



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 412**

51 Int. Cl.:

C07K 16/34 (2006.01)	C12N 15/13 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)	A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)	A61P 37/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01927974 .4**

96 Fecha de presentación : **12.04.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1272527**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.01.2003**

54 Título: **Preparación de anticuerpos que tienen una ADCC a través del CD16, en particular de los anticuerpos monoclonales anti-Rhesus D.**

30 Prioridad: **12.04.2000 FR 00 04685**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.05.2009

73 Titular/es: **LFB Biotechnologies**
3 avenue des Tropiques, ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis, FR

72 Inventor/es: **Beliard, Roland;**
Bourel, Dominique;
Glacet, Arnaud;
De Romeuf, Christophe;
Bihoreau, Nicolas y
Nony, Emmanuel

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

DESCRIPCIÓN

Preparación de anticuerpos que tienen una ADCC a través del CD16, en particular de los anticuerpos monoclonales anti-Rhesus D.

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención y de selección de anticuerpos monoclonales mediante un ensayo de tipo ADCC, pudiendo dichos anticuerpos activar los receptores Fcy de tipo III. La invención se refiere asimismo a unos anticuerpos monoclonales que presentan una estructura glicánica particular, a las células que producen dichos anticuerpos, a los procedimientos de preparación de las células productoras, así como a las composiciones farmacéuticas o a los ensayos de diagnóstico que comprenden dichos anticuerpos. Los anticuerpos anti-D según la invención se pueden usar para la prevención de la isoimmunización Rhesus de individuos Rh negativos, en particular de la enfermedad hemolítica del recién nacido (MHNN) o en unas aplicaciones tal como la púrpura trombocitopénica idiopática (PTI).

La inmunoterapia pasiva con la ayuda de anticuerpos policlonales se realiza desde los años 70. Sin embargo, la fabricación de las inmunoglobulinas policlonales plantea varios problemas:

La inmunización de sujetos voluntarios se interrumpió en Francia en 1997, debido a los problemas éticos que presentan dichos actos. En Francia, tal como en Europa, el número de donantes inmunizados es tan bajo para asegurar un abastecimiento suficiente en ciertos anticuerpos, que es necesario importar plasma hiperinmunizado de los Estados Unidos por ejemplo.

Así, esta escasez de inmunoglobulina no permite prever una administración antenatal para la prevención de la MHNN.

Diversos estudios han conducido a la producción de anticuerpos monoclonales humanos con el objetivo de sustituir los anticuerpos policlonales obtenidos a partir del fraccionamiento de plasmas de donantes voluntarios.

Los anticuerpos monoclonales presentan varias ventajas: se pueden obtener en grandes cantidades a precios razonables, cada lote de anticuerpos es homogéneo y la calidad de los diferentes lotes es reproducible puesto que están producidos por la misma línea celular que es criopreservada en nitrógeno líquido. La seguridad del producto se puede asegurar en cuanto a la ausencia de contaminación vírica.

Varias publicaciones describen la obtención de líneas celulares productoras de anticuerpos monoclonales humanos anti-Rh D de clase IgG, a partir de células B de donantes inmunizados. Boylston *et al.* 1980; Koskimies 1980; Crawford *et al.* 1983; Doyle *et al.* 1985; Goossens *et al.* 1987; Kumpel *et al.* 1989(a) y Mc Cann-Carter *et al.* 1993 describen la obtención de líneas de linfocitos B transformados por el virus EBV. Melamed *et al.* 1985; Thompson *et al.* 1986 y Mc Cann-Carter *et al.* 1993 se refieren a unos heterohíbridos que resultan de la fusión de linfocitos B (transformados por EBV) con mieloma murino. Goossens *et al.* 1987 se refiere a unos heterohíbridos que resultan de la fusión de linfocitos B (transformados por EBV) con mieloma humano. Bron *et al.* 1984 y Foung *et al.* 1987 describen unos heterohíbridos que resultan de la fusión de linfocitos B (transformados por EBV) con heteromieloma humano-ratón y, por último, Edelman *et al.* 1997 se refiere a unas células de insectos transfectadas con el gen que codifica para un anti-Rh(D) con la ayuda del sistema baculovirus. Klein P. *et al.*, Human antibodies, 1997, 8(1), 17-25 y Hadley A. *et al.* Immunology, 1992, 76(5), 446-51 describen el efecto de un cambio de sub-clase IgG1/3 sobre la actividad de un anti-D.

Entre las patentes y solicitudes de patente que se refieren a dichos anticuerpos monoclonales y sus líneas secretoras, se pueden citar:

El documento EP 576 093 (AETS (FR), Biotest Pharma GmbH (Alemania); Composition for prophylaxis of the haemolytic disease of the new-born comprises two human monoclonal antibodies of sub-class IgG1 and IgG3, which are active against the Rhesus D antigen), el documento RU 2094462, WO 85/02413 (Board of Trustees of the Leland Stanford Jr. University, Human Monoclonal Antibody against Rh (D) Antigen and its Uses), el documento GB 86-10106 (Central Blood Laboratories Authority, Production of heterohybridomas for manufacture of human monoclonal antibodies to Rhesus D antigen), el documento EP 0 251 440 (Central Blood Laboratories Authority, Human Anti-Rhesus D Producing Heterohybridomas), los documentos WO 89/02442, WO 89/02600 y WO 89/024443 (Central Blood Laboratories Authority, Human Anti-Rh (D) Monoclonal Antibodies), el documento WO 8607740 (Institut Pasteur, Protein Performance SA, Paris, FR, Obtention d'un anticorps monoclonal recombinant à partir d'un anticorps monoclonal human anti-rhésus D, sa production en cellules d'insecte et ses utilisations), el documento JP 88-50710 (International Reagents Corp., Japan, Reagents for Determination of Blood Group Substance Rh (D) Factor), el documento JP 83-248865 (Mitsubishi Chemical Industries Co., Ltd., Japan, Preparation of Monoclonal Antibody to Rh (D) positive Antigen), el documento CA 82-406033 (Queens University at Kingston, Human Monoclonal Antibodies) y el documento GB 8226513 (University College London, Human Monoclonal Antibody against Rhesus D Antigen).

Si el uso de anticuerpos monoclonales presenta numerosas ventajas con relación al uso de pools de anticuerpos policlonales, puede en cambio resultar difícil obtener un anticuerpo monoclonal eficaz. En efecto, en el marco de la invención, se ha descubierto que el fragmento Fcy de la inmunoglobulina obtenida debe poseer unas propiedades bien particulares con el fin de poder interactuar y activar los receptores de las células efectoras (macrófago, linfocito T, H y NK).

La actividad biológica de ciertas inmunoglobulinas G es dependiente de la estructura de los oligosacáridos presentes en la molécula, y en particular en su parte Fc. Las moléculas IgG de todas las sub-clases humanas y murinas poseen un N-oligosacárido fijado al dominio CH₂ de cada cadena pesada (en el residuo Asn 297 para las IgG humanas). Se ha demostrado la influencia de este residuo glicánico sobre la capacidad del anticuerpo para interactuar con unas moléculas efectoras (Fc receptores y complemento). La inhibición de glicosilación de una IgG1 humana, mediante el cultivo en presencia de Tunicamicina, provoca por ejemplo una disminución de 50 veces de la afinidad de este anticuerpo para el receptor FcγRI presente sobre los monocitos y macrófagos (Leatherbarrow *et al.*, 1985). La fijación al receptor FcγRIII está afectada asimismo por la pérdida de carbohidratos sobre la IgG, puesto que se ha descrito que una IgG3 no glicosilada es capaz de inducir una lisis de tipo ADCC por medio del receptor FcγRIII de las células NK (Lund *et al.*, 1990).

Sin embargo, más allá de la presencia necesaria de estos residuos glicánicos, es más precisamente la heterogeneidad de su estructura lo que puede ocasionar unas diferencias en la capacidad para activar unas funciones efectoras. Se han observado unos perfiles de galactosilación variables en función de los individuos (IgG1 humanas séricas). Estas diferencias reflejan probablemente unas disparidades en la actividad de las galactosiltransferasas y otras enzimas entre los clones celulares de estos individuos (Jefferis *et al.*, 1990). Mientras que esta heterogeneidad normal de los procesos post-traduccionales genera diferentes glicofomas (incluso en el caso de anticuerpos monoclonales), puede conducir a unas estructuras atípicas asociadas a ciertos estados patológicos tales como la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, para los cuales se ha demostrado una proporción importante de los residuos agalactosilados (Parekh *et al.*, 1985).

El perfil de glicosilación de la molécula purificada es la consecuencia de efectos múltiples de los que ya se han estudiado ciertos parámetros. El esqueleto proteico de las IgG y en particular los aminoácidos en contacto con los residuos N-acetilglucosamina (GlcNAc) y galactosa terminales del brazo manosa α 1-6 (aa 246 y 258 de las IgG) pueden explicar la existencia de estructuras preferenciales (galactosilación), tal como lo muestra el estudio realizado sobre las IgG murinas y quiméricas de diferentes isotipos (Lund *et al.*, 1993).

Las diferencias observadas demuestran asimismo unas especificidades relacionadas con la especie y con el tipo celular usado para la producción de la molécula. Así, la estructura habitual de los N-glicanos de las IgG humanas revela una proporción significativa de tipos biantenados con un residuo GlcNAc en posición bisectriz, estructura ausente a nivel de los anticuerpos producidos por unas células murinas. Asimismo, los residuos de ácidos siálicos sintetizados por la línea CHO (Chinese Hamster Ovary) son exclusivamente de tipo α 2-3 mientras que son de tipo α 2-3 y α 2-6 con las células murinas y humanas (Yu Ip *et al.*, 1994). La producción de inmunoglobulinas en unos sistemas de expresión diferentes de los que proceden de mamíferos puede introducir unas modificaciones mucho más importantes tales como la presencia de residuos xilosa fabricados por las células de insectos o por las plantas (Ma *et al.*, 1995).

Otros factores, tales como las condiciones de cultivo celular (incluyendo la composición del medio de cultivo, la densidad celular, el pH, la oxigenación), parecen intervenir sobre la actividad de las glicosiltransferasas de la célula y por consiguiente sobre la estructura glicánica de la molécula (Monica *et al.*, 1993; Kumpel *et al.*, 1994 b).

Ahora bien, se ha descubierto en el campo de la presente invención que una estructura de tipo biantenada, con unas cadenas cortas, una baja sialilación, unas manosas terminales y/o GlcNAc terminales no intermedios es el denominador común de las estructuras glicánicas que confieren una fuerte actividad ADCC a los anticuerpos monoclonales. Se ha llevado a cabo asimismo un procedimiento de preparación de dichos anticuerpos capaces de activar las células efectoras por medio del FcγRIII, en particular de anticuerpos anti-Rh(D).

Los antígenos de grupos sanguíneos se clasifican en varios sistemas en función de la naturaleza de las moléculas membranas expresadas en la superficie de los hematíes. El sistema Rhesus (Rh) comprende 5 moléculas o antígenos: D, C, c, E y e (ISSITT, 1988). El antígeno D es la más importante de estas moléculas porque es la más inmunógena, es decir, que puede inducir la producción de anticuerpos anti-D si unos glóbulos rojos Rh D positivo son transfundidos a unos sujetos Rh negativo.

El antígeno D se expresa normalmente en 85% de los sujetos caucásicos, siendo estas personas denominadas Rh positivo; 25% de estos sujetos son por lo tanto Rh negativo, es decir, que sus hematíes no presentan el antígeno D. La expresión de los antígenos D presenta ciertas variantes que se pueden asociar, o bien a una baja densidad antigénica, y se hablará entonces de antígenos D débiles, o bien a una antigenicidad diferente o parcial, y se hablará entonces de antígenos D parciales. El carácter D débil se caracteriza porque se trata de un antígeno normal pero cuyo número de sitios por hematíe está disminuido de manera más o menos importante; este carácter es transmisible según las leyes mendelianas. Los fenotipos D parciales han sido descubiertos en unos sujetos Rh D positivo que posean unos anticuerpos anti-D séricos; estos antígenos D parciales se pueden por lo tanto caracterizar como que poseen sólo una parte del mosaico. Unos estudios realizados con unos anticuerpos policlonales y monoclonales han permitido definir 7 categorías de antígenos D parciales con la descripción de por lo menos 8 epítomos constitutivos del antígeno D (LOMAS *et al.*, 1989; TIPETT 1988).

La importancia de los anticuerpos anti-Rh D apareció con el descubrimiento de los mecanismos que conducen a la enfermedad hemolítica del recién nacido (MHNN). Ésta corresponde a los diferentes estados patológicos observados en ciertos fetos o en ciertos recién nacidos cuando existe una incompatibilidad feto-maternal de grupo sanguíneo que

es responsable de la formación de anticuerpos maternos anti-Rh D capaces de atravesar la barrera placentaria. En efecto, el paso de hematíes fetales Rh positivo a una madre Rh negativo puede provocar la formación de anticuerpos anti-D.

Después de la inmunización de la madre Rh negativo, los anticuerpos anti-D de clase IgG son capaces de atravesar la barrera placentaria y fijarse sobre los hematíes fetales Rh positivo. Esta fijación provoca la activación de células inmunocompetentes a través de sus receptores Fc de superficie que induce así una hemólisis de los hematíes fetales sensibilizados. En función de la intensidad de la reacción, se pueden observar varios grados de gravedad de la MHNN.

Un diagnóstico de la MHNN se puede realizar antes y después del nacimiento. El diagnóstico prenatal se basa en la evolución del índice de los anticuerpos anti-D en la madre usando varias técnicas inmunohematológicas. El diagnóstico post-parto se puede llevar a cabo a partir de una extracción de sangre del cordón umbilical analizando los siguientes parámetros: determinación de los grupos sanguíneos del feto y del padre; búsqueda de anticuerpos anti-D; dosificación de la hemoglobina y de la bilirrubina.

Una profilaxis de la MHNN se realiza actualmente de forma sistemática en todas las mujeres de grupo sanguíneo Rh negativo que haya traído al mundo un niño Rh positivo con unas inyecciones de inmunoglobulinas humanas anti-D. Los primeros ensayos reales de inmunoprofilaxis han empezado en 1964. Para que la prevención sea eficaz, se necesita que las inmunoglobulinas sean inyectadas antes de la inmunización, es decir, en las 72 horas siguientes al parto, y que las dosis de anticuerpos sean suficientes (10 μ g de anticuerpo anti-D para 0,5 ml de hematíes Rh+).

Varios anticuerpos monoclonales anti-D han sido objeto de una evaluación terapéutica: BROSSARD/FNTS 1990 (no publicado); THOMSON/IBGRL 1990; KUMPEL/IBGRL 1994; BELKINA/Instituto de hematología de Moscú 1996; BIOTEST/LFB 1997 (no publicado). La eficacia clínica de los anticuerpos para inducir el aclaramiento de los glóbulos rojos Rh(D) positivo ha sido evaluado en unos voluntarios Rh(D) negativo. Sólo un anticuerpo de tipo IgG1 ha mostrado una eficacia equivalente a la de las inmunoglobulinas policlonales anti-D pero sólo en algunos pacientes (KUMPEL *et al.*, 1995).

La invención propone suministrar unos anticuerpos monoclonales que responden a los problemas mencionados anteriormente, es decir, unos anticuerpos seleccionados mediante un ensayo de tipo ADCC específico del anticuerpo y/o de los anticuerpos que poseen una estructura glicánica necesaria para la obtención de una buena eficacia.

Descripción

Así, la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un anticuerpo monoclonal capaz de activar las células efectoras que expresan el Fc γ RIII, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- a) purificar anticuerpos monoclonales obtenidos a partir de diferentes clones que proceden de líneas celulares seleccionadas de entre los hibridomas, en particular los heterohibridomas, y las líneas celulares animales o humanas transfectadas con la ayuda de un vector que comprende el gen que codifica para dicho anticuerpo;
- b) añadir cada anticuerpo obtenido en la etapa a) a una mezcla de reacción distinta que comprende:
 - las células diana de dichos anticuerpos,
 - unas células efectoras que comprenden unas células que expresan el Fc γ RIII,
 - unas IgG polivalentes,
- c) determinar el porcentaje de lisis de las células diana y seleccionar los anticuerpos monoclonales que activan las células efectoras que provocan una lisis significativa de las células diana (actividad ADCC de tipo Fc γ RIII).

Los clones pueden proceder de líneas celulares heterohíbridas obtenidas mediante la fusión de linfocitos B humanos (que proceden de sujetos inmunizados) con unas células de mieloma murino, humano o heterohíbrido, en particular el mieloma K6H6-B5 (ATCC n° CRL 1823); o también de líneas celulares animales o humanas transfectadas con la ayuda de un vector que contiene el gen que codifica para una inmunoglobulina humana de tipo IgG, pudiendo ser dichas líneas seleccionadas de entre las líneas CHO-K, CHO-Lec10, CHO Lec-1, CHO Pro-5, CHO dhfr-, Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, YB2/0, BHK, K6H6, NSO, SP2/0-Ag 14 y P3X63Ag8.653.

Las IgG polivalentes se usan para inhibir el mecanismo de lisis de las células efectoras a través del Fc γ RIII. En este procedimiento, se seleccionan los anticuerpos que presentan un porcentaje ADCC de tipo Fc γ RIII superior a 60%, 70%, 80% o preferentemente superior a 90%.

Las células diana pueden ser unos hematíes tratados con papaína. En este caso, se depositan por pocillo:

- 100 μ l de anticuerpos monoclonales purificados a aproximadamente 200 ng/ml,

- 25 μ l de hematíes papainados, es decir, aproximadamente 1×10^6 células,
- 25 μ l de células efectoras, es decir, aproximadamente 2×10^6 células, y
- 50 μ l de IgG polivalentes, en particular de TEGELINE™ (LFB, Francia), con una concentración comprendida entre 1 y 20 mg/ml.

Así, se puede comparar la calidad de lisis de las células diana con dos controles positivos que consisten en un compuesto químico tal como NH_4Cl y un anticuerpo de referencia activo *in vivo* y con un control negativo que consiste en un anticuerpo inactivo *in vivo*.

Se pueden usar asimismo los anticuerpos policlonales de origen comercial como controles positivos y un anticuerpo monoclonal no apropiado para inducir un aclaramiento *in vivo* como control negativo.

Ventajosamente, este procedimiento permite preparar unos anticuerpos monoclonales anti-Rh(D), tal como se ha indicado anteriormente. Se usan entonces como células diana unos hematíes rhesus D.

La invención se basa por lo tanto en la puesta a punto de un ensayo de actividad biológica *in vitro* en el que las actividades medidas están en correlación con la actividad biológica *in vivo* de los anticuerpos monoclonales o policlonales ya evaluados desde el punto de vista clínico en cuanto a su potencialidad para inducir el aclaramiento de hematíes Rh (D) positivos en unos sujetos voluntarios Rh (D) negativo. Este ensayo permite evaluar la actividad lítica dependiente del anticuerpo = ADCC (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) inducida esencialmente por los receptores Fc γ de tipo III (CD 16), siendo los receptores Fc γ de tipo I (CD 64) saturados por la adición de inmunoglobulinas humanas de tipo IgG (en forma de IgG polivalentes terapéuticas). La especificidad Fc γ RIII de este ensayo ADCC ha sido confirmada por la inhibición en presencia de anticuerpos monoclonales anti-Fc γ RIII (véase la figura 6). Se usan unas células mononucleadas de sujetos sanos como células efectoras en una proporción efector/diana (E/C) cercana a las condiciones fisiológicas *in vivo*. En estas condiciones, las actividades líticas de las inmunoglobulinas policlonales y de los anticuerpos monoclonales anti-D ineficaces *in vivo* (anticuerpo DF5 Goossens *et al.*, 1987 y los anticuerpos AD1 + AD3, FR 9207893 LFB/Biotest y FOG-1, GB 2189506) son respectivamente fuertes y débiles.

La selección de los anticuerpos descritos en la presente invención se ha realizado por lo tanto mediante la evaluación de su actividad biológica en este ensayo de tipo ADCC (véase el ejemplo 1).

En otro aspecto, la invención se refiere a los anticuerpos susceptibles de ser obtenidos a partir del procedimiento descrito anteriormente, presentando dichos anticuerpos unos porcentajes ADCC de tipo Fc γ RIII superiores a 60%, 70%, 80% o preferentemente superiores a 90% con relación al policlonal de referencia. Los anticuerpos monoclonales de la invención, dirigidos contra un antígeno determinado, activan las células efectoras que expresan el Fc γ RIII provocando una lisis superior a 60%, 70%, 80%, preferentemente superior a 90% de la lisis provocada por unos anticuerpos policlonales dirigidos contra dicho antígeno. Ventajosamente, dichos anticuerpos monoclonales son dirigidos contra el rhesus D.

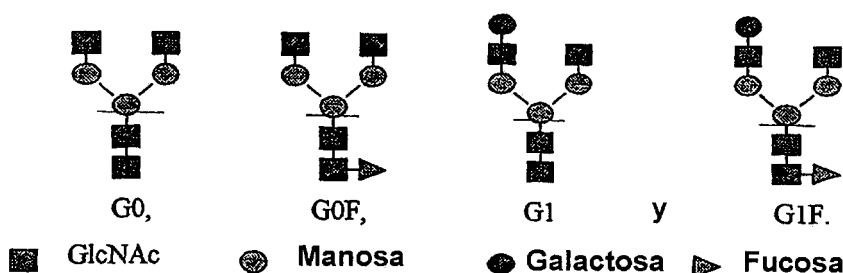
Preferentemente, se pueden producir mediante unos clones derivados de las líneas Vero (ATCC n° CCL 81), YB2/0 (ATCC n° CRL 1662) o CHO Lec-1 (ATCC n° CRL 1735), y pueden pertenecer a la clase IgG1 o IgG3.

La invención se refiere asimismo a unos anticuerpos que presentan una estructura glicánica particular que confiere una actividad efectora dependiente del Fc γ RIII.

Dichos anticuerpos se pueden obtener a partir de un procedimiento expuesto anteriormente y poseen en su sitio de glicosilación (Asn 297) del Fc γ unas estructuras glicánicas de tipo biantenadas, con unas cadenas cortas y una baja sialilación.

Preferentemente, su estructura glicánica presenta unas manosas terminales y/o GlcNAc terminales no intermedios.

Dichos anticuerpos se seleccionan más particularmente de entre las formas:



ES 2 320 412 T3

De esta forma, la invención prevé un anticuerpo monoclonal caracterizado porque posee en su sitio de glicosilación (Asn 297) del Fc γ unas estructuras glicánicas de tipo biantenadas, con unas cadenas cortas, una baja sialilación, unas manosas y GlcNAc del punto de unión terminales no intermedios. Dichos anticuerpos, dirigidos contra un antígeno determinado, activan las células efectoras que expresan el Fc γ RIII provocando una lisis superior a 60%, 70%, 80%, preferentemente superior a 90% de la lisis provocada por unos anticuerpos policlonales dirigidos contra dicho antígeno.

Más particularmente, la invención se refiere a unos anticuerpos y a unas composiciones que comprenden dichos anticuerpos tal como se han definido anteriormente, en los que el contenido en ácido siálico es inferior a 25%, 20%, 15% o 10%, preferentemente 5%, 4%, 3% o 2%.

Asimismo, la invención se refiere a unos anticuerpos y a unas composiciones que comprenden dichos anticuerpos tal como se han definido anteriormente, en los que el contenido en fucosa es inferior a 65%, 60%, 50%, 40%, o 30%. Preferentemente, el contenido en fucosa está comprendido entre 20% y 45% o también entre 25% y 40%.

Una composición según la invención particularmente eficaz comprende, por ejemplo, un contenido superior a 60%, preferentemente superior a 80%, para las formas G0 + G1 + G0F + G1F, entendiéndose que las formas G0F + G1F son inferiores a 50%, preferentemente inferiores a 30%.

TABLA 1

Cuantificación (%) de las estructuras oligosacáridas de los diferentes anticuerpos Anti-RhD

	Anticuerpos activos en ADCC Fc γ RIII					Anticuerpos inactivos en ADCC Fc γ RIII		
	R 297	R 270		F 60		D 31		F 5
Estructura	HPCE-LIF	HPCE-LIF	HPLC	HPCE-LIF	HPLC	HPCE-LIF	HPCE-LIF	HPLC
Fucosilado	34,3	45,9	37,2	47,7	46,6	82,0	88	100
Sialilado	1,0	2,2	4,1	9,9	19,6	47,9	52,0	47
G2S2FB								2,8
G2S2F	0,0	0,0	n.d.	4,2	0,0	11,3	11,9	4,1
G2S1FB								6,1
G2S1F	1,0	1,0	n.d.	2,7	2,5	21,4	30,5	28
G2S1	0,0	1,2	n.d.	3,0	0,0	0	0	
G1S1FB								6,2
G1S1F								1,7
G2F	3,9	5,0	3,0	10,3	11,6	16,9	22,1	4,2
G2	12,1	6,1	3,3	7,0	13,3	2,0	0,0	0,0
G1FB								25,7
G1F	17,4	16,9	15	24,8	22,1	16,1	21,5	12,4
G1	26,1	11,3	21,0	22,2	22,8	0,0	0,0	0,0
G0F	12,1	23,1	19,4	5,6	10,5	1,7	3,0	0,0
G0	29,1	32,7	38,5	15,8	17,7	13,6	13,9	0,5

Una alternativa para seleccionar específicamente el Fc γ RIII consiste en la preparación de anticuerpos de tipo “high mannose”.

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula que produce un anticuerpo mencionado anteriormente. Puede tratarse de un hibridoma, en particular de un heterohibridoma obtenido con la pareja de fusión K6H6-B5 (ATCC nº CRL 1823); o de una célula animal o humana transfectada con la ayuda de un vector que comprende el gen que codifica para dicho anticuerpo, en particular una célula derivada de las líneas Vero (ATCC nº CCL 81), YB2/0 (ATCC nº CRL 1662) o CHO Lec-1 (ATCC nº CRL 1735). Estas células corresponden a las líneas celulares seleccionadas por medio del procedimiento según la invención, produciendo dichas células unos anticuerpos que poseen las características evocadas anteriormente.

Un anticuerpo preferido según la invención muestra una actividad biológica importante (superior o igual a la del anticuerpo policlonal anti-Rh(D) de referencia) en el ensayo ADCC que usa unas células efectoras Fc γ RIII positivas. Su aptitud para la activación de los receptores Fc γ RIII (después de la fijación) se confirma sobre unos modelos *in vitro* que ponen en evidencia la modificación del flujo cálcico intracelular, la fosforilación de moléculas de transducción de la señal de activación o la liberación de mediadores químicos.

Estas propiedades se asocian a una estructura particular de los oligosacáridos del sitio de N-glicosilación de la parte Fc del anticuerpo: presencia de cadenas cortas, débilmente galactosiladas, poco sialiladas, que poseen unas manosas terminales y/o GlcNAc terminales no intermedios por ejemplo.

Este anticuerpo presenta unas aplicaciones terapéuticas: prevención de la MHNN, tratamiento de la PTI en los individuos Rh(D) positivo, y cualquier otra aplicación referida a la utilización de unas inmunoglobulinas policlonales anti-D.

Un anticuerpo preferido según la invención puede tener asimismo una especificidad distinta de anti-Rh(D) (anti-célula cancerígena, por ejemplo). Puede poseer las propiedades descritas anteriormente (actividad funcional dependiente de un mecanismo de fijación/activación a nivel de los receptores FcγRIII, estructura particular de los oligosacáridos) y ser usado en la inmunoterapia de cánceres o de cualquier otra patología para la cual se puede efectuar un tratamiento curativo o preventivo con la ayuda de un anticuerpo monoclonal cuyo mecanismo de acción corresponde a una actividad funcional por medio del receptor FcγRIII.

Otro aspecto se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la invención y al uso de dicho anticuerpo para la preparación de un medicamento.

Preferentemente, la invención se refiere al uso de un anticuerpo anti-Rh(D) descrito anteriormente para la preparación de un medicamento destinado a la prevención de la aloinmunización Rhesus de individuos Rh negativo. El modo de acción de las inmunoglobulinas anti-D *in vivo* es una fijación específica de los anticuerpos sobre el antígeno D de los glóbulos rojos Rh(D) positivo, seguida de una eliminación de estos glóbulos rojos de la circulación esencialmente a nivel del bazo. Este aclaramiento se asocia a un mecanismo dinámico de supresión de la respuesta inmune primaria en los individuos y previene por lo tanto la inmunización.

De esta manera, se puede usar un anticuerpo de la invención de manera profiláctica para la prevención de la aloinmunización de mujer Rhesus negativo, inmediatamente después del nacimiento de un niño Rhesus positivo, y para prevenir, durante los embarazos posteriores, la enfermedad hemolítica del recién nacido (MHNN); durante abortos, embarazos extra-uterinos en situación de incompatibilidad Rhesus D o también durante hemorragias transplacentarias que resultan de amniocentesis, de biopsias coriónicas, o de manipulaciones obstétricas traumatizantes en situación de incompatibilidad Rhesus D.

Además, se puede usar un anticuerpo de la invención en el caso de transfusiones Rh incompatibles con sangre o con derivados sanguíneos lábiles.

La invención se refiere asimismo al uso de un anticuerpo de la invención para la preparación de un medicamento destinado a un uso terapéutico en la Púrpura Trombocitopénica Idiopática (PTI).

Los anticuerpos de la invención son asimismo útiles para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de cánceres por inmunoterapia o para el tratamiento de infecciones causadas por unos agentes patógenos víricos o bacterianos.

Un aspecto complementario de la invención se refiere al uso de dichos anticuerpos en particular para el diagnóstico. La invención prevé por lo tanto un kit que comprende un anticuerpo descrito anteriormente.

En la continuación de la descripción, se hará referencia a las leyendas de las figuras presentadas a continuación.

Leyendas

Figura 1: evaluación ADCC de F60 y T125 YB2/0 (R270)

Esta figura representa el porcentaje de lisis obtenido en función de la concentración en anticuerpos en presencia de 100 y 500 µg/pocillo de TEGELINE™ (LFB, Francia). Se obtiene un porcentaje de lisis elevado para los anticuerpos según la invención F60 y T125.

Figura 2: fijación de los anti-D al receptor (FcγRIII)

Se obtiene un fuerte índice de fijación para los anticuerpos según la invención F60 y T125.

Figura 3: construcción del vector de expresión T125-H26 para la expresión de la cadena H de T125.

Figura 4: construcción del vector de expresión T125-K47 para la expresión de la cadena L de T125.

Figura 5: construcción del vector de expresión T125-IG24 para la expresión del anticuerpo completo T125.

Figura 6: inhibición ADCC en presencia de anti Fc RIII (CD 16).

Se establece el ensayo ADCC según el modo de funcionamiento descrito en el apartado 3.3 en presencia del anti-CD16 comercial 3G8 (TEBU) cuya acción es bloquear los receptores FcRIII presentes sobre las células efectoras. La concentración final de 3G8 es de 5 µg/pocillo (25 µg/ml). Se realiza un control en paralelo en ausencia de 3G8.

Los tres anticuerpos ensayados son el Poli-D WinRho, el anticuerpo F60 (Pf 155 99/47) obtenido según el procedimiento descrito en el ejemplo 1 y el R297 (Pf 210 01/76) obtenido según el procedimiento descrito en el ejemplo 2.

ES 2 320 412 T3

Resultados: se observa una inhibición en presencia del 3G8, lo que demuestra que la ADCC inducida por los tres anticuerpos ensayados es mayoritariamente dependiente del FcRIII.

Una inhibición ligeramente más fuerte se observa en presencia del Poli-D WinRho (83% frente a 68% y 61% de inhibición para el F60 y R297 respectivamente). Esta diferencia puede deberse a la presencia en el Poli-D de IgG humanas no anti-D que inhibirán los receptores de tipo 1 (FCRI o CD64) y por lo tanto actuar en sinergia con el anti-CD16.

Figura 7: caracterización de los glicanos de los anti-D mediante espectrometría de masa (MS).

Figura 8: comparación de los espectros MS de R 290 y DF5.

Figura 9: estudio de la glicosilación del anti-D D31DMM mediante MS.

Ejemplo 1

Establecimiento de una línea celular heterohíbrida productora de un anticuerpo anti-RH (D)

1- Obtención de clones linfoblastoides y de heterohíbridos

1.1- Fuente de linfocitos

El donante de linfocitos B se selecciona de entre los donantes de anti-Rh(D) en plasmaféresis, sobre la actividad de sus anticuerpos anti-Rh(D) séricos en el ensayo de actividad ADCC descrito en el apartado 3.3. Después de una donación de sangre total en 1998, se recupera la fracción "buffy coat" (concentrado de leucocitos).

1.2- Inmortalización de los linfocitos B del donante

Se separan las células mononucleadas de la sangre periférica de los demás elementos por centrifugación sobre Ficoll Plus (Pharmacia). Después, se diluyen a 10^6 células/ml en IMDM que contiene 20% (v/v) de suero de ternera fetal (SVF), al cual se añaden 20% de sobrenadante de cultivo de la línea B95-8 (ATCC-CRL 1612), 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de ciclosporina A (Sandoz), 50 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de gentamicina (Life Technologies), y se reparten en placas de 24 pocillos (P24 Greiner) o en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Después, se disponen en una incubadora a 37°C, 7% CO_2 . Después de 3 semanas, se busca mediante ADCC la presencia de anticuerpos anti-Rh(D).

^ Cada uno de los 16 micropocillos de un pocillo de placa P24 positivo se transfiere a un nuevo pocillo de P24. Este enriquecimiento se repite después de 10 a 15 días de cultivo y cada micropocillo se amplifica en P96 y después en P24.

^ Los pocillos de P96 positivos se recogen y se amplifican en P24 de fondo plano (Nunc). Después de algunos días de cultivo, se busca la presencia de anticuerpos anti-Rh(D) mediante ADCC.

1.3- Enriquecimiento por rosetas inmunes (RI)

Las células procedentes de uno o varios pocillos de P24 se enriquecen con células específicas mediante la formación y separación de rosetas con unos hematíes Rh(D) positivos papainados: se incuban 1 volumen de hematíes lavados en NaCl 0,9% durante 10 minutos a 37°C con 1 volumen de disolución de papaína (Merck) al 1/1000^a (m/v), y después se lava 3 veces en NaCl al 0,9%. A continuación, las células se lavan una vez en disolución de Hanks, se suspenden en SVF y se mezclan con los hematíes papainados en la relación 1 célula por 33 hematíes. La mezcla se dispone en un tubo de centrifugar de fondo cónico, se centrifuga durante 5 minutos a 80 g y se incuban durante una hora en hielo fundente. La mezcla se agita suavemente a continuación y se deposita el Ficoll en el fondo del tubo para separación durante 20 minutos a 900 g. El residuo que contiene las rosetas se hemoliza en disolución de NH_4Cl durante 5 minutos y las células se re-cultivan en P24 que contiene unas células mononucleadas humanas irradiadas. Después de aproximadamente 1 semana, los sobrenadantes se evalúan mediante ensayos CELA (apartado 3.2) y ADCC para la presencia de anticuerpos anti-Rh(D) que tienen una buena actividad. Se realiza un nuevo ciclo de enriquecimiento si el porcentaje de las células que forman rosetas aumenta significativamente con relación al ciclo anterior.

1.4- Clonaciones de las células linfoblastoides

Las células enriquecidas por RI se reparten en 5 y 0,5 células por pocillo en unas placas de 96 pocillos de fondo redondo que contienen unas células mononucleadas humanas irradiadas.

ES 2 320 412 T3

Después de aproximadamente 4 semanas de cultivo, se evalúan los sobrenadantes de los pocillos que contienen unos cúmulos celulares mediante un ensayo ADCC.

1.5- Heterofusión

Los pocillos de clonación de las células transformadas por EBV que presentan una actividad ADCC interesante se amplifican en cultivo y después se fusionan con el heteromioma K6H6-B5 (ATCC CRL 1823) según la técnica estándar con PEG. Después de la fusión, las células se reparten a razón de $2 \cdot 10^4$ células/pocillo en P96 de fondo plano que contiene unos macrófagos intraperitoneales murinos y en un medio selectivo que contiene aminopterina y ouabaina (Sigma).

Después de 3 a 4 semanas de cultivo, se evalúan los sobrenadantes de los pocillos que contienen unos cúmulos celulares mediante el ensayo ADCC.

1.6- Clonaciones de los heterohibridomas

La clonación por dilución límite se efectúa en 4, 2 y 1 células/pocillo en unos P96 de fondo plano. Después de 2 semanas se examina el aspecto microscópico de los pocillos para identificar los clones únicos, y después se renueva el medio. Al cabo de aproximadamente 2 semanas, se evalúan los sobrenadantes de los pocillos que contienen unos cúmulos celulares mediante el ensayo ADCC.

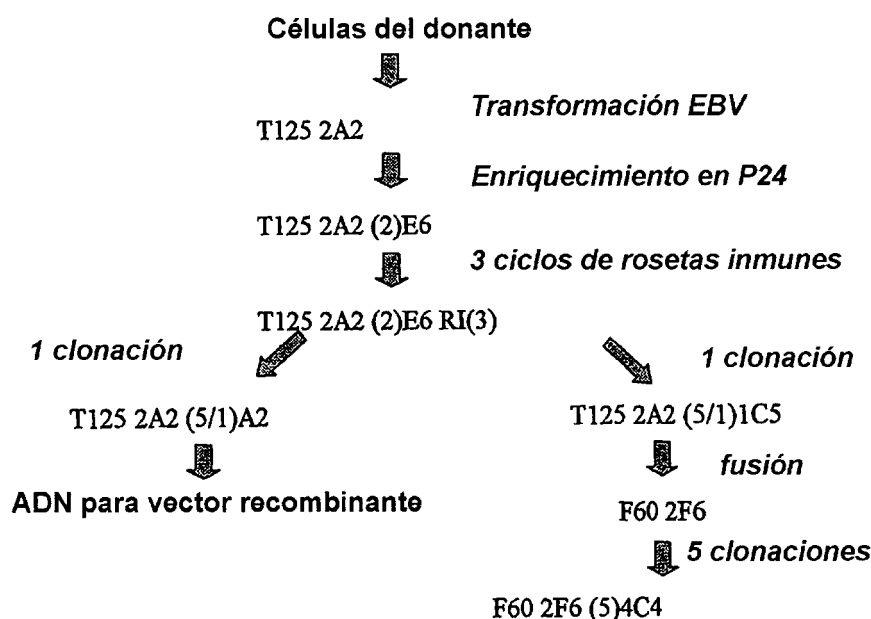
2- Histórico de los clones considerados

2.1- Clon productor de una IgG1

La transformación mediante EBV de las células del donante d13 ha permitido la selección de un pocillo, denominado T125 2A2 sobre el cual se han realizado sucesivamente: 2 enriquecimientos, 3 ciclos de RI, y una clonación en 5 células/pocillo para dar 2 clones:

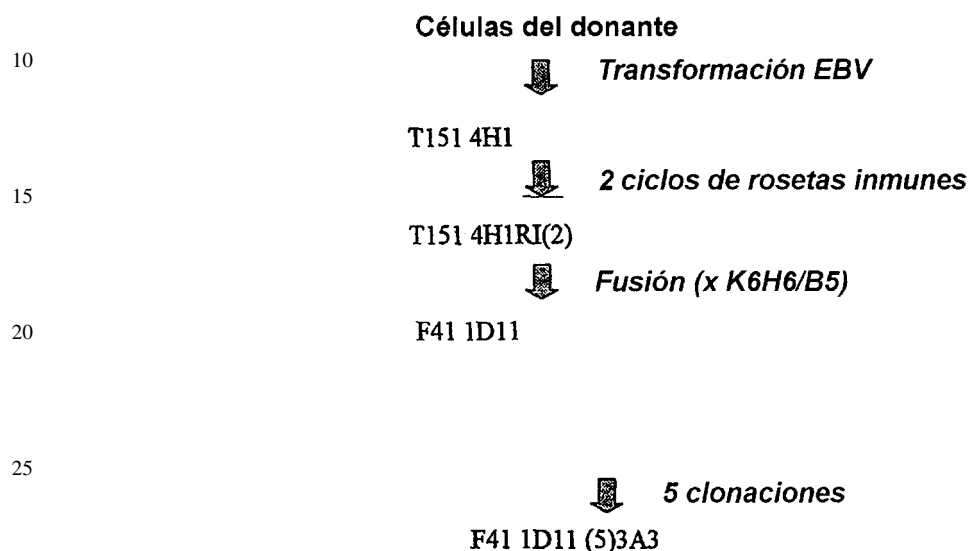
- 1) T125 2A2 (5/1) A2 a partir del cual se ha extraído el ADN para la preparación del vector recombinante;
- 2) T125 (5/1) A2 que ha sido fusionado con K6H6-B5 para dar F60 2F6 y después 5 clonaciones F60 2F6 (5) 4C4, clon considerado para la constitución de un stock celular previo a la preparación de bancos.

Se trata de una IgG1 que posee una cadena ligera Kappa.



2.2- clon productor de una IgG3

Según el mismo procedimiento que el usado para la preparación del anticuerpo de isotipo IgG1, se ha preparado una línea productora de una IgG3. Las células de origen proceden de una donación de sangre total, de otro donante designado, cuya fracción “buffy coat” (concentrado de leucocitos) ha sido recuperada. Se trata de una IgG3 que posee una cadena ligera Kappa.



3- Métodos de evaluación de los anticuerpos anti-Rh(D)

Después de la purificación por cromatografía de afinidad sobre la proteína A sefarosa (Pharmacia) y diálisis en tampón Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, se determina la concentración del anticuerpo T125 mediante la técnica de ELISA. Después, se mide la actividad biológica *in vitro* mediante la técnica ADCC.

3.1- Determinación del porcentaje de IgG y de los isotipos mediante la técnica ELISA

• IgG totales

Coating: anti-IgG (Calbiochem) a 2 µg/ml en tampón carbonato 0,05M pH 9,5, 1 noche a 4°C. Saturación: tampón de dilución (PBS + 1% de BSA + 0,05% de Tween 20, pH 7,2) 1 h a temperatura ambiente. Lavado (renovar en cada etapa): H₂O + NaCl 150 mM + 0,05% de Tween 20. Dilución de las muestras en tampón de dilución a aproximadamente 100 ng/ml y del intervalo de control constituido a partir de IgG humanas polivalentes LFB prediluidas a 100 ng/ml. Incubación durante 2 h a temperatura ambiente. Conjugado: anti-IgG (Diagnostic Pasteur) diluido al 1/5000, durante 2 horas a temperatura ambiente. Sustrato: OPD a 0,5 mg/ml (Sigma) en tampón de fosfato citrato, perborato de Na (Sigma), durante 10 minutos en oscuridad. Parada de la reacción mediante HCL 1N, y lectura a 492 nm.

• Dosificación de cadena Kappa

Coating: anti-Kappa (Caltag Lab) a 5 µg/ml en tampón carbonato 0,05M pH 9,5, 1 noche a 4°C. Saturación: tampón de dilución (PBS + 1% de BSA + 0,05% de Tween 20, pH 7,2) durante 1 h a temperatura ambiente. Lavado (renovar en cada etapa): H₂O + NaCl 150 mM + 0,05% de Tween 20. Dilución de las muestras en tampón de dilución a aproximadamente 100 ng/ml y del intervalo de control constituido a partir del anticuerpo monoclonal AD3T1 LFB (Kappa/gamma 3) prediluido a 100 ng/ml. Incubación durante 2 h a temperatura ambiente. Conjugado: anti-Kappa biotinilado (Pierce) diluido al 1/1000 en presencia de estreptavidina-peroxidasa (Pierce) diluido al 1/1500, durante 2 horas a temperatura ambiente. Sustrato: OPD a 0,5 mg/ml (Sigma) en tampón de fosfato citrato, perborato de Na (Sigma), durante 10 minutos en oscuridad. Parada de la reacción mediante HCL 1N, y lectura a 492 nm.

3.2- Determinación específica anti-D mediante la técnica CELA (Cellular Enzyme Linked Assay)

Este método se usa para la determinación específica de los anticuerpos anti-D en particular cuando se trata de sobrenadante de cultivo en unas etapas de cultivo en las que otras inmunoglobulinas no anti-D están presentes en la disolución (etapas precoces después de la transformación EBV).

Principio: el anticuerpo anti-D se incuba con unos hematíes Rhesus positivo y después se revela mediante una anti-Ig humana marcada con fosfatasa alcalina.

100 µl de hematíes Rh+ a 10% diluidos en tampón de dilución Liss-BSA 1%. Dilución de las muestras en tampón de dilución a aproximadamente 500 ng/ml y del intervalo de control constituido a partir de una IgG anti-D humana monoclonal purificada (DF5, LFB) prediluida a 500 ng/ml. Incubación durante 45 min a temperatura ambiente. Lavado (renovar en cada etapa): H₂O + NaCl 150 mM. Conjugado: anti-IgG fosfatasa alcalina (Jackson) diluido al 1/4000 en PBS + 1% de BSA, durante 1 h 30 a temperatura ambiente. Sustrato: PNPP a 1 mg/ml (Sigma) en dietanolamina 1M, MgCl₂ 0,5 mM; pH 9,8. Parada de la reacción mediante NaOH 1N y lectura a 405 nm.

3.3- Técnica ADCC

La técnica ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) permite evaluar la capacidad de los anticuerpos (anti-D) para inducir la lisis de los hematíes Rh positivo, en presencia de células efectoras (células mononucleadas o linfocitos).

Brevemente, los hematíes de un concentrado globular Rh positivo se tratan con papaína (1 mg/ml, durante 10 min a 37°C) y después se lavan en NaCl al 0,9%. Las células efectoras se aíslan a partir de un pool de por lo menos 3 buffy-coat, mediante centrifugación sobre Ficoll (Pharmacia), seguida de una etapa de adherencia en presencia de 25% de SVF, de manera que se obtiene una proporción linfocitos/monocitos del orden de 9. En una placa de microtitulación (96 pocillos) se depositan por pocillo: 100 µl de anticuerpos anti-D purificados a 200 ng/ml, 25 µl de hematíes papainados Rh+ (es decir 1 x 10⁶), 25 µl de células efectoras (es decir 2 x 10⁶) y 50 µl de IgG polivalentes (Tegolina LFB por ejemplo) con las concentraciones habituales de 10 y 2 mg/ml. Las diluciones se realizan en IMDM que contiene SVF al 0,25%. Después de la incubación durante una noche a 37°C, se centrifugan las placas, y después se mide la hemoglobina liberada en el sobrenadante en presencia de un sustrato específico de la actividad peroxidásica (2,7-diaminofluoreno, DAF). Los resultados se expresan en porcentaje de lisis, correspondiendo el 100% a la lisis total de los hematíes en NH₄Cl (control 100%), y el 0% a la mezcla de reacción sin ningún anticuerpo (control 0%).

La lisis específica se calcula en porcentaje según la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{DO muestra} - \text{DO control } 0\%) \times 100}{\text{DO control } 100\% - \text{DO control } 0\%} = \% \text{ ADCC}$$

Los resultados presentados en la figura 1 muestran la actividad del anticuerpo producido por el heterohíbrido F60 comparada con la de los anticuerpos de referencia:

- los anticuerpos policlonales anti-Rh(D) POLI-D LFB 51 y WinRhO W03 (Cangene) = controles positivos
- el anticuerpo monoclonal DF5 (inactivo *in vivo* sobre el aclaramiento de hematíes Rh(D) positivos (BROSSARD/FNTS, 1990, no publicado)) = control negativo
- las IgG1 purificadas (separadas de las IgG3) a partir del policlonal WinRhO W03.

Dos concentraciones de IgG humanas (Tegolina LFB) se usan para demostrar que la inhibición de actividad del control negativo está relacionada con la fijación de las IgG competidoras sobre los receptores Fcγ de tipo I.

3.4 Técnica de fijación al FcγRIII (CD16)

Este ensayo permite apreciar la fijación de los anticuerpos anti-Rh(D) de isotipo IgG1 sobre el FcγRIII y en particular diferenciar unos anticuerpos IgG3. Teniendo en cuenta la baja afinidad de este receptor para las IgG monoméricas, es necesaria la fijación previa de los anticuerpos sobre el antígeno D.

Principio: sobre unas membranas de hematíes Rh+ recubiertas en placas de microtitulación, se añade el anticuerpo a ensayar (anti-D) y después unas células Jurkat transfectadas que expresan en su superficie el receptor FcγRIII. Después de la centrifugación, se visualiza la interacción "membrana Rh+/anti-D/Jurkat CD16" mediante un esparcimiento homogéneo de las Jurkat CD16 en el pocillo. Al contrario, las células se agrupan en el centro del pocillo en ausencia de interacción. La intensidad de la reacción se expresa en cantidad de +.

Método

1) Incubación durante 1 h a 37°C del anticuerpo anti-D (50 µl a 1 µg/ml en IMDM) sobre una placa de Capture R (Immunochim), y después se lavan con agua + NaCl al 0,9%. Se añade Jurkat CD16 (2·10⁶ células/ml) en IMDM + 10% de SVF. Se incuba durante 20 min a 37°C y después se centrifuga y se evalúa la adherencia de las células (frente a un intervalo de control).

ES 2 320 412 T3

2) Revelación del anti-D fijado sobre las placas de Capture R mediante la técnica de tipo ELISA con la ayuda de anti IgG humanas-peroxidasa al 1/5000 (Sanofi Diagnostics Pasteur) después de haber lisado las células Jurkat CD16 con Tris-HCl 0,2M, urea 6M, pH 5,3-5,5. Revelación OPD y después lectura de la densidad óptica (D.O.) a 492 nm.

Expresión de los resultados: se asigna un valor arbitrario de 0 a 3 en función de la fijación y del esparcimiento de las células Jurkat CD16. Estos valores se asignan a cada intervalo de DO definido (de 0,1 en 0,1). Se traza:

* o bien una curva: adherencia de las células Jurkat (Y) en función de la cantidad de anti-D fijada sobre las membranas de hematíes (X).

* o bien un histograma de los “índices de fijación” que corresponde para cada anticuerpo a la suma de cada valor de fijación de las células Jurkat (0 a 3) asignada por intervalo de DO (sobre una porción común al conjunto de los anticuerpos ensayados).

Se presenta en la figura 2 un ejemplo de histograma.

Los anticuerpos anti-Rh(D) de isotipo IgG1 (F60 y T125 YB2/0) muestran un índice de fijación próximo al de las IgG1 policlonales (WinRho), mientras que los anticuerpos de control negativos DF5 y AD1 no se fijan. De la misma manera, el anticuerpo de isotipo IgG3 (F41) presenta un buen índice de fijación, ligeramente inferior al de las IgG3 purificadas a partir del policlonal WinRho y superior al del anticuerpo AD3 (otra IgG3 ensayada e ineficaz en ensayo clínico, en mezcla con AD1 (Biotest/LFB, 1997, no publicado).

Ejemplo 2

Producción de un anticuerpo (Ac) anti-D recombinante

1- Aislamiento y amplificación de los ADNc que codifican para las cadenas pesada y ligera del Ac

1.1- Extracción de los ARN y síntesis de ADNc

Se han extraído los ARN totales de un clon productor de Ac anti-D (IgG G1/Kappa) obtenido por transformación EBV: T125 A2 (5/1) A2 (véase apartado 2, ejemplo 1).

Los ADNc correspondientes han sido sintetizados por transcripción inversa de los ARN totales con la ayuda de cebadores oligo dT.

1.2- Amplificación de la región variable de la cadena pesada de T125-A2: secuencia VH/T125-A2

La secuencia VH/T125-A2 se obtiene mediante la amplificación de los ADNc de T125-A2 con la ayuda de los siguientes cebadores:

- el cebador A2VH5 localizado en la dirección 5' de la región líder del gen VH de T125-A2, introduce una secuencia líder de consenso (en negrita) deducida de secuencias líder ya publicadas y asociadas a unos genes VH que pertenecen a la misma familia VH3-30 que el gen VH de T125-A2; esta secuencia comprende asimismo un sitio de restricción Eco RI (en cursiva) y una secuencia de Kozak (subrayada):

A2VH5 (SEC ID nº1):

5'-CTCTCCGAATTCGCCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGT-3'

- el cebador antisentido GSP2ANP situado en la dirección 5' de la región constante (CH) de T125-A2: GSP2ANP (SEC ID nº 2):

5'-GGAAGTAGTCCTTGACCAGGCAG-3'.

1.3- Amplificación de la región constante de T125-A2: secuencia CH/T125-A2

La secuencia CH/T125-A2 se obtiene mediante la amplificación de los ADNc de T125-A2 con la ayuda de los siguientes cebadores:

- cebador G1 localizado en 5' de la región CH de T125-A2:

G1 (SEC ID nº3): 5'-CCCTCCACCAAGGGCCCCATCGGTC-3'

ES 2 320 412 T3

La primera base G de la secuencia CH se sustituye en este caso por un C (subrayado) a fin de recrear después de la clonación un sitio Eco RI (véase el apartado 2.1.1).

- el cebador antisentido H3'Xba situado en 3' del CH de T125-A2, introduce un sitio Xba I (subrayado) en 3' de la secuencia amplificada:

H3'Xba (SEC ID nº4):

5'-GAGAGGTCTAGACTATTTACCCGGAGACAGGGAGAG-3'

1.4- Amplificación de la cadena ligera Kappa: secuencia K/T125-A2

La cadena Kappa completa de T125-A2 (secuencia K/T125-A2) se amplifica a partir de los ADNc de T125-A2 usando los siguientes cebadores:

- el cebador A2VK3 situado en dirección 5' de la región líder del gen VK de T125-A2, introduce una secuencia de consenso (en negrita) deducida de la secuencia de varias regiones líder de genes VK VH que pertenecen al mismo sub-grupo VK1 que el gen VK de T125-A2; esta secuencia comprende asimismo un sitio de restricción Eco RI (en cursiva) y una secuencia de Kozak (subrayado):

A2VK3 (SEC ID nº5):

5'-CCTACCGAATTCGCCGCCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCA-3'

- cebador antisentido KSE1 localizado en dirección 3' de Kappa, introduce un sitio Eco RI (subrayado):

KSE1 (SEC ID nº6):

5'-GGTGGTGAATTCCTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT-3'.

La Fig. 1 esquematiza las estrategias de amplificación de las cadenas pesada y ligera de T125-A2.

2- Construcción de los vectores de expresión

2.1- Vector de expresión cadena pesada de T125-A2: T125-H26

La construcción de T125-H26 se resume en la Fig. 2. Se efectúa en dos tiempos: en primer lugar la construcción del vector intermedio V51-CH/T125-A2 por inserción de la región constante de T125-A2 en el vector de expresión V51 derivado de pCl-neo (Fig. 3) y después clonación de la región variable en V51-CH/T125-A2.

2.1.1 Clonación de la región constante de T125-A2

La secuencia CH/T125-A2 amplificada se inserta después de la fosforilación a nivel del sitio Eco RI del vector V51 (Fig. 3). La unión se efectúa después del tratamiento previo con polimerasa Klenow de los extremos cohesivos Eco RI de V51 a fin de hacerlos "extremos romos".

El cebador G1 usado para la amplificación de CH/T125-A2 permite recrear después de su inserción en V51 un sitio Eco RI en dirección 5' de CH/T125-A2.

2.1.2 Clonación de región variable de T125-A2

La secuencia VH/T125-A2 obtenida por amplificación es digerida por Eco RI y Apa I y después se inserta a nivel de los sitios Eco RI y Apa I del vector V51-G1/T125-A2.

2.2- Vector de cadena ligera de T125-A2: T125-K47

La construcción de T125-K47 se representa en la Fig. 4. La secuencia K/T125-A2 obtenida mediante PCR es digerida por Eco RI y se inserta a nivel del sitio Eco RI del vector de expresión V47 derivado de pCl-neo (Fig. 5).

2.3- Vector de cadenas pesada y ligera de T125-A2: T125-IG24

La construcción de T125-IG24 se esquematiza en la Fig. 6. Este vector que contiene las dos unidades de transcripción de las cadenas pesada y Kappa de T125-A2 se obtiene mediante la inserción del fragmento Sal I - Xho I de T125-K47 que contiene la unidad de transcripción de K/T125-A2 a nivel de los sitios Xho I y Sal I de T125-H26.

ES 2 320 412 T3

De esta forma, las cadenas pesadas y ligeras de T125-A2 se expresan bajo la dependencia del promotor CMV; se pueden usar otros promotores: RSV, promotor de cadena pesada IgG, LTR, MMLV, HIV, β actina, etc.

2.4- Vector líder específico de cadenas pesada y ligera de T125-A2: T125-LS4

Se construye asimismo un segundo vector de expresión de T125-A2 en el que la secuencia líder de consenso de la cadena Kappa se sustituye por la secuencia real de la región líder de T125-A2 previamente determinada por secuenciación de productos de "PCR 5'-RACE" (Rapid Amplification of cDNA 5' Ends).

La construcción de este vector T125-LS4 se describe en la Fig. 7. Se lleva a cabo en dos etapas: en primer lugar la construcción de un nuevo vector de expresión de la cadena Kappa de T125-A2, T125-KLS18, y después el ensamblaje del vector de expresión final, T125-LS4, que contiene las dos unidades de transcripción de cadena ligera modificada y de cadena pesada.

2.4.1 construcción del vector T125-KLS18

La parte 5' de la secuencia líder de consenso Kappa del vector T125-K47 se sustituye por la secuencia líder específica de T125 (KLS/T125-A2) durante una etapa de amplificación de la secuencia K/T125-A2 realizada con la ayuda de los siguientes cebadores:

- el cebador A2VK9 modifica la parte 5' de la región líder (en negrita) e introduce un sitio Eco RI (subrayado) así como una secuencia de Kozak (en cursiva):

A2VK9: 5'-CCTACCGAATTCGCCGCCACCATGAGGGTCCCCGCTCAGCTC-3'

- cebador KSE1 (descrito en el apartado 1.4)

El vector T125-KLS18 se obtiene a continuación sustituyendo el fragmento Eco RI de T125-K47 que contiene la secuencia K/T125-A2 de origen por la nueva secuencia KLS/T125-A2 digerida por Eco RI.

2.4.2 construcción del vector final T125-LS4

El fragmento Sal I - Xho I de T125-KLS18 que contiene la secuencia modificada KLS/T125-A2 se inserta en T125-H26 a nivel de los sitios Xho I y Sal I.

3- Producción de Ac anti-D en la línea YB2/0

3.1- Sin amplificación génica

Los dos vectores de expresión T125-IG24 y T125-LS4 se han usado para la transfección de células de la línea YB2/0 (mieloma de rata, línea ATCC nº 1662).

Después de la transfección por electroporación y la selección de los transformantes en presencia de G418 (selección neo), se han aislado varios clones. La producción de Ac anti-D recombinantes es de aproximadamente $0,2 \mu\text{g}/10^6$ células/24 h (valor obtenido para el clon 3B2 de R270). La actividad ADCC de este Ac recombinante es superior o igual a la de los controles poli-D (figura 1). Los Ac producidos con la ayuda de dos vectores de expresión no son significativamente diferentes en términos de nivel de producción o de actividad ADCC.

3.2- Con amplificación génica

El sistema de amplificación génica usado se basa en la selección de los transformantes que resisten al metotrexato (MTX). Necesita la introducción previa de una unidad de transcripción que codifica para la enzima DHFR (dihidrofolato reductasa) en el vector de expresión del Ac recombinante (SHITARI *et al.*, 1994).

3.2.1 Construcción del vector de expresión T125-dhfr 13

El esquema presentado en la Fig. 8 describe la construcción del vector de expresión de T125-A2 que contiene el gen dhfr murino.

Se ha construido un primer vector (V64) a partir de un vector de pCl-neo, V43 (Fig. 9), sustituyendo en dirección 3' del promotor SV40 y en dirección 5' de una secuencia de poliadenilación sintética, el gen neo (fragmento Hind III-Csp 45 I) por el ADNc del gen dhfr murino (obtenido por amplificación a partir del plásmido pMT2). Después, este vector se modifica de manera que se crea un sitio Cla I en dirección 5' de la unidad de transcripción dhfr. El fragmento Cla I que contiene la unidad de transcripción dhfr se inserta después a nivel del sitio Cla I de T125-LS4.

3.2.2 Selección en presencia de MTX

♦ 1ª estrategia

Las células YB2/0 transfectadas por electroporación con el vector T125-dhfr13 se seleccionan en presencia de G418. Los transformantes productores de Ac recombinante se someten a continuación a una selección en presencia de dosis crecientes de MTX (de 25 nM a 25 μ M). La evolución de la producción de Ac recombinantes, control del proceso de amplificación génica, se monitoriza a lo largo de las etapas de selección en MTX. Los transformantes que resisten al MTX se clonan después por dilución límite. Se evalúa el nivel y la estabilidad de la producción de Ac recombinantes para cada clon obtenido. La productividad de anticuerpos anti-D después de la amplificación génica es de aproximadamente 13 (+/- 7) μ g/10⁶ células/24 h.

♦ 2ª estrategia

Las células YB2/0 transfectadas por electroporación con el vector T125-dhfr13 se seleccionan en presencia de G418. Los mejores transformantes productores de Ac recombinante se clonan por dilución límite antes de la selección en presencia de dosis crecientes de MTX. La evolución de la producción de cada clon, control del proceso de amplificación génica, se monitoriza a lo largo de las etapas de selección en MTX. Se evalúa el nivel y la estabilidad de la producción de Ac recombinantes para cada clon resistente al MTX obtenido.

4- Evaluación de la actividad del anticuerpo T125 expresado en YB2/0

Después de la purificación por cromatografía de afinidad sobre proteína A sefarosa (Pharmacia) y diálisis en tampón Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, se determina la concentración del anticuerpo T125 mediante la técnica ELISA. La actividad biológica *in vitro* se mide a continuación mediante el ensayo ADCC descrito anteriormente. Los resultados se presentan en la figura 1.

Ejemplo 3

Demostración de la relación entre la estructura glicánica y la actividad dependiente del FC γ RIII

1- Cultivo celular en presencia de desoximanojirimicina (DMM)

Varios estudios describen el efecto de inhibidores enzimáticos sobre la glicosilación de las inmunoglobulinas y sobre su actividad biológica. Un aumento de la actividad ADCC se relaciona en ROTHMAN *et al.*, 1989, aumento no atribuible a una mejora de la afinidad del anticuerpo para su diana. La modificación de glicosilación provocada por la adición de DMM consiste en una inhibición de la α 1,2-manosidasa I presente en el Golgi. Conduce a la producción de una proporción más importante de estructuras polimanosiladas, no fucosiladas.

Diferentes líneas productoras de anticuerpos anti-Rh(D) han sido puestas en presencia de DMM, y la actividad funcional de los anticuerpos monoclonales producidos ha sido evaluada en forma de sobrenadantes de cultivo o después de la purificación.

Las células (heterohíbridas o linfoblastoides) se inoculan entre 1 y 3 x 10⁵ células/ml, y se cultivan en un medio de cultivo IMDM (Life Technologies) con 10% de SVF y en presencia de 20 μ g/ml de DMM (Sigma, Boehringer). Después de 3 renovaciones de medio, se ensayan los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA IgG humanas y después mediante ADCC.

TABLA 2

Efecto del cultivo en presencia de DMM sobre la actividad ADCC de diferentes anti-Rh(D)

Muestras	Actividad ADCC en % de la actividad de poli D LFB51		Dosis mínima de DMM necesaria μ g/ml
	Cultivo sin DMM	Cultivo en presencia de DMM	
F60	109	113	NT
D31	19	87	10
DF5	26	62	20
T125 RI(3)	3	72	20
T125-CHO	0	105	5
NT = no ensayado			

ES 2 320 412 T3

- El cultivo en presencia de desoximanojirimicina (DMM) aporta una mejora significativa de los resultados ADCC para los anticuerpos débilmente activos antes producidos por:

Un hibridoma hombre-ratón D31

Una línea linfoblastoide humana DF5

Una línea murina transfectada T125 en CHO

- La adición de DMM puede permitir restaurar la actividad ADCC de un anticuerpo que procede del clon T 125 = T125 RI(3) (descrito en el ejemplo 1) y que ha perdido esta actividad por un cultivo prolongado.
- La actividad fuerte del anticuerpo producido por el heterohibridoma F60 (cuya obtención se describe en el ejemplo 1) no se modifica por el cultivo en presencia de DMM.

2- Producción de anticuerpos anti-D recombinantes mediante diferentes líneas celulares

2.1- Preparación de un vector de expresión para el anticuerpo DF5

Se usa la secuencia nucleotídica del anticuerpo DF5, control negativo en el ensayo ADCC, para estudiar la transfección de este anticuerpo en algunas líneas, paralelamente a la transfección del anticuerpo T125.

Las secuencias que codifican para el Ac DF5 se aíslan y se amplifican según las mismas técnicas usadas para el Ac recombinante T125-A2.

- Los ADNc correspondientes se sintetizan en primer lugar a partir de ARN totales extraídos del clon productor de Ac anti-D (IgG G1/Lambda) 2MDF5 obtenido por transformación EBV.

- La amplificación de las cadenas pesada y ligera se realiza a continuación a partir de estos ADNc usando los cebadores presentados a continuación.

- Amplificación de la región variable de la cadena pesada de DF5 (secuencia VH/DF5):

- cebador DF5VH1 localizado en dirección 5' de la región líder (en negrita) del gen VH de DF5 (secuencia publicada: Chouchane L *et al.*); este cebador comprende asimismo un sitio de restricción Eco RI (en cursiva) y una secuencia de Kozak (subrayada): DF5VH1 (SEC ID n° 8):

5'CTCTCCGAATTCGCCGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTTTGGTGG-3'

- El cebador antisentido GSP2ANP situado en dirección 5' de la región constante (CH) ya descrito en el apartado 1.2 (ejemplo 2).

- Amplificación de la región constante CH de DF5 (secuencia CH/DF5): cebadores G1 y H3' Xba ya descritos en el apartado 1.3 (ejemplo 2).

- Amplificación de la cadena ligera Lambda de DF5 (secuencia LBD/DF5):

- El cebador DF5VLBD1 situado en dirección 5' de la región líder del gen VL de DF5, introduce una secuencia de consenso (en negrita) deducida de la secuencia de varias regiones líder de genes VL que pertenecen al mismo sub-grupo VL1 que el gen VL de 2MDF5; esta secuencia comprende asimismo un sitio de restricción Eco RI (en cursiva) y una secuencia de Kozak (subrayada):

DF5VLBD1 (SEC ID n°9):

5' CCTACCGAATTCGCCGCCACCATGGCCTGGTCTCCTCTCCTCAC-3'

- El cebador antisentido LSE1 localizado en dirección 3' de Lambda, introduce un sitio Eco RI (subrayado):

LSE1 (SEC ID n° 10):

5'-GAGGAGGAATTCACCTATGAACATTCTGTAGGGGCCACTGTCTT-3'.

- La construcción de los vectores de expresión de cadena pesada (DF5-H31), de cadena ligera (DF5-L10) y de cadenas pesada y ligera (DF5-IG1) del Ac DF5 se efectúa según un esquema de construcción similar a los vectores que expresan el Ac T125-A2. Todas las secuencias líder de origen (introducidas a nivel de los cebadores de amplificación) se conservan en estos diferentes vectores.

ES 2 320 412 T3

2.2- Transfección de diferentes líneas celulares con los anticuerpos T125 y DF5

Se usan los tres vectores de expresión T125-IG24, T125-LS4 y DF5-IgG1 para la transfección de células de diferentes líneas:

Se realizan unas transfecciones estables o transitorias mediante electroporación o con la ayuda de un agente reactivo de transfección.

TABLA 3

Líneas celulares usadas para la transfección de anticuerpos anti-Rh(D)

Nombre	Referencia	Tipo celular
CHO-K1	ATCC CCL 61	Ovario de hámster chino (epithelium like)
CHO-Lec10	Fenouillet <i>et al.</i> , 1996, Virology, 218, 224-231	Ovario de hámster chino (epithelium like)
Jurkat	ATCC TIB-152	Linfocito T humano (Leucemia T)
Molt-4	ATCC CRL 1582	Linfocito T humano (Leucemia linfoblástica aguda)
WIL2-NS	ATCC CRL 8155	Linfocito B humano transformado por EBV
Vero	ATCC CCL 81	Riñón de mono verde africano (fibroblaste like)
COS-7	ATCC CRL 1651	Riñón de mono verde africano transformado por SV40 (fibroblaste like)
293-HEK	ATCC CRL 1573	Riñón embrionario humano primario transformado por ADN adenovirus 5 defectivo
YB2/0	ATCC CRL 1662	Mieloma de rata no segregador
BHK-21	ATCC CCL 10	Riñón de hámster recién nacido (fibroblaste like)
K6H6-B5	ATCC CRL 1823	Heteromieloma hombre-ratón no segregador
NSO	ECACC 85110503	Mieloma de ratón no segregador (lymphoblaste like)
SP2/0-Ag 14	ECACC 85072401	Hibridoma de ratón x ratón no segregador
CHO Lec-1	ATCC CRL 1735	Ovario de hámster chino
CHO dhfr	ECACC 94060607	Ovario de hámster chino
CHO Pro-5	ATCC CRL 1781	Ovario de hámster chino
P3X63 Ag8.653	ATCC CRL 1580	Mieloma de ratón no segregador

Después de la selección de los transformantes en presencia de G418 (selección neo) se han aislado varios clones.

La modificación de actividad efectora de un anticuerpo monoclonal humanizado en función de la célula de expresión ha sido descrita por CROWE *et al.* (1992), con las líneas celulares CHO, NSO, YB2/0.

Los resultados obtenidos en este caso confirman la importancia de la línea celular de expresión frente a las características funcionales del anticuerpo a producir. Entre las células ensayadas, sólo las líneas Vero, YB2/0 y CHO Lec-1 permiten expresar unos anticuerpos monoclonales anti-Rh(D) recombinantes con una actividad lítica fuerte en el ensayo ADCC (véase el ejemplo 1 y la tabla 3).

ES 2 320 412 T3

TABLA 3

Actividad ADCC de los anticuerpos DF5 y T125 obtenidos mediante transfección en diferentes líneas celulares. Los resultados se expresan en porcentaje de la actividad del anticuerpo policlonal de referencia: Poli-D LFB 51

		Líneas celulares transfectadas								
		CHO-K1	CHO-Lec10	Wil-2	Jurkat	Vero	Molt-4	COS-7	293-HEK	YB2/0
anticuerpos	T125	7 +/- 8 n=13	22 +/- 6 n=11	3 +/- 5 n=12	6 +/- 8 n=7	90 +/- 21 n=5	0 n=1	13 +/- 2 n=4	16 +/- 13 n=12	114 +/- 28 n=54
	DF5	NT	51 +/- 19 n=3	NT	NT	72 +/- 17 n=5	NT	21 +/- 4 n=4	12 +/- 14 n=12	94 +/- 15 n=15

		Líneas celulares transfectadas							
		NSO	BHK	CHO-Lec1	SP2/O-Ag14	K6H6-B5	CHO Pro-5	CHO dhfr-	P3X63A g8.653
anticuerpos	T125	6 +/- 8 n=3	13 +/- 5 n=4	106 +/- 60 n=4	0 +/- 0 n=6	9 +/- 8 n=3	3 +/- 3 n=4	13 +/- 8 n=12	34 +/- 8 n=9

3- Estudio de las estructuras glicánicas

La caracterización de las estructuras glicánicas del anticuerpo anti Rh-D ha sido realizada sobre cuatro productos purificados que tienen una actividad ADCC (F 60, y tres proteínas recombinantes procedentes de T125) en comparación con dos productos purificados inactivos o muy débilmente activos en el ensayo ADCC según la invención (D31 y DF5).

En la práctica, los oligosacáridos se separan de la proteína mediante una desglicosilación enzimática específica por la PNGasa F a nivel del Asn 297. Los oligosacáridos así liberados se marcan mediante un fluoróforo, se separan y se identifican mediante diferentes técnicas complementarias que permiten:

- Una caracterización fina de las estructuras glicánicas mediante espectrometría de masas con desorción láser asistida por matriz (MALDI) por comparación de las masas experimentales con las masas teóricas.
- La determinación del porcentaje de sialilación por HPLC de intercambios de iones (GlycoSep C).
- La separación y la cuantificación de las formas oligosacáridicas según unos criterios de hidrofiliicidad por HPLC en fase normal (GlycoSep N).
- La separación y la cuantificación de los oligosacáridos mediante electroforesis capilar con detección de fluorescencia inducida por láser (HPCE-LIF).

1) Caracterización de los glicanos de las formas activas

Las diferentes formas activas estudiadas son F 60 y tres anticuerpos recombinantes, R 290, R 297 y R 270, procedentes de T125 y producidos en YB2/0. La caracterización fina de las estructuras glicánicas por espectrometría de masas (figura 7) muestra que todas estas formas son de tipo biantenadas. En el caso de R 270 la forma mayoritaria es de tipo agalactosilada no fucosilada (G0, masa exp. 1459,37 Da, fig. 1). Se han identificado otras tres estructuras: agalactosilada fucosilada (G0F a 1605,41 Da), monogalactosilada no fucosilada (G1 a 1621,26 Da) y monogalactosilada fucosilada (G1F a 1767,43 Da) minoritaria. Estas cuatro mismas estructuras son características de R 290, F 60 y R 297 (Figura 1).

Estos cuatro anticuerpos activos en ADCC se caracterizan asimismo por la ausencia de oligosacáridos que poseen un residuo N-acetilglucosamina en bisectriz.

La cuantificación de las estructuras glicánicas mediante las diferentes técnicas de HPLC y de HPCE-LIF (Tabla 1) confirma la presencia de las cuatro formas identificadas en masa: G0, G0F, G1 y G1F. El porcentaje de sialilación es muy bajo, en particular para los productos recombinantes, de 1 a 9,4%, lo que se confirma mediante la similitud de los espectros de masa obtenidos antes y después de la desialilación enzimática. El porcentaje de fucosilación varía entre 34 y 59%.

2) Formas inactivas

Las diferentes formas inactivas estudiadas son D31 y DF5. La cuantificación de las estructuras glicánicas mediante las diferentes técnicas cromatográficas y de electroforesis capilar (Tabla 1) revela, para estos dos anticuerpos, un porcentaje de sialilación próximo a 50%, y un porcentaje de fucosilación de 88 y 100% para D31 y DF5, respectivamente. Estos porcentajes de sialilación y de fucosilación son muy superiores a los obtenidos a partir de las formas activas.

La caracterización de las estructuras glicánicas muestra que la forma mayoritaria es, para los dos anticuerpos, de tipo biantenada monosialilada bigalactosilada fucosilada (G2S1F, tabla 1). La caracterización mediante espectrometría de masas de D31 (figura 7) revela que las formas neutras son mayoritariamente de tipo monogalactosilada fucosilada (G1F a 1767,43 Da) y bigalactosilada fucosilada (G2F a 1929,66 Da).

El anticuerpo inactivo DF5 se caracteriza por la presencia de oligosacáridos que poseen un residuo GlcNAc intermedio. En particular, el análisis en masas (figura 8) revela la presencia de una forma neutra mayoritaria de tipo monogalactosilada fucosilada Bisec-GlcNAc intermedia (G1FB a 1851,03 Da). Por el contrario, estas formas estructurales no son detectables o están presentes en el estado de traza en los anticuerpos activos estudiados.

La actividad ADCC del D31 después de la acción del DMM pasa de 10% a 60%. Las estructuras glicánicas del D31 DMM difieren de las de D31 por la presencia de formas oligomanosas (Man 5, Man 6 y Man 7) (véase la figura 9).

3) Conclusión

Los diferentes anticuerpos activos son modificados sobre el Asn 297 por unas N-glicosilaciones de tipo biantenadas y/o oligomanosídicas. Para las formas biantenadas, se trata de estructuras cortas muy débilmente sialiladas, débilmente fucosiladas, débilmente galactosiladas y sin ningún GlcNAc intermedio.

Referencias

Boylston, J. M., Gardner, B., Anderson, R. L., y Hughes-Jones, N. C. Production of human IgM anti-D in tissue culture by EB virus-transformed lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 12: 355-358 (1980).

Bron, D., Feinberg, M. B., Teng, N. N. H. y Kaplan, H. S. Production of Human Monoclonal IgG Antibodies against Rhesus (D) Antigen. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 81: 3214-3217 (1984).

Chouchane, L., Van Spronsen, A., Breyer, J., Guglielmi, P., y Strosberg, AD. Molecular characterization of a human anti-Rh(D) antibody with a DH segment encoded by a germ-line sequence. *Eur. J. Biochem.* 1; 207(3): 1115-1121 (1992).

Crawford, D. H., Barlow, M. J., Harrison, J. F., Winger, L. y Huehns, E. R. Production of human monoclonal antibody to rhesus D antigen. *Lancet*, i: 386-388 (1983).

Doyle, A., Jones, T. J., Bidwell, J. L., y Bradley, B. A. *In vitro* development of human monoclonal antibody secreting plasmacytomas. *Hum. Immunol.* 13: 199-209 (1985).

Edelman, L., Margarine, C., Chaabihi, H., Monchâtre, E., Blanchard, D., Cardona, A., Morin, F., Dumas, G., Petres, S. y Kaczorek, M. Obtaining a functional recombinant anti-rhesus (D) antibody using the baculovirus-insect cell expression System. *Immunology*, Vol. 91 (1), 13-19 (1997).

Foung, S. K. H., Blunt, J. A., Wu, P. S., Ahearn, P., Winn, L. C., Engleman, E. G. y Grumet, F. C. Human Monoclonal Antibodies to Rho (D). *Vox Sang.* 53: 44-47 (1987).

Goossens, D., Champomier, F., Rouger, P., y Salmon, C. Human Monoclonal Antibodies against Blood Group Antigens: Preparation of a series of stable EBV immortalized B clones producing high levels of antibody of different isotypes and specificities. *J. Immunol. Methods* 101: 193-200 (1987).

Issitt, P. D. Genetics of the Rh Blood Group System: Some Current Concepts. *Med. Lab. Sci.* 45: 395-404 (1988).

- Jefferis, R., Lund, J., Mizutani, H., Nakagawa, H., Kawazoe, Y., Arata, Y. y Takahashi, N.** A comparative study of the N-linked oligosaccharides structure of human IgG Subclass proteins. *Biochem. J.*, 268: 529-537 (1990).
- Koskimies, S.** Human Lymphoblastoid Cell Line Producing Specific Antibody against Rh-Antigen D. *Scand. Immunol.* 11: 73-77 (1980).
- Kumpel, B. M., Goodrick, M. J., Pamphilon, D. H., Fraser, I. D., Poole G. D., Morse, C., Standen, G. R., Chapman, G. E., Thomas, D. P. y Anstee, D. J.** Human Rh D monoclonal antibodies (BRAD-3 and BRAD-5) Cause Accelerated Clearance of Rh D + Red blood Cells and Suppression of Rh D Immunization in Rh D Volunteers. *Blood*, Vol. 86, n° 5, 1701-1709 (1995).
- Kumpel, B. M., Poole, G. D. y Bradley, B. A.** Human Monoclonal Anti-D Antibodies. I. Their Production, Serology, Quantisation and Potential Use as Blood Grouping Reagents. *Brit. J. Haemat.* 71: 125-129 (1989a).
- Kumpel, B. M., Rademacher, T. W., Rook, G. A. W., Williams, P. J., Wilson, I. B. M.** Galactosylation of human IgG anti-D produced by EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines is dependent on culture method and affects Fc receptor mediated functional activity. *Hum. Antibodies and Hybridomas*, 5: 143-151 (1994).
- Leatherbarrow, R. J., Rademacher, T. W., Dwek, R. A., Woof, J. M., Clark, A., Burton, D. R., Richardson, N. y Feinstein, A.** Effector functions of monoclonal aglycosylated mouse IgG2a; binding and activation of complement component C1 and interaction with human Fc receptor. *Molec. Immun.* 22, 407-415 (1985).
- Lomas, C., Tippet, P., Thompson, K. M., Melamed, M. D. y Hughes-Jones, N.C.** Demonstration of seven epitopes on the Rh antigen D using human monoclonal anti-D antibodies and red cells from D categories. *Vox Sang.* 57: 261-264 (1989).
- Lund, J., Takahashi, N., Nakagawa, H., Goodall, M., Bentley, T., Hindley, S. A., Tyler, R. y Jefferis, R.** Control of IgG/Fc glycosylation: a comparison of oligosaccharides from chimeric human/mouse and mouse subclass immunoglobulin G5. *Molec. Immun.* 30, n° 8, 741-748 (1993).
- Lund, J., Tanaka, T., Takahashi, N., Sarmay, G., Arata, Y. y Jefferis, R.** A protein structural change in aglycosylated IgG3 correlates with loss of hu Fc RI and hu Fc7RIII binding and/or activation. *Molec. Immun.* 27, 1145-1153 (1990).
- Ma, J. K. y Hein, M. B.** Immunotherapeutic potential of antibodies produced in plants. *Trends Biotechnol.* 13, 522-527 (1995).
- Mc Cann-Carter, M. C., Bruce, M., Shaw, E. M., Thorpe, S. J., Sweeney, G. M., Armstrong, S. S. y James, K.** The production and evaluation of two human monoclonal anti-D antibodies. *Transf. Med.* 3: 187-194 (1993).
- Melamed, M. D., Gordon, J., Ley, S. J., Edgar, D. y Hughes-Jones, N. C.** Senescence of a human lymphoblastoid clone producing anti-Rhesus (D) *Eur. J. Immunol.* 115: 742-746 (1985).
- Parekh, R. B., Dwek, R. A., Sutton, B. J., Fernandes, D. L., Leung, A., Stanworth, D., Rademacher, T. W., Mizuochi, T., Taniguchi, T., Matsuta, K., Takeuchi, F., Nagano, Y., Miyamoto, T. y Kobata, A.** Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature*, 316: 452-457 (1985).
- Rothman, R. J., Perussia, B., Herlyn, D. y Warren, L.** Antibody-dependent cytotoxicity mediated by natural killer cells is enhanced by castanospermine-induced alterations of IgG glycosylation. *Mol. Immunol.* 26(12): 1113-1123 (1989).
- Shitara K., Nakamura K., Tokutake-Tanaka Y., Fukushima M., y Hanai N.** A new vector for the high level expression of chimeric antibodies to myeloma cells. *J. Immunol. Methods* 167: 271-278 (1994).
- Thompson, K. M., Hough, D. W., Maddison, P. J., Melamed, M. D. y Hughes-Jones, N. C.** Production of human monoclonal IgG and IgM antibodies with anti-D (rhesus) specificity using heterohybridomas. *Immunology* 58: 157-160 (1986).
- Thomson, A., Contreras, M., Gorick, B., Kumpel, B., Chapman, G. E. Lane, R. S., Teesdale, P. Hughes-Jones, N. C. y Mollison, P. L.** Clearance of Rh D-positive red cells with monoclonal anti-D. *Lancet* 336: 1147-1150 (1990).
- Tippet, P.** Sub-divisions of the Rh (D) antigen. *Med. Lab. Sci.* 45: 88-93 (1988).
- Ware, R. E. y Zimmerman, S. A.** Anti-D: Mechanisms of action. *Seminars in Hematology*, vol. 35, n° 1, sup. 1: 14-22 (1998).

ES 2 320 412 T3

Yu, I. P. C., Miller, W. J., Silberklang, M., Mark, G. E., Ellis, R. W., Huang, L., Glushka, J., Van Halbeek, H., Zhu, J. y Alhadeff, J. A. Structural characterization of the N-Glycans of a humanized anti-CD18 murine immunoglobulin G. *Arch. Biochem. Biophys.* 308, 387-399 (1994).

- 5 **Zupanska, B., Thompson, E., Brojer, E. y Merry, A. H.** Phagocytosis of Erythrocytes Sensitized with Known Amounts of IgG1 and IgG3 anti-Rh antibodies. *Vox Sang.* 53: 96-101 (1987).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de un anticuerpo monoclonal capaz de activar las células efectoras que expresan el FcγRIII, **caracterizado** porque comprende las etapas siguientes:
 - a) purificar anticuerpos monoclonales obtenidos a partir de diferentes clones que proceden de líneas celulares seleccionadas de entre los hibridomas, en particular los heterohibridomas y las líneas celulares animales o humanas transfectadas con la ayuda de un vector que comprende el gen que codifica para dicho anticuerpo;
 - b) añadir cada anticuerpo obtenido en la etapa a) en una mezcla de reacción distinta que comprende las células diana de dichos anticuerpos, unas células efectoras que comprenden unas células que expresan el FcγRIII, y unas IgG polivalentes,
 - c) determinar el porcentaje de lisis de las células diana y seleccionar los anticuerpos monoclonales que activan las células efectoras que provocan una lisis significativa de las células diana (actividad ADCC de tipo FcγRIII).
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los clones proceden de líneas celulares heterohíbridas obtenidas por fusión de linfocitos B humanos que proceden de sujetos inmunizados con unas células de mieloma murino, humano o heterohíbrido, en particular el mieloma K6H6-B5 (ATCC nº CRL 1823).
3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los clones proceden de líneas celulares animales o humanas transfectadas con la ayuda de un vector que contiene el gen que codifica para una inmunoglobulina humana de tipo IgG, pudiendo dichas líneas ser seleccionadas en particular de entre las líneas CHO-K, CHO-Lec10, CHO Lec-1, CHO Pro-5, CHO dhfr-, Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, YB2/0, BHK, K6H6, NSO, SP2/0-Ag 14 y P3X63Ag8.653.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque las IgG polivalentes inhiben el mecanismo de lisis de las células efectoras a través del receptor FcγRIII.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se seleccionan los anticuerpos que presentan un porcentaje ADCC de tipo FcγRIII superior a 60%, 70%, 80% o preferentemente superior a 90%.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque las células diana son unos hematíes tratados con papaina.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se deposita por pocillo:
 - 100 μl de anticuerpos monoclonales purificados con unas concentraciones de 20 a 200 ng/ml,
 - 25 μl de hematíes papainados, es decir, aproximadamente 1×10^6 células,
 - 25 μl de células efectoras, es decir, aproximadamente 2×10^6 células, y
 - 50 μl de IgG polivalentes, en particular de TEGELINE™, con una concentración comprendida entre 1 y 20 mg/ml.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se compara la cantidad de lisis de las células diana con dos controles positivos que consisten en un compuesto químico tal como NH₄Cl y un anticuerpo de referencia activo *in vivo*, y con un control negativo que consiste en un anticuerpo inactivo *in vivo*.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque los anticuerpos monoclonales son unos anti-Rh(D), y las células diana son unos hematíes rhesus D.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** porque se usan los anticuerpos policlonales de origen comercial como controles positivos, y un anticuerpo monoclonal no apropiado para inducir un aclaramiento *in vivo* como control negativo.
11. Anticuerpos susceptibles de ser obtenidos a partir de un procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizados** porque presentan unos porcentajes ADCC de tipo FcγRIII superiores a 60%, 70%, 80% o preferentemente superiores a 90% con relación al policlonal de referencia, y porque poseen sobre su sitio de glicosilación (Asn 297) Fcγ de las estructuras glicánicas de tipo biantenadas, con unas cadenas cortas, una baja sialilación, y un contenido superior al 60% para las formas G0 + G1 + G0F + G1F, siendo las formas G0F + G1F superiores a 50%.
12. Anticuerpo monoclonal dirigido contra un antígeno determinado, **caracterizado** porque activa las células efectoras que expresan el FcγRIII que provoca una lisis superior a 60%, 70%, 80%, preferentemente superior a 90% de la lisis provocada por unos anticuerpos policlonales dirigidos contra dicho antígeno, y porque posee sobre su sitio

de glicosilación (Asn 297) Fcγ de las estructuras glicánicas de tipo biantenadas, con unas cadenas cortas, una baja sialilación, y un contenido superior al 60% para las formas G0 + G1 + G0F + G1F, siendo las formas G0F + G1F inferiores a 50%.

- 5 13. Anticuerpo monoclonal según una de las reivindicaciones 11 y 12, **caracterizado** porque está dirigido contra el antígeno rhesus D.
14. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 13, **caracterizado** porque está producido por unos clones derivados de las líneas Vero (ATCC n° CCL 81), YB2/0 (ATCC n° CRL 20 1662) o CHO Lec-1 (ATCC n° CRL 1735).
- 10 15. Anticuerpo según una de las reivindicaciones 12 a 14, **caracterizado** porque se trata de una IgG1 o de una IgG3.
16. Anticuerpos susceptibles de ser obtenidos a partir de un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizados** porque poseen sobre su sitio de glicosilación (Asn 297) Fcγ de las estructuras glicánicas de tipo biantenadas, con unas cadenas cortas, una baja sialilación, y un contenido superior a 60% para las formas G0 + G1 + G0F + G1F, siendo las formas G0F + G1F inferiores a 50%.
- 15 17. Anticuerpo según la reivindicación 16, **caracterizado** porque su estructura glicánica presenta unas manosas terminales y/o unas N-acetilglucosaminas terminales no intermedias.
- 20 18. Anticuerpo monoclonal, **caracterizado** porque posee en su sitio de glicosilación (Asn 297) Fcγ de las estructuras glicánicas de tipo biantenadas, con unas cadenas cortas, una baja sialilación, unas manosas terminales y/o unos GlcNAc terminales no intermedios.
- 25 19. Anticuerpo monoclonal según la reivindicación 18, dirigido contra un antígeno determinado, **caracterizado** porque activa las células efectoras FcγRIII+ provocando una lisis superior a 60%, 70%, 80%, preferentemente superior a 90% de la lisis provocada por unos anticuerpos policlonales dirigidos contra dicho antígeno.
- 30 20. Células que producen un anticuerpo según una de las reivindicaciones 11 a 19.
21. Células según la reivindicación 20, **caracterizadas** porque se trata de un hibridoma, en particular de un heterohibridoma obtenido por fusión con mieloma K6H6-B5 (ATCC n° CRL 1823) o de una célula animal o humana transfectada con la ayuda de un vector que comprende el gen que codifica para dicho anticuerpo, en particular una célula derivada de las líneas Vero (ATCC n° CCL 81), YB2/0 (ATCC n° CRL 1662) o CHO Lec-1 (ATCC n° CRL 1735).
- 35 22. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según una de las reivindicaciones 11 a 19.
- 40 23. Uso de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, para la preparación de un medicamento.
24. Uso de un anticuerpo anti-Rh(D) según una de las reivindicaciones 11 a 19, para la preparación de un medicamento destinado a la prevención de la aloinmunización Rhesus de individuos Rh negativo.
- 45 25. Uso según la reivindicación 24 de manera profiláctica para la protección de mujeres Rhesus negativo, inmediatamente después del nacimiento de un hijo Rhesus positivo, para prevenir, durante los embarazos ulteriores, la enfermedad hemolítica del recién nacido (MHNN).
26. Uso según la reivindicación 23 durante abortos, embarazos extra uterinos en situación de incompatibilidad Rhesus D.
- 50 27. Uso según la reivindicación 23 durante hemorragias transplacentarias que resultan de amniocentesis, de biopsias coriónicas, o de manipulaciones obstétricas traumatizantes en situación de incompatibilidad Rhesus D.
- 55 28. Uso según la reivindicación 23, en el caso de transfusiones Rh incompatibles con sangre o derivados sanguíneos lábiles.
29. Uso según la reivindicación 23, para la preparación de un medicamento destinado a un uso terapéutico en la Púrpura Trombocitopénica Idiopática (PTI).
- 60 30. Uso según la reivindicación 23, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de cánceres por inmunoterapia.
31. Uso según la reivindicación 23, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de infecciones causadas por unos agentes patógenos víricos o bacterianos.
- 65 32. Kit de diagnóstico que comprende un anticuerpo según una de las reivindicaciones 11 a 19.

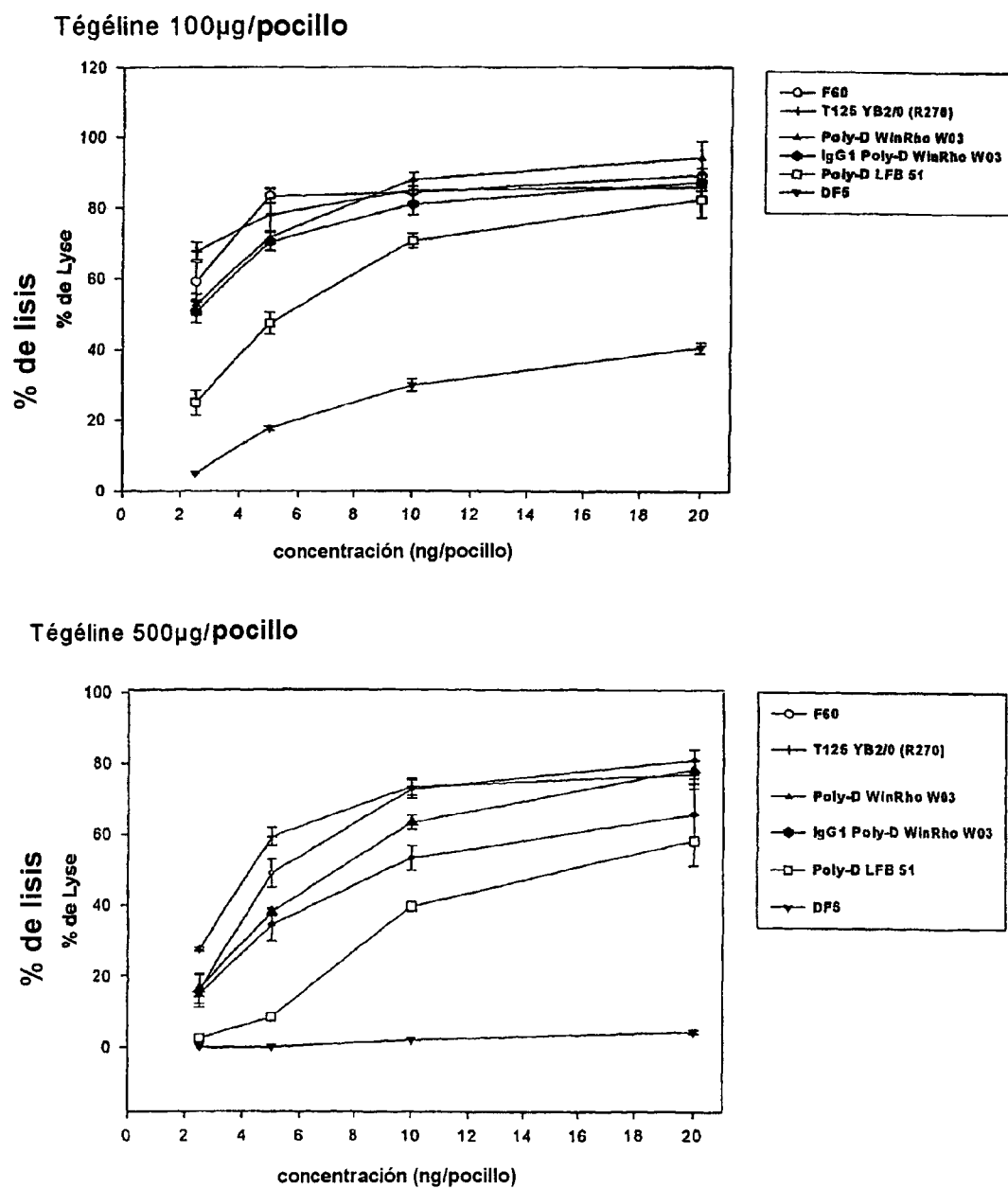


FIGURA 1

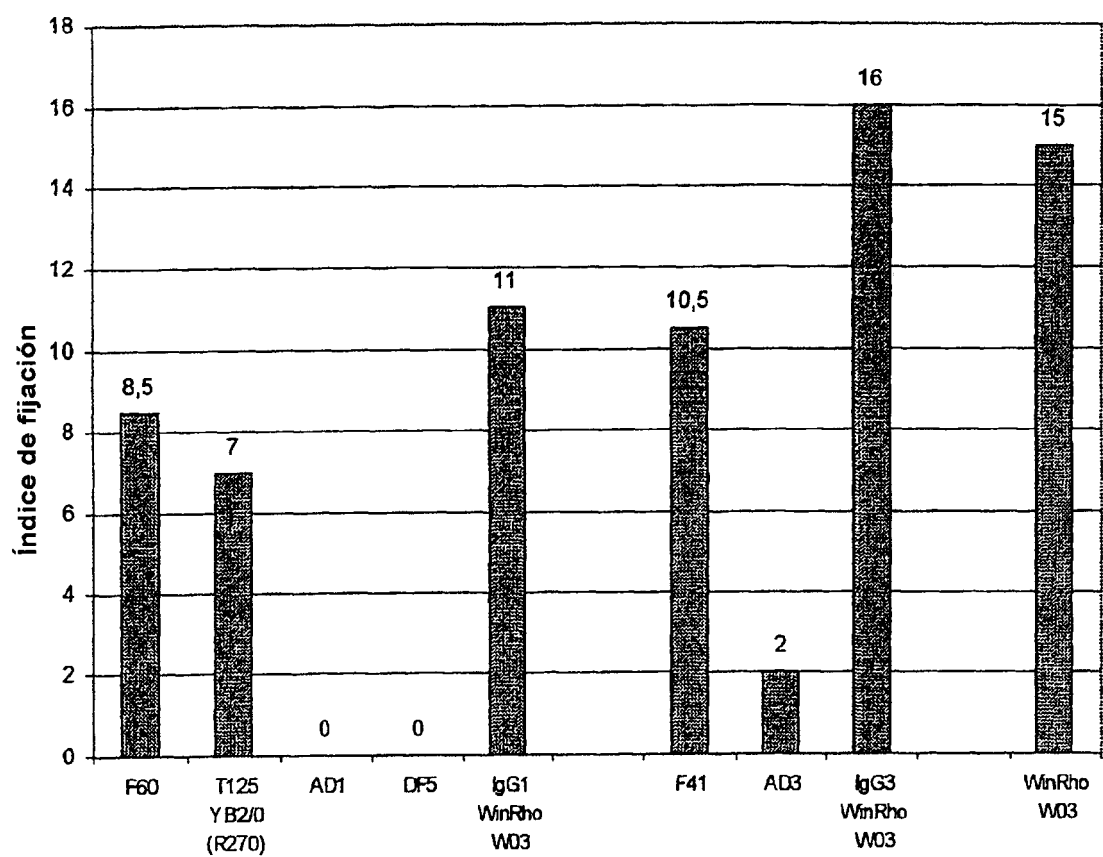


FIGURA 2

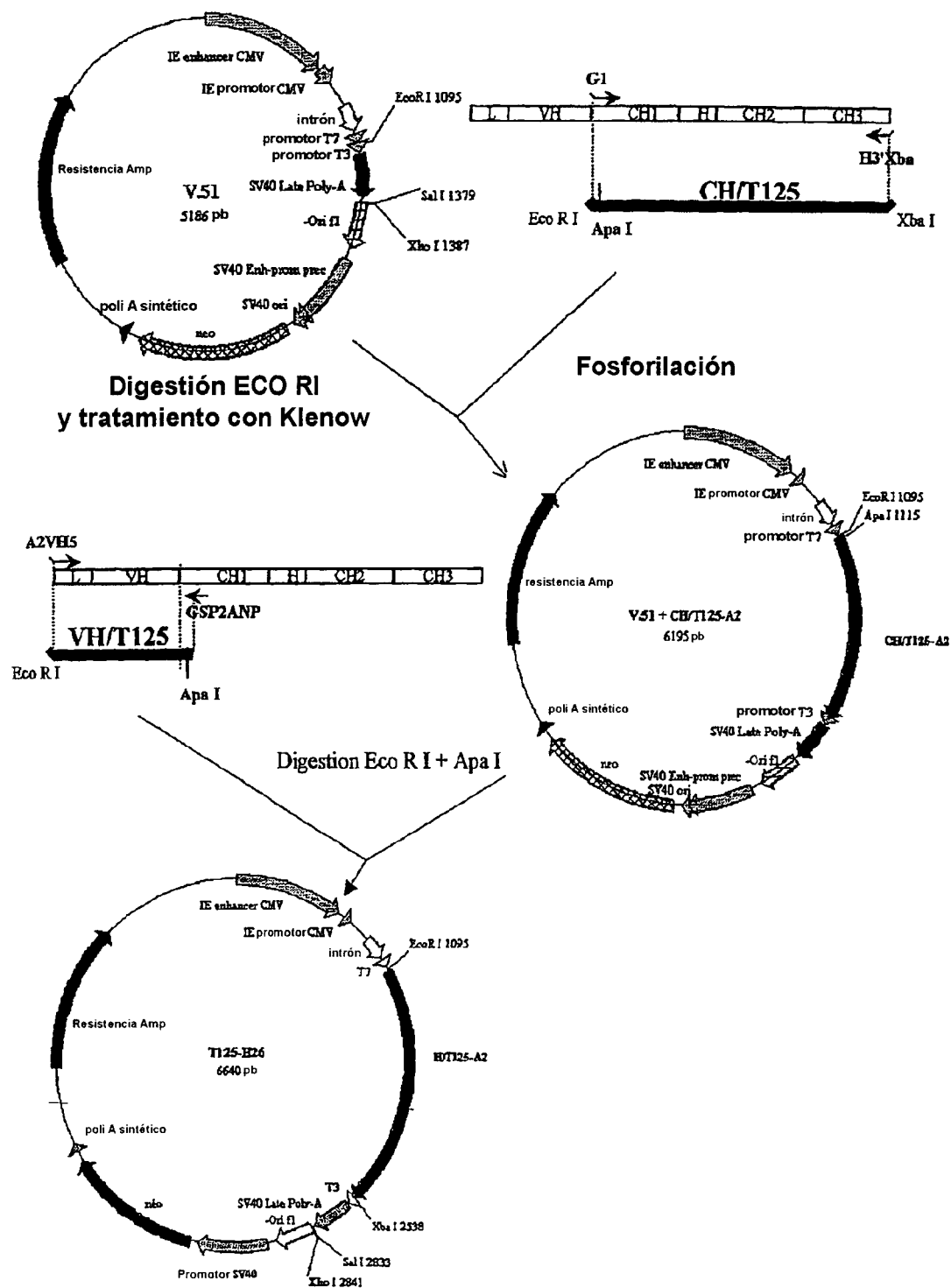


FIGURA 3

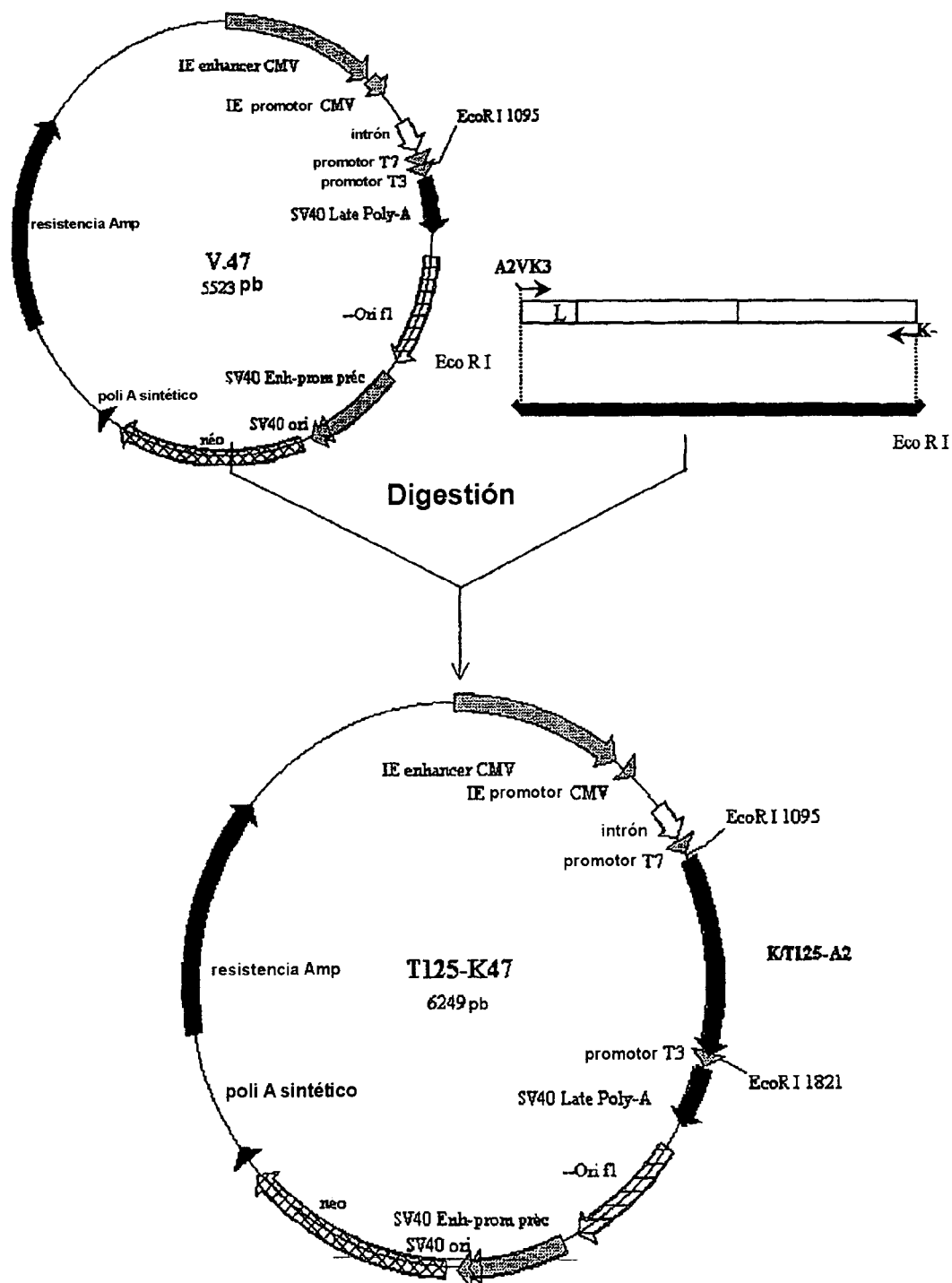


FIGURA 4

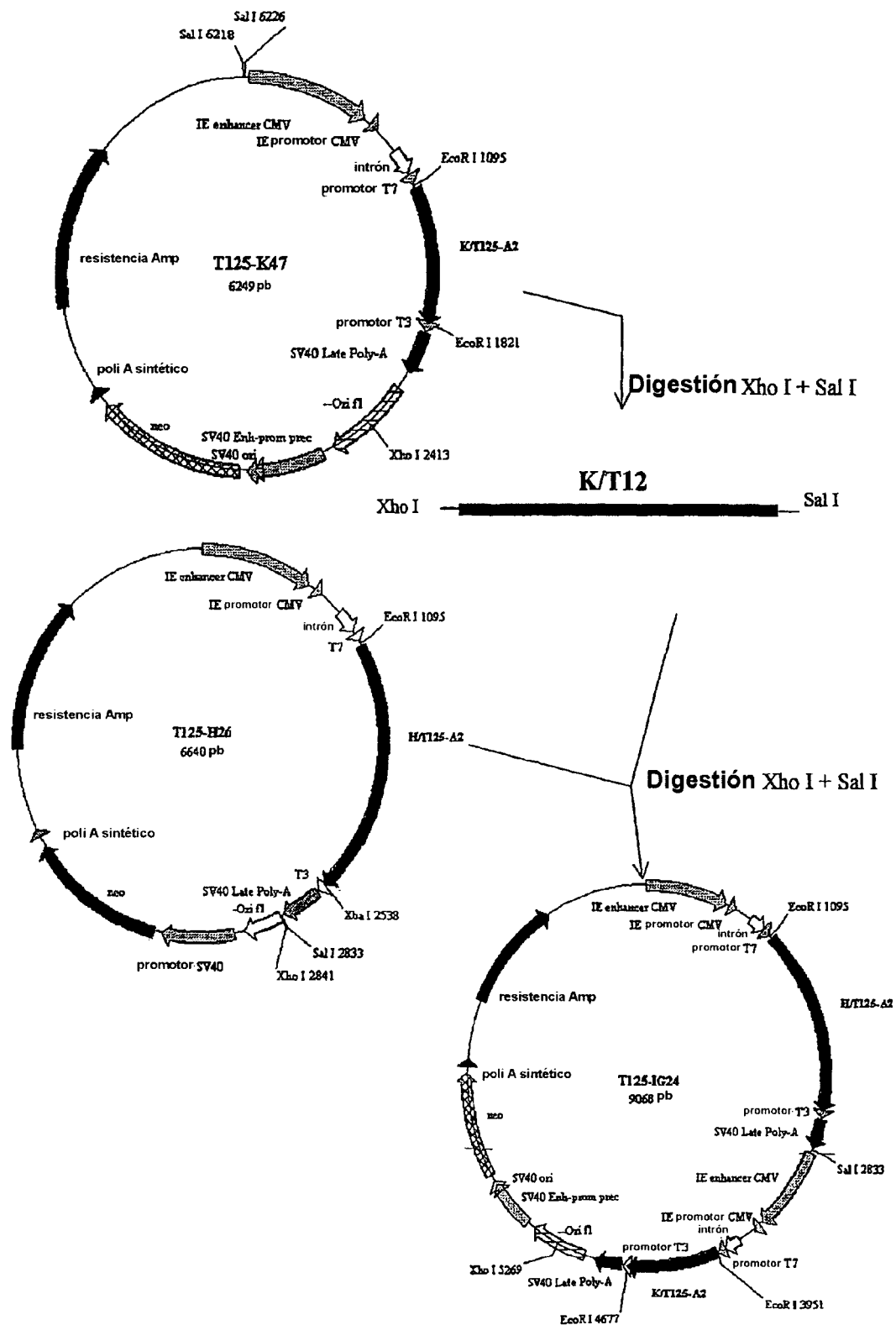


FIGURA 5

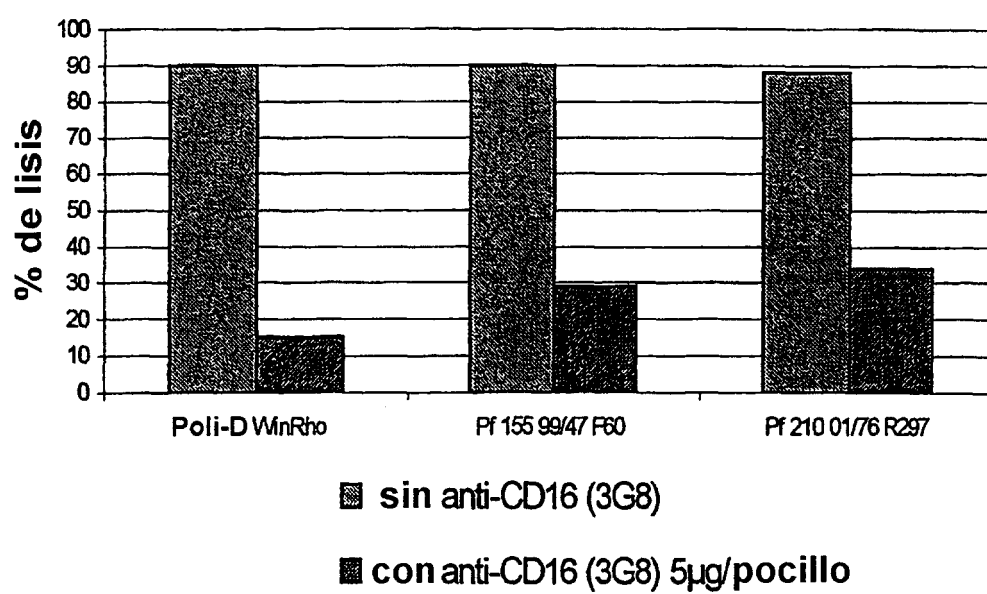


FIGURA 6

ES 2 320 412 T3

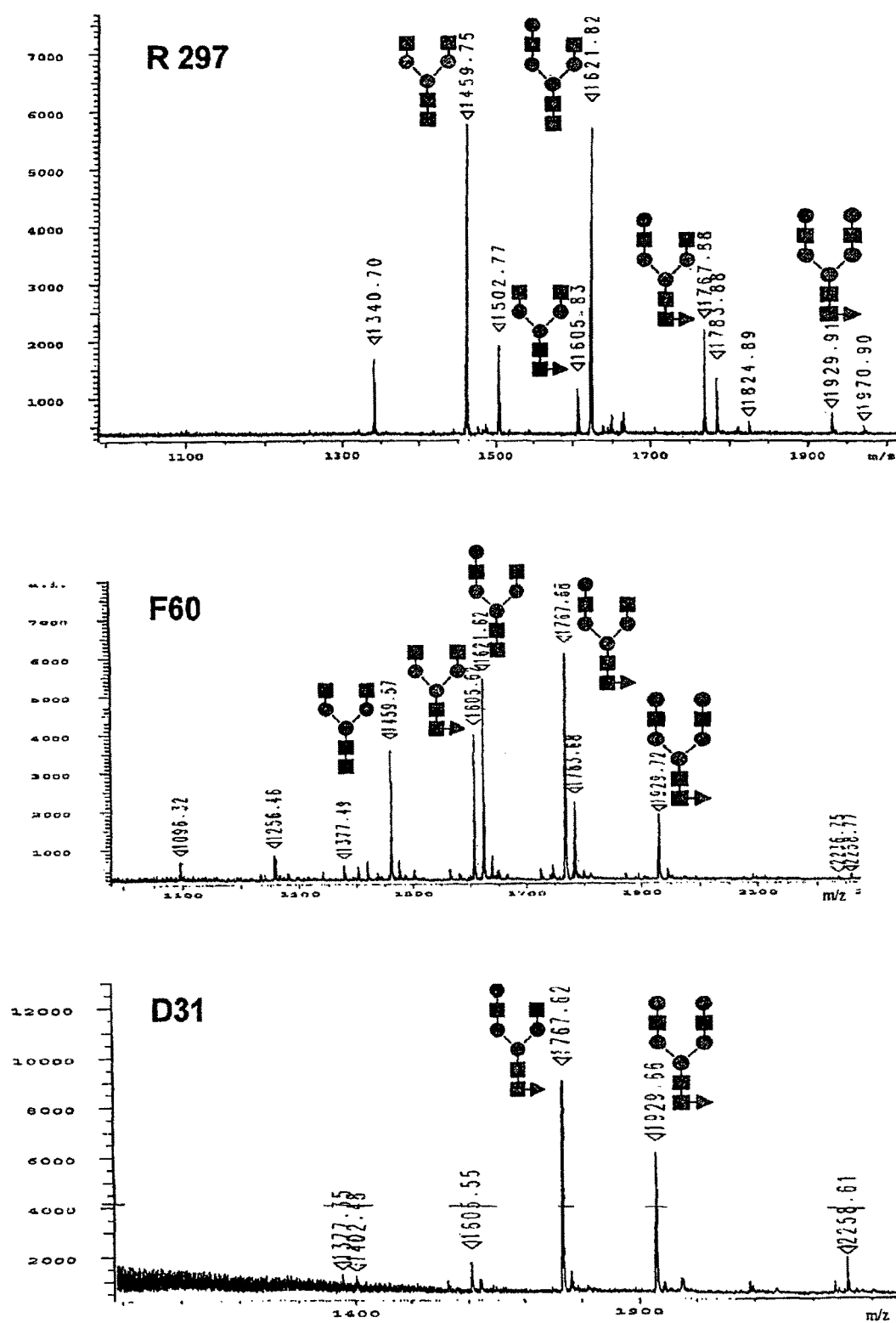


Figura 7

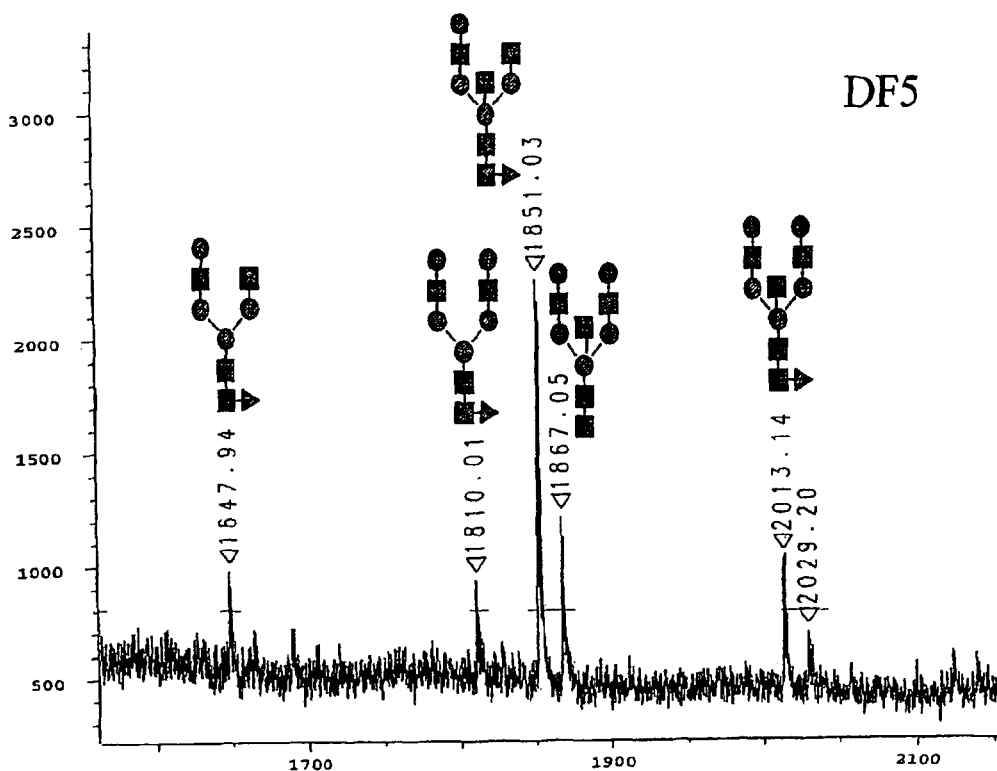
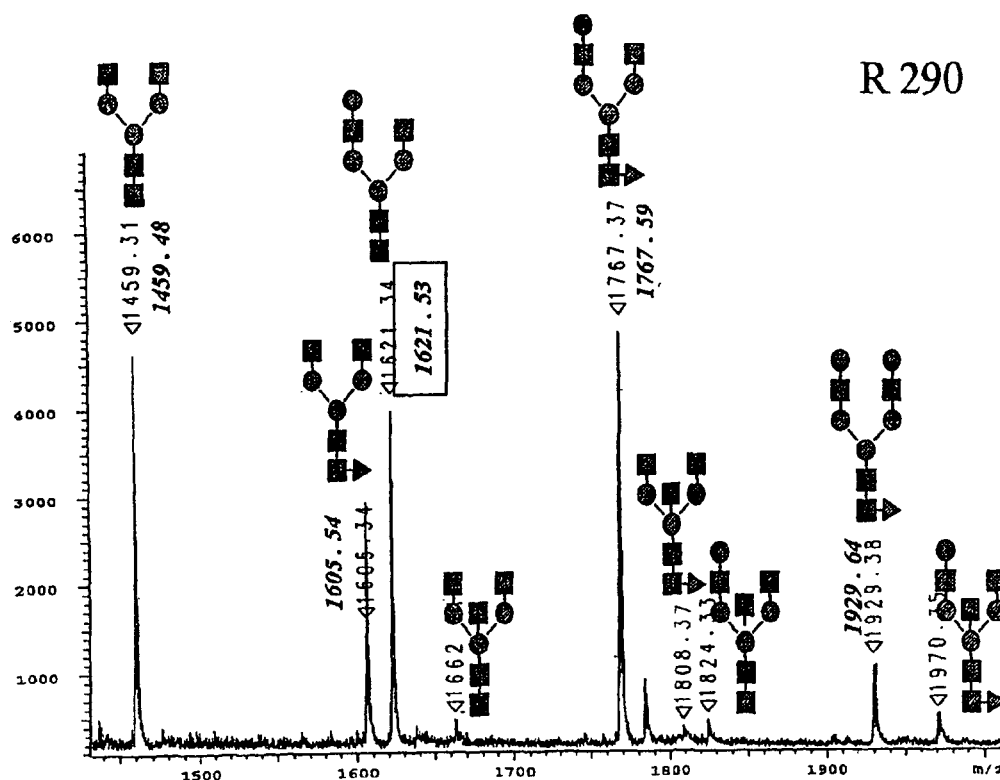


Figura 8

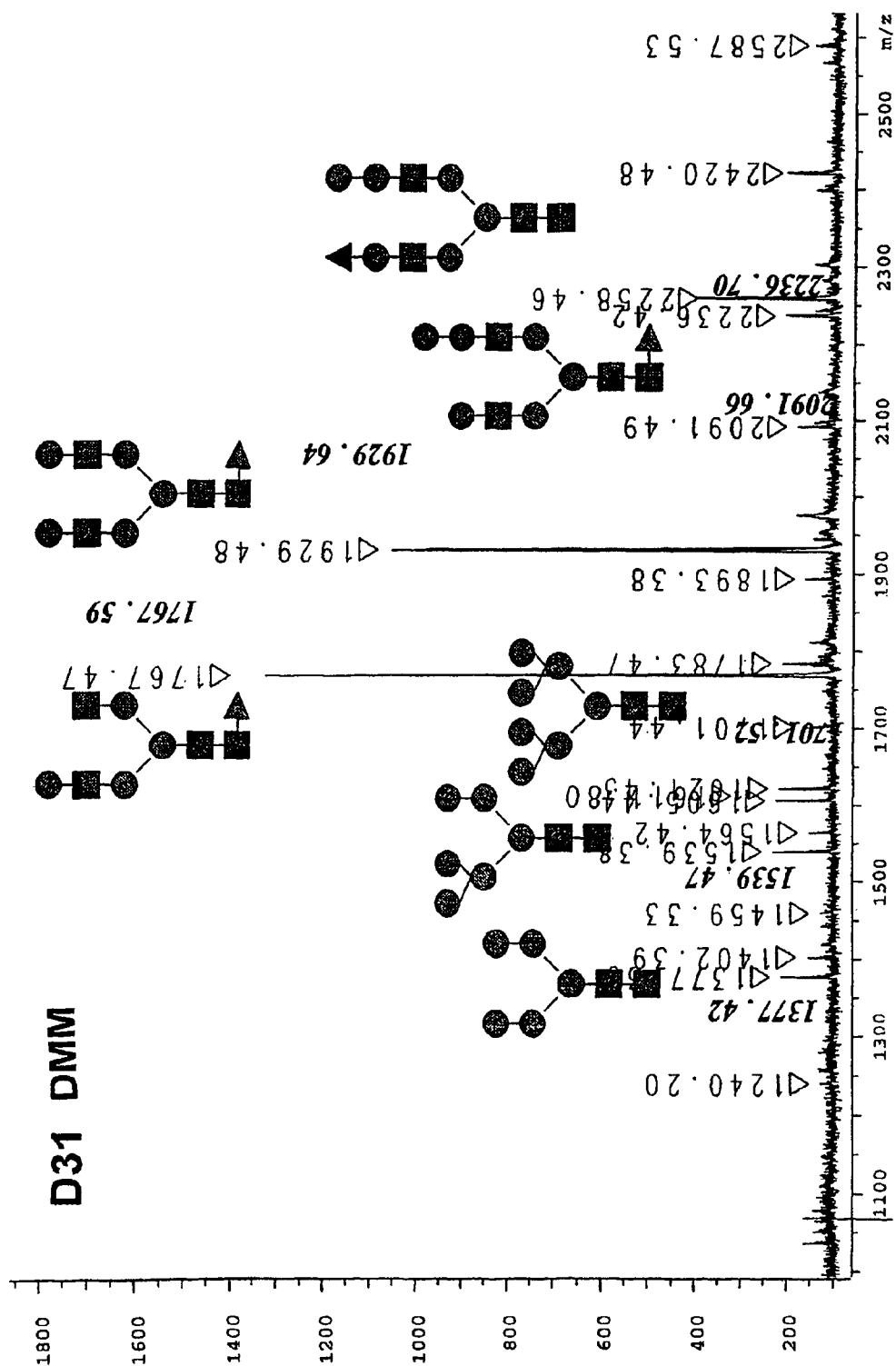


Figura 9