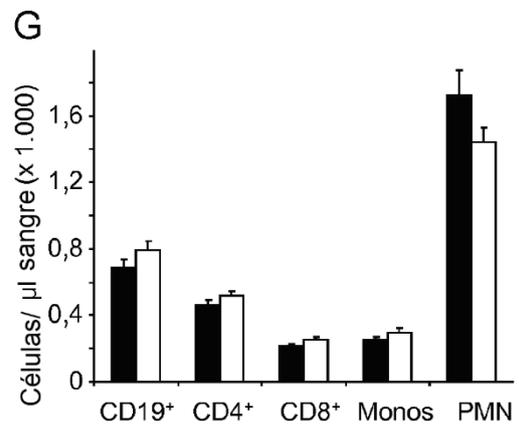
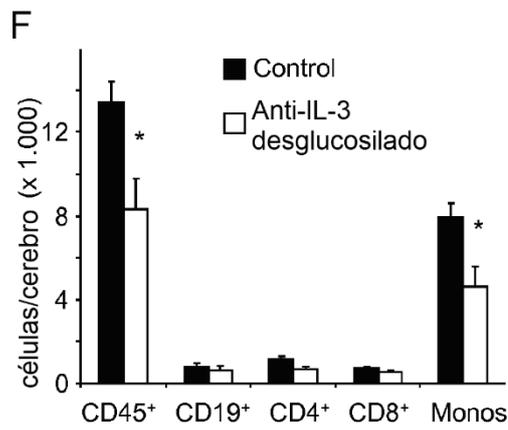
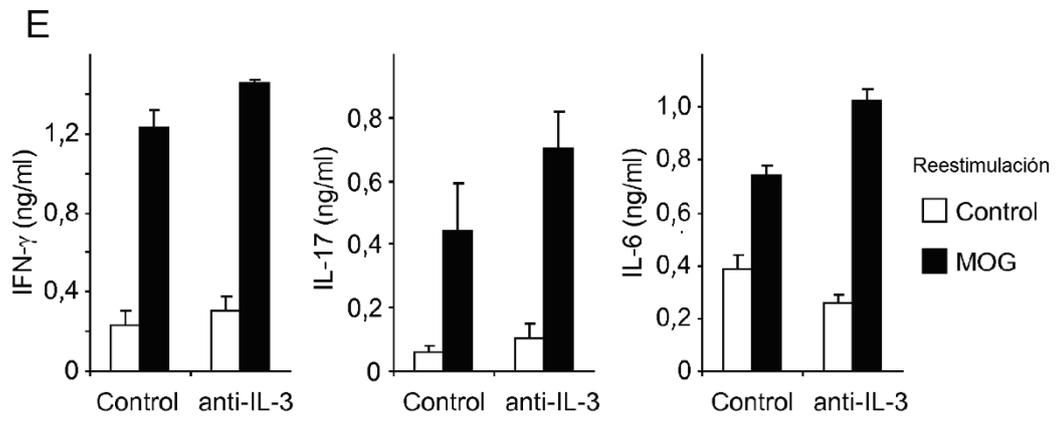


Figura 10 E-G

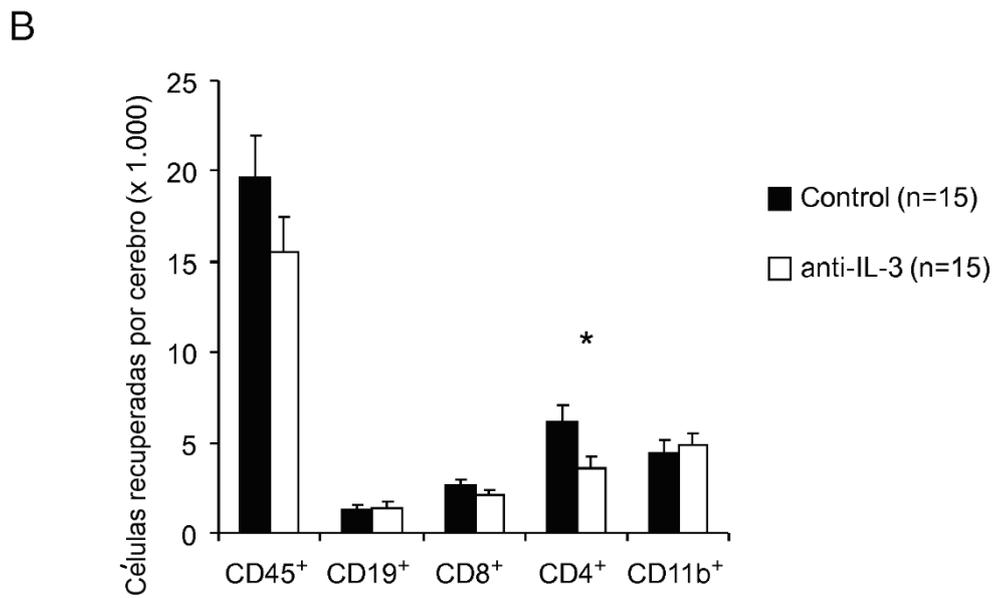
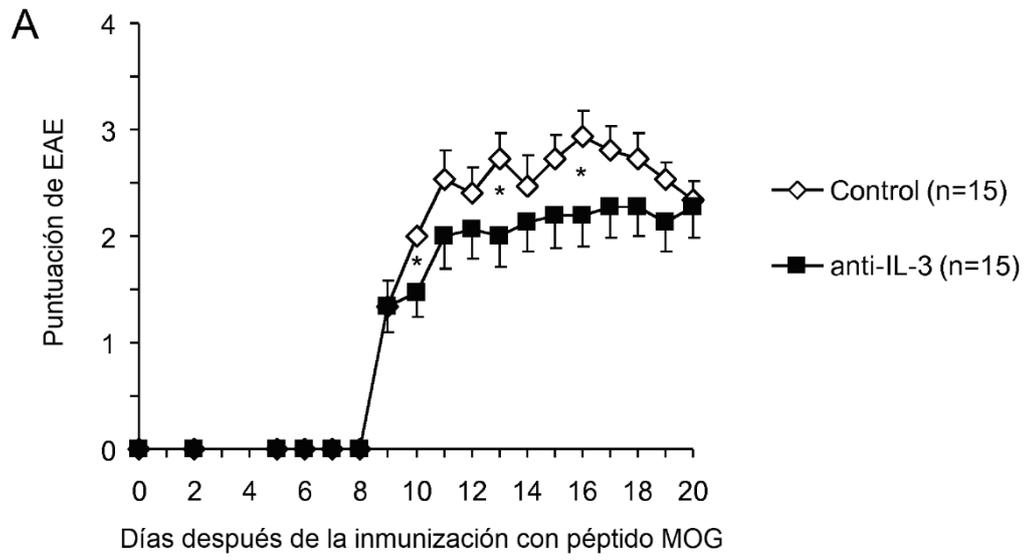


Figura 11

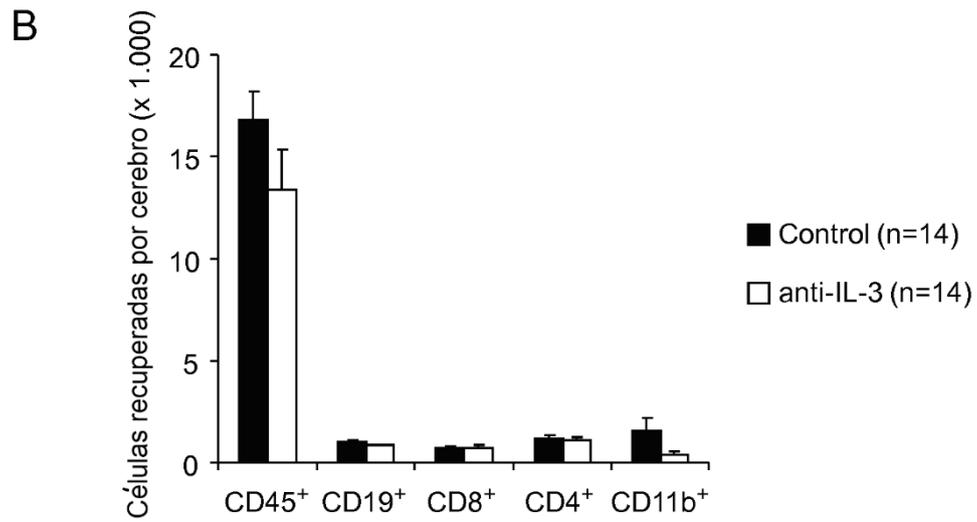
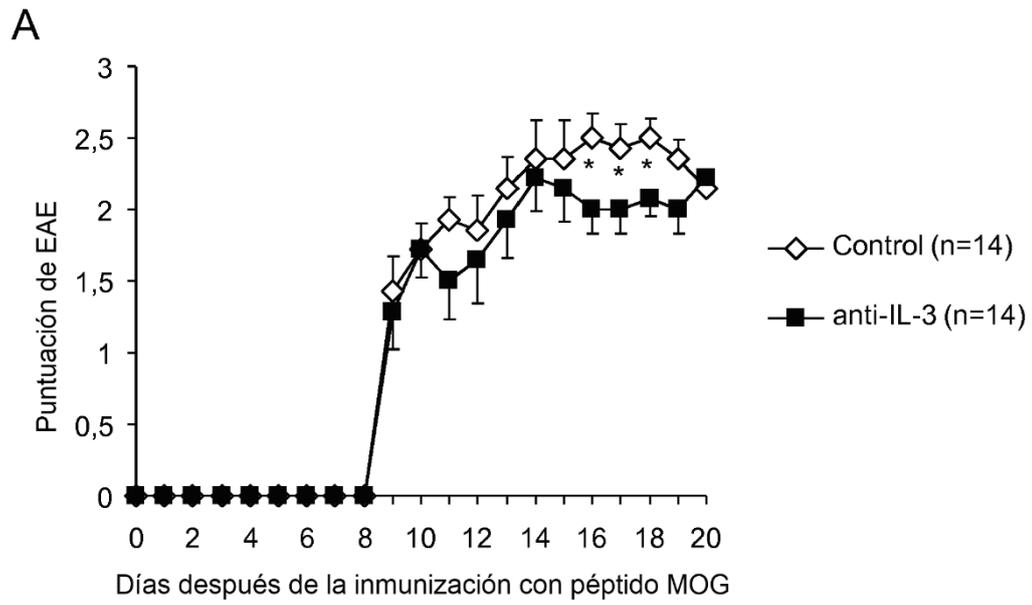


Figura 12

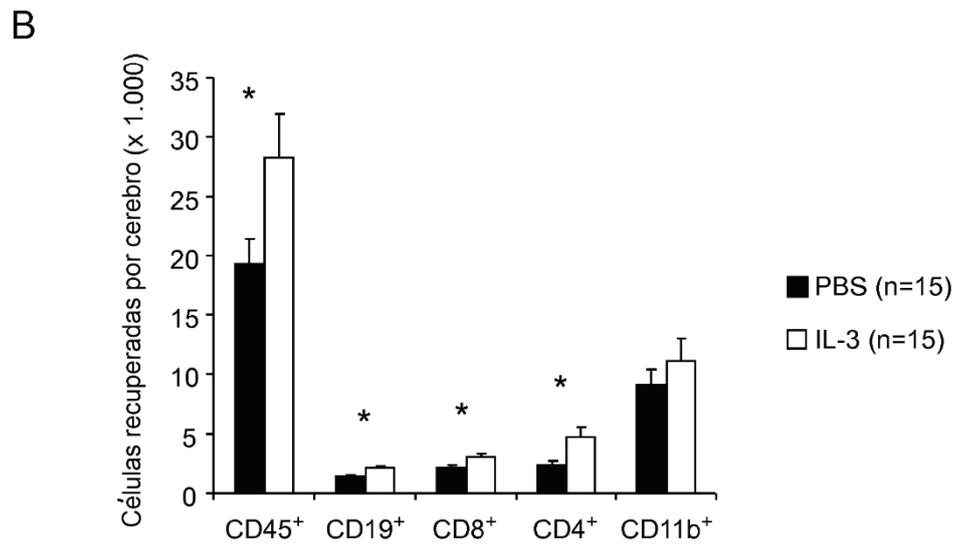
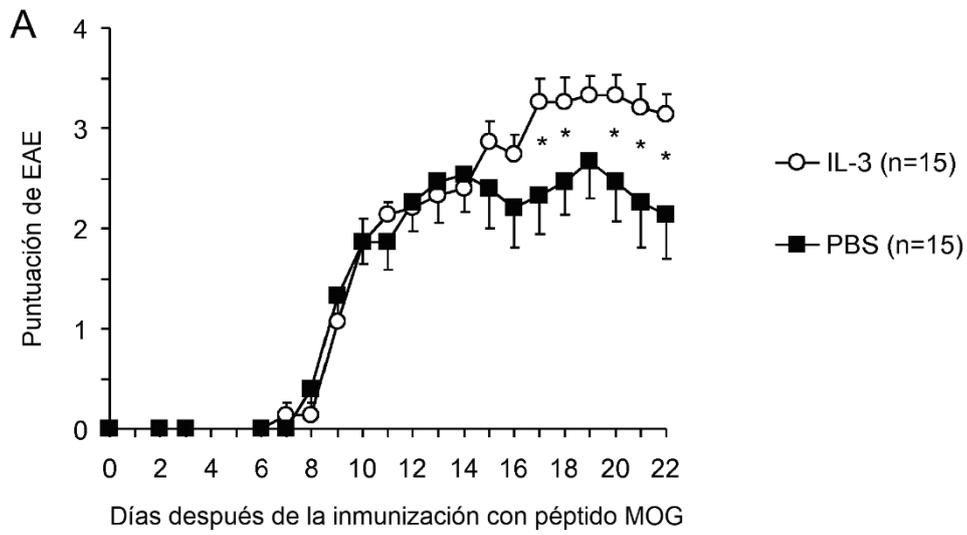
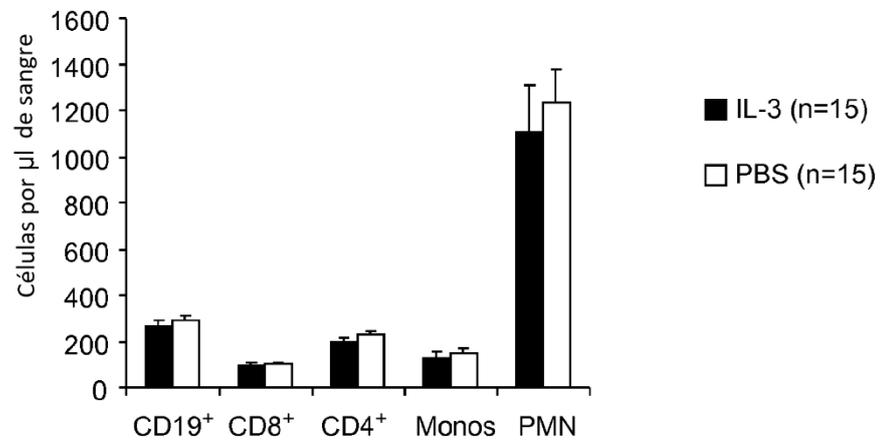


Figura 13 A, B

C



D

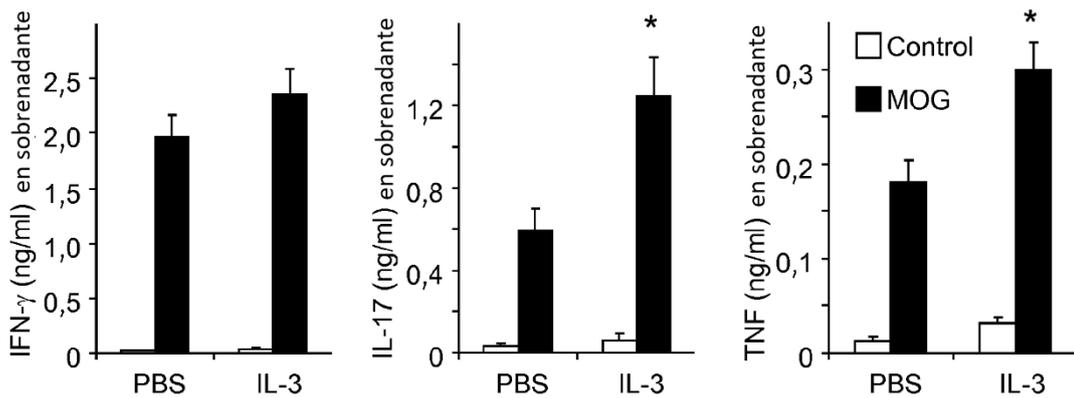


Figura 13 C, D

A 1 APMTQTTPLKTSWVNCSNMIDEIIT
 26 HLKQPPLPLLLDFNNLNGEDQDILME
 51 NNLRRPNLEAFNRAVKSLQNASAIE
 76 SILKNLLPCLPLATAAPTRHPIHIK
 101 DGDWNEFRRKLTFYLKTLENAQAQQ
 126 TTLSLAIF

B SWVN

C QPPLPLLLDFNNLNGEDQDILME

D APMTQTTPLKTSWVNCSN

E TFYLKTLENAQAQQTTLSLAIF

F 1 APMTQTTSLKTSWVNCSNMIDEIIT
 26 HLKQPPLPLLLDFNNLNGEDQDILME
 51 NNLRRPNLEAFNRAVKSLQNASAIE
 76 SILKNLLPCLPLATAAPTRHPIHIK
 101 DGDWNEFRRKLTFYLKTLENAQAQQ
 126 TTLSLAIF

G APMTQTTSLKTSWVNCSN

Figura 14 A-G

H SNMIDEIIT
HLKQPPLPLLLDFNNLNGEDQDILME
NNLRRPNLEAFNRVAVKSLQNASAIE
SILKNLLPCLPLATAAPTRHPIHIK
DGDWNEFRRKLTFFYLKTLENAQAQQ
TTLSLAIF

I DEIIT
HLKQPPLPLLLDFNNLNGEDQDILME
NNLRRPNLEAFNRVAVKSLQNASAIE
SILKNLLPCLPLATAAPTRHPIHIK
DGDWNEFRRKLTFFYLKTLENAQAQQ
TTLSLAIF

Figura 14 H, I

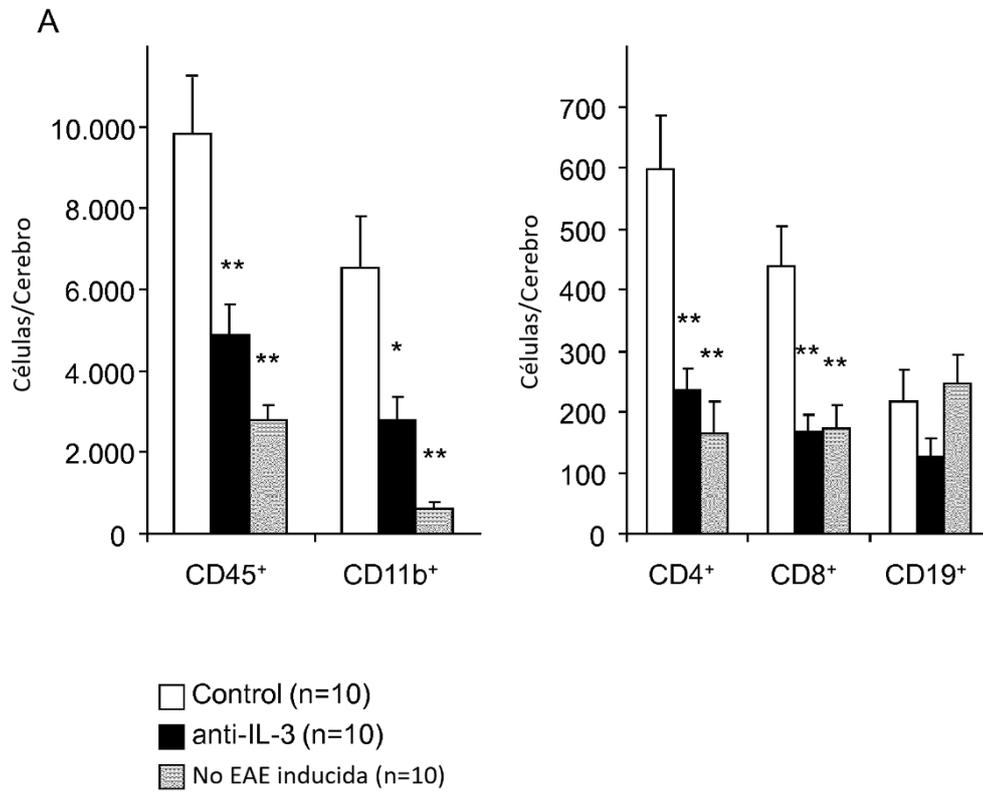


Figura 15 A

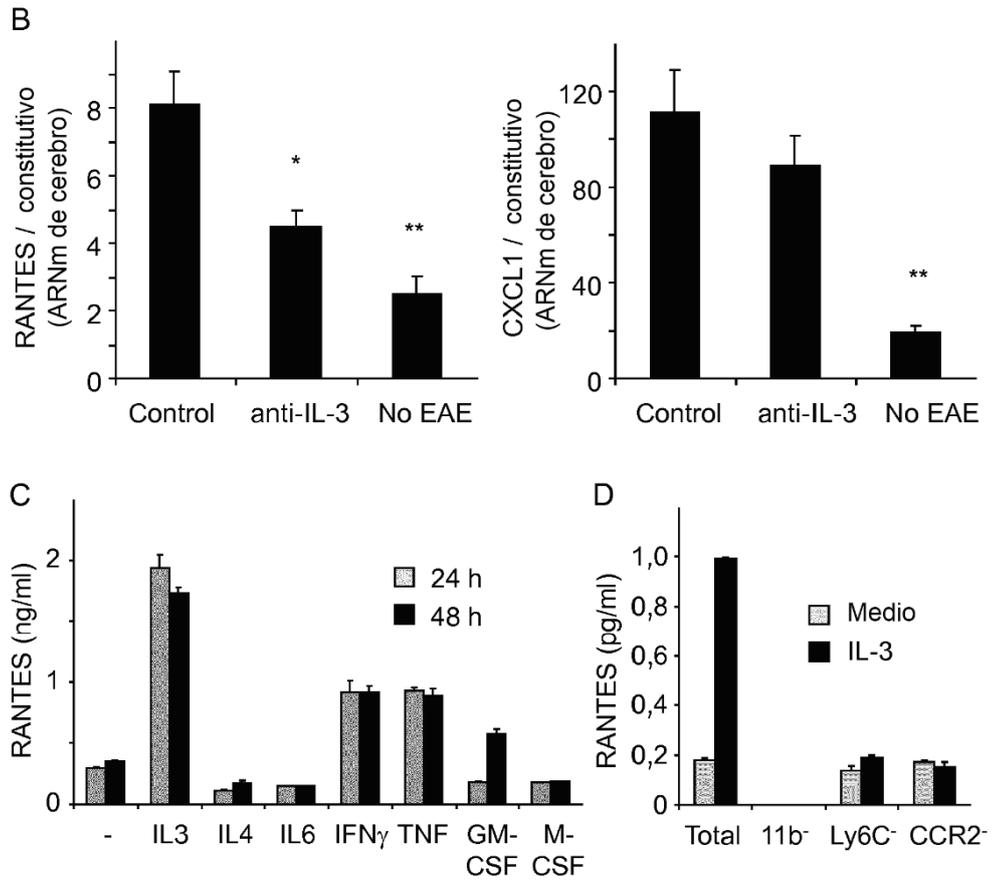


Figura 15 B-D

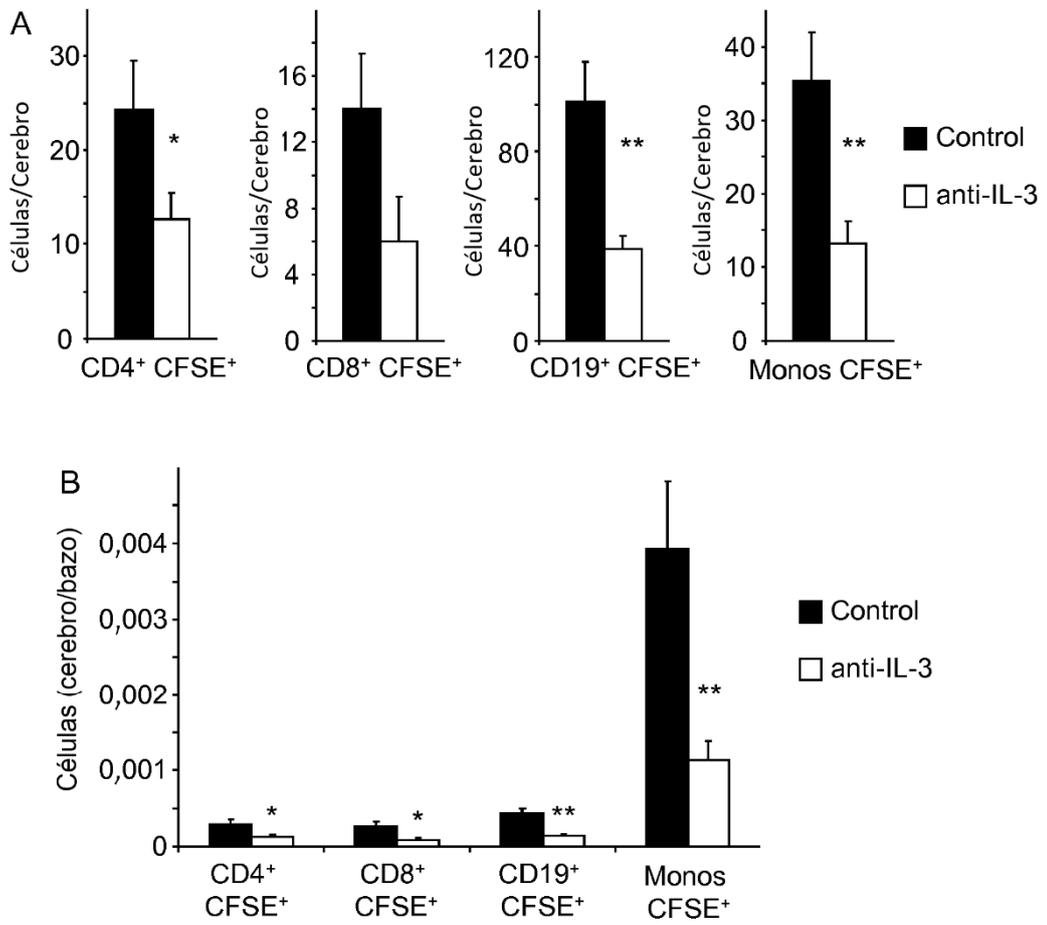


Figura 16