

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 337 224**

21 Número de solicitud: 200801766

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **11.06.2008**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2010**

Fecha de la concesión: **07.02.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **17.02.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
17.02.2011

73 Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 40%)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital de La Princesa (Titular al 60%)

72 Inventor/es: **Llorente Gómez, Mercedes;**
Fernández Ruiz, Elena;
Galán Díez, Marta;
Kremer Barón, Leonor y
Casasnovas, José María

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Anticuerpo anti-Dectin-1 humano, hibridoma productor de dicho anticuerpo y sus aplicaciones.**

57 Resumen:

Anticuerpo anti-Dectin-1 humano, hibridoma productor de dicho anticuerpo y sus aplicaciones.

La presente invención consiste en el hibridoma MGD3 y el anticuerpo monoclonal producido por él (denominado también MGD3), que reconoce de forma específica al receptor de membrana Decti-1 humano. El anticuerpo MGD3 es capaz de inhibir la unión de Dectin-1 a su ligando natural, los β -glucanos que son componentes de la pared de los hongos. Además, bloquea específicamente la unión a *Candida albicans* así como la secreción de citoquinas inducidas por la misma. El anticuerpo MGD3 obtenido permite la detección *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de la proteína humana Dectin-1. Del mismo modo, puede emplearse para detectar el nivel de expresión del receptor en leucocitos humanos y para definir el papel de este receptor en la patogenia de enfermedades autoinmunes y de condiciones caracterizadas por inflamación crónica así como para conocer el efecto terapéutico de distintos agentes anti-inflamatorios e inmunosupresores. Además, el anticuerpo MGD3 podría tener potencial terapéutico en enfermedades inflamatorias crónicas.

ES 2 337 224 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti-Dectin-1 humano, hibridoma productor de dicho anticuerpo y sus aplicaciones.

5 Estado de la técnica

La respuesta inmune innata es la encargada del reconocimiento y contención inmediatos de la invasión microbiana y dirige la respuesta adaptativa contra los patógenos a través del control del crecimiento de los mismos, de la expresión de moléculas co-estimuladoras en los fagocitos, de la presentación antigénica y de la producción de citoquinas y quimioquinas. Estos factores regulan el tráfico de los leucocitos iniciando la respuesta inflamatoria, activan las capacidades microbicidas de los fagocitos y dirigen la polarización de las células T cooperadoras. La respuesta inflamatoria sirve para limitar la infección, pero la inflamación tiene que resolverse para evitar procesos patológicos. En este sentido, se ha propuesto que la producción de citoquinas inhibitorias como la interleuquina (IL)-10 por los neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DCs) y células T reguladoras, tiene un papel importante en las fases tardías de la infección para prevenir una activación excesiva de la respuesta innata y el establecimiento del comensalismo y quizá de la latencia y persistencia del patógeno (Romani 2004).

En la respuesta inmune innata, el reconocimiento de los patógenos se lleva a cabo por las células fagocíticas a través de los receptores de patrones de reconocimiento (PRR, *Pattern Recognition Receptor*) que detectan estructuras microbianas altamente conservadas. El prototipo de PRR son los TLR (*Toll-like receptors*), pero recientemente se ha demostrado que también receptores de la familia de las lectinas como Dectin-1 pueden funcionar como PRRs (Akira y Takeda 2004; Gordon 2002; Brown 2005). El receptor de membrana Dectin-1 humano reconoce polisacáridos con enlaces $\beta(1\rightarrow3)$ y/o $\beta(1\rightarrow6)$, los llamados β -glucanos, presentes en la pared de los hongos (Brown y Gordon 2001; Brown *et al.* 2003). Como consecuencia, Dectin-1 está implicado en la respuesta inmune innata frente a patógenos fúngicos (Brown y Gordon 2003) tanto en humanos como en ratón.

La estructura de este receptor contiene una región extracelular con un único dominio de unión a carbohidratos de tipo CTLD (*C-type lectin-like domain*) (Weis *et al.* 1998) conectado al dominio intracelular a través de un cuello y una región transmembrana. Dectin-1 sufre un proceso de procesamiento alternativo que da lugar a varias isoformas, sólo dos de ellas funcionales: Dectin-1a (completa) y Dectin-1b (predominante, carente del cuello). Aunque parecen funcionar de manera similar *in vitro*, se expresan de forma diferencial según el tipo celular (Willment *et al.* 2001, Heinsbroek *et al.* 2006). En su tallo citoplasmático posee un motivo semi-ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) con dos residuos de tirosina potencialmente fosforilables, implicado en activación celular (Gantner *et al.* 2003; Brown *et al.* 2003; Gordon 2002).

Identificado inicialmente en macrófagos de ratón como el receptor principal de β -glucanos (Brown y Gordon 2001; Willment *et al.* 2005), Dectin-1 media la unión, captación y eliminación de patógenos, dispara la respuesta oxidativa generando especies reactivas de oxígeno (ROS) y produce citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas. Además, Dectin-1 está implicado en fenómenos de tolerancia y control de la respuesta inmune puesto que puede inducir la generación de citoquinas inhibitorias (Interleuquina (IL)-10, IL-2). Estas funciones pueden influenciar la respuesta inmune resultante y, en ciertas circunstancias, llevar a procesos patológicos y de autoinmunidad (Haskard y Landi 2002). Aunque se consideraba que Dectin-1 se expresaba de forma mayoritaria en células dendríticas (DCs) inmaduras y en células de Langerhans y que los estímulos de maduración disminuían su expresión (Ariizumi *et al.* 2000; Hermanz-Falcon *et al.* 2001; Sobanov *et al.* 2001; Yokota *et al.* 2001), posteriormente se comprobó que Dectin-1 no está restringido al linaje mielóide, sino que también se expresa en neutrófilos, eosinófilos, células B y una sub-población de células T (Brown *et al.* 2002; Taylor *et al.* 2002; Willment *et al.* 2005) aunque no en todos los tejidos (Reid. *et al.* 2004).

Dectin-1 es crucial en la respuesta inmune frente a patógenos fúngicos vivos como *Candida albicans* (Gantner *et al.* 2005; Taylor *et al.* 2007), *Coccidioides posadasii* (Viriyakosol *et al.* 2005), *Pneumocystis carinii* (Steele *et al.* 2003 y 2005) y *Aspergillus fumigatus* (Hohl *et al.* 2005; Steele *et al.* 2005; Gersuk *et al.* 2006). La relevancia de este receptor se ha establecido gracias a la generación de ratones deficientes en el gen que codifica para Dectin-1, en los cuales se ha visto que aumenta la susceptibilidad a *C. albicans* (Taylor *et al.* 2007) y a *P. carinii* (Saijo *et al.* 2007). No obstante, el papel que desempeña Dectin-1 en el control de la infección es aún controvertido. En cualquier caso, se ha demostrado que Dectin-1 puede desencadenar respuestas específicas contra patógenos en colaboración con los TLRs o de forma independiente de ellos. En la vía independiente de TLRs la unión del ligando provoca una cascada de señalización intracelular: la fosforilación de la tirosina proximal del motivo de activación ITAM por la tirosina quinasa Src, permite reclutar la tirosina quinasa de bazo (Syk, *Spleen Tyrosine Kinase*). Syk es necesaria para la señalización a través del receptor específico de antígeno de células T y B, y en células mieloides se ha descrito como crucial para estimular la producción de especies de oxígeno reactivas a través de Dectin-1 (Underhill *et al.* 2005; Rogers *et al.* 2005). Tras la activación de Syk, se produce una cascada de fosforilación que implica entre otros, al factor de transcripción NF- κ B (Dennehy. y Gordon 2007; Dennehy *et al.* 2008). Recientemente, se ha demostrado que la señalización vía Dectin-1 (inducida por β -glucano particulado (zymosan) o con esporas de *C. albicans*) puede modular directamente la expresión génica a través de la activación del factor de transcripción NFAT, tanto en macrófagos como en DCs, induciendo a su vez los factores de transcripción Egr2, Egr3 y COX-2 (Goodridge. *et al.* 2007). Además, Dectin-1 participa en una nueva ruta de señalización independiente de TLRs en DCs, mediando directamente la activación de NF- κ B vía la molécula adaptadora de señalización CARD9 (Gross *et al.* 2006). La ruta Dectin-1-Syk-CARD9 acopla la respuesta inmune y la adaptativa, siendo CARD9 necesaria para el desarrollo de una respuesta de tipo linfocito T cooperador (T_H -17) frente a patógenos como *C. albicans* (LeibundGut-Landmann *et al.* 2007).

Bibliografia

1. **Akira S. & Takeda K.** Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 499-511 (2004).
- 5 2. **Ariizumi K. et al.** Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, Dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* 275: 20157-67 (2000).
3. **Brown G.D. & Gordon S.** Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 413: 36-7 (2001).
- 10 4. **Brown GD. et al.** Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med* 196: 407-12 (2002).
5. **Brown GD. et al.** Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J. Exp. Med.* 197: 1119-24 (2003).
- 15 6. **Brown GD & Gordon S.** Fungal β -Glucans and Mammalian Immunity. *Immunity*, 19: 311-315, (2003).
7. **Brown G.D.** Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature Rev. Immunol.* 6: 33-43 (2005).
8. **Dennehy K.M. & Gordon D.B.** The role of the β -glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J. Leuk. Biol.* 82(2): 253-8. Epub 2007 May 2. Review. (2007).
- 20 9. **Dennehy K.M et al.** Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *Eur. J. Immunol.* (2008).
10. **Gantner B.N. et al.** Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.* 197: 1107-17 (2003).
- 25 11. **Gantner, B. N et al.** Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J.* 24: 1277-1286. (2005).
- 30 12. **Gersuk, G. M. et al.** Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J. Immunol.* 176: 3717-3724.(2006).
13. **Goodridge H.S. et al.** Dectin-1 Stimulation by *Candida albicans* Yeast or Zymosan Triggers NFAT Activation in Macrophages and Dendritic Cells. *J. Immunol.* 178: 3107-3115.(2007).
- 35 14. **Gordon S.** Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111: 927-930 (2002).
15. **Gross, O. et al.** Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* 442: 651-656. (2006).
- 40 16. **Haskard DO & Landis RC.** Interactions between leukocytes and endothelial cells in gout: lessons from a self-limiting inflammatory response. *Arthritis Res.* 4 Suppl 3:S91-7.(2002).
- 45 17. **Heinsbroek S.E.M. et al.** Expression of Functionally Different Dectin-1 Isoforms by Murine Macrophages. *J. Immunol.* 176: 5513-5518. (2006).
18. **Hernanz-Falcon P. et al.** Cloning of human DECTIN-1, a novel C-type lectin-like receptor gene expressed on dendritic cells. *Immunogenetics.* 53: 288-95 (2001).
- 50 19. **Hohl, T. M et al.** *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. *PLoS Pathog.* 1:e30. (2005).
20. **LeibundGut-Landmann et al.** Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nature Immunol.* Jun; 8(6): 630-638 (2007).
- 55 21. **Reid D. M. et al.** Expression of the β -glucan receptor, dectin-1, on murine leukocytes *in situ* correlates with its function in pathogen recognition and reveals potential roles in leukocyte interactions. *J. Leukoc. Biol.* 76, 86-94 (2004).
- 60 22. **Romani L.** Immunity to fungal infections. *Nature Rev.* 4: 1-13 (2004)
23. **Rogers N.C. et al.** Syk-dependent cytoquine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C-type lectins. *Immunity* 22: 507-17(2005).
- 65 24. **Saijo S. et al.** Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol.* 8: 39-46 (2007).

ES 2 337 224 B1

25. **Sobanov Y. et al.** A novel cluster of lectin-like receptor genes expressed in monocytic, dendritic and endothelial cells maps close to the NK receptor genes in the human NK gene complex. *Eur J Immunol* 31: 3493-503. (2001).
26. **Steele C. et al.** Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. uris involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor. *J Exp. Med.* 1; 198 (11): 1677-88 (2003).
27. **Steele C. et al.** The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* 1(4):e42 (2005).
- 10 28. **Taylor PR. et al.** The beta-glucan receptor, Dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* 169: 3876-82 (2002).
29. **Taylor PR et al.** Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol. Jan;* 8(1): 31-8 (2007).
- 15 30. **Underhill et al.** Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood* 106: 2543-50 (2005).
- 20 31. **Viriyakosol S.** Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and dectin-1. *Infect. Immun.* 73, 1553-1560 (2005).
32. **Weis W.I. et al.** The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol. Rev.* 163: 19-34(1998).
- 25 33. **Willment J.A. et al.** Characterization of the human Beta-glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J. Biol. Chem.* 276: 43818-23 (2001)
34. **Willment J. et al.** The human B-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. *Eur. J. Immunol.* 35: 1539-1547 (2005)
- 30 35. **Yokota K et al.** Identification of a human homologue of the dendritic cell-associated C-type lectin-1, dectin-1. *Gene* 272: 51-60 (2001).

Descripción de la patente

35

Descripción breve

Un objeto de la presente invención lo constituye el anticuerpo anti-Dectin-1 humano MGD3, caracterizado porque se une y reconoce específicamente el dominio 71-247 de la proteína humana Dectin-1 (SEQ ID NO2) ya sea un anticuerpo monoclonal o policlonal, en adelante el anticuerpo de la invención.

40

Un objeto más particular de la invención es el anticuerpo de la invención caracterizado porque es monoclonal que es producido por el hibridoma MGD3 (depositado en la colección de cultivos ECACC -*European Collection of Animal Cell Culture*- el 6 de Febrero de 2008 con la referencia 08020601).

45

Otro objeto de la presente invención es la secuencia de nucleótidos caracterizada por ser codificante del dominio 71-247 de la proteína humana Dectin-1 (SEQ ID NO1), y por ser:

- a) una secuencia de nucleótidos análoga a la SEQ ID NO1
- b) un fragmento de la secuencias de a, y
- c) una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a) y b).

50

Otro objeto de la invención lo constituye la secuencia de aminoácidos aislada de la proteína humana Dectin-1 caracterizada porque se corresponde con el dominio 71-247 de ésta (SEQ ID NO2), y por ser:

55

- a) una secuencia de aminoácidos análoga a la SEQ ID NO2
- b) un fragmento de la secuencia de a, y
- c) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a) y b).

60

Un objeto particular de la invención es el uso de la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO1) para la producción de anticuerpos anti-Dectin-1 humanos, ya sean monoclonales o policlonales.

65

ES 2 337 224 B1

Un objeto particular de la invención es el uso de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO2) para la producción de anticuerpos anti-Dectin-1 humanos, ya sean monoclonales o policlonales.

5 Un objeto de la presente invención es el hibridoma caracterizado porque produce un anticuerpo específico del dominio 71-247 de la proteína humana Dectin-1 (SEO ID NO2).

Un objeto particular de la invención es el hibridoma de la invención caracterizado porque es el hibridoma MGD3 productor del anticuerpo de la invención (depositado en la colección de cultivos ECACC -*European Collection of Animal Cell Culture*- el 6 de Febrero de 2008 con la referencia 08020601).

10 Otro objeto más particular de la invención es el uso de hibridoma de la invención para la producción del anticuerpo monoclonal anti-Dectin-1 humano, preferentemente el anticuerpo monoclonal de la invención.

15 Un objeto de la presente invención es una composición biotecnológica, farmacéutica, diagnóstica o terapéutica caracterizada porque contiene el anticuerpo de la invención.

Uso del anticuerpo de la invención para la elaboración de una composición biotecnológica, farmacéutica diagnóstica o terapéutica útil para la realización de:

- 20
- ensayos de detección, identificación y/o cuantificación de la proteína Dectin-1 humana,
 - tratamiento de enfermedades infecciosas, autoinmunes y/o inflamatorias, y
 - 25 - diagnóstico de enfermedades infecciosas, autoinmunes y/o inflamatorias.

Otro objeto de la invención es la composición biotecnológica, farmacéutica diagnóstica o terapéutica caracterizada porque comprende el anticuerpo de la invención.

30 Otro objeto particular de la invención es el uso de la composición de la invención y del anticuerpo de la invención en un procedimiento *ex vivo* de detección, identificación y/o cuantificación de la proteína Dectin-1 humana.

Otro objeto particular de la invención es el uso de la composición de la invención y del anticuerpo de la invención en un procedimiento *ex vivo* para el diagnóstico de una enfermedad autoinmune, infecciosa y/o inflamatoria.

35 Otro objeto particular de la invención es el uso de la composición de la invención y del anticuerpo de la invención en un procedimiento terapéutico de una enfermedad humana donde la proteína Dectin-1 humana presenta un papel etiopatogénico.

40 Otro objeto más particular de la invención es el uso de la composición de la invención y del anticuerpo de la invención donde la enfermedad a la que se le aplica el procedimiento terapéutico es una enfermedad inflamatoria, infecciosa y/o autoinmune.

45 Descripción detallada

La presente invención se basa en que los inventores han observado que un anticuerpo específico, concretamente un anticuerpo monoclonal y más concretamente el anticuerpo monoclonal MGD3, generado por los inventores al inmunizar ratones con una proteína de fusión que comprende la región entre los aminoácidos 71-247 (dominio Dectin-1/71-247) de la proteína Dectin-1 humana (SEQ ID NO2), presenta una serie de características que le confieren una serie de ventajas técnicas con respecto a los anticuerpos descritos en el estado de la técnica, por lo que el anticuerpo MGD3 representa una nueva herramienta biotecnológica útil en el campo de la investigación biomédica y en el campo asistencial médico, tanto en el área del diagnóstico como en el ámbito terapéutico.

55 Las ventajas técnicas que posee el anticuerpo MGD3 de la invención son las siguientes: es capaz de inhibir la unión del ligando natural a su receptor -en ensayos de citometría de flujo (Figura 6)- de manera análoga a los β -glucanos solubles (laminarina). También es capaz de inhibir de forma significativa la producción de citoquinas pro- y anti-inflamatorias como TNF- α e interleuquina (IL)-10, respectivamente, en células dendríticas derivadas de monocitos en respuesta a la interacción con esporas de *C. albicans* (Figuras 7A y 7B). Puede emplearse para detectar cambios en los niveles de expresión del receptor Dectin-1 en leucocitos humanos, lo que podría indicar la capacidad de estas células para detectar la presencia de patógenos fúngicos como *Candida albicans*, *Coccidioides posadasii*, *Pneumocystis carinii* y/o *Aspergillus fumigatus* y por tanto, la susceptibilidad hacia estos. Son útiles como marcadores de la proteína Dectin-1 humana *in vivo* en la superficie de monocitos, macrófagos, células de Langerhans y células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica (Figura 3), leucocitos en reposo y activados en procesos infecciosos, por ejemplo por agentes fúngicos, así como en patologías autoinmunes y/o inflamatorias y podrían servir para definir el papel de este receptor en la patogenia de estas enfermedades así como para definir la susceptibilidad hacia diferentes patologías inflamatorias. Finalmente, los anticuerpos MGD3 de la invención pueden ser utilizados como indicadores del efecto terapéutico de distintos agentes anti-inflamatorios e inmunosupresores.

Además, el anticuerpo MGD3 de la invención:

1. reconoce la proteína Dectin-1 *in vivo* en células mieloides con una elevada calidad en la relación señal-fondo (ver Figura 3).
2. es el único anticuerpo monoclonal anti-Dectin-1 humano que bloquea la unión de *Candida albicans* en ensayos *in vitro* con transfectantes estables de la proteína.
3. es el único anticuerpo monoclonal anti-Dectin-1 humano que reconoce la proteína Dectin-1 humana (SEQ ID NO2) con alta afinidad tanto en ensayos de citometría de flujo como de *Western Blot* (ver Figuras 1, 2, 3 y 4).
4. es capaz de capturar la proteína soluble DECTIN-1-FLAG en ensayos de interacciones moleculares mediante SPR en el biosensor Biacore 3000, lo que indica una gran afinidad por el ligando (Figura 7).
5. es capaz de inhibir de forma significativa la producción de TNF- α en DCs derivadas de monocitos que han estado en contacto con esporas de *C. albicans* (Figura 7A).
6. es capaz de inhibir de forma significativa la producción de IL-10 en DCs derivadas de monocitos que han estado en contacto con esporas de *C. albicans* (Figura 7B).

Todas las características descritas y enumeradas hasta ahora confieren al anticuerpo MGD3 de la invención las ventajas técnicas que hacen del mismo un anticuerpo único y ventajoso sobre el resto de anticuerpos anti-Dectin-1 humanos descritos previamente.

La invención, también se refiere a un hibridoma clonado (MGD3) (depositado en la colección de cultivos ECACC -*European Collection of Animal Cell Culture*- el 6 de Febrero de 2008 con la referencia 08020601) que produce un anticuerpo monoclonal, denominado en adelante MGD3, que reconoce específicamente el receptor de membrana Dectin-1 humano. Dicho clon se obtuvo por procedimientos estándar de fusión celular entre un linfocito B del bazo de un ratón BALB/c inmunizado y células de mieloma (X63.Ag.653 NP3) (Ejemplo 1).

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es un anticuerpo anti-Dectin-1 humano, en adelante anticuerpo de la invención, que se une y reconoce específicamente el dominio 71-247 de la proteína humana Dectin-1 (SEQ ID NO2), ya sea un anticuerpo monoclonal o policlonal.

Un aspecto más particular de la invención lo constituye el anticuerpo monoclonal de la invención y producido por el hibridoma MGD3 (depositado en la colección de cultivos ECACC -*European Collection of Animal Cell Culture*- el 6 de Febrero de 2008 con la referencia 08020601), en adelante anticuerpo monoclonal MGD3 de la invención.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “anticuerpo” se refiere a un anticuerpo recombinante o minianticuerpo que mantienen su capacidad de unión a antígeno. El término “minianticuerpo” se define como fragmentos derivados de anticuerpos construidos por tecnología de ADN recombinante, que, pese a su menor tamaño, conservan la capacidad de unión al antígeno ya que mantienen al menos un dominio variable de inmunoglobulina donde residen las zonas de unión a antígenos, e incluye, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: Fab, F(ab')₂, scFv, y anticuerpos recombinantes monodominio (dAbs). En el marco de la presente invención, se entiende por anticuerpos recombinantes monodominio y/o dominios tipo inmunoglobulina con capacidad de unión y reconocimiento independiente, tanto a los dominios variables de cadena pesada (VH), a los dominios variables de cadena ligera (VL), a los anticuerpos recombinantes de camélidos (VHH), los anticuerpos recombinantes de camélidos humanizados, los anticuerpos recombinantes de otras especies camelizadas, los anticuerpos monodominio IgNAR de peces cartilaginosos; es decir, que se incluyen tanto dominios que de forma natural son monodominio (caso de VHH e IgNAR), como anticuerpos que por ingeniería se han alterado para que por sí solos sean capaces de interactuar con el antígeno y mejorar sus propiedades de estabilidad y solubilidad. Se incluye en esta definición cualquier modificación de los anticuerpos recombinantes como su multimerización o la fusión a cualquier molécula (p.ej. toxinas, enzimas, antígenos, otros fragmentos de anticuerpos, etc.).

El anticuerpo puede ser obtenido de un ser humano o un animal (p.ej. camellos, llamas, vicuñas, ratones, ratas, conejos, caballos, tiburones nodriza, etc.) o mediante técnicas de DNA recombinante o síntesis química de genes, o bien desde o selección *in vitro* o *in vivo* de genotecas de anticuerpos.

Otro aspecto de la presente invención es la secuencia de nucleótidos caracterizada por ser codificante del dominio 71-247 de la proteína humana Dectin-1 (SEQ ID NO1), así como cualquier secuencia de nucleótidos análoga a ésta. En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos que pueda ser aislada o construida en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en la presente memoria, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativos o no conservativos, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos, en cualquier extremo o en el interior de la secuencia, y que constituya una secuencia codificante o péptido con actividad similar a la secuencia de la proteína humana Dectin-1.

ES 2 337 224 B1

En general, una secuencia de nucleótidos análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos comentada anteriormente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad de, al menos, un 40%, preferentemente de, al menos, un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

5

Esta secuencia de nucleótidos puede ser utilizada bien en su totalidad o bien de forma parcial mediante fragmentos de la misma para la expresión del péptido/s correspondientes en distintas células para sus posteriores usos biotecnológicos.

10

Otro aspecto de la presente invención es la secuencia de aminoácidos aislada de la proteína humana Dectin-1 correspondiente al dominio 71-247 de la misma (SEQ ID NO2), así como cualquier secuencia de aminoácidos análoga a ésta. En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análoga” pretende incluir cualquier secuencia de aminoácidos que pueda ser aislada o construida en base a la secuencia de aminoácidos mostrada en la presente memoria, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más aminoácidos, la adición de uno o más aminoácidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más aminoácidos, en cualquier extremo o en el interior de la secuencia, y que constituya un péptido con actividad similar a la secuencia de la proteína humana Dectin-1.

15

20

En general, una secuencia de aminoácidos análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos comentada anteriormente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de aminoácidos en cuestión tienen un grado de identidad de, al menos, un 40%, preferentemente de, al menos, un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

25

Otro aspecto de la invención es el uso de la secuencia nucleótidos y de aminoácidos -SEC ID NO1 y SEC ID NO2, respectivamente- para producir anticuerpos anti-Dectin-1 humanos, ya sean monoclonales y policlonales.

Otro aspecto de la invención es un hibridoma, en adelante hibridoma de la invención, que produce un anticuerpo específico del dominio 71-247 de la proteína humana Dectin-1 (SEQ ID NO2).

30

Otro aspecto más particular de la invención lo constituye el hibridoma de la invención denominado hibridoma MGD3 y productor del anticuerpo MGD3 (depositado en la colección de cultivos ECACC -*European Collection of Animal Cell Culture*- el 6 de Febrero de 2008 con la referencia 08020601).

35

Otro aspecto de la invención lo constituye el uso del anticuerpo de la invención en la elaboración de una composición biotecnológica o una composición farmacéutica diagnóstica o terapéutica útil para la realización de ensayos de identificación de la proteína Dectin-1 humana o para el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias.

40

Otro aspecto de la invención lo constituye una composición biotecnológica, composición farmacéutica diagnóstica o terapéutica que comprende el anticuerpo anti-Dectin-1 de la invención.

45

Otro aspecto de la invención lo constituye el uso del anticuerpo o de la composición farmacéutica de la invención en un procedimiento *ex vivo* de detección, identificación y/o cuantificación de la proteína anti-Dectin-1 humana, ya sea con fines de investigación o con fines de diagnóstico de una enfermedad humana.

50

Otro aspecto más particular de la presente invención es el uso del anticuerpo anti-Dectin-1 humano o de la composición biotecnológica de la invención, en un procedimiento biotecnológico *ex vivo* donde se requiera la identificación de la proteína Dectin-1 humana, como por ejemplo y sin que ello limite el alcance de la invención, en:

55

- ensayos de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica

- procesos de inmunoprecipitación de la proteína Dectin-1

60

- ensayos *in vivo* para reconocer la proteína Dectin-1 humana en la superficie de monocitos, macrófagos, células de Langerhans y células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica y que permitan identificar o seleccionar poblaciones que expresan Dectin-1 de poblaciones que no la expresan.

65

- ensayos *in vitro* de inhibición de la unión de hongos, por ejemplo de *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Coccidioides posadasii*, *Pneumocystis carinii* y *Aspergillus fumigatus*, al receptor Dectin-1 expresado en transfectantes estables o transitorios de dicha proteína o en células primarias.

- ensayos *in vitro* de inhibición de la producción de citoquinas mediada por Dectin-1 (por ejemplo TNF- α , IL-6, IL-10, IL-2, etc).

Otro aspecto más particular de la presente invención es el uso del anticuerpo anti-Dectin-1 humano o de la composición farmacéutica diagnóstica de la invención en un procedimiento *ex vivo* de identificación de la proteína Dectin-1 humana, como por ejemplo y sin que limite el alcance de la invención, en:

- 5 - la identificación de células patogénicas activadas en enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias, que indique el grado de exacerbación de la enfermedad y permita medir la eficacia de los tratamientos en las fases tempranas de ensayos clínicos con nuevas terapias,
- 10 - un procedimiento para determinar la susceptibilidad a la infección por patógenos fúngicos, mediante la identificación de cambios en la expresión del receptor endógeno de la proteína Dectin-1 humana, indicadores de la presencia de β -glucano en fluidos biológicos,
- 15 - la detección y cuantificación por citometría de la expresión del receptor de la proteína Dectin-1 humana en fagocitos activados en patologías autoinmunes o condiciones de inflamación crónica, como la artritis psoriásica.

Así, otro aspecto particular de la presente invención es el uso del anticuerpo anti-Dectin-1 humano o de la composición farmacéutica terapéutica de la invención en un procedimiento terapéutico de una enfermedad donde la proteína Dectin -1 humana presenta un papel etiopatogénico.

El anticuerpo monoclonal anti-Dectin-1 humano de la invención, más concretamente el anticuerpo MGD3, podría utilizarse para la elaboración de composiciones farmacéuticas útiles en el tratamiento de patologías inflamatorias, ya que bloquea la producción de citoquinas pro-inflamatorias que se inducen a través de Dectin-1 (por ejemplo el Factor de Necrosis Tumoral, TNF-alfa) y que están involucradas en la patogenia, por ejemplo y sin que limite el alcance de la invención, de diversas formas de artritis.

Así, otro objeto de la invención es el uso de la composición y/o del anticuerpo de la invención en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Otro objeto de la invención es el uso de la composición y/o del anticuerpo de la invención en el tratamiento de enfermedades infecciosas y/o autoinmunes.

Otro objeto particular de la invención es el uso de la composición y/o del anticuerpo de la invención en un procedimiento *ex vivo* para el diagnóstico de una enfermedad autoinmune, infecciosa y/o inflamatoria.

35 Descripción de las figuras

Figura 1.- *El anticuerpo monoclonal (mAb) MGD3 de la invención reconoce Dectin-1 humano en la superficie de transfectantes estables.* Células de la línea celular linfoblástica humana K562 transfectadas establemente con Dectin1aFlag (denominadas de ahora en adelante K562Dectin1aFlag) y células de la línea parental, fueron teñidas con el mAb anti-Dectin-1 MGD3 y con el control de isotipo (IgG2a) y analizadas por citometría de flujo. En la figura solo se muestran las células K562Dectin1aFlag teñidas con el control de isotipo (en gris) y con el anticuerpo MGD3 (en negro).

Figura 2.- *El mAb MGD3 reconoce Dectin-1 humano en la superficie de transfectantes transitorios de Dectin-1.* Las células humanas HEK293T se transfectaron transitoriamente con Dectin-1a humano y con el vector vacío (pcDNA 3.1) como control. A las 48 horas se realizó una citometría de flujo, teñiendo las células con el mAb anti-Dectin-1 MGD3 (línea negra) y con un control de isotipo (IgG2a, histograma gris).

Figura 3.- *El mAb MGD3 de la invención reconoce específicamente a la proteína Dectin-1 *in vivo* en la superficie de monocitos (MO), macrófagos (M ϕ) y células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica humana (MDDC).* Los MO se obtuvieron mediante purificación con bolas magnéticas acopladas a CD14 (Miltenyi Biotech). Para la obtención de M ϕ , se cultivaron los MO durante 5 - 7 días en presencia de 1000 U/ml GM-CSF y para obtener MDDCs se cultivaron las células con 1000 U/ml GM-CSF + 10 μ g/ml IL-4. Los histogramas grises representan la tinción con un mAb control (X63) y la línea negra representan la tinción con el mAb anti-Dectin-1 MGD3. En la parte inferior de la figura se muestra la tinción obtenida por un marcador específico de cada tipo celular utilizado.

Figura 4.- *El mAb MGD3 de la invención es capaz de reconocer Dectin-1 humano, en ensayos de Western Blot.* Lisados totales de células K562Dectin1aFlag tratadas o no con tunicamicina (3 μ M, 16 horas) fueron sometidos a electroforesis (SDS-PAGE) en condiciones no desnaturalizantes (30 μ g de proteína celular total/carril), transferido a una membrana y revelado con el mAb MGD3. El MGD3 reconoce una banda de aproximadamente 45 kDa en los carriles de los lisados de las células K562Dectin1aFlag sin tratar con tunicamicina, correspondiente a la isoforma a del Dectin-1 humano. En los carriles donde la muestra ha sido tratada con tunicamicina, aparece una banda de aproximadamente 43 kDa que corresponde a esta misma isoforma tras la pérdida de N-glicosilaciones debidas al tratamiento.

Figura 5.- *El mAb MGD3 es capaz de reconocer Dectin-1 humano en ensayos de inmunofluorescencia.* A.- Se utilizaron células K562 WT y K562Dectin1aFlag adheridas a cristales (10 x 10⁴ céls/cubreobjeto) recubiertos con

poli-L-lisina. Las células se tiñeron con los mAb anti-Dectin-1 humano MGD3 o con un control de isotipo IgG2a, seguidos de un Ab secundario de cabra-anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a Alexa488 (verde). En la figura se muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia utilizando el control de isotipo, y el mAb MGD3. En paralelo se muestra la tinción de núcleos con el colorante DAPI (azul), la imagen del contraste diferencial (DIC) de Nomarsky y el resultado de solapar las imágenes. En verde tan sólo se observa tinción cuando se utiliza el mAb MGD3 en las células K562Dectin1aFlag. B.- Células HeLa WT y transfectadas transitoriamente con Dectin-1-Flag, (50×10^3 células/cubreobjeto), se tiñeron con el anticuerpo anti-Dectin-1 humano MGD3, seguido de un Ab secundario de cabra-anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a Alexa488. Del mismo modo, se utilizó un mAb anti-Flag como control positivo de la expresión de la proteína transfectada. En la figura se muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia con el Ab anti-Flag y MGD3. Únicamente muestran tinción las células que expresan Dectin-1.

Figura 6.- *El mAb MGD3 de la invención es capaz de inhibir la unión de Candida albicans a Dectin-1 humano en ensayos de citometría de flujo de manera similar a la inhibición causada por el β -glucano soluble laminarina. Se estudió la capacidad de unión de Candida albicans a células K562 WT y a los transfectantes K562Dectin1aFlag, para lo que se incubaron las células con laminarina (500 μ g/ml, SIGMA) o con el mAb MGD3 (2 μ g/ml), previamente a la incubación con las esporas marcadas con fluoresceína. A.- Análisis por citometría de flujo del bloqueo de la unión de esporas a células K562Dectin1aFlag. La línea gris oscura representa el bloqueo por laminarina y la línea negra representa el bloqueo por el anticuerpo monoclonal MGD3. En gris aparece la unión total, en ausencia de competidor. Se muestra un experimento representativo. B.- Análisis de siete experimentos de citometría realizados en los que se muestra la cuantificación de la unión (*binding*) y los bloqueos con el MGD3 y la laminarina.*

Figura 7.- *El mAb MGD3 de la invención es capaz de inhibir la producción de citoquinas secretadas por células dendríticas en respuesta a esporas de Candida albicans. Se utilizaron células dendríticas humanas derivadas de monocitos de sangre periférica. Las células fueron incubadas con esporas de C. albicans (obtenidas a partir de la cepa CAF2). Las esporas fueron previamente inactivadas con luz ultravioleta (U.V.) para evitar su germinación. Los tratamientos de inhibición con 5 μ g/ml de los anticuerpos purificados y libres de endotoxinas, anti-Dectin-1 MGD3 (blanco) y el control de isotipo IgG2a (gris), o en ausencia de tratamiento (negro), se pre-incubaron 30 min a 37°C antes de añadir las esporas. Como controles de las condiciones experimentales se utilizaron zymosan (200 μ g/ml, SIGMA) y lipopolisacárido (LPS, 100 ng/ml, SIGMA). Se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó la producción de TNF- α e IL-10 mediante ELISA (Immunotools y R&D respectivamente). (A) Secreción de TNF- α las 6 horas B) producción de IL-10 a las 18 horas. **P<0.01 células no tratadas versus tratadas con el anticuerpo MGD3. Los valores de P fueron calculados por el método de *Mann Whitney's two tailed analysis*. Los datos representan la media \pm S.E. de los duplicados de seis diferentes experimentos.*

Figura 8.- *El mAb MGD3 de la invención es capaz, en ensayos de interacciones moleculares mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR), de capturar la proteína Dectin-1 recombinante humana (dominio extracelular; aminoácidos 71-247) presente en el medio condicionado por el crecimiento de células de mamífero transfectadas. Se utilizó un equipo biosensor Biacore 3000 (GE Healthcare) y un chip modelo CM5, al que se unió un anticuerpo de captura anti-inmunoglobulinas de ratón, de forma covalente, utilizando técnicas estandarizadas de entrecruzamiento de grupos amino. Se muestran las respuestas como señal relativa de resonancia (RU) en función del tiempo en segundos. Las curvas de la figura corresponden a la sustracción entre la señal obtenida para el anticuerpo MGD3 y la señal obtenida para el anticuerpo control negativo. La línea base corresponde a la señal de inyección del tampón HBS, seguida por la inyección de los medios condicionados realizada entre los 300 y 1200 segundos. En esta fase de asociación se observa la captura progresiva de las dos formas solubles de Dectin-1 por el anticuerpo. Una vez finalizada la inyección, el sistema continúa inyectando tampón y puede observarse la disociación de Dectin-1 y de HA-Dectin-1-Flag del complejo formado con el anticuerpo MGD3.*

Ejemplos de la invención

Ejemplo 1

Obtención del anticuerpo monoclonal (mAb) MGD3

En una primera etapa, se generó una proteína soluble con la secuencia de aminoácidos 71-247 del receptor Dectin-1 humano, que comprende el cuello y el dominio de reconocimiento de carbohidratos (CTLD) de dicho receptor (SEQ ID NO2). Dicha proteína se obtuvo mediante inserción de la secuencia génica de ADN codificante para dicho péptido soluble (SEQ ID NO1) en vectores de expresión de mamífero (pEF), fusionados a los dominios HA y Flag, transitoriamente transfectados mediante la técnica de fosfato cálcico en la línea celular humana HEK293T. La recolección de los sobrenadantes de cultivo de dichas células eucariotas y su posterior purificación mediante técnicas de inmunoafinidad y cromatográficas, permitió obtener cantidad suficiente como para realizar la inmunización de ratones de la cepa BALB/c, siguiendo protocolos estándar de inmunización.

Tras la fusión, la selección de hibridomas se realizó por ensayos de inmuno-absorción enzimática (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA). En este caso, los antígenos inmovilizados sobre la fase sólida utilizados han sido proteínas solubles de Dectin-1 humanas, purificadas y obtenidas tanto en mamíferos como en bacterias, así como diversos β -glucanos (ligandos del receptor Dectin-1). En estos ensayos se utilizaron los antígenos referidos como tapiz y como método de detección se añadió un anticuerpo anti-inmunoglobulinas de ratón acoplado a peroxidasa seguidos

ES 2 337 224 B1

del sustrato de la reacción colorimétrica. De esta forma, se seleccionaron los hibridomas secretores de anticuerpos más específicos para el antígeno. Todos los hibridomas fueron testados y confirmados en paralelo por ensayos de citometría de flujo sobre transfectantes estables de Dectin-1 humano en la línea linfoblastoide K562 versus la línea parental. Del mismo modo se testó su capacidad de reconocer células humanas obtenidas a partir de sangre periférica (monocitos y derivados de ellos, células dendríticas, macrófagos y células de Langerhans). Como resultado de los tres tipos de análisis realizados se seleccionaron los mejores hibridomas entre los que destacó el hibridoma MGD3 (depositado en la colección de cultivos ECACC -*European Collection of Animal Cell Culture*- el 6 de Febrero de 2008 con la referencia 08020601) que expresa establemente inmunoglobulinas del isotipo IgG2a, correspondientes al anticuerpo monoclonal (mAb) anti-Dectin-1 humano MGD3.

Ejemplo 2

El anticuerpo monoclonal MGD3 de la invención reconoce Dectin-1 humano en la superficie de transfectantes estables de Dectin-1 humano

Se utilizaron células de la línea celular linfoblástica humana K562 transfectadas establemente con un vector con el cDNA de Dectin-1 a-humano acoplado al epítipo reportero FLAG (K562Dectin1aFlag) y células parentales, fueron teñidas con el mAb anti-Dectin-1 MGD3 y con control de isotipo (IgG2a) y analizadas por citometría de flujo. El patrón de tinción permitió comprobar que el mAb MGD3 reconoce específicamente Dectin-1 humano ya que tiñe específicamente las células transfectadas K562Dectin1aFlag y no las células parentales (Figura 1).

Ejemplo 3

El anticuerpo monoclonal MGD3 de la invención reconoce Dectin-1 humano en la superficie de transfectantes transitorios de Dectin-1 humano

El resultado obtenido en el ejemplo 2 no descarta la posibilidad de que el hibridoma MGD3 pudiera estar secretando anticuerpos que reconozcan el epítipo FLAG. Para comprobar que el hibridoma MGD3 tan solo producía mAb anti-Dectin-1 se utilizó otras células humanas (HEK293T, derivadas de riñon embrionario) que se transfectaron transitoriamente con el cDNA completo de Dectin-1 humano sin FLAG o con el vector vacío (pcDNA 3.1) como control. A las 48 horas se realizó una citometría de flujo, tiñendo las células con el mAb anti-Dectin-1 MGD3 y con un control de isotipo. El patrón de tinción de membrana obtenido, tanto en los transfectantes estables de Dectin-1 con el epítipo Flag, como en los transfectantes transitorios que carecen de él, permitió comprobar que el mAb MGD3 de la invención reconoce específicamente Dectin-1 humano y no reconoce el epítipo Flag (Figura 2).

Ejemplo 4

*El anticuerpo monoclonal MGD3 reconoce específicamente la proteína *ex vivo* en la superficie de monocitos (MO), macrófagos (MØ) y células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica (MDDC)*

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas a partir de concentrados de células sanguíneas exentos de plaquetas (*buffy coats*) de donantes sanos mediante gradientes de densidad obtenidos utilizando medios de separación de linfocitos (Figura 3). Los monocitos se obtuvieron mediante purificación con bolas magnéticas acopladas a CD14 (Miltenyi Biotech). Para la obtención de MDDCs y MØ, se cultivan los monocitos durante 7 días en presencia de 1000 U/ml GM-CSF para los MØ, y 1000 U/ml GM-CSF + 10 µg/ml IL-4 para las MDDCs. Debido a la gran variabilidad de las muestras procedentes de diferentes individuos, en la figura 3 se muestran los perfiles de citometría de un solo donante representativo. Los patrones de tinción muestran una expresión semejante de Dectin-1 en la membrana de los tres tipos celulares. En la parte inferior se muestra la expresión de marcadores moleculares característicos de cada tipo celular.

Ejemplo 5

El mAb MGD3 de la invención es capaz de reconocer Dectin-1 humano en ensayos de Western Blot

Se realizó un Western Blot en condiciones no reductores con Usados totales de la línea celular humana establemente transfectada K562Dectin1aFlag y el correspondiente control con las células parentales. Para inhibir las N-glicosilaciones las células fueron tratadas con tunicamicina 3 µM durante 16 horas. Los lisados (30 µg de proteína celular total/carril), fueron sometidos a electroforesis (SDS-PAGE) en condiciones no desnaturizantes, transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Tras el bloqueo de la membrana (TBS-Tween 0,1%, 5% leche desnatada en polvo y 2% BSA) se procedió a la hibridación de la misma durante la noche a 4°C con el mAb anti-Dectin-1 humano MGD3 de la invención a 2 µg/ml. Tras los lavados correspondientes, la membrana se incubó con un Ab secundario de cabra-anti-inmunoglobulinas de ratón acoplado a peroxidasa y se reveló con un sustrato quimioluminiscente. El mAb MGD3 de la invención reconoció dos bandas: una de 45 kDa aprox. correspondiente a la isoforma a del Dectin-1 humano presente en la muestra de células transfectadas K562Dectin1aFlag sin tratar y otra de 43 kDa aproximadamente que corresponde a esta misma isoforma tras el tratamiento con tunicamicina (Figura 4).

Ejemplo 6

El mAb MGD3 es capaz de reconocer Dectin-1 humano en ensayos de inmunofluorescencia

5 Se utilizaron células K562Dectin1aFlag en suspensión, adheridas a cristales (10×10^3 céls/cubreobjeto) recubiertos de poli-L-lisina. Las células se fijaron con paraformaldehído 3,7% y tras los lavados y bloqueos pertinentes se tiñeron con el anticuerpo anti-Dectin-1 humano MGD3, seguido de un Ab de cabra-anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a Alexa488. Del mismo modo, se usó un mAb de isotipo IgG2a como control. La figura 5A muestra las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia para el control de isotipo y el mAb MGD3. Tan solo se detecta señal
10 en verde en las células K562Dectin1aFlag teñidas con el mAb MGD3 lo que indica que el receptor Dectin-1a -FLAG está siendo reconocido específicamente.

Estos datos se confirmaron utilizando otra línea celular humana adherente (HeLa, epiteliales de ovario), transfectada transitoriamente con Dectin-1a-Flag. Las células fueron crecidas sobre cristales (50×10^3 células/cubreobjeto) y fijadas con paraformaldehído 3,7%. Tras los lavados y bloqueos pertinentes se tiñeron con el anticuerpo anti-Dectin-1 humano MGD3 o con el mAb anti-Flag que reconoce el epítipo FLAG como control positivo, seguidos de un Ab secundario cabra-anti-inmunoglobulinas de ratón acoplado a Alexa488. En la Figura 5B aparecen las imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia donde se comprueba como el mAb MGD3 tiñe Dectin-1 con similar intensidad que el Ab anti-Flag el epítipo FLAG.
20

Ejemplo 7

El mAb MGD3 es capaz de inhibir la unión de Candida albicans a Dectin-1 humano en ensayos de citometría de flujo de manera similar a la inhibición causada por el β -glucano soluble laminarina

25 Se estudió la capacidad de unión de *Candida albicans* (cepa CAF-2) a los transfectantes K562Dectin1aFlag. Para ello se utilizaron esporas de *C. albicans* marcadas con fluoresceína (FITC) incubadas en una relación célula/espora de 1/10 durante 30 min. Para determinar la capacidad del mAb MGD3 de bloquear esta unión, se preincubaron las células con laminarina ($500 \mu\text{g/ml}$), o con el mAb MGD3 de la invención ($2 \mu\text{g/ml}$) durante 20 min., antes de la incubación con las esporas. El análisis de la unión y bloqueo de la misma se realizó por citometría de flujo (Figura 6A). Los resultados indican que el anticuerpo MGD3 inhibe totalmente la unión específica de *C. albicans* mediada por Dectin-1 puesto que la incubación con el anticuerpo disminuye la unión a niveles aún inferiores a los que presentan las células parentales. En este ensayo el anticuerpo MGD3 tiene la misma capacidad de inhibir la unión de esporas a Dectin-1 que el beta-glucano soluble laminarina (Figura 6B).
35

Ejemplo 8

El mAb MGD3 es capaz de inhibir la producción de TNF- α e IL-10 en células dendríticas humanas derivadas de monocitos en respuesta a esporas de Candida albicans

40 Para estimular la producción de citoquinas, se incubaron las MDDC con esporas de *C. albicans* inactivadas por luz U.V. Para determinar la capacidad del mAb MGD3 de bloquear dicha secreción, se preincubaron las células con los mAb MGD3 de la invención ($5 \mu\text{g/ml}$) o con el control de isotipo (IgG2a, $5 \mu\text{g/ml}$) durante 30 min., antes de la incubación con las esporas. Se recogió sobrenadante a las 6 y a las 18 horas. La cuantificación de las citoquinas presentes en el sobrenadante se realizó mediante ensayos de ELISA. Los resultados indican que el anticuerpo MGD3 inhibe significativamente tanto la producción de TNF- α Fig. 7A como la de IL-10 Fig. 7B inducidas por las esporas de *C. albicans* en las MDDC. Esta inhibición es específica puesto que el control de isotipo (IgG2a) no produce una disminución significativa en la secreción de ninguna de las dos citoquinas analizadas. En cuánto a los controles positivos, el anticuerpo MGD3 no bloquea de forma significativa la secreción de TNF- α producida por zymosan seguramente debido a que este estímulo induce elevados niveles de secreción de TNF- α mediada por la existencia de otros receptores (ej. TLR2 y receptor de mañosa) que también reconocen esta partícula (constituida además de por β -glucanos, por quitina, mananos y lípidos). En el caso del LPS la disminución de la secreción tampoco es significativa, resultado esperado puesto que el receptor implicado es el TLR4, no Dectin-1.
50

Ejemplo 9

El mAb MGD3 es capaz, en ensayos de interacciones moleculares mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR), de capturar Dectin-1 humano recombinante presente en el medio condicionado por el crecimiento de células de mamífero transfectadas

60 Se estudió la capacidad de interacción entre el anticuerpo MGD3 de la invención y proteínas solubles de Dectin-1. Para ello, se transfectaron transitoriamente células HEK293T bien con la porción extracelular (aminoácidos 71-247, dominio Dectin-1/71-247) del receptor humano Dectin-1 o bien con esta misma porción extracelular fusionada a los epítopos HA y Flag (HA-Dectin-1a-Flag) (SEQ ID NO2). Los sobrenadantes recolectados se purificaron mediante técnicas de inmunoafinidad y cromatográficas.
65

Se utilizó un equipo biosensor Biacore 3000 (GE Healthcare) y un chip modelo CM5, al que se unió un anticuerpo de captura anti-inmunoglobulinas de ratón, de forma covalente, utilizando técnicas estandarizadas de entrecruzamien-

ES 2 337 224 B1

to de grupos amino. Se utilizaron en paralelo dos celdas de flujo, en una se inyectó sobrenadante que contenía un anticuerpo control inespecífico y en la otra el anticuerpo MGD3, a una concentración de 15 μ g/ml y a una velocidad de 5 μ l/min, en tampón HBS (150 mM NaCl, Hepes 10 mM, pH 7.4). En un nuevo ciclo, realizado a continuación, se inyectó el sobrenadante de células transfectadas con los plásmidos control “mock” (verde), Dectin-1 (azul) y Dectin-1-Flag+HA (roja).

En la Figura 8 se muestran las respuestas como señal relativa de resonancia (RU) en función del tiempo en segundos. Las curvas de la figura corresponden a la sustracción entre la señal obtenida para el anticuerpo MGD3 y la señal obtenida para el anticuerpo control negativo. La línea base corresponde a la señal de inyección del tampón HBS, seguida por la inyección de los medios condicionados realizada entre los 300 y 1200 segundos. En esta fase de asociación se observa la captura progresiva de las dos formas solubles de Dectin-1 por el anticuerpo. Una vez finalizada la inyección, el sistema continúa inyectando tampón y puede observarse la disociación de Dectin-1 y de HA-Dectin-1a-Flag del complejo formado con el anticuerpo MGD3.

Los resultados indican que el anticuerpo MGD3 de la invención captura de forma específica a las proteínas solubles Dectin-1 y HA-Dectin-1a-Flag presentes en el medio de cultivo condicionado por el crecimiento de los transfectantes HEK293T. Estos resultados indican que este anticuerpo puede ser utilizado, en biosensores basados en la técnica SPR, como componente fundamental de ensayos de rastreo y caracterización de la interacción entre Dectin-1 y diferentes ligandos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo anti-Dectin-1 humano **caracterizado** porque se une y reconoce específicamente el dominio 71-247 de la proteína humana Dectin-1 (SEQ ID NO2) ya sea un anticuerpo monoclonal o policlonal.
- 10 2. Anticuerpo según la reivindicación 1 **caracterizado** porque es monoclonal y es producido por el hibridoma MGD3 (depositado en la colección de cultivos ECACC -*European Collection of Animal Cell Culture*- el 6 de Febrero de 2008 con la referencia 08020601).
- 15 3. Secuencia de nucleótidos **caracterizada** por ser codificante del dominio 71-247 de la proteína humana Dectin-1 (SEQ ID NO1) y por ser seleccionada del siguiente grupo:
- a) una secuencia de nucleótidos con al menos un 40% de identidad con la SEQ ID NO1, y
 - b) una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a).
- 20 4. Secuencia de aminoácidos aislada de la proteína humana Dectin-1 **caracterizada** porque se corresponde con el dominio 71-247 de ésta (SEQ ID NO2) y por ser seleccionada del siguiente grupo:
- a) una secuencia de aminoácidos con al menos un 40% de identidad con la SEQ ID NO2, y
 - b) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia cualquiera perteneciente de a).
- 25 5. Uso de la secuencia de nucleótidos según la reivindicación 3 en la producción de anticuerpos anti-Dectin-1 humanos, ya sean monoclonales o policlonales.
- 30 6. Uso de la secuencia de aminoácidos según la reivindicación 4 en la producción de anticuerpos anti-Dectin-1 humanos, ya sean monoclonales o policlonales.
- 35 7. Hibridoma **caracterizado** porque produce un anticuerpo específico del dominio 71-247 de la proteína humana Dectin-1 (SEQ ID NO2).
- 40 8. Hibridoma según la reivindicación 7 **caracterizado** porque es el hibridoma MGD3 productor del anticuerpo MGD3 (depositado en la colección de cultivos ECACC -*European Collection of Animal Cell Culture*- el 6 de Febrero de 2008 con la referencia 08020601).
- 45 9. Uso de hibridoma según cualquiera de las reivindicaciones 7 ó 8 para la producción del anticuerpo monoclonal anti-Dectin-1 humano, preferentemente el anticuerpo monoclonal MGD3.
- 50 10. Uso del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para la elaboración de una composición biotecnológica, farmacéutica diagnóstica o terapéutica útil para la realización de:
- ensayos de detección, identificación y/o cuantificación de la proteína Dectin-1 humana,
 - tratamiento de enfermedades infecciosas, autoinmunes y/o inflamatorias, y
 - diagnóstico de enfermedades infecciosas, autoinmunes y/o inflamatorias.
- 55 11. Composición biotecnológica, farmacéutica diagnóstica o terapéutica **caracterizada** porque comprende un anticuerpo según las reivindicaciones 1 y 2.
- 60 12. Uso de la composición según la reivindicación 11 ó del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 en un procedimiento *ex vivo* de detección, identificación y/o cuantificación de la proteína Dectin-1 humana.
- 65 13. Uso del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, infecciosa y/o autoinmune.
14. Uso de la composición según la reivindicación 11 y del anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 en un procedimiento *ex vivo* para el diagnóstico de una enfermedad autoinmune, infecciosa y/o inflamatoria.

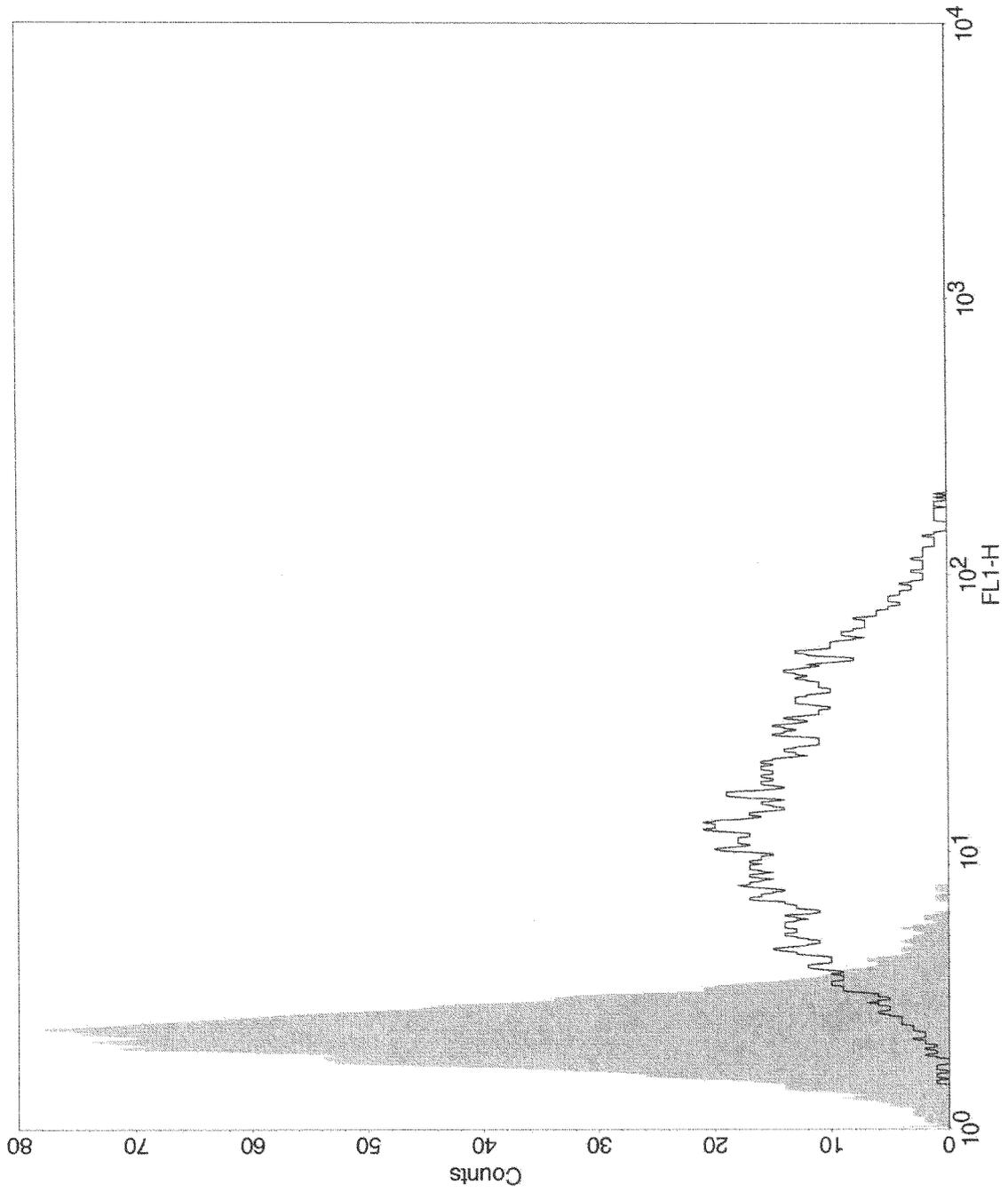


FIG 1

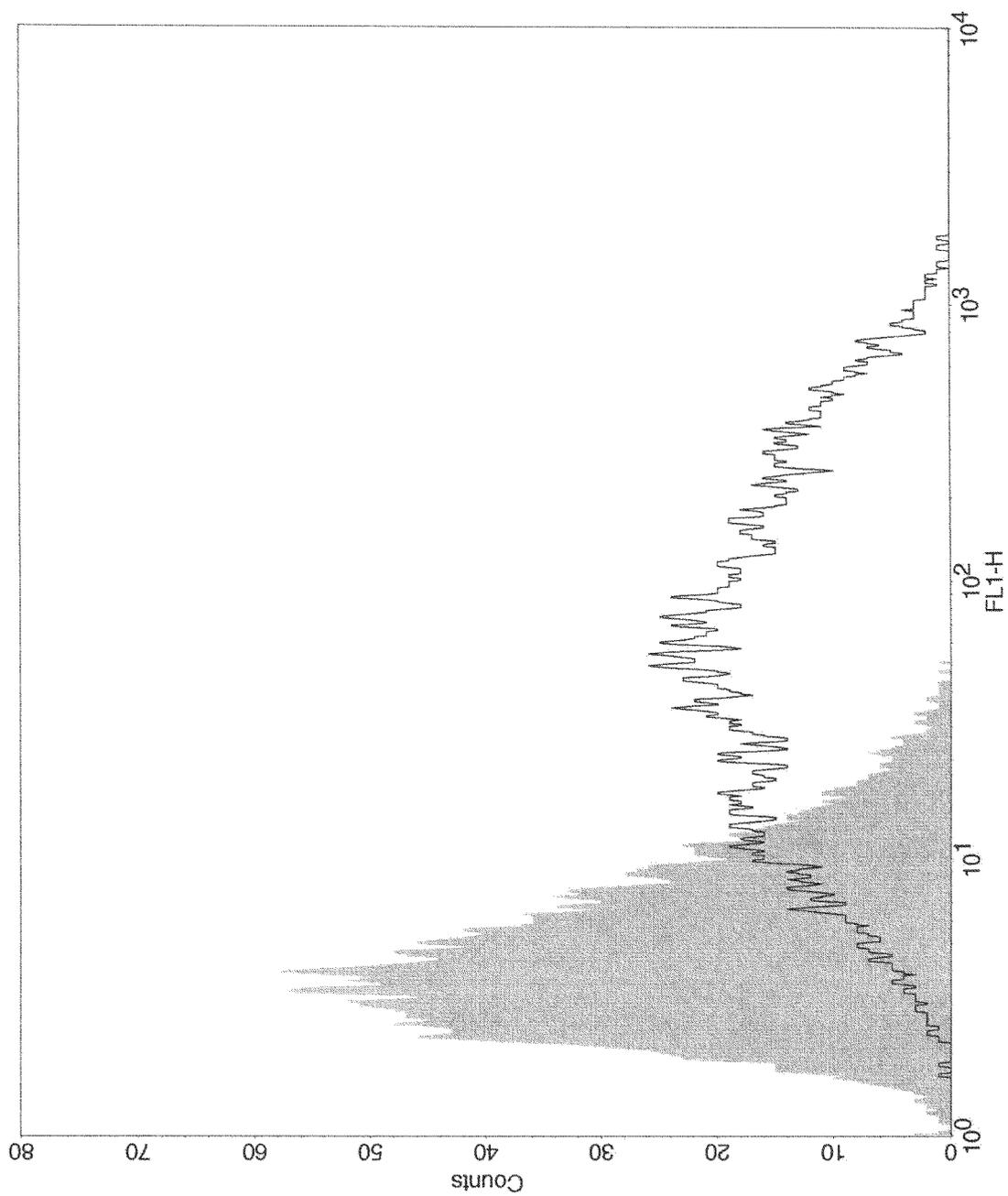


FIG 2

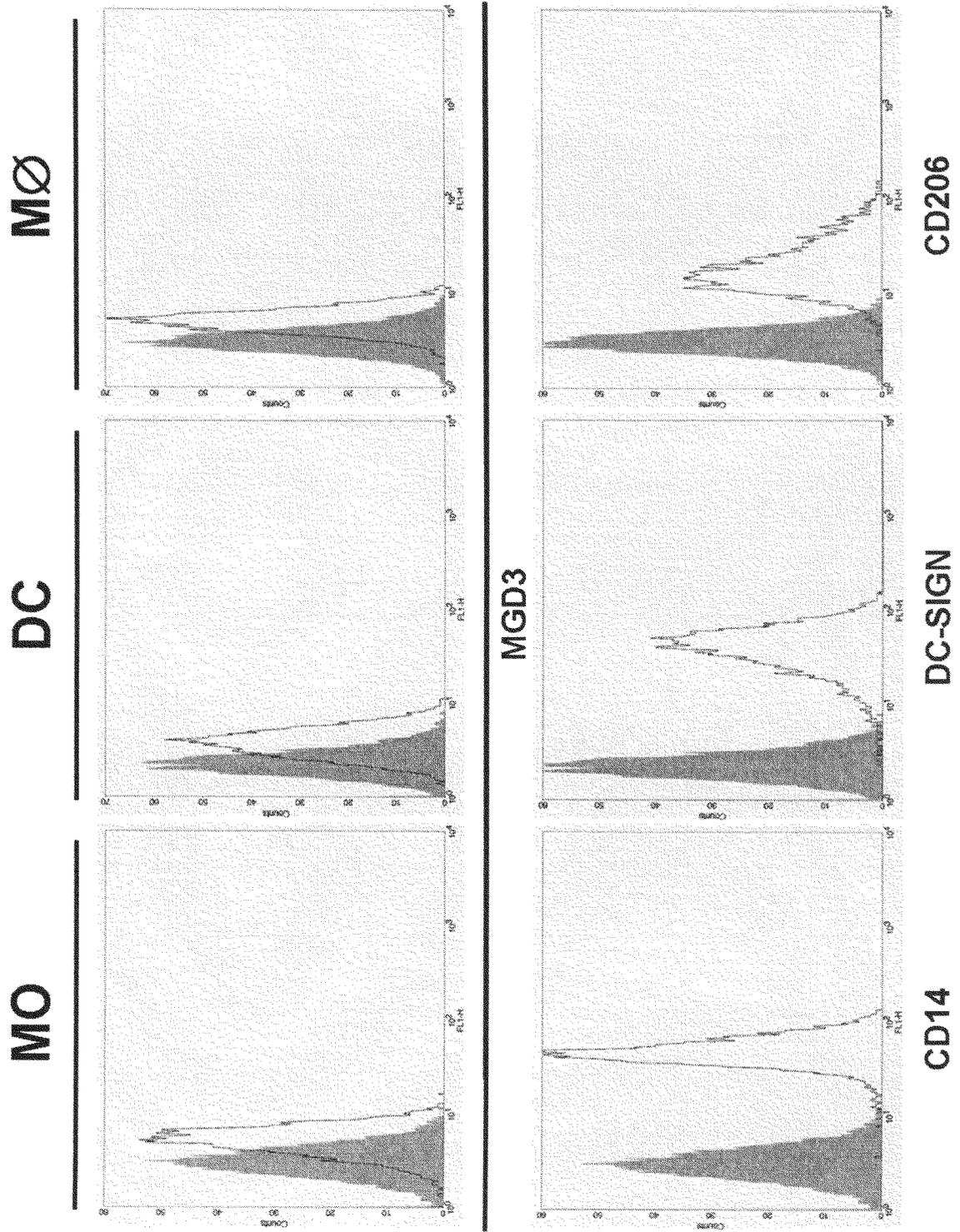


FIG 3

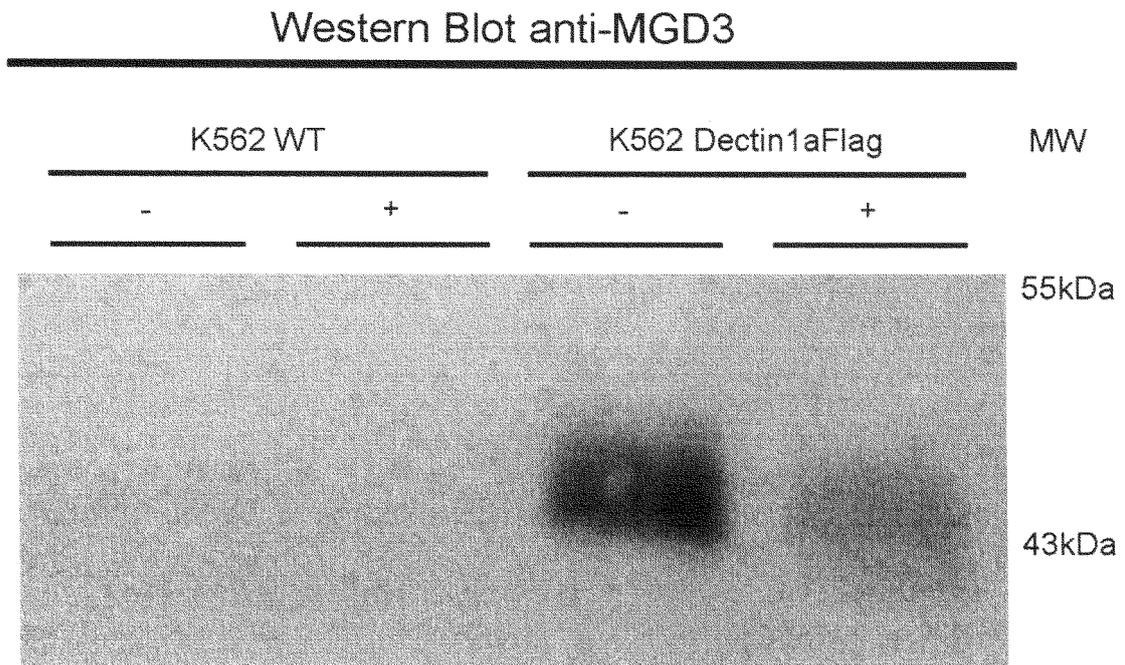


FIG 4

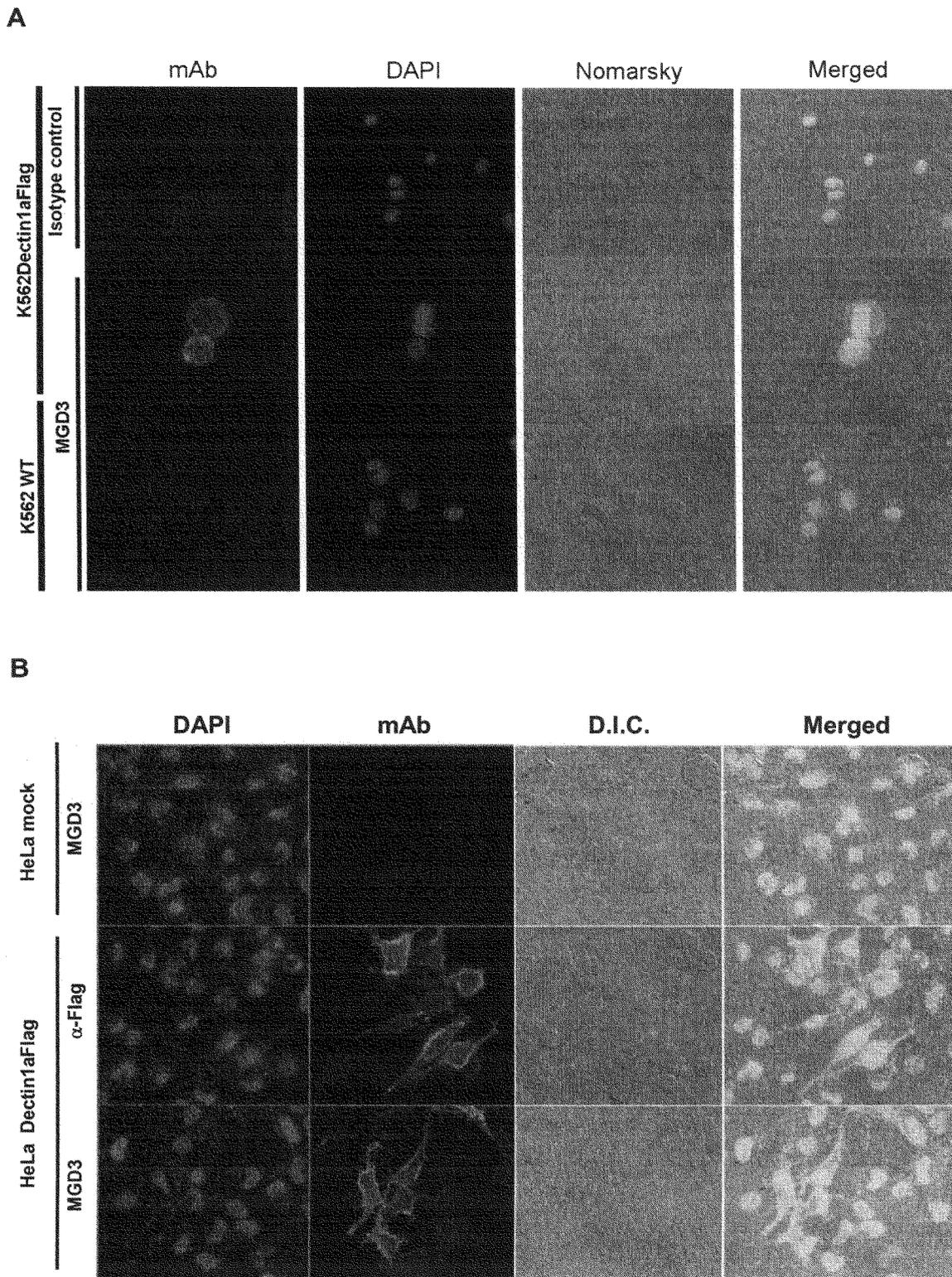


FIG 5

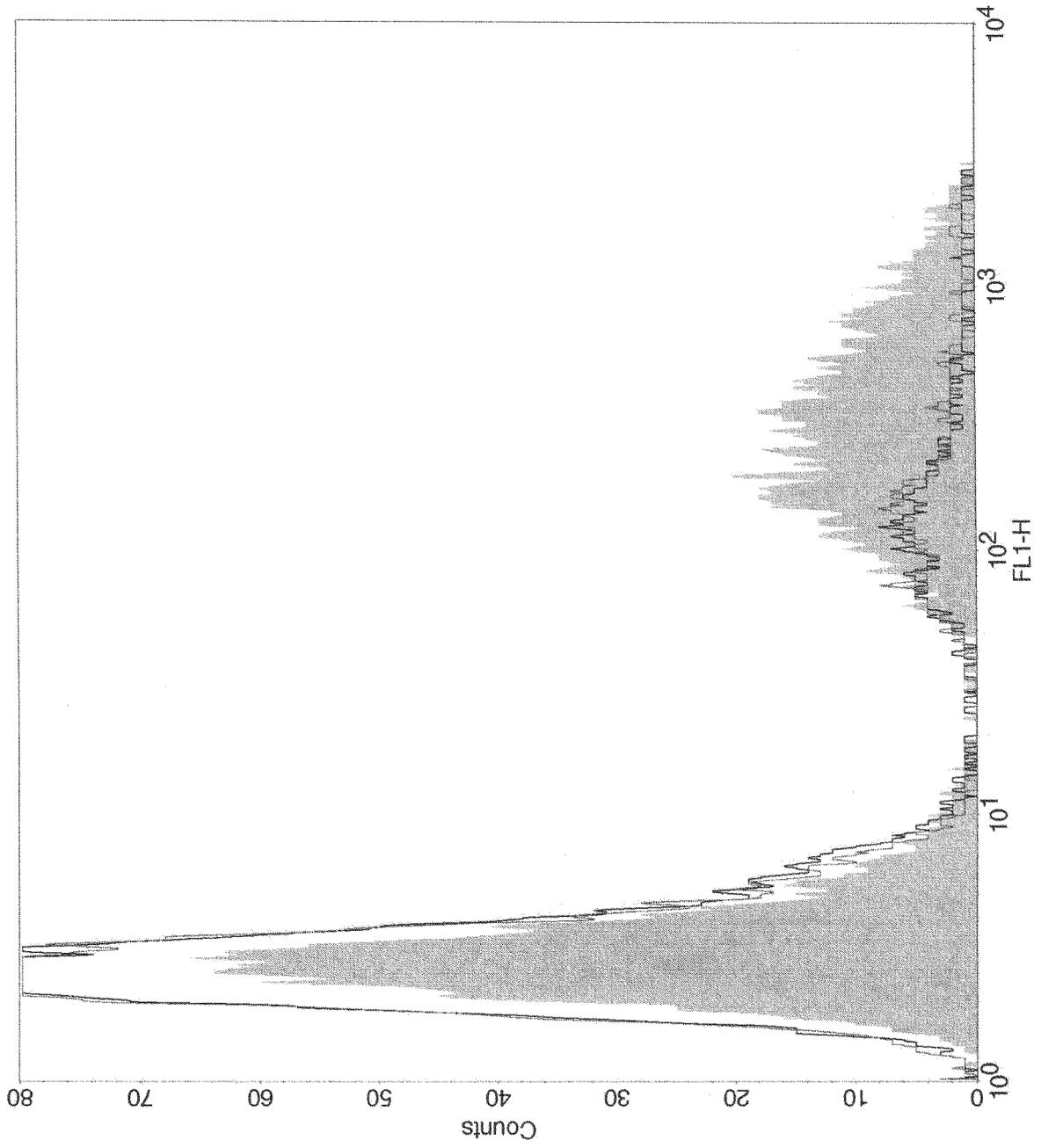


FIG 6A

B

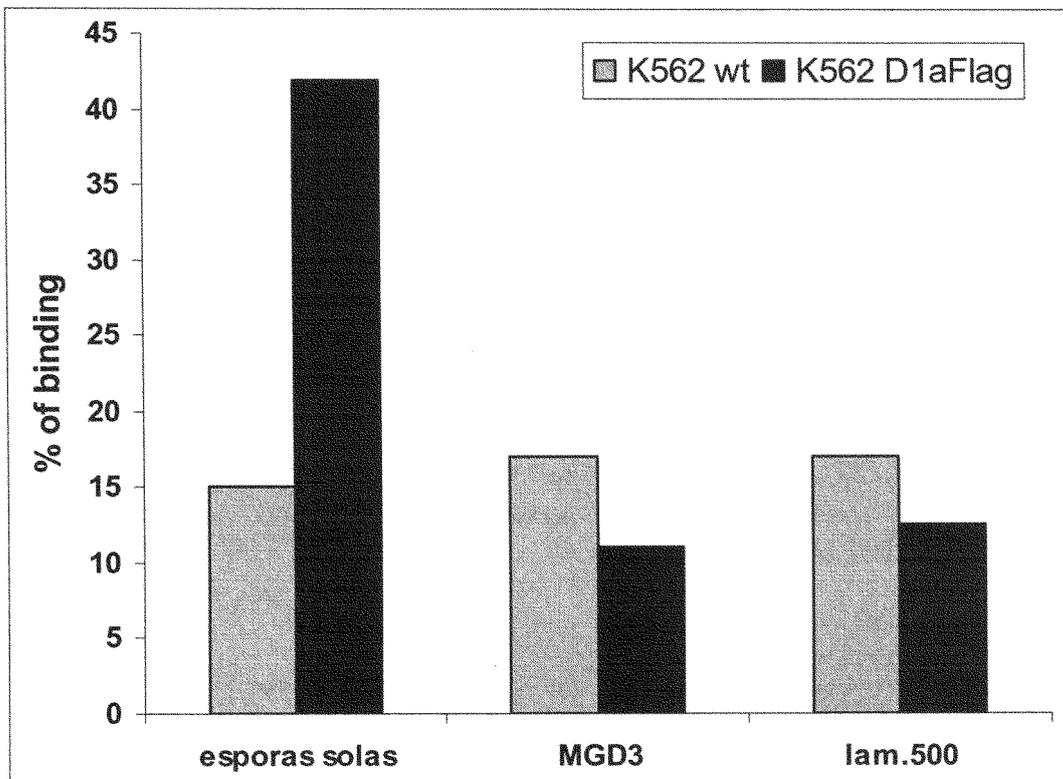


FIG 6 B

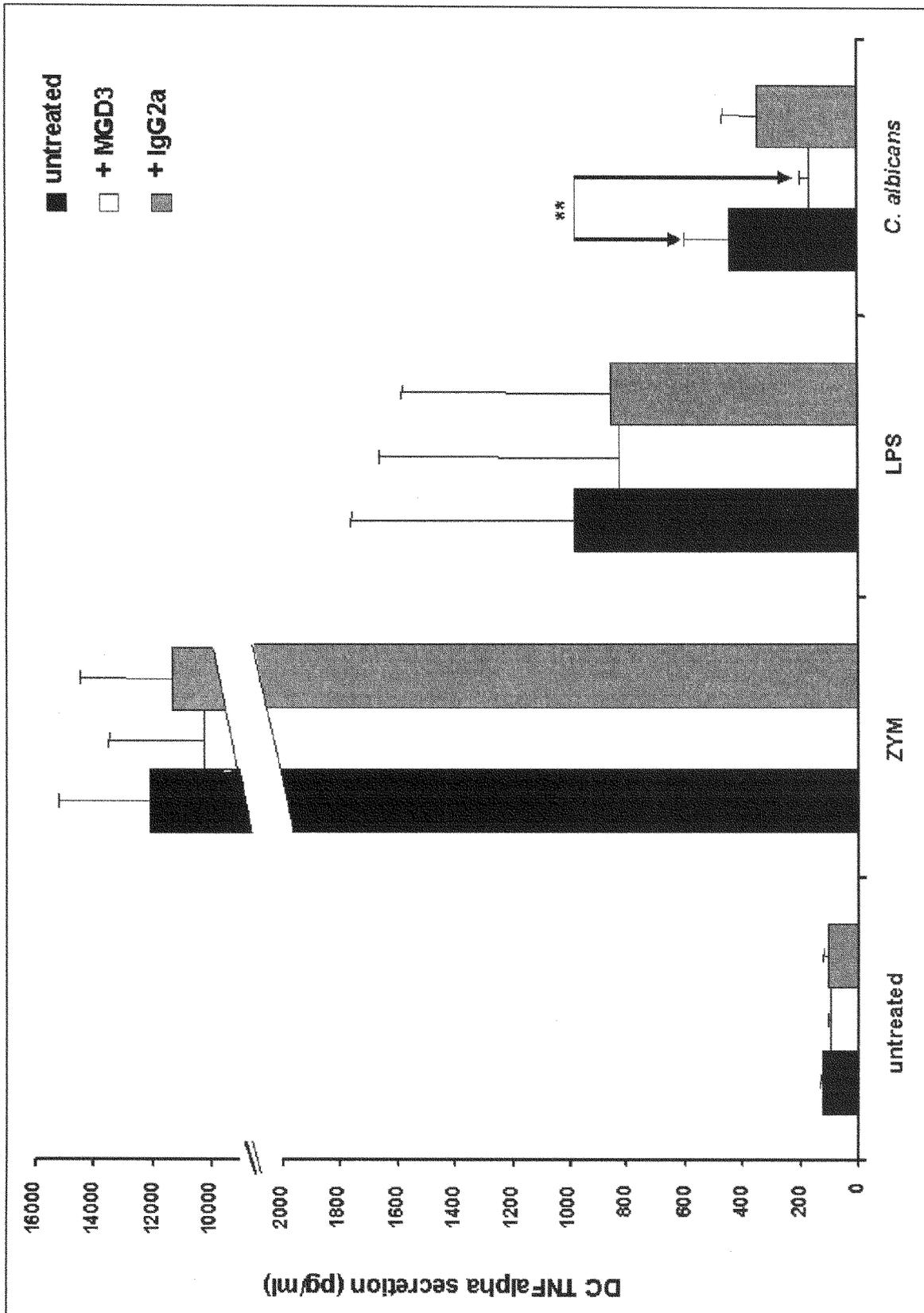


FIG 7A

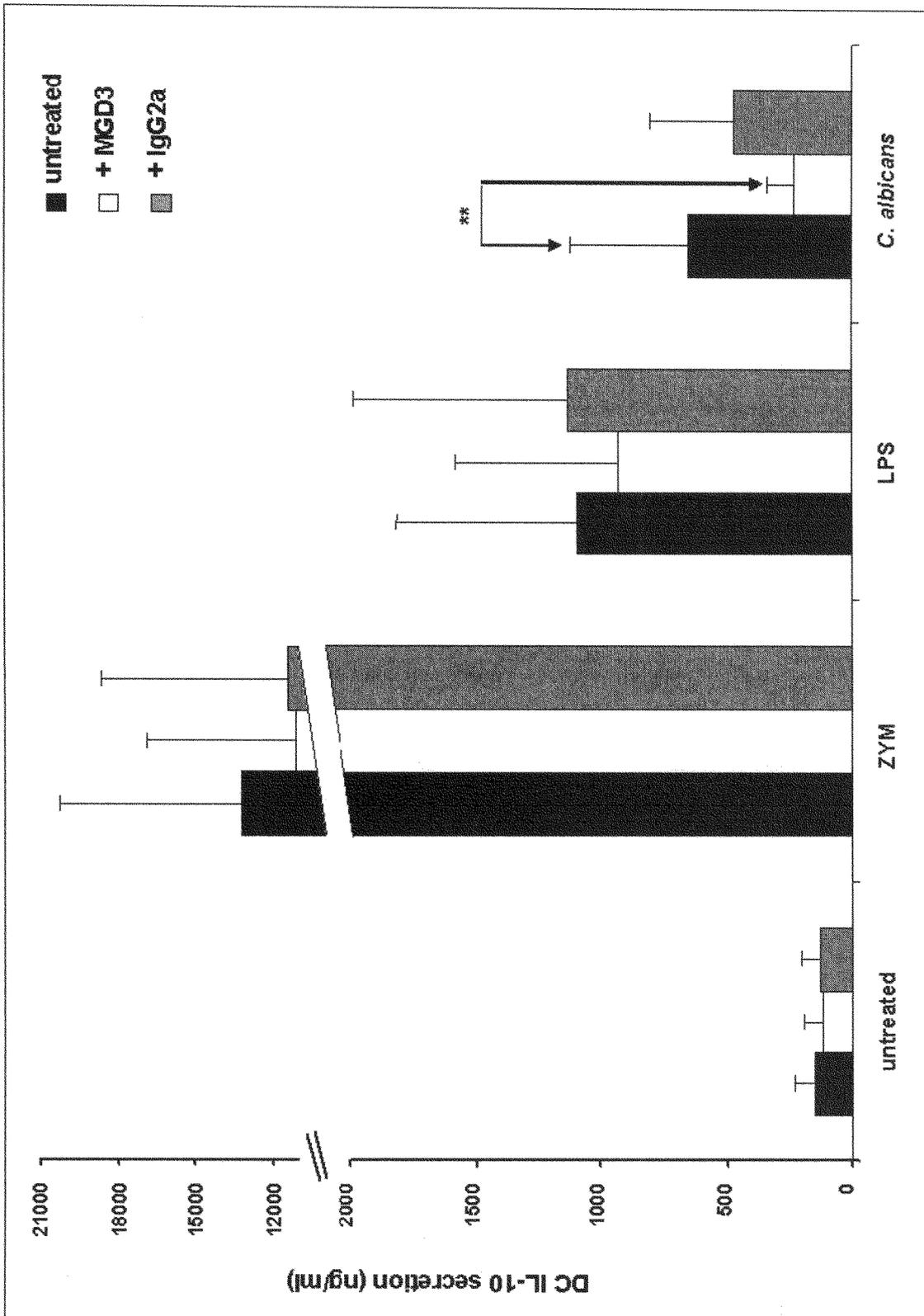


FIG 7B

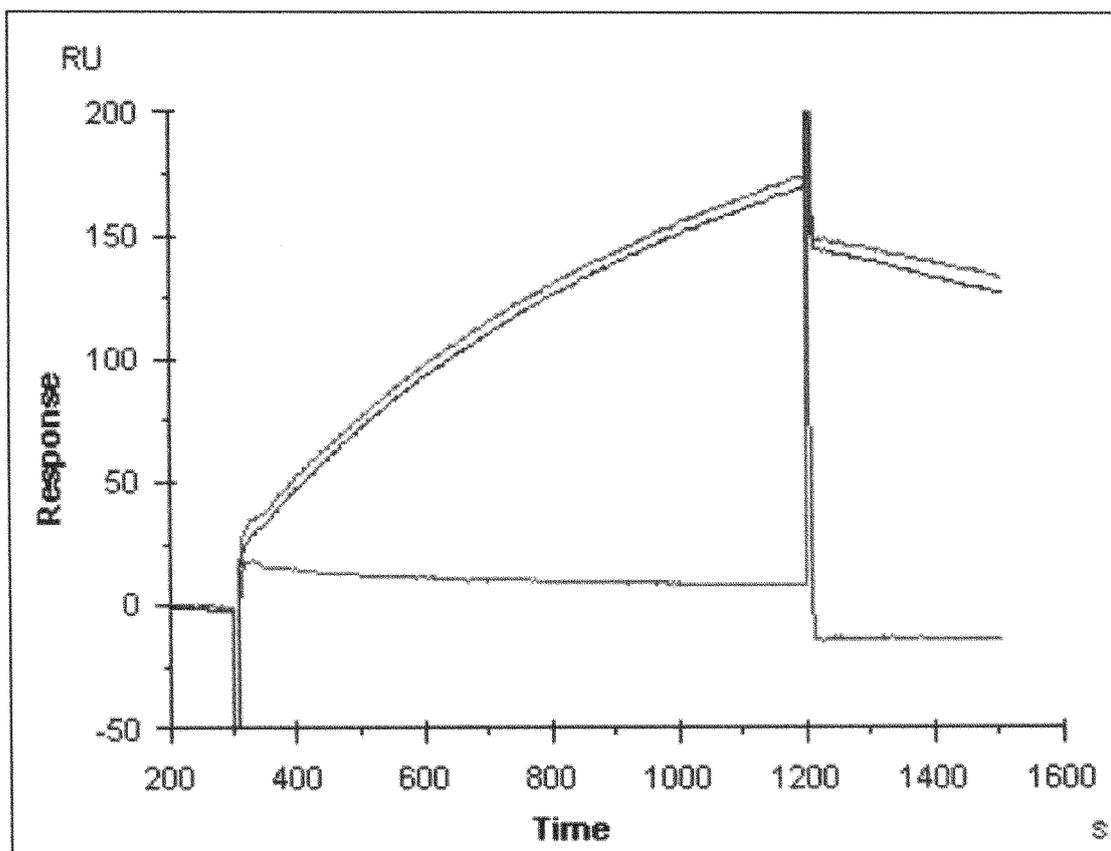


FIG 8

ES 2 337 224 B1

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL DE LA PRINCESA
- <120> ANTICUERPO ANTI-DECTIN-1 HUMANO, HIBRIDOMA PRODUCTOR DE DICHO ANTICUERPO Y SUS APLICACIONES
- 10 <130> Dectin_1
- <160> 4
- 15 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 528
- 20 <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>
- 25 <223> Dectin_1_71/247
- <220>
- <221> CDS
- 30 <222> (1)..(528)
- <223> Secuencia correspondiente a los nucleótidos 206-720 de la secuencia completa del mRNA de Dectin-1 humana (ID: AF400595) que codifican para los aminoácidos 71-247 de la parte extracelular (región del cuello y dominio de unión a carbohidratos, CTLD)
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

ES 2 337 224 B1

<400> 1

5	tcc Ser 1	aat Asn	tca Ser	gga Gly 5	agc Ser	aac Asn	aca Thr	ttg Leu	gag Glu	aat Asn 10	ggc Gly	tac Tyr	ttt Phe	cta Leu	tca Ser 15	aga Arg	48
10	aat Asn	aaa Lys	gag Glu	aac Asn 20	cac His	agt Ser	caa Gln	ccc Pro	aca Thr 25	caa Gln	tca Ser	tct Ser	tta Leu	gaa Glu 30	gac Asp	agt Ser	96
15	gtg Val	act Thr	cct Pro 35	acc Thr	aaa Lys	gct Ala	gtc Val	aaa Lys 40	acc Thr	aca Thr	ggg Gly	gtt Val	ctt Leu 45	tcc Ser	agc Ser	cct Pro	144
20	tgt Cys	cct Pro 50	cct Pro	aat Asn	tgg Trp 55	att Ile	ata Ile	tat Tyr	gag Glu	aag Lys	agc Ser	tgt Cys 60	tat Tyr	cta Leu	ttc Phe	agc Ser	192
25	atg Met 65	tca Ser	cta Leu	aat Asn	tcc Ser 70	tgg Trp	gat Asp	gga Gly	agt Ser	aaa Lys	aga Arg 75	caa Gln	tgc Cys	tgg Trp	caa Gln	ctg Leu 80	240
30	ggc Gly	tct Ser	aat Asn	ctc Leu 85	cta Leu	aag Lys	ata Ile	gac Asp	agc Ser	tca Ser 90	aat Asn	gaa Glu	ttg Leu	gga Gly	ttt Phe 95	ata Ile	288
35	gta Val	aaa Lys	caa Gln	gtg Val 100	tct Ser	tcc Ser	caa Gln	cct Pro	gat Asp 105	aat Asn	tca Ser	ttt Phe	tgg Trp	ata Ile 110	ggc Gly	ctt Leu	336
40	tct Ser	cgg Arg	ccc Pro 115	cag Gln	act Thr	gag Glu	gta Val	cca Pro 120	tgg Trp	ctc Leu	tgg Trp	gag Glu	gat Asp 125	gga Gly	tca Ser	aca Thr	384
45	ttc Phe	tct Ser 130	tct Ser	aac Asn	tta Leu	ttt Phe	cag Gln 135	atc Ile	aga Arg	acc Thr	aca Thr	gct Ala 140	acc Thr	caa Gln	gaa Glu	aac Asn	432
50	cca Pro 145	tct Ser	cca Pro	aat Asn	tgt Cys	gta Val 150	tgg Trp	att Ile	cac His	gtg Val	tca Ser 155	gtc Val	att Ile	tat Tyr	gac Asp	caa Gln 160	480
55	ctg Leu	tgt Cys	agt Ser	gtg Val 165	ccc Pro	tca Ser	tat Tyr	agt Ser	att Ile	tgt Cys 170	gag Glu	aag Lys	aag Lys	ttt Phe	tca Ser 175	atg Met	528

<210> 2

<211> 176

<212> PRT

50 <213> Artificial

<220>

55 <223> Synthetic Construct

60

65

ES 2 337 224 B1

<400> 2

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

45 <210> 3

<211> 9

<212> PRT

50 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido HA

55 <400> 3

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 1 5

60 <210> 4
 <211> 8

<212> PRT

65 <213> Artificial

ES 2 337 224 B1

<220>

<223> Péptido FLAG

5 <400> 4

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 337 224

② Nº de solicitud: 200801766

③ Fecha de presentación de la solicitud: 11.06.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HERNANZ-FALCÓN P. et al. "Cloning of human DECTIN-1, a Novel C-Type lectin-like Receptor Gene Expressed on Dendritic Cells". Immunogenetics 2001, Vol. 53, páginas 288-295. Figura 1A.	3-6
X	WILLMENT, J.A. et al. "Characterization of the Human Beta-glucan Receptor and Its Alternatively Spliced Isoforms". The Journal of Biological Chemistry. 23.11.2001, Vol. 276, no. 47, páginas 43818- 43823. Todo el documento, especialmente figura 3.	3-6
X	WO 02096945 A2 (ISIS INNOVATION LTD.) 05.12.2002, páginas 4-6; página 8 párrafo 1; página 24, párrafo 2; reivindicaciones 1,5-7,15-18,24.	1,7,10-14
Y		2,8,9
X	WO 9828332 A2 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 02.07.1998, todo el documento, especialmente SEQ ID nº 8; página 93, líneas 25-28; reivindicaciones 27,69-72,100-110.	1,3-7, 10-14
Y		2,8,9
Y	CHEN J. et al. Medicinal Importance of Fungal Beta-(1-3), (1-6)-glucans. Mycological Research III. 2007, páginas 635-652. 11.02.2007. En particular páginas 639-640.	2,8,9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 26.03.2010	Examinador M. Novoa Sanjurjo	Página 1/5
---	--	----------------------

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, C12N, G01N, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, EBI, BIOSIS, GOOGLE, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.03.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	2, 8-9	SÍ
	Reivindicaciones	1, 3-7, 10-14	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		SÍ
	Reivindicaciones	1-14	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

Consideraciones:

La invención consiste en un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente el dominio que comprende los aminoácidos 71 a 247 de la proteína humana Dectin-1, un receptor de membrana para beta-glucanos. También se reivindica la secuencia de ADN que codifica dicho polipéptido, el polipéptido y las secuencias que presentan al menos una identidad del 40% con las anteriores. Se reivindica asimismo el uso de las secuencias para producir anticuerpos anti Dectina-1 humanos y el uso de éstos en pruebas de diagnóstico y en la preparación de una composición farmacéutica.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	HERNANZ-FALCÓN P. ET AL. "Cloning of human DECTIN- 1, a Novel C-Type lectin-like Receptor Gene Expressed on Dendritic Cells". Immunogenetics 2001, Vol. 53, páginas 288-295.	2001
D02	WILLMENT, J.A. ET AL. "Characterization of the Human Beta-glucan Receptor and Its Alternately Spliced Isoforms". The Journal of Biological Chemistry. 23.11.2001, Vol. 276, no. 47, páginas 43818- 43823.	23-11-2001
D03	WO 02/096945 A2 (ISIS INNOVATION LTD.)	05-12-2002
D04	WO 9828332 A2 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM)	02-07-1998
D05	CHEN J. ET AL. Medicinal Importance of Fungal Beta-(1-3), (1-6)-glucans. Mycological Research III. 2007, páginas 635-652.	2007

Observaciones sobre documentos:

D01 describe las secuencias de ADN y la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la proteína Dectin-1 humana.

D02 describe además la localización exacta de cada uno de los exones que componen el dominio extracelular de Dectin-1 (aa 69-247). D03 describe la secuencia de ADN, el polipéptido, los anticuerpos y los usos terapéuticos de dichos anticuerpos.

D04, describe la proteína Dectin-1 de ratón, los diferentes dominios que la forman, la obtención de anticuerpos y su uso.

D05 describe la función fisiológica de Dectin-1.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La SEQ. ID. NO.1 de la reivindicación 3 se corresponde, con un 100% de identidad, con la secuencia de ADN que codifica la proteína Dectin-1 descrita en el documento D01 figura 1, y en el documento D03, SEQ. ID. NO.7. La SEQ. ID. NO.2 de la reivindicación 4 se corresponde, igualmente con un 100% de identidad, con el dominio extracelular de la proteína Dectin-1, descrita en numerosos documentos del estado de la técnica, en particular el documento D01, figura 1, y en el D02 figura 3.

La SEQ.ID. NO.1 de la reivindicación 3 y la SEQ. ID. NO.2 de proteína de la reivindicación 4 se consideran por tanto nuevas, pero carentes de actividad inventiva. Pero además, las reivindicaciones 3 y 4, están redactadas de una forma tan general que engloba secuencias distintas de SEQ ID 1 y 2. El documento D04, describe en la SEQ ID nº 8, el fragmento homólogo de la SEQ ID 2, con el que presenta una identidad del 61%. Esta secuencia, se ajusta al contenido de las reivindicaciones 3 y 4. Las reivindicaciones 3 y 4 por tanto y las 5, 6 en la medida en que dependen de ellas, en la forma en que están redactadas, carecen de novedad.

El documento D03 describe un anticuerpo humanizado desarrollado frente al dominio extracelular de la proteína Dectin-1, aminoácidos 66 a 244 (página 21). Este documento ataca la novedad de la reivindicación 1, referida a cualquier anticuerpo con características técnicas idénticas, pero no ataca la novedad de la reivindicación 2, referida a un anticuerpo específico con número de depósito.

El documento D03, divulga igualmente la preparación del anticuerpo a través de un hibridoma de idénticas características al hibridoma descrito en la reivindicación 7. La reivindicación 7 referida al hibridoma que produce un anticuerpo específico de la SEQ.ID. 2 carece por tanto de actividad inventiva.

La reivindicación 1, 3-7 y las reivindicaciones 10 a 15, dependientes de la reivindicación 1 carecen por tanto de novedad y de actividad inventiva y no cumplen los requisitos de los Art. 6 y 8 de la LP.

Hoja adicional

A efectos de la valoración de la actividad inventiva de un anticuerpo, se considera que si el antígeno es conocido, el anticuerpo producido frente a dicho antígeno carece de actividad inventiva, a menos que dicho anticuerpo presente una característica técnica que suponga una ventaja no obvia en relación a otros anticuerpos frente al mismo antígeno contenidos en el estado de la técnica anterior. El anticuerpo monoclonal de la invención presenta algunas características generales, como el reconocimiento del antígeno para el que se ha desarrollado, la proteína Dectin-1 y el bloqueo de la unión del receptor con su ligando natural, los beta-glucanos por ejemplo de la levadura *Candida albicans*.

El anticuerpo presenta además las siguientes características técnicas: es capaz de inhibir la producción del factor TNF-alfa e interleukina-10 (IL-10) en células dendríticas derivadas de monocitos preestimulados con *C. albicans*.

El documento D03 describe el estado de la técnica más cercano al objeto de la reivindicación 2. El documento D03 (página 4, líneas 1-4) describe que la activación del receptor Dectin-1 por su ligando, el zimosan, un beta-glucano presente en las paredes celulares de levaduras, por ejemplo *Candida albicans*, dan lugar a la inmediata producción del factor TNF alfa. En D03 (página 4, párrafos 1, 3, 4 y 8) se indica claramente que los anticuerpos frente a Dectin-1, deben estar preferiblemente dirigidos contra el dominio extracelular de la proteína y pueden servir, para detectar la proteína, bloquear su unión con el ligando, o competir con él si la exposición al anticuerpo se produce una vez el receptor ya ha sido cultivado con su ligando natural (D03, página 4, párrafo 1), como es el caso en esta solicitud.

El documento D03 no anticipa sin embargo la capacidad del anticuerpo de reducir la síntesis de IL-10 en células dendríticas derivadas de monocitos activados con *C. Albicans*. Las funciones del receptor Dectin-1 se encuentran descritas en el documento D05 (páginas 639, párrafo 1, página 640, párrafo 1). En D04 se describe que la activación del receptor tras su unión con zymosan dar lugar de una parte a la síntesis de TNF-alfa y por otra parte inicia una cascada de señales a través de la fosforilación de la proteína Dectin-1 que se traduce en el aumento de la producción de IL-10. Es decir, tanto la activación ambas reacciones son consecuencia directa de la unión del receptor a su ligando natural, la levadura *Candida albicans*.

De la combinación de las informaciones contenidas en los documentos D03 y D05 resulta por tanto obvio para un experto en la materia, que si se obtiene un anticuerpo que reconoce la proteína receptora Dectin-1 por una zona que bloquea con eficiencia la unión del receptor a su ligando, o compitiendo con el, las reacciones que se derivan de la activación del receptor se revertirán, es decir, se disminuirá la producción de TNF-alfa y de IL-10. No se observan por tanto características técnicas en el anticuerpo monoclonal de la invención que supongan una ventaja técnica no obvia con respecto al estado de la técnica.

El objeto de la reivindicación 2, es por tanto nuevo, pero carece de actividad inventiva. El objeto de la reivindicación 8 referida al hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 2, es asimismo nuevo, pero carece igualmente de actividad inventiva. El objeto de la reivindicación 9 referida al uso del hibridoma de la reivindicación 8 es consecuentemente nuevo pero carente de actividad inventiva.

Las reivindicaciones 2, 8 y 9 carecen de actividad inventiva de acuerdo al Art. 8 de la LP.