



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

06-98610

21. EXPEDIENTE N° 06-98610

54. TÍTULO "INMUNOGLOBULINAS"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 16/24

71. SOLICITANTE GLAXO GROUP LIMITED

DOMICILIO MIDDLESEX, INGLATERRA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. 29 SEP 2006



PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-098610- -00000-0000
Fec: 2006-09-29 17:29:53 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTE/II
Eve: 376 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 298

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

30-10-06

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención☐ Patente de Modelo de Utilidad☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: GLAXO GROUP LIMITED

Dirección: Glaxo Wellcome House, Berkeley
Avenue, Greenford Middlesex
UB6 0NN, Inglaterra.Nacionalidad o Domicilio: Middlesex,
Inglaterra.

Lugar de Constitución: Inglaterra y Gales.

Teléfono: 3284270 Fax: 6069701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALICIA LLORED RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES)
(72)Nombre: ELLIS, Jonathan, Henry; EON-DUVAL, Alexandre; GERMASCHEWSKI,
Volker; PLUMPTON, Christopher; RAPSON, Nicholas, Timothy y WEST, Michael,
Robert.Dirección: GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1
2NY y c/o GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1
2NY.

Nacionalidad o Domicilio: Reino Unido.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/GB2005/001147Fecha: 29/03/05Publicación Internacional No. WO 2005/095457 A3Fecha: 13/10/05

⑥

Título (54)

"INMUNOGLOBULINAS"

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 16/24

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

GB

GB

(32) Fecha

30/03/04

30/03/04

(31) Número de Solicitud

0407197.3

0407193.2

⑨

Comprobante de Pago No. 06-71.054Fecha: 14 de Septiembre de 2006

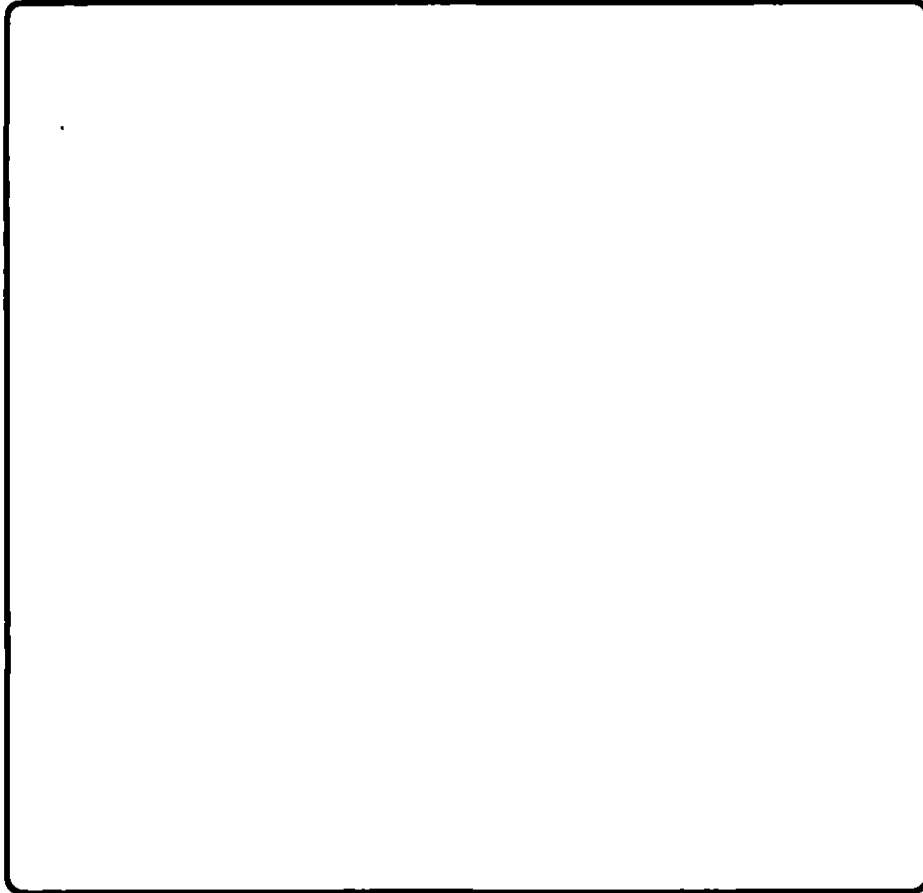
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: reporte de búsqueda internacional con su traducción, publicación con su traducción, opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional con su traducción y listado de secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-098510- -00000-0000
Fee: 2006-08-28 17:28:53 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEYII
Eve: 378 FASENACIONALI
Adj 411 PRESENTACION Folios: 258

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 000174089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 71,054
FECHA : SEPTIEMBRE 14 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLORERA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	45285109	14/09/2006	9,205,000.

***** C O N C E P T O *****

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-09-02-440
DE LAS PARTES PERTINENTES DE UN DOCUMENTO
PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, Documento escrito en inglés y en español.

Notarización del documento es español.
Hay un sello rojo sobre una cinta verde.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)
Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

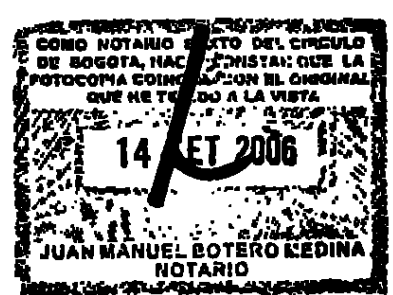
1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
2. Este documento público
3. ha sido firmado por Martin E Buchner
4. actuando como Notario Público
5. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público

CERTIFICADO

6. en Londres
7. el 26 de agosto de 2004
8. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
9. Número G499865
10. Sello/Estampilla
11. Firma: (ilegible)
12. M. Monaghan
13. Sello de la Oficina de Asuntos

23 AUG 2004 15:15
REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE
SECRETARÍA DE ESTADO
ASUNTOS EXTERIORES Y DEL COMMONWEALTH
23 AUG 2004 15:15
REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE
SECRETARÍA DE ESTADO
ASUNTOS EXTERIORES Y DEL COMMONWEALTH

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177
ANTTA ESCOBAR DE TAMAYO



MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

258650

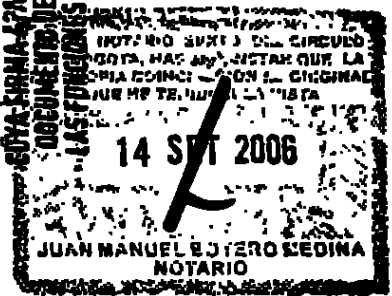
2006 SET -3 P 12:12

Andrés Escobar

ues

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.



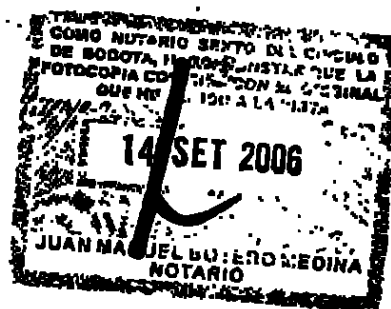
Exteriores y del Commonwealth

Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse en la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es autentica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido a mi mejor saber y entender, este día 2 de septiembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Yo, el infrascrito, Martin Emil BUCHNER, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

CERTIFICO:

QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don Peter John GIDDINGS, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad inglesa denominada "GLAXO GROUP LIMITED", Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Inglaterra, e inscrita en la Oficina de Registro de Sociedades bajo el número 305979, con domicilio social en Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 ONN, Inglaterra;

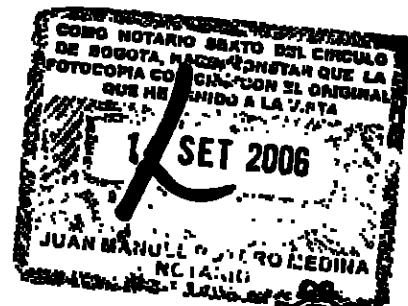
QUE el citado Señor Don Peter John GIDDINGS está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 30 de enero de 2003, una copia del cual he tenido a la vista;

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE donde y como convenga y fuere necesario expido el presente Certificado que firmo y sello en dicha Ciudad de Londres, el día de hoy veintiseis de agosto del año dos mil cuatro.



Martin Emil BUCHNER
Notario Publico de Londres, Inglaterra



DE PINNA

26 Piccadilly London W1J 0LJ

Telephone: +44 (0)20 7225 2800 Facsimile: +44 (0)20 7225 0000 TTX No. 42651 Piccadilly 2

APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by Martin E Buchner
a été signé par
3. Acting in the capacity of Notary Public
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of The Said Notary Public
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Attesté
6. the/le 26 August 2004

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

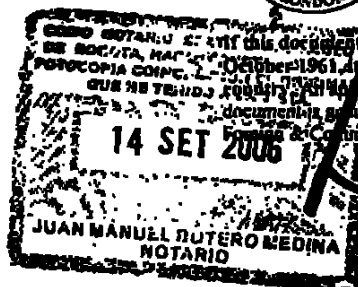
8. Number/sous No **G499865**

9. Stamp:
timbre:

10. Signature: M. Moynihan



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat



This document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961. It should be presented to the consular section of the mission representing that country. The apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Government of the United Kingdom or the Commonwealth Office approves of the contents.

Los abajo firmados, GLAXO GROUP LIMITED, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Inglaterra y Gales..

con domicilio en Glaxo Wellcome House
Berkeley Avenue
Greenford Middlessex UB8 0NN
Inglaterra

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 8o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los asuntos relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned, GLAXO GROUP LIMITED, a corporation organized and existing under the laws of England and Wales.

domiciled at Glaxo Wellcome House
Berkeley Avenue
Greenford Middlessex UB8 0NN
Great Britain

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

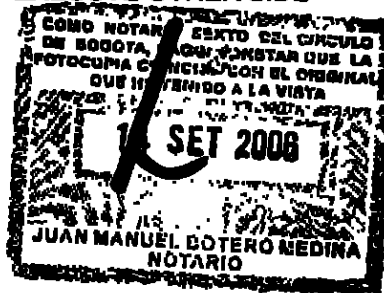
Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all instalments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 23 AUG 2004

Peter John GIDDINGS as Attorney and
Authorized Officer

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE



2

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT		
(21) N° de solicitud: 06-98610		(51) Int Cl: C07K 16/24		
(22) Fecha de solicitud: 29-09-06		(71) Solicitante(s): GLAXO GROUP LIMITED		
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) Pais	
	0407187.3	30-03-04	GB	
	0407183.2	30-03-04	GB	
		(72) Inventor(es): ELLIS, Jonathan, Henry; EON-DUVAL, Alexandre; GERMASCHEWSKI, Volker; PLUMPTON, Christopher; RAPSON, Nicholas, Timothy y WEST, Michael, Robert		
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE		
(85)	Fecha límite inicio fase nacional: 30-10-06		(87)	Publicación Internacional
(88)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha:	13-10-05
	Fecha de presentación de la solicitud: 29-03-05		N° publicación:	WO 2005/095457 A3
	No. de solicitud: PCT/GB2005/001147			
(54) Título:		INMUNOGLOBULINAS		

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1

Un anticuerpo terapéutico que une específicamente OSM, particularmente hOSM, y modula la interacción entre OSM y gp130.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

9

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(21) N° de solicitud: 06-98610 (22) Fecha de solicitud: 29-09-06

(51) Clasificación Internacional: C07K 16/24

(71) Solicitante(s): GLAXO GROUP LIMITED

(72) Inventor(es): ELLIS, Jonathan, Henry; EON-DUVAL, Alexandre; GERMASCHEWSKI, Volker; PLUMPTON, Christopher; RAPSON, Nicholas, Timothy y WEST, Michael, Robert.

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	0407197.3	30-03-04	GB
	0407193.2	30-03-04	GB

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 30-10-06

(87) Publicación Internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: 13-10-05

Fecha de presentación de la solicitud: 29-03-05

N° publicación: WO 2005/095457 A3

No. de solicitud: PCT/GB2005/001147

(54) Título: INMUNOGLOBULINAS

9

11

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente GCN/PB60806	PARA FUTURAS ACCIONES ver Forma PCT/ISA/220 así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud internacional No. PCT/GB2005/001147	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 29/03/2005	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) 30/03/2004
Solicitante GLAXO GROUP LIMITED		

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 6 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte

a. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo en este ítem.

☐ La búsqueda internacional se llevó a cabo según la traducción de la solicitud internacional proporcionada a esta Autoridad (Regla 23.1(b)).

b. ☒ Respecto a una secuencia de ácido nucleótico y/o amino revelado en la solicitud internacional, ver Casilla No. I.

2. ☒ Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Casilla II).

3. ☐ Falta unidad de invención (ver Casilla III).

4. Respecto al título,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lee así:

5. Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Regla 38.2(b), según aparece en la Casilla No. IV. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. Respecto a los dibujos,

a. La figura de los dibujos que se publicará con el resumen es la Figura No. _____

☐ como lo sugirió el solicitante.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

b. ☒ ninguna de las figuras es para ser publicada con el resumen.

Casilla No. I Secuencia(s) de ácido nucleótico y/o aminoácido (Continuación del ítem 1.b de la primera hoja)

1. Con respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia de aminoácido revelados en la solicitud internacional y necesarios para la invención reivindicada, la búsqueda internacional se realizó sobre la base de:
 - a. tipo de material
 - ☒ un listado de secuencias
 - ☐ tabla(s) relacionada(s) con el listado de secuencia
 - b. formato del material
 - ☒ en formato escrito
 - ☒ en una forma legible para computadora
 - c. momento de presentación/suministro
 - ☒ contenido en la solicitud internacional tal como se presentó
 - ☐ presentado junto con la solicitud internacional en forma legible para computadora
 - ☒ suministrado subsecuentemente a esta Autoridad para el propósito de la búsqueda
2. ☒ Adicionalmente, en el caso de que más de una versión o copia de un listado de secuencias y/o tabla en relación con aquello haya sido presentada o suministrada, o se suministraron, tal como es apropiado, las afirmaciones requeridas de que la información en las copias subsecuentes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud tal como se presentó o no va más allá de la solicitud tal como se presentó.
3. Comentarios adicionales:

Casilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del ítem 2 de la primera hoja)

Este Reporte de Búsqueda Internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.:
porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:
Aunque las reivindicaciones 28-35, 58 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/composición.
2. ☐ Reivindicaciones Nos.:
porque se relacionan con partes de la Solicitud Internacional que no cumplen con los requisitos preacritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:
3. ☐ Reivindicaciones Nos.:
porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).

Casilla III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del ítem 3 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.
2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.
3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

Comentario sobre Protesta ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante.

☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2005/001147

14

A. CLASIFICACION DE MATERIA OBJETO C07K 16/24 A61K39/395 G01N33/53		
Según la Clasificación de Patente Internacional (IPC) o según la clasificación nacional y la IPC		
B. CAMPOS BUSCADOS		
Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación) C07K A61K G01N		
Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados		
Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados) EPO-Internacional, Búsqueda de Secuencia		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	WO 99/48523 A (GLAXO GROUP LIMITED; LIFE, PAUL, FREDERICK) 30 de Septiembre de 1999 (1999-09-30) citado en la solicitud reivindicaciones 1-14; ejemplos 6, 9	1-73
A	OGATA I Y COL: "La Oncostatina M es producida durante el embarazo por células deciduales y estimula la liberación de HCG" MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION, AGOSTO 2000, vol. 6, no. 8, Agosto de 2000 (2000-08), páginas 750-757, XP002364877 ISSN: 1360-9947 resumen figura 7	1-73
----- -/-		
☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.		☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.
* Categorías especiales de documentos citados: 'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular 'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional 'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica) 'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios 'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada		'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención 'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo 'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica 'Z' documento miembro de la misma familia de patentes
Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional 2 de Febrero de 2006		Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional 14/02/2006
Nombre y dirección de correo de la ISA Oficina de Patentes Europea, P. B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Funcionario autorizado van Klompenburg, W

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2005/001147

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A	CARROLL G Y COL: "Antagonismo de la subfamilia citocina IL-6-- una estrategia potencial para terapia más efectiva en artritis reumatoide" INFLAMMATION RESEARCH, BIRKHAUSER VERLAG, BASEL, CH, vol. 47, 1997, páginas 1-7, XP002115636 ISSN: 1023-3830 el documento completo -----	1-73

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
Información sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2005/001147

16

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9948523 A	30-09-1999	AU 3046399 A	18-10-1999
		BR 9909077 A	05-12-2000
		CA 2325585 A1	30-09-1999
		CN 1295482 A	16-05-2001
		EP 1071449 A2	31-01-2001
		HU 0101690 A2	28-08-2001
		JP 2002507580 T	12-03-2002
		PL 343431 A1	13-08-2001
		US 6706266 B1	16-03-2004
		ZA 200005076 A	21-09-2001

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 18 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 48.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 48.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference GCM/PB60806	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/GB2005/001147	International filing date (day/month/year) 29/03/2005	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 30/03/2004
Applicant GLAXO GROUP LIMITED		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box II).3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/GB2005/001147

20

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the International application and necessary to the claimed invention, the International search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ in written format
 - ☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☒ contained in the International application as filed
 - ☐ filed together with the International application in computer readable form
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2005/001147

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 28-35,58 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB2005/001147A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K16/24 A61K39/395 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/48523 A (GLAXO GROUP LIMITED; LIFE, PAUL, FREDERICK) 30 September 1999 (1999-09-30) cited in the application claims 1-14; examples 6,9	1-73
A	OGATA I ET AL: "Oncostatin M is produced during pregnancy by decidual cells and stimulates the release of HCG." MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION. AUG 2000, vol. 6, no. 8, August 2000 (2000-08), pages 750-757, XP002364877 ISSN: 1360-9947 abstract figure 7	1-73

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 February 2006

Date of mailing of the international search report

14/02/2006

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van Klompenburg, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB2005/001147

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CARROLL G ET AL: "Antagonism of the IL-6 cytokine subfamily—a potential strategy for more effective therapy in rheumatoid arthritis" INFLAMMATION RESEARCH, BIRKHAUSER VERLAG, BASEL, CH, vol. 47, 1997, pages 1-7, XP002115636 ISSN: 1023-3830 the whole document	1-73

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB2005/001147

24

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9948523	A	30-09-1999	AU 3046399 A 18-10-1999
			BR 9909077 A 05-12-2000
			CA 2325585 A1 30-09-1999
			CN 1295482 A 16-05-2001
			EP 1071449 A2 31-01-2001
			HU 0101690 A2 28-08-2001
			JP 2002507580 T 12-03-2002
			PL 343431 A1 13-08-2001
			US 6706266 B1 16-03-2004
			ZA 200005076 A 21-09-2001

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
13 de Octubre de 2005 (13.10.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/095457 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 16/24 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/GB2005/001147

(22) Fecha de Registro Internacional:
29 de Marzo de 2005 (29.03.2005)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:
0407197.3 30 de Marzo de 2004 (30.03.2004) GB
0407193.2 30 de Marzo de 2004 (30.03.2004) GB

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto Estados Unidos de América): GLAXO GROUP LIMITED [GB/GB]; Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford Middlesex UB6 0NN (GB).

(72) Inventores; e

(73) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos de América solamente): ELLIS, Jonathan, Henry [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY (GB). EON-DUVAL, Alexandre [FR/GB]; c/o GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY (GB). GERMASCHESKI, Volker [DE/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY (GB). PLUMPTON, Christopher [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY (GB). RAPSON, Nicholas, Timothy [GB/GB]; c/o GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY (GB). WEST, Michael, Robert [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY (GB).

(74) Agente: NASH, Guy, Cameron; GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property (CN925.1), 980 Great West Road, Brentford Middlesex TW8 9GS (GB).

(81) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

- en cuanto al derecho del solicitante de solicitar y obtener una patente (Regla 4.17(ii))
- en cuanto al derecho del solicitante de reivindicar la prioridad de la solicitud anterior (Regla 4.17(iii))
- de invención (Regla 4.17(iv))

Publicada:

- con reporte de búsqueda internacional
- antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser republicada de nuevo en el caso de recibo de modificaciones

(88) Fecha de publicación del reporte de búsqueda internacional:
27 de Abril de 2006

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase a "Las Notas Gulas sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: INMUNOGLOBULINAS

(57) Resumen: La presente invención se refiere a inmunoglobulinas, tales como anticuerpos, que se unen específicamente Oncostatina M (OSM), particularmente OSM humana (hOSM) y modulan la interacción entre OSM y gp130. En modalidades típicas, la OSM se glicosila. La invención también se refiere a anticuerpos que modulan la interacción entre tanto el Sitio II como Sitio III de OSM y sus respectivos patrones de interacción. Se describen además composiciones farmacéuticas, métodos de selección y de tratamiento médico.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 October 2005 (13.10.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/095457 A3

(51) International Patent Classification:
C07K 16/24 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/GB2005/001147

(22) International Filing Date: 29 March 2005 (29.03.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0407197.3 30 March 2004 (30.03.2004) GB
0407193.2 30 March 2004 (30.03.2004) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): GLAXO
GROUP LIMITED (GB/GB); Glaxo Wellcome House,
Berkley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 0NN (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventor/Applicants (for US only): ELIJAH, Jonathan,
Henry (GB/GB); GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road,
Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). EON-DUVAL,
Alexandre [FR/GB]; c/o GlaxoSmithKline, Gunnels
Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB).
GERMASCHESKI, Volker [DE/GB]; GlaxoSmithK-
line, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire
SG1 2NY (GB). PLUMPTON, Christopher [GB/GB];
GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage,
Hertfordshire SG1 2NY (GB). RAPSON, Nicholas,
Timothy [GB/GB]; c/o GlaxoSmithKline, Gunnels Wood
Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). WEST,
Michael, Robert [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels
Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB).

(74) Agent: NASH, Guy, Cameron; GlaxoSmithKline, Corpo-
rate Intellectual Property (CN925.1), 980 Great West Road,
Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a
patent (Rule 4.17(i))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the
earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limits for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(85) Date of publication of the international search report:
27 April 2006

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: IMMUNOGLOBULINS

(57) Abstract: The present invention concerns immunoglobulins, such as antibodies, which specifically bind Oncostatin M (OSM), particularly human OSM (hOSM) and modulate the interaction between OSM and gp130. In typical embodiments, OSM is glyco-
sylated. The invention also concerns antibodies that modulate the interaction between both Site II and Site III of OSM and their
respective interacting partners. Further disclosed are pharmaceutical compositions, screening and medical treatment methods.

WO 2005/095457 A3

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES

27

De la
AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Para:		PCT	
ver forma PCT/ISA/220		OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL (PCT Regla 43bis.1)	
		Fecha de correo (día/mes/año) ver forma PCT/ISA/210 (segunda hoja)	
Registro de referencia del solicitante o agente ver forma PCT/ISA/220		PARA FUTURAS ACCIONES Ver párrafo 2 a continuación	
Solicitud Internacional No. PCT/GB2005/001147	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 29.03.2005	Fecha de prioridad (día/mes/año) 30.03.2004	
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC C07K16/24, A61K39/395, G01N33/53			
Solicitante GLAXO GROUP LIMITED			
1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: ☒ Casilla No. I Bases de la opinión ☒ Casilla No. II Prioridad ☒ Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial ☐ Casilla No. IV Falta de unidad de invención ☒ Casilla No. V Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación ☐ Casilla No. VI Ciertos documentos citados ☐ Casilla No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional ☐ Casilla No. VIII Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional 2. ACCIONES FUTURAS Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66.1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional. Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde. Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220. 3. Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220.			
Nombre y dirección de correo de la ISA: Oficina Europea de Patentes - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016		Funcionario Autorizado van Klompenburg, W Teléfono No. +31 70 340-2243	

28

28

Casilla No. I. Bases de la opinión

1. Respecto al idioma, esta opinión se ha establecido según la solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo bajo este ítem.
☐ Esta opinión se ha establecido según una traducción del idioma original al siguiente idioma , que es el idioma de una traducción proporcionada para la búsqueda internacional (bajo las Reglas 12.3 y 23.1(b)).
2. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:
 - a. tipo de material:
☒ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia
 - b. formato de material:
☒ en formato escrito
☒ en formato legible por computador
 - c. tiempo de presentación/suministro:
☒ contenido en la solicitud internacional según se registró.
☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.
☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda..
3. ☒ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.
4. Comentarios adicionales:

Casilla No. II Prioridad

1. ☒ La validez de la prioridad reivindicada no ha sido considerada porque la Autoridad Internacional de Búsqueda no tiene una copia de la solicitud anterior cuya prioridad ha sido reclamada, o donde se requiera, una traducción de dicha solicitud anterior. Sin embargo, esta opinión ha sido establecida asumiendo que la fecha relevante (Reglas 43bis.1 y 64.1) es la fecha de prioridad reclamada.
2. ☐ Esta opinión ha sido establecida como sino se hubiera reclamado prioridad debido al hecho de que el reclamo de prioridad se ha encontrado inválido (Reglas 43bis.1 y 64.1). Por consiguiente, para los propósitos de esta opinión la fecha de presentación internacional indicada arriba es considerada como la fecha relevante.
3. Observaciones adicionales, si es necesario:

Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

Las preguntas de si la invención reivindicada parece ser novedosa, comprender un nivel inventivo (ser no obvia) o ser aplicable industrialmente no se han examinado respecto a:

- ☐ toda la solicitud internacional,
☒ reivindicaciones Nos. 1, 18-38, 56-58, 60-63, 69, 70, 72, 73 en parte, y 28-35, 58 con respecto a aplicabilidad industrial

porque:

- ☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 28-35, 58 con respecto a aplicabilidad industrial se refieren a la siguiente materia objeto la cual no requiere un examen preliminar internacional (*especifique*):

ver hoja separada

- ☒ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique los elementos particulares a continuación*) o dichas reivindicaciones Nos. 1, 18-38, 56-58, 60-63, 69, 70, 72, 73 en parte son tan poco claros que no se podría formar una opinión significativa (*especifique*):

ver hoja separada

- ☐ las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones Nos. son sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no se podría formar una opinión significativa.

- ☒ no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional para toda la solicitud o para dichas reivindicaciones Nos. 1, 18-38, 56-58, 60-63, 69, 70, 72, 73 en parte

- ☐ El nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida no cumple con el estándar proporcionado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas en que:

la forma escrita

☐ no se ha proporcionado

☐ no cumple con el estándar

el formato legible por computador

☐ no se ha proporcionado

☐ no cumple con el estándar

- ☐ las tablas relacionadas con el nucleótido y/o lista de secuencia aminoácida, si están en formato legible por computador únicamente, no cumplen con los requerimientos técnicos proporcionados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

- ☐ Ver la hoja separada para más detalles

**OPINIÓN ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

**Solicitud Internacional No.
PCT/GB2005/001147**

Casilla No. V Afirmación razonada bajo la Regla 43bis.1(a)(i) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Declaración

Novedad (N)	Si: Reivindicaciones No: Reivindicaciones 1-73
Nivel Inventivo (IS)	Si: Reivindicaciones No: Reivindicaciones 1-73
Aplicabilidad Industrial (IA)	Si: Reivindicaciones 1-27, 36-57, 59-73 No: Reivindicaciones

2. Citaciones y explicaciones

ver hoja separada

Re Ítem III

No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

Las actuales reivindicaciones 1,18-38,56-58,60-63,69,70,72,73 abarcan compuestos definidos únicamente mediante su función deseada, contrario a los requisitos de claridad del Artículo 6 PCT, porque el tipo de definición resultado-a-ser-alcanzado no permite que el alcance de la reivindicación sea establecido. El hecho de que cualquier compuesto pueda ser clasificado no permite superar esta objeción, debido a que la persona versada en la materia no tendría conocimiento de antemano en cuanto a si esto caería dentro del alcance reclamado, excepto para los compuestos revelados en esta descripción, ver Tabla A (p.75). Se requeriría un grado de conocimiento excesivo para hacer una clasificación de compuestos aleatoriamente.

La no conformidad con las disposiciones substantivas es de tal magnitud que ninguna búsqueda significativa sobre el alcance total de las reivindicaciones 1,18-38,56-58,60-63,69,70,72,73 podría realizarse en absoluto (Artículo 17(2) PCT). La búsqueda internacional para estas reivindicaciones así como el examen preliminar está limitado a los compuestos de la Tabla A mencionada anteriormente.

Esta Autoridad considera que la materia objeto de las reivindicaciones 28-35,58 está cubierta por las disposiciones de la Regla 67.1(iv) PCT. En consecuencia, no se formulará ninguna opinión respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(I) PCT).

Re Ítem V

Declaración razonada respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

Se hace referencia de los siguientes documentos:

D1: WO 99/48523 A (GLAXO GROUP LIMITED; LIFE, PAUL, FREDERICK) 30 Septiembre 1999 (1999-09-30)

D2: OGATA I ET AL: "La Oncostatina M es producida durante el embarazo por células deciduales y estimula la liberación de HCG". MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION. AGO 2000, vol. 6, no. 8, Agosto 2000 (2000-08), páginas 750-757, XP002364877 ISSN: 1360-9947

D3: CARROLL G ET AL: "Antagonismo de la subfamilia IL-6 citosina – una estrategia potencial para una terapia más efectiva en artritis reumatoide" INFLAMMATION RESEARCH, BIRKHAUSER VERLAG, BASEL, CH, vol. 47, 1997, páginas 1-7, XP002115636 ISSN: 1023-3830

A la luz del gran número de (reivindicaciones independientes) y para el propósito de este examen internacional preliminar, sólo una reivindicación independiente por categoría es tratada en detalle a continuación:

La reivindicación 1 hace referencia a anticuerpos de oncostatina M (OSM) definidos únicamente en términos de una función deseada. Adicional a la falta de claridad, esta reivindicación carece de novedad con respecto a D1. D1 revela antagonistas de OSM (p.1 líneas 1-3) para producir medicamentos y para el tratamiento de desórdenes inflamatorios así como métodos de clasificación para tales antagonistas. Los anticuerpos contra OSM también son enseñados (p.5) por D1. Las figuras 7,8,11, las reivindicaciones 1-12 y los ejemplos 6,8,9 indican la utilidad de varios anticuerpos de OSM como medicamentos y en métodos de tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación tales como la artritis. Por lo tanto, la materia objeto de la reivindicación 1 no es nueva (Art. 33(2) PCT).

La reivindicación independiente 28 se refiere a un método para el tratamiento de un paciente humano con un anticuerpo terapéutico (fragmento). Aparte de las objeciones bajo el Art. 6 PCT esta reivindicación también carece de novedad con respecto a D1. Como se discutió anteriormente, D1 hace referencia a anticuerpos y otros antagonistas que se enlazan a OSM; más específicamente, estos anticuerpos pueden ser usados para tratar desórdenes (p.3, líneas 1-4). Por lo tanto se concluye que la reivindicación 28 carece de novedad (Art. 33(2) PCT).

La reivindicación independiente 64 se refiere a un método de clasificación de un anticuerpo que une putativamente OSM. Como se discutió anteriormente, D1 revela también métodos para la clasificación de anticuerpos que unen putativamente OSM (ejemplo 8). Por lo tanto la materia objeto de la reivindicación 64 carece de novedad (Art.33 (2) PCT).

Otras reivindicaciones independientes

El mismo razonamiento aplica, mutatis mutandis, a la materia objeto de las reivindicaciones independientes correspondientes que por consiguiente también se considera que no son nuevas/inventivas.

Reivindicaciones dependientes

Ninguna de las reivindicaciones dependientes contiene alguna característica que en combinación con las características de cualquier reivindicación a la que se refieran, cumpla con los requisitos del PCT con respecto a novedad y/o nivel inventivo, ver documentos D1-D3, y los apartes correspondientes citados en el reporte de búsqueda, de manera específica se resalta que los anticuerpos caracterizados por sus secuencias son considerados como idénticos a los anticuerpos mencionados en D1.

Concisión (Artículo 6 PCT)

Aunque las reivindicaciones 1,14-17,27,28,36-51, 55-65 han sido redactadas como reivindicaciones independientes separadas, parecen estar relacionadas de manera efectiva con la misma materia objeto y parecen diferir entre ellas únicamente con respecto a la definición de la materia objeto para la cual se busca protección y con respecto a la terminología usada para las características de dicha materia-objeto. Por lo tanto, las reivindicaciones en mención carecen de concisión y como tal no cumplen con los requisitos del Artículo 6 PCT.

Método de tratamiento

Para la evaluación de las actuales reivindicaciones 28-35,58 acerca de la aplicabilidad industrial, no existe criterio unificado en los estados contratantes del PCT. La patentabilidad también puede ser dependiente de la formulación de las reivindicaciones. La EPO por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable la materia objeto de las reivindicaciones para el uso de un compuesto en tratamiento médico, sin embargo, puede permitir reivindicaciones de primer uso en el tratamiento médico para un compuesto conocido y el uso de tal compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

PATENT COOPERATION TREATY

34

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/GB2005/001147

International filing date (day/month/year)
29.03.2005

Priority date (day/month/year)
30.03.2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
C07K18/24, A61K39/395, G01N33/53

Applicant
GLAXO GROUP LIMITED

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 86.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 851 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Authorized Officer

van Klompenburg, W

Telephone No. +31 70 340-2243



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2005/001147

35

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
☒ in written format
☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
☒ contained in the international application as filed.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date.
2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
3. Additional observations, if necessary:

36

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
- ☒ claims Nos. 1,18-38,56-58,60-63,69,70,72,73 in part, and 28-35,58 with respect to industrial applicability because:
- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 28-35,58 with respect to industrial applicability relate to the following subject matter which does not require an International preliminary examination (*specify*):
- see separate sheet
- ☒ the description, claims or drawings (*Indicate particular elements below*) or said claims Nos. 1,18-38,56-58,60-63,69,70,72,73 in part are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- see separate sheet
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 1,18-38,56-58,60-63,69,70,72,73 in part
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
- | | |
|----------------------------|--|
| the written form | ☐ has not been furnished |
| | ☐ does not comply with the standard |
| the computer readable form | ☐ has not been furnished |
| | ☐ does not comply with the standard |
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

37

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2005/001147

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-73
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-73
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-27,36-57,59-73
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The present claims 1,18-38,56-58,60-63,69,70,72,73 encompass compounds defined only by their desired function, contrary to the requirements of clarity of Article 6 PCT, because the result-to-be-achieved type of definition does not allow the scope of the claim to be ascertained. The fact that any compound could be screened does not overcome this objection, as the skilled person would not have knowledge beforehand as to whether it would fall within the scope claimed, except for the compounds disclosed in the description, see Table A (p.75). Undue experimentation would be required to screen compounds randomly.

The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent that no meaningful search over the whole scope of claims 1,18-38,56-58,60-63,69,70,72,73 could be carried out at all (Article 17(2) PCT). The international search for these claims as well as the preliminary examination is limited to the compounds from Table A mentioned above.

Claims 28-35,58 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following documents:

D1: WO 99/48523 A (GLAXO GROUP LIMITED; LIFE, PAUL, FREDERICK) 30 September 1999 (1999-09-30)

D2: OGATA I ET AL: "Oncostatin M is produced during pregnancy by decidual cells and stimulates the release of HCG." MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION. AUG 2000, vol. 6, no. 8, August 2000 (2000-08), pages 750-757, XP002364877 ISSN: 1360-9947

D3: CARROLL G ET AL: "Antagonism of the IL-6 cytokine subfamily—a potential strategy for more effective therapy in rheumatoid arthritis" INFLAMMATION RESEARCH, BIRKHAUSER VERLAG, BASEL, CH, vol. 47, 1997, pages 1-7, XP002115636 ISSN: 1023-3830

In the light of the large number of (independent claims) and for the purpose of this international preliminary examination only one independent claim per category is treated in detail below:

Claim 1 concerns therapeutic oncostatin M (OSM) antibodies solely defined in terms of a desired function. This lack of clarity notwithstanding, this claim also lacks novelty with respect to D1. D1 discloses antagonists of OSM (p.1 lines 1-3) for manufacturing medicaments and for treatment of inflammatory disorders as well as methods of screening for such antagonists. Antibodies against OSM are also anticipated (p.5) by D1. Figures 7,8,11, claims 1-12 and examples 6, 8,9 indicate the utility of various OSM antibodies as medicaments and in methods of treatment of inflammation related diseases such as arthritis. Therefore the subject-matter of claim 1 is not novel (Art. 33(2) PCT).

Independent claim 28 concerns a method of treating a human patient with a therapeutic antibody (fragment). Apart from the objections under Art. 6 PCT this claim also lacks novelty over D1. D1 as discussed above relates to antibodies and other antagonists binding to OSM, more specifically these antibodies can be used to treat disorders (p.3, lines 1-4). It is therefore concluded that claim 28 lacks novelty (Art. 33(2) PCT).

Independent claim 64 concerns a method of screening an antibody that putatively binds OSM. D1 as discussed above discloses also methods for screening antibodies that putatively bind OSM(example 8). Therefore the subject-matter of claim 64 lacks novelty (Art. 33(2) PCT).

Other independent claims

The same reasoning applies, *mutatis mutandis*, to the subject-matter of the corresponding independent claims which therefore are also considered not new/inventive.

Dependent claims

None of the dependent claims contain any features which, in combination with the features

of any claim to which they refer, meet the requirements of the PCT in respect of novelty and/or inventive step, see documents D1-D3. and the corresponding passages cited in the search report, specifically it is noted that the antibodies as characterized by their sequences are considered as being identical to the antibodies mentioned in D1.

Conciseness (Article 6 PCT)

Although claims 1,14-17,27,28,36-51,55-65 have been drafted as separate independent claims, they appear to relate effectively to the same subject-matter and to differ from each other only with regard to the definition of the subject-matter for which protection is sought and in respect of the terminology used for the features of that subject-matter. The aforementioned claims therefore lack conciseness and as such do not meet the requirements of Article 6 PCT.

Method of Treatment

For the assessment of the present claims 28-35,58 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

INMUNOGLOBULINAS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a inmunoglobulinas, tales como anticuerpos, que se unen específicamente Oncostatina M (OSM), particularmente OSM humana -(hOSM) y modulan la interacción entre OSM y gp130. En modalidades típicas, la OSM se glicosila. La invención también se refiere a anticuerpos que modulan la interacción
10 entre tanto el Sitio II como Sitio III de OSM y sus respectivos patrones de interacción. Se describen además composiciones farmacéuticas, métodos de selección y de tratamiento médico.

INMUNOGLOBULINAS

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a inmunoglobulinas que unen
5 específicamente Oncostatin M (OSM) y en particular OSM humano
(hOSM). Más particularmente, la presente invención se refiere a
anticuerpos que unen específicamente hOSM. La presente invención
también se refiere a métodos para tratar enfermedades o desórdenes
con dichas Inmunoglobulinas, composiciones farmacéuticas
10 comprendiendo dichas Inmunoglobulinas y métodos de fabricación.
Otros aspectos de la presente invención serán aparentes a partir de
la siguiente descripción.

Antecedentes de la Invención

15 Oncostatin M es una glicoproteína 28 KDa que pertenece a la
familia de citoquinas de Interleuquina 6 (IL-6) que incluye IL-6, Factor
Inhibidor de Leucemia (LIF), factor neurotrófico ciliar (CNTF),
cardiotropin-1 (CT-1) y citoquina similar a cardiotrofin (Ver Kishimoto
T *et al* (1995) Blood 86: 1243-1254), que comparte el receptor de
20 señalización de transmembrana gp130 (Ver Taga T and Kishimoto T
(1997) Annu. Rev. Immunol. 15: 797-819). OSM se descubre
originalmente por su habilidad para inhibir el crecimiento de la
estirpe de célula de melanoma A375 (Ver Malik N (1989) *et al* Mol
Cell Biol 9: 2847-2853). Subsiguientemente, más efectos se
25 descubren y se encuentra que es un mediador multifuncional como

otras membranas de la familia IL-6. OSM se produce en una variedad de tipos celulares incluyendo macrófagos, células T activadas (Ver Zarling JM (1986) PNAS (USA) 83: 9739-9743), neutrófilos polimorfonucleares (Ver Grenier A *et al* (1999) Blood 93:1413-1421), eosinófilos (Ver Tamura S *et al* (2002) Dev. Dyn. 225: 327-31), células dendríticas (Ver Suda T *et al* (2002) Cytokine 17:335-340). Páncreas, riñón, testículos, bazo, estómago y cerebro (Ver Znoyko I *et al* (2005) Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 283: 182-186), y médula ósea (Ver Psenak O *et al* (2003) Acta Haematol 109: 68-75) Sus efectos biológicos principales incluyen activación de endotelio (Ver Brown TJ *et al* (1993) Blood 82: 33-7), activación de la respuesta de fase aguda (Ver Benigni F *et al* (1996) Blood 87: 1851-1854), inducción de proliferación celular o diferenciación, modulación de liberación mediadora inflamatoria y hematopoyesis (Ver Tanaka M *et al* (2003) 102: 3154-3162), re-modelación de hueso (Ver de Hooge ASK (2002) Am J Pathol 160: 1733-1743) y, promoción de angiogénesis (Ver Vasse M *et al* (1999) Arterioscler Thromb Vase Biol 19:1835-1842) y curación de herida.

Los receptores para OSM (receptor β OSM, "OSMR β ") se expresan en un amplio rango de células incluyendo células epiteliales, condrocitos, fibroblastos (Ver Langdon C *et al* (2003) J Immunol 170: 548-555), músculo liso neuronal, nodo linfo, hueso, corazón, intestino delgado, pulmón, riñón (Ver Tamura S *et al* (2002) Mech Dev 115: 127-131) y células endoteliales. Varias líneas de evidencia sugieren que las células endoteliales son un objetivo

primario para OSM. Estas células expresan números 10 a 20 veces más grandes de ambos receptores, de alta y baja afinidad, y muestran alteraciones profundas y prolongadas en fenotipo después de la estimulación con OSM (Ver Modur V *et al* (1997) J Clin Invest 100: 158-168). Además, OSM es un factor de crecimiento autócrino principal para células de sarcoma de Kaposi, que se enseña que son de origen endotelial (Ver Murakami-Mori K *et al* (1995) J Clin Invest 96:1319-1327).

En común con otras citoquinas de familia IL-6, OSM se une a la glicoproteína de transducción de señal de transmembrana gp130. Una característica clave de las citoquinas gp130 es la formación de complejos receptores oligoméricos que comprenden gp130 y uno o más co-receptores dependiendo del ligando (Revisado en Heinrich PC *et al* (2003) Blochem J. 374: 1-20). Como un resultado, estas citoquinas pueden mediar ambas actividades biológicas, compartidas y únicas, *in vitro* e *in vivo* dependiendo de la composición del complejo receptor formado. OSM humano (hOSM) difiere de las otras citoquinas IL-6 en que puede formar complejos con gp130 y ya sea uno de los dos co-receptores, LIFR o el receptor de oncostatin (OSMR). FIG. 1 ilustra la Interacción entre hOSM y gp130, LIFR y OSMR. La estructura de cristal de hOSM se ha resuelto y mostrado que comprende un haz helicoidal α cuatro con dos sitios de glicosilación potenciales. Dos sitios de unión de ligando se han identificado por mutagénesis dirigida de sitio en la molécula hOSM (Ver Deller MC *et al* (2000) Structural Fold Des. 8:863-874). El

primero, llamado Sitio II (algunas veces, "sitio 2") interactúa con gp130 y el segundo sitio, llamado Sitio III (algunas veces "sitio 3"), en el extremo opuesto de la molécula interactúa con ya sea LIFR u OSMR. Experimentos de mutagénesis han mostrado que los sitios
5 de unión para LIFR y OSMR son casi idénticos pero que una mutación de ácido nucleico única puede discriminar entre los dos.

OSM se sintetiza como una proteína conteniendo una secuencia de señal de terminal N de 25 aminoácidos (AA) hidrofóbicos y un propéptido de terminal C de 33 AA, ambos de los
10 cuales se separan para generar OSM maduro. Proproteína OSM no tiene actividad biológica pero se incrementa significativamente por separación del propéptido de terminal C (Ver Bruce A.G. *et al* (1992) Prog.Growth Factor Res. 4: 157-170, Malik N *et al* (1989) Mol.Cell Biol. 9: 2847-2853). OSM se ha descrito como una "molécula en
15 forma de barrera, compacta" con dimensiones de aproximadamente 20Å x 27Å x 56Å. Existen cuatro regiones helicoidales alfa (hélice A 10-37AA, hélice B 67-90AA, hélice C 105-131AA y hélice D 159-185AA, numeración de AA inicia después del retiro de la secuencia de señal). Las hélices A y C contienen "rulos". Las hélices se unen
20 por dos ciclos por lo alto (ciclo AB 38-66AA, ciclo CD 130-158 AA) y se instalan como dos pares anti-paralelos (A-D y B-C). (Ver Deller M. C *et al* (2000) Structure 8; 863-874).

Parece que la unión OSM a través de Sitio II a gp130 permite la unión de otra molécula OSM a gp130 por una interacción de Sitio III.
25 OSM también se unirá a ya sea LIFR o OSMR a través del Sitio III.

De esta manera, OSM forma un complejo con su receptor
 consistiendo de: un gp130, un LIFR o OSMR, y dos moléculas OSM.
 (Ver Sporeno E (1994) J.Biol.Chem.269:10991-10995, Staunton D *et al* (1998) Prot.Engineer 11:1093-1102 y Gearing DP (1992) Science
 5 225:306-312).

Utilizando mutagénesis, los residuos importantes para unión
 OSM-gp130 Sitio II son Gln20, Gly120, Gln16 y Asn124. Para unión
 OSM-OSMR Sitio III, los residuos importantes son Phe160 y Lys163.
 La interacción del Sitio II OSM es por lo tanto dependiente de Gln20,
 10 Gly120, Asn124 y a menor grado Gln16 en hOSM. Tres residuos
 complementarios en gp130 (Phe169, Tyr196 y Glu282) se han
 identificado como de observación particular en la interacción entre
 OSM y gp130. (Ver Deller M *et al* (2000) Structure 8:863-874,
 Aasland D *et al* (2002) J.Mol.Biol.315:637-646, Timmermann A *et al*
 15 (2000) FEBS Lett.468: 120-124).

La secuencia de aminoácidos iniciando en la posición 1 para
 hOSM se establece como SEQ.I.D.NO: 13

20 MGVLTTQRTLLSLVLALLFPSMASMAAIGSCSKEYRVLLGQLQKQTDLM
 QDTSRLLDPYIRIQGLDVPKLREHCRERPGAFPSEETLRGLGRRGFLQ
 TLNATLGCVLHRLADLEQRLPKAQDLERSGLNIEDLEKLQMARPNILGL
 RNNIYCMACQLLDNSDTAEPTKAGRGASQPPTPTPASDAFQRKLEGCRF
 LHGYHRFMHSVGRVFSKWGESPNRSRRHSPHQALRKGVRRTTRPSRK
 GKRLMTRGQLPR. (SEQ.I.D.NO: 13).

Residuos Sitio II de observación particular se resaltan en
 negritas y se subrayan.

Un cADN que codifica hOSM se establece en SEQ.I.D.NO:14.

5 ATGGGGGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTC
 CTTGCACTCCTGTTTCCAAGCATGGCGAGCATGGCGGCTATAG
 GCAGCTGCTCGAAAGAGTACCGCGTGCTCCTTGGCCAGCTCC
 AGAAGCAGACAGATCTCATGCAGGACACCAGCAGACTCCTGGA
 CCCCTATATACGTATCCAAGGCCTGGATGTTCTAAACTGAGA
 GAGCACTGCAGGGAGCGCCCCGGGGCCTTCCCCAGTGAGGAG
 ACCCTGAGGGGGCTGGGCAGGCGGGGCTTCCTGCAGACCCTC
 AATGCCACACTGGGCTGCGTCCTGCACAGACTGGCCGACTTAG
 AGCAGCGCCTCCCCAAGGCCAGGATTTGGAGAGGTCTGGGC
 TGAACATCGAGGACTTGGAGAAGCTGCAGATGGCGAGGCCGA
 ACATCCTCGGGCTCAGGAACAACATCTACTGCATGGCCCAGCT
 GCTGGACAACCTCAGACACGGCTGAGCCCACGAAGGCTGGCCG
 GGGGGCCTCTCAGCCGCCCCACCCCTGCCTCGGATGC
 TTTTCAGCGCAAGCTGGAGGGCTGCAGGTTCTGCATGGCTAC
 CATCGCTTCATGCACTCAGTGGGGCGGGTCTTCAGCAAGTGG
 GGGGAGAGCCCGAACCGGAGCCGGAGACACAGCCCCACCA
 GGCCCTGAGGAAGGGGGTGCGCAGGACCAGACCCTCCAGGAA
 10 AGGCAAGAGACTCATGACCAGGGGACAGCTGCCCCGGTAG
 (SEQ.I.D.NO:14)

Artritis reumatoide (RA) comprende un síndrome de procesos
 patogénicos distintos pero interconectados. Son: inflamación local y
 sistémica, proliferación de células sinoviales, angiogénesis y
 15 deposición de matriz conduciendo a formación de tejido panoso que
 invade y destruye el cartilago y hueso, resultando en deformación e
 incapacidad. El apuntalamiento de esta patología es la liberación
 crónica de citoquinas y mediadores inflamatorios de células que
 entran y toman residencia en la articulación inflamada de células de
 20 tejido de articulación endógena (Ver Firestein G (2003) In
 Rheumatology. Eds Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt and
 Weisman. Pub. Mosby. 855-884). Los eventos de iniciación en RA se
 desconocen pero una abundancia de evidencia sugiere que incluyen
 activación de linfocitos T por ya sea un "auto" antígeno autólogo o
 25 externo (Ver Firestein G (2004) J Clin Invest 114: 471-4). El grado al

cual las células T se requieren para mantener los procesos de enfermedad en progreso una vez que se han iniciado también es incierto aunque los agentes terapéuticos tal como CTL4Ig, que específicamente tienen como objetivo las células T, pueden ser
5 efectivos en enfermedad avanzada (Ver Kremer JM *et al* (2003) New Engl J Med 349: 1907-15, Moreland L *et al* (2004) Annual meeting of the American College of Rheumatology Abstract 1475).

Los eventos más tempranos en el desarrollo de sinovitis reumatoide incluyen reclutamiento de células polimorfonucleares o
10 mononucleares para cruzar el endotelio en capilares en la capa de forro sinovial. Aunque los polimorfos migran en fluido sinovial (SF) los linfocitos permanecen próximos a los capilares y pueden organizarse subsiguientemente en folículos linfoides ectópicos. Este influjo de células inmunes se sigue por proliferación de sinoviocitos
15 como fibroblasto (FLS). A pesar de sus contrapartes normales, RA FLS parece haber escapado de los procesos reguladores que resultan en detención de proliferación y apoptosis conduciendo a su acumulación continúa (Ver Yamanishi Y *et al* (2004) Arthritis Res Ther 7: 12-18). Además, el tejido panoso emergente ahora
20 desarrolla nuevos vasos sanguíneos soportados por matriz extracelular para permitir expansión adicional. Este proceso incluye proliferación de fibroblasto, remodelación de matriz y angiogénesis se parece cercanamente a un evento de curación de herida no controlado. Los monocitos migran en el tejido panoso en desarrollo
25 y experimentan diferenciación en macrófagos con un fenotipo

activado crónicamente. De manera similar las células B experimentan diferenciación terminal para formar células de plasma que viven largo tiempo que secretan anticuerpos incluyendo factores reumatoides. La habilidad del sinovio inflamado a sostener la diferenciación local de mieloide y células linfoides se basa, en parte, en producción local de factores de crecimiento tales como GM-CSF e IL-6. Tanto FLS como leucocitos mononucleares residentes liberan factores solubles que estimulan reclutamiento adicional de células inflamatorias de la sangre y, críticamente, activan la siguiente etapa en el proceso de enfermedad, la destrucción de cartílago articular y re-modelación de hueso. El tejido sinovial es invasivo. Su borde guía secreta enzimas destructivas tales como MMPs y citoquinas que alteran el fenotipo de células que mantienen la integridad estructural de cartílago y hueso. Como un resultado, proteoglicanos se pierden y el colágeno tipo II se separa de manera irreversible conduciendo a debilitamiento y pérdida de cartílago. El hueso experimenta un número de cambios profundos, que incluye erosiones focales, osteoporosis sub-condral. Por último estos cambios resultan en la deformidad característica y subluxación de las articulaciones observadas en RA avanzada (Ver Gordon D and Hastings D (2003) in Rheumatology. Eds Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt and Weisman. Pub. Mosby. 765-780).

RA es una enfermedad sistémica, probablemente como un resultado del pasaje de mediadores inflamatorios de la articulación en la sangre. Esto afecta muchos sistemas de órgano en el cuerpo

incluyendo piel, ojos, hígado, riñones, cerebro y el forro vascular, conduciendo a mortalidad y morbilidad incrementada (Ver Matteson EL (2003) In Rheumatology. Eds Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt and Weisman. Pub. Mosby. 781-792). Mucha de la mortalidad en
5 exceso se debe a enfermedad cardiovascular causada por aterosclerosis ya que muchos de los procesos patogénicos incluidos en el desarrollo de sinovitis reumatoide son comunes para la formación de placas ateroscleróticas.

Tratamientos para RA con el objetivo de controlar el dolor
10 reducen la inflamación y detención de los procesos que resultan en destrucción de tejido. Tradicionalmente RA se ha tratado con fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDS), bajas dosis de esteroides y los así llamados fármacos anti-reumáticos modificando la enfermedad (DMARDS). Los bajos niveles de eficacia, inicio
15 lento, toxicidad, tolerabilidad deficiente y resistencia incrementada con el tiempo infestan el uso de estos tratamientos que incluyen metotrexato (MTX), sulfasalazina, oro y Leflunomida. Más recientemente, la introducción de fármacos biológicos tales como Enbrel™, Remicade™ y Humira™, que inhiben el Factor de Necrosis
20 de Tumor de citoquina (TNF), ha tenido un avance significativo (Ver Roberts L and McColl GJ (2004) Intern Med J 34:687-93).

Por lo tanto un objeto de la presente invención es proporcionar un planteamiento terapéutico al tratamiento de RA y otras enfermedades y desórdenes, particularmente desórdenes y
25 enfermedades inflamatorias tales como osteoartritis y psoriasis. En

particular es un objeto de la presente invención proporcionar inmunoglobulinas, especialmente anticuerpos que específicamente unen OSM (por ejemplo, hOSM, particularmente Sitio II del mismo) y modulan (es decir, inhiben o bloquean) la interacción entre OSM y gp130 en el tratamiento de enfermedades y desórdenes en respuesta a modulación de esa interacción.

Existe evidencia creciente para soportar la hipótesis de que modular la interacción OSM-gp130 puede ser de beneficio en el tratamiento de tales enfermedades y desórdenes.

10

Evidencia Clínica

OSM se encuentra en SF de pacientes RA humanos (Ver Hui W *et al* (1997) 56: 184-7). Estos niveles se correlacionan con; el número de neutrófilos en SF, niveles de TNF alfa (algunas veces "TNF") en SF, y marcadores de destrucción de cartílago (Manicourt DH *et al* (2000) Arthritis Rheum 43: 281-288). Además, el tejido sinovial de pacientes RA secreta OSM espontáneamente *ex vivo* (Ver Okamoto H *et al* (1997) Arthritis and Rheumatism 40: 1096-1105). También se ha demostrado que OSM está presente en macrófagos sinoviales (Cawston TE *et al* (1998) Arthritis Rheum 41:1760-1771) y como se trata anteriormente, receptores OSM y gp130 se expresan en células endoteliales, fibroblastos sinoviales, condrocitos y osteoblastos. Además, las células infiltrando placas ateroscleróticas y aneurismas aórticos expresan OSM sugiriendo una asociación de esta citoquina con inflamación crónica (Ver

25

Mirshahi F *et al* (2001) Ann NY Acad Sci 936: 621-4).

Evidencia *in vitro*

Las células endoteliales expresan diez a veinte veces el
5 número de receptores OSM que otros tipos celulares (Ver Brown TJ
et al (1991) J Immunol 147: 2175-2180, Linsley PS *et al* (1989) J Biol
Chem 264: 4282-4289). OSM solo o sinérgicamente en
combinación con otras citoquinas, activa el endotelio para liberar las
citoquinas y quimoquinas y unir los neutrófilos, monocitos y linfocitos
10 mediando su extravasación en tejido sinovial (Ver ModurV *et al*
(1997) J Clin Invest 100: 158-168). OSM también ha demostrado ser
un estimulador potente de angiogénesis (Ver Vasse M *et al* (1999)
Atheroscler Thromb Vase Biol 19: 1835-1842) y activación y
proliferación de células de fibroblasto sinovial (FLS) (facilitando así
15 la formación de tejido panoso, la liberación de IL-6, MMPs) y actúa
sinérgicamente con TNF e IL-1 para inducir esta liberación de
mediador (Ver Langdon C *et al* (2000) Am J Pathol 157: 1187-1196).
OSM también ha demostrado inducir (con IL-1) liberación de
colágeno y proteoglican del cartílago (Ver Cawston T *et al* (1995)
20 Biochem Biophys Res Commun 215: 377-385). Además, OSM induce
liberación de proteína de fase aguda y producción de receptor IL-6
de hepatocitos (Ver Cichy J *et al* (1997) J Immunol 159: 5648-5643,
Kurash JK (2004) Exp Cell Res 292: 342-58) y puede por lo tanto
contribuir a los efectos sistémicos de inflamación reumatoide
25 incluyendo fatiga. Además, OSM induce actividad y diferenciación

de osteoclasto *In vitro* (Ver Palmqvist P *et al* (2002) J Immunol 169: 3353-3362).

Evidencia In Vivo

- 5 Expresión adenoviral de OSM de murino (mOSM) en las articulaciones de ratones normales resulta en una artritis erosiva e inflamatoria severa (Ver Langdon C *et al* (2000) Am J Pathol 157: 1187-1196). De manera similar, la enfermedad agresiva se observa en ratones noqueados carentes de TNF, IL-1, IL-6 e iNOS siguiendo
- 10 el suministro de mOSM adenoviral (Ver de Hooge ASK *et al* (2003) Arthritis and Rheumatism 48:1750-1761), demostrando que OSM puede mediar todos los aspectos de patología de artritis. La expresión de OSM de ratón utilizando un vector mOSM adenoviralmente expresado causa daño a la placa de crecimiento
- 15 típica de Artritis Idiopática Juvenil (Ver de Hooge ASK *et al* (2003) Arthritis and Rheumatism 48:1750-1761). En un modelo experimental artritis inducida por colágeno, un anticuerpo anti-OSM administrado terapéutico a ratones previno progresión adicional de la enfermedad. Resultados similares se observan cuando anti-OSM se administra
- 20 profilácticamente a los ratones con artritis inducida por pristana, un modelo retrasado/remitente remnescente de la enfermedad de humano (Ver Plater-Zyberk C *et al* (2001) Arthritis and Rheumatism 44: 2697-2702). En monos, OSM inyectado subcutáneamente induce una respuesta de fase aguda e inflamación crónica local (Ver Loy JK
- 25 *et al* (1999) Toxicol Pathol 27: 151-155). OSM ha demostrado inducir
-

infiltración PMN y mononuclear y liberación de proteoglican cuando se inyectan en articulaciones de cabra (Ver Bell MC *et al* (1999) Arthritis Rheum 42: 2543-2551). La sobreexpresión transgénica de mOSM en nodos linf de ratón resulta en maduración de célula T
5 extratímica, proliferación de células T de memoria y falla para eliminar células T autoinmunes (Ver Louls I *et al* (2003) Blood 102:1397-1404). La sobreexpresión transgénica de OSM en el páncreas causa fibrosis extensiva similar a aquella observada en sinovio RA avanzada (Ver Malik N *et al* (1995) Mol Cell Biol 15:
10 2349-2358).

En WO99/48523, se describe el uso de antagonistas OSM en el tratamiento de desórdenes y enfermedades inflamatorias. Esta descripción utilizó un anticuerpo OSM de anti-ratón en un modelo murino de artritis.

15 Toda la patente y referencias de literatura descritas dentro de la presente especificación se incorporan expresa y completamente en la presente para referencia.

Breve Descripción de la Invención

20 La presente invención postula que modular (en particular bloquear) la interacción entre Sitio II de hOSM y gp130, con un anticuerpo que une específicamente hOSM modulará la señalización por todos los complejos receptores de OSM potenciales, neutralizando efectivamente la actividad biológica de la citoquina a
25 un grado terapéuticamente significativo. A pesar de esto, los

presentes inventores han encontrado que el bloqueo ambos sitios, Sitio II y Sitio III, de hOSM mejora sorprendentemente la neutralización de esta citoquina. Además, los presentes inventores han encontrado que la glicosilación de hOSM juega un papel inesperado en el evento de unión entre hOSM y un anticuerpo que une específicamente hOSM.

La presente invención por lo tanto proporciona un anticuerpo terapéutico 15E10 o 10D3 (que puede ser quimérico, humano, humanizado, blespecífico o fragmentos de unión de antígeno de los mismos), que une específicamente hOSM e interactúa con el Sitio II de hOSM. Ver Tabla A de abajo.

En una modalidad de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo que une específicamente hOSM y modula (es decir, inhibe o bloquea) la interacción entre Sitio II de hOSM y gp 130. En algunas modalidades, el anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo específicamente une Sitio II de hOSM.

En otra modalidad, se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo que une específicamente hOSM y comprende el siguiente CDRH3: SEQ.I.D.NO: 3 o SEQ.I.D.NO:42.

En otra modalidad de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a hOSM y comprende los siguiente CDRs: CDRH1: SEQ.I.D.NO: 1

CDRH2: SEQ.I.D.NO: 2

CDRH3: SEQ.I.D.NO: 3

CDRL1: SEQ.I.D.NO: 4

CDRL2: SEQ.I.D.NO: 5

5 CDRL3: SEQ.I.D.NO: 6

En otra modalidad de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a hOSM y comprende los siguientes CDRs: CDRH1: SEQ.I.D.NO: 40

10 CDRH2: SEQ.I.D.NO: 41

CDRH3: SEQ.I.D.NO: 42

CDRL1: SEQ.I.D.NO: 43

CDRL2: SEQ.I.D.NO: 44

CDRL3: SEQ.I.D.NO: 45

15 Por toda esta especificación, los términos "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3" siguen el sistema de numeración Kabat como se establece en Kabat *et al*; *Sequences of proteins of Immunological Interest* NIH, 1987. Por lo tanto lo siguiente define los CDRs de acuerdo a la invención:

20

CDR: Residuos

CDRH1: 31-35B

CDRH2: 50-65

CDRH3: 95-102

25 CDRL1: 24-34

CDRL2: 50-56

CDRL3: 89-97

En otra modalidad de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico de murino o fragmento de unión de antígeno del mismo
5 comprendiendo un dominio V_H teniendo la secuencia: SEQ.I.D.NO: 7 y un dominio V_L teniendo la secuencia: SEQ.I.D.NO: 8.

En otra modalidad de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico de murino o fragmento de unión de antígeno del mismo comprendiendo un dominio V_H teniendo la secuencia: SEQ.I.D.NO: 46
10 y un dominio V_L teniendo la secuencia: SEQ.I.D.NO: 47.

En una modalidad de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión de antígeno del mismo comprendiendo una cadena V_H teniendo la secuencia establecida en SEQ.I.D.NO: 9 y un dominio V_L teniendo la secuencia establecida en
15 SEQ.I.D.NO:10.

En una modalidad de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión de antígeno del mismo comprendiendo una cadena V_H teniendo la secuencia establecida en SEQ.I.D.NO: 48 y un dominio V_L teniendo la secuencia establecida
20 en SEQ.I.D.NO:49.

En otra modalidad de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado, tal anticuerpo comprende una cadena pesada teniendo la secuencia establecida en SEQ.I.D.NO: 11 y una cadena ligera teniendo la secuencia establecida en SEQ.I.D.NO:12.

25 En otra modalidad de la invención se proporciona un anticuerpo

terapéutico humanizado, tal anticuerpo comprende una cadena pesada teniendo la secuencia establecida en SEQ.I.D.NO: 50 y una cadena ligera teniendo la secuencia establecida en SEQ.I.D.NO:51.

En otra modalidad de la invención se proporciona un anticuerpo
5 terapéutico humanizado o fragmento de unión de antígeno del mismo que modula (es decir, inhibe o bloquea) la interacción entre hOSM y gp130.

En otra modalidad de la invención se proporciona un dominio V_H aislado de un anticuerpo comprendiendo (o consistiendo
10 esencialmente de) SEQ.I.D.NO: 7 o SEQ.I.D.NO:9 o SEQ.I.D.NO:46 o SEQ.I.D.NO:48.

En otra modalidad de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo comprendiendo un dominio V_H seleccionado del grupo que consiste
15 de; SEQ.I.D.NO: 7, SEQ.I.D.NO: 9, SEQ.I.D.NO: 46, SEQ.I.D.NO: 48.

En otra modalidad de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo que inhibe competitivamente la unión del anticuerpo terapéutico comprendiendo a CDRH3 de SEQ.I.D.NO: 3.

20 En otra modalidad de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo que inhibe competitivamente la unión del anticuerpo terapéutico comprendiendo CDRs de SEQ.I.D.NO: 1,2, 3, 4, 5 y 6 con hOSM.

En otra modalidad se proporciona anticuerpo terapéutico o
25 fragmento de unión de antígeno del mismo que inhibe

competitivamente la unión del anticuerpo terapéutico comprendiendo una cadena pesada de SEQ.I.D.NO: 11 y una cadena ligera de SEQ.I.D.NO: 12 con hOSM.

En otra modalidad de la invención se proporciona un método
5 para tratar un paciente humano afligido con una enfermedad o desorden en respuesta a modulación de la interacción entre hOSM y gp130 tal método comprende la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo como se
10 describe en la presente.

En otra modalidad de la presente invención se proporciona un método para tratar un paciente humano afligido con un desorden o enfermedad inflamatoria tal método comprende la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva
15 del anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo como se describe en la presente.

En otra modalidad de la presente invención se proporciona un método para tratar un paciente humano afligido con una enfermedad artrítica, particularmente artritis reumatoide, artritis de inicio juvenil
20 u osteoartritis tal método comprende la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo como se describe en la presente.

En otra modalidad de la invención se proporciona un método
25 para reducir o prevenir degradación de cartílago en un paciente

humano afligido con (o susceptible a) tal degradación, tal método comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo a dicho paciente como se describe en la presente.

En otra modalidad de la presente invención se proporciona a método para reducir producción de TNF alfa en un paciente afligido con una enfermedad o desorden en respuesta a reducción de TNF alfa, tal método comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo como se describe en la presente.

En otra modalidad de la invención se proporciona un método para tratar las manifestaciones extracelulares de un desorden o enfermedad artrítica tal método comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo como se describe en la presente al paciente humano afligido con las manifestaciones extraarticulares de un desorden o enfermedad artrítica.

En otra modalidad de la presente invención se proporciona un método para tratar un paciente humano afligido con una enfermedad de origen endotelial tal método comprende las etapas de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo como se describe en la presente.

Uso del anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo como se describe en la presente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o desórdenes como se describe en la presente también se
5 proporciona.

En otra modalidad de la invención se proporciona un proceso para la fabricación de un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo como se describe en la presente.

En otra modalidad de la invención se proporciona un ensayo
10 (particularmente un ensayo ELISA) para estudiar la interacciones entre OSM (particularmente hOSM) y un patrón de interacción (tal como gp130, LIFR, OSMR), tal ensayo comprende la etapa de proporcionar para dicho estudio, una muestra de OSM glicosilado (típicamente glicosilado por una célula huésped vertebrada tal como
15 célula huésped de mamífero, por ejemplo, CHO glicosilado).

En una modalidad adicional de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico que une específicamente hOSM glicosilado nativo y modula (es decir, inhibe o bloquea) la interacción entre hOSM glicosilado nativo y un patrón de interacción
20 seleccionado del grupo que consiste de gp130, LIFR, OSMR β .

Se proporciona un método para producir una composición farmacéutica comprendiendo un anticuerpo terapéutico que une específicamente hOSM y modula (es decir, inhibe o bloquea) la interacción entre hOSM y gp130 tal método comprende las etapas
25 de;

- (a) proporcionar un anticuerpo candidato
- (b) proporcionar OSM glicosilado (particularmente hOSM producido por una célula huésped mamífera recombinantemente transformada o transfectada tal como una célula CHO recombinantemente transformada y/o hOSM glicosilado nativo);
- (c) contactar el anticuerpo de la etapa (a) con hOSM de la etapa (b) bajo condiciones permisivas para unión;
- (d) determinar si el anticuerpo de la etapa (c) modula la interacción entre hOSM y gp130;
- (e) humanizar opcionalmente dicho anticuerpo de etapa (a) o (d);
- (f) incorporar dicho anticuerpo de la etapa (d) o (e) en una composición farmacéutica.
- Otros aspectos, objetos y ventajas de la presente Invención serán aparentes a partir de la siguiente descripción.

Breve Descripción de los Dibujos

FIG. 1 es una ilustración esquemática de la interacción entre OSM y gp130, LIFR y OSMR β .

FIG. 2 ilustra la inhibición de gp130 ELISA utilizando hOSM (panel superior) y cOSM (panel inferior) siguiendo el procedimiento establecido abajo de los ejemplos utilizando los anticuerpos quiméricos 15E10 y 10D3. Ver la descripción de abajo para detalles adicionales.

FIG. 3 ilustra el ensayo de célula KB utilizando hOSM (panel superior) y cOSM (panel inferior) siguiendo el procedimiento de los ejemplos utilizando los anticuerpos quiméricos 15E10 y 10D3 de los ejemplos.

5 FIG. 4 ilustra inhibición de gp130 ELISA contra hOSM (panel superior) y cOSM (panel inferior) en donde % de inhibición como una función de concentración de anticuerpo para cuatro anticuerpos humanizados (B1L1, B1L2, B4L1, B4L2) y quimérico 15E10 se diagrama.

10 FIG. 5 ilustra la inhibición de gp130 ELISA de los ejemplos donde varios anticuerpos humanizados (B2L2, B3L2, B4L2) se comparan con el quimérico 15E10 para unirse a hOSM producido por CHO.

15 FIG. 6 ilustra el ensayo de FIG. 5 utilizando cOSM en lugar de hOSM.

FIG. 7 ilustra el ensayo de FIG. 5 utilizando hOSM producido por CHO en 25% suero AB humano.

FIG. 8 ilustra el ensayo de FIG. 7 utilizando cOSM en lugar de hOSM.

20 FIG. 9 ilustra la inhibición de gp130 ELISA de OSM neutrófilo de cuatro muestras humanas diferentes utilizando anticuerpos humanizado B2L2, B3L2, B4L2 y quimérico 15E10.

25 FIG. 10 ilustra la inhibición de gp130 ELISA utilizando tres anticuerpos humanizados (B2L2, B3L2, y B4L2) y anticuerpo quimérico 15E10 contra hOSM aislado del fluido sinovial de

pacientes RA humanos.

FIGs. 11 a 16 ilustran los resultados de FIGs. 5 a 10 en el ensayo de célula KB en lugar de inhibición de gp130 ELISA con la excepción de que el ensayo de célula KB de OSM de neutrófilo de la
5 FIG. 15 utilizó una muestra de humano de OSM de neutrófilo. De esta manera FIG. 11 ilustra el ensayo KB de hOSM producido por CHO, FIG. 12 de cOSM producido por CHO, FIG. 13 de hOSM producido por CHO en 25% suero AB humano, FIG. 14 de cOSM producido por CHO en 25% suero AB humano, FIG. 15 de OSM de
10 neutrófilo, FIG. 16 de OSM aislado de células SF de pacientes RA.

FIG. 17 ilustra la Inhibición de gp130 ELISA del murino de origen 15E10, el quimérico 15E10, una construcción de anticuerpo humanizada B3L2, y un mutante lítico Fc de B3L2 contra hOSM producido por CHO. Ver descripción para más detalle.

15 FIG. 18 ilustra el ensayo de FIG. 17 utilizando cOSM.

FIG. 19 ilustra el ensayo de célula KB del murino de origen 15E10, quimera 15E10, construcción humanizada B3L2 y un mutante lítico Fc de B3L2 contra hOSM producido por CHO.

FIG. 20 es una ilustración esquemática del ensayo de
20 competición de los ejemplos.

FIG. 21 ilustra la Inhibición de 15E10 (construcción humanizada B3L2) por anticuerpo competidor 10D3 de murino de los ejemplos. El porcentaje de inhibición de 15E10 por competidor 10D3 a equimolaridad (0.15ug/ml):62.3%.

25 FIG. 22a ilustra una curva estándar típica en gp130-OSMELISA

utilizando OSM no glicosilado. y donde la concentración gp130 para revestir la placa ELISA es 1 $\mu\text{g/ml}$.

FIG. 22b ilustra la sensibilidad incrementada de gp130-OSM ELISA cuando la concentración gp130 utilizada para revestir la placa se incrementa a 4 $\mu\text{g/ml}$.

FIG. 22c ilustra que gp130-OSM ELISA funciona con tanto OSM glicosilado como no glicosilado, OSM no glicosilado; círculos llenos, OSM glicosilado; triángulos abiertos. Observe que la sensibilidad de ELISA es mayor para OSM no glicosilado, posiblemente como un resultado de epítomos de ocultamiento de glicosilación reconocidos por el anticuerpo de detección utilizado.

FIG. 23a ilustra el efecto de anticuerpo neutralizante OSM, Mab295 (R&D Systems) en gp130-OSM ELISA. OSM solamente; círculos abiertos, OSM + Mab296; triángulos llenos, OSM + MAb295 pero sin gp130 en la placa de ELISA; cuadros llenos.

FIG. 23b es una ilustración esquemática de como Mab295 puede potenciar la señal OSM en gp130-OSM ELISA.

FIG. 24 ilustra datos del ensayo de célula KB mostrando la efectividad de neutralización OSM por Mab 295. Las células se estimulan con 1 ng/ml OSM solamente, o esta concentración de OSM mezclada con varias concentraciones de Mab295 antes del ensayo. OSM solamente; triángulos llenos, OSM + Mab295; círculos abiertos, sin estimulación OSM; cuadros llenos.

FIG. 25 ilustra el efecto de un anticuerpo específico de sitio II de OSM, OM4-11.31 en gp130-OSM ELISA. OSM solamente; círculos

abiertos, OSM + IgG de control de isotipo; Triángulos invertidos llenos, OSM + anticuerpo específico OSM sitio II; cuadros abiertos, OSM + OM4-11.31; círculos llenos.

FIG. 26 ilustra la inhibición de unión de un complejo de OSM con un anticuerpo específico de sitio III (OM4-11.17) a gp130 por un anticuerpo OSM específico de sitio II, OM4-5.3. 12.5ng/ml OSM solamente; barra sólida, OSM+OM4-11.17; barra de línea diagonal, OSM+OM4-11.17+IgG control; barra cruzada; OSM+OM4-11.17+OM4-5.3; barra punteada.

FIG. 27 ilustra la emergencia de anticuerpos OSM específicos de sitio II y no sitio II en sueros de ratones inmunizados con OSM humano, como se detecta utilizando gp130-OSM ELISA. Análisis de suero después de refuerzos, primero, segundo y tercero con OSM humano; a, b y c respectivamente. Suero OSM+pre-Inmune; círculos abiertos, OSM+antisueros de ratón inmunizado; triángulos invertidos llenos, OSM+antisuero de ratón inmunizado, pero sin gp130 en placa de ELISA; triángulo abierto invertido.

FIG. 28 ilustra la sinergia en neutralización OSM entre un anticuerpo específico de OSM de sitio II ("15E10 hum", 15E10 humanizado) y un anticuerpo OSM específico de sitio III, (17H10) como se mide en un ensayo de célula KB. La neutralización OSM por 17H10 sólo (a) o 15E10 hum solo (b); círculos llenos, neutralización de OSM por la combinación de anticuerpo; triángulos abiertos.

FIG. 29 ilustra la eficacia de anticuerpo 15E10 humanizado

para inhibir secreción de IL-6 estimulada por OSM de fibroblastos sinoviales RA. Cada símbolo se refiere a un fibroblasto obtenido de pacientes diferentes.

FIG. 30 ilustra la inhibición de unión de OSM a gp130 por anticuerpo anti-OSM OM4-5.3. OSM (25ng/ml) se pre-incuba con las concentraciones de OM4-5.3 indicadas antes de la adición a la placa de ELISA. OSM solamente; círculos sólidos, OSM+OM4-5.3; círculos abiertos.

FIG. 31a ilustra la diferencia en potencia de OM4-41.5 para inhibir la unión de OSM glicosilado y no glicosilado a gp130. OSM; no glicosilado; círculos sólidos, OSM glicosilado; triángulos abiertos.

FIG. 31b ilustra la diferencia en potencia de OM4-5.3.1 para inhibir la unión de OSM glicosilado y no glicosilado a gp130. OSM no glicosilado; círculos sólidos, OSM glicosilado; triángulos abiertos.

FIG. 32 muestra la actividad de dos anticuerpos específicos de OSM de sitio II (a; 15E10, b; 5H2) contra glicosilado (círculos llenos) y no glicosilado (triángulos abiertos) en gp130-OSM ELISA.

FIG. 33 ilustra la correlación entre suero y fluido sinovial [OSM] en muestras de SF y suero en pares tomadas de pacientes RA .

FIG. 34a, 34b y 35 ilustran las concentraciones de OSM medidas en fluido sinovial OA utilizando ELISA OSM de los ejemplos. FIG. 34b ilustra esas que dos muestras tuvieron concentraciones de fluido sinovial de OST particularmente altas.

FIG. 36 ilustra la concentración de OSM encontrada en suero de paciente OA durante un periodo de prueba clínica de 12 meses.

#número es el identificador de paciente.

FIG. 37 ilustra una curva estándar de OSM típica en 25% suero AB humano.

5 **Descripción Detallada de la Invención**

1. Estructuras del Anticuerpo

1.1 Anticuerpos Intactos

Los anticuerpos intactos son usualmente glicoproteínas heteromultiméricas comprendiendo al menos dos cadenas pesadas y dos ligeras. Además de IgM, los anticuerpos intactos son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150Kda, compuestos de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Típicamente, cada cadena ligera se enlaza a una cadena pesada por un enlace de disulfuro covalente mientras que el número de enlaces de disulfuros entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina, varía. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes de disulfuro de intracadena. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por un número de regiones constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) y una región constante en su otro extremo; la región constante de la cadena ligera se alinea con la primer región constante de la cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Las cadenas ligeras de anticuerpos de la mayoría de las especies de vertebrados pueden asignarse a uno de dos tipos llamados Kappa y

Lambda en base a la secuencia de aminoácidos de la región constante. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos humanos pueden asignarse a cinco diferentes clases, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

5 IgG e IgA puede subdividirse además en subclases, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; y IgA1 e IgA2. Variantes de especies existen con ratón y rata teniendo al menos IgG2a, IgG2b. El dominio de región variable del anticuerpo confiere especificidad de unión en el anticuerpo con ciertas regiones desplegando variabilidad particular llamadas

10 regiones de determinación complementarias (CDRs). Las porciones más conservadas de la región variable se llaman regiones de estructura (FR). Los dominios variables de cadenas intactas pesadas y ligeras cada una comprende cuatro FR conectadas por tres CDRs. CDRs en cada cadena se mantienen juntos en

15 proximidad cercana por las regiones FR y con las CDRs de la otra cadena contribuyen a la formación del sitio de unión de antígeno de anticuerpos. Las regiones constantes no se incluyen directamente en la unión del anticuerpo al antígeno pero muestran varias funciones efectoras tales como participación en citotoxicidad

20 mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis a través de la unión al receptor Fcγ, tasa de vida media/despeje a través del receptor Fc neonatal (FcRn) y citotoxicidad dependiente de complemento a través del componente C1q de la cascada complemento.

25 En una modalidad por lo tanto se proporciona un anticuerpo

terapéutico intacto que une específicamente hOSM, tal anticuerpo modula la interacción entre hOSM y gp130. El anticuerpo puede unir específicamente Sitio II de hOSM e inhibir y bloquear la interacción entre hOSM y sus residuos correspondientes en gp130 incluidos en interacción de OSM. El procedimiento ELISA de los ejemplos puede utilizarse para determinar si cualquier anticuerpo particular o fragmento de unión de antígeno del mismo modula la interacción entre hOSM y gp130. El anticuerpo terapéutico intacto puede comprender una región constante (ya sea pesada o ligera) de cualquier isotipo o subclase de la misma descrita *supra*. En una modalidad, el anticuerpo es de isotipo IgG, particularmente IgG1. El anticuerpo puede ser rata, ratón, conejo, primate o humano. En una modalidad típica, el anticuerpo es primate (tal como cinomolgo, mono del Viejo Mundo o Chimpancé grande, ver por ejemplo. WO99/55369, WO93/02108) o humano.

En otra modalidad se proporciona un anticuerpo terapéutico intacto comprendiendo un CDRH3 de SEQ.I.D.NO: 3 o SEQ.I.D.NO:42. En otra modalidad se proporciona un anticuerpo terapéutico intacto comprendiendo una región variable teniendo CDRs de SEQ.I.D.NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 o una región variable de SEQ.I.D.NO:40, 41,42, 43, 44 y 45.

En otra modalidad, se proporciona un anticuerpo terapéutico Intacto de murino o fragmento de unión de antígeno del mismo comprendiendo un dominio V_H teniendo la secuencia de SEQ.I.D.NO: 7 y un dominio V_L de la secuencia de SEQ.I.D.NO: 8.

En otra modalidad, se proporciona un anticuerpo terapéutico intacto de murino o fragmento de unión de antígeno del mismo comprendiendo un dominio V_H teniendo la secuencia de SEQ.I.D.NO: 46 y un dominio V_L de la secuencia de SEQ.I.D.NO: 47.

5

1.1.2 Anticuerpos Humanos

Los anticuerpos humanos pueden producirse por un número de métodos conocidos por aquellos expertos en la materia. Los anticuerpos humanos pueden hacerse por el método de hibridoma
10 utilizando estirpes de célula de heteromioma de ratón-humano o mieloma ver Kozbor J.Immunol 133, 3001, (1984) y Brodeur, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp51-63 (Marcel Dekker Inc, 1987). Los métodos alternativos incluyen el uso de bibliotecas de fago o ratones transgénicos ambos de los
15 cuales utilizan repertorios de región V de humano (ver Winter G, (1994), Annu.Rev.Immunol 12,433-455, Green LL (1999), J. Immunol. methods 231, 11-23).

Varias cepas de ratones transgénicos están ahora disponibles en donde sus lugares de inmunoglobulina de ratón se han
20 reemplazado con segmentos de gen de inmunoglobulina (ver Tomizuka K, (2000) PNAS 97,722-727; Fishwild D. M (1996) Nature Biotechnol. 14, 845-851, Mendez MJ, 1997, Nature Genetics, 15,146-156). En el reto de antígeno tales como ratones son capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos de los cuales los
25 anticuerpos de interés pueden seleccionarse.

De particular observación es el sistema TrimerTM (ver Eren R *et al*, (1998) Immunology 93:154-161) donde los linfocitos humanos se transplanta en ratones irradiados, el Sistema de Anticuerpo de Linfocito Seleccionado (SLAM, ver Babcook *et al*, PNAS (1996) 93:7843-7848) donde los linfocitos humanos (u otras especies) se ponen efectivamente a través de un procedimiento de generación de anticuerpo *in vitro* agrupado masivo seguido por procedimiento de selección y dilución limitante, deconvulada y Xenomouse IITM (Abgenix Inc). Un planteamiento alternativo está disponible de Morphotek Inc utilizando la tecnología MorphodomaTM.

La tecnología de despliegue de fago puede utilizarse para producir anticuerpos humanos (fragmentos de los mismos), ver McCafferty; Nature, 348, 552-553 (1990) y Griffiths AD *et al* (1994) EMBO 13:3245-3260. De acuerdo a estos genes de dominio V de anticuerpo técnico se clonan en estructura en ya sea un revestimiento mayor o menos de gen proteínico de un bacteriófago filamentoso tal como M13 o fd se despliega (usualmente con la ayuda del fago ayudante) como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Las selecciones en base a las propiedades funcionales del anticuerpo resultan en selección del gen codificando el anticuerpo mostrando aquellas propiedades. La técnica de despliegue de fago puede utilizarse para seleccionar anticuerpos específicos de antígeno de bibliotecas hechas de células B tomadas de individuos afligidos con una enfermedad o desorden descrito arriba o alternativamente de donadores humanos no

inmunizados (ver Marks; J. Mol. Bio. 222,581-597, 1991). Donde un anticuerpo humano intacto se desea comprendiendo un dominio Fc es necesario volver a clonar el fragmento derivado desplegado de fago en un vector de expresión mamífero comprendiendo las regiones constantes deseadas y establecer estirpes de células de expresión estable. La técnica de maduración de afinidad (Marks; Bio/technol 10,779-783 (1992)) puede utilizarse para mejorar la afinidad de unión donde la afinidad del anticuerpo humano primario se mejora al reemplazar secuencialmente las regiones V de cadena H y L con variantes que ocurren de manera natural y seleccionar en la base de afinidades de unión mejoradas. Las variantes de esta técnica tales como "Impresión de epítipo" también están disponibles ver WO 93/06213. Ver también Waterhouse; Nucl.Acids Res 21, 2265-2266 (1993).

De esta manera en otra modalidad se proporciona un anticuerpo terapéutico intacto humano o fragmento de unión de antígeno del mismo que une específicamente hOSM y modula (es decir, inhibe y bloquea) la interacción entre hOSM y gp130. En otra modalidad se proporciona un anticuerpo terapéutico intacto humano o fragmento de unión de antígeno del mismo que une específicamente Sitio II de hOSM y modula (es decir, inhibe y bloquea) la interacción entre hOSM y gp130.

En otro aspecto se proporciona un anticuerpo terapéutico intacto humano o fragmento de unión de antígeno del mismo comprendiendo un CDRH3 de SEQ.I.D.NO: 3 o SEQ.I.D.NO:42 que

une específicamente hOSM y modula (es decir, inhibe y bloquea) la interacción entre hOSM y gp130. En otra modalidad se proporciona un anticuerpo terapéutico intacto humano o fragmento de unión de antígeno del mismo comprendiendo una región variable teniendo
5 CDRs de SEQ.I.D.NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 o una región variable teniendo SEQ.I.D.NO:40, 41,42, 43, 44 y 45.

1.2 Anticuerpos Humanizados y Quiméricos

El uso de anticuerpos no humanos intactos en el tratamiento de
10 enfermedades o desórdenes humanos lleva con el los problemas ahora bien establecidos de inmunogenicidad potencial especialmente en administración repetida del anticuerpo que es el sistema inmune de los pacientes, puede reconocer el anticuerpo intacto no humano como no autónomo y montar una respuesta neutralizante. Además
15 de desarrollar los anticuerpos completamente humanos (ver arriba) varias técnicas se han desarrollado con los años para superar estos problemas y generalmente incluyen reducir la composición de secuencias de aminoácidos no humanos en el anticuerpo terapéutico intacto mientras se mantiene la facilidad relativa para obtener
20 anticuerpos no humanos de un animal inmunizado, por ejemplo, ratón, rata o conejo. Ampliamente dos planteamientos se han utilizado para lograr esto. Los primeros son anticuerpos quiméricos, que generalmente comprenden un dominio variable no humano (por ejemplo, roedor tal como ratón) a una región constante humana.
25 Debido a que el sitio de unión de antígeno de un anticuerpo se

localiza dentro de las regiones variables, el anticuerpo quimérico retiene su afinidad de unión para el antígeno pero adquiere las funciones efectoras de la región constante humana y por lo tanto son capaces de realizar funciones efectoras tal como se describe arriba.

- 5 Los anticuerpos quiméricos se producen típicamente utilizando métodos de ADN recombinante. ADN codificando los anticuerpos (por ejemplo, cADN) se aísla y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, al utilizar sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse específicamente a genes
- 10 codificando las cadenas H y L del anticuerpo de la Invención, por ejemplo, ADN codificando SEQ.I.D.NO 1, 2, 3,4, 5 y 6 descritas supra). Las células de hibridoma sirven como una fuente típica de tal ADN. Una vez aisladas, el ADN se coloca en vectores de expresión que se transfectan entonces en células de huésped tales
- 15 como *E.Coli*, células COS, células CHO o células de mieloma que no producen de otra manera proteína de inmunoglobulina para obtener síntesis del anticuerpo. El ADN puede modificarse al sustituir la secuencia de codificación para cadenas L y H de humano por las regiones constantes H y L no humanas (por ejemplo, murino)
- 20 correspondientes ver por ejemplo. Morrison; PNAS 81, 6851 (1984).

El segundo planteamiento incluye la generación de anticuerpos humanizados en donde el contenido no humano del anticuerpo se reduce al humanizar las regiones variables. Dos técnicas para humanización han obtenido popularidad. El primero es humanización

25 por injerto CDR. CDR forma ciclos próximos al término N del

anticuerpo donde forman una superficie montada en un microandamio proporcionado por las regiones de estructura. La especificidad de unión de antígeno del anticuerpo se define principalmente por la topografía y por las características químicas de su superficie CDR. Estas características se determina, a su vez, por la conformación de las CDRs individuales, por la disposición relativa de las CDRs, y por la naturaleza y disposición de las cadenas laterales de los residuos comprendiendo las CDRs. Una gran disminución en inmunogenicidad puede lograrse al injertar solamente las CDRs de un anticuerpo no humano (por ejemplo, murino) (anticuerpos "donadores") sobre una estructura humana adecuada ("estructura aceptadora") y regiones constantes (ver Jones *et al.* (1986) *Nature* 321, 522-525 and Verhoeven M *et al* (1988) *Science* 239, 1534-1536). Sin embargo, el injerto de CDR *per se* puede no resultar en la retención completa de propiedades de unión de antígeno y se encuentra frecuentemente que algunos residuos de estructura del anticuerpo donador necesitan conservarse (algunas veces referirse como "mutaciones posteriores") en la molécula humanizada si afinidad de unión de antígeno significativa está por recuperarse (ver Queen C *et al* (1989) *PNAS* 86, 10,029-10,033, Co, M *et al* (1991) *Nature* 351, 501-502). En este caso, las regiones V de humano mostrando la mayor homología de secuencia (típicamente 60% o más) al anticuerpo donador no humano pueden elegirse de una base de datos para proporcionar la estructura de humano (FR). La selección de FRs de humano puede hacerse ya sea de consenso

humano o anticuerpos humanos individuales. Donde sea necesario los residuos clave del anticuerpo donador son substituidos en la estructura aceptadora de humano para conservar conformaciones CDR. El modelado por computadora del anticuerpo puede utilizarse
5 para ayudar a identificar tales residuos estructuralmente importantes, ver WO99/48523.

Alternativamente, humanización puede lograrse por un proceso de "revestimiento". Un análisis estadístico de regiones variables de cadena pesada y ligera de Inmunoglobulina de murino y humano
10 únicas reveló que los patrones precisos de residuos expuestos son diferentes en anticuerpos de murino y humano, y posiciones de superficie más individuales tienen una fuerte preferencia para un número pequeño de diferentes residuos (ver Padlan E.A. *et al*; (1991) Mol. Immunol.28, 489-498 and Pedersen JT. *et al* (1994) J.Mol.Biol.
15 235; 959-973). Por lo tanto es posible reducir la inmunogenicidad de un Fv no humano al reemplazar residuos expuestos en sus regiones de estructura que difieren de aquellos usualmente encontrados en anticuerpos humanos. Debido a que la antigenicidad de proteína puede correlacionarse con accesibilidad de superficie, reemplazo de
20 los residuos de superficie puede ser suficiente para volver la región variable de ratón "invisible" al sistema inmune humano (ver también Mark G. E. *et al* (1994) In Handbook de *Experimental Pharmacology* vol.113: *The pharmacology of monoclonal Antibodies*, Springer-Verlag, pp105-134). Este procedimiento de humanización se refiere
25 como "revestimiento" debido a que solamente la superficie del

anticuerpo se altera, los residuos de soporte permanecen sin perturbar. Un planteamiento alternativo adicional se establece en WO04/006955.

De esta manera otra modalidad de la invención proporciona un
5 anticuerpo terapéutico quimérico comprendiendo un dominio variable no humano (por ejemplo, roedor) fusionado a una región constante humana (que puede ser un isotipo IgG por ejemplo, IgG1) que une específicamente hOSM y modula la interacción entre Sitio II de hOSM y gp130.

10 En otra modalidad se proporciona un anticuerpo terapéutico quimérico comprendiendo una región variable no humana (por ejemplo, roedor) y una región constante humana (que puede ser un isotipo IgG por ejemplo, IgG1) que une específicamente hOSM, tal anticuerpo comprende además un CDRH3 de SEQ.I.D.NO:3 o
15 SEQ.I.D.NO:42. Tales anticuerpos pueden comprender además una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo, IgG1.

En otra modalidad se proporciona un anticuerpo terapéutico quimérico comprendiendo una región variable no humana (por ejemplo, roedor) y una región constante humana (que puede ser de
20 un isotipo IgG por ejemplo, IgG1) que une específicamente hOSM teniendo las CDRs de SEQ.I.D.NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 o SEQ.I.D.NO:40, 41, 42, 43, 44 y 45.

En otra modalidad se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión de antígeno del mismo que une
25 específicamente hOSM y modula (es decir, inhibe y bloquea) la

Interacción entre Sitio II de hOSM y gp130.

En otra modalidad se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión de antígeno del mismo que une específicamente hOSM y comprende un CDRH3 de SEQ.I.D.NO: 3 o
5 SEQ.I.D.NO:42. Tales anticuerpos pueden comprender una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo, IgG1.

En otra modalidad se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión de antígeno del mismo que une específicamente hOSM y comprende CDRs de SEQ.I.D.NO: 1, 2, 3,
10 4, 5 y 6 o SEQ.I.D.NO:40, 41, 42, 43, 44 y 45. Tales anticuerpos pueden comprender una región constante humana del isotipo IgG, por ejemplo, IgG1.

En otra modalidad se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión de antígeno del mismo que une específicamente hOSM y modula la interacción entre hOSM y gp130
15 y comprende (o consiste esencialmente de) la cadena pesada de SEQ.I.D.NO: 11 y una cadena ligera de SEQ.I.D.NO: 12.

En otra modalidad se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión de antígeno del mismo que une específicamente hOSM y modula la interacción entre hOSM y gp130
20 tal anticuerpo comprende (o consiste esencialmente de) una cadena pesada de SEQ.I.D.NO:50 y una cadena ligera de SEQ.I.D.NO:51.

En otra modalidad se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión de antígeno del mismo que une específicamente hOSM y modula la interacción entre hOSM y gp130
25

en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende CDRH3 de SEQ.I.D.NO: 3 además comprendiendo opcionalmente CDRs de SEQ.I.D.NO: 1, 2, 4, 5 y 6 en donde los residuos en posiciones 28, 29, 30, 71 y 94 de la región de estructura de cadena pesada aceptadora de humano y posiciones 49 y 71 de la estructura de cadena ligera aceptadora de humano se substituyen por los residuos correspondientes encontrados en la estructura de anticuerpo donador de la cual se deriva CDRH3.

En otra modalidad se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión de antígeno del mismo que une específicamente hOSM y modula la interacción entre hOSM y gp130 en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende CDRH₃ de SEQ.I.D.NO: 42 opcionalmente comprendiendo además CDRs de SEQ.I.D.NO: 40, 41, 43, 44, 45 en donde los residuos en posiciones 28, 44, 48, 67, 69, 71, 73 de la región de estructura de cadena pesada aceptadora de humano y posiciones 36, 38, 46, 47, 71 de la estructura de cadena ligera aceptadora de humano se substituyen por los residuos correspondientes encontrados en la estructura de anticuerpo donador del cual se deriva CDRH3.

Será aparente para aquellos expertos en la materia que el término "derivado" intenta definir no solamente la fuente en el sentido de ser el origen físico para el material sino que también definir material que es estructuralmente idéntico al material que no se origina de la fuente de referencia. De esta manera "residuos encontrados en el anticuerpo donador del cual CDRH3 se deriva" no

necesariamente se ha purificado del anticuerpo donador.

En otra modalidad se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión de antígeno del mismo que une específicamente hOSM en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende CDRH3 de SEQ.I.D.NO: 3 opcionalmente comprendiendo además CDRs de SEQ.I.D.NO: 1, 2, 4, 5 y 6 en donde la estructura de cadena pesada de humano comprende uno más (por ejemplo, todos) los siguientes residuos (o un sustituto conservador de los mismos):

10	Posición	Residuo
	28	S
	29	L
	30	T
	71	K
15	94	K

y la cadena ligera de humano comprende cualquiera o ambos de los siguientes residuos (o sustituto conservador de los mismos);

	Posición	Residuo
	49	E
20	71	Y

En otra modalidad se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión de antígeno del mismo que une específicamente hOSM en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende CDRs de SEQ.I.D.NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 en donde la estructura de cadena pesada de humano comprende uno o más (por

ejemplo, todos) los siguientes residuos (o un sustituto conservador de los mismos):

	Posición	Residuo
	28	S
5	29	L
	30	T
	71	K
	94	K

y la cadena ligera de humano comprende cualquiera o ambos de los siguientes residuos (o sustituto conservador de los mismos);

	Posición	Residuo
	49	E
	71	Y

En otra modalidad se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a hOSM en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende CDRH3 de SEQ.I.D.NO:42 opcionalmente comprendiendo además CDRs de SEQ.I.D.NO: 40, 41, 43, 44, 45 en donde la estructura de cadena pesada de humano comprende uno o más (por ejemplo, todos) los siguientes residuos (o un sustituto conservador de los mismos):

	Posición	Residuo
	28	I
	48	I
25	44	K

67	A
69	L
71	V
73	K

5 y la cadena ligera de humano comprende uno o más (por ejemplo, todos) los siguientes residuos (o sustituto conservador de los mismos);

	Posición	Residuo
	36	F
10	38	K
	46	R
	47	W
	71	Y

En otra modalidad se proporciona un anticuerpo terapéutico
15 humanizado o fragmento de unión de antígeno del mismo que se une específicamente a hOSM en donde dicho anticuerpo o fragmento del mismo comprende CDRs de SEQ.I.D.NO: 40, 41, 42, 43, 44, 45 en donde la estructura de cadena pesada de humano comprende uno o más (por ejemplo, todos) los siguientes residuos (o un sustituto
20 conservador de los mismos):

	Posición	Residuo
	28	I
	48	I
	44	K
25	67	A

69	L
71	V
73	K

y la cadena ligera de humano comprende uno o más (por ejemplo, todos) los siguientes residuos (o sustituto conservador de los mismos);

Posición	Residuo
36	F
38	K
10 46	R
47	W
71	Y

También se reconoce en la materia que ciertas substituciones de aminoácido son consideradas como siendo "conservadoras". Los aminoácidos se dividen en grupos en base a propiedades de cadena lateral comunes y substituciones dentro los grupos que mantienen toda o substancialmente toda la afinidad de unión del anticuerpo de la invención o fragmento de unión de antígeno del mismo se consideran como substituciones conservadoras, ver la siguiente tabla:

Cadena lateral	Miembros
Hidrofóbica	met, ala, val, leu, ile
Hidrofílica neutral	cys, ser, thr
Ácida	asp, glu
Básica	asn, gln, his, lys, arg
Residuos que influncian la orientación de cadena	gly, pro
Aromática	trp, tyr, phe

1.3 Anticuerpos Biespecíficos

Un anticuerpo biespecífico es un anticuerpo teniendo especificaciones para al menos dos epítopos diferentes. Los métodos para hacer tales anticuerpos se conocen en la materia. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena L-
5 cadena H de inmunoglobulina, donde dos cadenas H tienen diferentes especificidades de unión ver Millstein *et al*, Nature 305 537-539 (1983), WO93/08829 y Traunecker *et al* EMBO, 10, 1991, 3655-3659. Debido a la clasificación aleatoria de las cadenas H y L,
10 una mezcla potencial de diez estructuras de anticuerpo diferentes se producen de las cuales solamente una tiene la especificidad de unión deseada. Un planteamiento alternativo incluye fusionar los dominios variables con las especificidades de unión deseadas a región constante de cadena pesada comprendiendo al menos parte de la
15 región de articulación, regiones CH2 y CH3. Se prefiere tener la región CH1 conteniendo el sitio necesario para unión de cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. ADN codificando estas fusiones, y si se desea la cadena L se insertan en vectores de expresión separados y se contranfectan entonces en un organismo
20 huésped adecuado. Por lo tanto es posible insertar las secuencias de codificación para dos o las tres cadenas en un vector de expresión. En un planteamiento preferido, el anticuerpo biespecífico se compone de una cadena H con una primer especificidad de unión en el otro brazo, ver WO94/04690. Ver también Suresh *et al*
25 Methods in Enzymology 121, 210, 1 986.

En una modalidad de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico biespecífico en donde al menos una especificidad de unión de dicho anticuerpo es para hOSM, en donde dicho anticuerpo modula (es decir inhibe o bloquea) la interacción entre Sitio II de hOSM y gp130. Tales anticuerpos pueden comprender además una región constante de humano del Isotipo IgG, por ejemplo, IgG1.

En una modalidad de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico biespecífico en donde al menos una especificidad de unión de dicho anticuerpo es para hOSM, en donde dicho anticuerpo comprende al menos uno de CDRH3 de SEQ.I.D.NO: 3 o SEQ.I.D.NO:42. Tales anticuerpos pueden comprender además una región constante de humano del Isotipo IgG, por ejemplo, IgG1.

En una modalidad de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico biespecífico en donde al menos una especificidad de unión de dicho anticuerpo es para hOSM, en donde dicho anticuerpo comprende al menos CDRs de SEQ.I.D.NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 o SEQ.I.D.NO: 40,41, 42, 43, 44 y 45. Tales anticuerpos pueden comprender además una región constante de humano del isotipo IgG, por ejemplo, IgG1.

20

1.4 Fragmentos de Anticuerpo

En ciertas modalidades de la invención se proporcionan fragmentos de anticuerpo terapéutico que modulan la interacción entre OSM (particularmente hOSM) y gp130. Tales fragmentos pueden ser fragmentos de unión de antígeno funcional de

25

anticuerpos intactos y/o humanizados y/o quiméricos tales como fragmentos Fab, Fd, Fab', F(ab')₂, Fv, ScFv de los anticuerpos descritos *supra*. Tradicionalmente, tales fragmentos se producen por la digestión proteolítica de anticuerpos intactos, por ejemplo, por digestión de papain (ver por ejemplo, WO 94/29348) pero pueden producirse directamente de células huésped recombinantemente transformadas. Para la producción de ScFv, ver Bird *et al*; (1988) Science, 242, 423-426. Además, los fragmentos de anticuerpo pueden producirse utilizando una variedad de técnicas de formación como se describe abajo. Fragmentos Fv parecen tener energía de interacción inferior de sus dos cadenas que los fragmentos Fab. Para establecer la asociación de los dominios V_H y V_L, se han enlazado con péptidos (Bird *et al*, (1988) Science 242, 423-426, Huston *et al*, PNAS, 85, 5879-5883), puentes de disulfuro (Glockshuber *et al*, (1990) Biochemistry, 29, 1362-1367) y mutaciones "botón en agujero" (Zhu *et al* (1997), Protein Sci, 6, 781-788). Fragmentos ScFv pueden producirse por métodos bien conocidos por aquellos expertos en la materia ver Whitlow *et al* (1991) Methods companion Methods Enzymol, 2, 97-105 y Huston *et al* (1993) Int.Rev.Immunol 10, 195-217. ScFv puede producirse en células bacterianas tal como *E.Coli* pero se producen más típicamente en células eucarióticas. Una desventaja de ScFv es la monovalencia del producto, que produce una avidéz incrementada debido a unión polivalente, y sus vida media corta. Intentos por superar estos problemas incluyen (ScFv')₂ bivalente producido de

ScFv conteniendo una cisteína de terminal C adicional por
 acoplamiento quílmico (Adams *et al* (1993) Can. Res 53, 4026-4034 y
 McCartney *et al* (1995) Protein Eng. 8, 301-314) o por dimerización
 específica de sitio espontánea de ScFv conteniendo un residuo de
 5 cisteína de terminal C no en par (ver Kipriyanov *et al* (1995) Cell.
 Biophys 26, 187-204). Alternativamente, ScFv puede forzarse para
 formar multímeros al acortar el enlazador de péptido a entre 3 a 12
 residuos para formar "diacuerpos", ver Holliger *et al* PNAS (1993),
 90, 6444-6448. La reducción del enlazador aún además puede
 10 resultar en trímeros ScFv ("triacuerpos", ver Kortt *et al* (1997)
 Protein Eng, 10, 423-433) y tetrámeros ("tetracuerpos", ver Le Gall *et al*
et al (1999) FEBS Lett, 453, 164-168). Construcción de moléculas
 ScFv bivalentes también puede lograrse por fusión genética con
 motivos de dimerización de proteína para formar "minianticuerpos"
 15 (ver Pack *et al* (1992) Biochemistry 31, 1579-1584) y "minicuerpos"
 (ver Hu *et al* (1996), Cancer Res. 56, 3055-3061). Aleatorios ScFv-
 Sc-Fv ((ScFv)₂) también puede producirse al enlazar dos unidades
 ScFv por un tercer enlazador de péptido, ver Kurucz *et al* (1995)
 J.Immol.154, 4576-4582. Los diacuerpos biespecíficos pueden
 20 producirse a través de la asociación no covalente de dos productos
 de fusión de cadena única consistiendo de dominio V_H de un
 anticuerpo conectado por un enlazador corto al dominio V_L de otro
 anticuerpo, ver Kipriyanov *et al* (1998), Int.J.Can 77,763- 772. La
 estabilidad de tales diacuerpos biespecíficos puede mejorarse por la
 25 introducción de puentes de disulfuro o mutaciones "botón en agujero"

como se describe *supra* o por la formación de diacuerpos de cadena única (ScDb) en donde dos fragmentos ScFv híbridos se conectan a través de un enlazador de péptido ver Kontermann *et al* (1999) J. Immunol. Methods 226 179-188. Moléculas biespecíficas tetravalentes están disponibles al, por ejemplo, fusionar un fragmento ScFv al dominio CH3 de una molécula IgG o a un fragmento Fab a través de la región de articulación ver Coloma *et al.*, (1997) Nature Biotechnol. 15, 159-163. Alternativamente, las moléculas biespecíficas tetravalentes se han creado por la fusión de diacuerpos de cadena única biespecífica (ver Alt *et al.*, (1999) FEBS Lett 454, 90-94. Moléculas biespecíficas tetravalentes más pequeñas también pueden formarse por la dimerización de cualquier aleatorio ScFv-ScFv con un enlazador conteniendo un motivo de hélice-ciclo-hélice (minianticuerpos DiBi, ver Muller *et al* (1998) FEBS Lett 432, 45-49) o una molécula de cadena única comprendiendo cuatro dominios variables de anticuerpo (V_H y V_L) en orientación previniendo el par intramolecular (diacuerpo aleatorio, ver Kipriyanov *et al.*, (1999) J. Mol. Biol. 293, 41-56). Fragmentos $F(ab')_2$ biespecíficos pueden crearse por acoplamiento químico de fragmentos Fab' o por heterodimerización a través de cierres de leucina (ver Shalaby *et al.*, (1992) J.Exp.Med. 175, 217-225 y Kostelny *et al* (1992), J.Immunol. 148, 1547-1553). También están disponibles los dominios V_H y V_L (Domantis pic), ver US 6,248,516; US 6,291,158; US 6,172,197.

En una modalidad se proporciona un fragmento de anticuerpo

terapéutico (ver por ejemplo, ScFv, Fab, Fd, Fab', F(ab')₂) o un
fragmento de anticuerpo formado como se describe arriba) que se
une específicamente a hOSM y modula (es decir, inhibe o bloquea) la
interacción entre Sitio II de hOSM y gp130. El fragmento de
5 anticuerpo terapéutico puede comprender un CDRH3 teniendo la
secuencia de SEQ.I.D.NO: 3 opcionalmente junto con CDRs teniendo
la secuencia establecida en SEQ.I.D.NO: 1, 2, 4, 5 y 6 o un
fragmento de anticuerpo terapéutico comprendiendo un CDRH3 of
SEQ.I.D.NO:42 opcionalmente junto con CDRs teniendo la secuencia
10 establecida en SEQ.I.D.NO: 40, 41, 43, 44 y 45.

1.5 Anticuerpos Heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados también forman una
modalidad de la presente invención. Los anticuerpos
15 heteroconjugados se componen de dos anticuerpos covalentemente
unidos formados utilizando cualquier método de degradación
conveniente. Ver US 4,676,980.

1.6 Otras Modificaciones

20 La interacción entre la región Fc de un anticuerpo y varios
receptores Fc (FcγR) se cree que media las funciones efectoras del
anticuerpo que incluyen citotoxicidad celular dependiente de
anticuerpo (ADCC), fijación de complemento, fagocitosis y vida
media/despeje del anticuerpo. Varias modificaciones a la región Fc
25 de anticuerpos de la invención pueden llevarse a cabo dependiendo

de la propiedad efectora deseada. Por ejemplo, las mutaciones específicas en la región Fc para volver un anticuerpo de otra manera lítico, no lítico se detalla en EP 0629 240B1 y EP 0307434B2 o uno puede incorporar un epítopo de unión de receptor salvaje en el anticuerpo para incrementar la vida media de suero ver US 5,739,277. Existen cinco receptores Fcγ de humano actualmente reconocidos, FcγR (I), FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcRn neonatal. Shields *et al*, (2001) J.Biol.Chem 276, 6591-6604 demostró que un conjunto común de residuos IgG1 se incluye en la unión de todos los FcγRs, mientras FcγRII y FcγRIII utilizan sitios distintos fuera de este conjunto común. Un grupo de residuos IgG1 reduce la unión de todos los FcγRs cuando se altera a alanina: Pro-238, Asp-265, Asp-270, Asn-297 y Pro-239. Todos están en el dominio IgG y se agrupan cerca de la unión de articulación CH1 y CH2. Aunque FcγRI utiliza solamente el conjunto común de residuos IgG1 para unirse, FcγRII y FcγRIII interactúan con residuos distintos además del conjunto común. La alteración de algunos residuos redujo la unión solamente a FcγRII (por ejemplo, Arg-292) o FcγRIII (por ejemplo, Glu-293). Algunas variantes mostraron unión mejorada a FcγRII o FcγRIII pero no afectaron la unión a otro receptor (por ejemplo, Ser-267Ala mejoró la unión a FcγRII pero unión a FcγRIII no se afectó). Otras variantes mostraron unión mejorada a FcγRII o FcγRIII con reducción en unión al otro receptor (por ejemplo, Ser-298Ala mejoró la unión a FcγRIII y redujo la unión a FcγRII). Para FcγRIIIa, las mejores variantes IgG1 de unión tuvieron sustituciones de alanina

combinadas en Ser-298, Glu-333 y Lys-334. El receptor FcRn neonatal se cree que se incluye tanto en despeje del cuerpo como la transcitosis a través de los tejidos (ver Junghans RP (1997) Immunol. Res 16. 29-57 y Ghetie *et al* (2000) Annu.Rev.Immunol. 18, 739-766). Residuos IgG1 de humano se determinan para interactuar directamente con FcRn de humano incluye Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 y His435. La presente invención por lo tanto se refiere a anticuerpos de la invención teniendo cualquiera (o más) de los cambios de residuo detallados arriba para modificar vida media/despeje y/o funciones efectoras tales como ADCC y/o lisis complemento. En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que une específicamente hOSM y modula la interacción entre hOSM y gp130 teniendo sustituciones de alanina (u otra interrupción) en posiciones 235 (por ejemplo, L235A) y 237 (por ejemplo, G237A). En una modalidad adicional de la invención se proporciona un anticuerpo terapéutico humanizado que une específicamente hOSM y comprende una cadena pesada de SEQ.I.D.NO:61 y una cadena ligera de SEQ.I.D.NO:12.

Otras modificaciones incluyen variantes de glicosilación de los anticuerpos de la invención. Glicosilación de anticuerpos en posiciones conservadas en sus regiones constantes se conoce por tener un efecto profundo en función de anticuerpo, particularmente funcionamiento efector tal como aquellos descritos arriba, ver por ejemplo, Boyd *et al* (1996), Mol. Immunol. 32, 1311-1318. Variantes

de glicosilación de los anticuerpos terapéuticos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención en donde una o más porción de carbohidrato se agrega, substituye, elimina o modifica, se contemplan. La introducción de un motivo de

5 asparagina-X-serina o asparagina-X-treonina crea un sitio potencial para una unión enzimática de porciones de carbohidrato y puede utilizarse por lo tanto para manipular la glicosilación de un anticuerpo. En Raju *et al* (2001) *Biochemistry* 40, 8868-8876 la sialilación terminal de una inmunoadhesina TNFR-IgG se incrementa

10 a través de un proceso de regalactosilación y/o resialilación utilizando beta-1, 4-galactosiltransferasa y/o alfa, 2,3 sialiltransferasa. Incrementando la sialilación terminal se cree que incrementa la vida media de la inmunoglobulina. Los anticuerpos, en común con la mayoría de las glicoproteínas, se producen típicamente

15 en naturaleza como una mezcla de glicoformas. Esta mezcla es particularmente aparente cuando los anticuerpos se producen en células eucarióticas, particularmente mamíferas. Una variedad de métodos se han desarrollado para fabricar glicoformas definidas, ver Zhang *et al* *Science* (2004), 303, 371, Sears *et al*, *Science*, (2001)

20 291, 2344, Wacker *et al* (2002) *Science*, 298 1790, Davis *et al* (2002) *Chem.Rev.* 102, 579, Hang *et al* (2001) *Acc.Chem.Res* 34, 727. De esta manera, la invención se refiere a una pluralidad de anticuerpos terapéuticos (típicamente monoclonales) (que puede ser el isotipo IgG, por ejemplo, IgG1) como se describe en la presente

25 comprendiendo un número definido (por ejemplo, 7 o menos, por

ejemplo 5 o menos tales como dos o una glicoforma(s) única(s) de dichos anticuerpos o fragmentos de unión de antígeno de los mismos.

Las modalidades adicionales de la invención incluyen anticuerpos
5 terapéuticos de la invención o fragmentos de unión de antígeno de los mismos acoplados a un polímero no proteínico tal como glicol de polietileno (PEG), glicol de polipropileno o polioxialquileno. La conjugación de proteínas a PEG es una técnica establecida para incrementar la vida media de proteínas, así como también reducir la
10 antigenicidad e inmunogenicidad de proteínas. El uso de PEGilación con diferentes pesos moleculares y estilos (lineal o ramificado) se ha investigado con anticuerpos intactos así como también fragmentos Fab', ver Koumenis I.L. et al (2000) Int.J.Pharmaceut. 198:83-95.

Suministro de proteínas terapéuticas al cerebro se ha
15 dificultado por la presencia de la barrera cerebral sanguínea (BBB). Donde se desea suministrar un anticuerpo de la invención o fragmento de anticuerpo de la invención a través de la BBB, se han propuesto para mejorar tal suministro donde se necesite.

Para obtener nutrientes requeridos y factores de la sangre, la
20 BBB posee algunos receptores específicos, que transportan compuestos de la sangre circulante al cerebro. Los estudios han indicado que algunos compuestos como insulina (ver Duffy KR et al. (1989) Brain Res. 420:32-38), transferin (ver Fishman JB et al (1987) J.Neurosci 18:299-304) y los factores 1 y 2 de crecimiento similares
25 a insulina (ver Pardridge WM (1986) Endocrine Rev.7:314-330 y

Duffy KR *et al* (1986) *Metabolism* 37:136-140) atraviesan la BBB a través de la transcitosis mediada por receptor. Los receptores para estas moléculas de esta molécula proporcionan un medio potencial para anticuerpos de la invención y/o fragmentos de anticuerpo de la invención para acceder al cerebro utilizando los anticuerpos así llamados "vectorizados" (ver Pardridge WM (1999) *Advanced Drug Delivery Review* 36:299-321). Por ejemplo, un anticuerpo a receptor de transferrin se ha mostrado por transportarse dinámicamente en la parenquimia de cerebro (ver Friden PM *et al* (1991) *PNAS* 88:4771-4775 y Friden PM *et al* (1993) *Science* 259:373-377). De esta manera, un planteamiento potencial es producir un anticuerpo biespecífico o fragmento biespecífico tal como se describe *supra* en donde una primera especificidad es hacia Sitio II de hOSM (por ejemplo, la primera especificidad comprende CDRH3 de SEQ.I.D.NO: 3 opcionalmente junto con CDRs of SEQ.I.D.NO: 1, 2, 4, 5 y 6 o comprende un CDRH3 de SEQ.I.D.NO:42 opcionalmente junto con CDRs de SEQ.I.D.NO: 40, 41, 43, 44, 45) y una segunda especificidad hacia un receptor de transporte ubicado en la BBB, por ejemplo, una segunda especificidad hacia el receptor de transporte de transferrin.

2. Inmunoglobulinas de Competencia

La presente invención también proporciona inmunoglobulinas, anticuerpos y fragmentos de unión de antígeno de anticuerpos y otras entidades de proteína tales como inmunoadhesinas que unen específicamente hOSM e inhiben competitivamente, la unión entre

hOSM y el anticuerpo terapéutico de la invención fragmento de unión de antígeno del mismo comprendiendo una cadena pesada de SEQ.I.D.NO:11 y una cadena ligera de SEQ.I.D.NO:12. La inmunoglobulina competente, anticuerpo y fragmentos de unión de antígeno de anticuerpos y otra entidad de proteína tal como despliegues de inmunoadhesin, a concentraciones equimolares, al menos 25% inhibición, típicamente 35% o mayor, más típicamente al menos 50% inhibición.

De esta manera en una modalidad de la invención se proporciona un método para seleccionar un anticuerpo candidato o fragmento de anticuerpo para determinar si el anticuerpo candidato o fragmento de anticuerpo es un anticuerpo competente como se describe en la presente tal método comprende las etapas de;

(a) incubar el anticuerpo candidato o fragmento de anticuerpo con un anticuerpo terapéutico comprendiendo una cadena pesada de SEQ.I.D.NO:11 y una cadena ligera de SEQ.I.D.NO:12 o fragmento de unión de antígeno del mismo;

(b) determinar si el anticuerpo candidato o fragmento de anticuerpo del mismo de la etapa (a) inhibe competitivamente la unión entre el anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo y OSM y en particular hOSM. Típicamente un ensayo a base de ELISA se emplea tal como ELISA establecida en los ejemplos. Típicamente, OSM y/o hOSM se glicosilan. Típicamente, OSM y hOSM se han glicosilado por una célula mamífera tal como una célula CHO transformada, célula NSO o humana. En otras

modalidades, OSM y hOSM se han glicosilado por una célula nativa de la cual se deriva, es decir, hOSM se ha glicosilado por una célula de humano (por ejemplo hOSM puede aislarse del cuerpo humano).

De esta manera también se proporciona un anticuerpo
5 terapéutico competente o fragmento de unión de antígeno del mismo que inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo tal anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo comprende CDR teniendo las secuencias establecidas en SEQ.I.D.NO: 1, 2, 3, 4, 5 y
10 6.

También se proporciona un anticuerpo terapéutico competente o fragmento de unión de antígeno del mismo que inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo tal anticuerpo terapéutico o
15 fragmento de unión de antígeno del mismo comprende una cadena pesada de SEQ.I.D.NO:11 y una cadena ligera de SEQ.I.D.NO:12.

Un anticuerpo terapéutico competente o fragmento de unión de antígeno del mismo puede ser de cualquiera de las estructuras de anticuerpo anteriores. Por ejemplo, el anticuerpo terapéutico
20 competente puede ser un anticuerpo intacto humano o primate o un anticuerpo humanizado típicamente de un isotipo IgG por ejemplo, IgG1 o IgG4. Fragmentos de anticuerpo terapéuticos competentes pueden ser Fab, Fab', Fd, F(ab')₂, ScFv y lo similar. Un anticuerpo terapéutico competente puede producirse de acuerdo a los métodos
25 descritos dentro de esta presente especificación.

Un procedimiento típico para el método de selección descrito *supra*, se establece en los ejemplos abajo.

10D3 es un ejemplo de un anticuerpo competente de la invención. Ver Tabla A abajo.

5

2.1 Otros Métodos de Selección

Un aspecto adicional de la presente invención se basa en parte en un descubrimiento de que la glicosilación de hOSM juega un papel inesperado en el evento de unión entre un anticuerpo anti-
10 hOSM y hOSM. La presente invención por lo tanto se extiende a un método para seleccionar un anticuerpo que une específicamente hOSM tal método comprende incubar dicho anticuerpo con OSM glicosilado, particularmente hOSM, bajo condiciones permisivas para unión y medir la afinidad de unión del anticuerpo. procedimiento
15 ELISA detallado abajo permite tal método. Los anticuerpos (que pueden ser de cualquiera de las estructuras detalladas arriba) pueden seleccionarse en la base de tener una afinidad de unión (K_d) mayor a 1 μ M, típicamente mayor a 100nM, más típicamente mayor a 1 nM por ejemplo, 100pM o mayor. Los anticuerpos pueden
20 seleccionarse además en la base de su habilidad para unir OSM no glicosilado, por ejemplo, hOSM. De esta manera, los anticuerpos se seleccionan típicamente en la base que son capaces de unir OSM glicosilado por ejemplo, hOSM y también además capaces de unir OSM no glicosilado, por ejemplo, hOSM, al mismo o grado similar
25 (por ejemplo, tienen la misma o similar afinidad de unión como se

mide en un ensayo Biacore™).

- Los anticuerpos seleccionados de acuerdo al presente método pueden formarse además (por ejemplo, humanizarse si es necesario mediante, por ejemplo, manipulación de polinucleótidos codificando el anticuerpo) e incorporan en una composición farmacéutica. Los anticuerpos seleccionados por el presente método y polinucleótidos codificando tales anticuerpos forman una modalidad de la presente invención. De esta manera la presente invención proporciona un método para seleccionar un anticuerpo que une putativamente OSM, particularmente hOSM (por ejemplo, un anticuerpo que se ha originado contra OSM/hOSM), tal método comprende;
- (a) incubar dicho anticuerpo con OSM glicosilado, particularmente hOSM glicosilado bajo condiciones permisivas para unión;
 - (b) medir la afinidad de unión de dicho anticuerpo;
 - 15 (c) seleccionar dicho anticuerpo si dicho anticuerpo tiene una afinidad de unión mayor a 1 μ M, típicamente mayor a 100nM;
 - (d) proporcionar un polinucleótido codificando dicho anticuerpo de la etapa (c) y transformar o transfectar una célula huésped mamífera con un vector comprendiendo dicho polinucleótido;
 - 20 (e) cultivar dicha célula huésped de la etapa (d) bajo condiciones permisivas para secreción de dicho anticuerpo en el medio de cultivo;
 - (f) purificar opcionalmente el medio de cultivo de la etapa (e);
 - (g) incorporar el anticuerpo de la etapa (e) o (f) en una composición
 - 25 farmacéutica.
-

Uso de un anticuerpo identificado por este método en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o desórdenes detallados abajo también se proporciona.

- Uso de un anticuerpo (por ejemplo, Intacto, humano, humanizado, quimérico) que une específicamente hOSM glicosilado nativo (particularmente un epítopo de Sitio II de hOSM glicosilado) y modula la interacción entre dicho hOSM glicosilado y gp130 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o desorden detallado abajo también se proporciona.
- 5 Se proporcionan además los anticuerpos que unen específicamente hOSM glicosilado nativo con la misma o similar afinidad de unión como hOSM no glicosilado bajo las mismas condiciones experimentales. Una modalidad de la invención es anticuerpos que unen específicamente OSM glicosilado, particularmente aquellos que unen hOSM glicosilado. Anticuerpo 15E10 es un ejemplo de un anticuerpo que une específicamente hOSM glicosilado.
- 10
- 15

- En algunas modalidades, el método utiliza hOSM glicosilado por una célula huésped mamífera tal como CHO o NSO. En otras modalidades, el método utiliza hOSM que se ha glicosilado por una célula humana por ejemplo, una célula huésped humana transfectada o transformada recombinantemente o hOSM nativo que se ha aislado del cuerpo humano (por ejemplo hOSM hecho por células encontradas en el fluido sinovial de un paciente humano artrítico (por ejemplo, RA)).
- 20

3. Métodos de Producción

Los anticuerpos de la invención pueden producirse como una población policlonal pero se producen más típicamente como una población monoclonal (es decir, como una población substancialmente homogénea de anticuerpos idénticos dirigidos contra un sitio de unión antigénico específico). Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse en organismos transgénicos tales como cabras (ver Pollock *et al* (1999), J. Immunol. Methods 231:147-157), pollos (ver Morrow KJJ (2000) Genet.Eng.News 20:1 - 55), ratones (ver Pollock *et al* *ibid*) o plantas (ver Doran PM, (2000) Curr.Opinion Biotechnol. 11, 199-204, Ma JK-C (1998), Nat.Med. 4; 601-606, Baez J *et al*, BioPharm (2000) 13: 50-54, Stoger E *et al*; (2000) Plant Mol. Biol. 42:583-590). Los anticuerpos también pueden producirse por síntesis química. Sin embargo, los anticuerpos de la invención se producen típicamente utilizando tecnología de cultivo de célula recombinante bien conocida por aquellos expertos en la materia. Un polinucleótido codificando el anticuerpo se aísla e inserta en un vector replicable tal como un plásmido para clonación adicional (amplificación) o expresión. Tal sistema expresión útil es un sistema de sintetasa de glutamato (tal como se vende por Lonza Biologies), particularmente donde la célula huésped es CHO o NS0 (ver abajo). Polinucleótido codificando el anticuerpo es fácilmente aislado y secuenciado utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, sondas de oligonucleótido). Los vectores que pueden utilizarse incluyen

plásmido, virus, fago, transposones, minocromosomas de los cuales los plásmidos son una modalidad típica. Generalmente, tales vectores incluyen además una secuencia de señal, origen de réplica, uno o más genes marcadores, un elemento aumentador, un promotor y secuencias de terminación de transcripción operativamente enlazadas al polinucleótido de cadena pesada y/o ligera para facilitar la expresión. El polinucleótido codificando las cadenas ligera y pesada pueden insertarse en vectores separados y se introducen (por ejemplo, por electroporación) en la misma célula huésped o, si se desea tanto la cadena pesada como la cadena ligera pueden insertarse en el mismo vector para transfección en la célula huésped. De esta manera, de acuerdo a una modalidad de la presente invención se proporciona un proceso para construir un vector codificando las cadenas ligeras y/o pesadas de un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo de la invención, tal método comprende insertar en un vector, un polinucleótido codificando ya sea de una cadena ligera y/o cadena pesada de un anticuerpo terapéutico de la invención. Ver Tabla A abajo.

En otra modalidad de la invención se proporciona un polinucleótido codificando un dominio V_H de murino teniendo la secuencia establecida como SEQ.I.D.NO:15 o SEQ.I.D.NO:52.

En otra modalidad de la invención se proporciona un polinucleótido codificando un dominio V_L de murino teniendo la secuencia establecida como SEQ.I.D.NO: 16 o SEQ.I.D.NO:53.

En otra modalidad se proporciona un polinucleótido codificando un dominio V_H humanizado teniendo la secuencia establecida como SEQ.I.D.NO: 17 o SEQ.I.D.NO:54.

5 En otra modalidad se proporciona un polinucleótido codificando una cadena V_L humanizada teniendo la secuencia establecida como SEQ.I.D.NO: 18 o SEQ.I.D.NO:55.

En otra modalidad se proporciona un polinucleótido codificando una cadena pesada humanizada teniendo la secuencia establecida como SEQ.I.D.NO: 19 o SEQ.I.D.NO:56.

10 En otra modalidad se proporciona un polinucleótido codificando una cadena ligera humanizada teniendo la secuencia establecida como SEQ.I.D.NO:20 o SEQ.I.D.NO:57.

Será inmediatamente aparente para aquellos expertos en la materia que debido a la redundancia del código genético, polinucleótidos alternativos a aquellos descritos en la presente también están disponibles, que codificarán los polipéptidos de la invención.

3.1 Secuencias de Señal

20 Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse como una proteína de fusión con una secuencia de señal heteróloga teniendo un sitio de separación específico en el termino N de la proteína madura. La secuencia de señal debe reconocerse y procesarse por la célula huésped. Para células huésped
25 procarióticas, la secuencia de señal puede ser una fosfatasa

alcalina, penicilinasa, o guías de enterotoxina II estables por calor. Para secreción de levadura, las secuencias de señal puede ser una guía de invertasa de levadura, guía de factor α o guías de fosfatasa de señal ver por ejemplo, WO90/13646. En sistemas de célula

5 mamífera, guías secretoras virales tal como señal gD simple de herpes y una secuencia de señal de inmunoglobulina nativa (tal como cadena pesada Ig) están disponibles. Típicamente, la secuencia de señal se liga en estructura de lectura a ADN codificando el anticuerpo de la invención.

10

3.2 Origen de réplica

Origen de réplicas se conocen bien en la materia con pBR322 adecuado para la mayoría de las bacterias de gramnegativo, 2 μ plásmido para la mayoría de la levadura y varios orígenes virales

15 tales como SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV para la mayoría de las células de mamífero. Generalmente, el origen de componente de réplica no se necesita para vectores de expresión de mamífero pero el SV40 puede utilizarse ya que contiene el promotor anterior.

20 3.3 Marcador de Selección

Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina o (b) complementar deficiencias auxiotrófica o suministrar nutrientes no disponibles en el

25 medio de cultivo. El esquema de selección puede incluir detener

el crecimiento de la célula huésped. Las células, que se han transformado exitosamente con los genes codificando el anticuerpo terapéutico de la presente invención, sobreviven debido a por ejemplo, resistencia de fármaco conferida por el marcador de selección. Otro ejemplo es el así llamado marcador de selección DHFR en donde los transformadores se cultivan en la presencia de metotrexato. Las células CHO son una estirpe de célula particularmente útil para la selección de DHFR. Los métodos para amplificar y seleccionar las células huésped utilizando el sistema DHFR también se establecen bien en la materia ver Kaufman R.J. et al J. Mol. Biol. (1982) 159, 601-621, para revisión, ver Werner RG, Noe W, Kopp K, Schluter M, "Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals", Arzneimittel-Forschung. 48(8):870-80, 1998 Aug. Un ejemplo adicional es el sistema de expresión de sintetasa de glutamato (Lonza Biologies). Un gen de selección adecuado para usarse en levadura es el gen trp1; ver Stinchcomb et al Nature 282, 38, 1979.

3.4 Promotores

Promotores adecuados para expresar anticuerpos de la invención se enlazan operativamente ADN/polinucleótido codificando el anticuerpo. Los promotores para huéspedes procarióticos incluyen promotor phoA, Beta-lactamasa y sistemas promotores de lactosa, fosfatasa alcalina, triptofan y promotores híbridos tal como Tac. Los promotores adecuados para expresión en células de levadura

incluyen quinasa 3-fosfoglicerato u otras enzimas glicolíticas, por ejemplo, enolasa, gliceraldehído 3 fosfato dehidrogenasa, hexoquinasa, decarboxilasa de piruvato, fosfofructoquinasa, glucosa 6 fosfata isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa y glucoquinasa. Los
5 promotores de levadura inducibles incluyen dehidrogenasa de alcohol 2, isocitocromo C, fosfatasa de ácido, metalotioneína y enzimas responsables de metabolismo de hidrógeno o utilización de maltosa/galactosa.

Los promotores para expresión en sistemas celulares de
10 mamífero incluyen promotores virales tales como poliovirus, erupción en aves, y adenovirus (por ejemplo, adenovirus 2), virus de papiloma de bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus (en particular el promotor genético temprano inmediato), retrovirus, virus de hepatitis B, actin, virus de sarcoma rous (RSV) y el virus 40 de Simio
15 temprano o posterior. Por supuesto, la elección del promotor se basa en compatibilidad adecuada con la célula huésped utilizada para expresión.

3.5 Elemento Aumentador

20 Donde sea apropiado, por ejemplo, para expresión en eucarióticas grandes, un elemento aumentador operativamente enlazado al elemento promotor en un vector puede utilizarse. Las secuencias aumentadoras de mamífero adecuadas incluyen elementos aumentadores de globin, elastasa, albúmina, fetoproteína
25 e insulina. Alternativamente, uno puede utilizar un elemento

aumentador de un virus de célula eucariótica, aumentador de polímero, aumentador baculoviral o lugar IgG2 de murino (ver WO04/009823). El aumentador es típicamente ubicado en el vector en un sitio aguas arriba al promotor.

5

3.6 Células Huésped

Las células huésped adecuadas para clonar o expresar vectores codificando anticuerpos de la invención son células procarióticas, levadura o eucarióticas más grandes. Las células

10 procarióticas adecuadas incluyen eubacteria, por ejemplo, enterobacteriaceas tales como *E.Coli* (por ejemplo ATCC 31,446; 31,537; 27,325), *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella* *Proteus*, *Salmonella* por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia* por ejemplo, *Serratia marcescens* y *Shigella* así como también Bacilli tal

15 como *B.subtilis* y *B.licheniformis* (ver DD 266 710), *Pseudomonas* tal como *P.aeruginosa* y *Streptomyces*. De las células huésped de levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* (por ejemplo, ATCC 16,045; 12,424; 24178; 56,500), milhojas (EP402, 226), *Pichia Pastoris* (EP183, 070, ver también

20 Peng et al J.Biotechnol. 108 (2004) 185-192), *Candida*, *Trichoderma reesei* (EP244, 234J, *Penicillium*, *Tolypocladium* y huéspedes *Aspergillus* tales como *A.nidulans* y *A.niger* también se contemplan.

Aunque las células huésped de levadura y procarióticas se contemplan específicamente por la invención, típicamente sin

25 embargo, las células huésped de la presente invención son células

- vertebradas. Las células huésped vertebradas adecuadas incluyen células de mamífero tales como COS-1 (ATCC No.CRL 1650) COS-7 (ATCC CRL 1651), línea de riñón embrionica de humano 293, células de riñón hámster de bebe (BHK) (ATCC CRL.1632), BHK570 (ATCC NO: CRL 10314), 293 (ATCC NO.CRL 1573), células de ovario de hámster chino CHO (por ejemplo, CHO-K1, ATCC NO: CCL 61, estirpe de célula DHFR-CHO tal como DG44 (ver Urlaub *et al*, (1986) Somatic Cell Mol. Genet.12, 555-556)), particularmente aquellas estirpes de célula CHO adaptadas para cultivo de suspensión,
- 10 células sertoli de ratón, células de riñón de mono, células de riñón de mono verde (ATCC CRL-1587), células HELA, células de riñón caninas (ATCC CCL 34), células de pulmón de humano (ATCC CCL 75), Hep G2 y células de linfoma o mieloma por ejemplo, NSO (ver US 5,807,715), Sp2/O, YO.
- 15 De esta manera en una modalidad de la invención se proporciona una célula huésped transformada comprendiendo un vector que codifica una cadena pesada y/o cadena ligera del anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo como se describe en la presente. Típicamente, tales células
- 20 huésped comprenden un primer vector codificando la cadena ligera y un segundo vector codificando dicha cadena pesada.

Fermentación Bacteriana

- Los sistemas bacterianos son particularmente adecuados para
- 25 la expresión de fragmentos de anticuerpo. Tales fragmentos se
-

ubican intracelularmente o dentro del periplasma. Las proteínas periplásmicas insolubles pueden extraerse y redoblar para formar proteínas activas de acuerdo a los métodos conocidos por aquellos expertos en la materia, ver Sanchez *et al* (1999) J.Biotechnol. 72, 13-20 and Cupit PM *et al* (1999) Lett Appl Microbiol, 29, 273-277.

3.7 Métodos de Cultivo Celular

Las células huésped transformadas con vectores codificando los anticuerpos terapéuticos de la Invención o fragmentos de unión de antígeno de los mismos pueden cultivarse por cualquier método conocido por aquellos expertos en la materia. Las células huésped pueden cultivarse en matraces giratorios, botellas giratorias o sistemas de fibra hueca pero se prefiere para producción a gran escala que reactores de tanque agitados se utilizan particularmente para cultivos de suspensión. Típicamente, los tanques agitados se adaptan para aeración utilizando, por ejemplo, rociadores, reguladores o impulsores bajo cortantes. Para columnas de burbuja y reactores de aire dirigen aeración con burbujas de oxígeno o aire pueden utilizarse. Donde las células huésped se cultivan en un medio de cultivo libre de suero se prefiere que el medio se complemente con un agente protector de célula tal como F-68 plurónico para ayudar a prevenir el daño celular como un resultado del proceso de aeración. Dependiendo de las características de célula huésped, cualquier microvehículo puede ser utilizado como substratos de crecimiento por estirpes de célula dependientes de

sujeción o las células pueden adaptarse al cultivo de suspensión (que es típico). El cultivo de las células huésped, particularmente células huésped vertebradas pueden utilizar una variedad de modos operacionales tales como grupo de alimentación, procesamiento de grupo repetido (ver Drapau *et al.*, (1994 cytotechnology 15: 103-109), proceso de grupo extendido o cultivo de perfusión. Aunque las células huésped mamíferas transformadas pueden cultivarse en medio conteniendo suero tal medio comprendiendo suero de bovino fetal (FCS), se prefiere que tales células huésped se cultiven en medio libre de suero sintético tal como se describe en Keen *et al* (1995) Cytotechnology 17:153-163, o medios comercialmente disponibles tales como ProCHO-CDM o UltraCHO™ (Cambrex NJ, USA), complementado donde sea necesario con una fuente de energía tal como glucosa y factores de crecimiento sintético tal como insulín recombinante. El cultivo libre de suero de células huésped puede requerir que aquellas células se adapten para desarrollarse en condiciones libre de suero. Un planteamiento de adaptación es cultivar tales células huésped en suero conteniendo medio e intercambiar repetidamente 80% del medio de cultivo para el medio libre de suero de manera que las células huésped aprenden a adaptarse en condiciones libre de suero (ver por ejemplo, Scharfenberg K *et al* (1995) In *Animal Cell technology: Developments towards the 21st century* (Beuvery E. C. *et al* eds), pp619-623, Kluwer Academic publishers).

25 Los anticuerpos de la invención secretados en los medios

111

pueden recuperarse y purificarse de los medios utilizando una variedad de técnicas para proporcionar un grado de purificación adecuado para el uso propuesto. Por ejemplo, el uso de anticuerpos terapéuticos de la invención para el tratamiento de pacientes humanos típicamente manda al menos 95% pureza, más típicamente 98% o 99% pureza en comparación con el medio de cultivo comprendiendo los anticuerpos terapéuticos. En el primer caso, los residuos celulares del medio de cultivo se remueven típicamente utilizando centrifugación seguido por una etapa de clarificación del sobrenadante, utilizando, por ejemplo, microfiltración, ultrafiltración y/o filtración profunda. Una variedad de otras técnicas tales como diálisis y electroforesis de gel y técnicas cromatográficas tal como hidroxipatita (HA), cromatografía de afinidad (opcionalmente incluyendo un sistema de marcado de afinidad tal como polihistidina) y/o cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, ver US 5,429,746) están disponibles. En una modalidad, los anticuerpos de la invención, siguiendo varias etapas de clarificación, se capturan utilizando cromatografía de afinidad de Proteína A o G seguida por etapas de cromatografía adicionales tal como intercambio de ión y/o cromatografía HA, intercambio de anión o catión, cromatografía de exclusión de tamaño y precipitación de sulfato de amonio. Típicamente, varias etapas de retiro de virus también se emplean (por ejemplo, nanofiltración utilizando, por ejemplo, filtro DV-20). Siguiendo estas diversas etapas, una preparación purificada (típicamente monoclonal) comprendiendo al menos 75mg/ml o más

por ejemplo, 100mg/ml o mayor del anticuerpo de la invención o fragmento de unión de antígeno del mismo se proporciona y por lo tanto forma una modalidad de la invención. De manera adecuada tales preparaciones están substancialmente libres de formas
5 agregadas de anticuerpos de la invención.

4. Composiciones Farmacéuticas

Las preparaciones purificadas de anticuerpos de la invención (particularmente preparaciones monoclonales) como se describe
10 *supra*, pueden incorporarse en composición farmacéuticas para utilizarse en el tratamiento de enfermedades humanas y desordenes tales como aquellos subrayados arriba. Típicamente, tales composiciones comprenden además un vehículo farmacéuticamente aceptable (es decir, inerte) como se conocen y llaman por práctica
15 farmacéutica aceptable, ver por ejemplo, Remingtons Pharmaceutical Sciences, 16th ed, (1980), Mack Publishing Co. Ejemplos de tales vehículos incluyen vehículo esterilizado tal como salina, solución de Ringer o solución de dextrosa, regulada con reguladores adecuados a un pH dentro de un rango de 5 a 8. Las composiciones
20 farmacéuticas para inyección (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intramuscular o intraportal) o infusión continua están substancialmente libres de materia particulada visible y pueden comprender entre 0.1ng a 100mg de anticuerpo, típicamente entre 5mg y 25mg de anticuerpo. Métodos
25 para la preparación de tales composiciones farmacéuticas se

conocen bien por aquellos expertos en la materia. En una modalidad, composiciones farmacéuticas comprende entre 0.1ng a 100mg de anticuerpos terapéuticos de la invención en forma de dosificación unitaria, opcionalmente junto con instrucciones para usarse. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden liofilizarse para reconstitución antes de administración de acuerdo a métodos bien conocidos o aparentes para aquellos expertos en la materia. Donde las modalidades de la invención comprenden anticuerpos de la invención con un isotipo IgG1, un quelador de cobre tal como citrato (por ejemplo, citrato de sodio) o EDTA o histidina puede agregarse a la composición farmacéutica para reducir el grado de degradación mediada por cobre de anticuerpos de este isotipo, ver EP0612251.

Las dosis efectivas y regímenes de tratamiento para administrar el anticuerpo de la invención generalmente se determinan empíricamente y son dependientes de factores tales como la edad, peso y estado de salud del paciente y enfermedad o desorden a tratarse. Tales factores están dentro del campo del médico. Guía para seleccionar dosis apropiadas puede encontrarse en, por ejemplo, Smith *et al* (1977) *Antibodies in human diagnosis and therapy*, Raven Press, New York, pero en general será entre 1mg y 1000mg. En una modalidad, el régimen de dosificación para tratar un paciente humano afligido con RA es 100mg o aproximadamente (es decir, entre 50mg a 200mg) de anticuerpo de la invención (o fragmento de unión de antígeno del mismo) administrado

subcutáneamente por semana o cada dos semanas. Composiciones de la presente invención también pueden utilizarse de manera profiláctica.

Dependiendo de la enfermedad o desorden a tratarse, las composiciones farmacéuticas comprendiendo una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo de la invención puede utilizarse de manera simultánea, separada o secuencial con una cantidad efectiva de otro medicamento tal como un agente anti-inflamatorio por ejemplo NSAID, metotrexato, bucilamine, tiomilato de sodio o uno o más de un tratamiento alfa anti-TNF tal como Enbrel™ (etanercept), Remicade™ (infliximab), Humira™ (adalimumab) y/o CDP870. Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse en combinación con una cantidad efectiva de un anticuerpo receptor alfa anti-TNF, ver Davis MW *et al.* (2000) Ann Rheum Dis 59(Suppl 1): 41-43. En otras modalidades, anticuerpos de la invención pueden utilizarse en combinación con una cantidad efectiva de un agente dirigido contra; IL-1/IL-1R (por ejemplo, Kineret™), CTLA4-Ig, IL-6 (ver Choy *et al.*, (2002) Ann.Rheum.Dis 61 (suppl 1): 54), IL-8, IL-15, VEGF, IL-17, IL-18 (ver Taylor *et al.* (2001) Curr.Opin.Immunol.13:611-616), anti-ICAM y/o anticuerpos anti-CD4, agentes dirigidos contra un miembro de la familia MMP, por ejemplo, MMP-1, 2, 3 y/o 13. Anticuerpos de la invención también pueden utilizarse en combinación con un agente que extirpa las células conocidas por incluirse en el proceso inflamatorio, por ejemplo, células B positivas CD20 utilizando por ejemplo Mabthera™. Otras

terapias en combinación con anticuerpos de la invención incluyen terapias anti-anglogénicas tales como antagonistas de la Integrin $\alpha v \beta 3$, Kringles "1-5 (ver Sumariwalla P *et al* (2003), *Arthritis Res Ther* 5:R32-R39.), Flt-1 soluble (ver Miotla *et al*, (2000) *Lab. Invest.* 80:1195-1205) o un agente anti-COX-2. Convencionalmente, una composición farmacéutica comprendiendo un kit de partes del anticuerpo de la invención o fragmento de unión de antígeno del mismo junto con tal otro medicamento opcionalmente junto con instrucciones para usarse también se contempla por la presente invención. La invención proporciona además una composición farmacéutica comprendiendo una cantidad terapéuticamente efectiva de anticuerpo terapéutico monoclonal o fragmento de unión de antígeno del mismo como se describe en la presente para usarse en el tratamiento de enfermedades en respuesta a modulación de la interacción entre OSM Sitio II y gp130. También se proporciona una composición farmacéutica comprendiendo una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo terapéutico monoclonal tal anticuerpo comprende una cadena pesada teniendo la secuencia establecida en SEQ.I.D.NO: 11 y una cadena ligera teniendo la secuencia establecida en SEQ.I.D.NO: 12.

También se proporciona una composición farmacéutica comprendiendo una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo terapéutico monoclonal tal anticuerpo comprende una cadena pesada teniendo la secuencia establecida en SEQ.I.D.NO: 50 y una cadena ligera teniendo la secuencia establecida en

SEQ.I.D.NO: 51.

4.1 Composiciones Farmacéuticas para la Modulación de Interacción tanto de Sitio II como Sitio III

5 Un aspecto de la presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento inesperado de que la modulación de la interacción de tanto el Sitio II como Sitio III de hOSM con sus patrones de interacción respectivos (es decir, Sitio II, gp130, para Sitio III OSMR β y/o LIFR, y/o gp130 para unión de una segunda
10 molécula OSM) despliega sinergia en comparación con la modulación de la interacción de cualquiera de estos dos sitios solos.

 La presente invención por lo tanto proporciona un método para modular la interacción entre hOSM y gp130 y LIFR y/o OSMR β tal método comprende proporcionar un antagonista de Sitio II capaz de
15 modular (es decir, inhibir o bloquear) la interacción entre Sitio II de hOSM con gp130 y proporcionar un antagonista de Sitio III capaz de modular (es decir, inhibir o bloquear) la interacción entre Sitio III de hOSM y OSMR y/o LIFR, y gp130 (para unión de una segunda molécula OSM) despliega sinergia en comparación con la modulación
20 de la interacción de cualquiera de estos dos sitios solos.

 La presente invención por lo tanto proporciona un método para modular la interacción entre hOSM y gp130 y LIFR y/o OSMR β tal método comprende proporcionar un antagonista de Sitio II capaz de modular (es decir, inhibir o bloquear) la interacción entre Sitio II de
25 hOSM con gp130 y proporcionar un antagonista de Sitio III capaz de

modular (es decir, inhibir o bloquear) la interacción entre Sitio III de hOSM y OSMR y/o LIFR.

En una modalidad se proporciona una composición farmacéutica comprendiendo un primer agente terapéutico que une específicamente hOSM y modula la interacción entre hOSM y gp130 (un anticuerpo de Sitio II, ejemplos de los cuales se proporcionan por esta especificación) y un segundo anticuerpo terapéutico que une específicamente hOSM y modula la interacción entre hOSM y OSMR y/o LIFR (un anticuerpo de Sitio III, un ejemplo del cual está comercialmente disponible como MAB295, R&D systems). El segundo anticuerpo terapéutico puede reconocerse por su habilidad para modular (es decir, inhibir o bloquear) la interacción entre hOSM y OSMR β y/o LIFR en un ensayo a base de ELISA o como se establece en los ejemplos, es decir, por su habilidad para neutralizar OSM en el ensayo KB de los ejemplos y no inhibir la unión de OSM y gp130 en el ensayo ELISA de los ejemplos. Un anticuerpo de Sitio II puede reconocerse por su habilidad para inhibir unión de OSM en el ensayo ELISA de los ejemplos. Típicamente, ambos, el primero y segundo, anticuerpos terapéuticos son monoclonales. Por supuesto será aparente para aquellos expertos en la materia que no es necesario que la composición farmacéutica comprenda dos entidades antagonistas (por ejemplo, dos entidades de anticuerpo terapéutico) ya que es posible proporcionar, por ejemplo, anticuerpo biespecífico que une específicamente hOSM y modula tanto la interacción de Sitio II como Sitio III con sus patrones de interacción respectivos.

En otra modalidad se proporciona un kit de partes comprendiendo una primer composición farmacéutica comprendiendo un anticuerpo terapéutico que une específicamente hOSM y modula la interacción entre Sitio II de hOSM y gp130 y una segunda
5 composición farmacéutica comprendiendo un anticuerpo terapéutico que une específicamente hOSM y modula la interacción entre Sitio III de hOSM y OSMR β y/o LIFR opcionalmente junto con instrucciones para usarse.

En otra modalidad también se proporciona un método para
10 tratar un paciente humano afligido con una enfermedad o desorden en respuesta a la interacción entre hOSM y sus patrones de interacción (por ejemplo, gp130 y OSMR β y/o LIFR) tal como un desorden o enfermedad inflamatoria (por ejemplo, enfermedades artríticas tal como artritis reumatoide u osteoartritis) tal método
15 comprende administrar simultánea, secuencial o por separado una cantidad terapéuticamente efectiva de un primer antagonista terapéutico (por ejemplo, anticuerpo) que une específicamente hOSM y modula la interacción entre Sitio II de hOSM y gp130 y una cantidad terapéuticamente efectiva de un segundo antagonista (por
20 ejemplo, anticuerpo) que une específicamente hOSM y modula la interacción entre Sitio III de hOSM y OSMR β y/o LIFR.

Por supuesto será aparente para aquellos expertos en la materia al menos un primer antagonista (tal como un anticuerpo) que une gp130 y modula (por ejemplo, bloquea) la interacción entre (a)
25 gp130 y hOSM y también (b) OSMR β y/o LIFR y hOSM puede lograr

el mismo objetivo como se establece arriba.

5. Usos Clínicos

Anticuerpos de la invención pueden utilizarse para tratar una
5 variedad de enfermedades o desórdenes en respuesta al tratamiento
que modula la Interacción entre Sitio II de hOSM y gp130. Se hace
mención particular de enfermedades o desórdenes incluyendo la
producción de niveles patológicos de TNF alfa (es decir, un desorden
o enfermedad mediada por TNF alfa) y aquellas enfermedades o
10 desórdenes caracterizados por la interrupción o destrucción de
cartilago, cartilago articular particular. Como se describe en detalle
supra, anticuerpos de la Invención pueden utilizarse en el
tratamiento de atropatías inflamatorias tal como RA ya sea como una
monoterapia o en combinación con otro tratamiento para tal
15 artropatía. Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para
tratar una forma clínicamente estable de la enfermedad en cuestión o
para prevenir el Inicio en pacientes susceptibles o disminuir o
detener el progreso de la enfermedad hacia significado clínico. Para
el tratamiento de RA, los anticuerpos de la invención pueden
20 utilizarse para prevenir el relapso una vez que la remisión de la
enfermedad ha ocurrido. Donde el paciente se aflige con una forma
intermitente de la enfermedad, los anticuerpos de la invención
pueden utilizarse para prolongar el Intervalo de tiempo entre fases
agudas de la enfermedad. Anticuerpos de la Invención también
25 pueden utilizarse para tratar las manifestaciones extra-articulares de

RA, por ejemplo, síndrome Feltys y/o tratar la formación de placas ateroescleróticas. Para el tratamiento de RA, combinaciones de anticuerpos de la invención junto con medicamentos descritos *supra* pueden utilizarse. Otras enfermedades artríticas que pueden beneficiarse de la administración de un anticuerpo de la invención incluye artritis de Inicio Juvenil, artritis psoriática y espondilitis de anquilosis.

Osteoartritis (OA) es una enfermedad degenerativa, crónica de origen desconocido caracterizada por la pérdida gradual de cartilago articular y función de unión. Se clasifica actualmente en dos grupos. OA primaria puede localizarse o generalizarse, la última encontrada más comúnmente en mujeres post-menopáusicas, con el desarrollo de nodos de Heberdens. OA secundaria tiene una causa subyacente tal como trauma, obesidad, enfermedad de Paget o artritis inflamatoria. La pérdida de cartilago articular con frecuencia se acompaña por cambios óseos hipertróficos con formación de osteofito, espesamiento óseo subcondral e inflamación de la membrana sinovial. De particular interés es la incapacidad afligida a articulaciones que llevan peso tales como la rodilla, manos y cadera. OA es una enfermedad extremadamente debilitante que en lo más severo requiere el reemplazo de la articulación para restaurar la movilidad y detener el dolor de la articulación. Osteoartritis de la cadera se ha dividido en formas hipertróficas y atróficas (ver Solomon L (1976) J Bone Joint Surg 58, 176) en la base de una tendencia del paciente para desarrollar osteofitos grandes: otras articulaciones

pueden responder de manera similar a la presencia de la enfermedad. OA hipertrófica puede asociarse con deposición de cristal de pirofosfato y difundir la hiperostosis esquelética idiopática. Los tratamientos actuales incluyen el uso de analgésicos no opioides
5 tales como acetaminofen, y Tramadol, NSAIDS tal como un inhibidor específico de Cox-2 por ejemplo, celecoxib, rofecoxib, opioide analgésicos y glucosamina y sulfato de condroitin. De esta manera en una modalidad de la invención se proporciona un método para tratar osteoartritis (por ejemplo, primaria o secundaria) en un
10 paciente humano afligido con tal enfermedad, tal método comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo terapéutico o fragmento del mismo de la invención como se describe en la presente. La invención se refiere a una combinación del anticuerpo terapéutico de la invención junto con otro
15 tratamiento particularmente uno o más de los tratamientos de CA arriba descritos.

Psoriasis es una enfermedad de la piel crónica con morbilidad significativa que afecta aproximadamente 2% de la población Caucásica. Aunque para muchos puede ser una enfermedad
20 relativamente suave, puede tener efectos profundos en aquellos afectados. La incapacidad de pacientes con psoriasis se ha mostrado que es similar a aquella de pacientes con angina y acercamientos de los pacientes con falla cardíaca (Finlay *et al*, (1990); Br. J. Dermatol, 123, 751). La forma más común de psoriasis
25 es enfermedad de placa crónica. Esta se presenta como placas de

escala roja bien definidas típicamente distribuidas sobre el cuero cabelludo, espalda inferior y aspectos extensores de los limbos. Las variantes clínicas incluyen psoriasis de gota, sebopsoriasis y formas pustulares de la enfermedad. Una minoría de pacientes también

5 desarrollan artritis inflamatoria seronegativa. Microscópicamente, la piel lesional muestra proliferación incrementada y diferenciación anormal de queratinocitos, infiltración por linfocitos auxiliares T y neutrófilos e inactivación de la vasculatura subcutánea. Estos cambios corresponden a sobreexpresión de factores de crecimiento y

10 sus receptores, citoquinas proinflamatorias y péptidos angiogénicos. Sin embargo, a pesar de la investigación investiga la etiología y patogénesis de esta enfermedad permanece obscura aunque un papel central jugado por células T activas se ha demostrado en sistemas de modelo animal (ver Nickoloff *et al* (1999)

15 Arch.Dermatol.135, 546-552). Los tratamientos corrientes incluyen tratamientos tópicos tales como análogos de Vitamina D, corticoesteroides, ditanol y retinoides tal como gel Tazaroteno. Fototerapia incluye el uso de ultravioleta B o psoralen o ultravioleta A, y láser excimador. Tratamientos retinoides sistémicos incluyen

20 Etreinato y acitretin, isotretinoin, liarozola. Otros tratamientos incluyen metotrexato, hidroxiurea, ciclosporin y antagonistas de calcineurin, 6-tioguanina, azatloprina, sulfasalazina y ésteres de ácido fumárico. Más recientemente, los tratamientos biológicos tales como Ontak™ (Denileukin Diftitox), Zenapax™ (Daclizumab),

25 Basiliximab, anticuerpos anti-CD4, Efalizumab, Alefacept™,

Siplizumab, IDEC-114 y BMS 188667 (CTLA4Ig) han propuesto o demostrado ser útiles en el tratamiento de esta enfermedad. Además, tratamientos alfa anti-TNF tales como Enbrel™ (etanercept), Remicade™ (Infliximab), Humira™ (adalimumab) y/o CDP870 pueden utilizarse como psoriasis (incluyendo variantes de las mismas).

Evidencia para el papel de OSM en lesiones psoriáticas se encuentra en Boifatl *et al* (1998) Arch. Dermatol. Res 290:9, 13. Oncostatin M se secreta de manera espontánea por cultivos de órgano de corto plazo de piel psoriática lesional (Ver Bonifati C *et al* *Ibid*). Además de la activación constitutiva de STAT3, la molécula de señalización principal aguas abajo del receptor OSM, en queratinocitos de ratón resulta en desarrollo espontáneo de lesiones psoriáticas (Ver Sano S *et al* (2005) Nature Medicine 11 :43-49).

Los anticuerpos de la presente invención pueden por lo tanto utilizarse en el tratamiento de psoriasis (placa crónica, gota, sebopsoriasis, pustular, psoriasis asociada con artritis inflamatoria seronegativa), dermatitis atópica/eczema, acné, ictiosis, penfigo, verrugas virales ya sea como una monoterapia o en combinación con estos tratamientos descritos *supra*.

Eritematoso lupus sistémico (SLE) es una enfermedad autoinmune sistémica caracterizada por producción de auto-anticuerpos, formación de complejo inmune y daño de tejido mediado inmunológicamente (Revisado en Rheumatology (2003). Eds Hochberg, Silman, Smolen, Weinblatt and Weisman. Pub.

Mosby.1291-1430). Manifestaciones patológicas incluyen necrosis de fibrinoide, cuerpos de hemotoxilin, lesión vascular, e interrupción de la unión dérmica-epidérmica de piel, artritis inflamatoria y glomerulonefritis. SLE puede presentarse en cualquier edad
5 incluyendo neonatos. Es uno de los desordenes más comunes afectando mujeres en edad de llevar niños, es significativamente más común en mujeres que en hombres y afecta gente de origen Africano significativamente más frecuentemente que Caucásicos. Su
10 incidencia se ha estimado entre 1.8 y 7.6 casos por 100,000 personas-años en EE.UU. SLE se asocia con mortalidad incrementada, principalmente de infección, y complicaciones CNS y renales. Tratamiento de lupus y sus complicaciones se determinan por necesidades individuales del paciente. Fármacos anti-inflamatorios no esteroideos son de una terapia de primer línea
15 importante para síntomas músculo-esqueléticos, señales constitucionales y serositis suave. Anti-malarios (por ejemplo, hidroxicloquina, cloroquina y quinacrina) se utilizan para tratar síntomas músculo-esqueléticos y señales constitucionales que son refracatorias para no esteroideos y esteroides de baja dosis. La
20 mayoría de las manifestaciones clínicas de SLE responden a tratamiento con esteroides pero los efectos secundarios de estos fármacos pueden limitar tanto la dosis como duración de tratamiento. Los fármacos inmunosupresores, notablemente Azatioprina, pueden utilizarse para enfermedad más severa. Recientemente, el
25 tratamiento con la célula B eliminado el anticuerpo Rituxan ha

mostrado resultados prometedores en SLE (Revisado en Looney RJ *et al* (2005) *Curr Dir Autoimmune* 8:193-205). Oncostatin M se ha encontrado en niveles elevados en suero para pacientes SLE y los niveles muestran correlacionar con actividad de enfermedad (Ver 5 Robak E *et al* (1997) *Eur Cytokine Netw* 8: 281-286). De esta manera, la invención se refiere al uso de anticuerpos de la invención en el tratamiento (ya sea como una monoterapia o en combinación con uno o más de los tratamientos SLE actuales detallados arriba) de SLE.

10 Esclerosis sistémicas (SS) que incluye variantes de escleroderma y fenómeno de Raynaud es un desorden generalizado de la piel y órganos internos. Se caracteriza por acumulación de matriz extracelular en la piel y víscera. Oncostatin M puede estimular acumulación de matriz extracelular excesiva (Ver Bamber B 15 *et al* (1997) *J Mol Med Abstract Vol* 76: 61-69). Oncostatin M se produce espontáneamente de células mononucleares cultivadas de pacientes con esclerosis sistémica (Ver Hasegawa M *et al* (1999) *Rheumatology (Oxford)* 38: 612-617) y se encuentra en fluido de lavado broncoalveolar de fibrosis pulmonar en escleroderma 20 (Revisado en Atama SP and White B (2003) *Cytokine growth Factor Rev* 14: 537-550). De esta manera, la invención se refiere al uso de anticuerpos de la invención en el tratamiento de SS y variantes de los mismos como una monoterapia o en combinación con otro medicamento.

25 OSM se ha detectado en el fluido de lavado broncoalveolar de

pacientes durante lesión de pulmón aguda, particularmente en casos de neumonía (Tamura S *et al* (2002) *Develop Dyman* 225:327-331). Los neutrófilos parecen ser la fuente celular de OSM en estos pacientes, y concentraciones de OSM en el fluido BAL se correlacionan con números PMN. Ya que los neutrófilos son una fuente de OSM, y en la activación secretan OSM, es probable que OSM estará presente en los pulmones de cualquier paciente en donde neutrófilos son un componente significativo de inflamación de vías respiratorias, incluyendo COPD y asma severo. Además, OSM también se expresa por eosinófilos de tejido (ratón) y podría ser una fuente significativa de OSM durante inflamación (ver Tamura *ibid*).

La sobreexpresión de OSM en vías respiratorias de ratón utilizando un vector adenoviral indujo la inflamación eosinofílica profunda y deposición de matriz (ver Langdon C *et al* (2003) *J.Immunol.* 170:548-555 y también expresión de TIMP-1 (ver Kerr C *et al* (1999) *J. Interfer. Cytokine Res.*, 19:1 195-1205. Exposición de fibroblastos de pulmón de ratón a OSM estimuló la liberación de eotaxin, un quimioatrayente de eosinófilo potente. Además, OSM estimula la proliferación, induce producción de colágeno y previene la apoptosis de fibroblastos de pulmón de humano (ver Scaffidi, A.K. *et al* (2002) *Brit.J.Pharmacol* 136:793-801). Aunque los mecanismos más allá de estas observaciones son desconocidos, la deposición de matriz podría, en parte, ser el resultado de una fuerte suprarregulación específica de síntesis de inhibidor de proteínaza $\alpha 1$ (ver Cichy, J. *et al* (1998) *Biochem.J* 329:335-339). OSM también se

ha encontrado que promueve proliferación de célula germinal dependiente de fibroblasto y un incremento marcado en contenido de histamina (ver Gyotoku E et al (2001) Arch. Dermatol. Res 293:508-514). La instalación directa de OSM en pulmones de rata aislados indujo secreción de IL-6 sostenida y rápida (ver Li, H. L. (2002) J. Drug Targ 10:55-62). De esta manera, la presente invención se refiere al uso de anticuerpos de la invención (ya sea como una monoterapia o en combinación con otro medicamento) en el tratamiento de enfermedades de pulmón inflamatorias tal como asma y COPD (desorden pulmonar obstructivo crónico).

OSM se ha detectado en los cerebros de pacientes con esclerosis múltiple (MS), donde se localiza microglia, astrositos y leucocitos infiltrantes (ver Ruprecht K et al Journal of Neuropathology & Experimental Neurology. 60(11): 1087-98, 2001 Nov). OSM induce secreción de IL-6 y MCP-1 de células endoteliales cerebrales, y adición de $TNF\alpha$ con OSM causa una respuesta sinérgica. OSM también induce la expresión de ICAM1 en células endoteliales microvasculares cerebrales, que podrían aumentar la infiltración de leucocito en tejido cerebral (Ruprecht K et al ibid). Además de promover la inflamación en el cerebro, OSM puede contribuir directamente a pérdida de neurona. Los sobrenadantes de monocito de paciente con VIH causa profunda inhibición de crecimiento de neuroblasto también muerte celular neuronal, y el mediador de estos efectos se muestra que es Oncostatin M. Ya que muchos pacientes con VIH sufren de atrofia

cerebral causada por pérdida de célula neuronal. OSM puede ser un mediador de esta patología. Claramente, OSM podría también jugar un papel en otras enfermedades CNS donde la pérdida neuronal ocurre. De manera interesante en enfermedad de Alzheimer (AD),
5 antiqumotripsin $\alpha 1$ (ACT) es una de las proteínas asociadas amiloides y su expresión es dramáticamente incrementada en áreas de enfermedad, tal vez facilitando deposición de proteínas anormales en placas amiloides y enredos neurofibrilares. OSM, que se conoce por secretarse tanto por células T activadas de infiltración como
10 monocitos, y microglia, es un inductor potente de ACT, y podría por lo tanto contribuir a la patología AD (ver Kordula T et al (1998) J Biol.Chem. 273:4112-4118 and Kordula T Journal of Neuroscience. 20(20): 7510-6, 2000).

El trabajo por Tamura *et al* sugiere que OSM puede incluirse en
15 el desarrollo y mantenimiento de dolor neuroático (ver Tamura S. *et al* (2003) Eur.J.Neurosci. 17:2287-2298). Sus estudios revelaron un subconjunto de neuronas sensoriales nociceptivas que expresan el receptor OSM β . Todas las neuronas OSM β R +ve también expresaron receptores VR1 y P2X3, que se han mostrado que son
20 cruciales para desarrollo tanto dolor neuroático como inflamatorio (ver Jarvis M. F. et al (2002) PNAS 99:179-184 y Walker K.M *et al* (2003) J. Pharmacol. Exp. Ther 304, 56-62). Además, los ratones OSM-/- tienen respuestas nocivas reducidas a dolor químico, térmico, visceral o mecánico, correlacionándose con una reducción
25 de neuronas pequeñas VR1^{+/+} P2X3^{+/+} (ver Morikawa, Y. *et al* (2004):

J Neurosci 24, 1941-1947).

De esta manera, la presente invención también se refiere al uso (ya sea como una monoterapia o en combinación con otro medicamento) de anticuerpos de la invención en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central o desordenes tal como se describe *supra* tales como esclerosis múltiple (MS), enfermedad de Alzheimer (AD) y otras demencias y además se refiere al uso en el tratamiento de dolor, particularmente dolor inflamatorio y/o neuropático.

10 OSM se encuentra en macrófagos de tejido en lesiones ateroescleróticas (ver Modur V. *et al* J.Clin Invest. 100, 158-168) y como un factor angiogénico puede promover la neovascularización característica de placas ateroescleróticas que se piensa que contribuye a fragilidad de la pared del vaso. Así como también la
15 respuesta angiogénica, OSM causa inducción de tanto secreción de IL-6 en células endoteliales, donde sus efectos son aditivos o sinérgicos con IL-1 y TNF α respectivamente, y la expresión COX-2 (ver Brown JT *et al* (1991) J. Immunol.147:2175-2180). La inducción de la célula endotelial de COX2 es necesaria para las propiedades
20 angiogénicas de OSM (ver Brown JT *et al*, *ibid*). Sin embargo, OSM también induce la expresión de otros factores angiogénicos en células endoteliales; VEGF (Vasse, M *et al* (1999) Arterioscler Thromb Vase Biol. 19:1835-1842) y bFGF (Wijelahn E.S. *et al* (1997) J.Cell Sci 110:871-879) De manera interesante, células endoteliales
25 humanas tienen aproximadamente 10-20 veces más de densidad de

receptor OOSM que otras células (ver Modur V. *et al* Ibid).

Además de los efectos en endotelio, OSM también induce la expresión de IL-6 y COX-2 en células musculares lisas vasculares (VSMC) así como también causando cambios de golpeteo en morfología celular (Bernard C. *et al* (1999) Circ.Res. 85:1124-1131). Los depósitos se encuentran usualmente en lesiones ateroscleróticas avanzadas donde los macrófagos son la célula inflamatoria predominante. Los macrófagos son una fuente principal de OSM y de manera interesante, esta citoquina puede inducir la fosfatasa alcalina tipo ósea y deposición de calcio en cultivos VSMC (Shioi A. *et al* (2002) Circ.Res. 91:9-16). OSM también respectivamente induce y suprime factor de tejido (TF) y la secreción de inhibidor de trayectoria TF (TFPI) de VSMCs, resultando en una actividad procoagulante potente en sobrenadantes de cultivo VSMC (Mirshahi F. *et al* (2002) Blood Coag.Fibrinol. 13:449-455). Además, OSM afecta el factor von-Willebrand, activador de plasminogen tipo tejido y secreción PAI-1 de células endoteliales en una manera que sugiere que "OSM podría jugar un papel clave en el desarrollo de otras lesiones ateroscleróticas" (Portau J *et al* (1998) Blood Coag.Fibrinol. 9,609-615).

Los niveles de plasma de fibrinogen son un factor de riesgo vascular importante y OSM es un inductor potente de secreción de fibronogen en estudios con una estirpe de célula de hepatoma (Vasse.M *et al* (1996) Haernostasis 26, Suppl 4, 331-339). Sin embargo, a alta concentraciones (50 ng/ml) OSM también incrementó

la expresión del receptor LDL humano (Liu *et al* (2003) *Aterio.Thromb.Vasc.Biol.*23:90-96). Finalmente, OSM promueve esterificación de colesterol en macrófagos de monocito J774, y pueden por lo tanto contribuir a este proceso durante desarrollo de
5 célula Foam en lesiones ateroscleróticas (Mazlure C *et al* (1996) *Biochem. Biophys Acta* 1300, 30-34).

De esta manera, la presente invención se refiere al uso de anticuerpos de la invención en el tratamiento de enfermedades o desórdenes del sistema cardiovascular. También se contempla el
10 uso de anticuerpos de la invención en el tratamiento de aterosclerosis y enfermedades de origen celular endotelial. Se contempla además el uso de anticuerpos de la invención para tratar pacientes afligidos con VIH, particularmente para tratar condiciones resultantes de infección con virus tal como sarcoma de Kaposi.

15 Los anticuerpos de la invención también pueden utilizarse en enfermedades de regulación de ciclo celular por ejemplo, cáncer (tal como cáncer de próstata), mieloma.

Aunque la presente invención se ha descrito principalmente en relación al tratamiento de enfermedades o desórdenes de humano, la
20 presente invención puede también tener aplicaciones en el tratamiento de enfermedades similares o desórdenes en mamíferos no humanos.

Tabla A

	Proteína o polinucleótido (PN)	Anticuerpo 15E10	Anticuerpo 10D3
	CDRH1	SEQ.I.D.NO:1	SEQ.I.D.NO:40
	CDRH2	SEQ.I.D.NO:2	SEQ.I.D.NO:41
	CDRH3	SEQ.I.D.NO:3	SEQ.I.D.NO:42
	CDRL1	SEQ.I.D.NO:4	SEQ.I.D.NO:43
	CDRL2	SEQ.I.D.NO:5	SEQ.I.D.NO:44
5	CDRL3	SEQ.I.D.NO:6	SEQ.I.D.NO:45
	Domínio V _H (murino)	SEQ.I.D.NO:7	SEQ.I.D.NO:46
	Domínio V _L (murino)	SEQ.I.D.NO:8	SEQ.I.D.NO:47
	Domínio V _H (humanizado, B3)	SEQ.I.D.NO:9	SEQ.I.D.NO:48
	Domínio V _L (humanizado, L2)	SEQ.I.D.NO:10	SEQ.I.D.NO:49
	Cadena pesada (humanizada)	SEQ.I.D.NO:11	SEQ.I.D.NO:50
	Cadena ligera (humanizada)	SEQ.I.D.NO:12	SEQ.I.D.NO:51
	Domínio V _H (murino, PN)	SEQ.I.D.NO:15	SEQ.I.D.NO:52
	Domínio V _L (murino, PN)	SEQ.I.D.NO:16	SEQ.I.D.NO:53
	Domínio V _H (humanizado, PN, B3)	SEQ.I.D.NO:17	SEQ.I.D.NO:54
	Domínio V _L (humanizado, PN, L2)	SEQ.I.D.NO:18	SEQ.I.D.NO:55
	Cadena pesada (humanizada, PN)	SEQ.I.D.NO:19	SEQ.I.D.NO:56
10	Cadena ligera (humanizada, PN)	SEQ.I.D.NO:20	SEQ.I.D.NO:57
	Domínio V _H (B4, humanizado)	SEQ.I.D.NO:21	N/A
	Cadena pesada (humanizada, Fc mutada)	SEQ.I.D.NO:61	N/A
	Cadena pesada (humanizada, Fc mutada, PN)	SEQ.I.D.NO:62	N/A

La presente invención se describirá ahora a manera de ejemplo solamente. Las reivindicaciones anexas pueden incluir una generalización de uno o más de los siguientes ejemplos.

Ejemplificación

Ejemplos 1 a 6 se refieren a la producción y formación de anticuerpo 15E10. Ejemplo 7 se refiere a la producción y formación de anticuerpo 10D3.

1. Generación de Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se producen por células de hibridoma generalmente de acuerdo con el método establecido en E Harlow and D Lane, Antibodies a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. El resultado de la fusión de células de

mieloma de ratón con B-linfocitos de ratones inmunizados con el antígeno objetivo. La célula hibridoma se inmortaliza por el patrón de fusión de mieloma mientras la capacidad para producir anticuerpos se proporciona por el linfocito B.

- 5 Cuatro ratones SJL se inmunizan por inyección intraperitoneal con OSM humano glicosilado (hOSM) producido en células CHO suspendidas en adyuvante RIBI (Sigma). Los ratones se inyectan con hOSM solamente después de 2 semanas entonces con hOSM neutralizado con anticuerpo monoclonal anti-sitio III (OM4/11.17;
- 10 OSM:Mab 1:1.5 p:p) para activar la respuesta inmune hacia el Sitio II después de un adicional de 2 semanas de nuevo con el complejo OSM-MAb después de otras 2.5 semanas y finalmente con OSM solamente después de 5 semanas. Tres meses después de inmunización inicial, los bazo se remueven y linfocitos B se
- 15 fusionan con células de mieloma de ratón derivadas de células P3X utilizando PEG1500 (Boehringer) para generar hibridomas. Las estirpes de célula de hibridoma individuales se clonan al limitar la dilución (E Harlow y D Lane). Las cavidades conteniendo colonias únicas se identifican microscópicamente y los sobrenadantes se
- 20 prueban para actividad. Las células de la mayoría de los clones activos se expanden para criopreservación, producción de anticuerpo, etc. Selección de anticuerpo OSM inicial fue en la base de especificidad y potencia en neutralizar OSM glicosilado humano valorando en ELISA Inhibición gp130 y el ensayo de célula KB (ver
- 25 abajo) el último proporcionando una verificación de especificidad
-

OSM. Después de identificación de anticuerpos de suficiente potencia y especificidad correcta, criterios de selección adicional se aplican:

1. reactividad cruzada contra OSM de mono cinomólgo
 - 5 2. mantenimiento de actividad contra OSM de humano en la presencia de suero AB de humano agrupado
 3. mantenimiento de actividad contra una biblioteca OSM de neutrófilo de humano y contra OSM derivado de célula de fluido sinovial RA
- 10 1920 hibridomas se seleccionan en ELISA de Inhibición gp130. 43 dieron más de 50% inhibición y los experimentos de respuesta de dosis limitados se hacen en 15 de los cuales 6 se seleccionan para estudio adicional. Estos se subclonan y clones maestros se seleccionan.
- 15 Dos anticuerpos, clon 15E10 y clon 10D3 (ver ejemplo 7) se seleccionan en la base de potencia. Anticuerpo de murino 15E10 fue consistentemente más potente en ELISA de inhibición gp130 pero tuvo potencia similar a 10D3 en el ensayo de célula KB cuando OSM de humano fue el antígeno objetivo. Sin embargo, anticuerpo de
- 20 murino 15E10 fue mucho más potente que 10D3 contra OSM de mono cinomólgo en ambos ensayos.

2. Clonación de Regiones Variables de Clon 15E10

ARN total se extrae del clon de células de hibridoma 15E10 y el

25 cADN de los dominios variables ligeros y pesados se produce por

transcripción inversa utilizando cebadores específicos para la secuencia guía de murino y las regiones constantes de anticuerpo de acuerdo con el isotipo predeterminado (IgG2a/ κ). El cADN de los dominios ligeros y pesados variables se clona entonces en el vector pCR2.1 para secuenciación.

2.1 Extracción de ARN

ARN total se extrae de pastillas de 10^6 células de clon de hibridoma 15E10 utilizando Sistema de Aislamiento de ARN Total SV de Promega de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

2.2 Transcripción Inversa

ARN se transcribe de manera Inversa para producir cADN de los dominios ligeros y pesados variables utilizando cebadores específicos para las secuencias guía de murino y regiones constantes IgG γ 2a/ κ de murino. La mezcla de cebadores utilizada se establece en Jones ST y Bendig MM Bio/technology 9:88-89 (1991).

Los grupos de cebadores delanteros de secuencia guía V_H y V_L de murino se preparan a $50\mu M$. Las soluciones de los cebadores inversos de región constante κ y γ 2a de murino también se preparan a $50\mu M$.

2.3 Transcripción Inversa (RT-PCR)

La transcripción inversa del ARN codificando las regiones pesadas y ligeras variables se lleva a cabo en duplicados utilizando

el sistema Access RT-PCR de Promega de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cebadores delanteros e inversos V_H y V_L fueron como se describe arriba.

5 **3. Clonación de Producto PCR de 2.3**

3.1 Purificación de Gel

Los productos de RT-PCR ($2xV_H$ y $2xV_L$) se cargan en solución de carga de gel en un gel de agarosa al 1% preparativo conteniendo 0.01% bromuro de etidio y corre en un regulador TAE a 100V por 1
10 hora y las bandas de región V se cortan. Una escala de ADN 100bp también corre en el gel para permitir identificación de las bandas V_H y V_L .

Los fragmentos de ADN se extraen y purifican del gel utilizando el kit de extracción QIAquick TMGel de Qiagen de acuerdo a las
15 instrucciones del fabricante.

3.2 Ligación

Los fragmentos RT-PCR purificados ($2xV_H$ y $2xV_L$) se clonan en el vector pCR2.1 utilizando un kit de clonación TA de Invitrogen de
20 acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.3 Transformación

Los plásmidos ligados se transforman en células TOP10F' de acuerdo a instrucciones del kit de clonación TA. 50 μ l y 200 μ l de
25 células transformadas se difunden en placas L-ágar conteniendo

100 μ g/ml ampicilina y revisten con 8 μ l de 500mM solución IPTG y 16 μ l de 50mg/ml solución X-Gal en DMF. Las placas se incuban durante la noche a 37°C.

5 **3.4 Secuenciación**

5 colonias blancas se cultivan durante la noche a 37°C en 5ml medio LB complementado con 100 μ g/ml ampicilina.

Los plásmidos pCR2.1 conteniendo dominios V_H y V_L 15E10 se extraen y purifican utilizando el kit QIAGEN QIAprep Spin Miniprep de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los dominios V_H y V_L se secuencian utilizando cebadores T7, M13 para y M13 rev.

Secuencia de aminoácidos de dominio V_H 15E10 (consenso de 10 clones de 2 reacciones RT-PCR): SEQ.I.D.NO:7.

Secuencia de aminoácidos de dominio V_L 15E10 (consenso de 10 clones de 2 reacciones RT-PCR): SEQ.I.D.NO:8.

4. Anticuerpo Quimérico

Un anticuerpo quimérico consistiendo de regiones V de murino de origen de 3.4 injertado sobre regiones C tipo silvestre IgG1/k de humano se diseña para conformar la clonación de las regiones V de murino correctas y también para utilizarse como una referencia cuando se prueban construcciones humanizadas. El anticuerpo quimérico se expresa en células CHO, purifica y prueba para afinidad en el sitio II OSM en ELISA de inhibición gp130 y ensayo de célula KB (ver abajo).

Las regiones V de murino clonadas se amplifican por PCR para introducir sitios de restricción requeridos para clonación en vectores de expresión de mamífero RId y RIn. Sitios Hind III y Spe I se diseñan para estructurar el dominio V_H y permitir la clonación en un vector RId modificado conteniendo la región C tipo silvestre γ1. Los sitios Hind III y BsiW I se diseñan para estructurar el dominio V_L y permitir la clonación en un vector RIn modificado conteniendo la región C κ de humano.

10 **4.1 Amplificación PCR**

cebador delantero V_H:

5'-GAT **GAA GCT TGC CAC** CAT GGC TGT CCT AGG GCT ACT C-3'
(SEQ.I.D.NO:22)

El sitio de restricción Hind III se subraya y secuencia Kozak en negritas.

cebador inverso V_H: 5'-GAT **GGA CTA GTG** TCC CTG TGC CCC AGA C-3' (SEQ.I.D.NO:23)

El sitio de restricción Spe I se subraya.

cebador delantero V_L:

20 5'-GAT **GAA GCT TGC CAC** CAT GGA TTT TCA GGT GCA GAT T-3'
(SEQ.I.D.NO:24)

El sitio de restricción Hind III se subraya y secuencia Kozak en negritas.

cebador Inverso V_L:

25 5'-GAT **GCG TAC GTT** TGA TTT CCA ACT TTG TCC C-3'

(SEQ.I.D.NO:25)

El sitio de restricción BsiW I se subraya

5	Reacción PCR:	agua	66µl
		10x regulador	10µl
		dNTP (2mM)	10µl
		cebador 1 (5µM)	4µl
		cebador 2 (5µM)	4µl
		AmpliTaq polimerasa	2µl
		plásmido purificado	4µl
10		vol total	100µl
Cebador 1: cebador delantero V _H o V _L			
Cebador 2: cebador inverso V _H o V _L			
Plásmido purificado: plásmido V _H o V _L pCR2.1 purificado por Qiagen			
Minipreps (diluido 200x)			
15	Ciclo PCR:	1-95°C por 4min	
		2- 95°C por 1min	
		3- 55°C por 1min	
		4- 72°C por 1min	
		5- 72°C por 7min	
20		etapas 2 a 4: se repiten 30 veces	

4.2 Clonación en Vectores de Expresión de Mamífero

Los productos PCR se purifican utilizando el kit de Purificación MinElute PCR de Qiagen de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

4.2.1 Digestiones de Restricción

Producto PCR V_H y vector de expresión de mamífero hCγ1wt se diguieren Hind III-Spe I:

	regulador 10x (NERregulador2)	5μl
5	BSA 100x (NEB)	0.5μl
	ADN	5μl
	Hind III (Promega)	2μl
	Spe I (NEB)	2μl
	agua	35.5μl
10	vol total	50μl

ADN: producto PCR V_H purificado o vector RId hCγ1wt (a 0.25mg/ml) Incubado a 2h a 37°C.

El producto PCR V_L y vector de expresión de mamífero RIn hCκ se digieren Hind MI-BsiW I:

15	regulador 10x (NERregulador2)	5μl
	ADN	5μl
	Hind III (Promega)	2μl
	agua	38μl
	vol total	50μl

20 ADN: producto PCR V_L purificado de vector RIn hCκ (a 0.25mg/ml) Incubado a 2h a 37°C.

2μl de BsiW I (NEB) se agrega e incuba 2h a 55°C.

4.2.2 Purificación de Gel

25 Los productos de digestiones de restricción se cargan en

solución de carga de gel en un gel de agarosa al 1% preparativo conteniendo 0.01% bromuro de etidio y corre en regulador TAE a 100V por 1 hora y el vector Rld y Rln así como también bandas de fragmento PCR V_H y V_L se cortan. Una escala ADN 100bp también corre en el gel para permitir la identificación de las bandas de vector, V_H y V_L. El ADN se extrae y purifica de gel utilizando kit de extracción QIAquick Gel de QIAGEN de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

10 **4.2.3 Ligación**

El fragmento PCR V_H Hind III-Spe I digerido se liga en el vector Rld hCy1wt Hind III-Spe I digerido.

El fragmento PCR V_L Hind III-BsiW I digerido se liga en el vector Rln hCκ Hind III-BsiW I digerido.

15 La ligación se lleva a cabo utilizando Sistema de Ligación de ADN Rápido LigaFast de Promega de acuerdo a las instrucciones del fabricante proporcionado:

V_H: vector: Rld hCy1wt Hind III-Spe I digerido

inserción: fragmento PCR V_H Hind III-Spe I digerido

20 V_L: vector: Rln hCκ Hind III-BsiW I digerido

inserción: fragmento PCR V_L Hind III-BsiW I digerido.

4.2.4 Transformación

Los productos ligados se transforman en células competentes

25 DH5α:

Frascos de 200 μ l DH5 α se congelan en hielo.

Alícuotas de 50 μ l se preparan en tubos de transformación.

2 μ l de mezcla de ligación se agrega y mezcla gentilmente con una punta de pipeta seguida por incubación por 30min en hielo.

- 5 La mezcla se incuba por 45 seg a 42°C sin agitación.

Esto se transfiere a hielo por 2min.

450 μ l medio SOC se agrega y los tubos se incuban por 1 h a 37°C en Incubador agitador.

100 μ l de cultivo se difunde sobre placas L-ágar complementadas con

- 10 100 μ g/ml ampicilina e incuban durante la noche a 37°C.

4.2.5 Secuenciación

Clones V_H y V_L se cultivan durante la noche a 37°C en 5ml medio LB complementando con 100 μ g/ml ampicilina.

- 15 Los plásmidos Rld y Rin conteniendo dominios V_H y V_L respectivamente se extraen y purifican utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La región V_H se secuencia utilizando cebadores delanteros en el vector Rld y secuencia de señal y cebador inverso en la región

- 20 C γ 1 de humano.

La región V_L se secuencia utilizando cebadores delanteros en el vector Rin y secuencia de señal y cebador inverso en la región C κ de humano.

Los clones con las secuencias V_H y V_L se identifican y los

- 25 plásmidos se preparan para expresión en células CHO.

4.3 Expresión de Anticuerpo Quimérico en Células CHO

Los plásmidos RId y RIn conteniendo dominios V_H y V_L 15E10 respectivamente se co-transfectan transitoriamente en células CHO y se expresan. El anticuerpo quimérico producido se purifica de sobrenadante de cultivo celular por cromatografía de afinidad o Sepharose de rProteína A y su afinidad para OSM se evalúa en ELISA de Inhibición gp130 y ensayo de célula KB (ver abajo).

4.3.1 Purificación de Plásmido

10 Células DH5 α conteniendo plásmidos RId-15E10V $_H$ y RIn-15E10V $_L$ se cultivan en 5ml de medio LB complementado con 100 μ g/ml ampicilina por 8h a 37°C en un incubador agitador.

200ml de medio LB complementando con 100 μ g/ml ampicilina se inocula con 1 ml de cultivo de día e incuba durante la noche a 15 37°C en un incubador agitador.

Los plásmidos se extraen y purifican utilizando el kit QIAfilter Plasmid Maxi de Qiagen de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La pastilla de etanol se resuspende en 200 μ l regulador TE y concentración de plásmido se mide por absorbencia a 260nm 20 después de dilución 100 veces de solución de reserva.

4.3.2 Transfección

Las células CHO se cultivan para confluencia en MEM de Dulbecco con medio Glutamax-1 (DMEM) complementando con Suero de Bovino Fetal Ultra Bajo y 1% Penicillin-Streptomycin en 4x175cm² 25

matraces de cultivo de tejido BD Falcon a 37°C.

Para cada matraz, en un tubo Falcon de 50 ml, se agregan y mezclan los siguientes:

8ml Optimem 1 con Glutamax-1

5 20µg RId-1510V_H plásmido purificado

20µg RIn-1510V_L plásmido purificado

20µg Reactivo de Transfección TransFast bajo vórtice

La mezcla se incuba por 10-15 min a temperatura ambiente (RT).

10 Medio DMEM se remueve de matraz después la mezcla se coloca en vórtice y se agrega a matraz.

La mezcla se incuba a 37°C por 1h.

32ml Optimem se agrega al matraz e incuban a 37°C por 48-72h.

15

4.3.3 Purificación de anticuerpo gulférico

Medio de todos los matraces de 172cm² se agrupan y centrifugan a 1500rpm por 3min en un MSE Mistral 2000 y sobrenadante pasa a través de un Sistema de Filtro de 500mL

20 0.22µm CA.

El anticuerpo se purifica de sobrenadante clarificado en un Amersham Biosciences Akta Explorer utilizando software Unicorn software.

La columna utilizada fue una 1ml HiTrap rProteína A Sepharose
25 FF.

La velocidad de flujo fue 1 ml/min.

La columna se equilibra con 10CV de PBS de Dulbecco después se carga con sobrenadante clarificado a través de bomba A.

La columna se enjuaga con 20CV de PBS de Dulbecco, bomba
5 A se enjuaga para desperdicio y un 10CV adicional de PBS de Dulbecco se pasa a través de la columna para asegurar despeje completo de sobrenadante.

El anticuerpo se eluye con 10CV de Regulador de Elución IgG ImmunoPure (Pierce) y recolecta en fracciones de 1ml conteniendo
10 100µl de 1M Trizma-HCl pH8.0 regulador de neutralización.

La columna se reequilibra con 5CV de PBS de Dulbecco.

El anticuerpo en fracciones de eluido se cuantifica al leer la absorbancia a 280nm contra una solución vacía conteniendo 10 volúmenes de Regulador de Elución IgG ImmunoPure + 1 volumen de
15 1M Trizma-HCl pH8.0 y fracciones con cantidades suficientes de anticuerpo puro se agrupan y almacenan en alícuotas de 100µl a -20°C.

4.4 Análisis de Anticuerpo Químérico

20 Los anticuerpos químicos 15E10 y 10D3 (ver abajo) purificados se analizan en ELISA de inhibición gp130 y ensayo de célula KB para su potencia en neutralizar tanto OSM humano como cinomolgo (hOSM y cOSM). Los procedimientos para ELISA de Inhibición gp130 y ensayo de célula KB se establecen abajo.

Tabla 1
Valores IC50 (µG/ML) para Anticuerpos Quiméricos y de Murino
15E10 y 10D3

5

	ELISA gp130	Ensayo de célula KB
15E10 murino	0.059	0.195
15E10 quimérico	0.036	0.110
10D3 murino	0.107	0.114
10D3 quimérico	0.057	0.107

Ambos anticuerpos quiméricos 15E10 y 10D3 neutralizan hOSM y cOSM en ELISA de inhibición gp130 (FIG. 2) y ensayo de célula KB (FIG. 3). 15E10 quimérico tiene una afinidad más alta para OSM cInomólgo que 10D3 quimérico como se observa con el anticuerpo de murino de origen. Ambos anticuerpos quiméricos tienen perfiles de curva y valores IC50 similares a los anticuerpos de murino de origen (Tabla 1). La secuencia de aminoácidos y una secuencia cADN para OSM cInomólgo (cOSM) se establece como SEQ.I.D.NO:63 y 64 respectivamente;

15

SEQ.I.D.N: 63:

MGVPLTRRTLLSLILALLFPSMASMAAMGSCSKEYRMLLGQLQKQT
DLMQDTSRLDPYIRIQGLDIPKLREHCRESPGAFPSEETLRGLGR
RGFLQTLNATLGCVLHRLADLEQHLPKAQDLERSGLNIEDLEKLQM
ARNVLGLRNNVYCMQLLDNSDMTEPTKAGRGTPQPPTPTPTSD
VPQRKLEGCSFLRGYHRFMHSVGRIFSKWGESPNNRSRRHSPHQAL
RKGVRRTTRPSRKGNRLMPRGQLPR

20

25

SEQ.I.D.NO: 64:

5 ATGGGGGTACCGCTCACACGGAGGACGCTGCTCAGTCTGATCCTTG
 CACTCCTGTTTCCAAGCATGGCAAGCS1TGGCGGCTATGGGCAGCT
 GCTCGAAAGAGTACCGCATGCTCCTTGGCCAGCTCCAGAAGCAGAC
 AGATCTCATGCAGGACACCAGCAGGCTCCTGGACCCCTATATACGT
 ATCCAAGGCCTGGATATTCTAAACTGAGAGAGCACTGCAGAGAGA
 GCCCTGGGGCCTTCCCCAGCGAGGAGACCCTGAGGGGGCTGGGC
 AGGCGGGGCTTCCTACAGACGCTCAATGCCACACTGGGCTGCGTC
 CTGCACAGACTGGCCGACTTAGAGCAGCATCTCCCCAAGGCCAG
 GACTTGGAGAGGTCTGGGCTGAACATAGAGGACTTAGAGAAGCTGC
 AGATGGCGAGGCCGAATGTCCTCGGGCTCAGGAACAACGTCTACT
 GCATGGCCCAGCTGCTGGACAACTCAGACATGACTGAGCCCACGAA
 GGCCGGCCGGGGGACCCCTCAGCCGCCACCCCCACCCCTACCTC
 AGATGTTTTTTCAGCGCAAGCTGGAGGGCTGCAGTTTCCTGCGTGGC
 TACCATCGCTTCATGCACTCAGTGGGGCGGATCTTCAGCAAGTGGG
 GGGAGAGCCCGAACCGGAGCCGGAGACACAGCCCCCACCAGGCC
 10 CTGCGGAAGGGGGTGGCGCAGGACGAGACCCTCCAGGAAAGGCAAT
 AGACTCATGCCAGGGGACAGCTGCCCCGGTAG

Estos resultados confirman que las regiones variables 15E10
 correctas se han clonado exitosamente para producir un anticuerpo
 quimérico de unión de antígeno capaz de unir tanto OSM de humano
 15 y cinomólgo sitio II. Los dominios pesados y ligeros variables 15E10
 pueden ahora humanizarse.

5.1.1 Investigación de la Base de Datos de Ratón

15 15 secuencias de ratón con la homología más alta para la
 20 secuencia de aminoácidos V_H 15E10 y 10 secuencias de ratón con la
 homología más alta para la secuencia de aminoácidos V_L se
 identifican al buscar una base de datos de péptido.

La secuencia de aminoácidos V_H 15E10 se compara con todas
 las 15 secuencias de ratón de la búsqueda de base de datos y los
 25 siguientes residuos de estructura se identifican como significativos:

Posición	15E10 V _H	ratón	ocurrencia
75	R	K	15/15
105	T	Q	14/15

La posición es de acuerdo al sistema de numeración de Kabat *et al, supra*. La secuencia de aminoácidos V_L 15E10 se compara con las 10 secuencias de ratón de la búsqueda de base de datos y los siguientes residuos de estructura se identifican como significativos:

Posición	15E10 V _L	ratón	ocurrencia
9	T	A	8/10
10 38	E	Q	10/10
49	E	Y	10/10
60	A	V	10/10

5.1.2 Búsqueda de la Base de Datos de Humano

Las secuencias de estructura de humano con la homología más alta a estructuras V_H y V_L 15E10 se identifican utilizando EasyBlast en una base de datos de péptido.

Dos conjuntos de secuencias de humano se identifican para V_H 15E10:

Grupo A del cual la siguiente estructura se selecciona para humanización:

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYSWSWIRQPPGKGLEWI
GYIYYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
SPSSGSYYYYYGMDVWGQGTTVTVSs (SEQ.I.D.NO:26)

Las CDRs se subrayan.

Y

Grupo B para el cual la siguiente se selecciona para humanización:

QVQLVESGGGWQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEW

5 VAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY
CARDLGGPLYWYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ.I.D.NO:27)

Las CDRs se subrayan

Los siguientes residuos de estructura se identifican como potencialmente importantes para recuperar afinidad y pueden

10 necesitarse para mutarse de nuevo:

Posición (Kabat#)		15E10 V _H	Grupo A	Grupo B
	27	F	G	F
	28	S	S	T
	29	L	I	F
15	30	T	S	S
	48	L	I	V
	49	G	G	A
	67	L	V	F
	71	K	V	R
20	73	N	T	N
	78	V	F	L
	94	K	R	R

8 construcciones V_H humanizadas con diferentes mutaciones de nuevo se diseñan, 4 en base a las estructuras de humano del grupo

25 A (A1, A2, A3 y A4) y 4 en base a las estructuras de humano del

grupo B (B1 , B2, B3 y B4).

Un conjunto de secuencias de humano se identifican para V_L 15E10 del cual lo siguiente se selecciona para humanización:
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSKYLAWYQQKPGQAPRLLIY
5 DASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISNLEPEDFAVYYCQQRSNWPPT
FGQGKLEI (SEQ.I.D.NO:28)

Las CDRs se subrayan.

Los siguientes residuos se identifican como potencialmente importantes para recuperar afinidad y pueden necesitar mutarse de nuevo:

Posición (Kabat#)	15E10 V _L	Humano V _L
49	E	Y
71	Y	F

Dos construcciones se diseñan, uno como un injerto recto (L1),
15 el otro con mutaciones de nuevo en ambos residuos (L2).

Construcción V_H Humanizada A1:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWI
GVIWRGGSTDYNAAFMSRVTISVDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCA
KSPNSNFYWYFD VWGQGTTTS (SEQ.I.D.NO:29)

20 Construcción V_H Humanizada A2:

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWI
GVIWRGGSTDYNAAFMSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCA
KSPNSNFYWYFDVWGQGTTTS (SEQ.I.D.NO:30)

Construcción V_H Humanizada A3:

25 QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWI

GVIWRGGSTDYNAAFMSRVTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCA
KSPNSNFYWYFDVWGQGTTS (SEQ.I.D.NO:31)

Construcción V_H Humanizada A4:

QVQLIQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWIRQPPGKGLEWI

5 GVIWRGGSTDYNAAFMSRSLTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCA
KSPNSNFYWYFD VWGQGTTS (SEQ.I.D.NO:32)

Construcción V_H Humanizada B1:

QVQL1VESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLE
WVAVIWRGGSTDYNAAFMSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY

10 CARSPNSNFYWYFDVWGRGTLV (SEQ.I.D.NO:33)

Construcción V_H Humanizada B2:

QVQLVESGGGWQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEW
VAVIWRGGSTDYNAAFMSRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
AKSPNSNFYWYFDVWGRGTLV (SEQ.I.D.NO:34)

15 **Construcción V_H Humanizada B3:**

QVQLVESGGGWQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEW
VAVIWRGGSTDYNAAFMSRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
AKSPNSNFYWYFDVWGRGTLV (SEQ.I.D.NO:35)

Construcción V_H Humanizada B4:

20 QVQLVESGGGWQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEW
VAVIWRGGSTDYNAAFMSRSLTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
AKSPNSNFYWYFDVWGRGTLV (SEQ.I.D.NO:36)

Construcción V_L Humanizada L1:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIY

25 DTSNLAGIPARFSGSGSGTDFTLTISNLEPEDFAVYYCQQWSSYPPTF

GQGTKLEIK (SEQ.I.D.NO:37)

Construcción V_L Humanizada L2:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRLIE
DTSNLAGIPARFSGSGSGTDYTLTISNLEPEDFAVYYCQQWSSYPPTF

5 GQGTKLEIK (SEQ.I.D.NO:38)

5.2 Humanización de 15E10

Construcciones V_H y V_L humanizadas se preparan *de novo* por formación de oligonucleótidos de recuperación incluyendo sitios de
10 restricción para clonación en vectores de expresión de mamífero RId y RIn así como también una secuencia de señal de humano. Los sitios de restricción Hind III y Spe I se introducen para estructurar el dominio V_H conteniendo la secuencia de señal de humano para clonar en RId conteniendo la región constante tipo silvestre γ1 de
15 humano. Sitios de restricción Hind III y BsiW I se introducen para estructurar el dominio V_L conteniendo la secuencia de señal de humano para clonar en RIn conteniendo la región constante kappa de humano.

Secuencia de señal de humano: MGWSCIILFLVATATGVHS
20 (SEQ.I.D.NO:39).

Ocho construcciones V_H humanizadas y dos construcciones V_L humanizadas se diseñan. Esto resultaría en 16 combinaciones de cadena diferentes. Ya que la formación oligo de regiones variables consume tiempo, se decide inicialmente para preparar solamente las
25 construcciones por último y más mutadas de nuevo para el dominio

V_H (A1, A4, B1 y B4) y producen anticuerpos humanizados en combinación con las dos construcciones V_L humanizadas.

10 oligonucleótidos de 60 bases de largo con un mínimo de 18 bases de recubrimiento se diseñan para formación.

5

5.2.1 Formación de Oligonucleótido

Las soluciones de grupos de oligonucleótidos se preparan de 5µl de cada solución de reserva oligo a 100µM. La síntesis e los genes V_H y V_L humanizados por formación de oligonucleótidos de 10 recubrimiento se lleva a cabo generalmente de acuerdo a Stemmer WP *et al* (1995) Gene 164(1):49-53 utilizando software descrito en Ertl PF *et al* (2003) Methods 31: 199-206.

5.2.1.1 Reacción PCR de Ensamble

15	agua	41.5µl
	10xregulador PCR ProofStart	5µl
	dNTP (10mM)	1.5µl
	grupo oligo	1µl
	Polimerasa ADN ProofStart	1µl
20	vol total	50µl
	Ciclo PCR de ensamble:	1-94°C por 2min
		2-94°C por 30seg
		3-40°C por 2min
		4-72°C por 10seg
25		5-94°C por 15seg

6-40°C por 30seg

7-72°C por 20seg + 3seg/ciclo

etapas 4 a 7 se repiten 25 veces

5 **5.2.1.2 PCR de Recuperación**

Cebadores 1 y 2 fueron los primeros oligonucleótidos, superior e inferior, utilizados en PCR de ensamble. PCR de recuperación permite la amplificación del gen V completo.

Reacción PCR de recuperación:

10	agua	42µl	
	10xregulador PCR ProofStart	4µl	
	dNTP (10mM)	1.5µl	
	cebador 1 (100µM)	0.5µl	
	cebador 2 (100µM)	0.5µl	
15	reacción PCR de ensamble	1 µl	
	Polimerasa ADN ProofStart	0.5µl	
	vol total	50µl	
	cebador 1	cebador 2	
	15E10-A1/A4	15E10-A4-U1	15E10-A4-L1
20	15E10-B1	15E10-B1-U1	15E10-B1-L1
	15E10-B4	15E10-B1-U1	15E10-B4-L1
	15E10-L1/L2	15E10-L1-U1	15E10-L1-L1
	Recuperación ciclo PCR:	1-94°C por 2min	
		2-94°C por 45seg	
25		3-60°C por 30seg	

4-72°C por 2min

5-72°C por 4min

etapas 2 a 4 se repiten 25 veces.

Los productos PCR de recuperación se purifican utilizando el
5 kit de Purificación MinElute PCR de Qiagen de acuerdo a las
instrucciones del fabricante.

5.2.2 Digestiones de Restricción

Construcciones V_H 15E10 humanizadas A1, A4, B1 y se
10 digieren Hind III-Spe I y dos V_L 15E10 VL humanizados se digieren
Hind-III-BsiW I como se describe en 4.2.1.

5.2.3 Purificación de Gel

Los productos de digestión de restricción se purifican como en
15 4.2.2.

5.2.4 Ligación

Los fragmentos V_H humanizados 15E10 Hind III-Spe I digeridos
se ligan en el vector RId hCy1wt Hind III-Spe I digerido.

20 Los fragmentos V_L humanizados 15E10 Hind III-BsiW I
digeridos se ligan en el vector RIn hCk Hind III-BsiW I digerido.

La ligación se lleva a cabo utilizando el Sistema de Ligación de
ADN Rápido LigaFast de Promega de acuerdo a las instrucciones del
fabricante.

5.2.5 Transformación

Como en 4.2.5

5.2.6 Secuenciación

5 Colonias de cada placa de reacción se cultivan durante la noche a 37°C en 5ml medio LB complementando con 100µg/ml ampicilina.

Los plásmidos se extraen y purifican utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen de acuerdo a las instrucciones del
10 fabricante y se secuencian utilizando cebadores descritos en 4.2.5.

Los clones con las secuencias V_H y V_L humanizadas corregidas se identifican y los plásmidos se preparan para expresión en células CHO.

6. Expresión de Anticuerpos Humanizados en Células CHO

Cuatro construcciones V_H humanizadas (A1, A4, B1 y B4) y dos construcciones V_L humanizadas (L1 y L2) se preparan en vectores de expresión de mamífero RId hCγ1wt y RIn hCκ. Ocho combinaciones de cadena ligera-cadena pesada de plásmido (A1L1 , A1L2, A4L2,
20 B1L2, B4L1 y B4L2) se co-transfectan transitoriamente en células CHO y expresan a escala pequeña para dar 8 diferentes anticuerpos humanizados. Los anticuerpos producidos en sobrenadante se analizan en ELISA de inhibición gp130 (ver abajo).

6.1 Purificación de Plásmido

Células DH5 α conteniendo uno de los plásmidos de sección 6 se cultivan en 5ml de medio LB complementando con 100 μ g/ml ampicilina por 8h a 37°C en un incubador agitador.

200ml de medio LB complementando con 100 μ g/ml ampicilina se inocula con 1 ml de cultivo de día e incuba durante la noche a 37°C en un incubador agitador.

Los plásmidos se extraen y purifican utilizando el kit QIAfilter Plasmid Maxi de Qiagen de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La pastilla de etanol se resuspende en 200 μ l regulador TE y concentración de plásmido se mide por absorbencia a 260nm después de dilución de 100 veces de solución de reserva.

6.2 Transfección

9 cavidades de placas de 6 cavidades Corning Costar 3506 se siembran con 10⁵ células CHO y se cultivan durante la noche en MEM de Dulbecco con medio Glutamax-1 (DMEM) complementando con Suero de Bovino Fetal Ultra Bajo y 1 % Penicilina-Streptomycin a 37°C.

Para cada cavidad, los siguientes se agregan en un 5ml Bijou
1ml Optimem 1 con Glutamax-1

5 μ g plásmido llevando V_H humanizado

5 μ g plásmido llevando V_L humanizado

30 μ g Reactivo de Transfección TransFast bajo vórtice de manera que cada transfección contuvo una combinación diferente de cadenas ligeras y pesadas. La incubación tuvo lugar por 10-15min a

temperatura ambiente. Medio DMEM se remueve de las cavidades después la mezcla de vórtice y se agrega a la cavidad apropiada.

Incubación tuvo lugar a 37°C por 1 h.

2ml Optimem se agrega por cavidad e incuba a 37°C por 48-
5 72h.

6.3 Análisis de Anticuerpos Humanizados

Medio de cada cavidad se recupera y centrifuga a 13000rpm por 1 min en centrífugo Eppendorf 5415R y sobrenadante se pasa a
10 través de un filtro de jeringa de 0.2µm Pall Acrodisc 25mm.

8 anticuerpos humanizados (4 en base a las estructuras de humano del Grupo A, 4 en base a las estructuras de humano del Grupo B) y los anticuerpos quiméricos 15E10 se analizan en ELISA de inhibición gp130 para su potencia para neutralizar tanto hOSM
15 como cOSM (ver FIG. 4).

Tabla 2

Valores IC50 para anticuerpos humanizados B1L1, B1L2, B4L1 y B4L2 en ELISA de inhibición gp130

	OSM de humano	OSM de cinomólgo
B1L1	NA	NA
B1L2	0.334	0.110
B4L1	NA	0.167
B4L2	0.048	0.040
Quimera 15E10	0.070	0.060

Valores IC50 se expresan en µg/ml
NA: Inhibición es menor a 50%

El nivel de mutaciones de nuevo se expresa en anticuerpos humanizados tuvo un efecto directo en afinidad para OSM de humano y cinomólgo en ELISA de inhibición gp130. El último anticuerpo
25

mutado de nuevo (B1L1) no tuvo afinidad detectable para OMS de cinomólgo y solo los antecedentes de arriba para OSM de humano. Por el otro lado, el anticuerpos más mutado de nuevo (B4L2) tuvo una afinidad para OSM de humano y cinomólgo al menos equivalente a aquel del anticuerpo 15E10 quimérico. Los 2 anticuerpos humanizados conteniendo la cadena ligera mutadas de nuevo tuvieron afinidad más alta que los 2 anticuerpos humanizados conteniendo la cadena ligera de Injerto recta.

Ninguno de los cuatro anticuerpos humanizados basados en las estructuras del grupo A de humano tuvieron una señal inhibidora en ensayo ELISA gp130. De hecho ninguno de estos anticuerpos podría detectarse en un ELISA para anticuerpo IgG1 humano completo (donde el anticuerpo de captura es un policlonal originado contra cadena pesada y de humano en cabras y el anticuerpo de detección es un policlonal originado contra cadena ligera κ de humano).

Análisis adicional de sobrenadante conteniendo estos cuatro anticuerpos en ELISAs específica de cadena pesada de IgG de humano y específica de cadena ligera dio una señal positiva en ambos ensayos. Ambas ELISAs utilizaron un anticuerpo de captura originado contra cadenas pesada y ligera de IgG de humano en cabras mientras el anticuerpo de detección se origina contra cadena y de IgG de humano para ELISA específica de cadena pesada y contra cadena κ IgG de humano en ELISA específica de cadena ligera.

Estos resultados sugieren que los anticuerpos humanizados

donde la cadena pesada se diseña de las estructuras de humano de grupo A expresan tanto cadena pesada como ligera pero las dos cadenas no se combinan para producir un anticuerpo viable.

La construcción V_H más mutada de nuevo en base a las estructuras de Grupo B de humano (B4) en combinación con la cadena ligera mutada de nuevo (L2) probó que es el anticuerpo humanizado más potente. Tres anticuerpos humanizados comprendiendo V_H de Grupo B (B2L2, B3L2 y B4L2) se producen, purifican y analizan para determinar el anticuerpo humanizado más adecuado para selección de candidatos.

6.4 Preparación de construcciones V_H humanizadas de 6.3

Dos construcciones humanizadas B2 y B3 se preparan como en 5.2.1 a 5.2.6.

6.5 Expresión de anticuerpos humanizados en células CHO

Tres plásmidos conteniendo V_H humanizada (B2, B3 y B4) en combinación con el plásmido conteniendo V_L humanizada más mutada de nuevo (L2) de sección 6 se co-transfectan transitoriamente en células CHO y se expresan. Los 3 anticuerpos humanizados producidos se purifican de sobrenadante de cultivo celular por cromatografía de afinidad en rProteína A Sepharose y su afinidad para OSM se evalúa en ELISA de inhibición gp130 y ensayo de célula KB utilizando anticuerpo quimérico 15E10 como referencia.

Purificación de Plásmido se lleva a cabo como en 4.3.1.

Transfección se lleva a cabo como en 4.3.2. Purificación de anticuerpos humanizados se lleva a cabo como en 4.3.3.

6.6 Análisis de Anticuerpos Humanizados de sección 6.5

5 Anticuerpos humanizados purificados de la sección 6.5 se analizan en ELISA de inhibición gp130 y ensayo de célula KB (ver abajo) para su potencia para neutralizar tanto OSM de humano como cinomólgo. Ensayos se conducen con OSM de humano de una
10 25% suero AB de humano, neutrófilos y fluido sinovial de pacientes RA.

ELISA de inhibición gp130: datos de experimentos se ilustran en Fig 5 a 10.

ensayo de célula KB: datos de experimentos se ilustran en Fig
15 11 a 16. Estos resultados muestran que los anticuerpos humanizados (B3L2 y B4L2) tienen potencia equivalente a anticuerpo quimérico 15E10 pero más alta que el anticuerpo humanizado B2L2. Esto indica que la estrategia de humanización, especialmente la elección de mutaciones de nuevo resulto en recuperación completa de
20 afinidad para antígeno.

The secuencia de aminoácidos de la cadena V_H de B4 es
QVQLVESGGGWQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEW
VAVIWRGGSTDYNAAFMSRLTISKDNSKMTLYLQMNSLRAEDTAVYYC
AKSPNSNFYWYFD VWGRGTLVTVSS (SEQ.I.D.NO: 21)

25 y la cadena V_L es SEQ.I.D.NO: 12.

Un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo comprendiendo una cadena V_H de SEQ.I.D.NO: 21 y una cadena V_L de SEQ.I.D.NO: 12 puede considerarse como un anticuerpo competente de la invención y por lo tanto forma una
5 modalidad de la invención.

6.7 Comparación de Anticuerpo Humanizado B3L2 con Anticuerpos de Murino de Origen y Quiméricos

El anticuerpo humanizado B3L2 se compara con los anticuerpos
10 quiméricos 15E10 y de murino de origen en ELISA de Inhibición gp130 y ensayo de célula KB (ver abajo) utilizando OSM de humano y cinomólgo como antígeno objetivo. Un anticuerpo B3L2 humanizado llevando 2 mutaciones de punto en la cadena pesada constante (Ala reemplaza Leu en posición 235 y Gly en posición 237)
15 se diseña, expresa en células CHO y purifica. Las mutaciones reducen la habilidad del anticuerpo para generar funciones efectuatoras especialmente reclutamiento de factores complemento. El candidato de anticuerpo humanizado B3L2 con cadena pesada intacta se refiere como B3L2 wt (tipo silvestre) mientras el
20 anticuerpo B3L2 se llama B3L2 mut en las FIGSs. 17 a 19.

Tabla 4
Valores IC50 para B3L2 humanizado tipo silvestre en comparación con anticuerpos quiméricos y de murino de origen en ELISA de Inhibición gp130 y ensayo de célula KB

	gp130ELISA	Ensayo de célula KB
15E10 murino	0.009	0.053
15E10 quimérico	0.019	0.079
B3L2 wt	0.035	0.0123

Valores IC50 están en µg/ml

5 Estos resultados confirman que el anticuerpo B3L2 tiene potencia equivalente al anticuerpo de murino de origen 15E10.

La secuencia de aminoácidos de cadena pesada B3L2 humanizada se establece en SEQ.I.D.NO:11 y la cadena ligera B3L2 humanizada se establece en SEQ.I.D.NO:12.

10

Ejemplo 7 - Anticuerpo 10D3

7.1. Generación de Anticuerpos Monoclonales

Hibridoma 10D3 se genera como se detalla en el Ejemplo 1 de arriba.

15

7.2 Clonación de Regiones Variables de Clon 10D3

ARN total se extrae de células de hibridoma de clon 10D3 y el cADN de dominios variables pesados y ligeros se producen por transcripción inversa utilizando cebadores específicos para la secuencia guía de murino y las regiones constantes de anticuerpo de acuerdo al isotipo pre-determinado (IgG1/κ). El cADN de los dominios pesados y ligeros variables se clona entonces en el pCR2.1 para secuenciación.

20

25 **7.2.1 Extracción de ARN**

ARN total se extrae de pastillas de 10^8 células de clon de hibridoma 10D3 utilizando el Sistema de Aislamiento de ARN Total SV de Promega de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

5 **7.2.2 Transcripción Inversa**

ARN se transcribe Inversa para producir cADN de los dominios pesados y ligeros variables utilizando cebadores específicos para las secuencias guía de murino y regiones constantes IgG γ 2a/ κ de murino. La mezcla de cebadores utilizada se establece en Jones ST
10 ad Bendig MM Bio/technology 9:88-89 (1991).

Los grupos de cebadores delanteros de secuencia guía V_H y V_L de murino se preparan a $50\mu M$. Soluciones de los cebadores inversos de región constante γ 2a y κ de murino también se preparan a $50\mu M$.

15

7.2.3 Transcripción Inversa PCR (RT-PCR)

Transcripción Inversa de ARN codificando las regiones pesadas y ligeras variables se lleva a cabo por duplicado utilizando el Sistema Access RT-PCR de Promega de acuerdo a las instrucciones
20 del fabricante. Cebadores delanteros e inversos V_H y V_L son como se describen arriba.

7.3 Clonación de Producto PCR de 7.2.3

7.3.1. Purificación de Gel

25 Los productos de RT-PCR ($2xV_H$ y $2xV_L$) se cargan en solución

de carga en un gel de agarosa al 1% preparativo conteniendo 0.01% bromuro de etidio y corre en regulador TAE a 100V por 1 hora y las bandas de región V se cortan. Una escala de ADN 100bp también corre en el gel para permitir la identificación de las bandas V_H y V_L .

- 5 Los fragmentos de ADN se extraen y purifican del gel utilizando el kit de extracción de gel QIAquick™ de Qiagen de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

7.3.2 Ligación

- 10 Fragmentos RT-PCR purificados ($2xV_H$ y $2xV_L$) se clonan en el vector pCR2.1 utilizando el kit de clonación TA de Invitrogen de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

7.3.3 Transformación

- 15 Los plásmidos ligados se transforman en células TOP10F' células de acuerdo a las instrucciones del kit de clonación TA. 50 μ l y 200 μ l de células transformadas se difunden en placas L-ágar conteniendo 100 μ g/ml ampicilina y revisten con 8 μ l de 500mM solución IPTG y 16 μ l de 50mg/ml solución X-Gal en DMF.
- 20 Las placas se incuban durante la noche a 37°C.

7.3.4 Secuenciación

5 colonias blancas se cultivan durante la noche a 37°C en 5ml medio LB complementado con 100 μ g/ml ampicilina.

- 25 Los plásmidos pCR2.1 conteniendo dominios V_H y V_L 10D3 se

extraen y purifican utilizando el kit Qiagen QIAprep Spin Miniprep de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los dominios V_H y V_L se secuencian utilizando cebadores T7, M13 para y M13 rev.

5 Secuencia de aminoácidos de dominio V_H 10D3 (consenso de 10 clones de 2 reacciones RT-PCR): SEQ.I.D.NO:46.

Secuencia de aminoácidos de dominio V_L 10D3 (consenso de 10 clones de 2 reacciones RT-PCR): SEQ.I.D.NO:47.

10 **7.4. Anticuerpo Quimérico**

Un anticuerpo quimérico consistiendo de regiones V de murino de origen de 7.3.4 injertado sobre regiones C tipo silvestre IgG1/k de humano se diseña para conformar la clonación de las regiones V de murino correctas y también para utilizarse como una referencia
15 cuando se prueban construcciones humanizadas. El anticuerpo quimérico se expresa en células CHO, purifica y prueba para afinidad en el sitio II OSM en ELISA de inhibición gp130 y ensayo de célula KB (ver abajo).

Las regiones V de murino clonadas se amplifican por PCR para
20 introducir sitios de restricción requeridos para clonación en vectores de expresión de mamífero Rld y Rln. Sitios Hind III y Spe I se diseñan para estructurar el dominio V_H y permitir la clonación en un vector Rld modificado conteniendo la región C tipo silvestre γ1. Los sitios Hind III y BsiW I se diseñan para estructurar el dominio V_L y
25 permitir la clonación en un vector Rln modificado conteniendo la

región C κ de humano.

7.4.1 Amplificación PCR

cebador delantero V_H:

5 El sitio de restricción Hind III se subraya y secuencia Kozac en negritas

delantero V_H: 5'-GAT **GAA GCT TGC** CAC CAT GGG ATG GAG CTG GGT CTT T-31 (SEQ.I.D.NO:58)

inverso V_H: 5'-GAT **GGA CTA GTG** TGC CTT GGC CCC AAT A-31
10 (SEQ.I.D.NO:65)

El sitio de restricción Spe I se subraya.

cebador delantero V_L:

delantero V_L: 5'-GAT **GAA GCT TGC** CAC CAT GGA TTT ACA GGT GCA GAT T-3' (SEQ.I.D.NO:59)

15 El sitio de restricción Hind III se subraya y secuencia Kozak en negritas.

inverso V_L: 5'-GAT **GCG TAC GTT** TCA GCT CCA GCT TGG TCC C-3' (SEQ.I.D.NO:60)

El sitio de restricción BsiW I se subraya

20	Reacción PCR:	agua	66μl
		10x regulador	10μl
		dNTP (2mM)	10μl
		cebador 1 (5μM)	4μl
		cebador 2 (5μM)	4μl
25		AmpliTaq polimerasa	2μl

25 **Spe I (NEB)** **2μl**

agua	35.5µl
vol total	50µl

ADN: producto PCR V_H purificado o vector Rld hCγ1wt (a 0.25mg/ml) Incubado a 2h a 37°C.

5 El producto PCR V_L y vector de expresión de mamífero Rln hCκ se digieren Hind MI-BsiW I:

	regulador 10x (NERRegulador2)	5µl
	ADN	5µl
	Hind III (Promega)	2µl
10	agua	38µl
	vol total	50µl

ADN: producto PCR V_L purificado de vector Rln hCκ (a 0.25mg/ml) Incubado a 2h a 37°C.

2µl de BsiW I (NEB) se agrega e incuba 2h a 55°C.

15

7.4.2.2 Purificación de Gel

Los productos de digestiones de restricción se cargan en solución de carga de gel en un gel de agarosa al 1% preparativo conteniendo 0.01% bromuro de etidio y corre en regulador TAE a 100V por 1 hora y el vector Rld y Rln así como también bandas de fragmento PCR V_H y V_L se cortan. Una escala ADN 100bp también corre en el gel para permitir la identificación de las bandas de vector, V_H y V_L. El ADN se extrae y purifica de gel utilizando kit de extracción QIAquick Gel de Qiagen de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

25

7.4.2.3 Ligación

El fragmento PCR V_H Hind III-Spe I digerido se liga en el vector RId hCy1wt Hind III-Spe I digerido.

El fragmento PCR V_L Hind III-BsiW I digerido se liga en el
5 vector RIn hCκ Hind III-BsiW I digerido.

La ligación se lleva a cabo utilizando Sistema de Ligación de ADN Rápido LigaFast de Promega de acuerdo a las instrucciones del fabricante proporcionado:

V_H: vector: RId hCy1wt Hind III-Spe I digerido

10 Inserción: fragmento PCR V_H Hind III-Spe I digerido

V_L: vector: RIn hCκ Hind III-BsiW I digerido

inserción: fragmento PCR V_L Hind III-BsiW I digerido.

7.4.2.4 Transformación

15 Los productos ligados se transforman en células competentes DH5α:

Frascos de 200μl DH5α se congelan en hielo.

Alícuotas de 50μl se preparan en tubos de transformación.

2μl de mezcla de ligación se agrega y mezcla gentilmente con una
20 punta de pipeta seguida por incubación por 30min en hielo.

La mezcla se incuba por 45 seg a 42°C sin agitación.

Esto se transfiere a hielo por 2min.

450μl medio SOC se agrega y los tubos se incuban por 1 h a 37°C en incubador agitador.

25 100μl de cultivo se difunde sobre placas L-ágar complementadas con

100µg/ml ampicilina e incuban durante la noche a 37°C.

7.4.2.5 Secuenciación

Clones V_H y V_L se cultivan durante la noche a 37°C en 5ml
5 medio LB complementando con 100µg/ml ampicilina.

Los plásmidos Rld y Rln conteniendo dominios V_H y V_L respectivamente se extraen y purifican utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La región V_H se secuencia utilizando cebadores delanteros en
10 el vector Rld y secuencia de señal y cebador inverso en la región Cy1 de humano.

La región V_L se secuencia utilizando cebadores delanteros en el vector Rln y secuencia de señal y cebador inverso en la región Cκ de humano.

15 Los clones con las secuencias V_H y V_L se identifican y los plásmidos se preparan para expresión en células CHO.

7.4.3 Expresión de Anticuerpo Quimérico en Células CHO

Los plásmidos Rld y Rln conteniendo dominios V_H y V_L 10D3
20 respectivamente se co-transfectan transitoriamente en células CHO y se expresan. El anticuerpo quimérico producido se purifica de sobrenadante de cultivo celular por cromatografía de afinidad o Sepharose de rProteína A y su afinidad para OSM se evalúa en ELISA de inhibición gp130 y ensayo de célula KB (ver abajo).

7.4.3.1 Purificación de Plásmido

Células DH5 α conteniendo plásmidos RId-15E10V_H y RIn-15E10V_L se cultivan en 5ml de medio LB complementado con 100 μ g/ml ampicilina por 8h a 37°C en un incubador agitador.

- 5 200ml de medio LB complementando con 100 μ g/ml ampicilina se inocula con 1 ml de cultivo de día e incuba durante la noche a 37°C en un incubador agitador.

Los plásmidos se extraen y purifican utilizando el kit QIAfilter Plasmid Maxi de Qiagen de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La pastilla de etanol se resuspende en 200 μ l regulador TE y concentración de plásmido se mide por absorbencia a 260nm después de dilución 100 veces de solución de reserva.

7.4.3.2 Transfección

- 15 Las células CHO se cultivan para confluencia en MEM de Dulbecco con medio Glutamax-1 (DMEM) complementando con Suero de Bovino Fetal Ultra Bajo y 1% Penicilina-Streptomycin en 4x175cm² matraces de cultivo de tejido BD Falcon a 37°C.

Para cada frasco, en un tubo Falcon de 50 ml, se agregan y
20 mezclan lo siguiente:

8ml Optimem 1 con Glutamax-1

20 μ g RId-1510V_H plásmido purificado

20 μ g RIn-1510V_L plásmido purificado

20 μ g Reactivo de Transfección TransFast bajo vórtice

- 25 La mezcla se incuba por 10-15 min a temperatura ambiente

(RT).

Medio DMEM se remueve de matraz después la mezcla se coloca en vórtice y se agrega a matraz.

La mezcla se incuba a 37°C por 1h.

5 32ml Optimem se agrega al matraz e incuban a 37°C por 48-72h.

7.4.3.3 Purificación de Anticuerpo Químérico

Medio de todos los matraces de 172cm² se agrupan y
10 centrifugan a 1500rpm por 3min en un MSE Mistral 2000 y sobrenadante pasa a través de un Sistema de Filtro de 500mL 0.22µm CA.

El anticuerpo se purifica de sobrenadante clarificado en un Amersham Biosciences Akta Explorer utilizando software Unicorn
15 software.

La columna utilizada fue una 1ml HiTrap rProteína A Sepharose FF.

La velocidad de flujo fue 1 ml/min.

La columna se equilibra con 10CV de PBS de Dulbecco
20 después se carga con sobrenadante clarificado a través de bomba A.

La columna se enjuaga con 20CV de PBS de Dulbecco, bomba A se enjuaga para desperdicio y un 10CV adicional de PBS de Dulbecco se pasa a través de la columna para asegurar despeje completo de sobrenadante.

25 El anticuerpo se eluye con 10CV de Regulador de Elución IgG

ImmunoPure (Pierce) y recolecta en fracciones de 1ml conteniendo 100µl de 1M Trizma-HCl pH8.0 regulador de neutralización.

La columna se reequilibra con 5CV de PBS de Dulbecco.

El anticuerpo en fracciones de eluido se cuantifica al leer la
5 absorbancia a 280nm contra una solución vacía conteniendo 10 volúmenes de Regulador de Elución IgG ImmunoPure + 1 volumen de 1M Trizma-HCl pH8.0 y fracciones con cantidades suficientes de anticuerpo puro se agrupan y almacenan en alícuotas de 100µl a -20°C.

10

7.4.4 Análisis de Anticuerpo Quimérico

El anticuerpo quimérico 10D3 se analizan en ELISA de inhibición gp130 y ensayo de célula KB (ver abajo) para su potencia para neutralizar tanto OSM humano como cinomolgo.

15 Los procedimientos para ELISA de inhibición gp130 y ensayo de célula KB se establecen abajo.

Los anticuerpos quiméricos 10D3 neutralizan OSM en ELISA de inhibición gp130 y ensayo de célula KB.

Estos resultados confirman que las regiones variables correctas
20 se han clonado exitosamente para producir un anticuerpo quimérico de antígeno capaz de unir tanto sitio II de OSM de cinomólgo o humano.

Los dominios pesados y ligeros variables 10D3 pueden ahora humanizarse.

25 Las regiones variables de murino se clonan y secuencian

después se injertan en regiones constantes $\gamma 1/k$ humano para producir un anticuerpo quimérico. El anticuerpo quimérico 10D3 mostró potencia contra OSM cinomólgo y humano equivalente a aquel del anticuerpo de murino de origen en gp130 ELISA y ensayos
5 de célula KB (ver abajo).

El anticuerpo de murino se humaniza utilizando la estrategia de "mejor ajuste". Para el dominio pesado variable, una secuencia con 65% identidad se selecciona y CDRs de murino injertados sobre las estructuras de humano. Un número de construcciones se diseñan
10 con varias mutaciones de nuevo en las estructuras para recuperar afinidad. Estas construcciones son:

Construcción		Mutaciones de nuevo
A		T28I
B		T28I, R71V, T73K
15	C	T28I, V67A, M69L, R71V, T73K
	D	T28I, M48I, G44K, V67A, M69L, R71V, T73K

Para el dominio ligero variable, una secuencia con 60.0% Identidad se selecciona y CDRs de murino injertadas sobre las estructuras de humano. Un número de construcciones se diseñan
20 con varias mutaciones de nuevo en las estructuras para recuperar afinidad. Estas construcciones son:

Construcción		Mutaciones de nuevo
LA		ninguno (Injerto recto)
LB		L46R, L47W
25	LC	Y36F, Q38K

LD	Y36F, Q38K, L46R, L47W
LE	Y36F, Q38K, L46R, L47W, F71Y

Solamente las construcciones por último y más mutadas de nuevo (A, D, LA, LE) se sintetizan al formar los oligos de recubrimiento. Cuatro anticuerpos humanizados (ALA, ALE, DLA, DLE) se expresan en escala pequeña en células CHO y el sobrenadante se analiza para afinidad de anticuerpo en gp130 ELISA.

10 Solamente anticuerpos humanizados ALE y DLE mostraron inhibición en gp130 ELISA pero la inhibición por ALE no fue suficiente debido a la baja concentración de anticuerpo en el sobrenadante de manera que DEL se selecciona. La producción de anticuerpo humanizado DEL se escala en células CHO y el
15 anticuerpo se purifica y analiza en gp130 ELISA y ensayo de célula KB utilizando anticuerpo quimérico 10D3 como control.

Los valores IC50 (gp130 ELISA) (μ g/ml):

	hOSM	cOSM
quimera	0.032	0.246
20 DLE	0.021	0.059

Anticuerpo humanizado 10D3 DLE es al menos tan potente si no más potente que el anticuerpo quimérico contra OSM de humano y OSM de cinomólgo en gp130 ELISA.

Los anticuerpos quiméricos humanizados 10D3 DLE y 10D3 se
25 analizan en el ensayo de célula KB. 10D3 DLE dio valores IC50 de

0.205 μ g/ml contra OSM de humano y 0.07 μ g/ml contra OSM de cinomólgo.

En conclusión, anticuerpo sitio II OSM anti-humano 10D3 se ha humanizado exitosamente y muestra potencia equivalente a aquella
5 del anticuerpo de murino de origen.

Materiales

Sistema de Aislamiento de ARN Total SV: Promega Z3100

Sistema Access RT-PCR System: Promega A1250

Kit de Extracción de Gel QIAquick: Qiagen 28704

10 Solución de carga de gel: Sigma G7654

Agarosa: Invitrogen 15510-019

Bromuro de etidio: Sigma E1510

Regulador TAE: en casa

Escala de ADN 100bp: New England BioLabs N3231S

15 Kit de clonación TA: Invitrogen 45-0046

Células TOP10P: Invitrogen 44-0300

L-agar + 100 μ g/ml ampicilina: en casa

X-Gal, 50mg/ml en DMF: Promega V394A

AmpliTaq ADN Polimerasa: Applied Biosystems

20 10x regulador PCR: Applied Biosystems

E-Gel 1.2% agarosa: Invitrogen G501801

medio LB + 100 μ g/ml ampicilina: en casa

kit QIAprep Spin Miniprep kit: Qiagen 27106

kit de purificación MinElute PCR Purification: Qiagen 28004

25 NERegulador2 10x conc: New England Biolabs B7002S

- BSA Purificado 100x conc: New England Biolabs B9001S
- BsiW I: New England Biolabs R0553L
- Hind III: Promega R604A
- Spe I: New England Biolabs R0133S
- 5 Sistema de Ligación de ADN rápido LigaFast: Promega M8225
- Células químicamente competentes DH5 α Eficiencia MAX: Invitrogen
- 18258-012 medio SOC: en casa
- KIT QIAfilter Plasmid Maxi: Qiagen 12263
- MEM de Dulbecco con Glutamax-1: Invitrogen 31966-021
- 10 Optimem 1 con Glutamax-1: Invitrogen 51985-026
- Reactivo de Transfección TransFast: Promega E2431
- 1 ml HiTrap rProteína A Sepharosa FF: Amersham Biosciences 17-5079-01
- PBS de Dulbecco: Sigma D8537
- 15 Regulador de Elución de IgG ImmunoPure: Pierce 21009
- 1M Trizma-HCl pH8.0: Sigma T2694
- Polimerasa ADN ProofStart: Qiagen 1016816
- Regulador PCR ProofStart: Qiagen 1016961
- 20 **Ejemplo 8. ELISA de Inhibición gp130**
- OSM se une secuencialmente a gp130 y ya sea el receptor OSM o receptor LIF. El ensayo descrito abajo permite la medición de OSM (por ejemplo, hOSM) unido a gp130 en una placa ELISA. Además, el ensayo permite la medición de Inhibición de OSM unión
- 25 al receptor gp130 por anticuerpos originados contra OSM sitio II.

8.1 Materiales

1. Nunc Inmunoplaaca 1 F96 Maxisorp (Life Technologies, 4-39454A)
2. gp130-Fc Humano 100 μ g/ml (R&D Systems, 671-GP-100)
- 5 3. PBS
4. BSA (Sigma A7030)
5. OSM recombinante de humano 10 μ g/ml (R&D Systems, no glicosilado)
6. OSM anti humano biotinilado 50 μ g/ml (R&D Systems, BAF295)
- 10 7. Streptavidin HRP (Amersham RPN4401)
8. 3,3',5,5'-tetrametileno benzidina (TMB) (Sigma)
9. Ácido sulfúrico
10. Tween 20 (Sigma P7949)

15

8.2 Preparación de reactivos

1. Preparación de placas: Diluir el gp130-Fc de humano con 1 μ g/ml en PBS. Agregar 50 μ l/cavidad, cubrir e incubar durante la noche a 4°C.
- 20 2. Regulador de enjuague: a 1 L PBS agregar 500 μ l Tween 20 (0.05%).
3. Regulador de bloqueo: a 500ml PBS agregar 5g BSA (1 %).

8.3 Método

1. Enjuagar la placa utilizando el procedomiento de enjuague de placa estándar y secar tapa.
- 25

2. Agregar 200 μ l/cavidad regulador de bloqueo e incubar por 1 hora a RT.
3. Enjuagar como en la etapa 1.
4. Agregar 50 μ l/cavidad estándar OSM o muestra. Cubrir y
5 agitar por 2 horas a RT. (OSM se diluye a 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563 y 0 ng/ml en regulador de bloqueo o medio de cultivo de tejido dependiendo de la muestra).
5. Enjuagar como en la etapa 1.
6. Agregar 50 μ l/cavidad OSM anti humano biotinilado diluido
10 con 30ng/ml en regulador de bloqueo. Cubrir y agitar por 1 hora a RT.
7. Enjuagar como en etapa 1.
8. Agregar 50 μ l/cavidad streptavidin HRP diluida 1/4000 para bloquear el regulador. Cubrir y agitar por 30 min, a RT.
9. Enjuagar como en etapa 1.
15
10. Agregar 100 μ l/cavidad substrato TMB. Cubrir y agitar por 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Agregar 50 μ l/cavidad 1M H₂SO₄.
12. Leer OD 450_{nm}.
20

8.4 Uso de ensayo para análisis de Inhibición mediada por anticuerpo de unión gp130-OSM

- 1) Mezclar 25 ng/ml OSM con varias concentraciones de anticuerpo anti-OSM o varias diluciones de antisueros
25 conteniendo anticuerpos OSM. Incubar por 1 hr a RT.

- 2) Agregar 50µl/ cavidad de la mezcla de anticuerpo-OSM a una placa de 96 cavidades conteniendo gp130 unido, preparado como arriba.
- 3) Proceder con el ensayo como se describe arriba.

5

9. Ensayo KB

Introducción

Células KB (una estirpe de célula epitelial humano) expresan mARN para gp130 junto con receptores LIF y OSM (Mosley, J. Biol Chem., 271 (50) 32635- 32643). Tanto OSM como LIF inducen la liberación de IL-6 de células KB. Esta estirpe de célula se ha utilizado para identificar anticuerpos monoclonales modulando la interacción entre OSM y gp130.

9.1 Método

Las células KB se obtienen de ECACC (No. de Acceso 94050408) y mantienen en DMEM + 10% FCS Inactivado por calor, complementado con glutamina ("medio KB "). Las células se desarrollan como una monocapa y se dividen dos veces por semana. El medio de disociación de célula no enzimática Sigma o Versene se utiliza para separar las células.

1. Agregar 2×10^4 células/ 100µl/ cavidad/ placa de 96 cavidades e incubar durante la noche (37°C, 5% CO₂).
2. Elaborar los estándares OSM en medio de cultivo.
- 25 3. Elaborar 1ng/ml OSM + anticuerpo / diluciones de suero

Incubar por 1h a RT.

4. Remover cuidadosamente medios de la placa de célula KB y agregar estándares OSM y mezclas de OSM-anticuerpo.
5. Incubar por ~16-18h a 37°C.
- 5 6. Remover el medio de cultivo y ensayar por IL-6.

Nota:

- Medio de cultivo puede mantenerse congelado hasta que está listo para análisis.
- Medio de cultivo debe diluirse –20 veces para ensayo.
- 10 • En selección de hibridomas, la proporción del medio de clonación a medio KB debe ser constante, y los estándares OSM deben hacerse en esta mezcla.
- Estimulación de células KB con –100 ng/ml OSM da salida IL-6 máxima, pero 1 ng/ml es suficiente para actividad neutralizante de anticuerpo.
- 15

10. Ensayo de Competición

Este ensayo permite la medición de inhibición de unión del anticuerpo humanizado teniendo una cadena pesada de SEQ.I.D.NO: 11 y una cadena ligera teniendo una cadena ligera de SEQ.I.D.NO: 12 (para el propósito de este ejemplo denotado como 15E10-B3L2) a hOSM glicosilado soluble por un anticuerpo no humano candidato que se une específicamente a Sitio II de hOSM. Ilustración esquemática del ensayo de este ejemplo se establece en FIG. 20.

25 La placa se reviste con anticuerpo monoclonal anti-sitio III

(referido en la presente como OM4-11.31).

Para la curva estándar: 15E10-B3L2 purificado estándar serialmente diluido de 1 µg/ml se incuba con OSM humano glicosilado soluble a 50 ng/ml.

- 5 El anticuerpo se une a OSM a través del sitio II y el complejo se captura en la placa por el anticuerpo primario sitio III.

Para el ensayo de compresión: el anticuerpo candidato serialmente diluido de 1 µg/ml se incuba con OSM humano glicosilado soluble a 50ng/ml y 15E10-B3L2 a 150ng/ml.

- 10 La presencia de 15E10-B3L2 compuesto se detecta por un anticuerpo secundario de cadena gamma anti-humano.

Método:

1 Revestimiento

- 15 Una Inmunoplaaca Maxisorp Nunc se reviste con 50 µl por cavidad de anticuerpo sitio III OSM anti-humano (OM4-11.31, en casa) a 4 µg/ml en PBS. La placa se incuba durante la noche a 4°C.

2 Bloqueo.

La placa se enjuaga 3 veces con PBS + 0.05% Tween (PBST).

- 20 100 µl de 1% BSA (Sigma A7030) en PBS se agrega a cada cavidad.

La placa se incuba a temperatura ambiente por 2h con agitación.

3 Pre-Incubación

Estándar 15E10B3L2:

- 25 Una solución de anticuerpo 15E10-B3L2 a 1 µg/ml en 50 ng/ml

OSM de humano en regulador de bloqueo se prepara y 67 μ l se agregan a 2 cavidades en fila A de una placa de 96 cavidades no absorbente. El anticuerpo se diluye serialmente 1:3 en 50 μ l de 50 ng/ml de OSM humano en regulador de bloque de fila B a G.

5 Anticuerpo competente:

Una solución de anticuerpo competente a 1 μ g/ml en 150 ng/ml 15E10-B3L2+50ng/ml hOSM en regulador de bloque se prepara y 100 μ l se agregan a 2 cavidades en fila A de una placa de 96 cavidades absorbente. El anticuerpo se diluye serialmente 1:1 en 10 50 μ l de 150 ng/ml 15E10-B3L2+50 ng/ml OSM humano en regulador de bloque de fila B a G. Dos cavidades se incuban con diluyente si anticuerpo competente.

La placa de pre-incubación se incuba a temperatura ambiente por 1h bajo condiciones estáticas.

15 4 Incubación

La placa revestida se enjuaga 3 veces con PBST.

45 μ l de cada estándar y muestra se transfiere de la placa de preincubación a cavidades equivalentes en la placa revestida. PBS se agrega a cavidades vacías.

20 La placa se incuba a temperatura ambiente por 2h bajo agitación.

5 Anticuerpo Secundario

La placa se enjuaga 3 veces con PBST.

50 μ l de peroxidasa de cadena y anti-humano de cabra (Sigma 25 A6029) diluido 2000 veces en regulador de bloque se agrega a cada

cavidad.

La placa se incuba a temperatura ambiente por 1h bajo agitación.

6 Substrato

5 La placa se enjuaga 3 veces con PBST.

Substrato OPD (Sigma P9187) se prepara en agua de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

50 μ l se agrega a cada cavidad.

La placa se incuba a temperatura ambiente.

10 7 Detención

Una vez que la coloración se ha desarrollado lo suficiente, la reacción cromogénica se detiene por la adición de 10 μ l de 3M H_2SO_4 por cavidad.

15 La placa se lee en 490 nm en un lector de placa utilizado cavidades vacías como 0 absorbencia.

La curva estándar de absorbencia a 490nm contra concentración 15E10 se diagrama.

Concentración 15E10 complejada en las muestras conteniendo anticuerpo competente se lee fuera de la curva estándar % inhibición
20 se calcula como:

$$100 - [(15E10 \text{ conc en muestra en ng/ml} + 150 \text{ ng/ml}) \times 100].$$

La curva de % inhibición contra concentración de anticuerpo competente se diagrama y el % de inhibición de 15E10 a equimolaridad de anticuerpo competente (150ng/ml de anticuerpo
25 competente) se lee fuera de la curva.

Ejemplo 10.1: 10D3 como anticuerpo competente

Anticuerpo E9 clon 10D3 de Murino a 267 µg/ml (reserva) se utiliza como el competidor de 15E10. 10D3 tiene CDRs de cadena pesada y ligera como se establece en la Tabla A anterior.

5 Resultados:

10D3 (µg/ml)	15E10 acomplejado (µg/ml)	% de Inhibición
1	0.019	87.3
0.5	0.029	80.7
0.25	0.044	70.7
0.125	0.062	58.7
0.062	0.082	38.7
0.031	0.132	12.0
0.016	0.146	2.7

10

% de Inhibición de 15E10 por el competidor 10D3 en equimolaridad (0.15 µg/ml): 62.3%. Véase Fig. 21.

Ejemplo 11 – Identificación de anticuerpos que unen OSM y son específicos para el Sitio II o Sitio III de OSM

15

Para la función biológica, OSM tiene que interactuar tanto con gp130 como LIFR o OSMRβ. La interacción inicial de OSM con gp130 incluye OSM sitio II, mientras que la interacción de OSM con el OSMRβ o LIFR se presenta por medio del sitio III. Prosigue que los anticuerpos que tienen como objetivo cualquiera de las secuencias de OSM de sitio II o sitio III, o epítopos lo suficientemente cercanos a estos sitios de tal forma que la unión de anticuerpo podría obstaculizar estos sitios, podría neutralizar la actividad de OSM.

20

Un ensayo para medir la unión OSM-gp130 se establece en el Ejemplo 8. Una curva estándar típica (a 1 µ/ml, gp130) se establece en

25

la Fig. 22.

Al cambiar las condiciones del ensayo (a 4 µg/ml), la sensibilidad podría mejorarse mayormente según se ilustra en la Fig. 22b.

Además, a pesar de que la información anterior se generó
5 utilizando OSM no glicosilado, OSM glicosilado también se une a gp130 en este ensayo. Véase Fig. 22c.

Un anticuerpo anti-OSM neutralizante comercialmente disponible (Mab 295, R&D Systems) se utilizó en este ensayo para ver si este
10 podría bloquear la interacción de OSM-gp130. Sorprendentemente, éste potenció la señal de OSM, según se ilustra en la Fig. 23.

Cuando Mab 295 (30 µg/ml) se agrega a OSM aproximadamente
dobla la lectura de OD del ELISA en comparación con OSM solo para las
concentraciones de OSM >10 ng/ml. Si gp130 se omite de la placa,
entonces la señal generada por OSM + Mab295 se reduce al anterior.
15 Los inventores postulan la siguiente interpretación; Mab295 no se une a
o bloquea OSM sitio II. En concentraciones bajas en OSM, las
moléculas de anticuerpo de MAB295 solamente unen una OSM, que sin
embargo, se encuentra libre también de unirse a gp130, ya que el sitio II
se encuentra disponible. En concentraciones más altas, las moléculas
20 de anticuerpo unen dos moléculas OSM, cualquiera de las cuales se
encuentra disponible para unirse a gp130, de esta manera dando
posiblemente 2 moléculas OSM unidas para cada molécula gp130, una
unión directamente a gp130, y la otra congelada como una consecuencia
de la naturaleza bivalente del anticuerpo. Se anticipa que cualquier
25 anticuerpo OSM de no sitio II podría tener este efecto, pero ya que

Mab295 es un anticuerpo neutralizante (véase Fig. 24), debe unirse a, o bloquear la OSM sitio III. De esta manera, el uso del ensayo ELISA OSM gp130 del Ejemplo 8 y el ensayo de célula KB del ejemplo 9 permite la identificación de anticuerpos OSM neutralizantes como
5 específicos de sitio II o sitio III. Más particularmente, un anticuerpo de Sitio III neutralizará OSM en el ensayo KB pero no neutralizará la unión OSM-gp130 en el ensayo ELISA. Un anticuerpo de Sitio II neutralizará OSM tanto en el ensayo ELISA como KB.

El ensayo ELISA OSM gp130 se utilizó como una pantalla de
10 hibridoma primaria para detectar los anticuerpos generados en el Ejemplo 1 que inhibieron la interacción de gp130-OSM. Además, los hibridomas también se seleccionaron para la detección de la actividad de unión de OSM. Los sobrenadantes de hibridoma mostrando la unión alta en OSM, pero que no inhibieron la unión OSM-gp130 en el ensayo
15 ELISA del Ejemplo 8 se probaron en el ensayo de célula KB del Ejemplo 9 para la neutralización OSM. Esto identificó un número de anticuerpos OSM específicos de sitio III. Un tal anticuerpo se refiere como OM4-11.31.

Cuando los anticuerpos específicos OSM de sitio III se utilizaron
20 en el ELISA gp130-OSM, aumentaron mayormente la señal OSM según se muestra en la Fig. 25.

El anticuerpo de sitio II, 1B5 (1µg/ml) completamente inhibe la unión OSM-gp130. Sin embargo, el anticuerpo OSM de sitio III, OMR-11.3.1 origina una potenciación dependiente de dosis difásica de la
25 unión de OSM. En la concentración más alta OM4-11.3.1 utilizada la

señal es aproximadamente lo doble de la señal única de OSM, pero a medida que las concentraciones de anticuerpo se reducen, la señal aumenta, presuntamente como un resultado de la formación de complejos de anticuerpo-OSM que pueden unirse a gp130, hasta que se alcanza un valor máximo. El IgG de control de isotipo para OM4-11.31 no tuvo efecto en la unión de OSM-gp130. La Fig. 25 demuestra la gran sensibilidad de este ELISA en la discriminación de los anticuerpos específicos de sitio II vs. no sitio II, ya que el formador inhibe, pero el último mejora la unión de OSM.

10

Ejemplo 11.1 – Efecto de los anticuerpos anti-OSM específicos de Sitio II y Sitio III en ensayo ELISA OSM-gp130

Cuando los anticuerpos específicos OSM de sitio II y sitio III se mezclan juntos, los anticuerpos sitio II tienen un efecto dominante en el ELISA OSM gp130 del ejemplo 8, según se muestra en la Fig. 26.

La señal única OSM se mejora mayormente por el anticuerpo OSM específico de sitio III OM4-11.17. Mientras que esta mejora no se afecta por la adición de un IgG de control, la adición del anticuerpo OSM específico de sitio II, OM4-5.3, mayormente reduce la señal. Se cree que la señal detectable pequeña en la columna extrema derecha de la Fig. 26 se debe al tiempo de incubación sub-óptimo para el complejo OSM Sitio III y mAb sitio II antes de la adición a la placa gp130.

El ELISA OSM gp130 permite el monitoreo de la emergencia de los anticuerpos OSM específicos de sitio II en antisuero de ratones inmunizados con OSM humano (véase ejemplo 1), según se ilustra en la

25

Fig. 27a, 27b y 27c.

Después del primer empuje, se generaron anticuerpos predominantemente no sitio II, pero los anticuerpos específicos de sitio II comenzaron a emerger después del segundo empuje, y después del
5 tercer empuje, la dominancia de los anticuerpos de sitio II se observa claramente en las concentraciones de suero más altas.

Ejemplo 11.2 – Sinergia entre anticuerpos específicos de sitio II y sitio III OSM para la neutralización de OSM

10 Ya que el sitio II y sitio III de OSM son esenciales para la función de OSM, una combinación de anticuerpos que tienen como objetivo ambos sitios pueden operar sinérgicamente en la neutralización de OSM. El sitio III de OSM se utiliza no solamente para la interacción con OSMR β y LIFR sino también en la unión de una segunda molécula OSM
15 a gp130 y esto podría contribuir a la potencia aumentada por los anticuerpos específicos de sitio III, en comparación con aquellos contra el sitio II.

La Figura 28a y 28b ilustra el ensayo KB en el cual la combinación de un anticuerpo específico de sitio II y específico de sitio III aumenta
20 mayormente la potencia de la neutralización de OSM cuando se compara con cualquier anticuerpo solo.

Las concentraciones de los anticuerpos utilizados en las combinaciones se muestran en la tabla de abajo.

5

[17H100]	[15E10 hum]
ng/ml	ng/ml
20	120
7	40
2.2	13.3
0.7	4.4
0.3	1.5
0.082	0.5
0.027	0.165
0.0091	0.55

10

15

20

25

Una comparación de los anticuerpos específicos de sitio II y sitio III más activos mostró que los últimos fueron más potentes en la neutralización de OSM. Sin embargo, la reactividad cruzada de los anticuerpos de sitio II y sitio III con OSM de otra especie se encontró que era diferente, ya que todos los anticuerpos de sitio II potentes neutralizaron OSM de mono cinomólgo (en ensayos de célula KB y ELISA OSM gp130), mientras que los anticuerpos de sitio III no (solamente en el ensayo KB).

El bloqueo de la interacción de OSM tanto con gp130 como OSMR β o LIFR presuntamente se encuentra debajo de los efectos sinérgicos de los anticuerpos de sitio II y sitio III en la neutralización de OSM. Sin embargo, también es posible que la unión de un anticuerpo podría facilitar la unión de otro anticuerpo dirigido en un sitio diferente.

Ejemplo 11.3 – Optimización de la neutralización de OSM por combinación de los anticuerpos OSM específicos de sitio II y sitio III

Ya que la combinación de los anticuerpos OSM de sitio II y sitio III mayormente aumentó la potencia de neutralización, puede contemplarse

una estrategia para el desarrollo de concentraciones óptimas, en base a las afinidades de unión de los diferentes anticuerpos. El ejemplo 11.3 es teórico.

Inicialmente la afinidad de los anticuerpos específicos de sitio II y sitio III para OSM, previamente unidos por los anticuerpos específicos de sitio II o sitio III respectivamente, podría medirse utilizando la tecnología de resonancia de plasmón. Si las constantes de unión (K_d) son significativamente diferentes de la unión de los anticuerpos únicos a OSM, entonces se está presentando una interacción cooperativa en la unión de anticuerpos de sitio II y sitio III.

En base a los datos de estos estudios de unión de anticuerpos, las concentraciones de los anticuerpos de sitio II y sitio III podrían prepararse variando de 10 veces más que los valores K_d a 10 veces menos que la K_d , utilizando lo doble de diluciones. Además, las combinaciones de ambos anticuerpos podrían prepararse de tal forma que cada concentración del anticuerpo de sitio II se combina con cada concentración de anticuerpo de sitio III; permitiendo la exploración de la unión igual de los anticuerpos de sitio II o sitio III a OSM, y la dominancia en la unión de anticuerpo de sitio II y sitio III. Todas las diluciones y combinaciones de anticuerpo podrían probarse para la neutralización de OSM en un ensayo de célula KB. Los datos de este ensayo podrían permitir la selección de la combinación de anticuerpo que fue más potente en la neutralización de OSM.

Ejemplo 12 – Habilidad del anticuerpo específico de OSM de anti sitio II para inhibir la estimulación de OSM de fibroblastos sinoviales RA

Previamente, hemos mostrado que los anticuerpos de OSM
5 específicos de sitio II y sitio III pueden inhibir la estimulación de OSM
de las células KB. Sin embargo, estas células son epiteliales, se
transforman y pueden no ser representativos de las células encontradas
en el sinovio reumatoide. Por lo tanto, investigamos la eficacia de los
anticuerpos de OSM específicos de sitio II para inhibir la estimulación
10 de OSM de los fibroblastos sinoviales RA.

Los fibroblastos se cultivaron en placas de 96 cavidades a 2×10^4
células/cavidad y se cultivaron en 10% de FCS en DMEM hasta casi
confluente, reemplazando el medio 3 veces a la semana. El medio de
cultivo se cambió así al medio de cultivo fresco conteniendo, ya sea no
15 OSM, 1 ng/ml de OSM, o 1 ng/ml OSM que se había pre-incubado por 1
h con varias concentraciones de anticuerpo anti-OSM en el medio.
Después de 48 h, los sobrenadantes de cultivo se removieron y se
almacenaron a -20°C hasta el análisis de las concentraciones IL-6 por
ELISA.

20 La Figura 29 ilustra los datos representativos de las 4 cepas de
fibroblasto sinovial RA. El anticuerpo de OSM originó la inhibición
completa de secreción IL-6 estimulada por OSM, a pesar de que la
potencia del anticuerpo mostró alguna variación entre las diferentes
cepas.

Ejemplo 13 – Efecto de la glicosilación de OSM en la potencia de la neutralización por anticuerpos anti-OSM

Los anticuerpos anti-OSM se elevaron al inmunizar los ratones con OSM no glicosilado utilizando los métodos previamente descritos. La
5 selección de estos anticuerpos condujo a la identificación de un anticuerpo neutralizante potente (OM4-5.3) que interfirió con la unión OSM de gp 130, según se muestra en la Fig. 30.

Se anticipó que OM5-5.3 podría tener potencia similar contra OSM glicosilado (célula CHO glicosilada). Sin embargo, cuando se midió la
10 habilidad de un sub-clon de este anticuerpo (OM4-5.3.1) para inhibir la unión de OSM glicosilado (hOMS glicosilado por una célula CHO) a gp130, se observó una pérdida de potencia marcada, según se muestra en la Fig. 31a. Además ésta pérdida de potencia contra OSM glicosilado en comparación con OSM no glicosilado también se observó en otros
15 anticuerpos específicos de sitio II derivados de la inmunización de un ratón con OSM no glicosilado según se muestra en la Fig. 31b.

Además, los anticuerpos de sitio III derivados de las inmunización con OSM no glicosilado también mostraron un aproximado 10 veces de reducción de potencia contra OSM glicosilado en comparación con OSM
20 no glicosilado en un ensayo de célula KB – véase Tabla 1 de abajo.

Tabla 1

Anticuerpo	OSM no glic. IC50 ng/ml	OSM glic. IC50 ng/ml
OM4-11.17	4.1	45.5
OMR-11.31	7.7	89.8

25 Ya que la inmunización con OSM no glicosilado dio como resultado

los anticuerpos que fueron más potentes contra OSM no glicosilado en lugar de la forma glicosilada, consideramos que la inmunización con OSM glicosilado puede producir anticuerpos de potencia más alta contra esta forma de OSM. Esto a su vez produjo ser el caso. Las Figuras 32a y 32b ilustran la actividad contra OSM glicosilado y no glicosilado en el ELISA OSM gp130 de dos anticuerpos de OSM específicos de sitio II (15E10 y 5H2) derivados de la inmunización de OSM glicosilado.

Ejemplo 14 – Correlación entre niveles de OSM de fluido sinovial y suero en pacientes RA

Uno de los mayores sitios de producción de OSM en pacientes RA se encuentra en las articulaciones artríticas, ya que los niveles altos en OSM pueden medirse en fluido sinovial. En contraste, los niveles de suero OSM en pacientes RA son muy bajos, y solamente ha sido posible medir estos exactamente con el desarrollo de un ELISA de alta sensibilidad según se describe en el ejemplo 16 de abajo. Investigamos la posible relación entre las concentraciones de OSM en articulaciones artríticas y la circulación al medir las muestras de suero y fluido sinovial en par de los pacientes RA.

Los niveles de OSM en sueros y fluidos sinoviales según se mide por el ensayo ELISA establecido abajo (captura de anticuerpo OM4-11.31 de OSM) se muestran en la tabla de abajo, y la Figura 33 ilustra la relación entre las dos mediciones. Las muestras se congelaron siguiendo el muestreo y se descongelaron justo antes de estas mediciones. El coeficiente de correlación para estos dos parámetros,

según se determina por la regresión lineal es 0.9447.

5

Paciente	Suero [OSM] pg/ml	SF [OSM] pg/ml
1	9.8	43.24
2	13.7	101.445
3	0	0
4	88.58	397
5	22.84	142.12
6	18	147.4
7	13	9.2
8	13.8	29.88
9	10.88	14.78
10	13.8	15.98

La buena correlación entre los niveles de OSM de sueros y SF sugiere que los sitios de producción de OSM diferentes a las articulaciones artríticas tienen relativamente poca influencia en los niveles de OSM circulantes, o que estos sitios modulan la producción de OSM en manera que se correlaciona con la producción en la articulación. En cualquier caso, los inventores especulan que la correlación puede permitir la predicción de los niveles de OSM de articulación de la medición de OSM de suero y podrían encontrar la utilidad en la fijación de dosis de un anticuerpo de OSM neutralizante para el tratamiento de pacientes RA.

Ejemplo 15 – Medición de OSM en fluido sinovial (SF) y suero de los pacientes OA

Ya que la degradación de cartílago es una característica de osteoartritis y OSM, particularmente en sinergia con IL-1 y otras citoquinas pueden inducir a la ruptura del cartílago, medimos los niveles de OSM en los fluidos sinoviales y sueros de pacientes OA.

Las células se removieron de las muestras de SF por

centrifugación. Los sobrenadantes se trataron por 1 h con 0.1 U/m de hialuronidasa (Fluka, 53725) por 1 ha a temperatura ambiente después de lo cual se centrifugaron a 4000 rpm por 10 minutos. Los sobrenadantes se removieron, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80°C hasta el análisis.

Las concentraciones de OSM en OA SFs se analizaron utilizando el ensayo ELISA del Ejemplo 16 en dos experimentos mostrados en la Figura 34a y b y 35.

A pesar de que 13 de los 46 OA SFs no tenían OSM detectable, varios contuvieron OSM a niveles relativamente altos (>200 pg/ml) y las concentraciones de OSM de >1000 pg/ml se detectaron en tres muestras.

Ejemplo 15.1 – Concentraciones OSM en sueros OA

Las concentraciones altas de OSM en fluido sinovial OA fueron sorprendentes, ya que los reportes previos sugieren que los niveles de OSM en fluido sinovial OA tienden a ser inferiores que RA SF (véase Manicourt DH *et al.* (2000) Arthritis Rheum. 43(2):281-88). También medimos los niveles de OSM en sueros de pacientes OA en un ensayo clínico en varios diferentes puntos de tiempo durante un período de 12 meses utilizando el ensayo ELISA del ejemplo 16 de abajo. La Figura 36 ilustra que las concentraciones de OSM de suero fueron ya sea bajas o no detectables en estos pacientes. Sin embargo, se hizo la no correlación entre los niveles OSM en sueros y el fluido sinovial en pacientes OA a medidas que las muestras no se emparejaron.

Ejemplo 16 – ELISA sensible para detectar OSM en muestras biológicas a bajas concentraciones

Hemos desarrollado un ELISA sensible para la medición de OSM en muestras biológicas utilizando el anticuerpo de captura específico de OSM de sitio III OM4-11.31. Este ELISA permite la detección de OSM debajo de <2 pg/ml según se muestra en la Figura 37 y se ha utilizado para el análisis de las muestras de suero y fluido sinovial.

El protocolo para utilizar este ELISA con muestras de suero de fluidos sinoviales se da abajo.

10 Protocolo ELISA de OSM

MATERIALES Y REACTIVOS

- 11. Nunc Immunoplate F96 maxisorp (Life Technologies 4-39454A)
- 12. OSM anti-humano monoclonal OSM (OM4-11.31 GSK)
- 15 13. hOSM glicosilado @ 420 ug/ml (célula CHO glicosilada)
- 14. 50 µg/ml de OSM anti-humano de cabra biotinada (R&D Systems BAF295)
- 15. HRP Streptavidina (Amersham RPN4401)
- 16. PBS (SIGMA D8537 1L)
- 20 17. BSA (SIGMA A7888 500g)
- 18. 0.5% de Solución roja de fenol (SIGMA P0290 100 ml)
- 19. TMB (SIGMA T-8665 1L)
- 20. Control de suero macho normal AB agrupado (SIGMA H4522) Grupo #043K0500
- 25 21. Ácido Sulfúrico @ 1M

22. Tabletas PBS (SIGMA P4417 100 tabs.)

23. Tween 20 (Sigma P7949)

24. Selladores de placa

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

5 Preparación de placas- diluir el OSM anti-humano monoclonal a 4 $\mu\text{g/ml}$ en PBS.

Agregar 50 μl /cavidad, cubrir con banda de sellado e incubar durante la noche a 4°C.

Regulador de Lavado- a 5L de agua desmineralizada agregar 25
10 tabletas PBS + 2.5 ml de Tween 20 (0.05%).

Regulador de Bloqueo-

A 500 ml de PBS agregar 10 g de BSA (2%).

(agregar 800 μl de fenol rojo, y 5M de NaOH hasta que el pH es neutral).

Control de suero de sangre AB

15 Girar los 100 ml en centrífuga Sorvall @ 16K, 30 mins (utilizó tubos 4xOakridge balanceados a 0.02 g).

Pasar el sobrenadante a través de la gasa estéril (todavía nublado pero no particulados).

Allicuotar y congelar.

20 En el día del ensayo, descongelar el suero AB, microfugar 13K por 5 min, y diluir 1→4 en PBS.

(El suero será opaco pero es fino de utilizar).

Preparación de Estándares

Para el análisis de suero elaborar los estándares en suero AB
25 diluido 1→4 PBS.

Para el análisis de SFs elaboran los estándares en 1% de BSA en PBS.

Si se desea sensibilidad máxima:

Utilizar estándares a 112, 56, 28, 14, 7, 3.5, 1.75 y 0 pg/ml de

5 OSM.

MÉTODO

5. Lavar la placa 4x con regulador de lavado y cubrir en seco.
6. Agregar 200 µl/cavidad de regulador de bloqueo, sellar placa y agitar 2 hrs. @ TA, o estático durante la noche @+4.
- 10 7. Lavar como en la etapa 1.
8. Agregar 50 µl/cavidad de estándar o muestra. Cubrir y agitar 2 hrs. a temperatura ambiente.
- (El estándar se diluye en 25% de suero AB agrupado si las muestras de suero son para analizarse).
- 15 5. Lavar como en la etapa 1.
6. Agregar 50 µl/cavidad de OSM anti-humano blotintado diluido a 50 ng/ml en regulador de bloqueo con 1% de suero de cabra. Cubrir y agitar 1 hora a temperatura ambiente.
7. Lavar como en la etapa 1.
- 20 8. Agregar 50 µl/cavidad de streptavidina HRP 1/4000 en regulador de bloqueo. Cubrir y agitar 30 mins. a TA.
9. Lavar como en la etapa 1. -
10. Agregar 100 ul de sustrato TMB. Cubrir y agitar 40 mins. @ TA
11. Para detener el ensayo agregar 50 µl/cavidad 1M de H₂SO₄.
- 25 12. Leer inmediatamente @ 450 nm después de agitar la placa.

201

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo terapéutico que une específicamente OSM, particularmente hOSM, y modula la Interacción entre OSM y gp130.
2. El anticuerpo según la reivindicación 1 que comprende un
5 CDRH3 de SEQ.I.D.NO: 3.
3. El anticuerpo según la reivindicación 2 que además comprende;
- CDRH1 de SEQ.I.D.NO: 1
CDRH2 de SEQ.I.D.NO: 2
10 CDRL1 de SEQ.I.D.NO: 4
CDRL2 de SEQ.I.D.NO: 5
CDRL3 de SEQ.I.D.NO: 6.
4. El anticuerpo según la reivindicación 1 que comprende un CDRH3 de SEQ.I.D.NO:42.
- 15 5. El anticuerpo según la reivindicación 4 comprendiendo además;
- CDRH1 de SEQ.I.D.NO: 40
CDRH2 de SEQ.I.D.NO: 41
CDRL1 de SEQ.I.D.NO: 43
20 CDRL2 de SEQ.I.D.NO: 44
CDRL3 de SEQ.I.D.NO: 45.
6. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el anticuerpo se selecciona del grupo que comprende; intacto, quimérico, humanizado, biespecífico,
25 heteroconjugado.

202

7. El anticuerpo según la reivindicación 6, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo intacto.

8. El anticuerpo según la reivindicación 7, caracterizado porque el anticuerpo intacto es murino, rata, conejo, primate o
5 humano.

9. El anticuerpo según la reivindicación 8, caracterizado porque el anticuerpo intacto es humano.

10. El anticuerpo según la reivindicación 6, caracterizado porque el anticuerpo es quimérico o humanizado.

10 11. El anticuerpo según la reivindicación 8, caracterizado porque el anticuerpo es humanizado.

12. Un anticuerpo humanizado según la reivindicación 2, caracterizado porque los residuos 28, 29, 30, 71 y 94 de la región de estructura de cadena pesada variable del aceptor humano y las
15 posiciones 49 y 71 de la estructura de cadena ligera variable del aceptor humano se substituyen por los residuos correspondientes en la estructura de anticuerpo donador del cual se deriva CDRH3.

13. El anticuerpo según la reivindicación 12, caracterizado porque la estructura de cadena pesada humana comprende los
20 siguientes residuos (o un substituto conservativo de los mismos):

Posición	Residuos
28	S
29	L
30	T
25 71	K

94 K

y la cadena ligera humana comprende los siguientes residuos (o sustituto conservativo de los mismos)

	Posición	Residuos
5	49	E
	71	Y

14. Un anticuerpo terapéutico humanizado que une específicamente hOSM y modula la interacción entre hOSM y gp130 comprendiendo un dominio V_H de SEQ.I.D.NO: 9 y un dominio V_L de SEQ.I.D.NO: 10.

15. Un anticuerpo terapéutico humanizado que une específicamente hOSM y modula la interacción entre hOSM y gp130 comprendiendo una cadena pesada de SEQ.I.D.NO: 11 y una cadena ligera de SEQ.I.D.NO: 12.

16. Un anticuerpo terapéutico humanizado que une específicamente hOSM y modula la interacción entre hOSM y gp130 comprendiendo un dominio V_H de SEQ.I.D.NO: 48 y un dominio V_L de SEQ.I.D.NO: 49.

17. Un anticuerpo terapéutico humanizado que une específicamente hOSM y modula la interacción entre hOSM y gp130 comprendiendo una cadena pesada de SEQ.I.D.NO: 50 y una cadena ligera de SEQ.I.D.NO: 51.

18. Un anticuerpo terapéutico según cualquier reivindicación precedente comprendiendo además una región constante de cadena pesada humana seleccionada del grupo que comprende; IgA1, IgA2,

IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM.

19. Un anticuerpo terapéutico según la reivindicación 18, caracterizado porque la región constante es de un isotipo IgG por ejemplo, IgG1 o IgG4.

5 20. Un anticuerpo terapéutico según la reivindicación 19, caracterizado porque la región constante es IgG1.

21. Un anticuerpo terapéutico según la reivindicación 20, caracterizado porque la región constante se muta para volver al anticuerpo no lítico.

10 22. El anticuerpo terapéutico según cualquier reivindicación precedente, caracterizado porque dicho anticuerpo modula la interacción entre el Sitio II de hOSM y gp130.

23. Un anticuerpo terapéutico según la reivindicación 22, caracterizado porque dicho anticuerpo inhibe dicha interacción.

15 24. El anticuerpo según la reivindicación 23, caracterizado porque dicho anticuerpo bloquea dicha interacción.

25. Un fragmento de unión de antígeno del anticuerpo terapéutico de cualquier reivindicación precedente.

20 26. Un fragmento según la reivindicación 25, caracterizado porque dicho fragmento se selecciona del grupo que comprende; Fab, Fab', Fd, F(ab)₂, ScFv.

27. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno del mismo según cualquier reivindicación precedente.

25 28. Un método para tratar un paciente humano afligido con una

enfermedad o desorden en respuesta a la modulación de la interacción entre hOSM y gp130, dicho método comprendiendo la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición según la reivindicación 27.

5 29. Un método para tratar un paciente humano afligido con un desorden o enfermedad inflamatoria crónica dicho método comprendiendo la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición según la reivindicación 27.

10 30. Un método para tratar un paciente humano afligido con un desorden o enfermedad artrítica dicho método comprendiendo la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición según la reivindicación 27.

 31. Un método según la reivindicación 30, caracterizado
15 porque dicho paciente está afligido con artritis reumatoide y/o osteoartritis.

 32. Un método para tratar un paciente humano afligido con una enfermedad inflamatoria de pulmón tal como asma o COPD, dicho método comprendiendo la etapa de administrar a dicho paciente una
20 cantidad terapéuticamente efectiva de la composición según la reivindicación 27.

 33. Un método para tratar un paciente humano afligido con psoriasis, dicho método comprendiendo la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de la
25 composición según la reivindicación 27.

206

34. Un método para tratar un paciente humano afligido con un desorden o enfermedad cardiovascular tal como aterosclerosis tal método comprendiendo la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición según la reivindicación 27.

35. Un método para tratar un paciente humano afligido con sarcoma Karposi tal método comprendiendo la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición según la reivindicación 27.

36. Uso de un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad de respuesta a la modulación de la interacción entre hOSM y gp130 tal como artritis reumatoide, osteoartritis, psoriasis, asma, COPD.

37. Un medicamento comprendiendo el anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.

38. Un vector (por ejemplo, un plásmido) codificando la cadena pesada y/o cadena ligera del anticuerpo terapéutico o fragmento de unión de antígeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, el cual comprende por ejemplo un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 39 a 46.

39. Un polinucleótido codificando el dominio V_H de SEQ.I.D.NO: 9, donde dicho polinucleótido comprende (o consiste esencialmente de) SEQ.I.D.NO:17.

40. Un polinucleótido codificando el dominio V_L de SEQ.I.D.NO: 10, en donde dicho polinucleótido comprende (o consiste esencialmente de) SEQ.I.D.NO: 18.

5 41. Un polinucleótido que codifica la cadena pesada de SEQ.I.D.NO: 11, en donde dicho polinucleótido comprende (o consiste esencialmente de) SEQ.I.D.NO: 19.

42. Un polinucleótido que codifica la cadena ligera de SEQ.I.D.NO: 12, en donde dicho polinucleótido comprende (o consiste esencialmente de) SEQ.I.D.NO: 20.

10 43. Un polinucleótido que codifica el dominio V_H de SEQ.I.D.NO: 48, en donde dicho polinucleótido comprende (o consiste esencialmente de) SEQ.I.D.NO: 54.

44. Un polinucleótido que codifica el dominio V_L de SEQ.I.D.NO: 49, en donde dicho polinucleótido comprende (o consiste
15 esencialmente de) SEQ.I.D.NO: 55.

45. Un polinucleótido que codifica la cadena pesada de SEQ.I.D.NO: 50, en donde dicho polinucleótido comprende (o consiste esencialmente de) SEQ.I.D.NO: 56.

46. Un polinucleótido que codifica la cadena ligera de
20 SEQ.I.D.NO: 51, en donde dicho polinucleótido comprende (o consiste esencialmente de) SEQ.I.D.NO: 57.

47. Una célula huésped recombinante establemente transfectada o transformada que comprende el vector de la reivindicación 38.

25 48. Una célula huésped recombinante establemente

transformada o transfectada que comprende un primer vector que comprende un polinucleótido de SEQ.I.D.NO: 17 y un segundo vector que comprende un polinucleótido de SEQ.I.D.NO: 18.

49. Una célula huésped recombinante establemente transformada o transfectada que comprende un primer vector que comprende un polinucleótido de SEQ.I.D.NO: 19 y un segundo vector que comprende un polinucleótido de SEQ.I.D.NO: 20.

50. Una célula huésped recombinante establemente transformada o transfectada que comprende un primer vector que comprende un polinucleótido de SEQ.I.D.NO: 54 y un segundo vector que comprende un polinucleótido de SEQ.I.D.NO: 55.

51. Una célula huésped recombinante establemente transformada o transfectada que comprende un primer vector que comprende un polinucleótido de SEQ.I.D.NO: 56 y un segundo vector que comprende un polinucleótido de SEQ.I.D.NO: 57.

52. La célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 47 a 51, caracterizada porque dicha célula huésped es célula vertebrada.

53. La célula huésped según la reivindicación 52, caracterizada porque dicha célula es mamífera.

54. La célula huésped según la reivindicación 53, caracterizada porque dicha célula es CHO o NS0.

55. Un proceso para la fabricación de un anticuerpo terapéutico o comprendiendo la etapa de cultivar una célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 47 a 51.

209

56. Un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno que inhibe de manera competitiva la unión del anticuerpo terapéutico según la reivindicación 15 con OSM, particularmente hOSM, más particularmente con el Sitio II de hOSM en un ensayo a base de ELISA con la condición de que el anticuerpo de competencia no comprende un CDRH3 de SEQ.I.D.NO:42.

57. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de competencia según la reivindicación 56.

58. Un método para tratar un paciente humano afligido con una enfermedad o desorden en respuesta a la modulación de la interacción entre hOSM y gp130 (tal como enfermedad artrítica por ejemplo, artritis reumatoide y/o osteoartritis), en donde dicho método comprende la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición según la reivindicación 57.

59. Uso de un anticuerpo terapéutico que une específicamente la estructura de proteína de hOSM glicosilada (tal como el anticuerpo según la reivindicación 15 o 17) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o desorden seleccionado del grupo que comprende;

una enfermedad artrítica tal como artritis reumatoide, artritis de inicio juvenil, artritis psoriática, espondilitis anquilosis, psoriasis tal como enfermedad de placa crónica, enfermedad inflamatoria de pulmón tal como COPD o asma severo, MS, demencia tal como enfermedad de Alzheimer, dolor, tal como dolor inflamatorio o

neuropático, aterosclerosis, enfermedades de regulación de ciclo celular tal como cáncer (por ejemplo, próstata), mieloma.

60. Una composición farmacéutica que comprende un primer anticuerpo terapéutico que une específicamente hOSM y modula la interacción entre el Sitio II de hOSM y gp130 y un segundo anticuerpo terapéutico que une específicamente hOSM y modula la interacción entre el Sitio III de hOSM y OSMR β y/o LIFR.

61. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo terapéutico biespecífico que une hOSM y modula la interacción entre, tanto (a) el Sitio II de hOSM y gp130 como (b) el Sitio III de hOSM y OSMR β y/o LIFR.

62. Una composición farmacéutica que comprende al menos un primer antagonista que une hOSM y modula la interacción entre, tanto (a) el Sitio II de hOSM y gp130 como (b) el Sitio III de hOSM y OSMR β y/o LIFR.

63. Una composición farmacéutica que comprende al menos un primer antagonista (por ejemplo, un antagonista proteínico tal como un anticuerpo) que une gp130 y/o OSMR β y/o LIFR y modula la interacción (por ejemplo, inhibe o bloquea) la interacción entre (a) gp130 y hOSM y (b) OSMR β y/o LIFR y hOSM.

64. Un método para seleccionar un anticuerpo que une de manera putativa OSM, particularmente hOSM (por ejemplo, un anticuerpo que se ha originado contra OSM/hOSM), tal método comprende;

(a) Incubar dicho anticuerpo con OSM glicosilada,

particularmente hOSM glicosilada bajo condiciones permisivas para unión;

(b) medir la afinidad de unión de dicho anticuerpo;

5 (c) seleccionar dicho anticuerpo si dicho anticuerpo tiene una afinidad de unión mayor a 1uM, típicamente mayor a 100nM;

10 (d) proporcionar un polinucleótido que codifica dicho anticuerpo de la etapa (c) y transformar o transfectar una célula huésped mamífera con un vector que comprende dicho polinucleótido;

(e) cultivar dicha célula huésped de la etapa (d) bajo condiciones permisivas para secreción de dicho anticuerpo en el medio de cultivo;

15 (f) purificar opcionalmente el medio de cultivo de la etapa (e);

(g) incorporar el anticuerpo de la etapa (e) o (f) en una composición farmacéutica.

65. Un método para seleccionar un anticuerpo que une de manera putativa OSM, particularmente hOSM (por ejemplo, un anticuerpo que se ha originado contra OSM/hOSM), tal método comprende;

(a) incubar dicho anticuerpo con OSM glicosilado, particularmente hOSM glicosilado bajo condiciones permisivas para la unión;

25 (b) medir la afinidad de unión de dicho anticuerpo;

(c) seleccionar dicho anticuerpo si dicho anticuerpo tiene una afinidad de unión mayor a 1 uM, típicamente mayor a 100 nM.

66. El método según cualquiera de las reivindicaciones 64 o 5 65, caracterizado porque OSM se ha glicosilado por célula huésped mamífera tal como CHO.

67. El método según la reivindicación 64 o 65, caracterizado porque hOSM es hOSM glicosilada nativo.

68. El método según la reivindicación 67, caracterizado porque 10 la hOSM se ha aislado del fluido sinovial de un humano, particularmente un humano afligido con una enfermedad artrítica tal como RA.

69. Un anticuerpo identificado por el método según cualquiera de las reivindicaciones 65 a 68.

15 70. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo según la reivindicación 69 y un vehículo farmacéuticamente inerte.

71. Un anticuerpo terapéutico según la reivindicación 1 que además de ser capaz de unir hOSM también es capaz de unir cOSM.

20 72. Un método para detectar hOSM en una muestra biológica, particularmente fluido sinovial humano o suero humano, donde tal método comprende utilizar un anticuerpo Sitio III como un anticuerpo de captura en un ensayo a base de ELISA.

73. El método según la reivindicación 72, caracterizado porque 25 el ensayo a base de ELISA es esencialmente el ejemplo 16.

SEQ.ID.NO:1
NYGVH
SEQ.ID.NO:2
5 VIWRGGSTDYNAAFMS
SEQ.ID.NO:3
SPNSNFYWFYDV
SEQ.ID.NO:4
SGSSSVSYMY
10 SEQ.ID.NO:5
DTENLAS
SEQ.ID.NO:6
QQNSYPPT
SEQ.ID.NO:7
15 QVQLKQSGFGLVQPESQSLSTCTVSGFSLNYGVHVRQSPQKGLHWLGVIWRGG
STDYNAAFMERLSITKIDNERSQVFFKMSLQADDTALTYCAKEPNSNFYWFYDVW
GTGTTVTVSS
SEQ.ID.NO:8
QIVLTQSPTIMEASPGKVTHTCSGSSSVSYNYWYQKPKGSFRLLEDTENLAS
GVFARFEGSGSGTSYSLTISMEAEADAATYYCQQNSYFPTFGSGTKLEIK
20
25

SEQ.ID.NO:9

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHVRQAPGKLEWVAVIWRGG
STDYNAAFMSRPTISKDSSKNTLYLQDSLRADTAVYYCAKSPNSMFYWF'DVN
GRGTLVTVSS

5 SEQ.ID.NO:10

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYNYWYQQKPGQAPRLIEDTENTLAS
GIPARFSGSGSGTDYTLTISNLEPEDFVAVYYCQQNSYPPTFGQGTLEIK

SEQ.ID.NO:11

10 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHVRQAPGKLEWVAVIWRGG
STDYNAAFMSRPTISKDSSKNTLYLQDSLRADTAVYYCAKSPNSMFYWF'DVN
GRGTLVTVSSASTKSPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSQVHTFPFAVLQSSGLYSLSVVTVPSSELGTQTYICFVNHKPSMTKVDKKEVP
KSCDKTHTCPPCPAPFLLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFHWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIERTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELITNQVSLTCLVKGFYPSDIAVENE
HMQQPMNNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRNQQGMVFSCSVMEALEENHYT
QKSLSLSPGK

15 SEQ.ID.NO:12

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYNYWYQQKPGQAPRLIEDTENTLAS
GIPARFSGSGSGTDYTLTISNLEPEDFVAVYYCQQNSYPPTFGQGTLEIKRTVA
APSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTEQGLSSSFVTKSFNRGEC

20 SEQ.ID.NO:15

25



5

CAGGTGCAACTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCAGAGGCTGT
CCATAACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTAACTAATTATGGTGTACACTGGGT
TCGCCAGTCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTGATATGGAGAGGTGGA
AGCACAGACTACAATGCAGCTTTTCATGTCCAGACTGAGCATCACCAAGGACAACT
CCAGGAGCCAAAGTTTTCTTTAAAATGAACAGTCTACAAGCTGATGACACTGCCAT
ATACTACTGTGCCAAAAGTCCGAATAGTAACTTTTACTGGTATTTGGATGTCTGG
GGCACAGGGACCAAGGTACCGTCTCCTCA

SEQ.ID.NO:16

10

CAAAATTGTTCTCAGCCAGTCTCCAACAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGGAAGG
TCACCATGACCTGCAGTGGCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTATTGGTACCAGGA
GAAGCCAGGATCCTCCCCCAGACTCCTGATTGAAGACACATCCAACCTGGCTTCT
GGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTACAA
TCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAG
TTATCCACCCACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATCAA

SEQ.ID.NO:17

15

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCTCATTAACTAATTATGGTGTACACTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGATATGGAGAGGTGGA
AGCACAGACTACAATGCAGCTTTTCATGTCCCGATTACCATCTCCAAGGACAATT
CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGT
GTATTACTGTGCCAAAAGTCCGAATAGTAACTTTTACTGGTATTTGGATGTCTGG
GGCGTGGCACACTAGTCACAGTCTCCTCA

SEQ.ID.NO:18

20

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAGAG
CCACCTCTCCTGCAGTGGCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTATTGGTACCACAA
GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCGAAGACACATCCAACCTGGCTTCT
GGCATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTACACTCTCACCA
TCAGCAACCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAG
TTATCCACCCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAA

25

SEQ.ID.NO:19

5 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGA
GACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCTCATTAACTAATTATGGTGTACACTGGGT
CGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGATATGGAGAGGTGGA
AGCACAGACTACAATGCAGCTTTTCATGTCCCGATTCAACATCTCCAAGGACAATT
10 CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGT
GTATTACTGTGCGAAAAGTCCGAATAGTAACTTTTACTGGTATTTGGATGTCTGG
GGCCGTGGCACACTAGTCACAGTCTCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATGGGTCT
TCCCCCTGGCACCCTCTCCAAAGAGCACCTCTGGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCC
CTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACT
CCTCAGCAGCGTGGTGAACCGTGGCTTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT
15 CTGCAACGTGAATCACAGCCCGAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC
AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGG
GGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAGAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTC
CAGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCGTGAG
GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
CGCGGGAGGAGCAGTACAAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCTACCGTCTCT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCALGGTCTCCAACAAGCC
CTCCAGCCCCCAACGAGAAAACCTCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAAC
20 CACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTGAG
CCTGACCTGCTGTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAG
AGCAATGGGCAGCCGAGAAACAATAACAAGACCAAGCCTCCCGTGTGGAATCCG
AAGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ.ID.NO:20

25 GAAATTGTGTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAG
CCACCCTCTCCTGCAGTGGCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGTATTGGTACCAACA

5 GAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCGAAGACACATCCAACCTGGCTTCT
GGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTACACTCTCACCA
TCAGCAACCTAGAGCCTGAAGATTTTGCACTTTATTACTGTCAACAGTGGAGTAG
TTATCCACCCACGTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCT
GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTG
CCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTG
GAAGGTGGACAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAG
GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAG
ACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC
GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

10 SEQ.ID.NO:21
QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLHWVAVIWRG
GSTDYNAAFMSRLTISKDINSKNTLYLQDSLRADTAVYYCAKSPHSKPYWYFD
VWGRGTLVTSS

SEQ.ID.NO:40
DYNMD

15 SEQ.ID.NO:41
DINPMNGGTIDNQKFD

SEQ.ID.NO:42
GIYYYGSHYFDY

SEQ.ID.NO:43
SATSSVSVNH

20 SEQ.ID.NO:44
DTSKLAS

SEQ.ID.NO:45

25

QQWSSNPLT

SEQ.ID.NO:46

EVQLQQSGPELVKFGASVKISCTASGYIFDYNDWVRQASGKLEWIGDINPMN
GGTIDNQKFKDRATLTVDKSSSTAYMELASLTSEDVAVYYCARGIYYTGSHYFDY
WGQGTTLTVSS

5

SEQ.ID.NO:47

QIVLTQSPAIMSASPGRKVITCTSATSSVSVNMFQKKGTSFPRWITYDTSKLAS
GVPTRFSGSGSGTSYSLTISSEMAEDTATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLEIK

SEQ.ID.NO:48

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCIASGYIFDYNDWVRQAPGQKLEWIGDINPMN
GGTIDNQKFKDRATLTVDKSTSTVMELSSLSSEDVAVYYCARGIYYTGSHYFDY
WGQGTTLTVSS

10

SEQ.ID.NO:49

EIVLTQSPSSLSASVGDGVYITCSATSSVSVNMFQKKGKAPKRWITYDTSKLAS
GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVDIK

SEQ.ID.NO:50

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCIASGYIFDYNDWVRQAPGQKLEWIGDINPMN
GGTIDNQKFKDRATLTVDKSTSTVMELSSLSSEDVAVYYCARGIYYTGSHYFDY
WGQGTTLTVSSASTKQPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKHTCTCPGCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVLEFNYVDGVEVEDEAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLQNGHYTKCKVENK
ALPAPIEKTIISKAKGQPRFQVYTLPPSRDELTAHQVELTCLVKGFFYPSDIAVEN
HMQQPFENYKITTFFVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRNQQGNVFSCEVNHAEALSHY
TQESLSLSPGK

15

SEQ.ID.NO:51

EIVLTQSPSSLSASVGDGVYITCSATSSVSVNMFQKKGKAPKRWITYDTSKLAS
GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVDIKRTVA
APSVFIFFPQDEQLKSGTASVVCILLENFYPREAKVQNKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKSTYLSSTLTLSKADYKKHKVYACRVTSQGLSSFTTKSFNGEC

20

25

SEQ.ID.NO:52

5

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGA
AGATATCCTGCAAGGCCTCTGGATACATATTCAGTGAAGTACACATGGACTGGGT
GAAGCAGAGCCATGGAAAGAACTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTAATAAT
GGTGGTACTATCGACAACAGAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACA
AGTCTCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAAGCCTGACATCTGAGGACACTGC
AGTCTATTACTGTGCAAGAGGGATTATTAATACTACGGTAGTCACTACTTTGACTAT
TGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCTCA

SEQ.ID.NO:53

10

CAATTTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTTCTGCATCTCCAGGGGAGAGGGTCA
CATGACCTGCAAGTCCACCTCAAGTGTAAAGTGTATGCACTGGTTCCAGAGAGAGTCA
GTACCTCCCCCAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTACT
CGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCAATCAGTAGCATGGAGGC
TGAAGATACTGCCACTTATTACTGCCAGCAAGTGGAGTAGTAACCACTCAGGTTCCGTT
CTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

SEQ.ID.NO:54

15

GAGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
TTCTGCAAGGCATCTGGATACATATTCACCGACTACAACATGGACTGGGTGGACAGG
CCCCGGACAAAACTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTAATAATGGTGGTACTATC
GACAAACAGAGTTCAAGGACAGAGCCACCTTGACCGTGAACAGTCCACAGCACAGT
CTACTGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAG
GGATTATTAATACTACGGTAGTCACTACTTTGACTATTTGGGGCCAGGGAACTAGTCA
GTCTCTCA

SEQ.ID.NO:55

20

GAAATTTGTTGACGCAATCTCCATCTCTCCCTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCAC
CATCACTTGCAAGTCCACCTCAAGTGTAAAGTGTATGCACTGGTTCCAGAGAGAACAG
GGAAAGCCCCTAAGAGATGGATCTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTACACTCTCACCATCAGCAATCTGCAACC
TGAAGATTTTCAACTTATTACTGCCAGCAAGTGGAGTAGTAACCACTCAGGTTCCGGG
GAGGGACCAAGTGGATATCAA

SEQ.ID.NO:56

25

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGT
TTCTGCAAGGCATCTGGATACATATTCACCGACTACAACATGGACTGGGTGGACAGG

5
10
CCCCCTGGACAAAACCTTGAGTGGATTGGAGATAITDAATCCTAATAATGGTGGTACTATC
GACAAACCAGAAAGTTCAAGGACAGAGCCACCTTGACCGTAGACAAAGTCCACGAGCACAGT
CTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCCGTGTATTACTGTGCGAGAG
GGATTATTACTACGGTAGTCACTACTTTGACTATTGGGGCCAGGGAACACTAGTCACA
GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG
CACCTCTGGGGGACAGCGGGCCCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAACCGG
TGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGT
CTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCGTGCCTCCAGCAGCTT
GGGCAACCGAGACCTACATCTGCALCOTGAATCAACAGCCGAGCAACACCAAGGTGGACA
AGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAACTCAACATGCCACCGTGGCCAGCACT
GAACTCCTGGGGGACCGTCACTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCCCTCAT
GATCTCCCGAACCCCTGAGGTCACTGCGTGGTGGTGGACGTTAGCCACGAAGACCCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
CGGGAGGAGCAGTACAAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCAACAAAGCCCTCCAGCCC
CCATCGAGAAACCACTCTCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGGTGTACACC
CTGCCCCCACTCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAAGGTCAAGCTGACCTGCCTGGTCAA
AGGCTTCTATCCCAAGCAGATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAAGCCGAGAACCA
ACTACAAAGACCAAGCCTCCCGTCTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAG
CTCACCGTGGACAAAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA
TGAGGCTCTGCAACCACTACACGAGAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

SEQ.ID.NO:57

15
GAAATTTGTGACGCACTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCAC
CATCACTTGCACTGCCACCTCAAGTGTAAAGTGTCACTGACTGGTTCCAGAGAAACCAAG
GGAAAGCCCCTAAGAGATGATCTATGACACATCCAACTGGCTCTGGGGTCCCATCA
AGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTACACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACC
TGAAGATTTTGCACCTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCACTCAGCTCTGGCG
GAGGACCAAGTGGATATCAACGTACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTCTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTCTGTGTGTGCTGCTGAATTAATT
CTATCCCAAGAGAGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGACAAAGCCCTCCATCGGGTAACT
CCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC
CTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAACCA
TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ.ID.NO:61

20
25
QVQLVESHGGGVVQPGRLRLSCAAGGFSLTNYGVHNVVRQAPGKLEWVAVINRG
GSTDYNAAPMSRFTISKDWSKNTLYLQNSLRADTAIVYYCAKSPHSNFWYFD
VWGRGTLVTVSSASTKGPSVFFLAPSSKBTSGGTAALGCLVIDYFFPEFVTVENN
SGALTSGVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSBLGTQTYICNVHICPENTKVDR
KVEPKSCDKTHTCPFPAPELAGAPSVFLFPFKPDTLMISRTPKVTCTVVVDVS
HEDPKVKFHWYVDGVHVNATKPREQYNSTYRVVSVLTVLEQDNLNGKEYKC
KVENKALPAPIKTISKAKGQPREPQVYTLPPSDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESRQGPENYKTPPVLDSDGSGFFLYBKLTVDKSRWQQGNVTPSCSVMH
EALENHTYTKSLSLSPGK

SEQ.ID.NO:82

5 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCTCATTAACATAATTATGGTGTACACTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTGATATGGAGAGGT
GGAAGCACAGACTACAATGCAGCTTTTCATGTCCCGATTACCATCTCCAAGGAC
AATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACG
GCTGTGTATTACTGTGCGAAAAGTCCGAATAGTAACTTTACTGGTATTTGGAT
GTCTGGGGCCGTGGCACACTAGTCAAGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCA
TGGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCC
CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAC
TCAGGGCGCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCGGGCTGTCTACAGTCTCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCGTGCCTTCCAGCAGCTTGGGCACC
CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAACCAACCAAGGTGGACAG
AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTCCCCAGCA
CCTGAACTCGCGGGGGCACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGAC
10 ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACCGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
AGCGTCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC
AAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCC
AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAG
CTGACCAAGAACCAAGGTCAAGCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTATCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC
15 ACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

20

25



22

FIG. 1

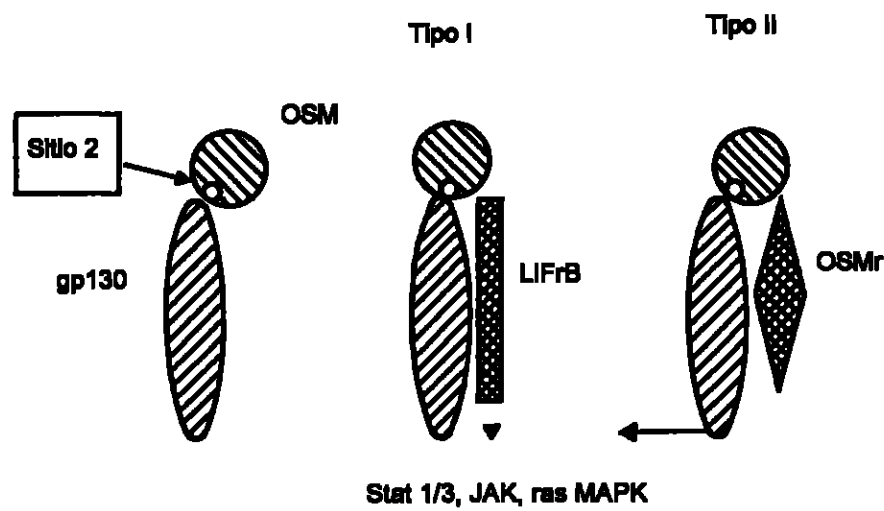


FIG.2

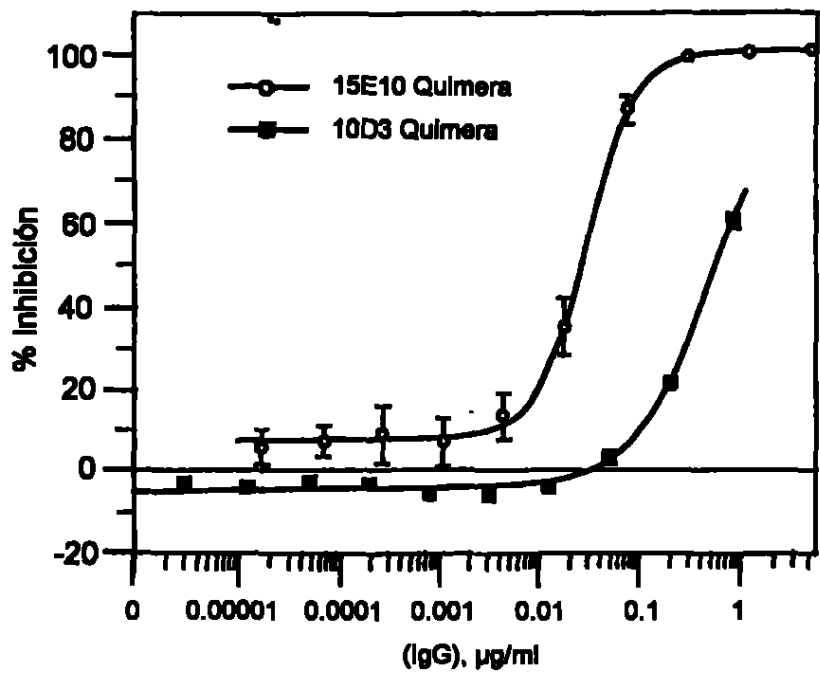
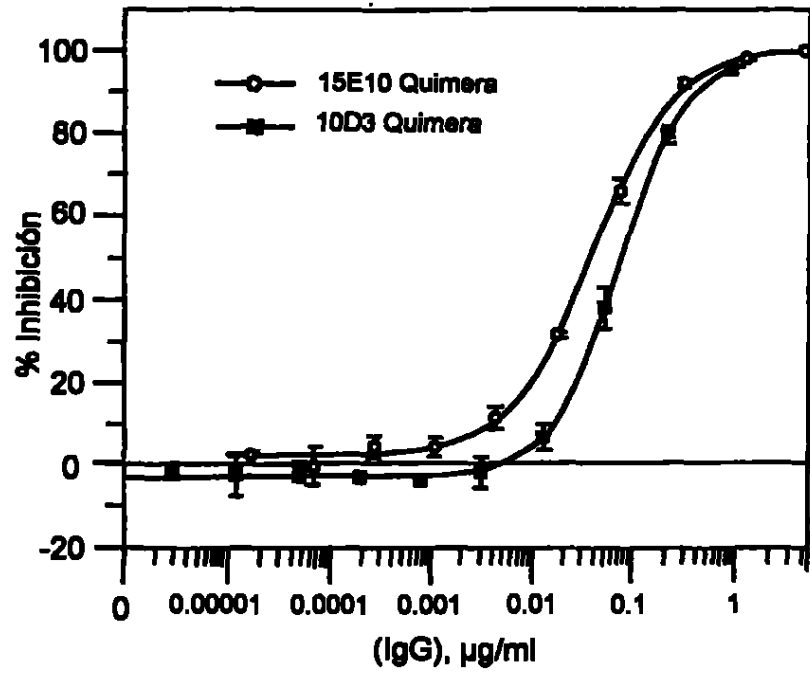
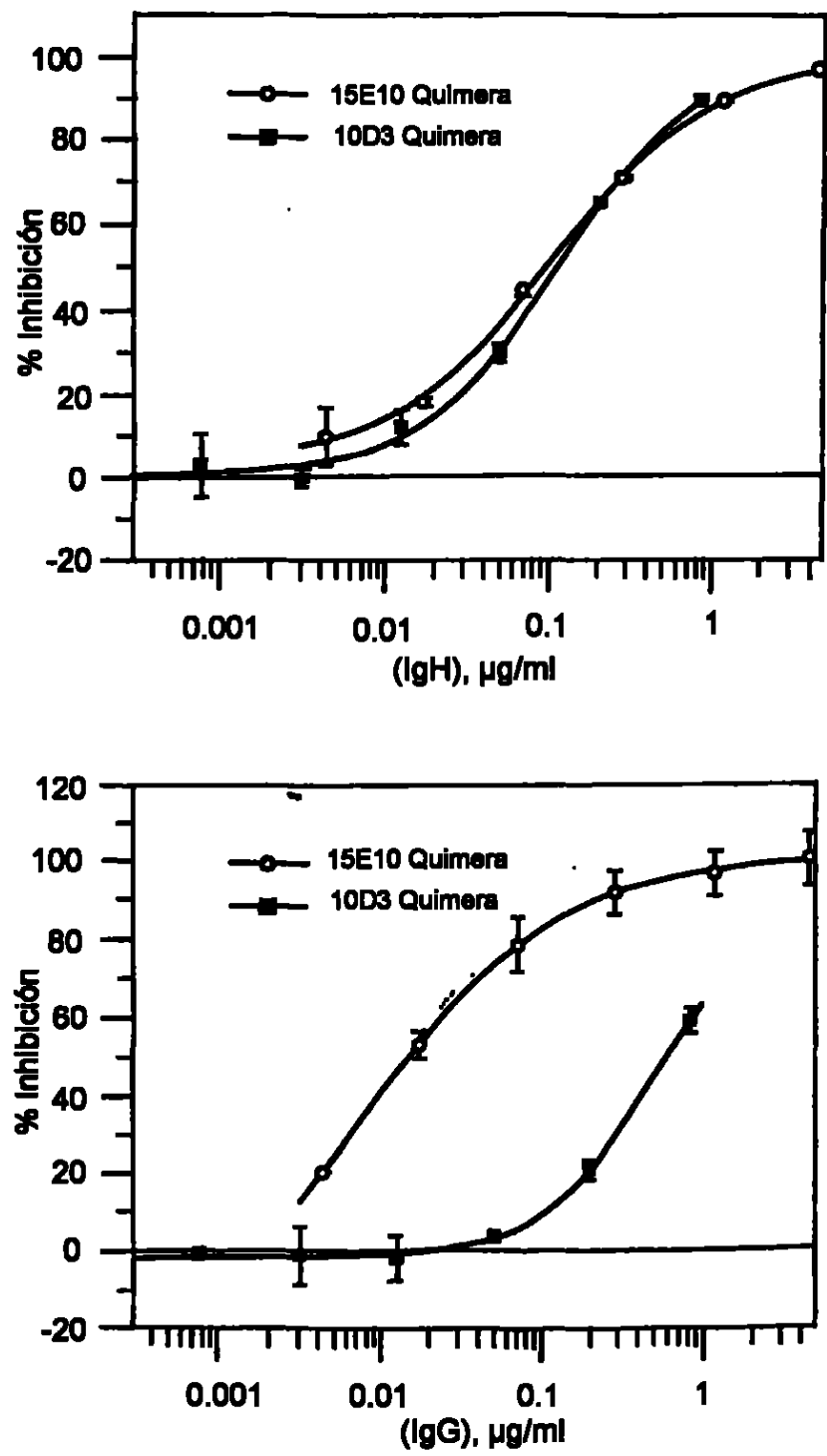


FIG. 3



225

FIG. 4

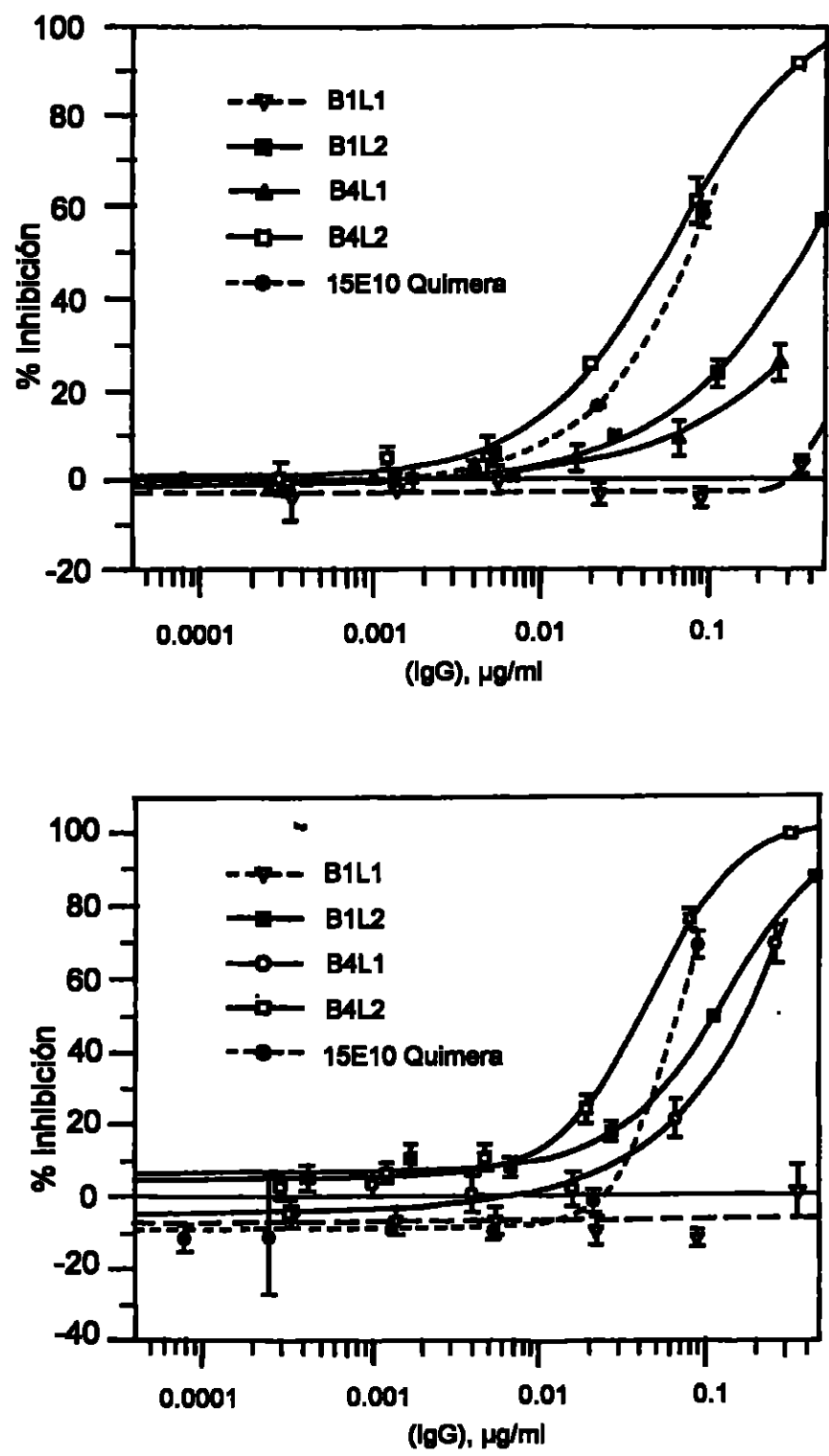


FIG. 5

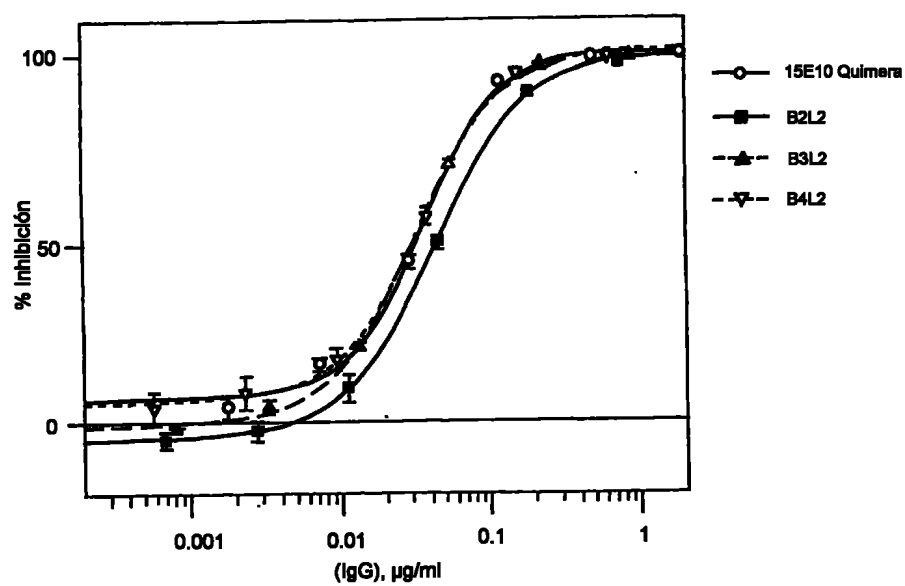


FIG. 6

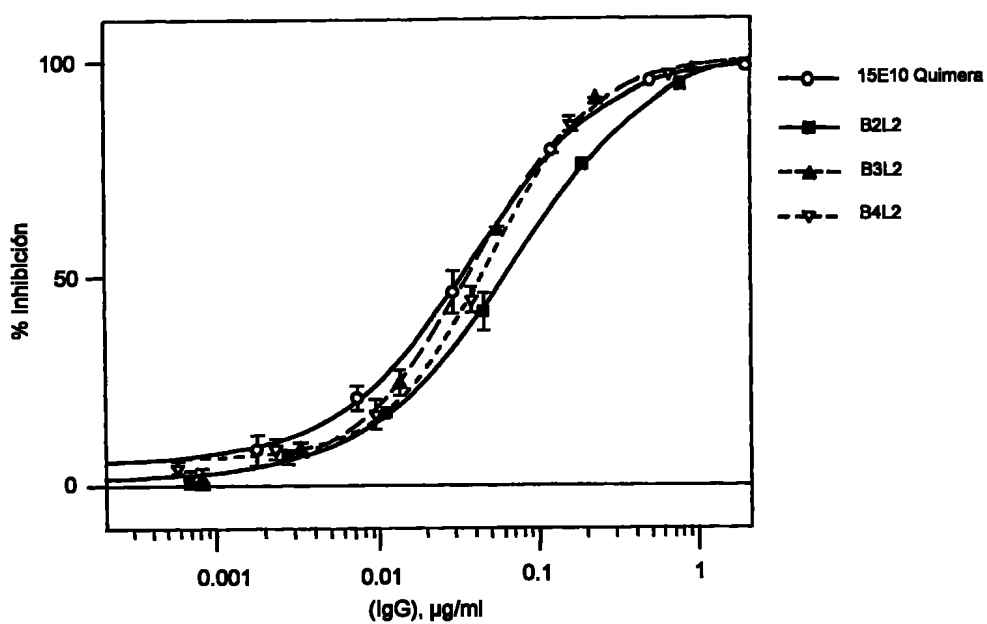


FIG. 7

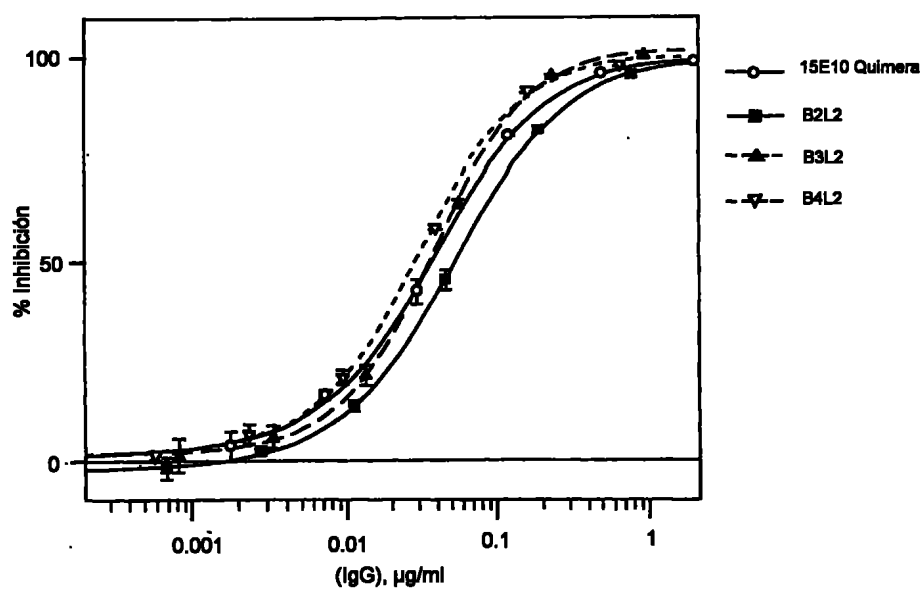
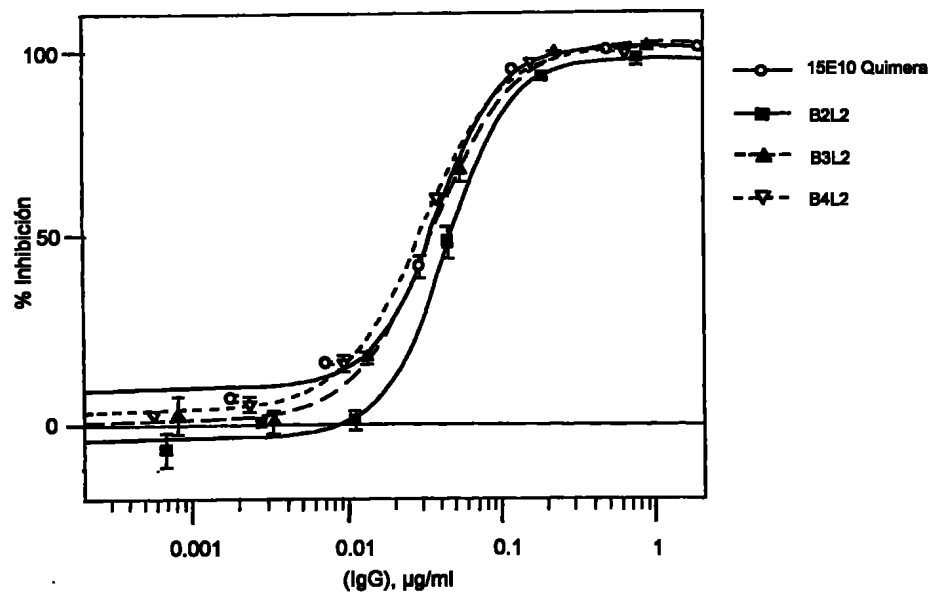


FIG. 8



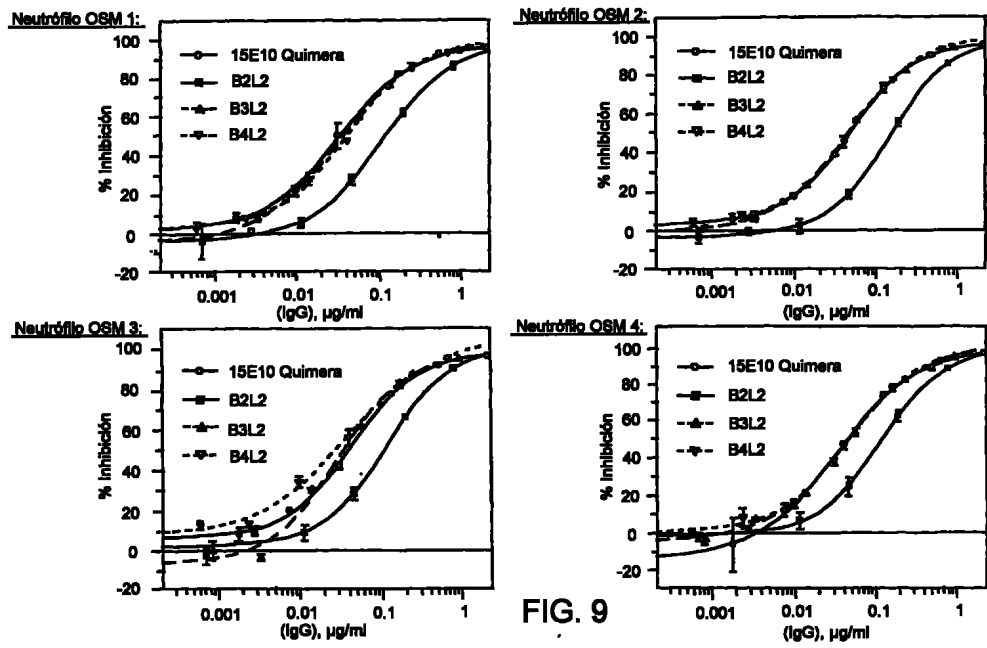


FIG.10

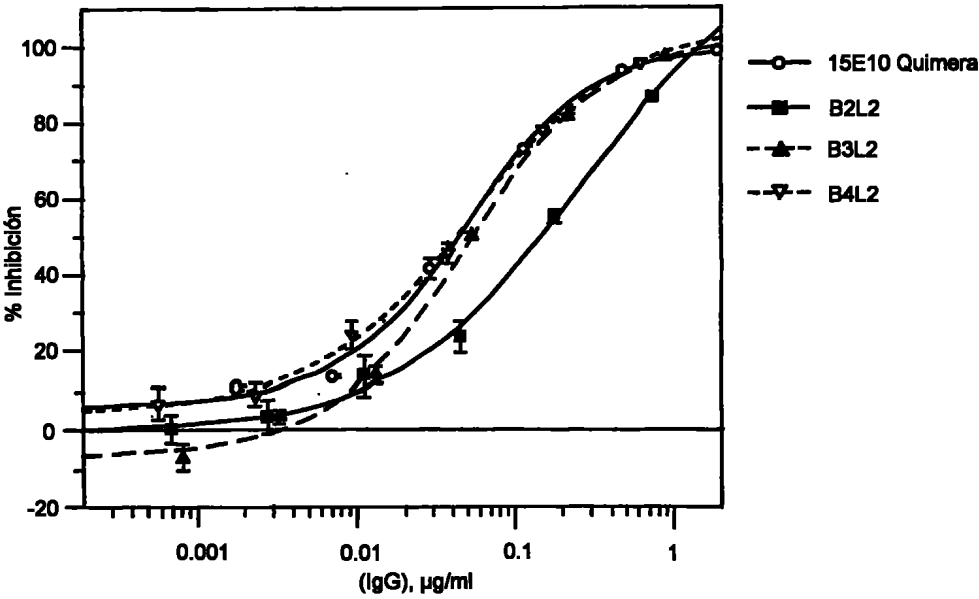


FIG. 11

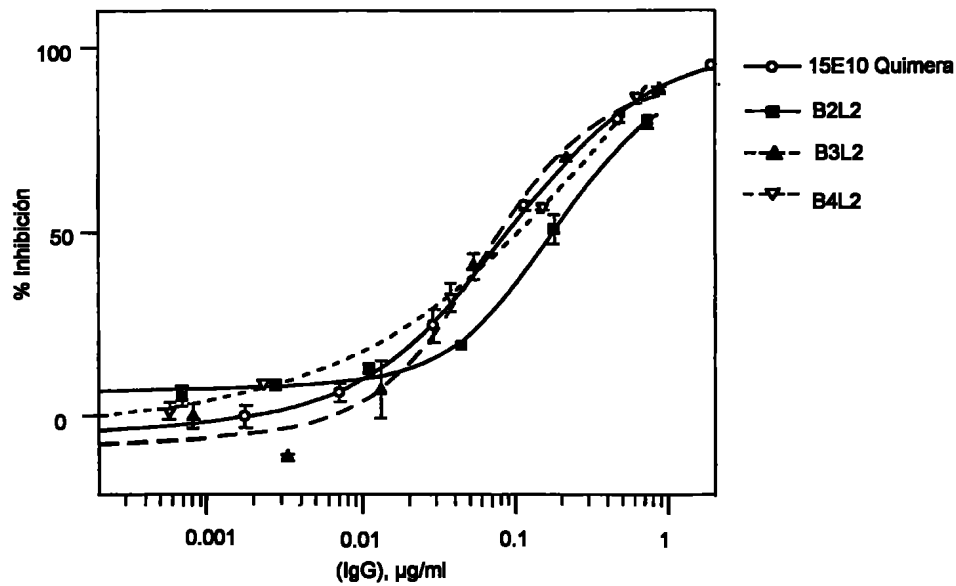


FIG. 12

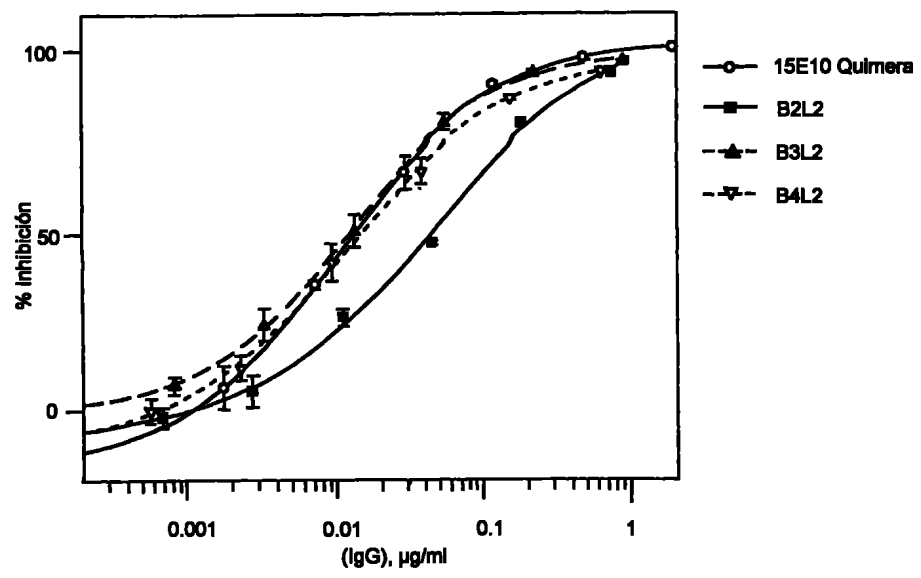


FIG. 13

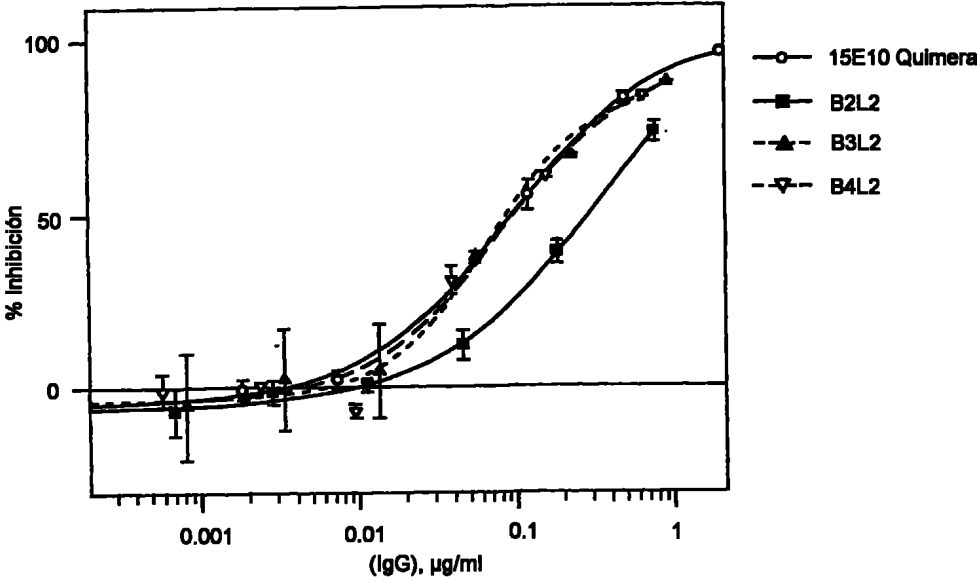


FIG. 14

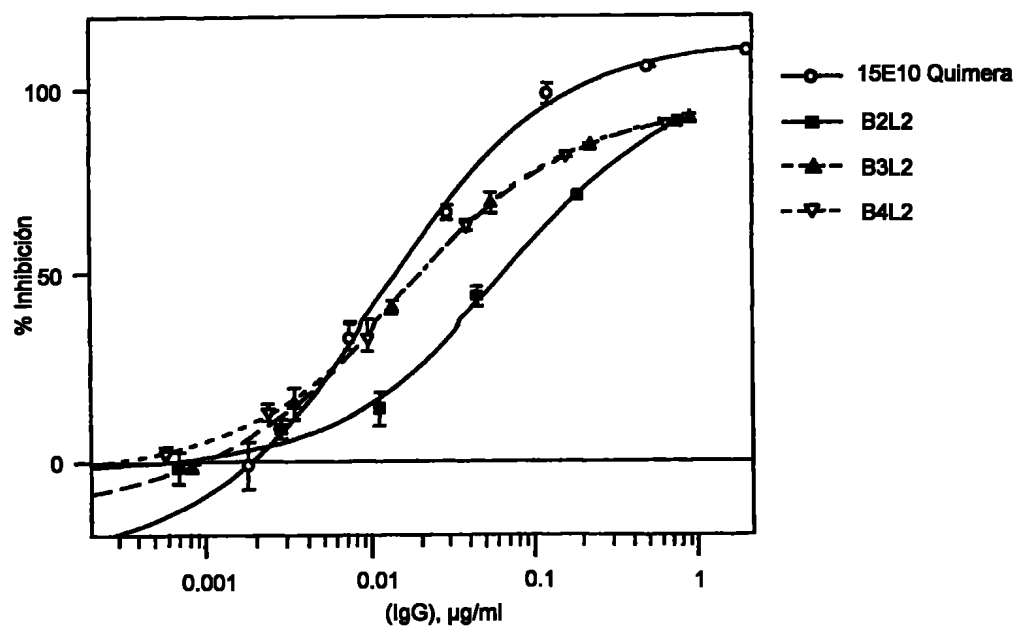


FIG. 15

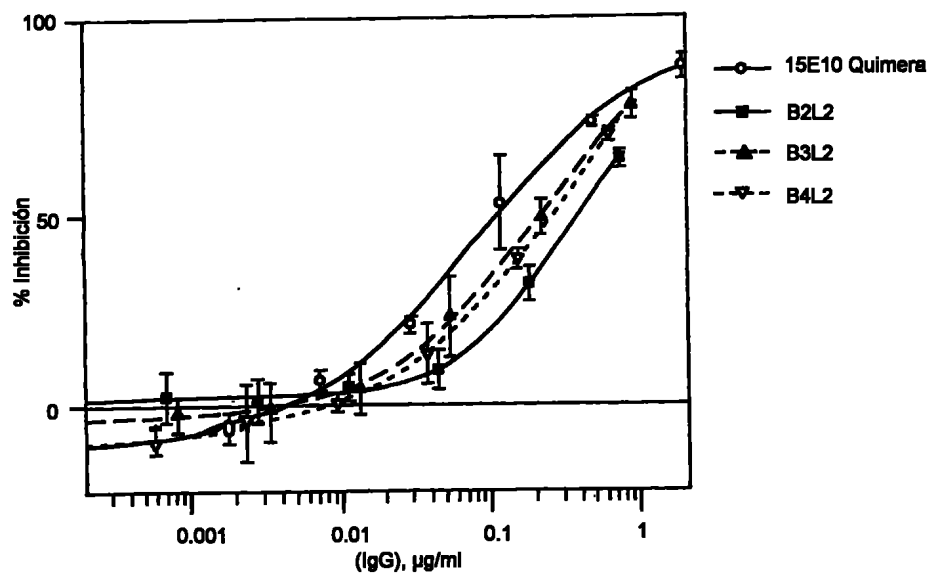


FIG. 16

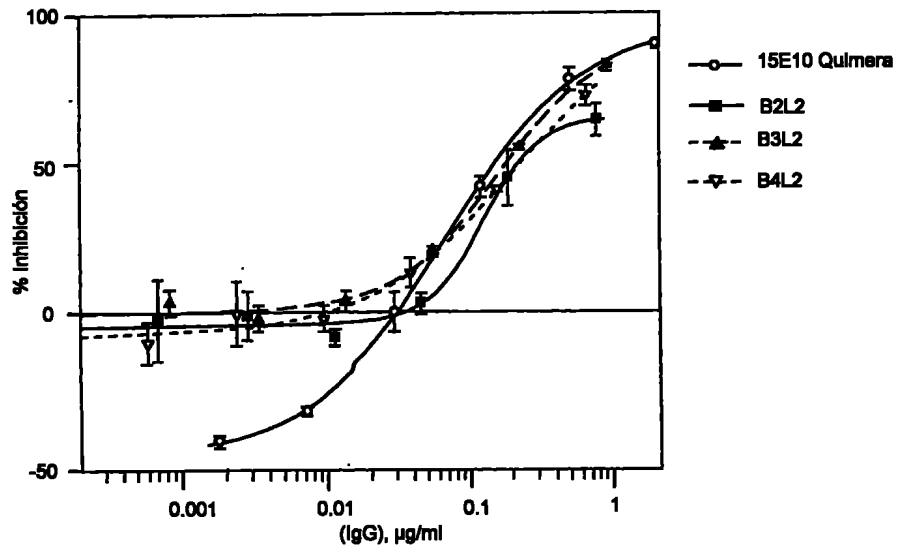


FIG. 17

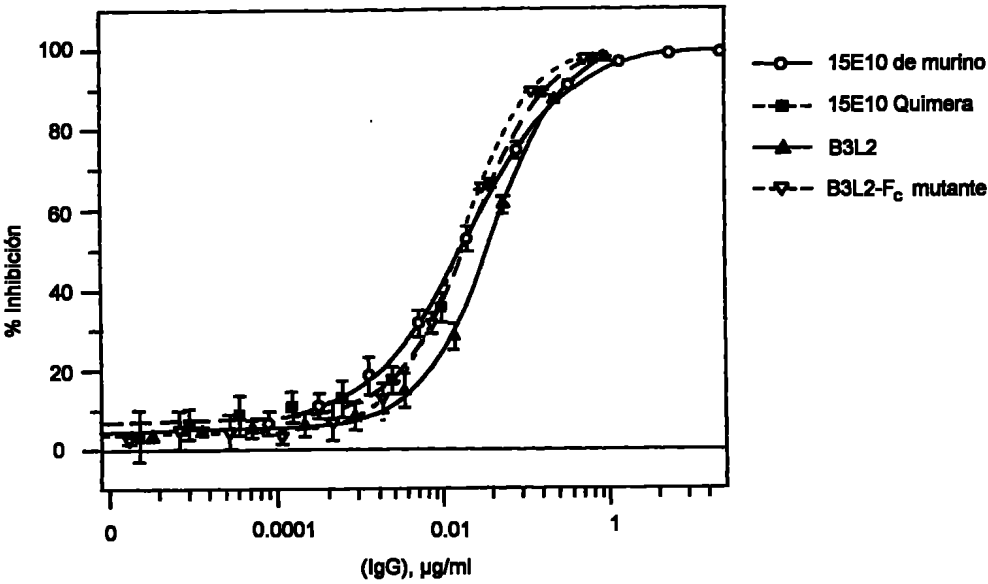


FIG. 18

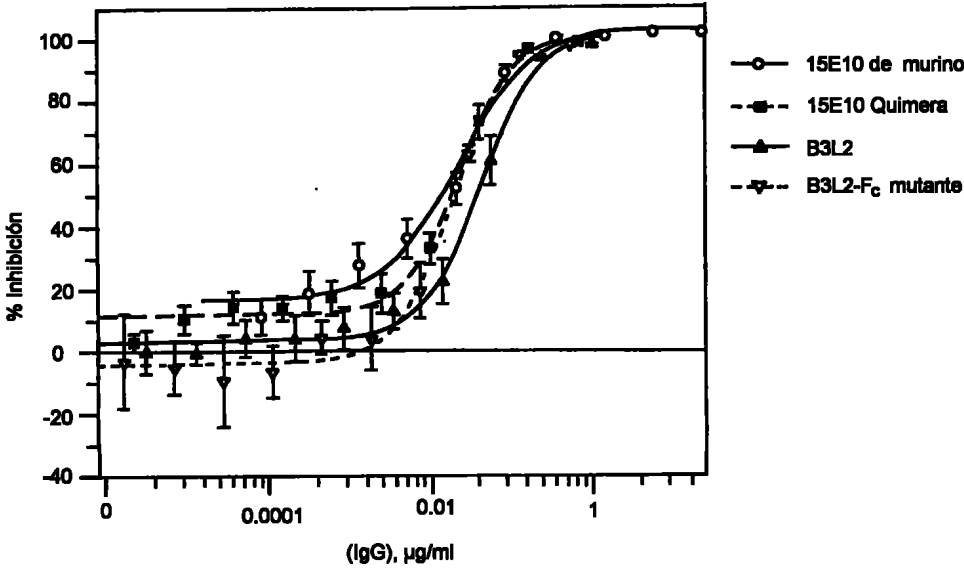


FIG. 19

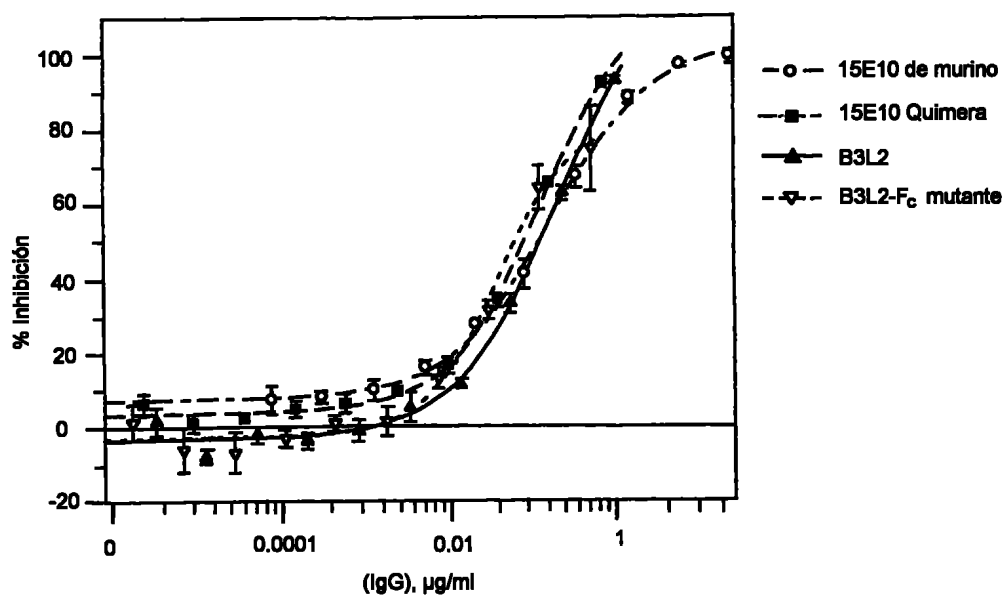


FIG. 20

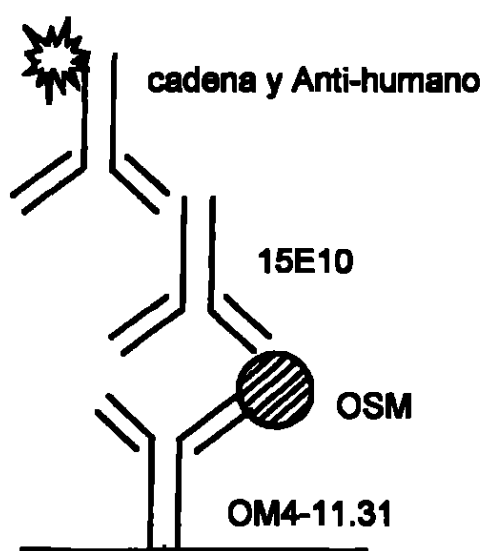


FIG. 21

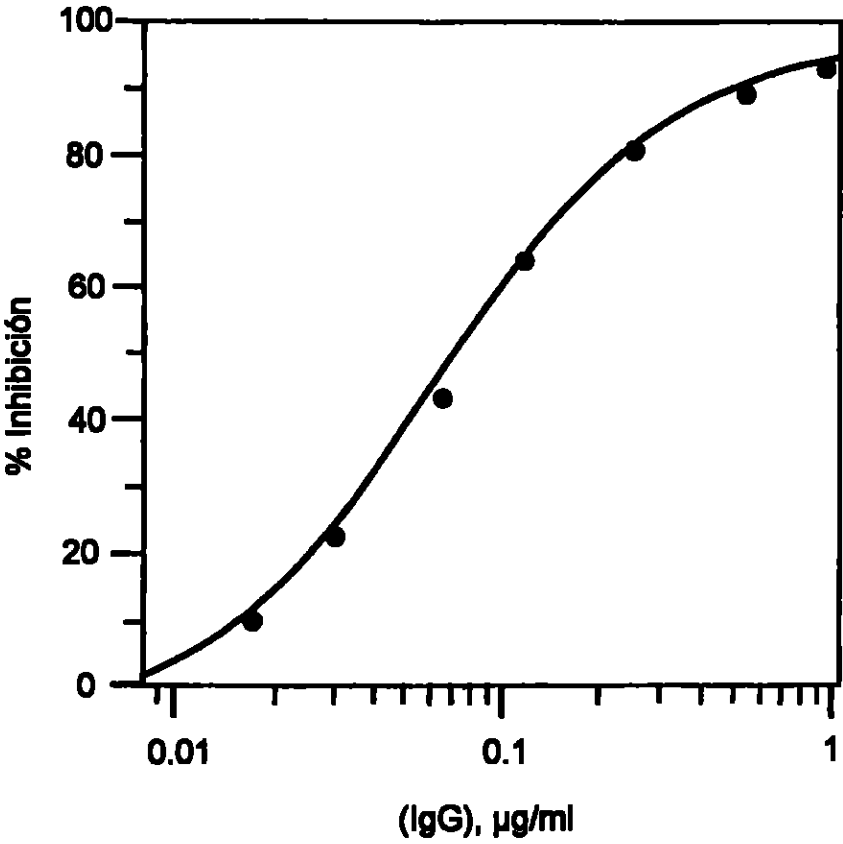


FIG. 22

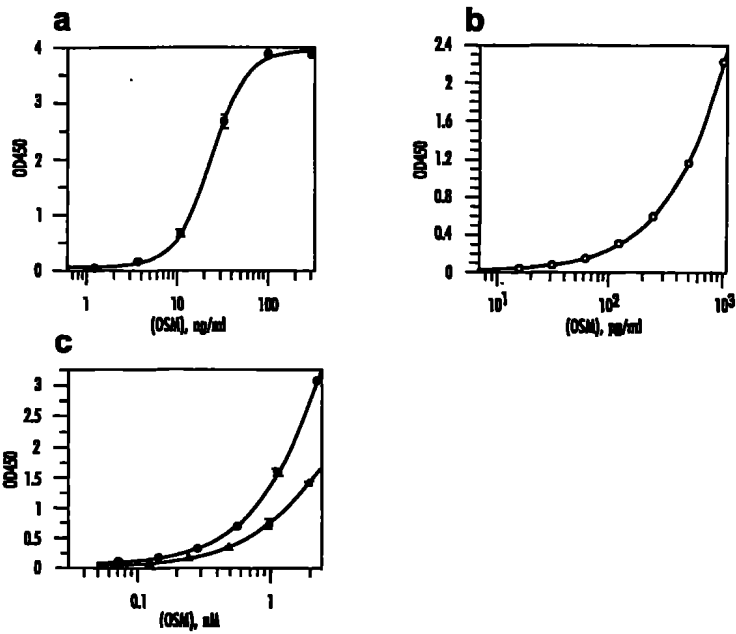


FIG. 23

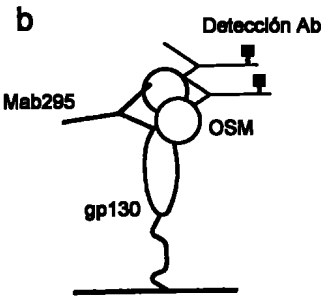
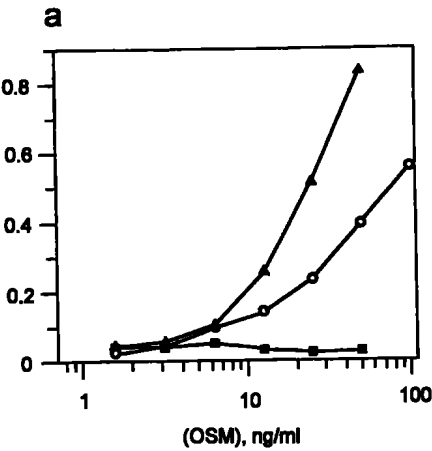


FIG. 24

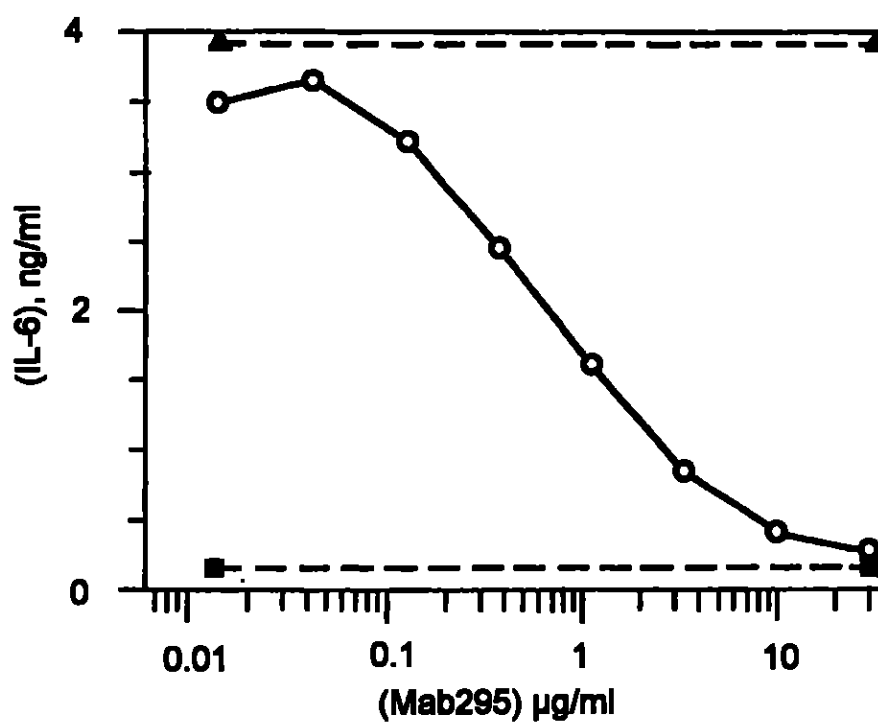
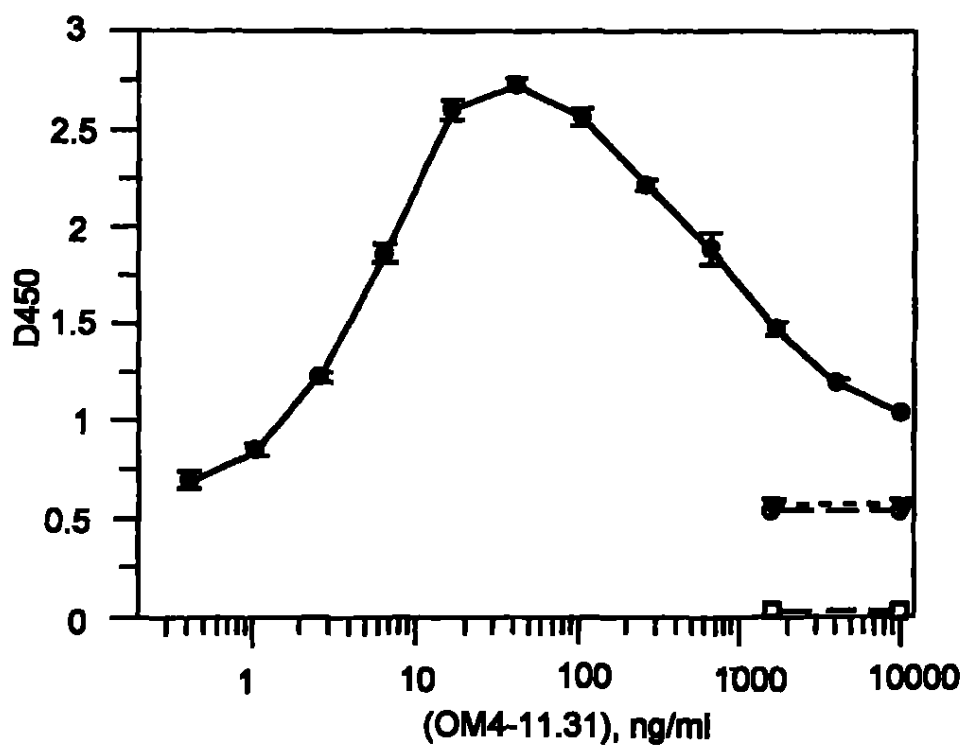


FIG. 25



242

26/37

FIG. 26

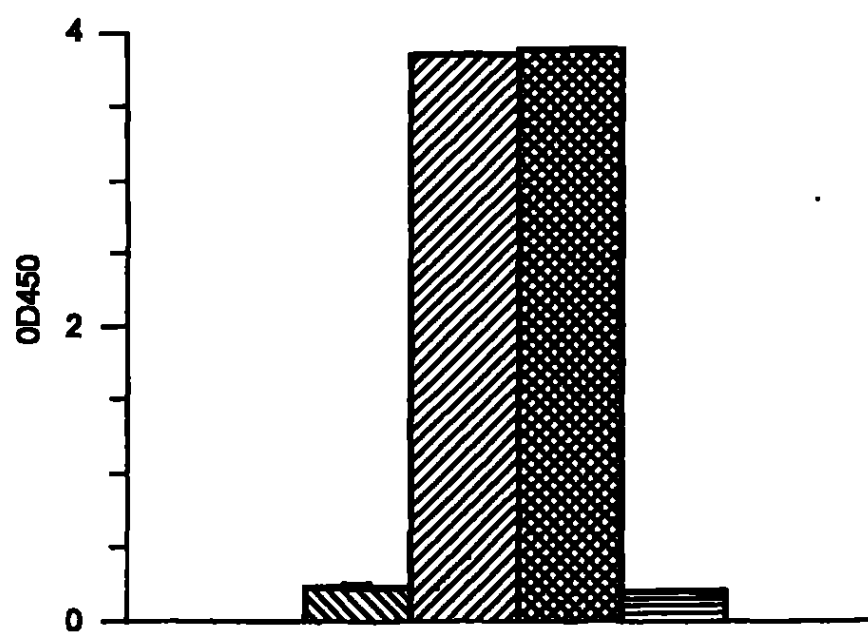


FIG. 27

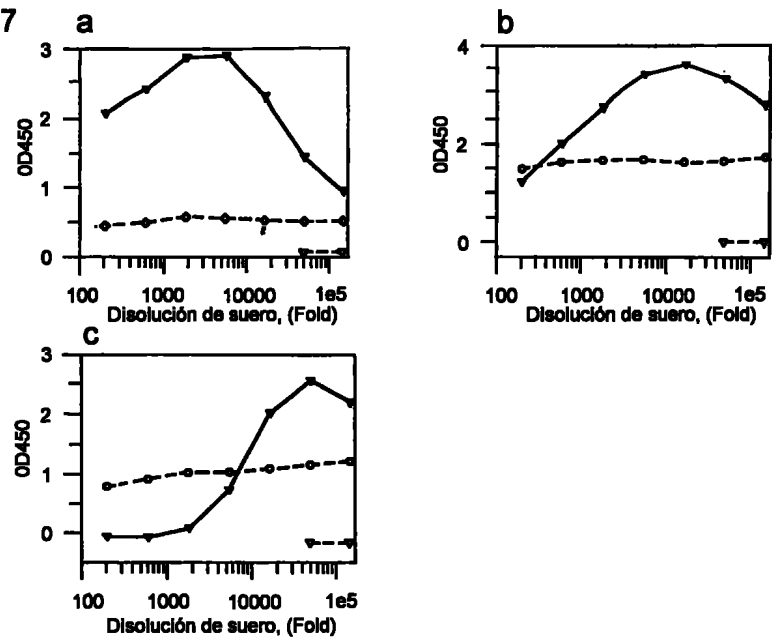
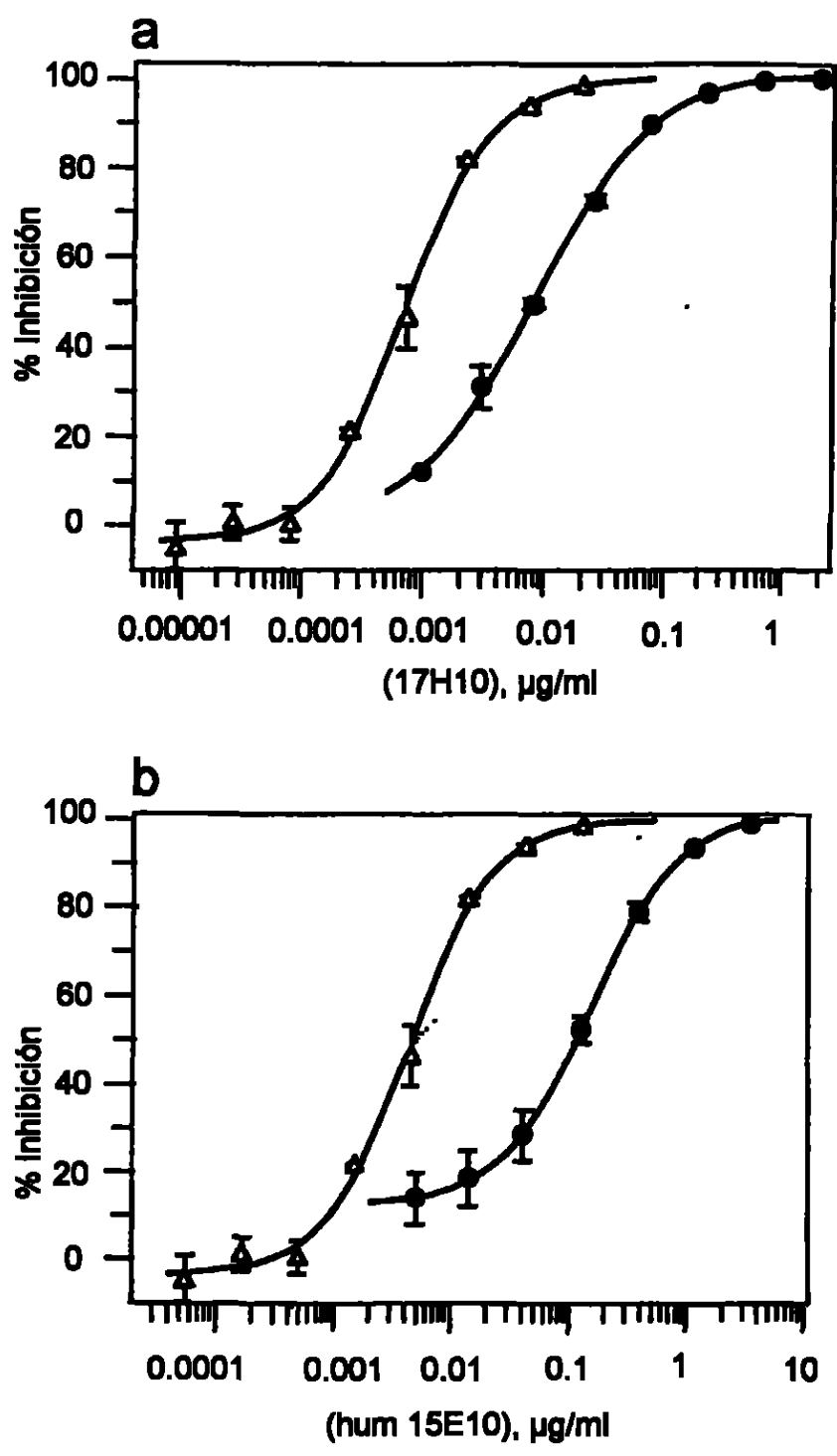
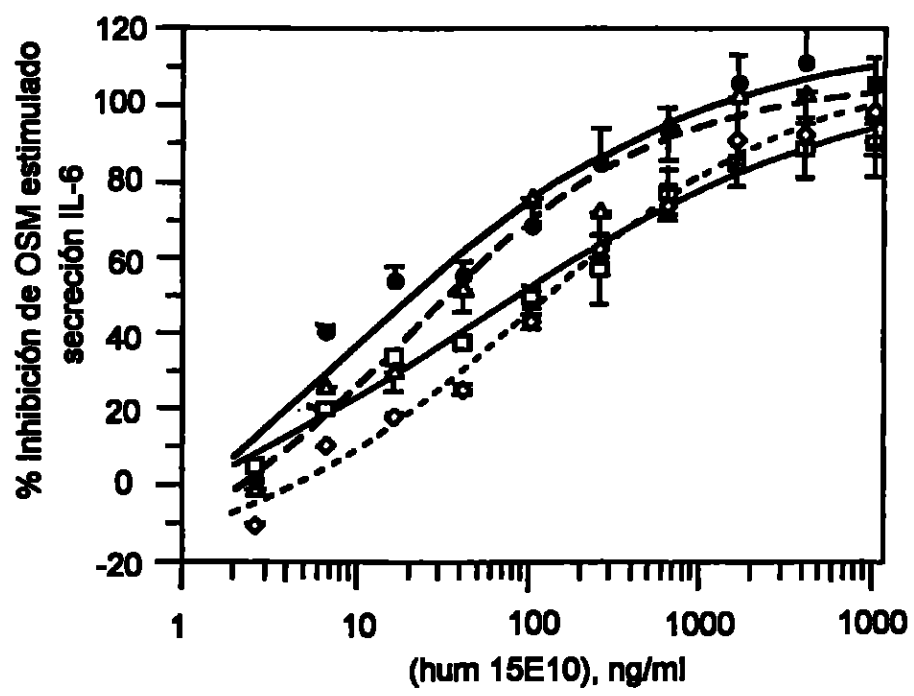


FIG. 28



250

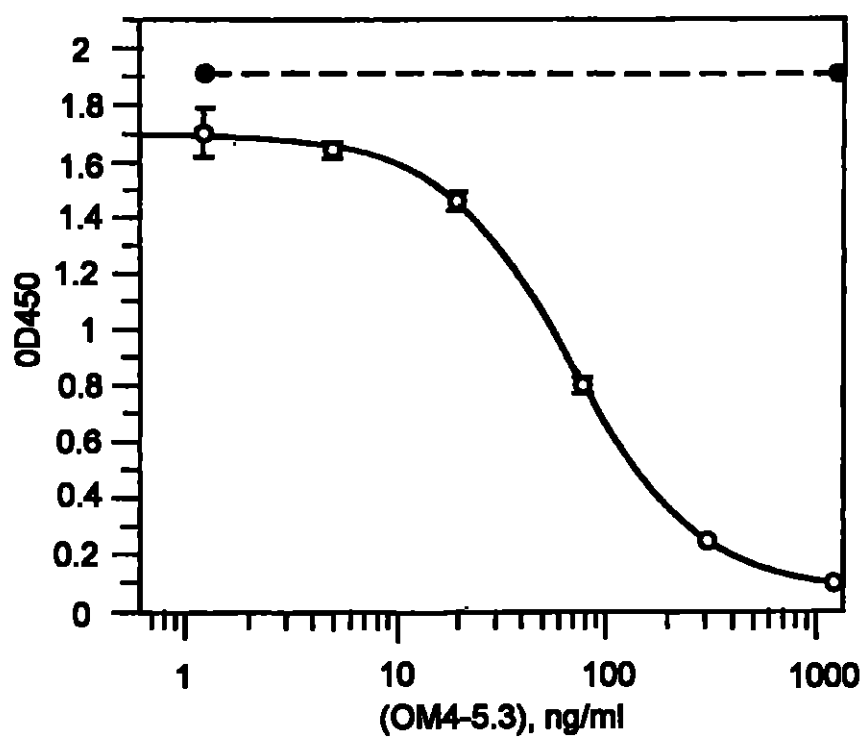
FIG. 29



251

30/37

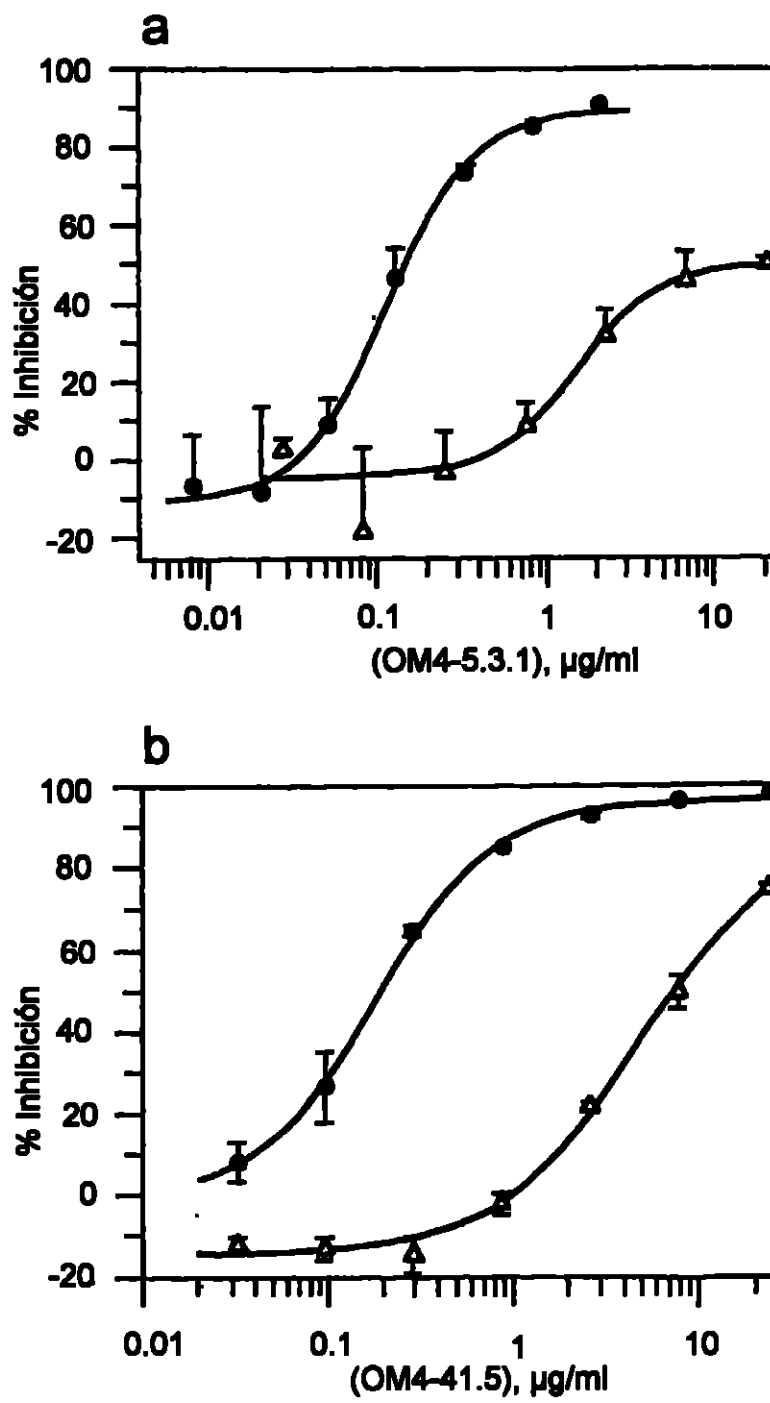
FIG. 30



82

31/37

FIG. 31



253

32/37

FIG. 32

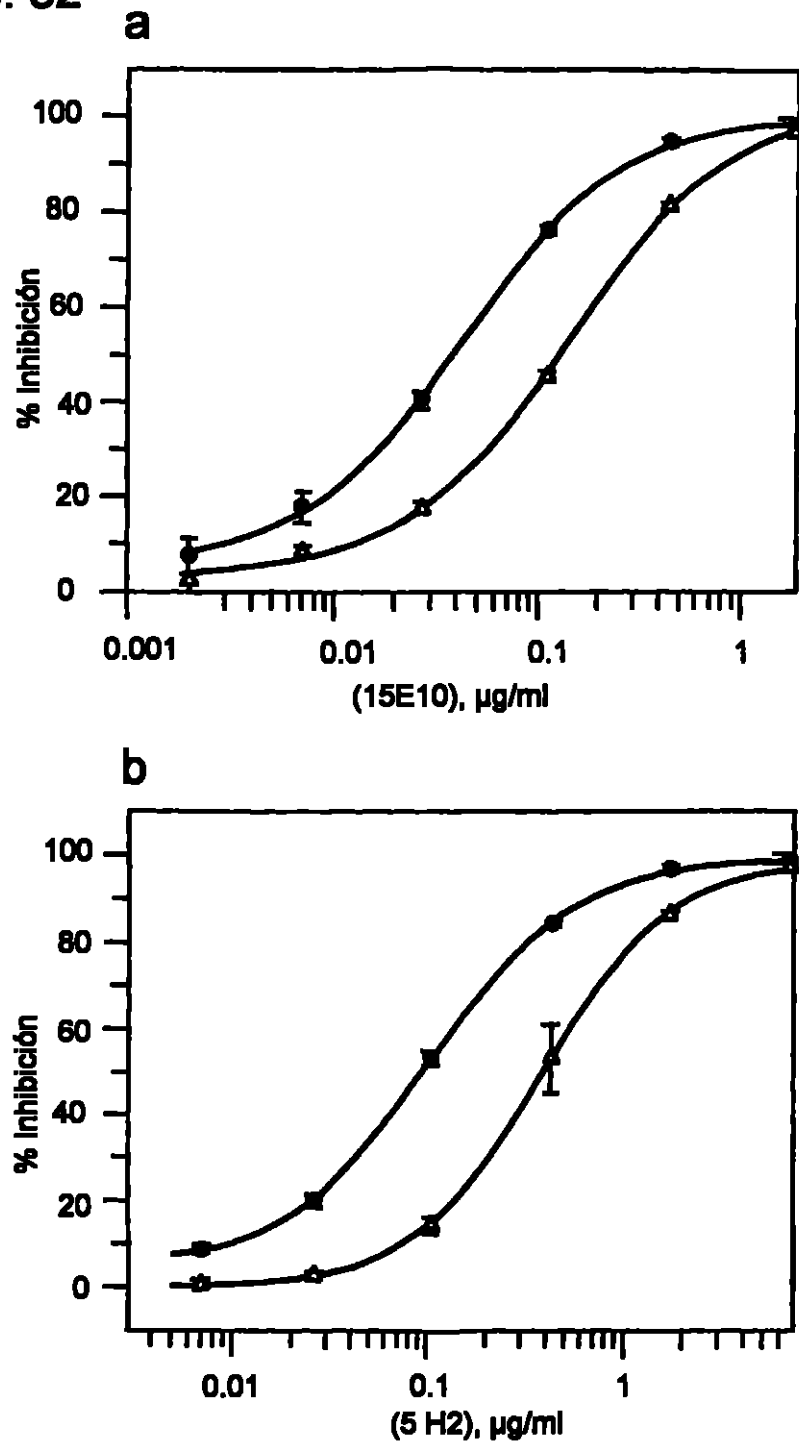
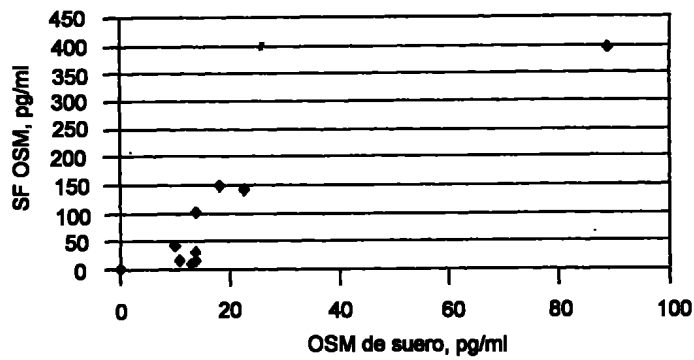


FIG. 33



255

FIG. 34

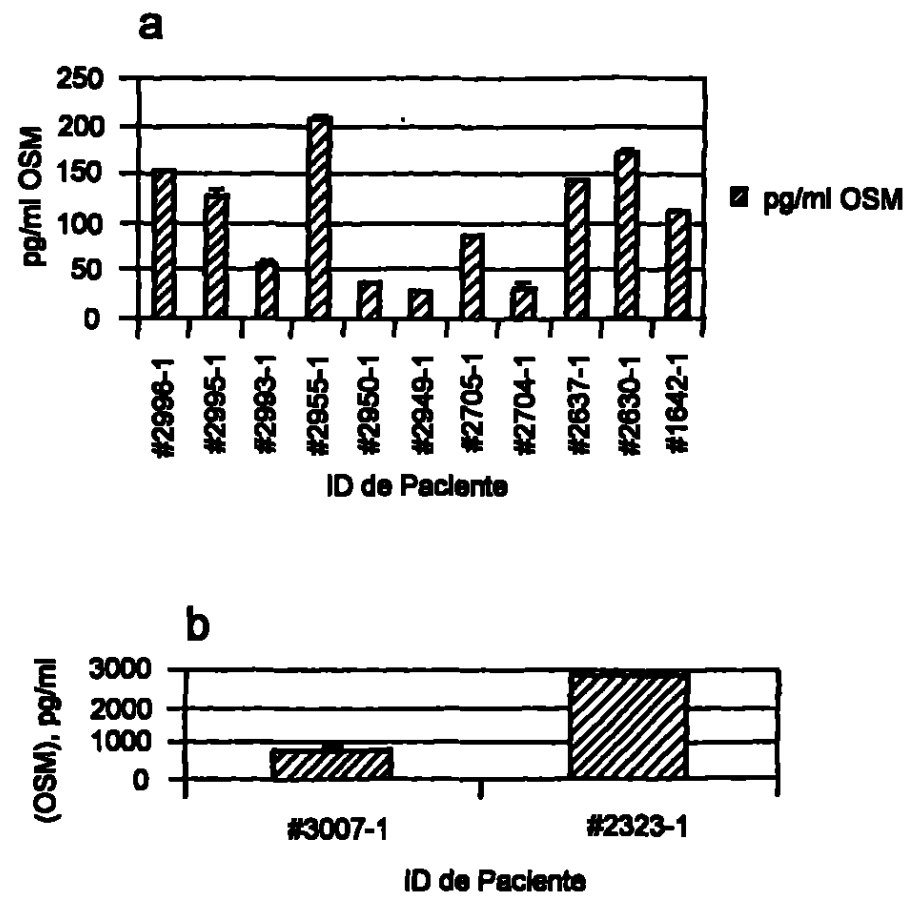


FIG. 35

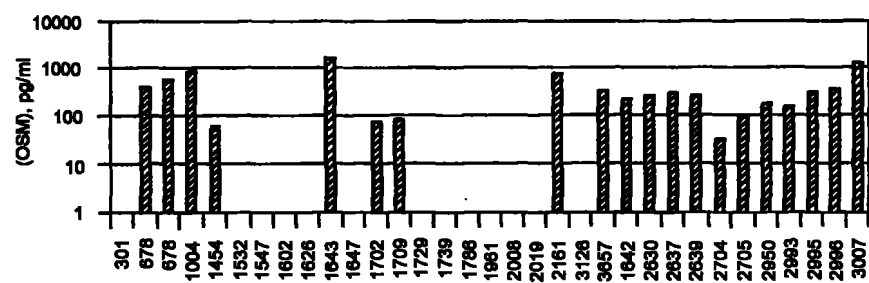


FIG. 36

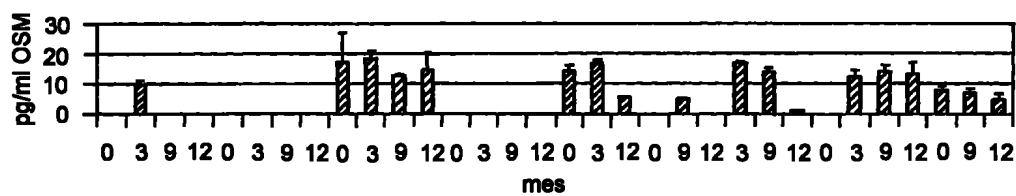
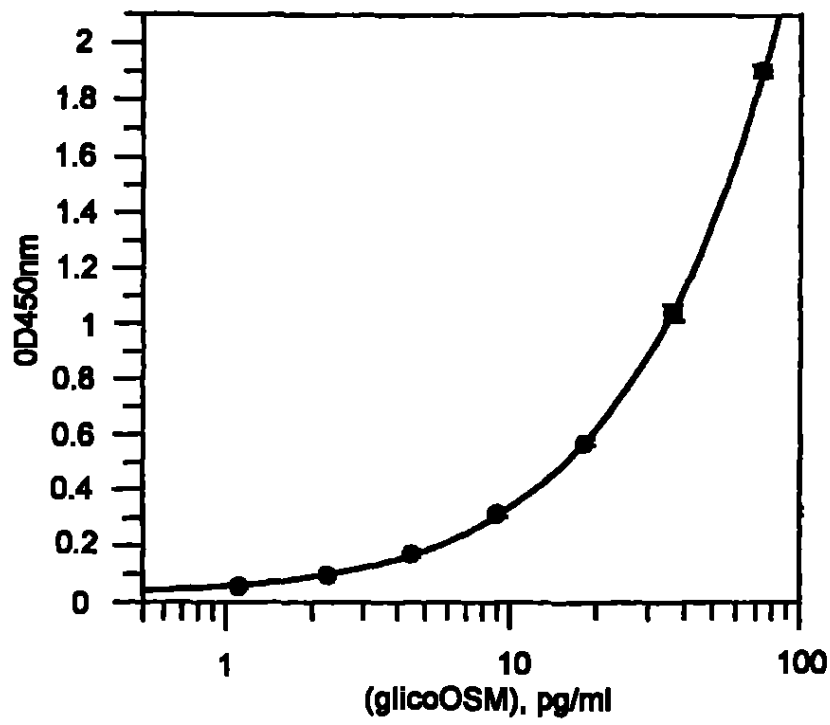


FIG. 37



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-098610- 00000-0000
Fec: 2008-09-29 17:29:53 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEIYII
Eve: 370 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION

Folios: 258



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒ 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒ 1
- ◆ Descripción de la invención ☒ 41
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒ 222
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒ 2

COMPLETA ☒ INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

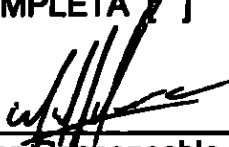
- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐ INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐ INCOMPLETA ☐



Firma Responsable

Fecha 29 de sep

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

260

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-098510- -00000-0000
Fee: 2008-09-28 17:29:53 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTE/II
Eve: 378 FASE NACIONAL
Aut 411 PRESENTACION Folios: 258

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL: 30-10-06

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)

Nombre: GLAXO GROUP LIMITED
Dirección: Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford Middlesex U86 0NN, Inglaterra.
Nacionalidad o Domicilio: Middlesex, Inglaterra.
Lugar de Constitución: Inglaterra y Gales.
Teléfono: 3284270 Fax: 6068701
E-mail: jllico@lloredacamacho.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT. ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE.
Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia
Teléfono: 3284270 Fax: 6068701
E-mail: jllico@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT. ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.890.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: ELLIS, Jonathan, Henry; EON-DUVAL, Alexandre; GERMASCHESKI, Volker; PLUMPTON, Christopher; RAPSON, Nicholas, Timothy y WEST, Michael, Robert.
Dirección: GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY y c/o GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage Hertfordshire SG1 2NY.
Nacionalidad o Domicilio: Reino Unido.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/GB2005/001147 Fecha: 28/03/05
Publicación Internacional No. WO 2005/095457 A3 Fecha: 13/10/05

⑥

Título (54)

"INMUNOGLOBULINAS"

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 16/24

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
GB	30/03/04	0407197.3
GB	30/03/04	0407193.2

⑨

Comprobante de Pago No. 06-71.054

Fecha: 14 de Septiembre de 2006

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo terapéutico que une específicamente OSM, particularmente hOSM, y modula la interacción entre OSM y gp130.

2. El anticuerpo según la reivindicación 1 que comprende un CDRH3 de SEQ.I.D.NO: 3.

3. El anticuerpo según la reivindicación 2 que además comprende;

CDRH1 de SEQ.I.D.NO: 1

CDRH2 de SEQ.I.D.NO: 2

CDRL1 de SEQ.I.D.NO: 4

CDRL2 de SEQ.I.D.NO: 5

CDRL3 de SEQ.I.D.NO: 6.

4. El anticuerpo según la reivindicación 1 que comprende un CDRH3 de SEQ.I.D.NO:42.

5. El anticuerpo según la reivindicación 4 comprendiendo además;

CDRH1 de SEQ.I.D.NO: 40

CDRH2 de SEQ.I.D.NO: 41

CDRL1 de SEQ.I.D.NO: 43

CDRL2 de SEQ.I.D.NO: 44

CDRL3 de SEQ.I.D.NO: 45.

6. El anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el anticuerpo se selecciona del grupo que comprende; intacto, quimérico, humanizado, biespecífico, heteroconjugado.

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
GLAXO GROUP LIMITED

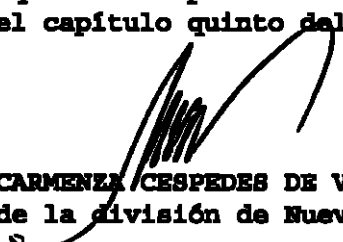
REFERENCIA	Radicación No.	06 98610
	Solicitud internacional	PCT/GB2005/001147
	Fecha inicio fase nacional	30/10/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	JJC 13588

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMEN CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 24 NOV. 2006 aalvarado