ANTICUERPOS QUE RECONOCEN SULFATIDOS Y PROTEOGLICANOS SULFATADOS Y SU USO.

Sector Técnico.

La presente invención está relacionada con nuevos anticuerpos monoclonales que reconocen de manera específica y con alta afinidad sulfátidos y proteoglicanos sulfatados. También la presente invención se relaciona con las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos monoclonales de la invención o los fragmentos derivados de estos anticuerpos. Adicionalmente la presente invención se relaciona con un juego de reactivos útil en el diagnostico de enfermedades cardiovasculares que comprende los anticuerpos de la invención o sus fragmentos.

Estado de la técnica anterior:

Después de más de 30 años de desarrollada la tecnología de hibridomas para la obtención de anticuerpos monoclonales (AcM) murinos (Koehler y Milstein Nature, 256: 495-497, (1975), los mismos han resultado muy útiles en el diagnóstico de enfermedades y en la investigación básica, pero solo 20 anticuerpos han sido registrados para la terapia en humanos(Pharma Vitae, Monoclonal antibodies Update, 6-363, 2008) demostrando su eficacia en humanos, lo que ha sido en gran medida debido a su corta vida media en sangre, así como al pobre reconocimiento de las funciones efectoras murinas por el sistema inmune humano, y además por la respuesta inmunológica que provoca el origen murino de los mismos al ser inyectados en pacientes (respuesta HAMA, siglas en inglés de human anti-mouse antibodies). Numerosos estudios han mostrado que, después de la administración de un anticuerpo extraño, la respuesta inmune producida en el paciente puede ser considerablemente fuerte y eliminar sustancialmente la utilidad terapéutica del anticuerpo después de un tratamiento inicial. Más aún, después de administrar a un paciente un AcM murino, tratamientos ulteriores con anticuerpos murinos no relacionados podrían no ser efectivos e incluso peligrosos debido a la reactividad cruzada conocida como respuesta HAMA según el reporte de Khazaeli, M.B. y col. Journal of Immunotherapy 15: 42-52 (1994).

De lo antes expuesto se infiere la necesidad de obtención de versiones de los anticuerpos terapéuticos, que sean menos inmunogénicas en humanos, que se obtengan de forma sencilla y económica y que resulten adecuados para la fabricación de formulaciones terapéuticas u otros usos. Morrison S.L. y col. Adv Immunol., 44: 65-92 (1989).

Se han desarrollado varios métodos para humanizar anticuerpos de ratón o de rata y así disminuir la respuesta xenogénica contra proteínas extrañas al ser estos inyectados en humanos. Uno de los primeros intentos para reducir la inmunogenicidad ha sido generar

anticuerpos "quiméricos", en los cuales los dominios variables de las proteínas murinas se insertan en dominios constantes de moléculas humanas, con lo cual no sólo se logra la disminución de la inmunogenicidad, sino también la activación de las funciones efectoras del sistema inmune. Morrison S.L. y col. PNAS USA, 81: 6851-6855 (1984). Estas moléculas quiméricas mantienen las características del anticuerpo original en relación con la unión al antígeno y su región constante no es inmunogénica.

La aterosclerosis y sus consecuencias tienen una enorme incidencia en la población mundial y constituyen la principal causa de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados. Melián, A. y col. Am. J. Pathol., 155:775 (1999) y en Cuba desde hace varios años (OMS, 2004, Anuario Estadístico, MINSAP, 2007).

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica de carácter multifactorial que contribuye en gran medida a la patogénesis del infarto del miocardio y cerebral, de la gangrena, y de la pérdida de las funciones en las extremidades. Greaves, D. R. y col. Trends Immunol 22: 180-181 (2001); Ross, R. y col. Am Heart J 138(5 Pt 2): S419-20 (1999).

Una de las principales causas de la aterosclerosis es la hipercolesterolemia. Las lipoproteínas de bajo peso molecular (LDL) en su tránsito a través de la pared arterial son atrapadas en la matriz extracelular de la íntima arterial, por interacciones con los proteoglicanos, y sufren modificaciones oxidativas. Las lipoproteínas unidas a proteoglicanos de la íntima arterial son más susceptibles a sufrir modificaciones, tanto en su porción lipídica como proteica, tales como la oxidación y la hidrólisis enzimática, con lo que aumenta su potencial aterogénico. La apoB-100 contiene varias regiones por medio de las cuales se puede unir a las cadenas de glucosaminoglicanos de los proteoglicanos y todas tienen en común la presencia de varios aminoácidos básicos. Camejo, G., E. y col. Atherosclerosis 139: 205-22, (1998); Chang, T. Y. y col. Curr Opin Lipidol 12: 289-96 (2001); Camejo, G., U. y col. Atheroscler Suppl 3: 3-9 (2002). La densidad de cargas negativas en los glicosaminoglicanos influye en la interacción con las LDL, de manera que el grado de sulfatación afecta la interacción de las LDL con proteoglicanos. Sambandam T. y col. Arterioascler Thromb, 11: 561-568 (1991)

Por otra parte, las LDL oxidadas pueden ser internalizadas por los macrófagos a través de los receptores basureros en la superficie de estas células, lo cual conduce a la acumulación de colesterol intracelular con la consiguiente formación de las células espumosas. Estos eventos representan los principales pasos que inician la respuesta inflamatoria, con la intervención de monocitos/macrófagos, mastocitos, células dendríticas, células T y NKT. Camejo, G. y col. Atherosclerosis 139(2): 205-22 (1998); Hurt-Camejo, E. y col. Invest Clin 42 Suppl 1: 43-73 (2001); Skalen, K., M. y col. Nature 417:750-754 (2002).

Existen evidencias experimentales que demuestran la participación de los proteoglicanos

presentes en la superficie de los macrófagos, en la unión de las LDL oxidadas a estas células, así como en la internalización o incorporación de estas partículas para formar finalmente las células espumosas. Halvorsen B. y col. Biochem J. 331:743-752 (1998).

Es indiscutible que la adopción de estilos de vida más sanos en conjunto con el uso de agentes anti-trombóticos y reductores de lípidos han tenido un impacto en la disminución del riesgo de que se desarrollen eventos cardiovasculares, pero estas estrategias aún son insuficientes para eliminar estos riesgos totalmente

Como se mencionó anteriormente, la aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria multifactorial donde diversos antígenos son importantes en su desarrollo, por lo que se están desarrollando diferentes estrategias de inmunoterapia activa y pasiva con el objetivo de lograr un mayor impacto terapéutico en esta enfermedad.

Una de estas estrategias son las terapias basadas en incrementar las HDL, debido a la relación inversa que existe entre HDL-colesterol y enfermedad cardiovascular. La CETP es una enzima clave en el metabolismo de las HDL y se considera una diana potencial para la terapia, ya que reduciendo su actividad se aumentan los niveles de HDL. La estrategia de utilización de vacunas que induzcan la producción de anticuerpos que se unan e inhiban la función de CETP ha sido descrita en WO 1997/041227 y WO 2006/133196. Sin embargo, estudios recientes que muestran el fallo en un ensayo clínico fase III utilizando el Torcetrapib como inhibidor de la CETP han hecho dudar de esta estrategia. Nicholls S. J. y col. Circulation. 9; 118:2506-14 (2008); Hermann M. y col. Curr Hypertens Rep, 11:76-80 (2009).

Algunos autores han descrito vacunas utilizando LDL oxidadas como inmunógenos con vistas a inhibir la formación de placas de ateroma. Palinski W. y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:821–25 (1995); Ameli S y col. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1*6:1074–79 (1996); Freigang S. y col. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 18:1972–82 9 (1998); Zhou X. y col. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:108–14 (2001); George J. y col. *Atherosclerosis* 138:147–52 (1998); Fredrikson G.N. y col. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:879–84 (2003); US 2008/0070265A1.

Otra estrategia es la obtención de vacunas terapéuticas y profilácticas basadas en fragmentos específicos de la apolipoproteína C-III oxidada, con el objetivo de inducir una respuesta inmune capaz de prevenir o reducir la formación de lesiones ateroscleróticas (WO 2001/064008, WO 2003/020765, WO 2004/080375 y WO 2004/081045).

Otro acercamiento vacunal descrito se basa en un péptido conjugado a un aldehído como el MDA ó 4-HNE para inducir anticuerpos que interactúen con receptores alfa/beta de las células T e impidan la formación de las lesiones ateroscleróticas (WO 2001/068119).

Algunos autores han abogado por la importancia en la aterosclerosis de vacunas contra patógenos para prevenir el desarrollo de placas de ateromas (WO1998/033510, US 006291437 B1, US 6471965 B1, US006808713 B1).

Otra estrategia propuesta para retardar o reducir la severidad de la aterosclerosis, causada por ingestión de colesterol en la dieta, es el uso de vacunas contra esteroles (US 2002/0018808 A1).

La inmunoterapia pasiva como herramienta terapéutica también puede jugar un papel importante en la aterosclerosis. La inmunización pasiva para tratar o prevenir la aterosclerosis utilizando anticuerpos humanos dirigidos contra fragmentos oxidados o modificados de la Apo B100 ha sido descrita (US 005196324ª, US 2007/0098725 A1, US 2008/0075716 A1).

También se ha propuesto como combinación terapéutica en el tratamiento o para la prevención de la aterosclerosis, la inmunización pasiva con anticuerpos con especificidad por la fosforilcolina (US 2007/0286868 A1, US 2007/0122419 A1).

Otra estrategia descrita es el uso de anticuerpos o fragmentos de unión al antígenos que específicamente se unen a M-CSF humano (US 2007326414 B2).

El uso de anticuerpos monoclonales que prevengan la adhesión de los monocitos al endotelio vascular y que por tanto impidan la invasión por estas células del endotelio y los tejidos que lo rodean, es otro acercamiento terapéutico para esta enfermedad (US 005541296 A).

Se ha descrito el uso de AcMs como inhibidores del receptor de la glicoproteína IIb/IIIa y por ende de la agregación plaquetaria (WO 1999/052551, US 005976532 A).

Además, se han obtenido AcMs humanos contra epítopos peptídicos protectivos de la apopoliproteína CIII para su uso en inmunoterapia pasiva (WO 2004/081046). También, el uso de inmunoglobulinas intravenosas (IVIG) puede tener un efecto ateroprotectivo. Udi N y y col. Autoimmunity reviews 7:445-452 (2008).

No han sido descritos AcMs quiméricos que reaccionen con sulfátidos y glicosaminoglicanos sulfatados, que reconozcan macrófagos y lesiones ateroscleróticas, y que al ser administrados en bajas dosis inhiban la formación de lesiones ateroscleróticas y con la capacidad de inducir una respuesta de anticuerpos contra estas moléculas sulfatadas.

Descripción detallada de la invención:

La presente invención se relaciona con anticuerpos monoclonales caracterizados porque reconocen sulfatidos y proteoglicanos sulfatados o fragmentos derivados de estos anticuerpos.

Los anticuerpos anti-sulfatidos y anti-proteoglicanos sulfatados de la invención son preferiblemente monoclonales. También se incluyen dentro del alcance de la invención fragmentos de anticuerpos como los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH y $F(ab')_2$, de los anticuerpos anti-sulfatidos y anti-proteoglicanos sulfatados proporcionados en la presente memoria descriptiva. Estos fragmentos de anticuerpos se pueden crear por medios tradicionales, como digestión enzimática, o se pueden generar mediante técnicas recombinantes. Estos fragmentos de anticuerpos pueden ser quiméricos o humanizados. Estos fragmentos son útiles para los fines diagnósticos y terapéuticos que se exponen en la presente descripción.

La invención también engloba formas de realización de anticuerpos y fragmentos sustancialmente puros

En una realización particular, el anticuerpo de la presente invención está caracterizado por las siguientes secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera:

Cadena pesada:

HCDR1 **SEQ ID: 1** RYSVH
HCDR2 **SEQ ID: 2** MIWGGGSTDYNSALKS
HCDR3 **SEQ ID: 3** SGVRRGRAQAWFAY

HFR1 **SEQ ID: 7** QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLS
HFR2 **SEQ ID: 8** WVRQPPGKGLEWLG
HFR3 **SEQ ID: 9** RLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCAR
HFR4 **SEQ ID: 10** WGQGTLVTVSA

Cadena Ligera:

LCDR1 **SEQ ID: 4** KASQDVSTAVA
LCDR2 **SEQ ID: 5** SASYRYT
LCDR3 **SEQ ID: 6** QQHYSTPWT

LFR1 **SEQ ID: 11** DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC
LFR2 **SEQ ID: 12** WYQQKPGQSPKLLIY
LFR3 **SEQ ID: 13** GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYC
LFR4 **SEQ ID: 14** FGGGTKLELK

Adicionalmente el anticuerpo de la invención comprende las regiones constantes IgG1 humana para cadena pesada y Ck humana para la cadena ligera.

Esta invención engloba composiciones, incluidas composiciones farmacéuticas, que comprenden un anticuerpo anti-sulfatidos y anti-proteoglicanos sulfatados de la invención o fragmentos derivados de los mismos. Como se usa en la presente memoria

descriptiva, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos que se unen a sulfatidos y proteoglicanos sulfatados.

Estas composiciones pueden comprender además, transportadores adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyan soluciones tamponadas o adyuvantes, que son bien conocidos en la materia.

En otra forma de realización la presente invención se relaciona con la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal cuyas secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera son las que se muestran a continuacion.

Cadena pesada:

HCDR1 **SEQ ID: 1** RYSVH
HCDR2 **SEQ ID: 2** MIWGGGSTDYNSALKS
HCDR3 **SEQ ID: 3** SGVRRGRAQAWFAY

HFR1 **SEQ ID: 7** QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLS
HFR2 **SEQ ID: 8** WVRQPPGKGLEWLG
HFR3 **SEQ ID: 9** RLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCAR
HFR4 **SEQ ID: 10** WGQGTLVTVSA

Cadena Ligera:

LCDR1 **SEQ ID: 4** KASQDVSTAVA
LCDR2 **SEQ ID: 5** SASYRYT
LCDR3 **SEQ ID: 6** QQHYSTPWT

LFR1 **SEQ ID: 11** DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC
LFR2 **SEQ ID: 12** WYQQKPGQSPKLLIY
LFR3 **SEQ ID: 13** GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYC
LFR4 **SEQ ID: 14** FGGGTKLELK

En un tercer aspecto, la presente invención se relaciona con un juego de reactivos útil en el diagnostico de lesiones ateroscleróticas que comprende uno de los anticuerpos de la invención o fragmentos derivados de los mismos. Y más particularmente el juego de reactivos comprende el anticuerpo monoclonal con las secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera descritas previamente.

En un aspecto adicional la presente invención se relaciona con el uso de los anticuerpos de la invención para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, particularmente aquellas que muestran evidencias de lesiones ateroscleróticas.

El termino anticuerpo generalmente se refiere a anticuerpo monoclonal y más particularmente a un anticuerpo monoclonal murino o a un anticuerpo quimérico.

Obtención de los anticuerpos:

En general los anticuerpos monoclonales anti- sulfatidos y anti-proteoglicanos sulfatados de la invención pueden obtenerse por el método de obtención del hibridoma, descrito por primera vez en Kohler *et al., Nature,* 256:495 (1975) a partir de ratones inmunizados con extractos de glicolipidos obtenidos a partir de fuentes naturales o sintéticos. Las células del bazo de ratones inmunizados se funden con células de mieloma P3.X63Ag8 6.5.3, se cultivan en medio selectivo según lo descrito y se seleccionan los clones productores por detección de inmunoglobulinas en el sobrenadante de cultivo por medio de la técnica de ELISA.

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos con la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones productores se pueden subclonar mediante los procedimientos de dilución limitante y se pueden crecer mediante métodos estándar de crecimiento de cultivo celular (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* en un animal en forma de tumores ascíticos.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, de los fluidos ascíticos o del suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, como por ejemplo, la proteína A-sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos de la invención también se pueden obtener por técnicas de ingeniería genética maniopulando adecuadamente los genes de inmunoglobulinas murinas. Por ejemplo, los anticuerpos quimericos de la invención se pueden obtener a partir de ARN obtenido de las células productoras de los anticuerpos monoclonales murinos, por las técnicas convencionales de manipulación de genes, tales como amplificación, clonación, secuenciación y digestión de genes, entre otras, descritas por el arte previo, por ejemplo en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, y ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)).

La síntesis de ADNc y amplificación por la PCR (de las siglas en Ingles de la Reacción en Cadena de la Polimerasa) de las regiones variables del anticuerpo se puede realizar a partir del RNA que codifica el anticuerpo murino, se sintetiza cDNA, se amplifican las

regiones variables VK y VH por PCR, esto se puede realizar siguiendo las técnicas convencionales descritas para tales efectos por el arte previo.

Los productos de las PCRs para cada una de las cadenas pesada y ligera respectivamente se clonan en los vectores utilizados para la secuenciación de genes. Los clones resultantes se secuencian usando cualquiera de los métodos descritos para tal efecto, por ejemplo, el método de los dideoxinucleótidos usando T7 ADN Polimerasa según las especificaciones del fabricante.

Los genes de la región variable de las cadenas pesada VH y ligera VK se obtienen por restricciones enzimáticas de las construcciones intermedias y son clonados en los respectivos vectores de expresión siguiendo las técnicas convencionales para la construcción de genes quiméricos. Para tales fines son útiles cualquiera de los vectores descritos para la expresión eficiente de proteínas recombinantes, particularmente de anticuerpos monoclonales.

Para la expresión del anticuerpo quimérico, se pueden usar las células NS0, las cuales son electroporadas con el DNA de las construcciones en los respectivos vectores de expresión que contienen los genes del anticuerpo. Estas células se crecen en medio selectivo. La detección de los clones productores de inmunoglobulina se realiza por la medición en el sobrenadante de los cultivos empleando un ELISA (ensayo de inmunoadsorción enzimática).

Selección de los anticuerpos con la especificidad y la función deseadas:

En ciertas formas de realización, los anticuerpos de la presente invención se pueden detectar por diversas técnicas que para estos fines se describen en el arte previo, por ejemplo, por un ensayo de ELISA (ensayo de inmunoadsorción enzimática).

Mediante la técnica de Elisa se puede verificar el reconocimiento de los diferentes clones productores de anticuerpos y se seleccionan aquellos clones que muestran la especificad deseada.

En ciertas formas de realización de la invención se analiza la actividad biológica de los anticuerpos producidos en la misma. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención se prueban por su actividad de unión al antígeno.

Los ensayos de unión al antígeno que se conocen en la especialidad y pueden ser usados en la presente memoria descriptiva incluyen, entre otros, ensayos de unión competitiva o directa que usan técnicas como ensayos tipo western, radioinmunoensayos, ELISA, inmunoanálisis de doble anticuerpo (tipo "sandwich"), ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A. Los ensayos de unión a antígeno ilustrativos se incluyen más adelante en la sección Ejemplos.

En la presente invención, adicionalmente se pueden identificar aquellos clones que producen anticuerpos con capacidad de reconocer placas de ateroma en cortes de aorta humana, esto se puede realizar utilizando técnicas inmunohistoquimicas convencionales y descritas en el arte previo.

En otro aspecto se puede medir la capacidad de inducir respuesta anti-heparina en ratones por los anticuerpos de la presente invención. Para esto, diferentes grupos de animales se inmunizan con los anticuerpos de la invención y las muestras de suero de dichos animales se analizan para la presencia de anticuerpos anti-heparina.

En un aspecto adicional se puede medir el efecto anti-aterosclerótico de los anticuerpos de la presente invención, para esto se puede usar un modelo, de inducción de lesiones ateroscleróticas en conejos con Lipofundín (Takács E, Hársing J, Füzesi S, Jellinek H . 1986 Arteriosclerosis developing in rabbits after lipofundin administration. Morphol Igazsagugyi Orv Sz. 26:99-105; Noa M & Más R (1992). Ateromixol y lesión aterosclerótica en conejos inducida por lipofundin. Progresos en Ciencias Médicas, 6: 14-19).

Composición farmacéutica:

En una forma de realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos de la presente invención. En una forma de realización, una composición que comprende un anticuerpo comprende, además, un excipiente, el cual es farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención proporciona un juego de reactivos que comprende un una composición que comprende uno o más anticuerpos de la invención; y adicionalmente puede comprender una solución tamponada. En una forma de realización, la solución tamponada es farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, una composición que comprende un anticuerpo, comprende, además, una molécula transportadora, que, en algunas formas de realización, es farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización, un juego de reactivos comprende también instrucciones para la administración o el uso de la composición (por ejemplo, el anticuerpo) a un sujeto.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención se preparan para su conservación mediante la mezcla de anticuerpos con el grado deseado de pureza con moléculas transportadoras, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables (*Remington*: *The Science and Practice of Pharmacy* 20th edition (2000)), en forma de soluciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones liofilizadas. Los transportadores, excipientes, o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en todas las dosis y concentraciones empleadas.

Los anticuerpos de la invención están presentes en la composición farmacéutica en combinación en cantidades que sean eficaces para el fin que se pretende.

Las formulaciones para administrar *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

En un aspecto, la invención enseña como usar un anticuerpo de la invención en la preparación de un fármaco para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, como una enfermedad cardiovascular.

Los anticuerpos de la invención se pueden usar para tratar, inhibir, retrasar la progresión, prevenir/retrasar aparición de lesiones ateroscleróticas, mejorar o prevenir enfermedades, trastornos o procesos asociados a la expresión y/o actividad de una o más moléculas antigénicas.

Según la presente invención una dosis terapéutica de estos anticuerpos estaría en el rango entre 10 microgramos y 10 mg por dosis, preferiblemente entre 100 microgramos y 1 mg por dosis. El anticuerpo de la invención se administra(n) por cualquier medio adecuado, incluyendo las vías parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para tratamiento local, la vía intralesional.

En otro aspecto, la invención proporciona un juego de reactivos para diagnosticar un trastorno, como una enfermedad cardiovascular.

EJEMPLOS:

Los siguientes ejemplos de realización tienen como objetivo ilustrar la invención pero en ningún caso limitar su alcance.

En los siguientes ejemplos todas las enzimas de restricción o modificación utilizadas, así como reactivos y materiales fueron obtenidos de fuentes comerciales a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplo 1. Reconocimiento por el AcM quimérico anti-SO3 de sulfátidos de cerebro bovino

Usando la técnica ELISA, placas PolySorp, Nunc, se recubrieron con 50 µL/pozo de una solución de sulfátidos de cerebro bovino, a una concentración de 4 µg/mL en metanol, y se dejó evaporar el solvente incubándolas durante 90 minutos a 37°C. Luego se bloquearon con 200 µL/pozo de SSTF conteniendo 1% de seroalbúmina bovina (SAB) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se les añadieron 50 µL/pozo de diferentes concentraciones del anticuerpo quimérico anti-SO_3- en SSTF-T y se incubaron durante una hora a 37°C. Luego se lavaron con SSTF y se les adicionó 50 µL/pozo de un antisuero de chivo anti-cadena gamma humana conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma). Después de incubar las placas durante 1 hora a 37°C, se lavaron las

placas nuevamente y se les adicionó 100 µL/pozo de la solución sustrato, consistente en 1 mg/mL de *p*-nitrofenilfosfato, en solución tampón dietanolamina, pH 9,8. La absorbancia del producto de reacción se midió luego de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, en un lector de ELISA a 405 nm.

Como control negativo se empleó un AcM quimérico modificado a partir de la sustitución de R por S en la región variable de la cadena pesada en la posición 98 del AcM quimérico anti-SO_3-.

En la Figura 1 se muestra la reactividad contra los sulfátidos de los diferentes AcMs quiméricos. En el gráfico se observa que el AcM quimérico anti-SO_3- reconoce a los sulfátidos incluso a una concentración tan baja como 0,01 µg/ml. En cambio, el AcM quimérico modificado en la posición 98 no mostró reactividad alguna.

Ejemplo 2. Ensayo de reconocimiento de heparina

Posteriormente se evaluó si el AcM quimérico anti-SO3 reconocía moléculas sulfatadas de mayor complejidad que los sulfátidos. Para el estudio se escogió la heparina, molécula altamente sulfatada y usada como modelo de glucosaminoglicanos sulfatados.

Los ensayos para heparina se realizaron basados en una técnica de ELISA para biglicano, desarrollada por Skalen, K. M. y cols (Nature 417: 750-754 , 2002), con algunas modificaciones. Placas de microtitulación Maxisorp (Nunc) se recubrieron con heparina (Sigma) a 10 µg/mL (100µL/pozo) en solución salina tamponante de Hepes (SSTH) (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,4) y se incubaron toda la noche a 4°C. Se lavaron las placas tres veces con SSTH y luego se bloquearon con SSTH conteniendo SAB al 1%, (SSTH-SAB) durante una hora a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con SSTH-Tween 20 al 0,02% (SSTH-T) y se añadieron diluciones seriadas del AcM quimérico anti-SO_3-, partiendo de una concentración inicial de 40 µg/mL en tampón de unión (10 mM Hepes, 20 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, pH 7,4), durante una hora a temperatura ambiente. Como control negativo se empleó el anticuerpo quimérico modificado a partir de la sustitución de R por S en la región variable de la cadena pesada en la posición 98 del AcM quimérico anti-SO_3-. Se lavaron las placas dos veces con SSTH-T y seguidamente se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con un antisuero de chivo anti-cadena gamma humana conjugada a fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich, EUA) en SSTH-T conteniendo SAB 0,1%. Se realizaron los lavados correspondientes y el revelado se realizó mediante el uso del sustrato *p*-nitrofenilfosfato disuelto en tampón dietanolamina, pH 9,8. La absorbancia a 405 nm del producto se cuantificó en un lector de ELISA (Organon Teknica, Austria).

Como se muestra en la Figura 2, el AcM quimérico anti-SO_3- tuvo una alta reactividad contra la heparina. En cambio,el anticuerpo quimérico modificado utilizado como control de isotipo no mostró reactividad a ninguna de las concentraciones estudiadas.

Ejemplo 3: Reconocimiento de la línea celular J774 por citometría de flujo.

Los monocitos y los macrófagos son importantes en los procesos inflamatorios, como la aterosclerosis (Østerud B, Bjørklid E. Physiol Rev 83:1069-1112, 2003). Estas células sintetizan proteoglicanos y se ha demostrado que algunas de las vías de incorporar LDL oxidadas por los macrófagos en el proceso de formación de las células espumosas involucran a los proteoglicanos de la membrana celular (Halvorsen B y cols. Biochem J. 331:743-752, 1998). Para determinar si el anticuerpo quimérico anti-SO_3- era capaz de reconocer macrófagos, se realizó un experimento de citometría de flujo utilizando la línea celular de macrófagos murinos J774, la cual se cultivó en medio DMEM-F12 (Gibco BRL, Paisley, Escocia) suplementado con 8% de suero fetal de ternera inactivado (SFT; Gibco), 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina.

Las células (0.5 x 10^6 por tubo), se incubaron con 20 µL/tubo de suero inactivado de conejo durante 10 minutos a 37°C para bloquear los receptores Fc-gamma. Posteriormente, se añadieron los AcMs quiméricos anti-SO_3- y el anticuerpo quimérico modificado como control de isotipo, ambos biotinilados a 10 µg/mL, en solución salina tamponada con fosfatos (SSTF), pH 7,4, conteniendo 1% de seroalbúmina bovina, (Sigma, St. Louis, MO) y 0.01% de azida sódica por 30 minutos en baño de hielo. Después de lavar las células, estas se incubaron con un complejo estreptavidina-isotiocianato de fluoresceína (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), a una dilución 1/200, durante 30 minutos en baño de hielo. Las células se lavaron, se resuspendieron en SSTF conteniendo azida sódica al 1% y se analizaron en un citómetro de flujo (Becton- Dickinson, San Jose, CA).

Como se observa en la Figura 3, el anticuerpo quimérico utilizado como control de isotipo, no reconoció a las células de la línea J774. En cambio, el anticuerpo quimérico anti-SO_3- reconoció el 93.7% de las células.

Ejemplo 4: Reconocimiento de placa de ateroma en aorta humana.

La determinación inmunohistoquímica (IHQ) del reconocimiento del anticuerpo quimérico anti-SO_3- se realizó en fragmentos de aorta humana fijados en formalina y embebidos en parafina. Se emplearon cortes de tejido de 4 µm, que se montaron sobre láminas silanizadas y se incubaron a 68°C durante 12 horas. Los cortes de tejidos se desparafinaron en xilol y se hidrataron en etanol a concentraciones decrecientes. Luego se aclararon durante 5 minutos en agua bidestilada y se lavaron en SSTF. El desenmascaramiento antigénico se realizó empleando un baño termostatado ajustado a una temperatura de 100 °C. Las láminas inmersas en tampón citrato pH 6.0 se mantuvieron en el baño durante 30 minutos, y luego se hirvieron en tampón citrato pH

6,8 durante 10 minutos, utilizando un horno microondas. Los cortes se dejaron enfriar durante 20 minutos, y posteriormente se lavaron con agua destilada y en SSTF. La peroxidasa endógena se inhibió con una solución de H_2O_2 al 3% durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavó con SSTF, y se aplicaron el anticuerpo quimérico anti-SO_3- y el anticuerpo control de isotipo biotinilados, a una concentración de 50 µg/mL, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó con SSTF y se añadió el complejo estreptavidina-peroxidasa (Anacrom Diagnostics) por igual tiempo y temperatura. Finalmente, las secciones de tejido se incubaron con una mezcla fresca de solución de 3,3'-diaminobencidina (DAB) en 1 mL de tampón sustrato durante 3 a 5 min. El contraste se realizó con hematoxilina de Mayer, se procedió a la deshidratación en alcoholes a concentraciones ascendentes, se clarificó en xilol y finalmente se montaron las láminas en medio permanente Eukitt (Kinder GmbH & CO). La evaluación se realizó utilizando un microscopio de luz blanca (Leica).

La Figura 4 muestra como el anticuerpo quimérico anti-SO_3- reaccionó intensamente con las muestras de las lesiones ateroscleróticas presentes en la aorta, observándose reactividad con macrófagos cargados de grasa o células espumosas y con el núcleo lipídico de las lesiones. (la reactividad se muestra en color marrón intenso). La figura muestra como el anticuerpo utilizado como control de isotipo no reconoció los cortes de aorta humana

Ejemplo 5: Capacidad de inducir respuesta anti-heparina en ratones por el anticuerpo quimérico anti-SO_3- .

Se utilizaron 10 ratones BALB/c hembras, que recibieron 50 µg del anticuerpo quimérico anti-SO_3- en 200 µL por vía subcutánea. Las inmunizaciones se realizaron cada 14 días hasta completar un total de cuatro dosis. El anticuerpo quimérico anti-SO_3- se administró en ausencia de adyuvante o proteína transportadora. Se tomaron muestras de suero los días 0 y 49 (siete días después de la cuarta dosis).

La presencia de anticuerpos anti-heparina en el suero de los animales inmunizados se midió utilizando la técnica de ELISA descrita en el Ejemplo 2, utilizando placas MaxiSorp recubiertas con heparina (10µg/mL, 100 µL/pozo). Los sueros de los ratones se ensayaron a una dilución 1/100 en tampón de unión, 100 µL/pozo. Como anticuerpo secundario se utilizó un antisuero de chivo anti-IgG e IgM de ratón conjugado a fosfatasa alcalina (Jackson).

La Figura 5 muestra los resultados obtenidos al ensayar los sueros de los ratones tomados los días 0 y 49. No se detectó presencia de anticuerpos anti-heparina en los sueros preinmunes (día 0) de ninguno de los animales. En cambio, se detectó la presencia de dichos anticuerpos séricos luego de que los ratones se inmunizaron con el anticuerpo quimérico anti-SO_3-. Este resultado indica que el anticuerpo quimérico anti-

SO_3- no solo reconoce fuertemente la heparina, sino que tiene la capacidad sorprendente de inducir una respuesta contra esta molécula (efecto vacuna).

Ejemplo 6: Efecto anti-aterosclerótico del anticuerpo quimérico anti-SO_3- .

Para evaluar si el anticuerpo quimérico anti-SO_3- era capaz de producir un efecto biológico *in vivo*, se utilizó un modelo, previamente descrito, de inducción de lesiones ateroscleróticas en conejos con Lipofundín (Takács E y cols.Morphol Igazsagugyi Orv Sz. 26:99-105, 1998; Noa M & Más R. Progresos en CienciasMédicas, 6: 14-19, 1992).

Se utilizaron 15 conejos Nueva Zelandia que se dividieron en tres grupos de cinco conejos cada uno. El grupo 1 no recibió ningún tratamiento (control negativo). El grupo 2 recibió diariamente, por ocho días, 2 mL de Lipofundín por kg de peso (Braun), por vía intravenosa. Al grupo 3 se le administró tres dosis de 100 μg del anticuerpo quimérico anti-SO_3- en SSTF por vía subcutánea a intervalos de siete días, y el día de la última inmunización se inició la administración diaria de Lipofundín con el mismo esquema que se utilizó en los animales del grupo 2. Todos los conejos se sacrificaron bajo anestesia un día después de recibir la última dosis de Lipofundín y los animales controles negativos del grupo 1 se sacrificaron también ese día. Se obtuvieron las aortas de los animales y se realizó el estudio de las mismas por anatomía patológica para determinar la presencia de lesiones ateroscleróticas macroscópicas y microscópicas.

En las aortas de los conejos del grupo 1 que no recibieron ningún tratamiento no se observaron lesiones macroscópicas. En todas las aortas provenientes de los conejos del grupo 2 que recibieron durante ocho días 2 mL de Lipofundín por kg de peso se observaron lesiones macroscópicas. En las aortas de los conejos que recibieron previamente tres dosis del anticuerpo quimérico anti-SO_3- y luego se les administró el Lipofundín, no se observaron lesiones macroscópicas.

Para el estudio de lesiones microscópicas, fragmentos de las aortas se fijaron en formalina y se embebieron en parafina. Se emplearon cortes de tejido de 4 μm, que se montaron sobre láminas silanizadas y la tinción se realizó con hematoxilina-eosina. La evaluación se realizó utilizando un microscopio de luz blanca (Leica).

Al evaluar los cortes de tejido de aorta de los conejos que no recibieron ningún tratamiento, todos mostraban la estructura normal de las arterias, sin presentar alteraciones, como se muestra en la Figura 6.

En los cortes de aorta de todos los conejos del grupo que recibió el lipofundín se observaron las lesiones características: presencia de engrosamiento de la pared arterial hacia la íntima, con depósitos de material extracelular entre las fibras musculares, elásticas y colágenas, así como distorsión de la arquitectura tisular. En cambio, en las muestras de tres de los conejos que recibieron tres dosis del anticuerpo quimérico anti-SO_3- y luego se les administró el Lipofundín, no se observaron lesiones microscópicas.

En las muestras de los restantes dos conejos se observaron algunas alteraciones tisulares dadas por discreto engrosamiento en algunas zonas de la pared arterial, con algún depósito de material extracelular entre las fibras. No se observaron engrosamientos en la íntima.

Breve descripción de las figuras:

Figura 1. Reconocimiento de sulfátidos por el AcM quimérico anti-SO_3-.
Diferentes concentraciones del AcM quimérico anti-SO_3- y del AcM quimérico control de isotipo fueron añadidas a placas de ELISA recubiertas con los sulfátidos a una concentración de 4 µg/mL en metanol. La reactividad se detectó con un antisuero de chivo anti-cadena gamma humana conjugada a fosfatasa alcalina. La absorbancia a 405 nm del producto se cuantificó en un lector de ELISA. (*$p<0.05$, Prueba de U de Mann-Whitney)

Figura 2. Reconocimiento de heparina por el AcM quimérico anti-SO_3-.
Diferentes concentraciones del AcM quimérico anti-SO_3- y del AcM quimérico control de isotipo fueron añadidas a placas de ELISA recubiertas con heparina a una concentración de 10 µg/mL en SSTH. La reactividad se detectó con un antisuero de chivo anti-cadena gamma humana conjugada a fosfatasa alcalina. La absorbancia a 405 nm del producto se cuantificó en un lector de ELISA .(*$p<0.05$, Prueba de U de Mann-Whitney)

Figura 3. Reconocimiento de la línea celular J774 por el AcM quimérico anti-SO_3-.
Las células se incubaron con 10 µg/mL de los anticuerpos biotinilados. La reacción se reveló con un antisuero de chivo anti-IgG humana conjugado a FITC y se analizó por citometría de flujo.

Figura 4. Reconocimiento de placas de ateroma humanos por el AcM quimérico anti-SO_3-.
Fragmentos de aorta humana fijados en formalina y embebidos en parafina (4 µm) se incubaron con el anticuerpo quimérico anti-SO_3- y el anticuerpo control de isotipo biotinilados. La reaction se reveló con un complejo estreptavidina-peroxidasa. Los epítopos reconocidos por el AcM anti-SO_3- se indican por la coloración marrón intensa y los núcleos de las células se contratiñeron con hematoxilina. (400 X).

Figura 5: Respuesta de anticuerpos contra heparina inducidos por la inmunización con el AcM quimérico anti-SO_3-.
Muestras de sueros obtenidos de ratones BALB/c los días 0 y 49 del inicio de las inmunizaciones con el AcM quimérico anti-SO_3- se ensayaron por ELISA. Cada símbolo es el valor obtenido del suero de un ratón. pI y hI: preinmune e hiperinmune, respectivamente (*$p<0.05$, prueba U de Mann-Whitney).

Figura 6: Efecto del tratamiento con el AcM quimérico anti-SO_3- en el desarrollo de lesiones ateroscleróticas en el modelo de Lipofundin en conejos.
Cortes histológicos de las aortas torácicas de conejos representativos de los diferentes grupos de estudio. (A) Grupo 1, animal no tratado, donde se aprecia la estructura normal de las arterias, sin presentar alteraciones. (B) Grupo 2, animal tratado con Lipofundín, donde se observa la presencia de engrosamiento de la pared arterial hacia la íntima, con depósitos de material extracelular entre las fibras musculares, elásticas y colágenas, así como distorsión de la arquitectura tisular. (C y D) Grupo 3, animales inmunizados con el AcM quimérico anti-SO_3- y a los que luego se les administró Lipofundín; no se observan lesiones tisulares evidentes ni engrosamientos en la íntima. Tinción hematoxilina-eosina 180X

ANTICUERPOS QUE RECONOCEN SULFATIDOS Y PROTEOGLICANOS SULFATADOS Y SU USO.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal para el diagnostico y tratamiento de enfermedades cardiovasculares caracterizado porque el anticuerpo reconoce sulfatidos y proteoglicanos sulfatados

2. El anticuerpo monoclonal según reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia de las regiones determinantes de la complementariedad de la región variable de las cadenas pesada y ligera es la que se muestra a continuación:
   Cadena Pesada
   HCDR1 **SEQ ID: 1** RYSVH
   HCDR2 **SEQ ID: 2** MIWGGGSTDYNSALKS
   HCDR3 **SEQ ID: 3** SGVRRGRAQAWFAY
   Cadena Ligera
   LCDR1 **SEQ ID: 4** KASQDVSTAVA
   LCDR2 **SEQ ID: 5** SASYRYT
   LCDR3 **SEQ ID: 6** QQHYSTPWT

3. El anticuerpo monoclonal según reivindicación 2, caracterizado porque la secuencia de las regiones de marco de la región variable de las cadenas pesada y ligera es la que se muestra a continuación:
   Cadena Pesada
   HFR1 **SEQ ID: 7** QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLS
   HFR2 **SEQ ID: 8** WVRQPPGKGLEWLG
   HFR3 **SEQ ID: 9** RLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCAR
   HFR4 **SEQ ID: 10** WGQGTLVTVSA
   Cadena Ligera
   LFR1 **SEQ ID: 11** DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC
   LFR2 **SEQ ID: 12** WYQQKPGQSPKLLIY
   LFR3 **SEQ ID: 13** GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYC
   LFR4 **SEQ ID: 14** FGGGTKLELK

4. El anticuerpo monoclonal según reivindicación 3, caracterizado porque la secuencia de las regiones constantes son IgG1 humana para cadena pesada y Ck humana para la cadena ligera.

5. Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende uno de los anticuerpos de las reivindicaciones 1 a 4 o los fragmentos de los mismos.

6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, caracterizada porque adicionalmente comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.

7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, caracterizada porque además comprende un adyuvante.

8. Un juego de reactivos útil en el diagnostico de lesiones ateroscleróticas caracterizado porque comprende uno de los anticuerpos de las reivindicaciones 1 a 4 o sus fragmentos.

9. El uso de un anticuerpo monoclonal que reconoce sulfatidos y proteoglicanos sulfatados para la manufactuira de un medicamento útil para el diagnostico y tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

10. Uso del anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 4 para la manufactuira de un medicamento útil para el diagnostico y tratamiento de enfermedades cardiovasculares.